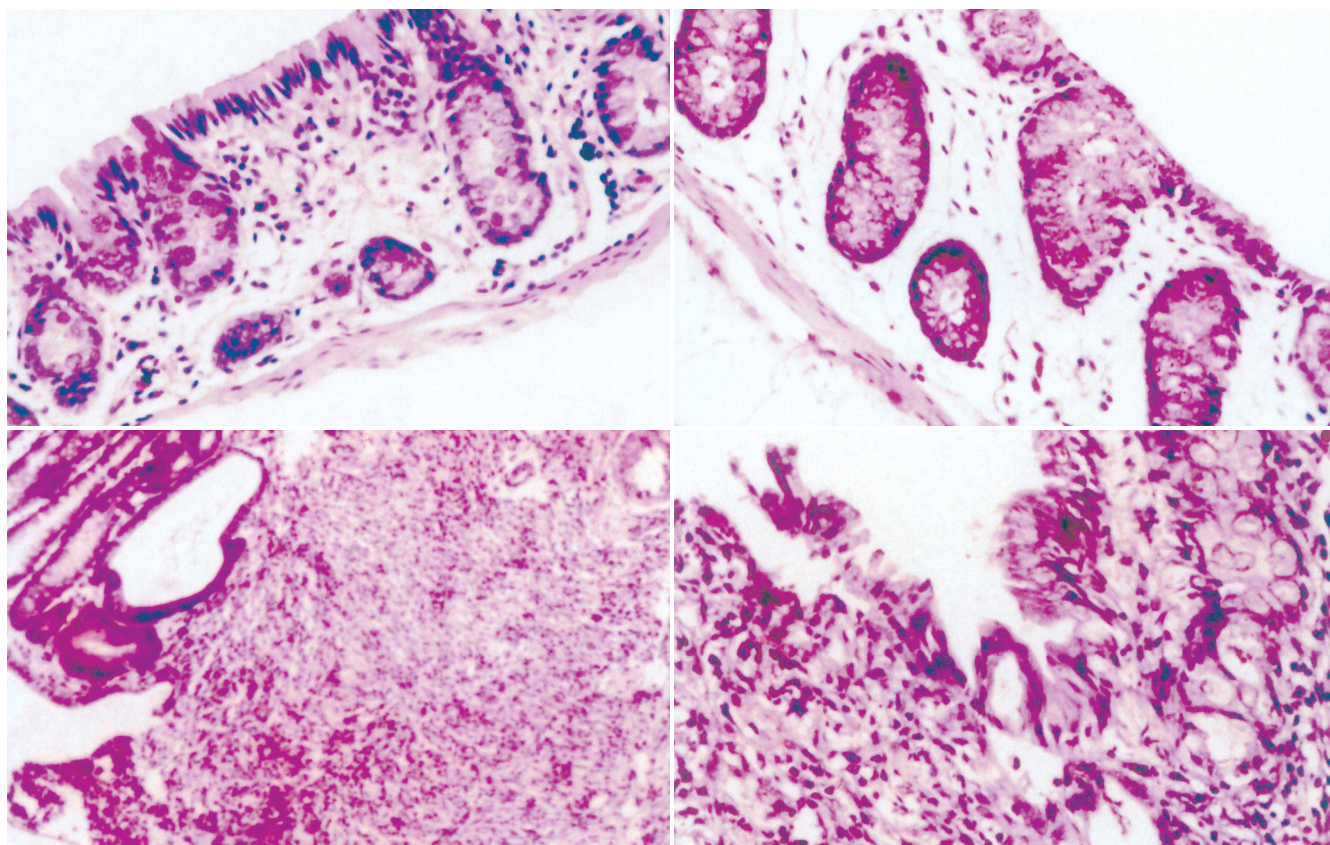


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2006 年 7 月 28 日 第 14 卷 第 21 期 (Volume 14 Number 21)



21 / 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
别平教授	重庆
白文元教授	石家庄
白玉贤教授	哈尔滨
蔡淦教授	上海
蔡开琳副教授	武汉
曹洁副教授	上海
曹志成院士	香港

陈海龙教授	大连
陈红松研究员	北京
陈积圣教授	广州
陈建荣副教授	南通
陈立波副教授	武汉
陈凇教授	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
程树群副教授	上海
迟宝荣教授	长春
崔云甫教授	哈尔滨
代文杰教授	哈尔滨
戴冬秋教授	沈阳
党双锁副教授	西安
邓长生教授	武汉
董蕾教授	西安
杜群研究员	广州
樊红副教授	南京
范建高教授	上海
范志宁主任医师	南京
房静远教授	上海
傅春彬主任医师	吉林
高成新教授	上海
高春芳研究员	上海
高峰教授	西安
高润平教授	长春
戈之铮教授	上海
龚国忠教授	长沙
龚建平教授	重庆
巩鹏副教授	大连
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
郝春秋副教授	西安
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
李军祥教授	北京
李奇林教授	广州
李胜研究员	济南
李涛主治医师	北京
李晓宇主任医师	北京
李旭副教授	广州
李延青教授	济南
李永哲副研究员	北京
李瑗教授	南宁
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
林胜璋副教授	温州
林勇讲师	上海
刘宝瑞教授	南京
刘彬彬副研究员	上海
刘冰熔教授	哈尔滨
刘成海研究员	上海
刘平教授	上海
刘杞教授	重庆
刘铁夫教授	哈尔滨
刘颖斌副教授	杭州
刘占举教授	郑州

世界华人消化杂志®

编辑委员会

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

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2006 年 7 月 28 日 第 14 卷 第 21 期 (总第173期)

述 评	2049 中西医与分子靶向综合治疗胰腺癌的进展 曹志成
基 础 研 究	2055 蛋白激酶B丝氨酸磷酸化在非乙醇性脂肪肝发病机制中的作用 韩继武, 詹晓蓉, 阴惠清, 梁桂敏, 何强, 王月影 2060 银杏叶提取物抗大鼠肝纤维化中激活素A和肝细胞凋亡的作用 时昭红, 刘浩, 刘嵩, 张介眉, 涂晋文 2067 二硝基氯苯引起大鼠结肠炎与神经源性肠炎的关系 吴星宇, 潘慧, 黄鹏, 吴彬, 蒋惠君, 梅林 2073 利用微波固化犬胰腺的实验观察 崔云甫, 郑宏群, 黄睿, 石炯 2077 中药护肝灵对实验大鼠乙醇分解酶的影响 潘年松, 夏庆杰, 黄勋, 张立实 2082 人大肠癌HCT-8/5-FU耐药细胞株的建立及P-gp测定 布立民, 孙淑红, 华建平, 韩英, 赖靖, 鲍文漪
临 床 研 究	2087 胃癌组织与血清中VEGF和bFGF的表达意义 周红凤, 吴瑾, 王翠华, 张波, 刘丹, 王雯, 赵宁 2093 胃癌和癌前病变中错配修复基因hMLH1的表达及意义 肖桂珍, 刘希双 2098 体表超声判定胃癌生物学行为的意义 张艳华, 郭存丽, 顾秀娟, 潘丽霞
文 献 综 述	2102 胃癌相关基因在癌前病变中的表达 凌霄华, 汪丽燕, 关景明, 刘颖, 于欣 2106 uPA纤溶途径与肝纤维化 安德明, 季光, 邢练军, 郑培永 2112 糖尿病及其血管并发症的介入治疗 朱悦琦, 程英升 2116 脂肪性肝病的实验室诊断 陆元善 2123 RNAi的作用机制及抗病毒研究进展 陈煜, 谢小芳
治 疗 指 南	2130 溃疡性结肠炎的外科治疗指南 梁毅超, 卿三华
研 究 快 报	2135 尾静脉液压法注射转hIL-10在大鼠肝组织中的表达 成峰, 王学浩, 肇毅, 黄蓬
临 床 经 验	2139 针刺对功能性消化不良患者近端胃动力的影响 姚筱梅, 姚树坤, 张瑞星 2142 巨大胰腺假性囊肿的处理方法及时机选择 汪建初, 浦润, 李良波, 韦建宝, 韦忠恒, 马日海, 韦邦宁
病 例 报 告	2146 胃恶性间质瘤合并继发性血小板增多症1例 马向涛, 余力伟, 付静

附 录	2149 世界华人消化杂志投稿须知
致 谢	2154 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	2066 第六届全国消化道恶性病变介入治疗研讨会第二轮通知 2072 第八届中西医结合实验医学研讨会 2081 2006年即将召开的国际会议 2097 第三届亚洲大洋洲光生物学大会 2105 技法与经验 2111 更正与说明专栏 2115 专家门诊 2122 2006上海中日早期胃肠肿瘤国际研讨会通告 2129 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 2134 《世界华人消化杂志》简介 2145 2006年第十二届华北区消化学术会议征文通知 2148 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
封面故事	吴星宇, 潘慧, 黄鹏, 吴彬, 蒋惠君, 梅林. 二硝基氯苯引起大鼠结肠炎与神经源性肠炎的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(21):2067-2072 http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2067.asp
国际会议	7th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association September 3-7, 2006 convention@edinburgh.org www.edinburgh.org/conference 71st ACG Annual Scientific Meeting and Postgraduate Course October 20-25, 2006 14th United European Gastroenterology Week 21-25 October 2006 Berlin United European Gastroenterology Federation www.uegw2006.de 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

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 2006-07-28
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 张焕兰 王晓瑜
电子编辑 张敏 李琪
本期审读 张焕兰 王晓瑜

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: wcjd@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 国外代号
82-262 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

July 2006 Contents in Brief Volume 14 Number 21

EDITORIAL	2049 Progress of the integrative and molecular targeted therapies on pancreatic cancer <i>Cao ZC</i>
BASIC RESEARCH	<p>2055 Role of protein kinase B serine phosphorylation in pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease induced by high-fat diets <i>Han JW, Zhan XR, Yin HQ, Liang GM, He Q, Wang YY</i></p> <p>2060 Roles of activin A and hepatocellular apoptosis in the anti-liver fibrosis process induced by Ginkgo biloba extract in rats <i>Shi ZH, Liu H, Liu S, Zhang JM, Tu JW</i></p> <p>2067 Dinitrochlorobenzene-induced colitis and its correlations with neurogenic inflammation of gut in rats <i>Wu XY, Pan H, Huang P, Wu B, Jiang HJ, Mei L</i></p> <p>2073 Experimental study on microwave tissue coagulation of canine pancreas <i>Cui YF, Zheng HQ, Huang R, Shi J</i></p> <p>2077 Effects of <i>Hu Gan Ling</i> on lytic enzymes of ethanol in experimental rats <i>Pan NS, Xia QJ, Huang X, Zhang LS</i></p> <p>2082 Preparation of HCT-8/5-fluorouracil multidrug resistant cell line and detection of P-glycoprotein <i>Bu LM, Sun SH, Hua JP, Han Y, Lai J, Bao WY</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>2087 Expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in gastric carcinoma and their significances <i>Zhou HF, Wu J, Wang CH, Zhang B, Liu D, Wang W, Zhao N</i></p> <p>2093 Expression of DNA mismatch repair gene hMLH1 and its significance in gastric cancer and premalignant lesions <i>Xiao GZ, Liu XS</i></p> <p>2098 Value of transabdominal ultrasonography in investigating biological action of gastric carcinoma <i>Zhang YH, Guo CL, Gu XJ, Pan LX</i></p>
REVIEW	<p>2102 Expression of gastric cancer-associated genes in premalignant lesions <i>Ling XH, Wang LY, Guan JM, Liu Y, Yu X</i></p> <p>2106 Relationship between urokinase plasminogen activator and liver cirrhosis <i>An DM, Ji G, Xing LJ, Zheng PY</i></p> <p>2112 Interventional therapy of diabetes mellitus and its vascular complications <i>Zhu YQ, Cheng YS</i></p> <p>2116 Laboratory diagnosis of hepatic steatosis <i>Lu YS</i></p> <p>2123 Advance in mechanism and anti-viral effect of RNA interference <i>Chen Y, Xie XF</i></p>
TREATMENT GUIDELINE	2130 Surgical guide for ulcerative colitis <i>Liang YC, Qing SH</i>
RAPID COMMUNICATION	2135 Hydrodynamics-based delivery of human interleukin-10 gene in rats <i>Cheng F, Wang XH, Zhao Y, Huang P</i>

CLINICAL PRACTICE	<p>2139 Effect of acupuncture on proximal gastric motility in patients with functional dyspepsia <i>Yao XM, Yao SK, Zhang RX</i></p> <p>2142 Alternatives of timing and surgical treatments for giant pancreatic pseudocysts <i>Wang JC, Pu J, Li LB, Wei JB, Wei ZH, Ma RH, Wei BN</i></p>
CASE REPORT	<p>2146 Aastric stromal tumor complicated with secondary thrombocythemia: one case analysis <i>Ma XT, Yu LW, Fu J</i></p>
APPENDIX	<p>2149 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology</p>
ACKNOWLEDGMENT	<p>2154 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
COVER	<p><i>Wu XY, Pan H, Huang P, Wu B, Jiang HJ, Mei L.</i></p> <p>Dinitrochlorobenzene-induced colitis and its correlations with neurogenic inflammation of gut in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(21):2067-2072 http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2067.asp</p>
INTERNATIONAL MEETINGS	<p>7th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association September 3-7, 2006 convention@edinburgh.org www.edinburgh.org/conference</p> <p>71st ACG Annual Scientific Meeting and Postgraduate Course October 20-25, 2006</p> <p>14th United European Gastroenterology Week 21-25 October 2006 Berlin United European Gastroenterology Federation www.uegw2006.de</p> <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>

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 July 28, 2006

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

Edited by Editorial Board of

World Chinese Journal of Digestology

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Overseas Distributor

China International Book Trading Corporation

PO Box 399, Beijing 100044, China

Code No.M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381901

Fax: +86-10-85381893

Email: wjgd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

Copyright © 2006 by The WJG Press

中西医与分子靶向综合治疗胰腺癌的进展

曹志成

曹志成, 伊利沙伯医院临床肿瘤科 香港特别行政区
曹志成, 香港浸会大学中医药学院博士, 国际认证自然疗法博
士, 加拿大注册自然疗法医师, 伊利沙伯医院临床肿瘤科肿瘤研
究部科学主任. 主要从事临床恶性肿瘤的研究.

通讯作者: 曹志成, 香港九龙加士居道30号伊利沙伯医院R座13
楼1305室, 临床肿瘤科肿瘤研究部. williamcscho@gmail.com

电话: 852-94720348 传真: 852-27156139

收稿日期: 2006-04-18 接受日期: 2006-06-05

摘要

胰腺癌预后不良, 死亡率高居消化道癌症第5位. 现代医学对胰腺癌的病因尚未完全清楚, 但随着肿瘤发生、发展分子机制的逐步了解, 癌细胞与正常细胞的区别将会更加明确, 一些癌细胞特有的分子靶点将成为胰腺癌诊疗的有用工具. 基因检测和蛋白质检测, 以及手术治疗、放射治疗和化学治疗为本病常用的诊疗方法. 另一方面, 中医辨证施治、标本兼治、阴阳平衡等方法 and 理论, 如能恰当地融合到西医对胰腺癌的综合诊疗中, 定将提高治愈率, 并能改善患者的生存质量. 此外, 分子靶向治疗如免疫治疗、核糖核酸干扰等在近年来蓬勃兴起, 尽管其技术仍需改善, 疗效有待提高, 但已给恶性肿瘤的诊疗带来了希望. 本文对胰腺癌作出较详尽的介绍, 并阐述目前胰腺癌诊疗的最新进展.

关键词: 胰腺癌; 中西医综合治疗; 分子靶向治疗; 基因治疗

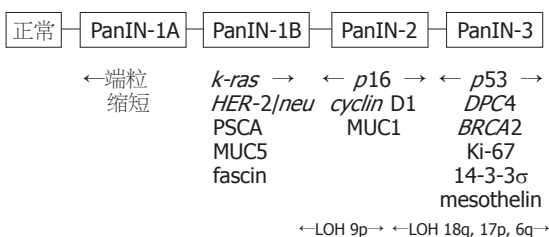
曹志成. 中西医与分子靶向综合治疗胰腺癌的进展. 世界华人消化杂志 2006;14(21):2049-2054

http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2049.asp

0 引言

胰腺癌预后不良, 其发病率近年有显著上升趋势. 据世界卫生组织2002年资料显示, 全球每年新发病例约23.2万, 为世界第13大常见恶性肿瘤, 死亡人数约22.7万, 为消化道癌症第5号杀手. 我国年发病人数约4.3万, 每年约有3.7万人死于此病, 死亡率占癌症中的第7位^[1]. 据统计, 只有约15%病例可进行手术治疗, 5 a生存率不足3%, 超过90%患者在确诊后1 a内死亡, 平均存

西医观点:



PanIN: pancreatic intraepithelial neoplasia, LOH: Loss of heterozygosity.

中医观点:

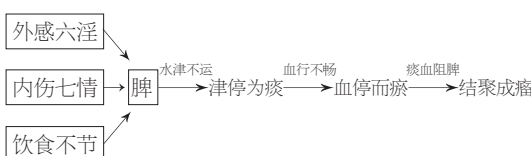


图1 胰腺癌的多步骤癌变机制.

活期少于6 mo^[2].

1 病因及高危因素

现代医学对胰腺癌的病因尚未清楚, 西医认为本病的成因有: (1)吸烟. 吸烟者罹患胰腺癌是非吸烟者的2倍^[3-4]; (2)经常进食高动物脂肪和蛋白、或含亚硝酸盐类食物者, 属高危发病人群^[5]; (3)1型糖尿病患者合并胰腺癌者较一般人高2倍^[6]; (4)亦有认为胰腺癌与家族性慢性胰腺炎或胰腺结石有一定关系, 但目前尚未完全确定(图1). 胰腺癌属中医脾积、积聚、黄疸范畴, 其病位在脾, 中医认为本病的病因病机有: (1)外感湿毒, 损伤脾气, 脾运失司, 水湿不化, 郁而化热, 湿热内蕴, 酿毒结瘤; (2)脾居中州, 为气机升降之枢纽, 内伤忧思, 抑郁伤脾, 脾气郁结, 升降失常, 水津不运, 血行不畅, 津停为痰, 血停而瘀, 痰血阻脾, 结聚成瘤; (3)饮食不节, 内伤酒食, 伤脾损胃, 聚湿生痰, 痰湿瘀血结聚于脾, 日久不散, 酿生癌瘤(图1).

2 临床诊断

根据胰腺癌的发生部位, 可分为胰头癌、胰体癌、胰尾癌和全胰癌, 其临床表现隐匿, 且发病迅速, 常见症状有: (1)腹痛. 胰头癌常有右

■背景资料

胰腺癌是死亡率最高的恶性肿瘤之一, 由于难以早期确诊, 增加了手术的局限性, 加上本病对放、化疗不敏感, 患者平均生存期少于6 mo. 近年个体化中西医结合诊疗的提倡, 与分子靶向治疗的迅猛发展, 为胰腺癌的治疗带来了新希望.

■研发前沿

人类基因组图谱的完成是恶性肿瘤研究的新的里程碑,先进的基因组和蛋白质组科研平台,加速了分子靶向诊疗的研究发展,本文对前沿性的胰腺癌分子靶向治疗作了具体的阐述。

上腹痛,胰体、胰尾癌多见中上腹痛或左上腹痛;(2)黄疸和皮肤瘙痒;(3)体质量下降。常规诊断有:(1)胃肠X线钡餐检查、选择性血管造影(SAG)、纤维胃镜超声检查^[7]或内镜下逆行胰胆管造影(ERCP),有助于与胃部疾病区别;(2)血清免疫生化检测可将急慢性胰腺炎、肝炎、胆囊炎与本病相鉴别;(3)B超、增强螺旋CT扫描或磁共振成像(MRI),可与胆石症、原发性肝癌、壶腹周围癌相鉴别;(4)正电子放射断层扫描(PET)采用定量或半定量方法计算胰腺癌组织中的¹⁸F-FDG含量,有助于胰腺癌与慢性胰腺炎的鉴别诊断,其敏感性可达94%,特异性为88%,但该方法因费用昂贵,不适于常规临床应用;(5)胰腺活组织检查可确诊高度怀疑的病例。

2.1 肿瘤标记物 目前已发现一些与胰腺癌相关的肿瘤标记物,但由于特异性偏低,且对瘤体较小的病例阳性率低,尚未被广泛应用,临床常用的标记物有以下几个:(1)CA19-9:其敏感性、特异性和准确性分别为83%,73%和75%,但小于2 cm的胰腺癌阳性率仅61%;(2)CA50:与CA19-9同属Lewis系统抗原,两者无需同时测定,但CA50和CA242联合检测则可提高敏感性;(3)MIC-1:与正常组比较,其受试者作业特征(ROC)曲线评价结果高达0.99,与慢性胰腺炎比较亦有0.81,比CA19-9更具诊断价值^[8];(4)Span-1:其敏感性和特异性分别为81%和68%,但小于2 cm的胰腺癌阳性率仅56%;(5)Dupan-2:敏感性约60%,若与CA19-9联合检测阳性率可提高至95%;(6)CEA(癌胚抗原):阳性率约79%,CEA阴性者平均生存期为39 mo,可用以判断预后。

2.2 基因检测 随着肿瘤发生、发展分子机制的阐明,癌细胞与正常细胞的区别将会更加明确,一些癌细胞特有的分子靶点将成为胰腺癌诊疗的有用工具^[9]。(1)*ras*:胰腺癌有高表达*k-ras*基因,阳性率达90%,而胰腺其他疾病不具有这种标志性改变,*ras*基因突变的检测,可能成为早期诊断胰腺癌的可靠分子生物学手段^[10-11];(2)*C-erbB-2*和*COX-2*:其基因产物在胰腺癌中呈高表达,与肿瘤大小及预后有关^[12];(3)*p16*,*p21*和*p53*:在胰腺癌中表达率高的抑癌基因,具有特异性,对良、恶性胰腺肿瘤具鉴别价值^[13];(4)*Rap1GAP*:在1p35-p36上*Rap1GAP*的缺失与胰腺癌有关^[14];(5)*PD2/hPaf1*:在19q13上*PD2/hPaf1*的高表达与胰腺癌的发展有关^[15];(6)*SI00A6*:采用微阵列芯片(microarray)检测胰腺液中*SI00A6*信使核糖核酸,可有效鉴别胰腺癌与非恶性肿瘤患者^[16];(7)*RecQ1*,*RAD54L*和

ATM:从单核苷酸多态性研究显示,这些基因与胰腺癌生存期的缩短有关^[17];(8)甲基化检测:利用甲基化特异性基因扩增(MSP)技术量化胰腺液中基因(如*cyclin D2*,*FOXO1*,*NPTX2*,*ppENK*,*p16*,*Reprimo*和*TFPI2*等)甲基化的变化,可有助胰腺癌的诊断^[18-19]。

2.3 蛋白质检测 胰腺癌患者血清中IL-10, TGF- β , VEGF, PSCA和KU-CT-1呈高表达^[20-23],组织中EGFR亦呈高表达^[24],可作为免疫治疗的靶点;应用质谱技术发现血清fibrinogen- γ ^[25]和自身免疫抗体DDX48^[26]在胰腺癌中明显升高,可作为与正常病例区分的生物标志;用蛋白质组定量分析则发现,载脂蛋白E, α -1-抗胰凝乳蛋白酶, inter-alpha-trypsin inhibitor, 组织蛋白酶D, 巨噬细胞集落刺激因子, 纤维连接因子受体, 抑制蛋白1, IGFBP-7和胰岛素样生长因子结合蛋白-2均与胰腺癌有关^[27-29];亦有用表面增强激光解吸离子化-飞行时间质谱(SELDI-TOF MS)技术检测到一系列可能与胰腺癌相关的生物标志^[30-31]。

3 治疗

因胰腺癌早期缺乏特异性临床表现,确诊时往往已届晚期,治疗效果差,死亡率高,常用治疗手段分述如下。

3.1 西医治疗 近年肿瘤治疗越来越趋向综合治疗方向发展,下列常规治疗手段除单独使用外,更常合理地综合应用,提高治愈机会^[32]。(1)手术治疗:为主要治疗方法,胰头癌多采Whipple手术(PD),壶腹周围癌或壶腹部癌可用保留幽门的胰十二指肠切除术(PPPD),癌组织涉及全胰但无肝转移及腹膜种植者,可采取全胰切除术,胰体尾部无癌转移者可采用胰体尾切除术(DP),癌组织与周围器官广泛浸润并向远处转移者,可采用姑息性外科治疗缓解黄疸症状^[33-34];(2)放射治疗:在术前、术中、术后或化疗期间施行放疗对胰腺癌有一定抑制作用,可延长患者生存期^[35-37];(3)化学治疗:虽然胰腺癌对化疗药物不敏感,但化疗可延长生存期,使部分病情得以缓解,如以raltitrexed-oxaliplatin联合化疗来治疗单药gemcitabine耐药患者的胰腺癌转移^[38],实验显示trichostatin A联合其他化疗药物一同使用,有增效作用^[39],临床试验证明口服药物erlotinib联合gemcitabine能延长晚期患者的生存期^[40],而gemcitabine联合epirubicin治疗晚期胰腺癌患者亦已进入II期临床试验,效果令人鼓舞^[41],其他

常用联合化疗方案有FAM, FAP和MA等。

3.2 中医治疗 中医治疗胰腺癌讲求辨证论治, 按其个体临床症状可分为: (1)气滞血瘀、络脉瘀阻者, 方以金铃子散合失笑散加味, 用以行气活血、散结止痛; (2)痰瘀交凝、积聚于脾者, 方以膈下逐瘀汤合涤痰汤化裁, 用以涤痰化瘀、软坚散结; (3)邪毒内攻、胆火上炎者, 方以茵陈蒿汤合黄连解毒汤加减, 用以清热解毒、利胆泄浊; (4)气虚血弱、脉络瘀阻者, 方以十全大补汤加减, 用以益气养血、化瘀散结。

3.3 中西医结合治疗 胰腺癌的治疗目前尚无新的突破, 仍以早期手术切除为首选, 但手术切除率不高, 确诊时大多数为中晚期患者, 因此适宜用个体化中西医结合治疗, 常用治疗方案有: (1)手术与中医药结合治疗. 根治手术后可以中药健脾和胃、益气养血, 仅作姑息性手术治疗者, 术后可用中药改善体质, 增强机体抵抗能力; (2)化疗与中医药结合治疗. 健脾益气中药可减轻化疗毒副反应, 如红、白细胞和血小板低下, 也可减少哆嗦、乏力等症状, 更能提高疗效; (3)手术、放疗与中医药结合治疗. 根治手术后采用放疗和长期以疏肝健脾中药治疗, 对提高远期生存具有一定意义; (4)手术、化疗与中医药结合治疗. 姑息性手术治疗后结合扶正固本中药和化疗药物, 对改善生存质量和延长生存期有一定帮助。

3.4 疼痛治疗 胰腺癌患者多伴有痛症, 且疼痛难忍, 痛时常不能平卧, 夜间加重, 影响进食和睡眠, 止痛方法有: (1)阿司匹林. 适用于轻至中度疼痛; (2)吗啡. 用于缓解中度至重度疼痛; (3)神经阻滞. 经皮或术中注射药物行内脏神经阻滞, 通过化学方法破坏腹腔神经节; (4)针刺. 体针可取三阴交、太神、公孙(双侧), 耳针可取交感、神门、三焦、脾穴(双侧); (5)中药. 徐长卿和雷公藤均具止痛效力, 可用水煎服。

3.5 分子靶向治疗 目前用以治疗胰腺癌最常用的基因治疗方法, 是将靶向基因载体直接注射或导入体内的肿瘤组织, 进行局部性基因治疗, 近年更采用联合基因治疗, 以增强疗效, 由于能针对肿瘤内特有的基因变异情况进行修复或促使肿瘤细胞死亡, 基因治疗具有广阔的应用前景^[42-44], 常用分子靶向治疗策略有: (1)抑癌基因治疗. 将具有正常功能的野生型抑癌基因(如 *p53*, *p21*, *Rb*, *Thoc1/p84*等)转染至胰腺癌细胞中, 重建失活的抑癌基因功能, 恢复细胞的正常

生长表型, 或诱导细胞凋亡, 从而达到控制胰腺癌细胞异常生长的目的^[45]; (2)病毒基因治疗. 利用肿瘤细胞和正常细胞中抑癌基因(如 *p53*, *Rb*等)的差别, 以蛋白质(如E1A, E1B等)缺陷的腺病毒导入胰腺癌组织, 病毒的大量繁殖可导致肿瘤细胞裂解死亡^[46]; (3)自杀基因治疗. 把自杀基因(如 *TK*, *CD*, *mda-7/IL-24*, *PNP*, *XGPRT*等)转染至胰腺癌细胞中, 能将前体药物(如ACV, GCV等)转化为对分裂细胞具杀伤作用的代谢产物, 从而特异性地杀伤胰腺癌细胞^[47-48]; (4)修饰基因治疗. 把多药耐药基因(MDR)导入体内的造血干细胞, 使其具有比胰腺癌细胞更强的化疗药物耐受力, 可以提高临床化疗剂量和时间, 减轻对骨髓细胞的损害^[49]; (5)核糖核酸干扰(RNAi). RNAi识别可以精确到一个核苷酸, 对由野生型点突变形成的癌基因(如 *ras*, *LSM-1*, *p53*等)和蛋白质(如Mirk, MUC1等), 能够产生准确有效的封闭效果, 其他正常野生型基因则不受影响. 基因的突变在胰腺癌的发病及发展中均占有重要地位, 通过改变癌基因的表达, 可以杀灭肿瘤或抑制肿瘤生长, 而利用RNAi技术调控基因(如 *GADD45*)和蛋白质(如X染色体相关细胞凋亡蛋白抑制剂)的表达, 能控制胰腺癌细胞的增殖^[50-54], 或减轻化疗抗药性^[55], 近年更引进崭新的小型干扰核糖核酸(siRNA)技术, 以此调控notch-1信号途径减低NF- κ B, VEGF和MMPs在胰腺癌细胞中的高表达, 可抑制其侵略和扩散^[56], 亦有利用survivin基因特异siRNA抑制胰腺癌细胞的生长^[57-59]; (6)免疫治疗. 将血管生成抑制剂(如angiostatin, bevacizumab^[60-61], endostatin和PEDF^[62]等)注射到体内, 阻抑肿瘤血管形成, 使胰腺癌细胞因供养不足而凋亡^[63], 也有利用免疫调控剂(如IL-2^[64], virulizin等^[65])或细胞凋亡抑制剂(如survivin^[66])注射到体内, 以增强患者抗病能力, 延长存活期并改善生存质量; 此外, 亦有采用单株纯种抗体抑制胰腺癌中高度表达的结缔组织生长因子, 以期控制肿瘤的生长和转移^[67], 还有用基因治疗联合免疫治疗(如UPRT/5-FC联合TRA-8)以增强抗癌能力^[68-69]。

3.6 饮食调理 人类80%-90%的癌症与环境相关, 其中约35%与饮食有关, 饮食调理的目的, 是合理安排饮食, 保证充分的营养, 提高身体免疫功能, 巩固治疗效果, 防止癌症复发. 研究显示, 多吃蔬果(如卷心菜)可减低患胰腺癌的机会^[70]. 而中医食疗则提倡和胃通腑、清肝消痞、健脾益

■应用要点

本文对胰腺癌的诊疗做了较全面的总结和资料汇编, 更针对胰腺癌的特性, 详细介绍其中西医综合诊疗的方法, 对易为人忽略的饮食调理和先进的分子靶向治疗亦有详尽的介绍, 对临床研究有一定参考价值。

■名词解释

1 甲基化特异性基因扩增(MSP): 用基因扩增技术直接检测基因组上癌基因或抑癌基因的甲基化状态, 显示基因是否活化, 来预示癌变的可能性, 如抑癌基因p16的GC岛在多种癌变中甲基化, 被抑制表达, 通过MSP可检测此基因GC岛的甲基化情况。

2 表面增强激光解吸离子化: 飞行时间质谱(SELDI-TOF MS)-利用激光脉冲使芯片中的分析物解吸形成荷电离子, 根据不同质荷比, 离子在仪器场中飞行的时间长短不一, 由此绘制出一张质谱图来, 经计算机处理可形成模拟谱图, 直接显示样品中各种蛋白质的分子量、含量等信息, 将它与常人或某种疾病患者谱图进行对照, 能够发现和捕获新的疾病特异性相关蛋白质及其特征。

3 小型干扰核糖核酸(siRNA): 是抑制目标基因的有力手段, 运用21-25个双链的siRNA来干扰目标基因表达, siRNA与目标基因是同源的, 而改良的叉状双链siRNA, 其有义链的3'端有1-4个与反义链不匹配的碱基, 这种分子在哺乳类动物细胞中能够增加传统RNAi的强度。

气, 现列举一些调理胰腺癌食疗如下: (1)牛奶淮山糊. 具健脾补中、生津养胃功效, 用于不思饮食者; (2)山楂香橼煎. 具理气消食、利膈祛瘀功效, 用于腹痛呕吐纳呆者; (3)粉葛猪胰汤. 具生津润燥、补脾益肺功效, 用于腹胀口干、便秘纳差者; (4)夏枯草甜瓜猪胰汤. 具清热利尿、养肝除烦、生津止渴功效, 用于纳差、形体消瘦、左胁疼痛者; (5)猪肉猪胰煲魔芋. 具解毒散结、补脾润燥功效, 用于上腹胀满疼痛者; (6)桂花莲子粥. 具化痰散瘀、补益脾胃功效, 用于腹胀痛纳差者; (7)黄花木耳瘦肉汤. 具清肝养胃、祛瘀退黄功效, 用于消瘦乏力伴腹胀黄疸者; (8)蝸牛瘦肉煲鸡骨草. 具清热利湿、疏肝和脾功效, 用于体虚纳呆伴腹胀腹水者; (9)大蒜田七焖鳝鱼. 具补虚健脾、祛瘀止痛功效, 用于晚期腹胀疼痛、体虚纳差者; (10)桃仁人参粥. 具补中益气、润燥祛瘀功效, 用于晚期腹痛呕吐、形神俱衰者。

胰腺癌治愈率低, 生存期短, 患上本病几近被判死刑, 虽然外科手术、放疗和化疗技术日益进步, 但依然未能控制此顽疾。治癌如用兵, 有正有奇, 正者法度, 奇者不为法度所绑。中医辨证施治、标本兼治、阴阳平衡等方法理论和, 如能恰当地融合到西医对胰腺癌的综合诊疗中, 定将提高治愈率并能改善患者的生存质量。另一方面, 癌基因的发现及其功能的逐步明确, 无疑是肿瘤学发展史上的重要里程碑, 胰腺癌研究得以进入一个崭新的分子时代。分子靶向治疗在近年来蓬勃兴起, 尽管其技术仍需改善, 疗效有待提高, 但已给恶性肿瘤的诊疗带来了曙光, 不难预见, 将来胰腺癌治疗的突破很可能依赖个体化中西医结合治疗的实践和分子靶向治疗的成熟应用。

4 参考文献

- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- Laheru D, Biedrzycki B, Thomas AM, Jaffee EM. Development of a cytokine-modified allogeneic whole cell pancreatic cancer vaccine. *Methods Mol Med* 2005; 103: 299-327
- Gallicchio L, Kouzis A, Genkinger JM, Burke AE, Hoffman SC, Diener-West M, Helzlsouer KJ, Comstock GW, Alberg AJ. Active cigarette smoking, household passive smoke exposure, and the risk of developing pancreatic cancer. *Prev Med* 2006; 42: 200-205
- Malfertheiner P, Schutte K. Smoking-a trigger for chronic inflammation and cancer development in the pancreas. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 160-162
- Wang L, Li H. Advances in researches on genetic

epidemiology of pancreatic cancer. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 2006; 28: 289-293

- Valerio A, Basso D, Fogar P, Falconi M, Greco E, Bassi C, Seraglia R, Abu-Hilal M, Navaglia F, Zambon CF, Gallo N, Falda A, Pedrazzoli S, Plebani M. Maldi-TOF analysis of portal sera of pancreatic cancer patients: identification of diabetogenic and antidiabetogenic peptides. *Clin Chim Acta* 2004; 343: 119-127
- Saftoiu A, Popescu C, Cazacu S, Dumitrescu D, Georgescu CV, Popescu M, Ciurea T, Gorunescu F. Power Doppler endoscopic ultrasonography for the differential diagnosis between pancreatic cancer and pseudotumoral chronic pancreatitis. *J Ultrasound Med* 2006; 25: 363-372
- Koopmann J, Rosenzweig CN, Zhang Z, Canto MI, Brown DA, Hunter M, Yeo C, Chan DW, Breit SN, Goggins M. Serum markers in patients with resectable pancreatic adenocarcinoma: macrophage inhibitory cytokine 1 versus CA19-9. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 442-446
- Choudhuri G, Singh D. Molecular mechanisms of pancreatic cancer. *Trop Gastroenterol* 2005; 26: 111-114
- He Y, Yang B, Ruan CG. Anti-pancreatic cancer immune response induced by K-ras mutated peptide. *Ai Zheng* 2005; 24: 559-562
- Jeong S, Lee DH, Lee JI, Lee JW, Kwon KS, Kim PS, Kim HG, Shin YW, Kim YS, Kim YB. Expression of Ki-67, p53, and K-ras in chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6765-6769
- Juuti A, Louhimo J, Nordling S, Ristimäki A, Haglund C. Cyclooxygenase-2 expression correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. *J Clin Pathol* 2006; 59: 382-386
- Xu L, Li YM, Yu CH, Li L, Liu YS, Zhang BF, Fang J, Zhou Q, Hu Y, Gao HJ. Expression of p53, p16 and COX-2 in pancreatic cancer with tissue microarray. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006; 5: 138-142
- Zhang L, Chenwei L, Mahmood R, van Golen K, Greenon J, Li G, D'Silva NJ, Li X, Burant CF, Logsdon CD, Simeone DM. Identification of a putative tumor suppressor gene Rap1GAP in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 898-906
- Moniaux N, Nemos C, Schmied BM, Chauhan SC, Deb S, Morikane K, Choudhury A, Vanlith M, Sutherland M, Sikela JM, Hollingsworth MA, Batra SK. The human homologue of the RNA polymerase II-associated factor 1 (hPaf1), localized on the 19q13 amplicon, is associated with tumorigenesis. *Oncogene* 2006; 25: 3247-3257
- Ohuchida K, Mizumoto K, Ishikawa N, Fujii K, Konomi H, Nagai E, Yamaguchi K, Tsuneyoshi M, Tanaka M. The role of S100A6 in pancreatic cancer development and its clinical implication as a diagnostic marker and therapeutic target. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 7785-7793
- Li D, Frazier M, Evans DB, Hess KR, Crane CH, Jiao L, Abbruzzese JL. Single nucleotide polymorphisms of RecQ1, RAD54L, and ATM genes are associated with reduced survival of pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1720-1728
- Matsubayashi H, Canto M, Sato N, Klein A, Abe T,

- Yamashita K, Yeo CJ, Kalloo A, Hruban R, Goggins M. DNA methylation alterations in the pancreatic juice of patients with suspected pancreatic disease. *Cancer Res* 2006; 66: 1208-1217
- 19 Sato N, Fukushima N, Matsubayashi H, Iacobuzio-Donahue CA, Yeo CJ, Goggins M. Aberrant methylation of Reprimo correlates with genetic instability and predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer* 2006
- 20 Smirne C, Camandona M, Alabiso O, Bellone G, Emanuelli G. High serum levels of Transforming Growth Factor-beta1, Interleukin-10 and Vascular Endothelial Growth Factor in pancreatic adenocarcinoma patients. *Minerva Gastroenterol Dietol* 1999; 45: 21-27
- 21 Wente MN, Jain A, Kono E, Berberat PO, Giese T, Reber HA, Friess H, Buchler MW, Reiter RE, Hines OJ. Prostate stem cell antigen is a putative target for immunotherapy in pancreatic cancer. *Pancreas* 2005; 31: 119-125
- 22 Okada T, Akada M, Fujita T, Iwata T, Goto Y, Kido K, Okada T, Matsuzaki Y, Kobayashi K, Matsuno S, Sunamura M, Kawakami Y. A novel cancer testis antigen that is frequently expressed in pancreatic, lung, and endometrial cancers. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 191-197
- 23 Mancuso A, Calabro F, Sternberg CN. Current therapies and advances in the treatment of pancreatic cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; 58: 231-241
- 24 Bloomston M, Bhardwaj A, Ellison EC, Frankel WL. Epidermal growth factor receptor expression in pancreatic carcinoma using tissue microarray technique. *Dig Surg* 2006; 23: 74-79
- 25 Bloomston M, Zhou JX, Rosemurgy AS, Frankel W, Muro-Cacho CA, Yeatman TJ. Fibrinogen gamma overexpression in pancreatic cancer identified by large-scale proteomic analysis of serum samples. *Cancer Res* 2006; 66: 2592-2599
- 26 Xia Q, Kong XT, Zhang GA, Hou XJ, Qiang H, Zhong RQ. Proteomics-based identification of DEAD-box protein 48 as a novel autoantigen, a prospective serum marker for pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330: 526-532
- 27 Yu KH, Rustgi AK, Blair IA. Characterization of proteins in human pancreatic cancer serum using differential gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. *J Proteome Res* 2005; 4: 1742-1751
- 28 Gronborg M, Kristiansen TZ, Iwahori A, Chang R, Reddy R, Sato N, Molina H, Jensen ON, Hruban RH, Goggins MG, Maitra A, Pandey A. Biomarker discovery from pancreatic cancer secretome using a differential proteomic approach. *Mol Cell Proteomics* 2006; 5: 157-171
- 29 Chen R, Pan S, Yi EC, Donohoe S, Bronner MP, Potter JD, Goodlett DR, Aebersold R, Brentnall TA. Quantitative proteomic profiling of pancreatic cancer juice. *Proteomics* 2006
- 30 Rosty C, Christa L, Kuzdzal S, Baldwin WM, Zahurak ML, Carnot F, Chan DW, Canto M, Lillemoe KD, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. Identification of hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein I as a biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma by protein biochip technology. *Cancer Res* 2002; 62: 1868-1875
- 31 Honda K, Hayashida Y, Umaki T, Okusaka T, Kosuge T, Kikuchi S, Endo M, Tsuchida A, Aoki T, Itoi T, Moriyasu F, Hirohashi S, Yamada T. Possible detection of pancreatic cancer by plasma protein profiling. *Cancer Res* 2005; 65: 10613-10622
- 32 Yang GY, Wagner TD, Fuss M, Thomas CR Jr. Multimodality approaches for pancreatic cancer. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 352-367
- 33 Mann O, Strate T, Schneider C, Yekebas EF, Izbicki JR. Surgery for advanced and metastatic pancreatic cancer-current state and perspectives. *Anticancer Res* 2006; 26: 681-686
- 34 Fernandez JA, Parrilla P. What are the main errors made by surgeons in the management of pancreatic cancer? *Cir Esp* 2006; 79: 215-223
- 35 Abrams RA. Radiotherapy in the adjuvant management of pancreatic adenocarcinoma. *Semin Oncol* 2005; 32: S30-S32
- 36 Evans DB. Preoperative chemoradiation for pancreatic cancer. *Semin Oncol* 2005; 32: S25-S29
- 37 Knaebel HP, Marten A, Schmidt J, Hoffmann K, Seiler C, Lindel K, Schmitz-Winnenthal H, Fritz S, Herrmann T, Goldschmidt H, Mansmann U, Debus J, Diehl V, Buchler MW. Phase III trial of postoperative cisplatin, interferon alpha-2b, and 5-FU combined with external radiation treatment versus 5-FU alone for patients with resected pancreatic adenocarcinoma-CapRI: study protocol [ISRCTN62866759]. *BMC Cancer* 2005; 5: 37
- 38 Reni M, Pasetto L, Aprile G, Cordio S, Bonetto E, Dell'Oro S, Passoni P, Piemonti L, Fugazza C, Luppi G, Milandri C, Nicoletti R, Zerbi A, Balzano G, Di Carlo V, Brandes AA. Raltitrexed-eloxatin salvage chemotherapy in gemcitabine-resistant metastatic pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2006; 94: 785-791
- 39 Piacentini P, Donadelli M, Costanzo C, Moore PS, Palmieri M, Scarpa A. Trichostatin A enhances the response of chemotherapeutic agents in inhibiting pancreatic cancer cell proliferation. *Virchows Arch* 2006; 448: 797-804
- 40 Tang PA, Tsao MS, Moore MJ. A review of erlotinib and its clinical use. *Expert Opin Pharmacother* 2006; 7: 177-193
- 41 Eickhoff A, Martin W, Hartmann D, Eickhoff JC, Mohler M, Galle PR, Riemann JF, Jakobs R. A phase I/II multicentric trial of gemcitabine and epirubicin in patients with advanced pancreatic carcinoma. *Br J Cancer* 2006; 94: 1572-1574
- 42 MacKenzie MJ. Molecular therapy in pancreatic adenocarcinoma. *Lancet Oncol* 2004; 5: 541-549
- 43 Kindler HL. Front-line therapy of advanced pancreatic cancer. *Semin Oncol* 2005; 32: S33-S36
- 44 Bhattacharyya M, Lemoine NR. Gene therapy developments for pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 285-298
- 45 Yin S, Goodrich DW. Combination gene therapy with p53 and Thoc1/p84 is more effective than either single agent in an animal model of human pancreatic adenocarcinoma. *Int J Oncol* 2006; 28: 781-785
- 46 Eisenberg DP, Adusumilli PS, Hendershott KJ, Yu Z, Mullerad M, Chan MK, Chou TC, Fong Y. 5-fluorouracil and gemcitabine potentiate the efficacy of oncolytic herpes viral gene therapy in the treatment of pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 1068-1077
- 47 Cascante A, Huch M, Rodriguez LG, Gonzalez JR, Costantini L, Fillat C. Tat8-TK/GCV suicide gene

■同行评价

本文对胰腺癌的诊疗做出了全面的总结和资料汇编, 针对胰腺癌的特性, 详细介绍其中西医综合诊疗、饮食调理以及先进的分子靶向治疗, 对临床研究有一定参考作用。

- therapy induces pancreatic tumor regression *in vivo*. *Hum Gene Ther* 2005; 16: 1377-1388
- 48 Lebedeva IV, Sarkar D, Su ZZ, Gopalkrishnan RV, Athar M, Randolph A, Valerie K, Dent P, Fisher PB. Molecular target-based therapy of pancreatic cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 2403-2413
 - 49 Giroux V, Malicet C, Barthet M, Gironella M, Archange C, Dagorn JC, Vasseur S, Iovanna JL. p8 is a new target of gemcitabine in pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 235-241
 - 50 Dykxhoorn DM, Lieberman J. Running interference: prospects and obstacles to using small interfering RNAs as small molecule drugs. *Annu Rev Biomed Eng* 2006
 - 51 Bhattacharyya M, Lemoine NR. Gene therapy developments for pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 285-98
 - 52 Tsutsumida H, Swanson BJ, Singh PK, Caffrey TC, Kitajima S, Goto M, Yonezawa S, Hollingsworth MA. RNA interference suppression of MUC1 reduces the growth rate and metastatic phenotype of human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2976-2987
 - 53 Schneider G, Weber A, Zechner U, Oswald F, Friess HM, Schmid RM, Liptay S. GADD45alpha is highly expressed in pancreatic ductal adenocarcinoma cells and required for tumor cell viability. *Int J Cancer* 2006; 118: 2405-2411
 - 54 Deng X, Ewton DZ, Li S, Naqvi A, Mercer SE, Landas S, Friedman E. The kinase Mirk/Dyrk1B mediates cell survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res* 2006; 66: 4149-4158
 - 55 Li Y, Jian Z, Xia K, Li X, Lv X, Pei H, Chen Z, Li J. XIAP is related to the chemoresistance and inhibited its expression by RNA interference sensitize pancreatic carcinoma cells to chemotherapeutics. *Pancreas* 2006; 32: 288-296
 - 56 Wang Z, Banerjee S, Li Y, Rahman KM, Zhang Y, Sarkar FH. Down-regulation of notch-1 inhibits invasion by inactivation of nuclear factor-kappaB, vascular endothelial growth factor, and matrix metalloproteinase-9 in pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2006; 66: 2778-2784
 - 57 Tsuji N, Asanuma K, Kobayashi D, Yagihashi A, Watanabe N. Introduction of a survivin gene-specific small inhibitory RNA inhibits growth of pancreatic cancer cells. *Anticancer Res* 2005; 25: 3967-3972
 - 58 Guan HT, Xue XH, Dai ZJ, Wang XJ, Li A, Qin ZY. Down-regulation of survivin expression by small interfering RNA induces pancreatic cancer cell apoptosis and enhances its radiosensitivity. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2901-2907
 - 59 Guan HT, Xue XH, Wang XJ, Li A, Qin ZY. siRNA targeted against survivin induces apoptosis of pancreatic cancer cells. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2006; 26: 169-173
 - 60 Salmon JS, Lockhart AC, Berlin J. Anti-angiogenic treatment of gastrointestinal malignancies. *Cancer Invest* 2005; 23: 712-726
 - 61 Crane CH, Ellis LM, Abbruzzese JL, Amos C, Xiong HQ, Ho L, Evans DB, Tamm EP, Ng C, Pisters PW, Charnsangavej C, Delclos ME, O'Reilly M, Lee JE, Wolff RA. Phase I trial evaluating the safety of bevacizumab with concurrent radiotherapy and capecitabine in locally advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1145-1151
 - 62 Hase R, Miyamoto M, Uehara H, Kadoya M, Ebihara Y, Murakami Y, Takahashi R, Mega S, Li L, Shichinohe T, Kawarada Y, Kondo S. Pigment epithelium-derived factor gene therapy inhibits human pancreatic cancer in mice. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8737-8744
 - 63 Xie K, Wei D, Huang S. Transcriptional anti-angiogenesis therapy of human pancreatic cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17: 147-156
 - 64 Angelini C, Bovo G, Muselli P, Mussi C, Crippa S, Caprotti R, Uggeri F. Preoperative interleukin-2 immunotherapy in pancreatic cancer: preliminary results. *Hepatogastroenterology* 2006; 53: 141-144
 - 65 Li H, Cao MY, Lee Y, Lee V, Feng N, Benatar T, Jin H, Wang M, Der S, Wright JA, Young AH. Virulizin, a novel immunotherapy agent, activates NK cells through induction of IL-12 expression in macrophages. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54: 1115-1126
 - 66 Wobser M, Keikavoussi P, Kunzmann V, Weininger M, Andersen MH, Becker JC. Complete remission of liver metastasis of pancreatic cancer under vaccination with a HLA-A2 restricted peptide derived from the universal tumor antigen survivin. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 1294-1298
 - 67 Dornhofer N, Spong S, Bennewith K, Salim A, Klaus S, Kambham N, Wong C, Kaper F, Sutphin P, Nacalumi R, Hockel M, Le Q, Longaker M, Yang G, Koong A, Giaccia A. Connective tissue growth factor-specific monoclonal antibody therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 2006; 66: 5816-5827
 - 68 Plate JM, Harris JE. Immunobiotherapy directed against mutated and aberrantly expressed gene products in pancreas cancer. *J Cell Biochem* 2005; 94: 1069-1077
 - 69 Kaliberov SA, Chiz S, Kaliberova LN, Krendelchtchikova V, Della Manna D, Zhou T, Buchsbaum DJ. Combination of cytosine deaminase suicide gene expression with DR5 antibody treatment increases cancer cell cytotoxicity. *Cancer Gene Ther* 2006; 13: 203-214
 - 70 Larsson SC, Hakansson N, Naslund I, Bergkvist L, Wolk A. Fruit and vegetable consumption in relation to pancreatic cancer risk: a prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 301-305

电编 李琪 编辑 潘伯荣

蛋白激酶B丝氨酸磷酸化在非乙醇性脂肪肝发病机制中的作用

韩继武, 詹晓蓉, 阴惠清, 梁桂敏, 何强, 王月影

韩继武, 哈尔滨医科大学附属第一医院消化科在读博士 黑龙江省哈尔滨市 150001
詹晓蓉, 阴惠清, 梁桂敏, 何强, 王月影, 哈尔滨医科大学附属第一医院内分泌科 黑龙江省哈尔滨市 150001
黑龙江省自然科学基金资助课题, No. 2005-13
通讯作者: 詹晓蓉, 150001, 黑龙江省哈尔滨市南岗区邮政街23号, 哈尔滨医科大学附属第一医院内分泌科.
xiaorongzhan@sina.com
电话: 0451-53643849-5061
收稿日期: 2006-05-13 接受日期: 2006-06-27

Role of protein kinase B serine phosphorylation in pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease induced by high-fat diets

Ji-Wu Han, Xiao-Rong Zhan, Hui-Qing Yin,
Gui-Min Liang, Qiang He, Yue-Ying Wang

Ji-Wu Han, Department of Digestive Disease, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China
Xiao-Rong Zhan, Hui-Qing Yin, Gui-Min Liang, Qiang He, Yue-Ying Wang, Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China
Supported by the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province, No. 2005-13
Correspondence to: Xiao-Rong Zhan, Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. xiaorongzhan@sina.com
Received: 2006-05-13 Accepted: 2006-06-27

Abstract

AIM: To clarify whether protein kinase B (PKB) serine phosphorylation pathway is involved in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) induced by high-fat diets.

METHODS: Sixty male Wistar rats were randomly divided into group A, B and C. The rats in group A served as controls, and those in group B and C were fed with high-fat diets for 16 wk. Meanwhile, the rats in group C were also treated with rosiglitazone 4 mg per day. At the end of 16th wk, all the animals were sacrificed. Liver index (liver/body weight ratio), serum ac-

tivities of liver-associated enzymes, blood lipids, liver index, fasting blood glucose, fasting plasma insulin, liver histology and liver ultrastructure were assayed in all the groups. The expression of serine phosphorylated PKB was detected by immunohistochemistry. The liver histological and ultrastructural changes were observed by light and electron microscopy.

RESULTS: The liver index, plasma triglycerides (TG), homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR), serum activities of alanine aminotransferase (ALT), gamma glutamyl transferase (GGT) were significantly increased in group B than those in the normal controls ($3.96\% \pm 0.32\%$ vs $2.31\% \pm 0.21\%$, $P < 0.01$; 2.87 ± 0.3 mmol/L vs 0.56 ± 0.20 mmol/L, $P < 0.05$; 15.59 ± 1.7 vs 1.79 ± 1.7 , $P < 0.05$; 1108.5 ± 0.61 nkat/L vs 231.7 ± 0.23 nkat/L, $P < 0.05$; 1700.3 ± 0.92 nkat/L vs 158.4 ± 0.63 nkat/L, $P < 0.05$), while the expression of serine phosphorylated PKB was markedly lower (34.2% vs 89.06% , $P < 0.01$). Macroscopic and microscopic findings demonstrated that lipid accumulation in the liver was observed as early as 2 wk after high-fat diets used; a fatty liver phenotype developed at 12 wk; and severe steatosis, mainly as microvesicular steatosis, lobular inflammatory, cell infiltration and necrosis, occurred at 16 wk. Electron microscopy showed that the structures of cell organelle disappeared, and the ruptured mitochondrial crista or vacuole-like mitochondria was observed. However, the histopathological and ultrastructural changes were notably alleviated in group C.

CONCLUSION: PKB signaling pathway may be involved in the pathogenesis of NAFLD induced by high-fat diets.

Key Words: Nonalcoholic fatty liver disease; Protein kinase B; Serine phosphorylation; High-fat diets; Insulin resistance

Han JW, Zhan XR, Yin HQ, Liang GM, He Q, Wang YY. Role of protein kinase B serine phosphorylation

■背景资料

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是最常见的弥漫性肝脏病变之一, 15%的患者可以从单纯的脂肪肝转变为肝纤维化、肝硬化, 甚至3%的患者可能进展为肝功能衰竭。流行病学显示: 在不同的国家中NAFLD的发病率约占20%-34%, 肥胖人的发病率高达57%-74%。无症状性转氨酶升高的患者中, 在排除了其他肝病后约42%-90%是由NAFLD引起的。在肥胖人群中发NAFLD病率增加4-6倍, 在我国有1/3的糖尿病患者患有NAFLD。在我国肥胖人群中2/3以上患有脂肪肝变性, 在发达国家NAFLD与2型糖尿病一样可发生于任何年龄, NAFLD并有不断增加的趋势, 严重地威胁着人们的健康, 有效地控制NAFLD的发生已成为全球关注的热点。

■ 研发前沿

目前研究显示NAFLD的发生与胰岛素抵抗有关,基于此,本研究试图以胰岛素传导通路的关键酶-磷酸肌醇激酶3激酶/蛋白激酶B(PKB)为线索,观察使用胰岛素增敏剂前后PKB活性和在肝脏中的表达情况与肝脏组织学和超微结构的变化关系,探讨脂质在肝脏中的蓄积的机制并寻找出治疗NAFLD的有效方法。

in pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease induced by high-fat diets. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(21):2055-2059

摘要

目的: 探讨蛋白激酶B丝氨酸磷酸化在高脂诱导大鼠非乙醇性脂肪肝发病机制中的作用。

方法: 选Wistar大鼠60只,随机分为正常对照组($n = 20$),高脂组($n = 20$)和高脂+罗格列酮组($n = 20$)。分别用正常、高脂和高脂+罗格列酮饲料喂养16 wk,处死,观察血脂、胰岛素、肝功,肝脏组织学及超微结构的变化,免疫组化检测丝氨酸磷酸化的蛋白激酶B在肝脏中的表达。

结果: 高脂组16 wk后,肝细胞中出现大量的脂肪滴,小叶内及汇管区炎性细胞浸润并伴有点片状坏死。超微结构示:细胞器结构消失,线粒体嵴断裂或空泡变。肝指数、甘油三酯、胰岛素抵抗指数、肝脏谷丙转氨酶(ALT)、 γ -氨基酰胺转氨酶(GGT)(分别为 $3.96\% \pm 0.32\%$, 2.87 ± 0.3 mmol/L, 15.59 ± 1.7 , 136.7 ± 0.26 nkat/L和 1700.3 ± 0.92 nkat/L)较正常对照组($2.31\% \pm 0.21\%$, 0.56 ± 0.20 mmol/L, 1.79 ± 1.7 , 125.0 ± 0.14 nkat/L和 158.4 ± 0.63 nkat/L)相比明显增加($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。高脂组肝脏蛋白激酶B蛋白表达量为34.2%,与正常对照组的89.06%相比明显减弱($P < 0.01$)。

结论: 高脂可能通过抑制蛋白激酶B的活性的表达影响胰岛素信号传导而产生胰岛素抵抗进而参与了非乙醇性脂肪肝的形成。

关键词: 非乙醇性脂肪肝; 蛋白激酶B; 丝氨酸磷酸化; 高脂饮食; 胰岛素抵抗

韩继武, 詹晓蓉, 阴惠清, 梁桂敏, 何强, 王月影. 蛋白激酶B丝氨酸磷酸化在非乙醇性脂肪肝发病机制中的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(21):2055-2059

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2055.asp>

0 引言

非乙醇性脂肪性肝病(NAFLD)是一种多病因引起的肝细胞内脂质蓄积过多的临床病理综合征。NAFLD常与中心性肥胖、高血压、高TG血症及2型糖尿病相伴行。近年来,NAFLD已被认为是代谢综合征的肝脏表现^[1]。最近的几个临床研究^[2-4]亦发现,几乎所有的NAFLD患者都既存在外周胰岛素抵抗,又存在肝脏胰岛素抵抗,并认为胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)所导致的脂

质在肝脏中蓄积是NAFLD发病的基础。

有关IR所导致的脂质在肝脏中蓄积的发病机制并不完全清楚,众所周知,在肝脏中,胰岛素通过肝细胞表面受体及细胞内的调节,如PI3/PKB(磷酸肌醇激酶3激酶/蛋白激酶B)即控制脂代谢又控制糖代谢,胰岛素信号传导通路PI3/PKB途径发生障碍是导致IR的主要机制^[5],基于此,我们试图通过分析胰岛素传导通路中的关键酶-蛋白激酶B(PKB)的表达情况与肝脏组织学和超微结构的变化关系探讨脂质在肝脏中的蓄积的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 用♂ Wistar大鼠60只,体质量160-180 g,购自哈医大学第一临床医学院实验动物中心,合格证号:黑动字第P00102008号。正常普通饲料由本实验中心提供,其组成中小麦面占10%,麸子占30%,玉米面占30%,豆饼占20%,鱼粉占5%,骨粉占2%,酵母占2%,氯化钠占1%。高脂饲料为在普通饲料中添加10%猪油,2%胆固醇,0.2%甲基硫氧嘧啶,0.5%胆盐。人胰岛素试剂盒批号(Tarrytown, NY 10591-5079 USA),购自拜耳公司,PKBSer473兔抗鼠PKB多克隆抗体和羊抗兔IgG/HRP(SA1022,二抗)均购自SentaCruzBiotechInc.(Calif. USA)。胆固醇购自Sigma公司。

1.2 方法 所有大鼠适应性喂养3 d后,随机分为2组,正常对照组(Con, $n = 20$)给予普通饮食喂养;高脂组和高脂组+罗格列酮($n = 20$)分别给予含20%脂肪的高脂食料和高脂组每日加用罗格列酮4 mg/(kg·d)喂养16 wk,高脂组病理证实造模成功。肝指数:肝湿质量/体质量 $\times 100\%$ 。生化指标检测:大鼠0 wk左眼底静脉丛采血1 mL;第16周时禁食12 h后戊巴比妥钠(60 mg/kg, ip)麻醉,开胸心脏采血4 mL,开腹取肝脏。测肝功、三酯酰甘油(TG),胆固醇(TC)和胰岛素(FINS)。所取肝脏置于40 g/L的多聚甲醛溶液中。胰岛素的测定和胰岛素抵抗指数的计算:胰岛素的测定采用化学发光法:胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)和胰岛素敏感指数(ISI)的判定: $HOMA-IR = (FBG \times FINS) / 22.5$, $ISI = 1 / (FBS \times FINS)$,取大鼠肝脏后,去除包膜,长轴方向对切,用10 g/L的中性甲醛固定后,石蜡包埋切片,切片厚度1 μ m,作常规HE染色。使用日本电子公司生产的JEM-1220型透射电镜。肝脏石蜡切片免疫组化染色程序:石蜡切片常规脱蜡至水,行30 mL/L

表 1 高血脂喂养16 wk大鼠生化指标的变化

分组	三酰甘油 (mmol/L)	胆固醇 (mmol/L)	空腹血糖 (mmol/L)	ALT (nkat/L)	AST (nkat/L)	GGT (nkat/L)
正常对照	0.56 ± 0.20	1.42 ± 0.15	4.1 ± 0.2	231.7 ± 0.23	125.0 ± 0.14	158.4 ± 0.63
高脂	2.87 ± 0.3 ^b	2.68 ± 0.26 ^b	10.2 ± 0.9 ^b	1108.5 ± 0.61 ^b	136.7 ± 0.26	1700.3 ± 0.92 ^b
罗格列酮	1.92 ± 0.2 ^a	1.98 ± 0.2	8.2 ± 0.41 ^a	393.4 ± 0.47 ^a	151.7 ± 0.32	63.3 ± 0.81 ^a

^a $P < 0.05$ vs 高脂; ^b $P < 0.01$ vs 正常对照.

 表 2 高血脂对大鼠FINS, IRI, ISI影响 ($n = 20$, mean ± SD)

分组	肝指数(%)	胰岛素FINS	胰岛素抵抗指数IRI	胰岛素敏感指数ISI
正常对照	2.31 ± 0.21	9.8 ± 5	1.79 ± 1.7	0.06 ± 0.2
高脂	3.96 ± 0.32 ^b	34.3 ± 6	15.59 ± 1.7 ^b	0.002 ± 0.4 ^b
高脂+罗格列酮	2.98 ± 0.26	13.5 ± 5	4.55 ± 1.9 ^{ab}	0.01 ± 0.4 ^{ab}

^a $P < 0.05$ vs 正常对照; ^b $P < 0.01$ vs 高脂.

H₂O₂去除内源性过氧化物酶, 进行热修复和BSA封闭. 滴加一抗(1:800)和二抗[生物素化山羊抗兔(鼠)血清], 再滴加试剂SABC. 用苏木素复染1 min, 自来水冲洗返蓝5 min. 切片经过梯度酒精脱水干燥, 二甲苯透明5 min, 中性树胶封片. 免疫组化染色判定结果: 胞膜/胞质内呈明显棕黄色颗粒的细胞为阳性细胞.

统计学处理 计量资料用mean ± SD表示, 采用SPSS 12分析软件, 组间差异用单因素方差分析.

2 结果

2.1 肝指数、肝功和生化指标 正常对照组和高脂组分别为2.31% ± 0.21%和3.96% ± 0.32%, 差异显著($P < 0.01$). 罗格列酮组为2.98% ± 0.26%与高脂组相比差异显著($P < 0.05$)(表1). 高脂组: ALT和GGT分别为1108.5 ± 0.61 nkat/L和1700.3 ± 0.92 nkat/L与正常组的231.7 ± 0.23 nkat/L和158.4 ± 0.63 nkat/L相比差异显著($P < 0.05$), 其中ALT增加5倍, GGT增加10倍, 而AST两组值分别为136.7 ± 0.26 nkat/L和125.0 ± 0.14 nkat/L, 两组无显著差异($P > 0.05$, 表1). 高脂组: TG和TC分别为2.87 ± 0.3 mmol/L和2.68 ± 0.26 mmol/L与正常对照组的0.56 ± 0.20 mmol/L和1.42 ± 0.15 mmol/L相比显著差异($P < 0.05$), 且其中TG增加5-6倍, TC增加1倍. 罗格列酮组TG明显降低($P < 0.05$), 胰岛素抵抗指数(HOMA IR): 高脂组15.59 ± 1.7与正常对照组的1.79 ± 1.7明显升高($P < 0.05$),

罗格列酮组4.55 ± 1.9与高脂组相比明显降低($P < 0.05$, 表2).

2.2 肝脏的病理变化 正常对照组大鼠肝色鲜红, 边缘锐利, 质韧; 高脂组大鼠肝外观呈奶油黄或红黄相间, 体积明显增大, 边缘变钝, 质地变软, 切面略带油腻感. 正常对照组大鼠肝小叶清晰, 肝细胞索排列整齐, 偶见小泡性脂肪滴空泡; 高脂组: 肝小叶中心带肝细胞中出现大小不等的脂肪滴, 以大泡性脂肪滴为主, 部分肝细胞核则被脂肪滴挤压而明显偏位, 小叶内及汇管区局灶性炎性细胞浸润, 并伴有一定程度的点片状坏死. 罗格列酮组: 病理改变较高脂组明显减轻.

2.3 肝脏的超微结构变化 正常对照组肝细胞胞质内细胞器结构完好, 线粒体、粗面内质网和游离核蛋白体丰富发达, 未见脂肪颗粒, 狄氏间隙内肝细胞的微绒毛完整(图1A); 高脂组肝细胞胞质内充满大量的脂肪颗粒, 细胞器结构消失, 被大量的脂滴所充填(图1B); 罗格列酮组: 胞质内脂肪颗粒减少, 线粒体和粗面内质网细胞器结构完整(图1C).

2.4 肝脏PKB的表达水平 正常对照组肝细胞索和肝血窦清晰, 肝脏细胞的表达出现较强阳性信号, 以胞质为主, 阳性细胞率89.06%(图2A), 高脂组表达减弱, 阳性细胞率为34.2%(图2B), 罗格列酮组为66.21%(图2C).

3 讨论

IR是导致脂质在肝脏中蓄积的基础^[6], 但其确

■ 相关报道

目前研究尚发现胰岛素抵抗患者的脂肪、肝脏和肌肉组织对胰岛素的反应减退, 从而降低了脂肪和肌肉对葡萄糖的摄取, 增加肝脏的葡萄糖释放并且增加脂肪组织游离脂肪酸的释放. 游离脂肪酸水平的升高会进一步加重肝脏和肌肉的胰岛素抵抗. Sanyal *et al*在研究胰岛素抵抗时观察到血清游离脂肪酸(FFA)上升伴有胰岛素抵抗和NAFLD出现, 另组研究发现胰岛素抵抗的严重程度与脂肪沉积部位有关, 即以躯干内脏性肥胖最为重要.

■创新盘点

非乙醇性脂肪肝发病机制仍不清楚,有报道胰岛素抵抗在NAFLD形成过程中起了重要的作用,但目前国内外尚未有人系统地观察以胰岛素传导通路为线索,从肝脏的病理组织学、超微结构对其发病机制进行探讨。国内外尚未有人系统地观察应用胰岛素的增敏剂干预后大鼠肝脏的形态学、超微结构和胰岛素传导通路关键酶活性和蛋白水平表达量的变化,确定治疗脂肪肝的有效方法。

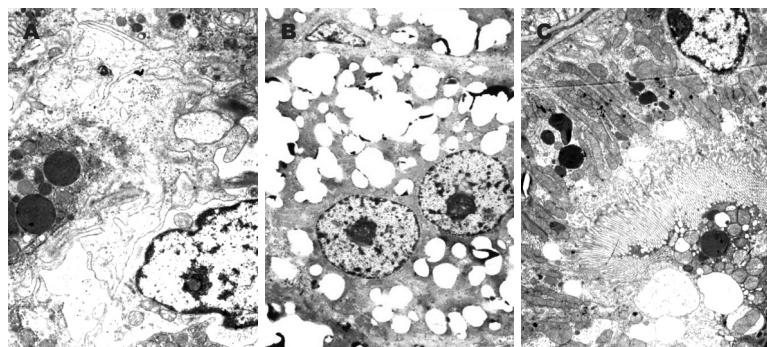


图1 各组肝细胞透射电镜观察结果: A: 正常肝细胞, 肝细胞胞质内细胞器结构完好, 线粒体、粗面内质网和游离核蛋白体丰富发达, 未见脂肪颗粒; 狄氏间隙内肝细胞的微绒毛完整; B: 高脂组肝细胞, 肝细胞胞质内充满大量的脂肪颗粒, 细胞器结构消失, 被大量的脂肪滴所充填; C: 高脂+罗格列酮组, 胞质内脂肪颗粒减少, 线粒体和粗面内质网细胞器结构完整。

切的机制尚不清楚。我们通过建立高脂血症胰岛素抵抗Wistar大鼠脂肪肝模型, 旨在探讨胰岛素信号传导通路在非酒精性脂肪肝发病机制中的作用, 进一步确定胰岛素抵抗在NAFLD发病机制的意义和地位。持续高脂喂养Wistar大鼠16 wk, 大鼠肝脏从大体解剖、组织学至肝脏的超微结构均有明显改变, 同时胰岛素抵抗指数与肝脏脂肪含量及肝脏组织损害程度呈一致性, 我们研究发现随着大鼠食物脂肪含量的增加, 肝脏GGT, ALT, IRI数值也随之增高, 与正常对照组相比差异显著 $P<0.05$, 且IRI与肝脏脂肪的含量呈正比, 而罗格列酮组随着胰岛素敏感性的改善, 肝细胞脂肪堆积量也明显减轻, 肝脏的酶学和组织结构也趋于正常, 此结果表明体内胰岛素抵抗程度和肝脏中脂肪沉积量与肝细胞的损伤相一致, 进一步证实IR是引起脂质在肝细胞中沉积的原因, 还发现高脂组肝脏酶学升高以GGT, ALT为主, 且以GGT表现更为显著, 故推测以GGT升高为主的肝脏酶学改变为非酒精性脂肪肝酶学升高的一大特点。

磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3-K)途径是胰岛素作用的主要信号转导途径之一, 而作为PI3-K下游激酶的PKB/AKT是这一途径中重要的丝氨酸/苏氨酸激酶, PKB表达量的改变是导致IR的主要机制之一^[7]。目前有关高脂诱导IR的分子机制尚不清楚。本研究免疫组化结果发现磷酸化的PKB在正常肝脏的表达近乎达95%以上, 个别片子全表达, 而高脂组表达量只有34%较正常对照组减弱50%以上, 同时高脂组血脂的变化以TG升高为主, 同时肝脏内有大量的脂肪沉积, 于是我们推测血中大量的甘油三酯可能在脂肪、肌肉和肝脏细胞中的沉积使PKB丝氨酸磷酸化受抑制, 从而削弱了细胞内胰岛素信号蛋白PKB丝氨酸磷酸化进一步使胰岛素传递受损, 从而抑制糖的转运活动而诱导IR。反之, 具有IR的个体, 体内增

■应用要点

目前对于NAFLD仍无有效地治疗手段。对糖尿病、高脂血症患者, 主要目标是治疗原发病, 但效果不理想。寻找对脂肪肝具有潜在治疗作用的药物, 依然是亟待研究的重要课题。此研究的实现是为脂肪肝的治疗开辟一条新思路。

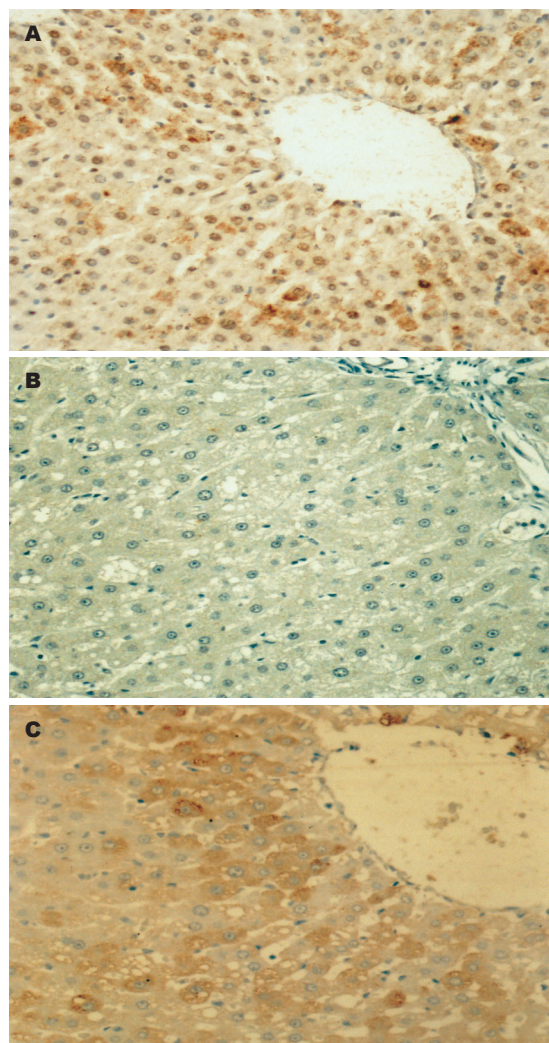


图2 各组肝免疫组化结果: A: 正常组, 可见约40%肝细胞胞质内有棕色颗粒沉着, 为肝细胞的阳性表达, 大多在中央静脉附近; B: 高脂组, 可见细胞间有大量的脂肪滴, 大多远离中央静脉, 大部分细胞肿胀, 肝细胞内未见明显棕色颗粒沉着; C: 高脂+罗格列酮组, 细胞间有的脂肪滴明显减少, 可见在中央静脉附近, 约20%的肝细胞内有棕色颗粒沉着。

高的胰岛素水平作用于脂肪细胞促进其对脂肪的分解, 形成的大量游离脂肪酸(free fatty acids, FFA)通过门脉系统送至肝细胞中并合成脂肪酸, 又加重了FFA在肝脏的沉积。升高FFA除直接的

细胞毒性外,可抑制胰岛素受体底物和磷脂酰肌醇-3激酶信号途径-P13. 严重IR的大鼠表现出胰岛素介导的IRS-1和PI3-K激酶活性下降^[8]. 同时我们尚推论IR时高胰岛素水平也促使肝脏的生脂作用进一步加重,而导致脂肪在肝细胞中的沉积,我们的研究与Wilkinson *et al*^[9]有关“高浓度FFA可影响胰岛素信号转导途径中的重要物质包括胰岛素受体底物1 (IRS-1)和蛋白激酶C等,从而诱导发生IR的研究”有一致之处.

我们尚发现高脂喂养后的大鼠在加用罗格列酮治疗16 wk后,磷酸化的PKB在肝脏中阳性细胞的表达数由高脂组的34%增加至66%,同时肝脏的酶学、肝脏细胞内脂沉积的量和细胞的超微结构均明显改善,进一步证实胰岛素抵抗可能作为原发病因参与NAFLD的发生和发展. 且实验中尚发现高脂组与正常对照组及高脂组与罗格列酮组大鼠血糖增加的均数差与ALT、GGT的均数差相一致,推测NAFLD可能是IR发展为糖尿病的中间阶段.

至今NAFL的发病机制尚未明确,我们研究的PKB丝氨酸磷酸化受抑而致胰岛素传导信号障碍而引发的胰岛素抵抗是NAFLD的发病的基础,提高胰岛素的活性,可能是改善NAFLD的有效手段.

4 参考文献

- 1 Ibdah JA, Perlegas P, Zhao Y, Angdisen J, Borgerink H, Shadoan MK, Wagner JD, Matern D, Rinaldo P, Cline JM. Mice heterozygous for a defect in mitochondrial trifunctional protein develop hepatic steatosis and insulin resistance. *Gastroenterology* 2005; 128: 1381-1390
- 2 Bugianesi E, Gentilecore E, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, David E, Rizzetto M, Marchesini G. A randomized controlled trial of metformin versus vitamin E or prescriptive diet in nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1082-1090
- 3 Qi NR, Wang J, Zidek V, Landa V, Mlejnek P, Kazdova L, Pravenec M, Kurtz TW. A new transgenic rat model of hepatic steatosis and the metabolic syndrome. *Hypertension* 2005; 45: 1004-1011
- 4 Nishino M, Ikegami H, Fujisawa T, Kawaguchi Y, Kawabata Y, Shintani M, Ono M, Ogiwara T. Functional polymorphism in Z-DNA-forming motif of promoter of SLC11A1 gene and type 1 diabetes in Japanese subjects: association study and meta-analysis. *Metabolism* 2005; 54: 628-633
- 5 Schattenberg JM, Wang Y, Singh R, Rigoli RM, Czaja MJ. Hepatocyte CYP2E1 overexpression and steatohepatitis lead to impaired hepatic insulin signaling. *J Biol Chem* 2005; 280: 9887-9894
- 6 Angulo P, Alba LM, Petrovic LM, Adams LA, Lindor KD, Jensen MD. Leptin, insulin resistance, and liver fibrosis in human nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2004; 41: 943-949
- 7 Stratford S, Hoehn KL, Liu F, Summers SA. Regulation of insulin action by ceramide: dual mechanisms linking ceramide accumulation to the inhibition of Akt/protein kinase B. *J Biol Chem* 2004; 279: 36608-36615
- 8 Yang SQ, Lin HZ, Mandal AK, Huang J, Diehl AM. Disrupted signaling and inhibited regeneration in obese mice with fatty livers: implications for nonalcoholic fatty liver disease pathophysiology. *Hepatology* 2001; 34: 694-706
- 9 Wilkinson P, Leach C, Ah-Sing EE, Hussain N, Miller GJ, Millward DJ, Griffin BA. Influence of alpha-linolenic acid and fish-oil on markers of cardiovascular risk in subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype. *Atherosclerosis* 2005; 181: 115-124

■同行评价

本文对PKB在NAFLD发病机制中的作用进行研究,设计合理,研究结果有一定意义.

电编 张敏 编辑 潘伯荣

银杏叶提取物抗大鼠肝纤维化中激活素A和肝细胞凋亡的作用

时昭红, 刘浩, 刘嵩, 张介眉, 涂晋文

■背景资料

肝纤维化是一切慢性肝病的重要病理特征,也是进一步向肝硬化发展的主要中间环节。肝脏慢性病变如寄生虫感染、病毒感染、免疫源性肝炎、遗传性金属超负荷、毒性作用等均可引起肝纤维化。我国是乙型病毒性肝炎高发区,肝炎后肝硬化发病率高;随着生活条件的改善,酒精性肝硬化的发病率也逐年增高。因此对肝纤维化防治的研究引起了越来越多的医务工作者的关注,探讨肝纤维化的发生机制、寻找高效的肝纤维化防治方法已迫在眉睫。

时昭红, 刘浩, 刘嵩, 张介眉, 武汉市第一医院消化内科 湖北省武汉市 430022
涂晋文, 湖北省中医学院 湖北省武汉市 430061
时昭红, 2006年湖北中医学院博士研究生毕业, 副主任医师, 主要从事肝纤维化防治方面的研究。
湖北省卫生厅科研计划资助项目, No. 2004079025
通讯作者: 时昭红, 430022, 湖北省武汉市, 武汉市第一医院消化内科, liuhao678@163.com
收稿日期: 2006-05-10 接受日期: 2006-05-22

Roles of activin A and hepatocellular apoptosis in the anti-liver fibrosis process induced by Ginkgo biloba extract in rats

Zhao-Hong Shi, Hao Liu, Song Liu, Jie-Mei Zhang, Jin-Wen Tu

Zhao-Hong Shi, Hao Liu, Song Liu, Jie-Mei Zhang, Department of Gastroenterology, Wuhan First Municipal Hospital, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Jin-Wen Tu, Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei Province, China
Supported by the Science Foundation from Health department of Hubei Province, No. 2004079025
Correspondence to: Zhao-Hong Shi, Department of Gastroenterology, Wuhan First Municipal Hospital, Wuhan 430022, Hubei Province, China. liuhao678@163.com
Received: 2006-05-10 Accepted: 2006-05-22

Abstract

AIM: To investigate the effects of Ginkgo biloba extract (GBE) on CCl₄-induced liver fibrosis as well as the underlying mechanisms.

METHODS: Thirty adult male Sprague Dawley rats were randomized into 3 groups: control group ($n = 10$), model group ($n = 10$) and treatment group ($n = 10$). Except the rats in the control group, the others were intraperitoneally injected with 500 mL/L CCl₄ (1 mL/kg) to induce liver cirrhosis (twice a week, for 8 weeks). Moreover, the rats in treatment group were intragastrically administered with GBE (0.4 g/kg) for 8 weeks. At the end of the 8th week, all the rats were sacrificed. Blood samples were collected for the determination of biochemical indicators.

Tissue samples were used for histopathological examinations. The expression of activin A was determined by immunohistochemistry and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Hepatocellular apoptosis was determined by the method of terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) method.

RESULTS: The grade of liver fibrosis in treatment group was lower than that in the model group ($P < 0.05$). The serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and albumin (ALB) in treatment group were significantly improved as compared with those in the model group (ALT: 2806.9 ± 576.1 nkat/L vs 4452.9 ± 709.5 nkat/L; AST: 5314.2 ± 1042 nkat/L vs $15\ 743.4 \pm 625.8$ nkat/L; ALB: 31.0 ± 2.1 g/L vs 21.7 ± 1.8 g/L; all $P < 0.05$). GBE treatment markedly reduced mRNA and protein levels of activin A (mRNA: 0.42 ± 0.09 vs 0.78 ± 0.15 ; protein: 4.2 ± 0.8 vs 11.4 ± 1.2 ; both $P < 0.01$). In comparison with that in the model group, the apoptosis index was decreased in treatment groups (7.56 ± 3.36 vs 16.06 ± 8.84 , $P < 0.01$).

CONCLUSION: GBE can markedly attenuate the degrees of hepatic fibrosis, and the mechanism may be correlated with the expression of activin A and hepatocellular apoptosis.

Key Words: Ginkgo biloba extract; Liver fibrosis; Activin A; Hepatocellular apoptosis; Immunohistochemistry; Reverse transcription-polymerase chain reaction

Shi ZH, Liu H, Liu S, Zhang JM, Tu JW. Roles of activin A and hepatocellular apoptosis in the anti-liver fibrosis process induced by Ginkgo biloba extract in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(21):2060-2066

摘要

目的: 观察银杏叶提取物(GBE)对大鼠肝纤维化的防治效果及其机制。

方法: ♂ SD大鼠30只随机分为3组: 正常对照组($n = 10$)、模型组($n = 10$)及GBE干预组($n = 10$), 模型组及GBE干预组给予500 mL/L CCl_4 ip, 1 mL/kg, 每周2次, 共8 wk, 干预组每天同时给予GBE灌胃, 0.4 g/kg. 实验结束后, 心脏取血分离血清行肝功能生化指标检测, 处死动物取肝脏液氮冻存及甲醛固定, 常规行HE染色, 免疫组化检测Activin A, RT-PCR检测Activin A mRNA的表达, TUNEL法检测肝细胞凋亡.

结果: 光镜下组织学检查纤维化分级GBE干预组低于模型组($P < 0.05$), 肝功能生化指标检测GBE干预组优于模型组(分别为ALT: 2806.9 ± 576.1 nkat/L vs 4452.9 ± 709.5 nkat/L; AST: 5314.2 ± 1042 nkat/L vs $15\ 743.4 \pm 625.8$ nkat/L; ALB: 31.0 ± 2.1 g/L vs 21.7 ± 1.8 g/L; P 均 < 0.05), 免疫组化和RT-PCR检测Activin A的表达GBE干预组低于模型组(免疫组化: 4.2 ± 0.8 vs 11.4 ± 1.2 ; RT-PCR: 0.42 ± 0.09 vs 0.78 ± 0.15 ; P 均 < 0.01), 凋亡指数(AI) GBE干预组低于模型组(7.56 ± 3.36 vs 16.06 ± 8.84 , $P < 0.01$).

结论: GBE对 CCl_4 诱导的大鼠肝纤维化有良好的防治作用, 其作用机制可能与肝组织Activin A表达降低及肝细胞凋亡减少有关.

关键词: 银杏叶提取物; 肝纤维化; 激活素A; 肝细胞凋亡; 免疫组化; 逆转录-聚合酶链反应

时昭红, 刘浩, 刘嵩, 张介眉, 涂晋文. 银杏叶提取物抗大鼠肝纤维化中激活素A和肝细胞凋亡的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(21):2060-2066
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2060.asp>

0 引言

银杏叶提取物(Ginkgo biloba extract, GBE)是一种用途广泛、无不良反应的天然物质, 主要成分为银杏黄酮甙和萜类, 其药理作用有改善心肌缺血、脑组织血液供应、清除氧自由基、抗血小板活化因子等. 临床上用GBE治疗冠心病心绞痛、脑缺血、脑老化、老年性痴呆、脑功能不全、哮喘等, 已收到满意的效果^[1-5]. 目前, 亦有大量的研究表明其在慢性肝损伤、肝纤维化过程中也具有保护预防作用^[6-10]. 我们通过四氯化碳(CCl_4)诱导大鼠肝纤维化模型, 同时用银杏叶提取物进行干预, 观察实验过程中细胞因子激活素A (Activin A)表达及肝细胞凋亡的变化, 研究银杏叶提取物预防大鼠肝纤维化的作用机制, 为临床合理应用银杏叶提取物提供参

考依据.

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级 ♂ SD大鼠30只(160 ± 20 g), 购于武汉大学实验动物中心; GBE由武汉市第一医院中药制剂室提供, 经湖北午时药业股份有限公司检验, 编号02-391; 四氯化碳为郑州化学试剂二厂产品; Activin A mAb购自美国R&D公司; SP试剂盒为北京中杉金桥生物技术有限公司产品; TUNEL法凋亡试剂盒购自武汉博士德生物制剂有限公司; Trizol试剂购自Invitrogen公司, 逆转录酶为Promega公司产品, Taq DNA聚合酶购自Biostar公司, RNA酶抑制剂和100 bp DNA Ladder购自华美生物工程公司, 焦磷酸乙二醇(DEPC)、琼脂糖为Sigma公司产品; 引物由上海生工生物公司合成, 大鼠Activin A上游引物: 5'GGACCTAACTCTCAGCCAGAGATG3', 下游引物: 5'TCTCAAAATGCAGTGTCTTCCTGG3', 全长280 bp; 大鼠GAPDH上游引物: 5'CATGACCACAGTCCATGCCATC3', 下游引物: 5'CACCCTGTTGCTGTAGCCATATTC3', 全长450 bp; HPIAAS-2000彩色图文分析系统; Biometra PCR仪; Bio-rad凝胶图像分析系统; Eppendoff低温离心机; 721分光光度计; HW-8B型超级微量恒温器等.

1.2 方法 将30只 ♂ SD大鼠随机分为3组, 正常组(10只)、模型组(10只)、GBE干预组(10只), 组间暴露无差异. 大鼠肝纤维化模型制备方法为首次应用纯 CCl_4 (分析纯)ip, 剂量为3 mL/kg, 后改为500 mL/L CCl_4 ip, 剂量为1 mL/kg, 2次/wk, 共8 wk. 模型组在造模的同时给予生理盐水灌胃, 1次/d; GBE干预组在造模的同时给予银杏叶制剂悬浊液按每只0.3 g/kg的剂量灌胃, 1次/d; 正常组只用生理盐水ip和灌胃, 处理方法同上. 造模过程中, 模型组死亡1只大鼠, 实验总周数为8 wk, 大鼠处死前禁食24 h, 处死时, 大鼠乙醚麻醉, 迅速从心脏取血, 分离血清, -20°C 保存. 然后处死动物, 迅速切取肝脏标本置于冰盐水中充分洗涤, 取右叶相同的部分以40 g/L福尔马林固定, 3 d内石蜡包埋备组织病理检测; 余下肝脏于液氮中速冻、 -80°C 冰箱内保存, 备肝组织匀浆抽提RNA. 将固定好的肝组织石蜡包埋切片, 常规行HE染色, 光镜下观察. HE染色由同一病理专科医生予以纤维化分级, 分级标准根据其纤维化程度分为0-4级. 0级: 无纤维化; 1级: 纤维结缔组织仅局限于汇管区或汇管区扩大,

■创新盘点

激活素(Activin)是转化生长因子超家族成员, 是近年来发现的一组重要细胞因子, 目前对激活素A (Activin A)的研究比较多. 近年研究显示, 激活素A与肝脏病变有密切的关系, 是肝脏再生过程中的负向调节因子. 肝细胞产生的激活素A, 通过自分泌和旁分泌方式, 抑制肝细胞DNA合成, 诱导肝细胞凋亡, 促进肝纤维化的形成.

■同行评价

本文探讨激活素A和肝细胞凋亡在银杏叶提取物抗大鼠肝纤维化中的作用, 结构完整, 立题思路清晰, 采用的研究方法可靠、丰富, 具有较高理论水平。

表 1 各组大鼠肝纤维化分级、肝功能指标、Activin A蛋白表达及凋亡指数的变化

分组	n	肝纤维化的分级					ALT	AST	ALB	Activin A	凋亡指数
		0	1	2	3	4	(nkat/L)	(nkat/L)	(g/L)	(%)	(AI)
正常	10	10	0	0	0	0	1667 ± 352.6 ^b	3257.6 ± 542.4 ^b	39.4 ± 1.5 ^b	0.3 ± 0.1 ^b	2.11 ± 1.23 ^b
模型	9	0	1	1	3	4	4452.9 ± 709.5	15 743.4 ± 625.8	21.7 ± 1.8	11.4 ± 1.2	16.06 ± 8.84
EGB	10	0	3	4	2	1	2806.9 ± 576.1 ^a	5314.2 ± 1042 ^a	31.0 ± 2.1 ^a	4.2 ± 0.8 ^b	7.56 ± 3.36 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 模型组。

有向小叶发展的倾向; 2级: 纤维结缔组织增生进入肝小叶2/3及有1级同样的改变; 3级: 纤维结缔组织进入肝小叶中央静脉周围; 4级: 纤维结缔组织在肝小叶呈多处弥漫性增生, 有假小叶形成, 并有3级同样的改变。取大鼠血液, 3000 r/min离心10 min, 取血清, -20℃保存, 送检验科以CX全自动生化分析仪(美国Backman公司产品)检测肝功能指标: 谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)和白蛋白(ALB)。

1.2.1 免疫组织化学检查 采用石蜡包埋常规切片, SP法, Activin A mAb以1:100稀释, DAB显色, 苏木素复染。PBS代替一抗作为阴性对照。显色结果采用HPIAS-2000型多媒体彩色图像分析系统对染色阳性部位进行光密度值测定。通过显微摄像系统放大200倍, 在每张切片上随机选取3个视野, 以胞质内出现棕色颗粒为Activin A阳性表达, 测定其平均光密度值(MOD)、阳性区域面积百分比。

1.2.2 RT-PCR 称取肝组织50-100 mg用Trizol提取总RNA, 采用分光光度法测定其含量及纯度, 测定 A_{260}/A_{280} 值。取总RNA 2 μg, 42℃逆转录90 min。参数设置94℃变性, 3 min×1循环。94℃变性30 s, 53℃退火30 s, 72℃延伸45 s, 共35个循环。最后72℃彻底延伸7 min×1循环, 同法扩增GAPDH作为内参照。取5 μL PCR产物15 g/L琼脂糖凝胶电泳。凝胶图像分析系统检测灰度, Activin A/GAPDH比值表示Activin A mRNA相对水平。

1.2.3 细胞凋亡原位检测 采用TUNEL法, 严格按试剂盒说明书进行操作, 以不加末端脱氧核酸转移酶(TdT)作为阴性对照。光镜下观察, 胞核染成棕黄色为阳性细胞。观察不少于5个高倍视野(400倍), 以平均每100个细胞核中含凋亡细胞个数作为凋亡指数(AI)。

统计学处理 处理结果计量资料用mean ± SD表示, SPSS10.0软件进行配对 t 检验, 纤维化

计数资料采用Ridit分析。

2 结果

肝脏HE染色显示, 正常大鼠可见少量胶原着色, 病理模型组肝小叶结构破坏, 纤维组织增生明显, 将肝小叶分隔成大小不等的肝细胞团, 肝细胞广泛变性坏死, 汇管区扩大、胶原沉积。GBE干预组肝细胞有不同程度的变性坏死, 汇管区及小叶间有少量纤维组织增生, 纤维间隔细小, 与模型组比较差异显著。统计分析, GBE干预组较模型组纤维化程度轻($P < 0.05$, 图1, 表1)。模型组ALT、AST显著升高, ALB显著降低; GBE干预组ALT、AST较模型组明显降低, ALB则显著升高(表1)。

2.1 免疫组化结果 正常组肝组织中几乎不表达Activin A, 模型组Activin A阳性表达主要位于中央小叶和门静脉周围肝细胞中, 并在Kuffer细胞、类间质细胞质及其周围也可见其表达, GBE干预组阳性染色程度均较模型组明显减轻($P < 0.01$, 表1, 图2)。

2.2 肝细胞凋亡结果 正常组大鼠肝组织中偶见凋亡细胞, 模型组大鼠肝组织的凋亡细胞多分布在肝实质中, 胞核呈棕黄色, 镜下视野可见广泛肝细胞凋亡, GBE干预组凋亡肝细胞数目显著减少, 各组间肝细胞AI差异有显著性($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$, 表1, 图3)。

2.3 RT-PCR 正常肝组织几乎不表达Activin A mRNA, 而模型组表达明显增强, Activin A/GAPDH比值为0.78 ± 0.15, 远高于正常组($P < 0.01$); GBE干预组Activin A/GAPDH比值为0.42 ± 0.09, Activin A mRNA表达低于模型组($P < 0.01$, 图4, 图5)。

3 讨论

肝纤维化是慢性肝病重要的病理特征, 也是进一步向肝硬化发展的主要中间环节。其发生、

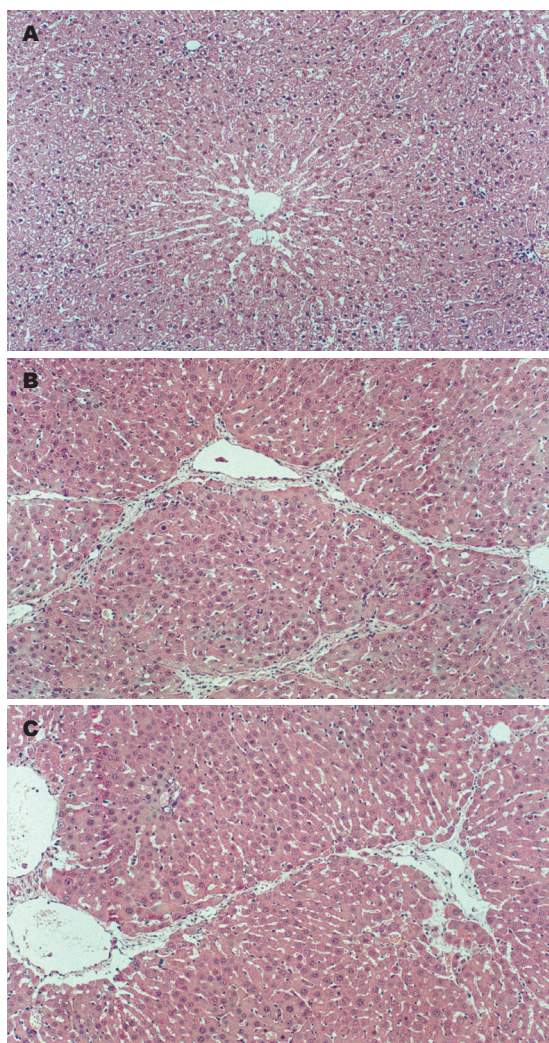


图 1 大鼠肝脏病理(HE × 100). A: 正常组; B: 模型组; C: EGB干预组.

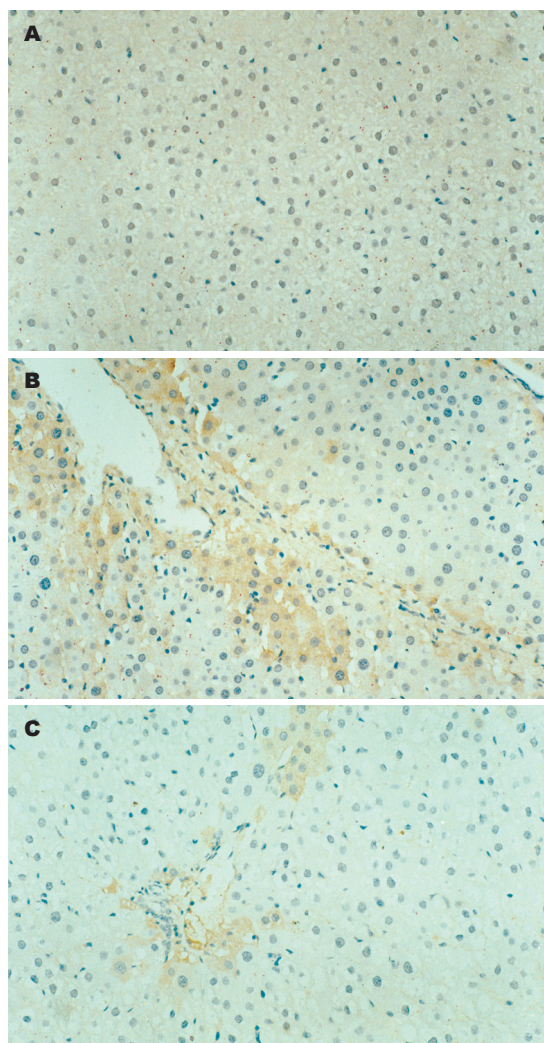


图 2 大鼠肝组织Activin A表达(SP × 200). A: 正常组; B: 模型组; C: EGB干预组.

发展是一个非常复杂的过程, 具体机制目前还不十分明了. 但可以肯定的是, 肝纤维化是慢性肝损伤引起肝脏代谢和细胞间相互作用紊乱的结果^[11-12]. 无论何种原因引起的慢性肝病, 其特征为: 肝实质细胞的慢性炎症和慢性坏死以及细胞间基质的数量和质量的变化而引起细胞间质的沉积. 肝纤维化过程中在细胞水平上可能涉及肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)、Kupffer细胞、巨噬细胞的活化; 在分子水平上, 他与生长因子、细胞因子、化学因子、细胞间质生成和沉积的改变有关^[13-16]. 近年来, GBE普遍应用于临床, 其主要药理作用为抗氧化, 在心、脑血管疾病中研究较多. GBE具有很强的抗氧自由基、增强抗氧化酶活性的作用, 还可抑制血小板抑制因子, 改善微循环等, 对心、脑血管缺血性损伤有明显的保护作用. GBE还能明显的抗氧化和抗脂质过氧化, 减少氧自由基对ATP

酶的攻击, 增强中枢神经系统功能、调节神经递质和激素的水平等^[2-3,5]. 此外, Daba *et al*研究表明GBE可通过抑制脂质过氧化而对博莱霉素(bleomycin)诱导的肺纤维化具有保护作用^[17], 而国内的研究亦显示GBE能使肺间质纤维化减轻^[18]. 在肝脏方面, 研究显示, GBE对肝窦状内皮细胞具有保护作用^[6], 可以改善慢性肝损伤后的微循环紊乱^[6-7]. 我们前期的研究也表明, GBE对实验性大鼠慢性肝损伤、肝纤维化具有保护作用^[8-10]. 我们利用CCl₄诱导实验性肝纤维化模型, 同时应用GBE进行干预, 结果显示, 造模8 wk后模型组肝细胞广泛变性坏死, 纤维组织增生明显, 将肝小叶分隔成大小不等的肝细胞团, 表示造模成功. 而GBE干预组仅汇管区及小叶间有少量纤维组织增生, 纤维间隔细小, 与模型组相比差异显著. 并且, GBE干预组ALT, AST等各项肝功能指标也明显优于模型组. 这说明GBE对

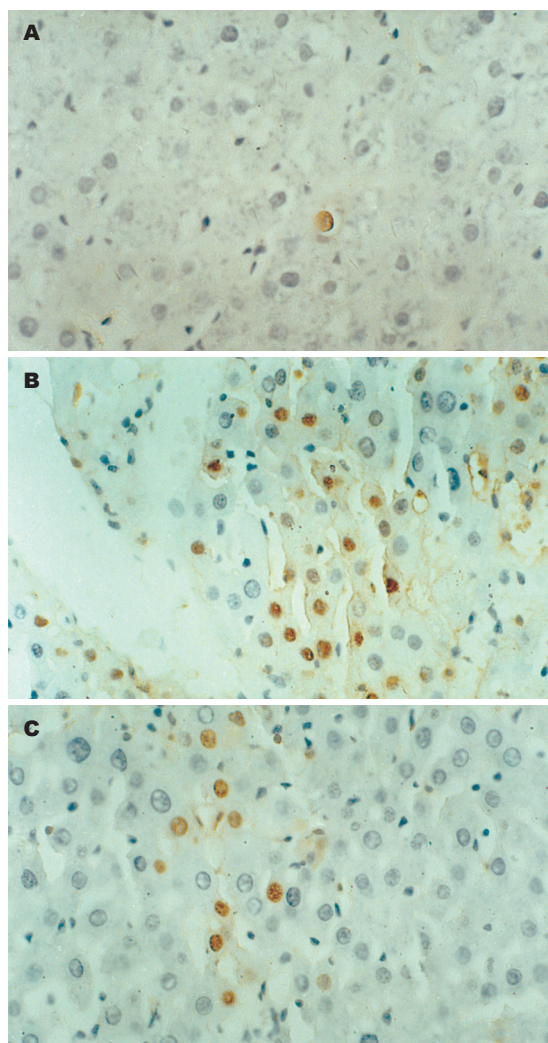


图3 大鼠肝细胞凋亡变化(TUNEL $\times 400$)。A: 正常组; B: 模型组; C: EGB干预组。

实验性大鼠肝纤维化具有预防和抑制作用, 结果与以前的研究相一致。

Activin是转化生长因子超家族成员, 是近年来发现的一组重要细胞因子。它具有广泛的生物学活性, 如在动物胚胎中诱导中胚层和前后极分化, 在动物和人体内刺激多种细胞分化等。Activin是由2个 β 亚基构成的二聚体糖蛋白, 目前已知有5种 β 亚基, 其分别为 βA , βB , βC , βD 和 βE 。在正常肝脏实质细胞中5种 β 亚基均有表达, 其中 βA 和 βB 亚基的表达是肝脏维持生理功能所必须的, 另外3种 β 亚基在肝脏中的作用尚不很清楚。按照亚基结合的方式, 可分为Activin A ($\beta A\beta A$)、Activin B ($\beta B\beta B$)和Activin AB ($\beta A\beta B$)。目前对Activin A的研究比较多。研究表明, Activin作用不仅限于性腺, 而且在组织细胞生长分化、骨形成、胚胎发育、免疫调节、组织损伤修复及炎症反应过程中均发挥了重要

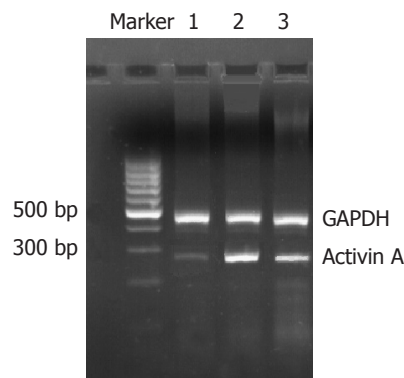


图4 大鼠肝组织Activin A的RT-PCR扩增产物。1: 正常组; 2: 模型组; 3: EGB干预组。

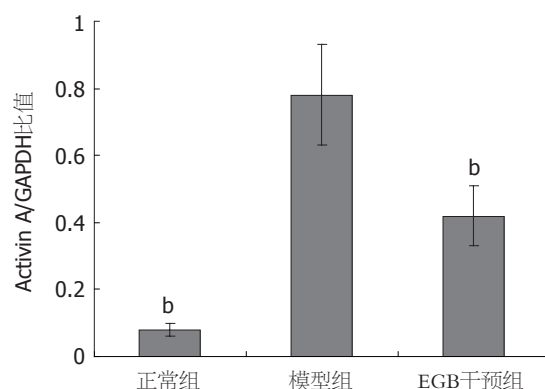


图5 大鼠肝组织Activin A mRNA表达。^b $P < 0.01$ vs 模型组。

作用^[19-21]。近年研究显示, Activin A与肝脏病变有密切的关系。在慢性病毒性肝炎患者血清中Activin A比正常对照组患者明显升高^[22]; 亦有学者发现肝硬化及肝细胞癌患者血清Activin A水平升高, 且后者升高更为明显^[23], 提示发生硬化的肝脏和肝脏肿瘤可能部分有Activin A的参与。在实验性肝纤维化方面, 研究证实, 不同方式诱导的大鼠肝纤维化都有肝脏Activin A的表达增强^[24-26]。而在急性肝损伤时, 研究亦表明Activin A表达增强, 对HSC分泌纤维具有调节作用^[27]。总之大量研究证明, Activin A是肝脏再生过程中的负向调节因子。肝细胞产生的Activin A, 通过自分泌和旁分泌方式, 抑制肝细胞DNA合成, 诱导肝细胞凋亡^[28-32], 促进HSC和成纤维细胞分泌I型胶原^[27,33]。

凋亡是肝实质和间质细胞死亡的最主要形式, 肝细胞增殖和凋亡失去平衡, 肝脏再生异常, 导致慢性肝炎、肝硬化和肝癌等病变的发生。目前的研究表明, 细胞凋亡在肝纤维化的形成和发展中发挥着重要的作用, 而肝细胞凋亡更是在肝纤维化的进展过程中具有促进作用^[13-14]。

Activin A与肝细胞凋亡的关系为我们理解肝纤维化的形成提供了新的思路. 慢性肝损伤过程中, 炎症因子刺激Activin A在肝脏表达增多, 肝细胞凋亡也随之增多, 从而促进形成肝纤维化甚至肝硬化^[26]. 本实验模型组造模8 wk后, 大鼠肝纤维化形成, 免疫组化和RT-PCR显示肝脏中Activin A表达明显增强, 肝细胞凋亡也明显增加, 和以上研究结果相一致. 而在GBE干预组, 大鼠肝脏中Activin A表达较模型组减弱, 肝细胞凋亡数量较模型组减少, 大鼠肝纤维化程度也较模型组明显为轻. 这说明, GBE抗大鼠肝纤维化的作用可能与肝组织Activin A表达及肝细胞凋亡有关, GBE干预使肝纤维化大鼠Activin A表达减少从而减少肝细胞凋亡可能是其机制之一.

4 参考文献

- Gertz HJ, Kiefer M. Review about Ginkgo biloba special extract GBE 761 (Ginkgo). *Curr Pharm Des* 2004; 10: 261-264
- McKenna DJ, Jones K, Hughes K. Efficacy, safety, and use of ginkgo biloba in clinical and preclinical applications. *Altern Ther Health Med* 2001; 7: 70-86, 88-90
- DeFeudis FV. A brief history of GBE 761 and its therapeutic uses. *Pharmacopsychiatry* 2003; 36 Suppl 1: S2-7
- Smith JV, Luo Y. Studies on molecular mechanisms of Ginkgo biloba extract. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004; 64: 465-472
- Diamond BJ, Shiflett SC, Feiwei N, Matheis RJ, Noskin O, Richards JA, Schoenberger NE. Ginkgo biloba extract: mechanisms and clinical indications. *Arch Phys Med Rehabil* 2000; 81: 668-678
- Zhang C, Zu J, Shi H, Liu J, Qin C. The effect of Ginkgo biloba extract (GBE 761) on hepatic sinusoidal endothelial cells and hepatic microcirculation in CCl₄ rats. *Am J Chin Med* 2004; 32: 21-31
- Topp S, Knoefel WT, Schutte A, Brilloff S, Rogiers X, Gundlach M. Ginkgo biloba (GBE 761) improves microcirculation after warm ischemia of the rat liver. *Transplant Proc* 2001; 33: 979-981
- Luo YJ, Yu JP, Shi ZH, Wang L. Ginkgo biloba extract reverses CCl₄-induced liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1037-1042
- 刘诗权, 于皆平, 罗和生, 冉宗学. 银杏叶萃取物对大鼠纤维化肝脏NF- κ B的影响. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 922-926
- 胡伟, 时昭红, 马庭芳, 于皆平. 银杏叶提取物抗大鼠肝纤维化的作用. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 886-891
- Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275: 2247-2250
- Hoek JB, Pastorino JG. Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury. *Alcohol* 2002; 27: 63-68
- Albanis E, Friedman SL. Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy. *Clin Liver Dis* 2001; 5: 315-334
- Lamireau T, Desmouliere A, Bioulac-Sage P, Rosenbaum J. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Arch Pediatr* 2002; 9: 392-405
- Kanzler S, Lohse AW, Keil A, Henninger J, Dienes HP, Schirmacher P, Rose-John S, zum Buschenfelde KH, Blessing M. TGF-beta1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis. *Am J Physiol* 1999; 276: G1059-1068
- Wang XZ, Zhang LJ, Li D, Huang YH, Chen ZX, Li B. Effects of transmitters and interleukin-10 on rat hepatic fibrosis induced by CCl₄. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 539-543
- Daba MH, Abdel-Aziz AA, Moustafa AM, Al-Majed AA, Al-Shabanah OA, El-Kashef HA. Effects of L-carnitine and ginkgo biloba extract (EG b 761) in experimental bleomycin-induced lung fibrosis. *Pharmacol Res* 2002; 45: 461-467
- 陈建, 何冰, 刘新民, 王海斌, 章巍, 张英. 银杏叶制剂治疗肺间质纤维化的实验研究. *中国中西医结合杂志* 2000; 20: 441-443
- Woodruff TK. Regulation of cellular and system function by activin. *Biochem Pharmacol* 1998; 55: 953-963
- Luisi S, Florio P, Reis FM, Petraglia F. Expression and secretion of activin A: possible physiological and clinical implications. *Eur J Endocrinol* 2001; 145: 225-236
- Naumnik B, Borawski J, Mysliwiec M. Activin A-follistatin: new cytokines, new perspectives. *Pol Arch Med Wewn* 2003; 109: 431-435
- Patella S, Phillips DJ, de Kretser DM, Evans LW, Groome NP, Sievert W. Characterization of serum activin-A and follistatin and their relation to virological and histological determinants in chronic viral hepatitis. *J Hepatol* 2001; 34: 576-583
- Pirisi M, Fabris C, Luisi S, Santuz M, Toniutto P, Vitulli D, Federico E, Del Forno M, Mattiuzzo M, Branca B, Petraglia F. Evaluation of circulating activin-A as a serum marker of hepatocellular carcinoma. *Cancer Detect Prev* 2000; 24: 150-155
- Huang X, Li DG, Wang ZR, Wei HS, Cheng JL, Zhan YT, Zhou X, Xu QF, Li X, Lu HM. Expression changes of activin A in the development of hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 37-41
- Sugiyama M, Ichida T, Sato T, Ishikawa T, Matsuda Y, Asakura H. Expression of activin A is increased in cirrhotic and fibrotic rat livers. *Gastroenterology* 1998; 114: 550-558
- Gold EJ, Francis RJ, Zimmermann A, Mellor SL, Cranfield M, Risbridger GP, Groome NP, Wheatley AM, Fleming JS. Changes in activin and activin receptor subunit expression in rat liver during the development of CCl₄-induced cirrhosis. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 201: 143-153
- Date M, Matsuzaki K, Matsushita M, Tahashi Y, Sakitani K, Inoue K. Differential regulation of activin A for hepatocyte growth and fibronectin synthesis in rat liver injury. *J Hepatol* 2000; 32: 251-260
- Yasuda H, Mine T, Shibata H, Eto Y, Hasegawa Y, Takeuchi T, Asano S, Kojima I. Activin A: an autocrine inhibitor of initiation of DNA synthesis in rat hepatocytes. *J Clin Invest* 1993; 92: 1491-1496
- Hully JR, Chang L, Schwall RH, Widmer HR, Terrell TG, Gillett NA. Induction of apoptosis in the murine liver with recombinant human activin A. *Hepatology* 1994; 20: 854-862
- Kanamaru C, Yasuda H, Fujita T. Involvement of

- Smad proteins in TGF-beta and activin A-induced apoptosis and growth inhibition of liver cells. *Hepatol Res* 2002; 23: 211-219
- 31 Ichikawa T, Zhang YQ, Kogure K, Hasegawa Y, Takagi H, Mori M, Kojima I. Transforming growth factor beta and activin tonically inhibit DNA synthesis in the rat liver. *Hepatology* 2001; 34: 918-925
- 32 Gold EJ, Zhang X, Wheatley AM, Mellor SL, Cranfield M, Risbridger GP, Groome NP, Fleming JS. betaA- and betaC-activin, follistatin, activin receptor mRNA and betaC-activin peptide expression during rat liver regeneration. *J Mol Endocrinol* 2005; 34: 505-515
- 33 Wada W, Kuwano H, Hasegawa Y, Kojima I. The dependence of transforming growth factor-beta-induced collagen production on autocrine factor activin A in hepatic stellate cells. *Endocrinology* 2004; 145: 2753-2759

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 •

第六届全国消化道恶性病变介入治疗研讨会第二轮通知

本刊讯 第六届全国消化道恶性病变介入治疗研讨会于2006-09-15/18在浙江省杭州市举行。本届会议由上海同仁医院和浙江省中医院联合主办, 中华放射学杂志、中华消化内镜杂志、世界华人消化杂志和介入放射学杂志共同协办。会议将邀请众多著名专家围绕消化疾病介入诊治新热点及消化道内支架治疗的热门技术和疑难问题进行专题演讲和实例操作, 并就消化道支架治疗中的疑难病例和出现问题以沙龙形式深入研讨。参会代表可获国家级继续教育 I 类学分12分。

1 会议主要议题

消化疾病诊治进展、消化内镜治疗新技术应用、化疗药物应用新进展、上消化道吻合口梗阻和瘘的综合治疗、胸腔胃穿瘘的支架封堵技术、肠道支架临床应用、肝门部胆道梗阻的内支架治疗、食管及胃肠道支架难点研讨以及其他介入新技术应用等。

2 征文内容

征集消化道恶性病变内镜治疗、介入放射治疗、外科治疗、肿瘤化学治疗、生物治疗及免疫治疗等方面的论著、文献综述、临床经验、个案报告等稿件。欢迎消化、介入放射、肿瘤、普外、胸外及肝胆外科等相关学科医师投稿参会。

3 投稿要求

专题讲座由组委会约稿。论著需1000字以内的标准论文摘要, 包括目的、方法、结果与结论四要素。经验交流、短篇报道等全文限1000字以内。所有稿件一律要求电脑打印用E-mail投稿, 邮寄者需附WORD格式软盘(请自留稿底, 恕不退稿)。

4 报名地址及要求

联系地址: 杭州市邮电路54号(浙江省中医院)吕宾 收, 邮编: 310006, 电话: 0571-87032028, 手机: 13906515409, E-mail: lvin@medmail.com.cn; 上海市愚园路786号(上海同仁医院)茅爱武 收, 邮编: 200050, 电话: 021-62524259-3397, 手机: 13371936559, E-mail: maoaw@sohu.com。会议收费800元, 提前注册收费700元, 截稿日期: 2006-08-15。

二硝基氯苯引起大鼠结肠炎与神经源性肠炎的关系

吴星宇, 潘慧, 黄鹏, 吴彬, 蒋惠君, 梅林

吴星宇, 潘慧, 黄鹏, 吴彬, 梅林, 北京大学医学部生理学与病理生理学系 北京市 100083

蒋惠君, 北京大学医学部病理学系 北京市 100083

吴星宇, 1994年武汉华中农业大学学士, 讲师, 主要从事动物生理学和病理生理学研究。

北京市自然科学基金资助项目, No. 7063083

通讯作者: 梅林, 100083, 北京市海淀区学院路38号, 北京大学医学部生理学与病理生理学系. linmei@bjmu.edu.cn

电话: 010-82801477 传真: 010-82801477

收稿日期: 2006-05-08 接受日期: 2006-05-22

Dinitrochlorobenzene-induced colitis and its correlations with neurogenic inflammation of gut in rats

Xing-Yu Wu, Hui Pan, Peng Huang, Bin Wu, Hui-Jun Jiang, Lin Mei

Xing-Yu Wu, Hui Pan, Peng Huang, Bin Wu, Lin Mei, Department of Physiology and Pathophysiology, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China
Hui-Jun Jiang, Department of Pathology, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China
Supported by the Natural Science Foundation of Beijing, No. 7063083

Correspondence to: Lin Mei, Department of Physiology and Pathophysiology, Peking University Health Science Center, 38 Xueyuan Road, Haidian District, Beijing 100083, China. linmei@bjmu.edu.cn

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

Abstract

AIM: To explore the immune mechanism of ulcerative colitis as well as the relationship between ulcerative colitis and enteric nervous system.

METHODS: Male Sprague Dawley rats were divided into 2, 4-dinitrochlorobenzene (DNCB) groups and ethanol (control) group. After sensitized by DNCB smeared on the abdominal skin, the rats were challenged with DNCB by enema or intrathecal injection. The weight, stool viscosity and hematochezia were observed and accumulated as the disease active index (DAI) score; the colon pathological score was achieved by macropathology and HE staining of section prepared for microscopy; and the activity of leukocyte migration inhibitory factor (LMIF) was determined by immunofluorescence staining in

colon tissues.

RESULTS: In the rats treated with 4 and 8 g/L DNCB enema, the macropathological and microscopic scores were significantly higher than those in the controls (macropathological: 2.200 ± 0.416 , 3.857 ± 0.143 vs 0.143 ± 0.143 , $P < 0.05$; microscopic: 2.000 ± 0.471 , 3.714 ± 0.184 vs 0.429 ± 0.297 , $P < 0.05$). The colon tissue showed higher fluorescence intensity of LMIF in the rats treated with DNCB enema than that in the controls. In the rats intrathecally injected with 8 and 16 g/L DNCB, the DAI scores were significantly higher than those in the control rats ($P < 0.05$ and $P < 0.01$). Colon HE staining showed mucosal edema in the rats intrathecally injected 4 g/L DNCB, infiltration of numerous inflammatory cells in those with 8 g/L DNCB, and mucosal erosion, necrosis, and ulceration in those with 16 g/L DNCB.

CONCLUSION: Colitis can be induced by DNCB enema or intrathecal injection in sensitized rat, which reflects a delayed type of hypersensitivity (DTH). The enteric nervous system and neuro-immune mediator LMIF play important roles in the DNCB-induced colitis.

Key Words: Colitis; Neurogenic inflammation; 2, 4-dinitrochlorobenzene; Rats

Wu XY, Pan H, Huang P, Wu B, Jiang HJ, Mei L. Dinitrochlorobenzene-induced colitis and its correlations with neurogenic inflammation of gut in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(21):2067-2072

摘要

目的: 以2, 4-二硝基氯苯(DNCB)致大鼠结肠炎, 探索免疫因素的作用以及结肠炎与肠神经系统的关系。

方法: 给♂SD大鼠以DNCB涂腹致敏, 然后以DNCB灌肠或脊髓蛛网膜下腔注射(ith)激发过敏。DNCB灌肠或ith注射后, 根据每日记录的动物体质量和大便性状做疾病活动指数(DAI)评分; d 10-15处死动物后, 做结肠大体评分、结肠HE染色的镜下评分以及肠壁组织白细胞

■背景资料

自100多年前发现溃疡性结肠炎(UC)至今, 对其病因仍然没有彻底阐明。从神经源角度分析UC的发病机制, 是近10 a国际学术界出现的一种倾向。相关的国内文献尚未检索到, 国外文献最经典的是1999年Kemler *et al*和2000年Peck *et al*的临床病例报道。迄今停留在推测阶段, 缺乏直接证据, 而且再未见他们后续报道。本研究采用了方法学上颇具难度的ith插管慢性动物实验, 第一次直接探讨肠神经与结肠炎的因果关系。

■研究前沿

UC研究的热点是其病因和发病机制。本研究从神经免疫特别是神经源性炎症的观点出发,必将为UC病因和发病机制的认识提供新思路。

移动抑制因子(LMIF)的免疫荧光测定。

结果: 4 g/L和8 g/L DNCB灌肠组大鼠的结肠大体和镜下评分明显高于600 mL/L乙醇灌肠组(大体评分: 2.200 ± 0.416 , 3.857 ± 0.143 vs 0.143 ± 0.143 , $P < 0.05$; 镜下评分: 2.000 ± 0.471 , 3.714 ± 0.184 vs 0.429 ± 0.297 , $P < 0.05$), 其肠壁组织中LMIF的荧光染色也明显强于乙醇组。ith DNCB 8和16 g/L组大鼠的DAI评分明显高于ith 600 mL/L乙醇组($P < 0.05$ 和 0.01), ith 4, 8和16 g/L DNCB大鼠的结肠组织镜下表现为黏膜层水肿、大量炎性细胞浸润、黏膜糜烂坏死和溃疡形成。

结论: DNCB灌肠或ith注射可使致敏大鼠出现结肠炎, 肠神经系统和神经免疫介导体LMIF在DNCB所致实验性结肠炎中起重要作用。

关键词: 结肠炎; 神经源性炎症; 2, 4-二硝基氯苯; 大鼠

吴星宇, 潘慧, 黄鹏, 吴彬, 蒋惠君, 梅林. 二硝基氯苯引起大鼠结肠炎与神经源性结肠炎的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(21):2067-2072

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2067.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)使用多种治疗手段都不能取得根治效果^[1-3]。1999年Barbara *et al*^[4]提出, UC很可能是神经源性炎症的表现形式之一, 即肠的神经源性炎症, 其根据主要来自Kemler *et al*^[5]的临床报道以及此临床报道之前的一些实验室资料^[6-8]。Barbara的观点很快得到Peck *et al*^[9]的又一项临床观察的支持。这种观点的出现给人们认识UC的病因提供了新的思路。利用动物研究UC时, 由致敏原2, 4-二硝基氯苯(DNCB)建立的具有DTH (delayed-type hypersensitivity)反应特征^[10]的实验性结肠炎模型, 在其发病机制和病理学改变上被认为与人的UC有许多相似之处^[11], 并且较早在豚鼠和家兔^[10-11], 后来又在大鼠和小鼠^[12-14]被研究和报道。我们在DNCB致小鼠结肠炎^[13-14]的基础上, 用DNCB灌肠大鼠模型探讨作为神经免疫介导体和DTH反应特异指标^[15-16]的白细胞移动抑制因子(LMIF)是否在炎性结肠的组织中活性增加; 然后用DNCB中枢注射的大鼠模型, 探讨脊髓神经元直接受到免疫炎症刺激后, 其末梢支配的靶器官(胃肠道)是否发生炎症改变。进一步探索

免疫因素在UC中的作用及其与肠神经系统的关系, 从而为Barbara和Peck关于“神经源性结肠炎”的观点提供直接证据。

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂SD大鼠由北京大学医学部实验动物科学部提供, 体质量180-210 g。DNCB购于北京化学试剂公司, 兔抗大鼠LMIF多克隆抗体购于Santa Cruz公司, 荧光素TRITC(罗丹明)标记的山羊抗兔IgG、山羊血清工作液和EDTA均购于北京中杉金桥生物技术有限公司。DNCB涂腹液以丙酮: 橄榄油(1: 1)混合液配制, 浓度为33 g/L; DNCB灌肠液和脊髓蛛网膜下腔注射(ith)液均以600 mL/L乙醇配制, 灌肠用DNCB浓度分别为2 g/L, 4 g/L和8 g/L, ith用DNCB浓度分别为4 g/L, 8 g/L和16 g/L。兔抗大鼠LMIF抗体和荧光素标记的二抗均以PBS缓冲液(pH 7.4)稀释, PBS-H₂O₂以30 mL/L H₂O₂和PBS配制(比例1: 9)。

1.2 方法

1.2.1 DNCB造模及结肠炎评价 实验第1天, 在大鼠的腹部剪毛区滴涂200 μ L DNCB涂腹液致敏, 每天1次, 连续4 d。第5天, 以DNCB灌肠液或ith激发过敏。灌肠方法: 将直径1 mm的硅胶管从肛门插入经12 h禁食后的大鼠结肠, 插管尖端距肛门约6.5-7.0 cm, 分别灌入2 g/L, 4 g/L和8 g/L的DNCB灌肠液, 每天1次, 每次2 mL/kg体质量。ith注射方法: 给大鼠进行ith插管后, 取4 g/L, 8 g/L和16 g/L的DNCB, 分别注入大鼠脊髓蛛网膜下腔, 每天1次, 每次10 μ L, 于2 min内缓慢注入。对照组以同体积溶剂(600 mL/L乙醇)灌肠或ith。DNCB灌肠或ith后, 每日记录动物的体质量和大便性状, 进行DAI (disease activation index)综合评分^[13]和结肠大体、镜下评分^[14]。

1.2.2 脊髓蛛网膜下腔(ith)插管 参照Wu *et al*^[17]的方法并加以改动: 以100 mL/L水合氯醛麻醉大鼠(ip, 0.3 g/kg体质量)后, 腰背部剪毛、消毒。在髂棘(约L₄)水平正中线沿脊柱纵向分别上下划开皮肤0.5 cm, 用一长约15 cm的不锈钢套管(外径0.9 mm, 内径可容PE-10管通过, 前端打磨成斜面), 在L₄和L₅间隙垂直刺入椎管, 以动物的尾巴或后肢出现轻微抽动确认钢管在脊髓内。改变钢套管方向指向动物头端, 将PE-10管通过钢套管沿蛛网膜下腔向头端送入约2.8 cm, 达L₁-L₅水平。拔除钢套管, 缝合固定PE-10管。颈背部皮肤剪小口, 使PE-10管经皮下由此穿出, 缝

表 1 致敏大鼠DNCB灌肠后结肠病理学评分

药物	Macropathology score						Microscopic score					
	0	1	2	3	4	mean ± SE	0	1	2	3	4	mean ± SE
600 mL/L乙醇	(6)	(1)				0.143 ± 0.143	(5)	(1)	(1)			0.429 ± 0.297
2 g/L DNCB	(3)	(4)	(2)			0.889 ± 0.261	(3)	(3)	(3)			1.000 ± 0.287
4 g/L DNCB	(1)	(2)	(3)	(2)	(2)	2.200 ± 0.416 ^a	(1)	(3)	(2)	(1)	(2)	2.000 ± 0.471 ^a
8 g/L DNCB				(1)	(6)	3.857 ± 0.143 ^a			(2)	(5)		3.714 ± 0.184 ^a

^a $P < 0.05$ vs 600 mL/L乙醇组. 括号中数字代表动物例数.

合固定, 外露约1 cm, 管内注入3 g/L肝素生理盐水, 封口, 缝合皮肤. 术后ip青霉素10 kU以预防感染, 3 d后即可进行实验.

1.2.3 LMIF免疫荧光染色 取经过石蜡包埋的大鼠肠组织切片(5 μ m), 按参考文献[18]方法进行LMIF免疫荧光染色. 大致步骤: 标本做脱蜡和水化处理, 并经过抗原修复和封闭非特异结合等处理后, 滴加兔抗大鼠LMIF一抗(1:300), 置于湿盒4℃过夜. 待标本恢复至室温并经PBS洗后, 滴加荧光素(TRITC)标记的二抗(1:300), 避光室温下孵育1 h. 在Nikon-Eclipse TE2000- μ (日本)荧光显微镜下观察LMIF的荧光强度并照相.

统计学处理 采用PRISM 4.0统计软件包进行统计学分析, 计量资料采用mean \pm SE表示, 多组间比较采用方差分析(ANOVA)进行, $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 DNCB灌肠所致结肠病变 4 g/L和8 g/L DNCB灌肠后24 h, 个别动物开始出现稀便, 2-3 d后出现不同程度的血便, 7-8 d后可见脓血便. 尤其是8 g/L DNCB组的大鼠, 脓血便出现最早、脓血最明显, 其中个别动物因严重脓血便而从第10天相继死亡. DNCB引起的大鼠结肠病理学改变与以前小鼠的结果^[13-14]基本相同. 2 g/L DNCB组近端肠腔扩张及少量白色渗出物, 结肠黏膜充血; 4 g/L DNCB组结肠黏连较明显, 但比较局限, 可见一处或多处溃疡形成; 8 g/L DNCB组结肠广泛黏连, 多处坏死, 个别部位有肠壁穿孔. 镜下特点: 4 g/L DNCB组的结肠黏膜层有炎性细胞浸润, 黏膜下层高度水肿; 8 g/L DNCB组黏膜坏死, 肠壁有大量炎性细胞浸润. 对照组(600 mL/L乙醇)显示正常结构, 仅见黏膜固有层有少量嗜酸性粒细胞(表1).

2.2 结肠LMIF活性变化 以免疫荧光方法检测结肠组织中LMIF蛋白在荧光显微镜下显示红色

■ 相关报道

关于DNCB灌肠致大鼠结肠炎-PubMed检索自1992年以来仅不到10篇. 他们造模的方法与本文大同小异, 但是都没有同时检测LMIF活性, 而是偏重治疗研究(如针刺、中药等), 与本文研究目的不同.

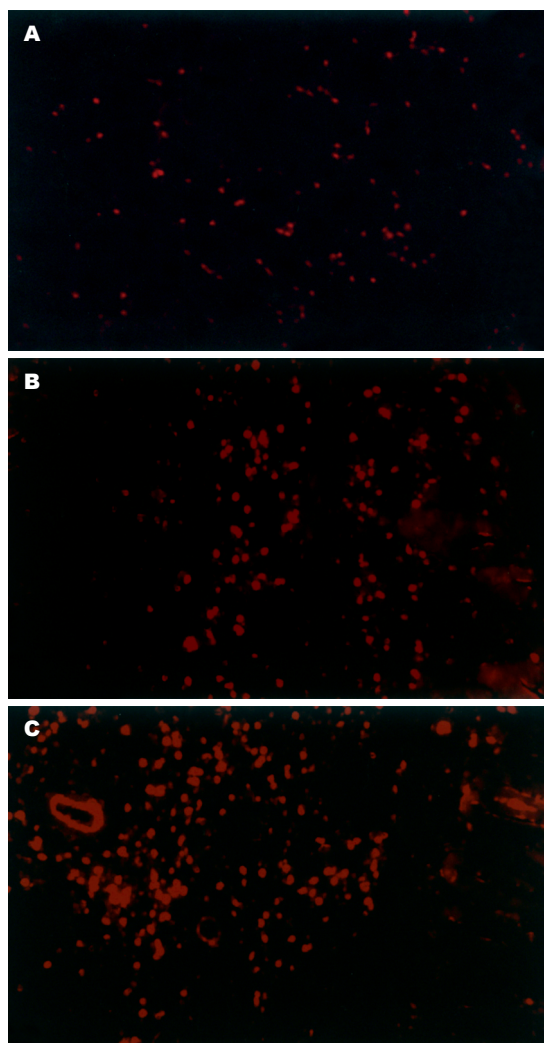


图 1 DNCB灌肠引起的致敏大鼠结肠组织LMIF活性变化(免疫荧光染色, $\times 200$). A: 600 mL/L乙醇; B: 4 g/L DNCB; C: 8 g/L DNCB.

(图1). DNCB灌肠组的LMIF荧光明显强于乙醇灌肠(对照)组, 尤其以8 g/L DNCB组的荧光强度最大.

2.3 DNCB ith所致DAI评分和结肠病理变化 致敏大鼠每天1次ith DNCB, 经过13-15 d, 动物出现不同程度的体质量下降和稀便, 其DAI评分明

■创新盘点

给致敏大鼠ith DNCB导致结肠炎的动物模型是本文创新点,测定DNCB结肠炎时肠壁组织LMIF的表达也未见报道。

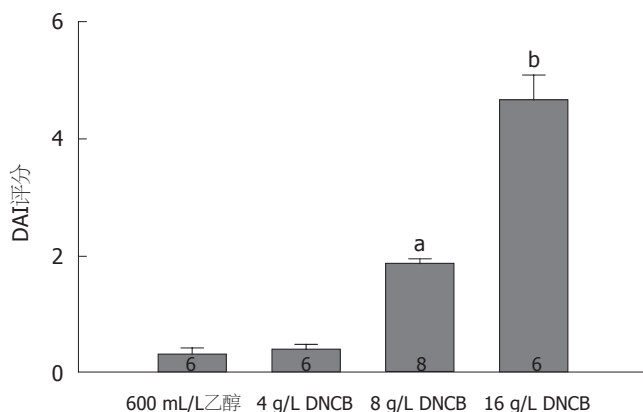


图2 致敏大鼠DNCB ith引起的DAI评分变化。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 600 mL/L乙醇组;柱内数字代表动物例数。

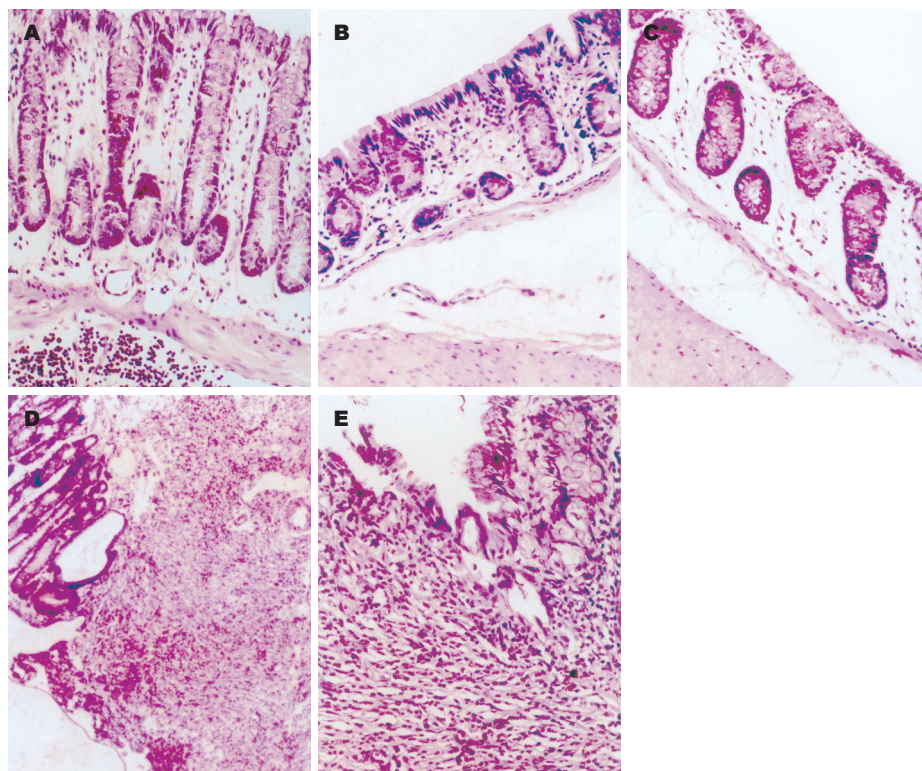


图3 DNCB ith引起的致敏大鼠结肠病理学变化(HE × 100)。A: 单纯ith插管, 正常肠结构; B: ith 600 mL/L乙醇, 黏膜下层水肿; C: ith 4 g/L DNCB, 黏膜及黏膜下层水肿; D: ith 8 g/L DNCB, 黏膜糜烂坏死、形成溃疡; E: ith 16 g/L DNCB, 黏膜溃疡形成, 肠壁全层可见大量以淋巴细胞为主的炎性细胞浸润。

显高于ith乙醇组(图2)。3 wk后取结肠组织,发现ith DNCB组的结肠有黏连和表面伪膜;镜下见结肠组织有大量淋巴细胞浸润,并有溃疡形成(图3)。同时取脊髓组织切片观察,除在16 g/L DNCB组有轴突根部增粗和白质疏松水肿的表现之外,大多数神经元结构清楚、排列整齐(结果未显示)。

3 讨论

我们首先用DNCB给大鼠灌肠,出现了与我们以往在小鼠结肠所见到的相似的病理学变化(表1)。并且,结肠炎的肠壁组织可见LMIF荧光强度随DNCB灌肠液浓度的增大而增加(图1),与病理学评分的改变是一致的。结合我们曾经在DNCB

结肠炎小鼠的肠系膜淋巴细胞发现LMIF功能增强的结果^[13],使我们更加确信LMIF在此DNCB结肠炎模型中起重要作用。LMIF是由致敏的T淋巴细胞当再次受同种抗原刺激时释放的一种致炎因子^[19-20],是衡量DTH反应的主要指标之一^[16]。在某些其他类细胞如胃肠上皮^[21]和中枢神经元^[18]等,也发现有LMIF的表达。从本实验看到,对照组大鼠的结肠有一定程度的LMIF表达,主要分布于黏膜层的腺体之间(图1A);DNCB结肠炎时LMIF表达明显增多,并且在肠壁的各层组织都可见到较强的LMIF荧光,其中很可能包括肠壁神经元(图1B-C)。结合已有的报道,即:LMIF可作为DTH反应如DNCB结肠炎^[10,14]、接触性皮炎^[16,19]的特异性免疫指标,且在人的UC

■应用要点

如果阐明了肠神经系统与结肠炎的因果关系,则有可能在治疗或预防UC时,用神经干预的理念,采取有效手段。

中明显升高^[22-23], 我们有理由认为, 从DNFB诱导的实验性结肠炎模型中取得的资料在一定程度上可以说明人类的UC. 根据已有的发现, LMIF是神经免疫的重要介导体^[15-16], 我们更倾向于“UC是与神经和免疫因素都有密切关系的炎症^[24]”这一观点.

正是为了以DNFB肠炎模型验证UC与神经系统的关系, 我们将DNFB直接注射到脊髓中枢, 从插管的位置看, 更可能是影响了支配大肠的(交感)中枢^[17,25]. 我们观察到, 如果肠神经系统首先受免疫原(半抗原DNFB与体内蛋白质结合即构成免疫原)刺激, 不仅神经组织本身出现病理变化, 而且继发性地影响到其末梢支配的靶器官-大肠. 在我们使用的DNFB剂量范围内, 神经组织的变化仅见于ith DNFB最大浓度(16 g/L)组, 只有个别神经元出现嗜碱性变、轴突根部增粗和白质疏松水肿, 而大多数神经元结构完整(且在ith用药全过程中, 动物的运动功能和感觉功能始终正常); 但结肠的变化却可见于ith DNFB 3个浓度组, 其病理改变非常显著, 以大量淋巴细胞浸润为其特点(图3). 我们还注意到, 与DNFB灌肠不同的是: ith DNFB引起的结肠病理变化需要在13-15 d后才明显易见; 动物虽然有稀便但很少出现血便或脓血便. 同时取动物的小肠、胃、肝脾以及肾和膀胱等组织, 都未检测到病理学变化. 这说明, 支配结肠的脊髓节段受到免疫或炎性刺激, 能够比较特异地导致其末梢支配的肠组织发炎, 这似乎吻合了Barbara和Peck关于“神经源性肠炎”的反应模式.

所谓神经源性炎症(neurogenic inflammation)的报道较多见于皮肤^[26]、呼吸道^[27]以及某些病原体不明的疾病, 如慢性盆腔痛、偏头痛和类风湿性关节炎等^[28], 多认为是由于神经末梢释放的炎症介质作用于靶组织, 影响其血管壁的通透性和平滑肌运动^[29]等. 将人类UC与“神经源性炎症”联系起来的第1篇报道是Kemler *et al*^[5]在1999年的一个奇异发现: 他给一位慢痛综合征患者施行脊髓刺激疗法以缓解骨折后疼痛的过程中, 见到这位患者原有的UC呈现反复发作, 但是如果停止脊髓刺激则UC得到缓解. 当Barbara根据这一报道以及在此之前的一些动物实验资料, 如P物质在UC模型的动物体内活性增强^[6-7]、麻醉药利多卡因能减轻动物结肠炎的炎症^[8]等, 提出UC是“肠神经源性炎症”的假说^[4]后不久, Peck *et al*^[9]也报道了另一位UC多年的患

者因外伤累及第五颈椎而瘫痪后, 以前曾经多次复发的UC却不再复发. 但是, 上述无论动物实验, 还是临床报道, 都缺乏最直接的证据, 也未见到他们在这方面继续深入的工作. 我们第一次直接证实, 支配肠的脊髓中枢如果受到免疫原(或其他诱因)刺激而导致神经元结构(或功能)异常时, 神经元末梢支配的肠组织就会出现炎症. 当然, 如果能同时测定此过程中脊髓和肠壁神经元是否释放了致炎因子, 特别是有无LMIF的活性变化, 将会使肠神经-肠炎(或肠炎-肠神经)之间的因果关系更加明确, 这也是我们将要继续探讨的课题.

致谢: 本文组织病理、荧光免疫技术分别得到宫恩聪教授和杨敏博士的指导和帮助.

4 参考文献

- Haskey N, Dahl WJ. Synbiotic therapy: a promising new adjunctive therapy for ulcerative colitis. *Nutr Rev* 2006; 64: 132-138
- Hibi T, Inoue N, Ogata H, Naganuma M. Introduction and overview: recent advances in the immunotherapy of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2003; 38 Suppl 15: 36-42
- Xu CT, Meng SY, Pan BR. Drug therapy for ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2311-2317
- Barbara G, De Giorgio R, Stanghellini V, Gionchetti P, Campieri M, Corinaldesi R. Relapsing ulcerative colitis after spinal cord stimulation: a case of intestinal neurogenic inflammation? *Gastroenterology* 1999; 117: 1256-1257
- Kemler MA, Barendse GA, Van Kleef M. Relapsing ulcerative colitis associated with spinal cord stimulation. *Gastroenterology* 1999; 117: 215-217
- Evangelista S, Maggi M, Renzetti AR. Down-regulation of substance P receptors during colitis induced by trinitrobenzene sulfonic acid in rats. *Neuropeptides* 1996; 30: 425-428
- Watanabe T, Kubota Y, Muto T. Substance P containing nerve fibers in ulcerative colitis. *Int J Colorectal Dis* 1998; 13: 61-67
- McCafferty DM, Sharkey KA, Wallace JL. Beneficial effects of local or systemic lidocaine in experimental colitis. *Am J Physiol* 1994; 266: G560-567
- Peck OC, Wood JD. Brain-gut interactions in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2000; 118: 807-808
- Glick ME, Falchuk ZM. Dinitrochlorobenzene-induced colitis in the guinea-pig: studies of colonic lamina propria lymphocytes. *Gut* 1981; 22: 120-125
- Rabin BS, Rogers SJ. A cell-mediated immune model of inflammatory bowel disease in the rabbit. *Gastroenterology* 1978; 75: 29-33
- Guo SM, Tong HB, Bai LS, Yang W. Effect of traditional Chinese medicinal enemas on ulcerative colitis of rats. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1914-1917
- 林平, 肖兰, 周婷, 杨菁菁, 潘慧, 金雨菡, 宫恩聪, 梅林. DNFB所致小鼠结肠炎与LMIF的关系. *中国病理生理杂志* 2004; 20: 1778-1782
- Yu WG, Lin P, Pan H, Xiao L, Gong EC, Mei L.

■名词解释

1 DTH反应: 迟发型(超)敏反应. 致敏T细胞当再次接受相同抗原后, 被进一步激活并大量增殖, 并释放包括LMIF在内的多种淋巴因子, 直接和间接杀伤靶细胞, 引起局部炎症反应.

2 LMIF: 致敏T淋巴细胞再遇相同抗原而释放出的一种生物活性物质.

3 神经源性炎症: 神经(多指外周感觉神经)受刺激, 其局部的血管通透性增加、组织血流量增加, 表现为血液渗出、局部组织温度升高、红肿等. 这种炎症多见于皮肤(如特应性皮炎和风疹)、呼吸道(如支气管哮喘)以及某些病原体不明的疾病如慢性盆腔痛、偏头痛和类风湿性关节炎等.

■同行评价

本实验方法先进,数据可靠,观点明确,题目新颖,为溃疡性结肠炎的神经免疫发病学说提供了依据,对溃疡性结肠炎的发病机制研究有重要参考价值。

- Pathophysiological significance of a reaction in mouse gastrointestinal tract associated with delayed-type hypersensitivity. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2254-2258
- 15 Bucala R. Neuroimmunomodulation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Ann N Y Acad Sci* 1998; 840: 74-82
- 16 Mei L, Li L, Li Y, Deng Y, Sun C, Ding G, Fan S. Conditioned immunosuppressive effect of cyclophosphamide on delayed-type hypersensitivity response and a preliminary analysis of its mechanism. *Neuroimmunomodulation* 2000; 8: 45-50
- 17 Wu WP, Xu XJ, Hao JX. Chronic lumbar catheterization of the spinal subarachnoid space in mice. *J Neurosci Methods* 2004; 133: 65-69
- 18 Vera PL, Meyer-Siegler KL. Anatomical location of macrophage migration inhibitory factor in urogenital tissues, peripheral ganglia and lumbosacral spinal cord of the rat. *BMC Neurosci* 2003; 4: 17
- 19 Goebeler M, Gutwald J, Roth J, Sorg C. The severity of irritant contact dermatitis in various strains of mice correlates with endothelial expression of migration inhibitory factor (MIF). *Arch Dermatol Res* 1991; 283: 246-250
- 20 Baugh JA, Donnelly SC. Macrophage migration inhibitory factor: a neuroendocrine modulator of chronic inflammation. *J Endocrinol* 2003; 179: 15-23
- 21 Maaser C, Eckmann L, Paesold G, Kim HS, Kagnoff MF. Ubiquitous production of macrophage migration inhibitory factor by human gastric and intestinal epithelium. *Gastroenterology* 2002; 122: 667-680
- 22 Murakami H, Akbar SM, Matsui H, Onji M. Macrophage migration inhibitory factor in the sera and at the colonic mucosa in patients with ulcerative colitis: clinical implications and pathogenic significance. *Eur J Clin Invest* 2001; 31: 337-343
- 23 Murakami H, Akbar SM, Matsui H, Horiike N, Onji M. Macrophage migration inhibitory factor activates antigen-presenting dendritic cells and induces inflammatory cytokines in ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 2002; 128: 504-510
- 24 di Mola FF, Friess H, Zhu ZW, Koliopanos A, Bley T, Di Sebastiano P, Innocenti P, Zimmermann A, Buchler MW. Nerve growth factor and Trk high affinity receptor (TrkA) gene expression in inflammatory bowel disease. *Gut* 2000; 46: 670-679
- 25 Guyton AC, Hall JE. Text book of medical physiology. tenth ed. Singapore: Health Science Asia, Elsevier Science, 2000; 698-702
- 26 Zegarska B, Lelinska A, Tyrakowski T. Clinical and experimental aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Pharmacol Rep* 2006; 58: 13-21
- 27 Liu CL, Lai KF, Chen RC, Luo W, Zeng YX, Yao WM, Zhong NS. The role of airway neurogenic inflammation in gastro-esophageal reflux induced cough. *Zhonghua Jiehe He Huxi Zazhi* 2005; 28: 520-524
- 28 Wesselmann U. Neurogenic inflammation and chronic pelvic pain. *World J Urol* 2001; 19: 180-185
- 29 Wiedermann CJ, Dunzendorfer S, Kahler CM, Reinisch N, Schratzberger P. Secretoneurin and neurogenic inflammation. *Zhongguo Yaolixuebao* 1999; 20: 789-794

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 •

第八届中西医结合实验医学研讨会

本刊讯 第八届中西医结合实验医学研讨会将于2006-10在南京举行, 现将征文通知公布如下:

1 截稿日期

2006-08-31截稿。

2 联系方式

南京中山东路305号南京军区总医院 齐名; 邮编: 210002; 电话: 025-52926620.

利用微波固化犬胰腺的实验观察

崔云甫, 郑宏群, 黄睿, 石炯

崔云甫, 郑宏群, 黄睿, 哈尔滨医科大学附属第二医院肝胆胰及腹腔镜外科 黑龙江省哈尔滨市 150086
石炯, 哈尔滨医科大学病理教研室 黑龙江省哈尔滨市 150086

崔云甫, 1987年本科毕业于哈医大医疗系, 1990年获得普外科硕士学位, 2002年获得德国萨尔大学医学博士, 2004年获得临床外科博士后学位(出站)。现任哈医大二临床医学院肝胆胰、腔镜外科医疗副主任, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 世界华人消化杂志编委, 中华实验外科杂志特约编委, 中华临床医学杂志编委, 中华胰腺外科学组黑龙江胰腺外科学组成员兼秘书, 黑龙江省胰腺炎学组副组长。

哈尔滨市归国留学人员基金项目, No. 2003AFLXJ007

通讯作者: 崔云甫, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路246号, 哈尔滨医科大学附属第二医院肝胆胰及腹腔镜外科。
yfcui777@hotmail.com

电话: 0451-86605356

收稿日期: 2006-04-28 接受日期: 2006-05-24

Experimental study on microwave tissue coagulation of canine pancreas

Yun-Fu Cui, Hong-Qun Zheng, Rui Huang, Jiong Shi

Yun-Fu Cui, Hong-Qun Zheng, Rui Huang, Department of Hepatobiliary, Pancreatic and Laparoscopic Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Jiong Shi, Department of Pathology, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Supported by the Fund from Harbin Municipality for the Returned Scholars, No. 2003AFLXJ007

Correspondence to: Yun-Fu Cui, Department of Hepatobiliary, Pancreatic and Laparoscopic Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. yfcui777@hotmail.com

Received: 2006-04-28 Accepted: 2006-05-24

Abstract

AIM: To evaluate the feasibility and safety of microwave tissue coagulation to pancreas through the observation of physiological state and pathological changes after the coagulation of canine pancreas.

METHODS: Microwave tissue coagulation of fifteen healthy mongrel dogs' pancreas was performed through laparotomy. The power and time were set on 50 Watt and three minutes respectively. The 5 coagulated points were selected at an interval of 1 cm. The blood amylase and other parameters were examined regularly after the operation. The dogs were killed at the instant

time ($n = 5$), the 1st d ($n = 5$) and 1st wk ($n = 5$) after the operation. Hematoxylin and eosin (HE) staining together with nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and TUNEL staining was used to observe the pathological changes.

RESULTS: The level of blood amylase increased immediately after the operation and the maximal value occurred within 48-72 h. Furthermore, it returned to normal level 1 wk later if no complications occurred. The segmental microwave lesions included hyperintense zone of coagulative necrosis and peripheral hypointense zone. Apoptosis was observed at the peripheral zone 1 d after the operation. The fibrosis and tissue absorption occurred finally 1 wk after the operation.

CONCLUSION: Microwave tissue coagulation is safe and feasible, and it may be used in the treatment of pancreatic cancer at the late stage.

Key Words: Microwave tissue coagulation; Pancreatic cancer; Canine pancreas; Pathological changes

Cui YF, Zheng HQ, Huang R, Shi J. Experimental study on microwave tissue coagulation of canine pancreas. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(21):2073-2076

摘要

目的: 通过对犬胰腺微波固化后的机体生理状态及病理改变的观察, 以期探讨微波固化应用于胰腺的可行性与安全性。

方法: 成年健康杂种犬15条, 无菌手术暴露胰腺下叶后, 利用微波探头以50 W功率, 1 cm为间距固化5点, 每点固化时间为3 min。术后监测淀粉酶等血生化指标, 并分别于术后即刻、1 d及1 wk各处死5条。利用HE法、NADH组织活性染色及TUNEL染色对固化中心区及固化旁组织进行病理分析。

结果: 术后即刻血淀粉酶开始升高, 术后48-72 h出现峰值, 无并发症者均于1 wk内降至正常。术后即刻可见固化区组织呈凝固性坏死, 组织活性消失, 与周围组织分解明显。1 d

■背景资料

热疗是近年来新兴的一种肿瘤局部治疗手段, 其疗效得到初步认可。微波固化作为一种新的热疗手段, 其在胰腺的应用属于起步阶段, 因此也成为基础及临床研究的热点。

■创新盘点

本实验采用固化后连续监测淀粉酶,并描绘淀粉酶变化曲线的方法,突破了以往单一时间点观察的局限。另外,本实验采用的病理染色方法较丰富,从不同角度观察病理变化,也是实验创新之一。

后可于固化旁组织发现大量凋亡细胞。1 wk后固化区纤维组织增生包裹。

结论:微波固化治疗胰腺疾病是安全可行的。

关键词:微波固化;胰腺癌;犬胰腺;病理变化

崔云雨, 郑宏群, 黄睿, 石炯. 利用微波固化犬胰腺的实验观察. 世界华人消化杂志 2006;14(21):2073-2076
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2073.asp>

0 引言

胰腺癌(pancreatic cancer)是常见的消化道恶性肿瘤之一,由于其早期诊断困难,因此预后极差,5 a生存率不足5%。目前,胰腺癌的有效治疗方法仍然是以外科手术为主,放射治疗及化学治疗为辅的综合治疗。20世纪末,随着一系列肿瘤热疗手段的出现,为胰腺癌的治疗提供了新的选择。我们通过对犬胰腺微波固化后的机体生理状态及病理改变的观察,以期探讨微波固化应用于胰腺的可行性与安全性及其价值。

1 材料和方法

1.1 材料 成年健康杂种犬15条,体质量16-18 kg,雌雄不限,由哈尔滨医科大学附属第二医院动物实验中心提供;北京恒福微波治疗仪-I型,由哈尔滨鑫迪瑞科贸有限公司提供;细胞凋亡检测试剂盒购自Sigma公司。成年健康杂种犬随机分为术后即刻处死组($n=5$)、1 d处死组($n=5$)及1 wk处死组($n=5$)。

1.2 方法 实验动物术前12 h禁食,以30 g/L戊巴比妥钠按1 mL/kg im麻醉。取仰卧位,固定四肢,备皮及消毒后,铺一次性无菌单。取上腹部正中切口,进腹后剪开大网膜,循十二指肠确定胰腺位置,可见犬胰腺分上、下两叶。充分暴露胰腺下叶,以纱布隔离周围组织,在距离前缘5 cm,下缘2.5 cm处为第1点,与胰腺表面成30°角插入固化探针,进针深度为2 cm。设定输出功率为50 W,时间为3 min,以1 cm为间距依次水平固化5点,查无活动出血后关腹。于术后即刻($n=5$)、1 d($n=5$)及1 wk($n=5$)分别处死动物,取出胰腺,于距离固化穿刺点1 cm及2 cm范围内各取组织作为病理标本进行观察分析,以未固化的胰腺上叶组织作为病理对照。即刻处死的犬胰腺标本行HE及NADH组织活性染色,利用图文分析软件进行分析,计算NADH染色阳性指数(阳性指数 = 阳性染色面积/总面积);1 d处死

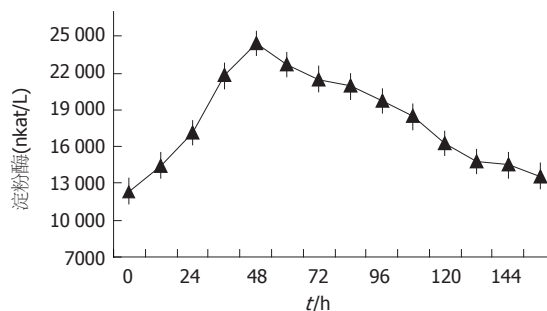


图1 胰腺固化后淀粉酶变化。

的犬胰腺标本行HE及TUNEL染色,以细胞出现棕色颗粒为阳性,并计算每高倍视野阳性细胞数;其余标本仅行HE染色。1 wk处死组需观察动物的一般生存状态,如饮食、排便等,并于术前、术后即刻及此后每12 h抽血监测血淀粉酶。

统计学处理 利用SAS软件进行两个独立样本的秩和检验分析。

2 结果

固化开始后,见胰腺组织开始肿胀,颜色变灰,失去光泽,且范围逐渐扩大。至3 min时,关闭电源,结束固化。退出固化探头,尖端无坏死组织黏着,穿刺孔无出血及胰液渗漏。所有动物单点固化半径为 1.74 ± 0.10 cm,固化面积为 26.07 ± 2.29 cm²。1 wk处死组动物麻醉清醒后,出现拒食,喜饮水。4只动物于术后3 d起逐步恢复正常饮食及排便,且生存良好。1只至处死时始终未恢复正常饮食,且体质量明显减轻,解剖于胰腺体尾部发现包裹性积液,内容浑浊且有腥臭味,考虑为胰瘘所致。1 wk处死组术前所测血淀粉酶值为 12362 ± 751 nkat/L,术后即刻血淀粉酶开始升高,峰值出现于术后48-72 h,为 24433 ± 772 nkat/L,其中4只动物血淀粉酶随后缓慢下降,1 wk后基本恢复正常(图1)。1只动物血淀粉酶于20 004-23 338 nkat/L间波动,处死后解剖证实为胰瘘所致。

2.1 病理学观察结果 术后即刻,距固化中心1 cm范围内,可见大片凝固性坏死(图2A),细胞核呈固缩、破裂或溶解。2 cm范围内除坏死细胞外,可见部分细胞水肿,且有微小出血灶。1 d后观察,1 cm范围内的病理变化与即刻基本相同,2 cm范围内出现炎症反应区,并伴有中性粒细胞浸润。1 wk后观察,固化区部分纤维化,成纤维细胞及脂肪细胞增多,并有毛细血管增生。

2.2 NADH组织活性染色结果 术后即刻行NADH组织活性染色,有活性组织表现为蓝紫色,无活

性组织表现为绿色(图2B). 正常组织平均阳性指数为 0.860 ± 0.026 , 距固化中心1 cm范围内平均阳性指数为 0.035 ± 0.015 , 距固化中心2 cm范围内平均阳性指数为 0.630 ± 0.055 .

2.3 TUNEL染色结果 固化后, 凝固性坏死区周边组织阳性染色细胞数较正常对照胰腺组织明显增加(图2C). 正常对照胰腺组织每高倍视野阳性细胞数为 3.60 ± 0.53 , 凝固性坏死区周边组织每高倍视野阳性细胞数为 18.20 ± 1.75 , 二者有显著差异($u = 6.8598, P = 0.0088$).

3 讨论

胰腺癌是常见的消化道恶性肿瘤之一, 由于其早期诊断困难, 大部分患者就诊时已属晚期, 所以其预后极差, 5 a生存率不足5%, 有85%的患者在诊断后12 mo内死亡^[1]. 尽管胰腺癌的诊断和治疗技术已经有了一定程度的进步, 但根据对美国国立癌症数据库(National Cancer Database) 1985-1995年100 313例胰腺癌患者的数据调查得出的结论: 近20 a来, 胰腺癌的总体生存率并没有改变^[2]. 热疗是上世纪末兴起的治疗肿瘤的新方法, 其疗效已经被大家公认^[3-10], 因此也为胰腺癌姑息性治疗提供了新的选择. 微波固化是近年来出现的治疗实体肿瘤的新的热疗手段, 其利用探头将微波能量集中在一个区域, 使组织细胞内的带点粒子高速振荡, 产生热量. 致局部组织温度达到65-100℃, 从而起到杀灭肿瘤细胞的目的. 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(reduced nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)是细胞呼吸链中的关键物质, 其活性的存在与否可以直接代表细胞活性的有无, 故NADH组织活性染色阴性代表了组织细胞已经发生了不可逆转的坏死变化. 传统的HE染色通过对细胞形态的观察判断细胞的活性, 因此有时难以评定肿瘤热疗后某些区域的坏死程度. 而NADH组织活性染色后, 可见坏死区与非坏死区对比明显, 界限清晰, 且可以利用图文软件将不同区域的组织染色结果量化, 使结果更加客观. 因此, NADH组织活性染色可以作为即刻评价热疗后肿瘤组织坏死程度的方法^[11-14].

细胞凋亡(cell apoptosis)的概念是Kerr在1972年最先提出^[15]. 他是细胞生命周期中的重要组成部分, 与胚胎发育、组织发生、组织分化、组织修复、内环境的稳定、细胞癌变等过程有紧密的联系. 与细胞坏死不同的是, 他是受基因控制的细胞死亡形式^[16]. 许多因素可诱导凋

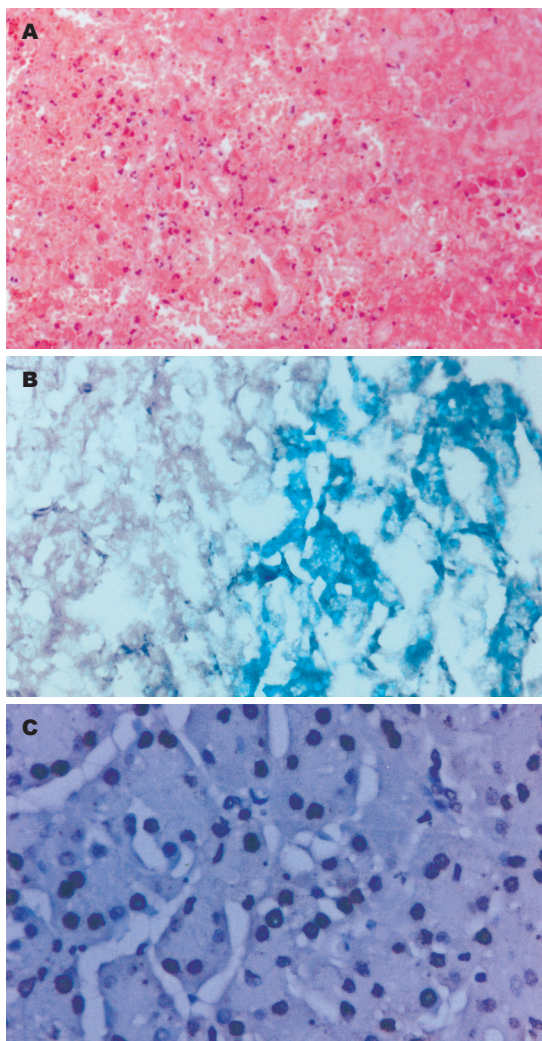


图2 犬胰腺微波固化后病理染色结果. A: 固化后即刻HE染色; B: 固化后即刻NADH染色; C: 固化后周边TUNEL染色.

亡或抑制凋亡, 如激素、细胞因子、抗体、超抗原、黏附分子、免疫细胞、化疗药物、致癌药、生长因子缺失、高温、放射线等. 细胞凋亡中, 染色体DNA双链断裂或单链断裂而产生大量的黏性3'-OH末端, 可在脱氧核糖核苷酸末端转移酶(TdT)的作用下, 将脱氧核糖核苷酸和荧光素、过氧化物酶、碱性磷酸酶或生物素形成的衍生物标记到DNA的3'-末端, 从而可进行凋亡细胞的检测, 这类方法称为脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL).

我们发现, 胰腺组织固化后循凝固性坏死-急性炎症反应-机化-纤维包裹-吸收的过程发展^[17-18]. 固化早期, 在凝固性坏死区周边可出现炎症反应带, 而本实验利用TUNEL法检测, 结果

■应用要点

本实验通过对胰腺微波固化后犬的生理及病理变化的观察, 得出该治疗方法针对胰腺是安全有效的, 为其临床应用奠定理论基础. 如进一步进行临床研究将会有深远的社会经济效益.

■同行评价

本文针对晚期胰腺癌积极选择微波固化作为综合治疗的辅助措施,是该实验明确的目的所在。文章实验方法先进,结果计算准确,讨论深刻,具有一定的学术水平,对临床应用有参考价值。

显示该区域凋亡细胞明显增多。究其原因,可能有以下两个方面:一是微波固化产生的局部高温虽不能使此区域的细胞即刻坏死,但可以在细胞、亚细胞和分子水平上产生一系列变化导致细胞膜通透性增加,酶活性下降,分裂指数下降, DNA合成抑制以及染色体断裂等,导致细胞在固化后的一段时间内死亡。这种变化在组织固化12 h后在固化边缘区域持续存在,可能对病变的局部控制有利^[19]。二是此区域浸润的炎症细胞释放的细胞因子作用于细胞,使其走向凋亡。因此,微波固化并非仅仅是短时间的高温作用,其可能在治疗后的一段时间内仍发挥着治疗作用。此外,国内尚有直接利用“凋亡温度”达到减瘤效果,治疗胰腺癌的临床报道^[20]。胰腺肿瘤热疗后,血淀粉酶仍然是治疗后临床监测的重要生化指标,并对判断是否出现并发症有重要的指导作用。通过对血淀粉酶检测结果进行统计分析发现,无并发症的动物的血淀粉酶术后呈现单峰状变化,其峰值出现于术后72 h以内,并于1 wk时基本恢复正常。因此,在胰腺肿瘤热疗后的临床观察过程中,对于那些血淀粉酶持续升高不降或下降后短期内又升高者,更应提高警惕,及时发现并发症的存在,以免导致不良后果。微波固化应用于胰腺尚处于探索阶段,相信随着技术设备以及操作方法的日趋成熟,微波固化将成为胰腺肿瘤安全可行且有效的治疗方法。

4 参考文献

- 1 Friess H, Liao Q, Zhao YP, Büchler MW. Surgical treatment for pancreatic cancer. *Chin J Hepatobiliary Surg* 2002; 8: 515-523
- 2 Sener SF, Fremgen A, Menck HR, Winchester DP. Pancreatic cancer: a report of treatment and survival trends for 100,313 patients diagnosed from 1985-1995, using the National Cancer Database. *J Am Coll Surg* 1999; 189: 1-7
- 3 Vogl TJ, Mack M, Eichler K, Lehnert T, Nabil M. Effect of laser-induced thermotherapy on liver metastases. *Expert Rev Anticancer Ther* 2006; 6: 769-774
- 4 Sutherland LM, Williams JA, Padbury RT, Gotley DC, Stokes B, Maddern GJ. Radiofrequency ablation of liver tumors: a systematic review. *Arch Surg* 2006; 141: 181-190
- 5 Ohguri T, Imada H, Kato F, Yahara K, Morioka T, Nakano K, Korogi Y. Radiotherapy with 8 MHz radiofrequency-capacitive regional hyperthermia for pain relief of unresectable and recurrent colorectal cancer. *Int J Hyperthermia* 2006; 22: 1-14
- 6 Haemmerich D, Laeseke PF. Thermal tumour ablation: devices, clinical applications and future directions. *Int J Hyperthermia* 2005; 21: 755-760
- 7 Gannon CJ, Curley SA. The role of focal liver ablation in the treatment of unresectable primary and secondary malignant liver tumors. *Semin Radiat Oncol* 2005; 15: 265-272
- 8 Wu F, Wang ZB, Zhu H, Chen WZ, Zou JZ, Bai J, Li KQ, Jin CB, Xie FL, Su HB. Feasibility of US-guided high-intensity focused ultrasound treatment in patients with advanced pancreatic cancer: initial experience. *Radiology* 2005; 236: 1034-1040
- 9 Wu F, Wang ZB, Zhu H, Chen WZ, Zou JZ, Bai J, Li KQ, Jin CB, Xie FL, Su HB. Extracorporeal high intensity focused ultrasound treatment for patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 92: 51-60
- 10 Li CX, Xu GL, Jiang ZY, Li JJ, Luo GY, Shan HB, Zhang R, Li Y. Analysis of clinical effect of high-intensity focused ultrasound on liver cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2201-2204
- 11 Scudamore CH, Lee SI, Patterson EJ, Buczkowski AK, July LV, Chung SW, Buckley AR, Ho SG, Owen DA. Radiofrequency ablation followed by resection of malignant liver tumors. *Am J Surg* 1999; 177: 411-417
- 12 Patterson EJ, Scudamore CH, Owen DA, Nagy AG, Buczkowski AK. Radiofrequency ablation of porcine liver *in vivo*: effects of blood flow and treatment time on lesion size. *Ann Surg* 1998; 227: 559-565
- 13 Hansen PD, Rogers S, Corless CL, Swannstrom LL, Siperstien AE. Radiofrequency ablation lesions in a pig liver model. *J Surg Res* 1999; 87: 114-121
- 14 Jeffrey SS, Birdwell RL, Ikeda DM, Daniel BL, Nowels KW, Dirbas FM, Griffey SM. Radiofrequency ablation of breast cancer: first report of an emerging technology. *Arch Surg* 1999; 134: 1064-1068
- 15 O'Rourke MG, Ellem KA. John Kerr and apoptosis. *Med J Aust* 2000; 173: 616-617
- 16 Formigli L, Conti A, Lippi D. "Falling leaves": a survey of the history of apoptosis. *Minerva Med* 2004; 95: 159-164
- 17 Merkle EM, Haaga JR, Duerk JL, Jacobs GH, Brambs HJ, Lewin JS. MR imaging-guided radio-frequency thermal ablation in the pancreas in a porcine model with a modified clinical C-arm system. *Radiology* 1999; 213: 461-467
- 18 王石林, 笪冀平, 欧阳筌, 李路平, 汤勇, 孙晓丽, 何泽生, 王青庭, 王新, 吴金生. 植入型微波固化犬胰的研究. *中华实验外科杂志* 1996; 13: 45
- 19 Ohno T, Kawano K, Sasaki A, Aramaki M, Yoshida T, Kitano S. Expansion of an ablated site and induction of apoptosis after microwave coagulation therapy in rat liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001; 8: 360-366
- 20 田伏洲, 戴睿武, 郑然, 李旭, 蔡忠红, 高晓美, 罗皓. 选择性多极射频热缓释仪治疗不能切除的胰腺癌. *中华外科杂志* 2003; 41: 716

电编 张敏 编辑 潘伯荣

中药护肝灵对实验大鼠乙醇分解酶的影响

潘年松, 夏庆杰, 黄 勋, 张立实

潘年松, 遵义医药高等专科学校遵义市中药民族药新药研究
实验室 贵州省遵义市 563004

夏庆杰, 四川大学华西医院眼科研究所 四川省成都市
610041

黄勋, 四川大学分析测试中心 四川省成都市 610041

张立实, 四川大学华西公共卫生学院营养与食品卫生教研室
四川省成都市 610041

潘年松, 1986年贵阳中医学院本科毕业, 1999年河南中医学院
硕士毕业, 2002年成都中医药大学博士毕业, 2004年四川大学
华西公共卫生学院公共卫生与预防医学博士后流动站出站, 高
级讲师, 享受遵义市引进人才特殊津贴, 主要从事中药新药研究。

通讯作者: 张立实, 610041, 四川省成都市人民南路三段17号,
四川大学华西公共卫生学院营养与食品卫生教研室。

lishizhang_56@163.com

电话: 028-85502401 传真: 028-85501275

收稿日期: 2006-04-11 接受日期: 2006-05-17

Effects of *Hu Gan Ling* on lytic enzymes of ethanol in experimental rats

Nian-Song Pan, Qing-Jie Xia, Xun Huang, Li-Shi Zhang

Nian-Song Pan, Zunyi Laboratory for Ethnodrug and
New Drug of Traditional Chinese Medicine, Zunyi Medical
School, Zunyi 563004, Guizhou Province, Guizhou Prov-
ince, China

Qing-Jie Xia, Department of Ophthalmology, West China
Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan
Province, China

Xun Huang, Center for Analysis and Measurement, Sich-
uan University, Chengdu 610041 Sichuan Province, China

Li-Shi Zhang, Department of Nutrition and Food Hygiene,
School of Public Health, Sichuan University, Chengdu
610041, Sichuan Province, China

Correspondence to: Professor Li-Shi Zhang, Department
of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health,
Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province,
China. lishizhang_56@163.com

Received: 2006-04-11 Accepted: 2006-05-17

Abstract

AIM: To investigate the effects of *Hu Gan Ling*
on lytic enzymes of ethanol in the experimental
rats.

METHODS: The rat model of liver injury was
induced intragastrically by alcohol administra-
tion. After treatment with Essentiale, high- and
low-dose *Hu Gan Ling*, the alcohol concentration
in serum was determined by dual wavelength
spectrophotometry, and the contents of catalase

(CAT) and alcohol dehydrogenase (ADH) in
liver homogenate were detected according to
the instruction of kit and by spectrophotometric
method, respectively. The expressions of ADH
and CYP450 II E1 mRNA were examined by re-
verse transcription-polymerase chain reaction
(RT-PCR).

RESULTS: In comparison with that in the normal
controls, the serum content of alcohol in model
group was significantly increased (545.7 ± 108.85
mg/L vs -51.4 ± 2.83 mg/L, $P < 0.05$), but the tis-
sue content of ADH or CAT was significantly
decreased (667 ± 272 nkat/L vs 1884 ± 650 nkat/L,
 $P < 0.05$; 112 ± 29 nkat vs 255 ± 43 nkat, $P < 0.05$).
However, *Hu Gan Ling* reduced the serum con-
tent of alcohol (low dose: 248.5 ± 96.63 mg/L;
high dose: -0.1 ± 33.94 mg/L; both $P < 0.01$), but
increased the tissue content of ADH (low dose:
 1184 ± 422 nkat/L; high dose: 1550 ± 458 nkat/L;
both $P < 0.05$) or CAT (low dose: 202 ± 31 nkat/L;
high dose: 167 ± 34 nkat/L; both $P < 0.05$). After
modeling, the expression of CYP450 II E1 mRNA
was significantly down-regulated (10 ± 2 vs $15 \pm$
 2 , $P < 0.01$), and then further down-regulated by
Hu Gan Ling treatment (high dose: 8 ± 2 , $P < 0.05$).
The mRNA expression of ADH was not marked-
ly changed after modeling and drugs treatment (P
 > 0.05).

CONCLUSION: *Hu Gan Ling* can activate the
lytic enzymes of ethanol, and enhance the in-
tracorporal ethanol metabolism.

Key Words: *Hu Gan Ling*; Lytic enzymes; Ethanol;
Rats

Pan NS, Xia QJ, Huang X, Zhang LS. Effects of *Hu Gan*
Ling on lytic enzymes of ethanol in experimental rats.
Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(21):2077-2081

摘要

目的: 探讨中药护肝灵对乙醇代谢相关酶的
影响。

方法: 以乙醇灌胃法复制大鼠模型, 分别以易

■背景资料

本研究为潘年松
博士在四川大学
华西公共卫生学
院博士后流动站
工作期间, 在合
作导师张立实教
授指导下, 夏庆
杰教授、黄勋讲
师等支持下完成
的自由研究课题。
详细内容在潘年
松博士的《博士
后出站报告》中
有记载。

创新盘点

国内较常用RT-PCR技术研究其机制,但未见同时对基因的扩增进行实时定量研究的报道.本研究在RT-PCR技术基础上增加了可被荧光识别的探针,从而可以对mRNA进行定量.

善复及高、低剂量护肝灵处理,双波长法检测血中乙醇浓度,按试剂盒说明书检查肝匀浆中CAT含量,活性分光光度法检测肝匀浆ADH含量,荧光实时定量RT-PCR观察ADH和CYP450 II E1的mRNA表达.

结果:与正常对照组相比,模型组血清乙醇含量显著升高(545.7 ± 108.85 mg/L vs -51.4 ± 2.83 mg/L, $P < 0.05$),ADH和CAT含量显著降低(667 ± 272 nkat/L vs 1884 ± 650 nkat/L, $P < 0.05$; 112 ± 29 nkat vs 255 ± 43 nkat, $P < 0.05$).与模型组相比,中药护肝灵可以降低口服乙醇大鼠血中乙醇含量(低剂量: 248.5 ± 96.63 mg/L;高剂量: -0.1 ± 33.94 mg/L;均 $P < 0.01$),提高肝组织ADH(低剂量: 1184 ± 422 nkat/L;高剂量: 1550 ± 458 nkat/L;均 $P < 0.05$)和CAT(低剂量: 202 ± 31 nkat/L;高剂量: 167 ± 34 nkat/L;均 $P < 0.05$)含量.造模后肝组织CYP450 II E1 mRNA显著下降(10 ± 2 vs 15 ± 2 , $P < 0.01$),护肝灵可使肝组织CYP450 II E1 mRNA表达进一步下降(高剂量: 8 ± 2 , $P < 0.05$).造模及药物处理后,ADH mRNA均无显著变化($P > 0.05$).

结论:中药护肝灵可激活乙醇代谢相关酶,进而促进乙醇在体内的代谢.

关键词:护肝灵;分解酶;乙醇;大鼠

潘年松,夏庆杰,黄勋,张立实.中药护肝灵对实验大鼠乙醇分解酶的影响.世界华人消化杂志 2006;14(21):2077-2081
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2077.asp>

0 引言

采用中药复方治疗酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)的报道很多^[1-5].实验研究中乙醇灌胃法是较公认的动物模型复制方法^[5-9].国内较常用的是采用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术研究其机制^[10-15],但未见同时对基因的扩增进行实时定量研究的报道.部分研究者在研究其他肝病时报道过加用光密度扫描定量^[15].我们采用白酒灌胃法复制大鼠模型,用荧光实时定量RT-PCR来研究自制中药护肝灵对实验大鼠乙醇分解酶的影响如下.

1 材料和方法

1.1 材料 同批繁殖Wistar大鼠50只,全♂,体重180-220 g,四川大学华西动物中心提供.乙醇(ethanol, EtOH)(分析醇)成都蜀都实业有限责任公司生产.护肝灵胶囊(枳椇、虎杖、砂

仁、白茅根)0.3 g/粒,相当于生药2.14 g/粒,四川天然药物研究所加工.多烯磷脂酰胆碱(polyenephosphatidylcholine, APSULES、商品名:易善复)A.Nattermann & Cie. GmbH Koln生产.肝匀浆介质PH7.4, 0.01 mol/L缓血酸氨(Tris-HCl), 0.0001 mol/L乙二胺四乙酸钠(EDTA-2Na), 0.01 mol/L蔗糖, 8 g/L NaCl溶液,所用试剂在成都试剂厂购置.过氧化氢酶(catalase, CAT)试剂盒南京建成生物工程研究所生产.乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)引物探针根据ADH基因序列(NM_019286):

1 ggccattacg gccggggact gcaggaggga agaagtctac
gagaatccat ccatttctg

61 cccacagcga aggacagcat gaggcacagct ggaaaagtaa
tcaaatgcaa agcggccgtg

121 ctatgggagc ctcacaagcc cttcaccatc gaggacatag
aagtcgcacc ccccaaggcc

181 catgaagttc gcattaagat ggtggccacc ggagtctgcc
gctcagacga tcacgcggt

241 agtggatccc tgttcacgcc tcttctgca gttctaggcc
acgagggagc tggcattgt

301 gagagcattg gagaaggggt gacttgtgtg aaaccaggtg
ataaagtcac cccgctgttc

由上海生工生物工程有限公司合成.上游引物:ADH1F(自定义的上游引物)5'-gagcacagc tggaaaagtaatc-3';下游引物:ADH1R(自定义的下游引物)5'-gccaccatcttaatgcgaact-3';TaqMan探针(ADHTM:太克曼探针):5'-FAM-(荧光素)cctcacaagcccttcaccatc-TAMRA-3'(淬灭基团).扩增片段长度为126 bp.细胞色素P450 II E1(cytochrome P450 II E1, CYP450 II E1)引物探针根据CYP450 II E1序列(NM_031543):

661 ctttacaata actttgcgga ttatctacga tacctacctg
gaagccatag aaaaatcatg

721 aaaaatgtgt ctgaaataaa acagtacaca ctgaaaaag
ccaaggaaca cttcagtcga

781 ctggacatca actgcgccc ggtgtgtgact gactgtctcc
tcatagagat ggagaaggaa

841 aaacacagcc aagaacccat gtacacaatg gaaatgttt
ctgtgacttt ggccgacctg

由上海生工生物工程有限公司合成.上游引物:CYP2EF(自定义的上游引物)5'-ccaaggaacaccttcag tca-3';下游引物:CYP2ER(自定义的下游引物)5'-ggctgtgttttcttctcca-3';TaqMan探针(CYP2ETM:太克曼探针):5'-FAM-ggatgtgactgactgtctcctc-TAMRA

-3'. 扩增片段长度为90 bp.

1.2 方法 常规饲养7 d后, 称量体质量, 按体质量大小分4层后查数随机分为正常对照组(阴性对照组)、模型对照组(模型组)、护肝灵低剂量组(低剂组)、护肝灵高剂量组(高剂组)、易善复对照组(药物对照组), 每组10只; 除阴性对照组外, 其余各组用500 mL/L乙醇(蒸馏水稀释)按12 mL/kg造模; 低剂组和高剂组每日同时分别予护肝灵0.15 g/kg和0.3 g/kg剂量的蒸馏水稀释液灌胃(依次相当于人用量的5倍和10倍), 药物对照组每日同时予易善复0.15 g/kg稀释液灌胃; 造模与给药均连续42 d. 各组均普食普水饲养, 连续观察大鼠的活泼及自卫、饮食饮水、体毛皮表、大小便、分泌物、死亡等情况, 并记录. 造模及药物干预结束后, 禁食禁水12 h, 称量体质量, 取大鼠股动脉血2 mL, -196℃液氮保存携带, 45℃温箱孵育、3000 r/min离心, 取上清液参照王向阳报导的双波长法检测乙醇浓度^[17]; 肝匀浆制备: 取大鼠肝脏胸侧叶下第二层的三叶中的右侧叶肝脏作标本, -196℃液氮保存携带、-60℃保存, 肝标本用8.6 g/L冷生理盐水洗涤, 滤纸吸干水份, 准确称质量, 移取9倍肝质量冷匀浆介质的1/3到匀浆玻璃管中, 剪碎, 约12 000 r/min冰水中间隙匀浆4次, 吸出到离心管, 其余冷匀浆介质2/3洗涤匀浆玻璃管, 移到前述离心管, 3000 r/min离心15 min, 取上清液, 制成100 g/L的肝匀浆储备液, 按试剂盒说明书检测CAT含量, 参照胡建强 *et al*^[18]报道的活性分光光度法检测ADH含量, 并用荧光实时定量RT-PCR法作ADH和CYP450 II E1的mRNA表达实验.

ADH及CYP450 II E1的标准品制备将5'-ccaaggaaca ccttcagtca ctggacatca actgcgccccggatgtgact gactgtctcc tcatagagat ggagaaggaa aaacacagcc-3'和5'-gagcacagct ggaaaagtaa tcaaatgcaagcggccgtg 121 ctatgggagc ctcacaagcc cttcaccatc gaggacatag aatgcgcacc cccaaggcc 181 catgaagttcgcattaagat ggtggc-3', 序列分别经PCR扩增, 与T-载体连接, 克隆到大肠杆菌DH5 α , 并经测序验证, 大量提取质粒, 紫外分光光度计测定质粒浓度, 稀释成10¹³拷贝/L, 获得ADH及CYP450 II E1的标准品. 取冻存的大鼠右侧叶肝脏组织约30 mg于玻璃匀浆器中, 加入1 mL RNA提取试剂(Trizol), 冰浴中匀浆2 min, 按试剂盒使用说明要求提取总RNA, 溶解于20 μ L焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的纯水中, 紫外分光光度计测定RNA浓度, 稀释至1 g/L. 采用MBI公司的

逆转录试剂盒(RevertAidTM, RT Kit), 将提取的各个标本的总RNA 2 μ L, 随机引物1 μ L, 超纯水(ddH₂O)209 μ L, 置入70℃, 5 min, 然后行冰水猝冷, 使RNA变性; 然后再加入8 μ L预混液[5 \times buffer(逆转录缓冲液)4 μ L, 10 mmol/L dNTP 2 μ L, RNA酶抑制剂(RNasin)1 μ L, 鼠源逆转录酶M-MLV 1 μ L]; 20℃ 10 min, 42℃保温60 min, 70℃变性5 min, 得到模板cDNA, 置于-20℃冰箱保存备用. 逆转录. 在PCR反应管中加入cDNA模板5 μ L, 25 μ L PCR预混液[10 \times buffer(逆转录缓冲液)3 μ L, 10 mmol/L dNTP 1 μ L, Taq DNA聚合酶0.3 μ L(1.5 U), 25 mmol/L氯化镁(MgCl₂)3 μ L, 10 μ mol/L上、下游引物各1 μ L, 对应的10 μ mol/L TaqMan探针1 μ L, H₂O 14.7 μ L]; 瞬时离心, 于FTC2000荧光定量PCR仪上94℃ 2 min后, 按94℃ 20 S, 53℃ 30 S, 60℃ 40 S(此时收集检测荧光)循环45次, 观察记录各个反应的Ct值. 同时将已知拷贝数的标准品按10倍比例稀释成10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³的浓度梯度. 每个梯度的标准品分别进行荧光定量PCR反应, 统计其Ct值, 并以Ct值为横坐标, 标准品模板拷贝数对数为纵坐标, 作标准曲线, 其相关系数 $r > 0.96$ 时, 即可认为Ct值与模板拷贝数对数成线性关系, 并据此标准曲线计算各个标本的cDNA模板拷贝数.

统计学处理 使用PEMS 3.1统计软件处理数据, 所有计量资料用mean \pm SD表示, 组间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 大鼠血清中EtOH含量 模型组EtOH值较阴性对照组明显升高, 差异有显著性($P < 0.05$); 高剂组、低剂组EtOH值较模型组明显降低, 差异有显著性($P < 0.05$), 高剂组已接近阴性对照组值($P > 0.05$)(表1).

2.2 肝组织ADH和CAT含量 模型组ADH和CAT含量较阴性对照组明显降低, 差异有显著性($P < 0.05$); 护肝灵高剂组、低剂组ADH值较模型组明显升高, 差异有显著性($P < 0.05$), 高剂组已接近阴性对照组值($P > 0.05$), CAT含量较模型组明显升高, 差异有显著性($P < 0.05$)(表1).

2.3 肝组织ADH和CYP450 II E1 mRNA表达 ADH mRNA表达Ct值各组间差异均无显著性($P > 0.05$). 乙醇造模的4组大鼠CYP450 II E1 mRNA表达Ct值均明显低于阴性对照组, 差异有显著性($P < 0.01$); 4组中以高剂组降低最明显, 与

■名词解释

1 TaqMan探针: 结构特点为两端有荧光素和淬灭基团, 当两者同时存在时, 说明未发生新的碱基互补, 这时荧光定量PCR仪上不能收集到荧光点, 反之即可收集到荧光点.

2 起跳点: 当荧光点开始快速升高时的点, 称其为起跳点.

3 Ct值: 即从能收集到荧光点到起跳点时的循环次数.

■同行评价

中药复方治疗酒精性肝病具有较好前景. 采用荧光实时定量RT-PCR观察ADH和CYP450 II E1的mRNA表达, 作到定量程度, 数据齐全, 方法先进, 有一定的学术价值.

表 1 EtOH、ADH、CAT含量及ADH和CYP450 II E1的mRNA表达Ct值 (mean ± SD)

分组	EtOH		ADH		CAT		ADH mRNA		CYP450 II E1 mRNA	
	n	含量 (mg/L)	n	含量 (nkat/L)	n	含量 (nkat/L)	n	Ct值 (次)	n	Ct值 (次)
阴性对照组	10	-51.4 ± 2.83	10	1884 ± 650	10	255 ± 43	10	22 ± 2	10	15 ± 2
模型组	9	545.7 ± 108.85 ^a	9	667 ± 272 ^a	8	112 ± 29 ^a	8	21 ± 9	8	10 ± 2 ^b
护肝灵低剂	9	248.5 ± 96.63 ^{ad}	10	1184 ± 422 ^{ac}	10	202 ± 31 ^{ac}	10	23 ± 3	10	9 ± 2 ^b
护肝灵高剂	9	-0.1 ± 33.94 ^{df}	8	1550 ± 458 ^c	8	167 ± 34 ^{acg}	8	21 ± 2	9	8 ± 2 ^{bc}
药物对照组	9	114.5 ± 64.78 ^{adh}	9	1334 ± 2409 ^{ac}	9	142 ± 33 ^{ab}	8	21 ± 3	8	9 ± 2 ^b

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 阴性对照组; ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs 模型组; ^e*P*<0.05, ^f*P*<0.01 vs 低剂组; ^g*P*<0.05, ^h*P*<0.01 vs 高剂组.

模型组比较差异有显著性(*P*<0.05)(表1).

3 讨论

ALD的病理组织学分型包括轻型酒精性肝病、酒精性脂肪肝、酒精性肝炎、酒精性肝纤维化、酒精性肝硬化等病型^[19]. ALD是西方国家最常见的肝硬化病因, 也是十大常见死因之一^[20]. 1979年世界卫生大会决定把过量饮酒问题列入世界公共卫生的主要问题^[21].

中医认为酒毒为湿热, 戒酒为预防酒毒伤人的根本办法. 由于戒酒很难, 所以, 本研究以“以疏代堵”为立意, 精选枳椇、虎杖、砂仁、白茅根等中药组方, 通过清湿热、运脾湿、利小便, 达到解酒毒、护肝脏的目的(专利申请号20041004864.2).

酒中有效成分为EtOH, 长期、过量饮酒是造成乙醇性肝损伤的最主要原因, 其发病机制有5个方面^[22]. 乙醇在肝细胞内存在2个代谢系统: ADH系统和非ADH系统, 2个代谢系统分为3条代谢途径^[24]: ADH途径, 定位于胞质内; MEOS (microsomal enzyme oxidizing system, MEOS)途径, 定位于内质网内; CAT途径, 定位于过氧化物酶体内. 乙醇代谢过程是乙醇→乙醛→乙酸, 后者以乙酰辅酶A的形式进入三羧酸循环, 氧化生成二氧化碳和水. 我们的实验结果显示, 模型组EtOH值较阴性对照组明显升高, 差异有显著性; 护肝灵高剂组、低剂组EtOH值较模型组明显降低, 差异有显著性, 高剂组已接近阴性对照组值.

ADH是乙醇的氧化还原酶, 在乙醇代谢中主要是将乙醇氧化为乙醛, 为乙醛进一步代谢成为乙酸提供可能. 我们的实验结果显示, 模型组ADH值较阴性对照组明显降低, 差异有显著性; 护肝灵高剂组、低剂组ADH值较模型组明显升高, 差异有显著性, 高剂组已接近阴性对照组值. 荧光实时定量RT-PCR检查ADH mRNA

表达, 其Ct值显示: 各组间相互比较差异均无显著性. 按文献报道和推测, 阴性对照组、模型组间ADH mRNA表达Ct值差异应该有显著性^[24], 但本实验结果相反. 我们拟做一个标品对照以进一步验证, 但因样本已使用完, 故未能做比较, 存疑.

CAT亦称触酶, 在人体内以肝脏、肾脏含CAT活性最高. CAT能将细胞代谢所产生的毒性物质过氧化氢迅速加以清除, 从而起到保护巯基酶、膜蛋白和解毒的作用. 本结果显示, 模型组CAT含量较阴性对照组明显降低, 差异有显著性; 护肝灵高剂组、低剂组CAT含量较模型组明显升高, 差异有显著性.

MEOS是肝内酒精氧化的另一重要途径, 主要存在于肝小叶第三区, 其关键酶是CYP450 II E1, 分为3个亚型^[25], 作用的环节在于加速乙醛的氧化, 促进肝脏的解毒功能^[26]. 中国人CYP450 II E1表达水平和酶活性的个体差异与*Rsa* I 识别的基因多态有关^[27]. 实验大鼠肝组织荧光实时定量RT-PCR检查CYP450 II E1 mRNA表达的Ct值结果显示, 乙醇造模的四组大鼠CYP450 II E1 mRNA表达的Ct值均明显低于阴性对照组, 差异有显著性; 四组中以高剂组降低最明显, 与模型组比较差异有显著性. 表明阴性对照组大鼠的循环周期长, CYP450 II E1 mRNA不易表达, 而受到乙醇刺激后循环周期缩短, 易于表达, 给药干预后循环周期更加缩短, 更易于表达, 受到乙醇刺激的4组中以高剂组循环周期最短, 最易于表达.

4 参考文献

- 郝丽静, 冯天铸, 马晓莉. 益肝颗粒的工艺学研究和质量标准的初步制定. 中成药 2002; 24: 305-306
- 黄哲, 田德禄. 中医药防治酒精性肝病的研究进展(综述). 北京中医药大学学报 2000; 23: 72-74
- 侯留法, 陈宝玲, 赵玉瑶, 张影, 毛重山. 酒肝消脂冲剂治疗酒精性脂肪肝102例. 中国中西医结合杂志 2003;

- 23: 413
- 4 戴宁, 曾民德, 李继强, 邱德凯. 清脂健肝方对酒精性肝损伤的防治作用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1457-1459
- 5 邢练军, 季光, 张玮, 王奕, 王雨秋, 王育群, 曹承楼. 清肝活血方防治酒精性肝损伤的机理研究. 上海中医药大学学报 2002; 16: 48-50
- 6 孙怡宁, 尚荣军, 罗金燕, 张宽学. 白酒灌胃法建立大鼠早期酒精性肝病模型. 陕西医学杂志 2002; 32: 565-567
- 7 杜施霖, 迟宝荣. 酒精性肝损伤动物模型的研究. 白求恩医科大学学报 2001; 27: 682-685
- 8 李舒丹, 厉有名, 虞朝辉. 大鼠慢性酒精性肝损伤观察. 中国公共卫生 2004; 20: 195-197
- 9 赵敏, 杨杏芬, 黄俊明, 池莉平, 王凤岩. 小鼠酒精性肝损伤模型的研究. 卫生研究 2005; 34: 121
- 10 胡安斌, 蔡继业, 郑启昌, 洪岸, 何晓青, 戴云, 单于, 潘运龙, 李凌松. ES细胞体外定向分化为成熟肝细胞的实验研究. 生物化学与生物物理进展 2004; 31: 518-522
- 11 厉有名, 陈卫星, 虞朝辉, 蔡卫民, 郑敏. 酒精性肝病外周血单个核细胞转化生长因子 $\beta 1$ mRNA表达的研究. 中华内科杂志 2002; 41: 190-191
- 12 左国庆, 何松, 刘长安, 龚建平. 实验性酒精性肝病时脂多糖结合蛋白和脂多糖受体CD14的表达. 中华肝脏病杂志 2002; 10: 207-210
- 13 周俊, 拓西平, 苗振春, 孙波, 韩易. 大鼠酒精性肝病早期1型纤溶酶原激活抑制物mRNA表达及药物的影响. 中华消化杂志 2002; 22: 573-574
- 14 陈韶华, 虞朝辉, 厉有名. 缺氧诱导因子1- α 在酒精性肝病形成中的表达. 中华肝脏病杂志 2004; 12: 417-419
- 15 阎明, 朱孔锡, 孟繁立, 王红娟, 吴美玲. 乙醛脱氢酶基因多态性与酒精性肝病的关系. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 654-656
- 16 任绪义, 周雍, 张建鹏, 冯伟华. 镉中毒大鼠睾丸与肝脏金属硫蛋白表达的时相研究. 生物化学与生物物理进展 2002; 29: 811-814
- 17 王向阳. 乙醇氧化酶法测定血清中乙醇含量. 临床检验杂志 2002; 20: 208-210
- 18 胡建强, 刘凤兰. 血清乙醇脱氢酶活性测定及临床应用. 天津医科大学学报 2001; 7: 110-111
- 19 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 酒精性肝病诊断标准. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 72
- 20 邱德凯, 马雄. 酒精性肝病的治疗. 临床内科杂志 2004; 21: 77-79
- 21 汪俊韬. 加强对酒精性肝病的研究. 中西医结合肝病杂志 1997; 7: 193-194
- 22 王吉耀, 涂传涛. 酒精性肝病的发病机制. 临床内科杂志 2004; 21: 73-74
- 23 Oneta CM, Simanowski UA. First pass metabolism of ethanol is strikingly influenced by the speed of gastric empty. Gut 1998; 43: 612-619
- 24 黄玉红, 王秩淳, 王炳元, 付宝玉. 酒精性肝病血清乙醇脱氢酶活性的变化. 中华肝脏病杂志 2002; 10: 24
- 25 张顺财, 刘斯青, 刘红春, 朱无难. 酒精性肝病细胞色素P450 II E1基因型分析及其意义. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 338-339
- 26 李俊杰. 乙醇对肝细胞色素P-450氧化酶2E1的诱导. 中国病理生理杂志 2003; 19: 193-202
- 27 谭文, 吴健雄, 唐槐静, 林东昕. 中国人肝脏细胞色素P450 II E1表达-基因型与表型的关系. 中国科学(C辑) 2001; 31: 136-140

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年即将召开的国际会议

Internal Medicine: Gastroenterology
22 July 2006-1 August 2006
Amsterdam
Continuing Education Inc
jbarnhart@continuingeducation.net

7th World Congress of the International
Hepato-Pancreato-Biliary Association
3-7 September 2006
Edinburgh
Edinburgh Convention Bureau
convention@edinburgh.org
www.edinburgh.org/conference

World Congress on Controversies in Obesity
Diabetes and Hypertension
25-28 October 2006
Berlin
comtec international
codhy@codhy.com
www.codhy.com

XXX Panamerican Congress of
Gastroenterology
11-16 November 2006
Cancun
www.panamericano2006.org.mx

人大肠癌HCT-8/5-FU耐药细胞株的建立及P-gp测定

布立民, 孙淑红, 华建平, 韩英, 赖靖, 鲍文漪

■背景资料

国内人大肠癌多药耐药细胞株报道较少, 本文用5-FU对人大肠癌细胞株HCT-8进行诱导, 建立大肠癌多药耐药细胞株, 并探讨耐药机制。通过间歇诱导法, 浓度梯度递增法建立的大肠癌MDR有一定科学性, 对P-gp的测定有助于了解大肠癌术后化疗差机制。

布立民, 华建平, 鲍文漪, 天津市第一中心医院消化科 天津市 300000

孙淑红, 承德医学院外科教研室 河北省承德市 063700

韩英, 北京军区总医院消化科 北京市 100700

赖靖, 解放军464医院内二科 天津市 300810

布立民, 2003年军医进修学院硕士生, 主治医师, 主要从事胃肠道肿瘤的诊治研究。

通讯作者: 韩英, 100700, 北京市东城区南门仓5号, 北京军区总医院消化内科。

电话: 010-66721009

收稿日期: 2006-05-16 接受日期: 2006-06-05

Preparation of HCT-8/5-fluorouracil multidrug resistant cell line and detection of P-glycoprotein

Li-Min Bu, Shu-Hong Sun, Jian-Ping Hua, Ying Han, Jing Lai, Wen-Yi Bao

Li-Min Bu, Jian-Ping Hua, Wen-Yi Bao, Department of Gastroenterology, the First Central Hospital, Tianjin 300000, China

Shu-Hong Sun, Department of Surgery, Chengde Medical College, Chengde 063700, Hebei Province, China

Ying Han, Department of Gastroenterology, General Hospital of Beijing Military Command, Beijing 100700, China

Jing Lai, the Second Department of Internal Medicine, the 464th Hospital of Chinese PLA, Tianjin 300810, China

Correspondence to: Dr. Ying Han, Department of Gastroenterology, General Hospital of Beijing Military Command, 5 Nanmencang Road, Dongcheng District, Beijing 100700, China.

Received: 2006-05-16 Accepted: 2006-06-05

Abstract

AIM: To develop HCT-8/5-fluorouracil multidrug resistant cell line and explore the mechanism its drug resistance.

METHODS: High concentration of 5-FU was used in the beginning to induce drug resistance of HCT-8 cell line, and thereafter, the concentration of 5-FU was increased in gradient. About 7 mo later, the cells could stably grow in 2.0 mg/L 5-FU, which was named HCT-8/5-FU multidrug resistant cell line. The resistant index of HCT-8/5-FU cells to 5-FU, adriamycin (ADM), and cisplatin (DDP) was examined with MTT assay, and growth curve was drawn. The morphological changes were observed by both light and electron microscopy. The function of P-glyco-

protein (P-gp) was detected by flow cytometry using rhodamine staining.

RESULTS: The resistant index of HCT-8/5-FU cells to 5-FU is 16.6, and a cross-resistance to ADM and DDP was also noticed. In comparison with that of the parental cells, the growth rate of HCT-8/5-FU cells did not changed significantly, but the morphology of the cells was remarkably changed. Irregular nucleus, double nucleus and polymorphic nucleus appeared in HCT-8/5-FU cells, and the cells shaped as polygon-like and leptosomatic. The numbers of mitochondria, endoplasmic reticulum and lysosome were increased, and over-expression of P-gp was observed in HCT-8/5-FU cells.

CONCLUSION: HCT-8/5-FU multidrug resistant cell line is successfully developed. The drug-resistance mechanism of HCT-8/5-FU cell line may be related to the over-expression of P-gp.

Key Words: Tumor cell; Cell culture; Colorectal cancer; Drug-resistant cell line; Multidrug resistance; P-glycoprotein

Bu LM, Sun SH, Hua JP, Han Y, Lai J, Bao WY. Preparation of HCT-8/5-fluorouracil multidrug resistant cell line and detection of P-glycoprotein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(21):2082-2086

摘要

目的: 建立人大肠癌多药耐药细胞株HCT-8/5-FU及并对其耐药机制进行探讨。

方法: 先采用较大剂量间歇诱导法进行筛选, 再采用浓度梯度递增法作用, 历时7 mo, 至HCT8细胞可长期在5-FU浓度为2.0 mg/L的细胞培养液中稳定生长。电镜、HE染色观察2种细胞形态结构差异。体外细胞毒性实验观察他对5-FU, ADM, DDP的耐药性。绘制亲本细胞和耐药细胞的体外生长曲线。罗丹明染色法检测其两种细胞P-gp功能表达。

结果: HCT-8细胞株经7 mo诱导, 可在5-FU 2.0 g/L的培养液中稳定增殖, 具有多药耐药性, 命

名为HCT-8/5-FU, 该细胞株对5-FU的耐药指数为16.6, 并对ADM, DDP有交叉耐药性. 该细胞株体外群体倍增时间与亲本细胞差别不显著. HE染色观察耐药细胞胞体较亲本细胞大, 细胞核不规则, 可见双核、多形核, 细胞形态不规则, 呈多角形、细长形改变, 可见巨核细胞. 透射电镜下耐药细胞胞质内线粒体、内质网、溶酶体增多. 流式细胞仪罗丹明染色法观察荧光强度曲线左移, 提示耐药细胞有过度P-gp表达.

结论: 成功建立HCT-8/5-FU多药耐药细胞株. 先采用较大剂量间歇诱导进行筛选, 再采用浓度梯度递增法作用是诱导大肠癌耐药细胞株的较好方式. HCT-8/5-FU细胞株的耐药机制与P-糖蛋白表达有关.

关键词: 肿瘤细胞; 细胞培养; 大肠癌; 耐药细胞株; 多药耐药; P-糖蛋白

布立民, 孙淑红, 华建平, 韩英, 赖靖, 鲍文漪. 人大肠癌HCT-8/5-FU耐药细胞株的建立及P-gp测定. 世界华人消化杂志 2006;14(21):2082-2086

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2082.asp>

0 引言

随着国民生活水平的提高, 饮食结构的改变, 大肠癌的发病率正逐年升高, 其发病率仅次于胃癌、食道癌、肺癌等恶性肿瘤之后, 居第4-6位^[1]. 近年来, 虽然现代外科学手术方法取得改进及非手术方法取得了一定进展, 但是对术后复发或转移尚缺乏有效手段. 肿瘤细胞耐药性限制了疗效提高^[2-3]. 建立大肠癌耐药细胞株为临床研究肿瘤细胞多药耐药(MDR)机制提供了实验基础, 因此研究MDR机制和逆转MDR的方法是肿瘤临床亟待解决的问题^[4-5]. 国内对人大肠癌多药耐药细胞株报道较少, 我们用5-氟尿嘧啶(5-fluorouracid, 5-FU)对人大肠癌细胞株HCT-8进行诱导, 建立大肠癌MDR细胞株, 并探讨其生物学特性, 为进一步寻找逆转剂的研究打好基础.

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI 1640为Gibco公司产品; 噻唑兰(MTT)、罗丹明123 (Rhodamine 123)、10 g/L钼酸溶液、环氧树脂等均为美国Sigma公司产品; 5-FU, 天津氨基酸公司产品; 顺铂(cisplatin, DDP), 阿霉素(adriamycin, ADM), 齐鲁制药厂产品. 大肠癌细胞株HCT-8由中国医学科学院药物

研究所提供, 为大肠腺癌细胞, 在含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养液, 37℃, 50 mL/L CO₂饱和湿度的细胞培养箱中培养.

1.2 方法 细胞铺满瓶底约90%时, 先用50 mg/L 5-FU的培养液作用约24 h, 观察有70%细胞死亡时, 停止药物作用, PBS缓冲液冲洗2次, 此时瓶中仅有10%-20%细胞贴壁生长, 用含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养液培养, 约1 mo时, 细胞已铺满瓶底80%, 继续用含5-FU的培养液作用约24 h, 改用含胎牛血清的RPMI 1640培养液继续培养, 待细胞进入对数生长期时, 分瓶传代, 以梯度增加方式, 在5-FU终浓度为0.5, 1.0, 1.5, 2.0 g/L的RPMI 1640培养液中培养, 历时7 mo, 至HCT-8细胞可长期在2.0 g/L的5-FU培养液中稳定生长, 表明HCT-8/5-FU耐药细胞株建立. 取对数生长期HCT-8和HCT-8/5-FU细胞, 胰酶消化, 充分吹打悬浮, 接种于6孔培养板, 使每孔含细胞数为 1×10^4 , 每孔加培养液3 mL, 每株每24 h计数3孔, 取其均值, 共计数6 d, 绘制细胞生长曲线.

1.2.1 细胞形态学观察 取6孔培养板先加入经高温蒸气消毒的盖玻片, 每孔3-4片, 与培养板底壁贴牢固定, 再加入细胞数为 1×10^8 /L的亲本HCT-8细胞和HCT-8/5-FU细胞悬液, 3 mL/孔. 待细胞呈对数生长期时, 取出盖玻片行HE染色后光学树脂封片并照相. 另取对数生长期的HCT-8亲本细胞和HCT-8/5-FU细胞各一瓶, 用细胞刮子轻轻刮下, 离心去上清, 细胞团块用25 g/L戊二醛前固定, 10 g/L钼酸后固定, 丙酮梯度脱水, 环氧树脂包埋, 切片机进行超薄切片, 用醋酸-铀双染色, TECNAI透射电镜观察并摄片.

1.2.2 耐药指数测定 对数生长期的HCT-8细胞和HCT-8/5-FU细胞, 胰酶消化, 充分吹打成细胞悬液, 100 μ L/孔接种于96孔板, 使每孔细胞数为 1×10^4 , 并设空白对照, 阴性对照, 于CO₂孵箱中适应性培养24 h后, 加入稀释后的抗肿瘤药物(每种药物设5种浓度), 对照组加入等量的PBS溶液, 对照组及各浓度组均设4孔, 继续培养48 h. 快速翻转并弃去孔中液体, 在每孔中加入1 g/L的MTT 30 μ L, 继续培养4 h, 小心吸去孔中上清液, 在每孔中加入DMSO 100 μ L, 振荡培养板10 min, 使孔中沉淀完全溶解, 以490 nm为检测波长, 560 nm为参考波长, 测各孔吸光度值(A值), 以平均A值对药物浓度的对数作图, 从图上求出杀死半数细胞的药物浓度即ID₅₀, 依据耐药细胞和亲本细胞对某一药物的ID₅₀比值, 求得耐

■同行评价

本文阐述癌细胞多药耐药机制, 并寻找逆转其耐药机制的对策, 是一项有意义的研究. 文章设计科学, 方法先进, 结论客观, 虽然所作工作是初步的, 但其研究思路有一定的启示性.

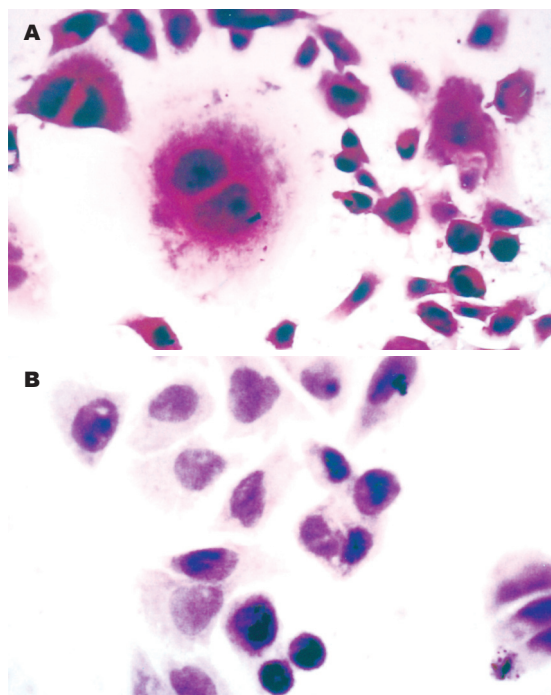


图1 细胞形态HE × 100. A: HCT-8/5-FU; B: HCT-8.

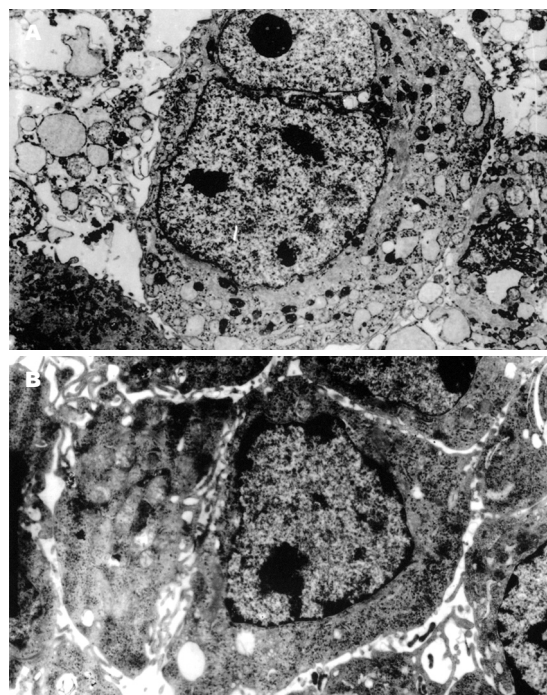


图2 细胞超微结构TEM × 10 000. A: HCT-8/5-FU; B: HCT-8.

药指数, 耐药指数(RI) = ID_{50} 耐药细胞/ ID_{50} 亲本细胞.

1.2.3 细胞内P-gp的检测 亲本细胞和耐药细胞同时应用, 充分消化, 分散程度要高, 将培养细胞用RPMI 1640培养液漂洗1次, 制成 $2 \times 10^6/L$ 细胞悬液, 计数; 每管加入终浓度达5 g/L的罗丹明; 37℃保温30 min, 1500 r/min离心2 min, 去除培养液, 再用新培养液洗去细胞外的罗丹明染料; 在37℃保温10 min, 使P-gp糖蛋白功能得以发挥, 能把药物泵出; 再用RPMI 1640培养液洗1次, 异博定(10 g/L终浓度)终止泵出功能, 放在冰冷的新RPMI 1640培养液中待检测; 流式细胞仪用488 nm的激发光, 测试细胞荧光强度.

统计学处理 应用STATA 7.0软件进行统计学处理, 采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性.

2 结果

2.1 细胞形态和生长 HE染色观察耐药细胞胞体较亲本细胞大, 细胞核不规则, 可见双核、多形核, 细胞形态不规则, 呈多角形、细长形改变, 可见巨核细胞. 而亲本细胞胞核相对较大, 胞质少, 细胞形态与耐药细胞相比较规则(图1). 透射电镜下可见两种细胞超微结构的差异, 与亲本细胞相比, 耐药细胞胞质内可见丰富线粒体及内质网, 部分内质网扩张为囊泡状, 部分耐药细胞胞质内可见大量溶酶体及酶性颗粒分泌、不规则空泡及脂滴(图2). 两株细胞在贴壁后第6天

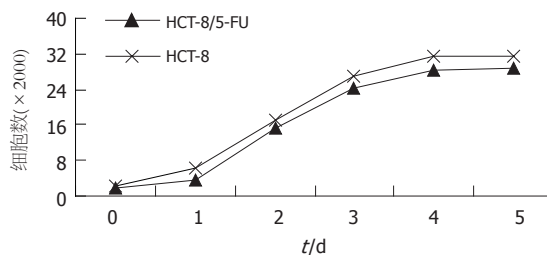


图3 HCT-8和HCT-8/5-FU的细胞增殖曲线.

表1 细胞对不同浓度化疗药物的 IC_{50} 及耐药指数 ($n = 4$, mean \pm SD)

	HCT-8	HCT-8/5-FU	耐药指数
5-FU	0.40 ± 0.02	7.14 ± 0.46	16.6
DDP	1.20 ± 0.67	4.72 ± 0.23	3.93
ADM	0.83 ± 0.02	5.21 ± 0.13	6.26

均达到对数生长期, 图3提示耐药细胞和亲本细胞体外增殖速度相似, 但倍增时间较亲本细胞延长.

2.2 HCT-8/5-FU具有多药耐药性 HCT-8不但对5-FU产生耐药性, 而且对大肠癌的常用化疗药物ADM, DDP也产生一定程度的交叉耐药性(表1).

2.3 P-gp蛋白的表达 罗丹明的结构与众多抗癌药物的结构有许多相似之处, 可作为积累在细胞内的抗癌药物的代表. 他能有效地被P-gp蛋白

排出胞外, 并且有强荧光性, 容易测定. 图4说明亲本细胞由于没有或很少P-gp蛋白, 不能将进入细胞中的罗丹明排出, 在细胞中积累大量罗丹明, 故荧光强度很大, 曲线右移; 而耐药细胞有P-gp过度表达, 使进入细胞的罗丹明有效地排出, 故荧光强度低, 曲线左移.

3 讨论

大肠癌是消化道常见恶性肿瘤之一, 早期诊断, 成功的根治性手术切除及手术为主的综合治疗是提高大肠癌患者治愈率的关键^[6]. 但临床就诊时多数患者已是中晚期, 术后5 a生存率一直徘徊在50%左右, 其主要原因之一是化疗的失败. 化疗失败的主要原因是肿瘤对分子结构不同、作用机制各异的抗肿瘤药物产生交叉耐药, 即MDR的产生^[7-8]. 所以建立耐药细胞株, 通过对MDR发生机制的研究, 以指导临床医生选择合理的化疗方案和化疗药物具有重要意义. 肿瘤细胞与抗癌药物接触后, 不仅对其所用药物产生耐药性, 对其他结构和功能不同的药物也产生耐药性, 这种交叉耐药性通常与所用诱导药物的耐受程度呈正比^[9-10]. 已往建立的耐药细胞系, 多采用逐步增加化疗药物浓度持续作用方式体外诱导, 或者恒定药物浓度周期作用方式获得. 前者所需时间较长, 一般为9-12 mo, 而恒定药物周期作用方式因浓度选择较困难, 浓度过高会使诱导失败, 而浓度较低, 细胞的耐药性不明显, 诱导周期较长, 均有一定不足^[11-13]. 本实验先用恒定浓度的化疗药物短间接触法, 筛选出对5-FU耐药性较强的细胞, 并在此基础上逐步增加化疗药物浓度持续作用, 在7 mo内成功诱导出HCT-8耐药细胞株, 命名为HCT-8/5-FU. 耐药细胞株对5-FU的相对耐受度提高了约16倍, 并对ADM, DDP也产生一定程度耐药. 与亲代细胞相比, 耐药细胞生长速度较慢, 倍增时间延长. 形态学上, 耐药细胞体积增大, 胞质空泡及颗粒增多, 不规则形态细胞增多. 电镜下观察两种细胞的超微结构, 可见耐药细胞胞质中有丰富内质网、线粒体, 部分线粒体扩张, 胞质内还可见到大量溶酶体及酶性颗粒分泌及不规则空泡及脂滴存在, 内质网增生及溶酶体与细胞的解毒功能、吞噬外来物质作用相关, 而线粒体增多与脂滴存在也提示细胞器功能增强, 提示随着HCT-8/5-FU细胞耐药性增强, 其生物学特性已发生变化. 已往的大肠癌耐药细胞株采用ADM, 丝裂霉素等^[14], 因5-FU对肿瘤细胞敏

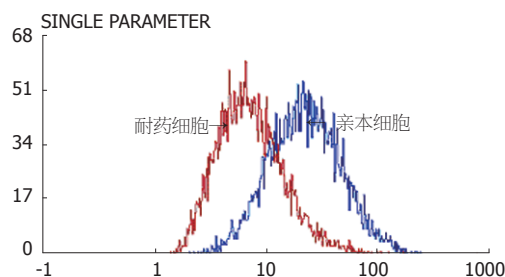


图4 罗丹明染色法检测两种细胞的荧光强度曲线.

感, 诱导较困难, 报道不多. HCT-8/5-FU细胞株对大肠癌的首选药物5-FU产生耐药, 并与ADM, DDP等常用大肠癌化疗药产生交叉耐药, 是研究大肠癌MDR机制和寻找逆转剂的理想模型, 对临床应用有较大指导意义.

过去对有关耐药细胞株和恶性肿瘤的耐药机制进行了深入的研究, 肿瘤细胞根据耐药谱不同, 其耐药类型可分为原药耐药(PDR)和多药耐药(MDR)^[15-16]. 化疗失败的主要原因是肿瘤多药耐药性(MDR)的产生. 国内外对MDR进行了广泛、深入实验和临床研究, 证明其机制包括: 多药耐药基因(*mdr1*基因)及其编码的P-糖蛋白(P-gp)过度表达; 多药耐药相关蛋白(MRP)表达增加; 谷胱甘肽(GSH)依赖性解毒酶系统活性增加; 蛋白激酶C变化; DNA修复机制增强; DNA拓扑异构酶含量减少或性质发生改变等^[7,17-18]. P-gp能使肿瘤细胞对多种化疗药物不敏感, 他是多药耐药基因(*multidrug resistant gene*)的表达产物^[19]. 多数学者认为, P-gp是一种ATP能量依赖泵, 能够将药物由细胞内排出, 其结果导致相应细胞毒药物在细胞内蓄积减少, 致使抗癌效应丧失, 这是耐药细胞产生耐药的重要途径^[8,20-21]. 故任何降低其外流的物质可使细胞内药物聚集增加, 从而有效杀伤大肠癌细胞^[22-23].

目前已建立了数种不同敏感性和特异性的多药耐药检测方法, 用于确定恶性肿瘤不同的耐药机制. 在RNA水平上的检测方法有Northern blot, Slot blot, RT-PCR, RNase protection assay和原位杂交. 而免疫组化, Western blot和流式细胞术可用于耐药蛋白的检测^[24-25]. 另外功能性检测方法如罗丹明123的摄取和抗癌药物在细胞内的积聚可用于确定不同耐药蛋白的功能活性^[26]. 这些方法有的用于大体肿瘤标本的检测, 有的用于细胞株研究. 通过罗丹明活细胞染色证明HCT-8/5-FU细胞能够有效地将细胞内化疗药物排出胞外, 提示HCT-8/5-FU细胞的耐药机制与P-gp过度表达有关^[27]. 但如上所述, 肿瘤细胞产

生耐药性的机制是多方面的, HCT-8/5-FU细胞的多药耐药机制除P-gp过度表达外, 还有待于进一步研究.

4 参考文献

- 1 Burden C, Rose D, Daniels IR. Bowel cancer: the outcome is improving. *J R Soc Health* 2005; 125: 255-258
- 2 McCafferty MH. Advances in treatment of colorectal cancer. *Am Surg* 2005; 71: 892-900
- 3 Goldberg RM. Advances in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Oncologist* 2005; 10 Suppl 3: 40-48
- 4 Fojo AT, Menefee M. Microtubule targeting agents: basic mechanisms of multidrug resistance (MDR). *Semin Oncol* 2005; 32: S3-8
- 5 Luqmani YA. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Med Princ Pract* 2005; 14 Suppl 1: 35-48
- 6 Rougier P, Lepere C. Metastatic colorectal cancer: first- and second-line treatment in 2005. *Semin Oncol* 2005; 32: 15-20
- 7 Molnar J, Gyemant N, Tanaka M, Hohmann J, Bergmann-Leitner E, Molnar P, Deli J, Didiziapetris R, Ferreira MJ. Inhibition of multidrug resistance of cancer cells by natural diterpenes, triterpenes and carotenoids. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 287-311
- 8 Hait WN, Yang JM. Clinical management of recurrent breast cancer: development of multidrug resistance (MDR) and strategies to circumvent it. *Semin Oncol* 2005; 32: S16-21
- 9 Aronica E, Gorter JA, Redeker S, van Vliet EA, Ramkema M, Scheffer GL, Scheper RJ, van der Valk P, Leenstra S, Baayen JC, Spliet WG, Troost D. Localization of breast cancer resistance protein (BCRP) in microvessel endothelium of human control and epileptic brain. *Epilepsia* 2005; 46: 849-857
- 10 Qian F, Wei D, Zhang Q, Yang S. Modulation of P-glycoprotein function and reversal of multidrug resistance by (-)-epigallocatechin gallate in human cancer cells. *Biomed Pharmacother* 2005; 59: 64-69
- 11 Ishiguro A, Shitara K, Munakata M, Saitoh S, Sakata Y. Recent progress of chemotherapy for colorectal cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 2005; 32: 2017-2023
- 12 Golfinopoulos V, Pentheroudakis G, Pavlidis N. Treatment of colorectal cancer in the elderly: a review of the literature. *Cancer Treat Rev* 2006; 32: 1-8
- 13 Bruch HP, Esnaashari H, Schwandner O. Current status of laparoscopic therapy of colorectal cancer. *Dig Dis* 2005; 23: 127-134
- 14 Sultan-Amar V, Fabre-Guillevin E, Piedbois P. Progresses in the medical treatment of advanced colorectal cancer. *Rocz Akad Med Bialymst* 2005; 50: 97-100
- 15 Thomas H, Coley HM. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control* 2003; 10: 159-165
- 16 Andrus MB. Polyene multi-drug resistance reversal agents. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2004; 7: 823-831
- 17 Mizutani T, Hattori A. New horizon of MDR1 (P-glycoprotein) study. *Drug Metab Rev* 2005; 37: 489-510
- 18 Cortes-Selva F, Jimenez IA, Munoz-Martinez F, Campillo M, Bazzocchi IL, Pardo L, Ravelo AG, Castanys S, Gamarro F. Dihydro-beta-agarofuran sesquiterpenes: a new class of reversal agents of the multidrug resistance phenotype mediated by P-glycoprotein in the protozoan parasite *Leishmania*. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 3125-3139
- 19 Tsuruo T. Molecular cancer therapeutics: recent progress and targets in drug resistance. *Intern Med* 2003; 42: 237-243
- 20 Johnson WW. P-glycoprotein-mediated efflux as a major factor in the variance of absorption and distribution of drugs: modulation of chemotherapy resistance. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2002; 24: 501-514
- 21 Swerts K, De Moerloose B, Dhooge C, Laureys G, Benoit Y, Philippe J. Prognostic significance of multidrug resistance-related proteins in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Cancer* 2006; 42: 295-309
- 22 Breier A, Barancik M, Sulova Z, Uhrík B. P-glycoprotein-implications of metabolism of neoplastic cells and cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2005; 5: 457-468
- 23 Vaidyanathan G, Zalutsky MR. Imaging drug resistance with radiolabeled molecules. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 2965-2979
- 24 Salama NN, Eddington ND, Payne D, Wilson TL, Scott KR. Multidrug resistance and anticonvulsants: new studies with some enaminones. *Curr Med Chem* 2004; 11: 2093-2113
- 25 Varma MV, Ashokraj Y, Dey CS, Panchagnula R. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacol Res* 2003; 48: 347-359
- 26 Kitagawa S. Inhibitory effects of polyphenols on p-glycoprotein-mediated transport. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 1-6
- 27 Richaud-Patin Y, Vega-Boada F, Vidaller A, Llorente L. Multidrug resistance-1 (MDR-1) in autoimmune disorders IV. P-glycoprotein overfunction in lymphocytes from myasthenia gravis patients. *Biomed Pharmacother* 2004; 58: 320-324

电编 张敏 编辑 潘伯荣

胃癌组织与血清中VEGF和bFGF的表达意义

周红凤, 吴瑾, 王翠华, 张波, 刘丹, 王雯, 赵宁

周红凤, 吴瑾, 王翠华, 张波, 刘丹, 王雯, 赵宁, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院内科七病房 黑龙江省哈尔滨市 150040
周红凤, 1995年哈尔滨医科大学本科毕业, 2006年哈尔滨医科大学硕士研究生毕业, 主治医师, 主要从事各种肿瘤性疾病的诊断、治疗方面的研究。

黑龙江省教育厅科学技术研究项目, No. 10541145

哈尔滨市科技攻关计划项目, No. 2002AA9CS151-3

通讯作者: 吴瑾, 150040, 黑龙江省哈尔滨市动力区哈平路150号, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院内科七病房。

xianliu@public.hr.hl.cn

电话: 0451-86298729 传真: 0451-86298730

收稿日期: 2006-04-30 接受日期: 2006-05-22

Expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in gastric carcinoma and their significances

Hong-Feng Zhou, Jin Wu, Cui-Hua Wang, Bo Zhang, Dan Liu, Wen Wang, Ning Zhao

Hong-Feng Zhou, Jin Wu, Cui-Hua Wang, Bo Zhang, Dan Liu, Wen Wang, Ning Zhao, Department of Internal Medicine, the Affiliated Tumor Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China
Supported by the Science and Technology Research Program from Education Department of Heilongjiang Province, No. 10541145, and the Key Project of Science and Technology of Harbin City, No. 2002AA9CS151-3

Correspondence to: Dr. Jin Wu, Department of Internal Medicine, the Affiliated Tumor Hospital of Harbin Medical University, 150 Haping Road, Dongli District, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China. xianliu@public.hr.hl.cn

Received: 2006-04-30 Accepted: 2006-05-22

Abstract

AIM: To investigate the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF) in serum and tissues of gastric cancer patients and the clinical characteristics of gastric cancer.

METHODS: Avidin-biotin system enzyme-linked immunosorbent assay (ABC-ELISA) was used to examine the serum expression of VEGF and bFGF in preoperative gastric cancer patients ($n = 73$) and healthy individuals ($n = 20$). Meanwhile, immunohistochemistry was used to detect the expression of VEGF and bFGF in the cancer and cancer-adjacent tissues.

RESULTS: The serum expression of VEGF and bFGF in gastric cancer patients were significantly higher than those in the healthy controls (VEGF: 101.8 ± 53.3 ng/L vs 16.1 ± 22.5 ng/L, $P < 0.05$; bFGF: 152.9 ± 42.7 ng/L vs 25.0 ± 11.4 ng/L, $P < 0.05$). The serum expression of VEGF and bFGF were significantly correlated with the depth of invasion, TNM staging, lymph node metastasis and distant metastasis, but not with the age, sex of patients, and pathological types ($P < 0.05$). The positive rates of VEGF and bFGF expression in gastric cancer tissues were significantly higher than those in the cancer-adjacent tissues ($\chi^2 = 32.1$, $P < 0.05$; $\chi^2 = 17.7$, $P < 0.05$). The tissue expression of VEGF and bFGF were also correlated with the depth of invasion, TNM staging, lymph node metastasis and distant metastasis ($P < 0.05$), but not with the age, sex of patients, and pathological types. There existed positive correlations between serum and tissue expression of VEGF and bFGF (in serum: $r = 0.439$, $P < 0.01$; in tissue: $r = 0.391$, $P < 0.01$). The correlation between serum and tissue expression was also significantly positive (VEGF: $r = 0.346$, $P < 0.01$; bFGF: $r = 0.304$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: VEGF and bFGF play important roles in the oncogenesis, progression, metastasis and prognosis of gastric cancer, which may become new tumor markers for preoperative diagnosis, postoperative following-up, metastasis or recurrence monitoring, assessment of anti-angiogenesis drugs.

Key Words: Gastric cancer; Vascular endothelial growth factor; Basic fibroblast growth factor

Zhou HF, Wu J, Wang CH, Zhang B, Liu D, Wang W, Zhao N. Expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in gastric carcinoma and their significances. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(21):2087-2092

摘要

目的: 研究胃癌患者血清和组织中VEGF, bFGF的表达与胃癌临床特征之间的关系, 研究二者的相关性及组织和血清之间的相关性, 探讨VEGF, bFGF在胃癌的发生、发展、侵袭

■背景资料

肿瘤的生长和转移是血管新生依赖性的, 近几年来研究表明, 新生毛细血管向肿瘤内生长与血管新生刺激因子有关, 如血管内皮生长因子(VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF), 作用于自身的生长因子受体, 形成自身分泌循环, 不断刺激血管增殖, 使肿瘤无休止生长。研究证实, 血管生长因子的表达与肿瘤的发生、发展、侵袭、转移和预后有关。

■研究前沿

现国内外该研究的热点主要是VEGF和bFGF在肿瘤的发生、发展、侵袭、转移和预后中的作用。

和转移中的作用。

方法: 应用酶联免疫技术(ABC-ELISA方法)检测73例胃癌患者术前血清和20例健康体检者血清中的VEGF, bFGF的表达水平, 同时应用免疫组织化学染色方法检测癌组织和癌旁组织中VEGF, bFGF的表达。

结果: 胃癌患者术前血清VEGF, bFGF表达水平明显高于健康体检者(VEGF: 101.8 ± 53.3 ng/L vs 16.1 ± 22.5 ng/L, $P < 0.05$; bFGF: 152.9 ± 42.7 ng/L vs 25.0 ± 11.4 ng/L, $P < 0.05$)。胃癌患者术前血清VEGF, bFGF的表达水平平均随胃癌的浸润深度、TNM分期、淋巴结转移、远处转移而增高($P < 0.05$), 而与年龄、性别及病理类型无关。胃癌组织VEGF的阳性表达率为71.2%, 癌旁组织中VEGF均未见阳性表达, 二者之间有显著性差异($\chi^2 = 32.1$, $P < 0.05$); 胃癌组织中bFGF的阳性表达率为63.0%、癌旁组织中bFGF阳性表达率为(10%), 二者之间亦有显著性差异($\chi^2 = 17.7$, $P < 0.05$)。胃癌患者组织VEGF, bFGF的表达水平平均与胃癌的浸润深度、TNM分期、淋巴结转移、远处转移有关($P < 0.05$), 而与年龄、性别及病理类型无关。胃癌患者血清VEGF的表达水平与血清bFGF的表达水平呈明显正相关($r = 0.439$, $P < 0.01$), 胃癌患者组织VEGF的表达水平与组织bFGF的表达水平呈明显正相关($r = 0.391$, $P < 0.01$); 胃癌患者术前血清VEGF的表达水平与组织VEGF的表达呈正相关($r = 0.346$, $P < 0.01$), 术前血清bFGF的表达水平与组织bFGF的表达呈正相关($r = 0.304$, $P < 0.01$), 均有显著性差异。

结论: VEGF, bFGF在胃癌的发生、发展、转移及预后起着重要的作用, 有望成为胃癌术前诊断、术后随访、复发转移监测、评价抗血管生成药物疗效和化疗效果判定的新的肿瘤标志物。

关键词: 胃癌; 血管内皮细胞生长因子; 碱性成纤维细胞生长因子

周红凤, 吴瑾, 王翠华, 张波, 刘丹, 王雯, 赵宁. 胃癌组织与血清中VEGF和bFGF的表达意义. 世界华人消化杂志 2006;14(21):2087-2092
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2087.asp>

0 引言

胃癌是常见恶性肿瘤^[1]。目前对胃癌的治疗, 仍以包括淋巴结清扫在内的外科手术为主, 以术前术后的化疗为辅。对晚期胃癌而言, 上述胃癌

综合治疗方案仍难取得令人满意的疗效。肿瘤的浸润和转移是肿瘤治疗的最大障碍和直接导致患者死亡的主要原因。血管新生与实体瘤的生长、浸润、转移及预后密切相关, 已成为肿瘤治疗的新靶点之一^[2]。血管生成最重要的正性调控因子是血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)与碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)^[3]。我们采用ABC-ELISA法和免疫组织染色方法同时对73例胃癌患者血清和组织中VEGF, bFGF进行检测, 观察二者在胃癌血清和组织中的表达, 探讨二者与胃癌临床特征之间的关系及二者之间的相关性以及血清和组织之间的相关性, 为肿瘤的靶向治疗寻求新的靶点, 为用血清代替组织来检测胃癌生长情况提供理论依据。获取血清标本简单、方便、患者依从性好, 因此具有较大的社会效益。

1 材料和方法

1.1 材料 2004-06/2005-06住院胃癌患者73例, 男59例, 女14例, 年龄38-83(平均59.2)岁。所有病例术前均未进行过放疗和化疗, 术后均经病理证实为胃癌, 而且均有完整的临床和病理资料, 其中高、中分化腺癌19例, 低分化腺癌43例, 黏液癌5例, 印戒细胞癌6例。临床分期采用1988年国际抗癌联盟(UICC)正式颁布的国际统一的胃癌TNM分期法, 其中I+II期34例, III+IV期39例; 淋巴结转移54例, 无淋巴结转移19例; 远处转移12例, 无远处转移61例。血清正常对照组为健康体检者20例, 男12例, 女8例, 年龄27-55(平均37)岁。术前留取空腹静脉血3.0 mL, 混匀后于3000 r/min离心10 min, 分离出血清存放在-20℃冰箱保存待检。人VEGF定量ELISA试剂盒(进口分装)和人bFGF定量ELISA试剂盒(进口分装)均购自上海森雄科技实业有限公司。电热恒温培养箱(上海市跃进医疗器械一厂), DNX-9620电脑洗板机(北京普朗新技术有限公司), TDL-50B离心机, Biocell2010型酶标仪, TL-2000MM-1型微量振荡仪。鼠抗人VEGFmAb、兔抗人bFGFmAb、SP免疫组化试剂盒、DAB显色试剂盒均购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.2 方法

1.2.1 VEGF和bFGF的测定 建立标准曲线: 设标准孔8孔, 每孔中各加入样品稀释液100 μ L, 第1孔加标准品100 μ L, 混匀后用加样器吸出100 μ L, 移至第2孔。如此反复做对倍稀释至第

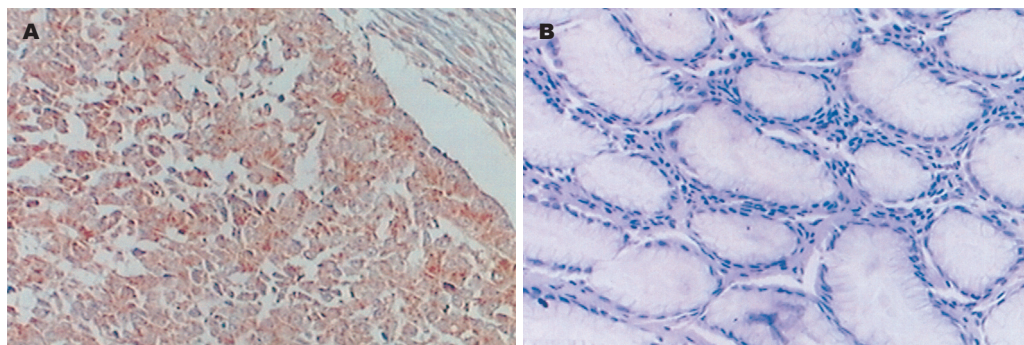


图1 VEGF在胃组织中的表达. A: 胃癌组织, 阳性; B: 癌旁组织, 阴性.

7孔, 最后, 从第7孔中吸出100 μ L弃去, 使之体积均为100 μ L. 第8孔为空白对照. 待测样品孔中每孔加入待测样品100 μ L和50 μ L, 置37 $^{\circ}$ C 120 min, 用洗涤液将反应板充分洗涤4-6次, 在滤纸上印干; 每孔中加入第一抗体工作液50 μ L, 置37 $^{\circ}$ C 60 min, 用洗涤液将反应板充分洗涤4-6次, 在滤纸上印干; 每孔加酶标抗体工作液100 μ L, 置37 $^{\circ}$ C 60 min, 洗板同前; 每孔加入底物工作液100 μ L, 置37 $^{\circ}$ C暗处反应5-10 min, 每孔加入1滴终止液混匀, 在492 nm处测吸光值; VEGF以标准品3200, 1600, 800, 400, 200, 100, 50, 0 ng/L之A值在Biocell2010型酶标仪上画出标准曲线. 根据样品A值在该曲线图上查出相应人VEGF含量; bFGF以标准品500, 250, 125, 62, 31, 16, 8, 0 ng/L之A值在Biocell2010型酶标仪上画出标准曲线. 根据样品A值在该曲线图上查出相应人bFGF含量.

1.2.2 组织VEGF和bFGF的测定 所有标本经常规切片制成4 μ m厚切片, 备染. 取其中20例癌旁组织作对照. 组织VEGF和bFGF测定用免疫组化染色法(SP法), 每次染色流程均设有对照作为染色质量控制标准. 阳性对照用福州迈新生物技术开发有限公司已证实的阳性VEGF和bFGF大肠癌切片为对照, 以PBS代替一抗作为阴性对照, 至少有2名有经验的病理医师独立观察切片. VEGF阳性着色位于细胞质中, 呈弥漫或散在的棕黄色颗粒. 阳性癌细胞 $\geq 10\%$ 为阳性, 无阳性癌细胞或阳性癌细胞 $< 10\%$ 为阴性^[4]. bFGF阳性着色位于细胞质中, 细胞质、细胞膜表面也有少量着色, 为棕黄色颗粒, 采用Eastham *et al*^[5]的判定方法: 即无着色为(-); 切片中癌组织阳性染色弱, 阳性范围 $< 50\%$ 者判定为(+); 染色弱, 阳性范围 $\geq 50\%$ 者判定为(++); 染色强, 阳性范围 $< 50\%$ 者判定为(+++); 染色强, 阳性范围 $\geq 50\%$ 者判定为(++++).

统计学处理 数据资料Microsoft Excel软件录入计算机, 计量资料以mean \pm SD表示, 各组间均数比较用独立样本 t 检验或 t' 检验, 血清VEGF和bFGF与病理类型的关系用方差分析, 计数资料采用 χ^2 检验, 两组间关系运用非参数统计中Spearman等级相关进行分析. 统计分析在SPSS 10.0软件上进行处理, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 血清VEGF和bFGF测定结果 胃癌患者术前血清VEGF和bFGF表达水平明显高于健康体检者, 经统计学分析均有统计学意义($P < 0.05$, 表1). 胃癌患者术前血清VEGF的表达水平随原发肿瘤的浸润深度、TNM分期、淋巴结转移、远处转移而增高, 并有统计学意义($P < 0.05$), 而与年龄、性别及病理类型无关(表1). 胃癌患者术前血清bFGF的表达水平随原发肿瘤的浸润深度、TNM分期、淋巴结转移、远处转移而增高, 并有统计学意义($P < 0.05$), 而与年龄、性别及病理类型无关(表1). 胃癌患者术前血清VEGF和bFGF的表达水平用非参数统计中Spearman等级相关进行分析呈正相关($r = 0.439$, $P < 0.01$), 有统计学意义. 胃癌患者术前血清与组织VEGF表达水平用非参数统计中Spearman等级相关进行分析呈正相关($r = 0.346$, $P < 0.01$), 有统计学意义.

2.2 组织VEGF和bFGF的测定结果 VEGF阳性着色位于细胞质中, 呈弥漫或散在的棕黄色颗粒(图1). 73例胃癌组织中VEGF的阳性表达率为71.2%, 20例癌旁组织中VEGF均未见阳性表达, 二者之间有统计学意义($P < 0.05$). bFGF阳性着色位于细胞质中, 细胞质细胞膜表面也有少量着色, 为棕黄色颗粒(图2). 73例胃癌组织中bFGF的阳性表达率为63.0%, 20例癌旁组织中bFGF阳性表达率为10%, 二者之间有统计学意义.

■创新盘点

目前国内外关于VEGF和bFGF在胃癌组织中的表达及临床意义的研究较多, 而血清中VEGF和bFGF的表达及临床意义研究较少, VEGF和bFGF在胃癌组织和血清中相关性的研究国内尚未见报道. 本文通过对VEGF和bFGF在胃癌组织和血清中表达情况, 以及二者在组织和血清中相关性的研究, 来探讨VEGF和bFGF在胃癌的发生、发展、侵袭、转移和预后中的作用.

■应用要点

本实验结果证实无论胃癌组织中还是血清中, VEGF和bFGF的表达均与胃癌的发生、发展、侵袭、转移和预后密切相关。虽然目前工作还仅限于实验室研究阶段, 但却具有广阔的应用前景, 在不久的将来VEGF和bFGF有望成为胃癌术前诊断、术后随访、复发转移、评估抗血管生成药物疗效和化疗效果判定提供新的肿瘤标志物。

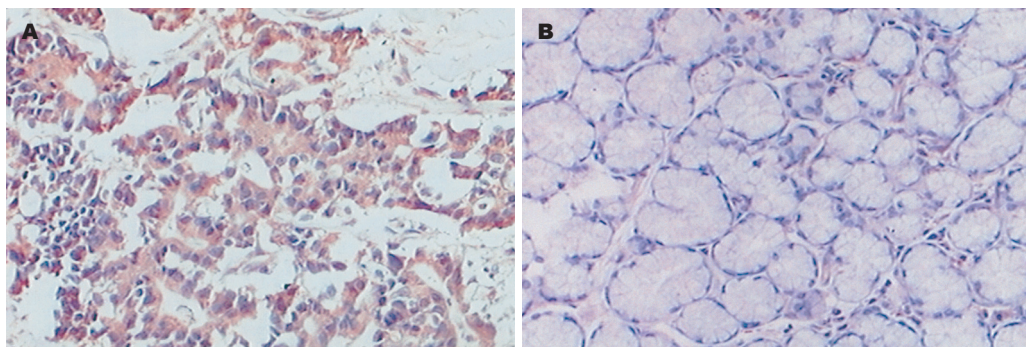


图2 bFGF在胃组织中的表达。A: 胃癌组织, 阳性; B: 癌旁组织, 阴性。

表1 胃癌患者术前VEGF和bFGF表达与临床特征的关系

临床特征	<i>n</i>	血清VEGF (ng/L, mean ± SD)	血清bFGF (ng/L, mean ± SD)	VEGF阳性 <i>n</i> (%)	bFGF阳性 <i>n</i> (%)
男	59	101.3 ± 54.5	154.6 ± 41.4	41 (69.5)	35 (59.3)
女	14	104.3 ± 49.5	145.6 ± 49.2	11 (78.6)	11 (78.6)
年龄: <60岁	37	100.1 ± 57.2	148.8 ± 45.3	25 (67.6)	24 (64.5)
≥60岁	36	103.6 ± 49.7	157.1 ± 40.1	27 (75.0)	22 (61.1)
高中分化腺癌	19	101.1 ± 55.5	155.2 ± 39.2	14 (73.7)	12 (63.2)
低分化腺癌	43	98.7 ± 51.5	151.9 ± 44.7	31 (72.1)	26 (60.5)
黏液腺癌	5	120.4 ± 67.1	138.4 ± 35.0	2 (40.0)	4 (80.0)
印戒细胞癌	6	111.1 ± 57.4	164.6 ± 52.7	5 (83.3)	4 (66.7)
浸润: 未及浆膜	16	53.0 ± 24.2	109.2 ± 40.0	5 (31.3)	4 (25.0)
累及浆膜	57	115.5 ± 51.2 ^a	165.2 ± 35.0 ^a	47 (82.5) ^a	42 (73.7) ^a
淋巴结转移:					
无	19	66.9 ± 42.9	125.3 ± 40.8	7 (36.8)	6 (31.6)
有	54	114.1 ± 51.4 ^a	162.6 ± 39.3 ^a	45 (83.3) ^a	40 (74.1) ^a
TNM: I + II期	34	73.0 ± 43.4	127.1 ± 36.1	20 (58.8)	13 (38.2)
III + IV期	39	127.0 ± 48.5 ^a	162.6 ± 39.3 ^a	32 (82.0) ^a	33 (84.6) ^a
远处转移:					
无	61	92.9 ± 51.1	144.6 ± 39.9	34 (55.7)	34 (55.7)
有	12	147.3 ± 40.9 ^a	195.2 ± 30.3 ^a	12 (100) ^a	12 (100) ^a
总计	73	101.8 ± 53.3 ^a	152.9 ± 42.7 ^a		
健康人	20	16.1 ± 22.5	25.0 ± 11.4		

^a*P* < 0.05.

(*P* < 0.05). VEGF在胃癌组织中的表达与性别、年龄、病理类型无关(*P* > 0.05), VEGF在累及浆膜、有淋巴结转移、TNM分期(III+IV期)、有远处转移组阳性表达明显高于未累及浆膜、无淋巴结转移、TNM(I+II期)、无远处转移组, 有统计学意义(*P* < 0.05, 表1). bFGF在胃癌组织中的表达与性别、年龄、病理类型无关(*P* > 0.05), bFGF在累及浆膜、有淋巴结转移、TNM分期(III+IV期)、有远处转移组阳性表达明显高于无淋巴结转移、TNM分期(I+II期)、无远处转移组, 有统计学意义(*P* < 0.05, 表1). 胃癌患者

血清VEGF的表达水平与血清bFGF的表达水平呈明显正相关(*r* = 0.439, *P* < 0.01), 胃癌患者组织VEGF的表达水平与组织bFGF的表达水平呈明显正相关(*r* = 0.391, *P* < 0.01); 胃癌患者术前血清VEGF的表达水平与组织VEGF的表达呈正相关(*r* = 0.346, *P* < 0.01), 术前血清bFGF的表达水平与组织bFGF的表达呈正相关(*r* = 0.304, *P* < 0.01), 均有显著性差异。

3 讨论

1971年, Folkman最早提出肿瘤生长需要血管新

生, 认为肿瘤细胞和血管组成一个高度整合的生态系统, 源于肿瘤细胞或相关炎性细胞的弥散信号促使内皮细胞从休止状态变为快速增殖状态, 并设想通过抑制肿瘤血管新生来控制肿瘤. 随着内皮细胞培养技术的建立, 血管生成抑制剂的发现以及血管生成活性蛋白纯化工作的完成, 这一观点已为越来越多的研究证实. 现代观点认为肿瘤的生长和转移依赖于肿瘤血管形成. 肿瘤的生长有两个明显不同的阶段, 即从无血管的缓慢生长期转为有血管的快速增殖期, 血管的生长使肿瘤能获得足够的营养而完成血管切换期. 新生血管形成之后, 肿瘤灶局部快速播散, 增强肿瘤灶的远处转移能力^[6]. 因此, 血管形成在肿瘤的发生、发展、侵袭及转移中发挥着重要作用, 已成为肿瘤治疗的新靶点之一^[2], 目前已知的血管生成促进因子包括VEGF、血小板源生长因子、转化生长因子、表皮细胞生长因子等, VEGF是目前所知道的最强的直接作用血管内皮细胞的生长因子. 正常情况下, VEGF在人体许多正常组织中表达水平极低, 而大多数恶性肿瘤存在VEGF高表达^[7]. 这与本研究VEGF在胃癌组织的阳性表达率(71.2%)明显高于胃癌癌旁组织(0%)一致. 而且我们还发现, 组织中VEGF的阳性表达与性别、年龄及病理类型无关, 而与肿瘤浸润深度、淋巴结转移、临床分期、远处转移有显著关系, 这些结果提示, VEGF有促进血管生成作用, 在肿瘤生长、浸润和转移中起重要作用. VEGF在多种肿瘤患者的血液和/或尿液中能够检测到, 且与分期和预后有关. 我们以血清VEGF为指标观察其与胃癌临床特征的关系, 结果显示, 血清VEGF的表达水平随胃癌的浸润深度、淋巴结转移、临床分期和远处转移而增高, 与性别、年龄及病理类型无关. 这与以组织VEGF表达为指标得出的结论基本一致, 而且我们用统计学分析, 二者呈正相关关系, 表明血清VEGF至少部分反映了肿瘤的血管增生情况, 从而可能更方便地评价肿瘤血管增生, 这与其他人的研究相似^[8].

血管生成另一重要的正性调控因子是bFGF. 人bFGF是由146个氨基酸组成的多功能调节性多肽, 分子质量为18 kDa, 基因编码定位于4号染色体, 是分布体内最广泛的生长因子之一. 许多肿瘤表达此因子, 它具有促进有丝分裂原产生、促进趋化性和内皮细胞迁移、刺激内皮细胞产生胶原酶以降解基底膜、诱导大量来

自中胚层和神经外胚层的细胞增殖和分化等作用. 研究发现, 许多肿瘤中均有不同程度的bFGF的表达, 并与很多实体瘤的血管密度、侵袭转移及预后不良相关^[9-10]. 我们发现, bFGF在胃癌组织中的表达与年龄、性别、病理类型无关. bFGF在胃癌组织中的阳性表达率(63.0%)明显高于胃癌癌旁组织(10%), 而且随浸润深度加深阳性表达增加. bFGF在III+IV期胃癌组织中的阳性表达率明显高于I+II期, 这说明组织bFGF的表达与胃癌的发生、发展关系密切. 胃癌细胞主要通过淋巴途径进行远处转移, 淋巴结有无转移及转移的程度是决定胃癌患者预后的重要因素. 本研究在胃癌组织中有淋巴结转移组和无淋巴结转移组bFGF的阳性表达率分别为74.1%, 31.6%, 二者之间有统计学意义($P<0.05$), 表明胃癌组织bFGF的阳性表达与淋巴结转移关系密切. 还发现, 有远处转移组胃癌组织VEGF的阳性表达率明显高于无远处转移组. 这都说明, bFGF阳性表达率越高, 越易发生转移.

本研究表明, 胃癌患者术前血清bFGF表达水平明显高于健康体检者, 而且与胃癌的浸润深度、淋巴结转移、临床分期和远处转移有关, 与性别、年龄及病理类型无关. bFGF血清来源有两个原因: 肿瘤细胞损害后释放, 因肿瘤发展到一定时间, 出现细胞死亡或坏死, 释放至血液; 另一途径是为肿瘤细胞衍生的旁分泌因子^[11]. 而且血清bFGF的表达与组织中的表达具有一致性, 呈正相关关系.

恶性肿瘤的死亡率已逐渐占据各种疾病的首位, 而胃癌则是威胁我国人民生命健康最严重的恶性肿瘤之一, 其发病率及死亡率均居恶性肿瘤之首. 早期胃癌的发现率不超过治疗患者的10%, 而我国目前情况尚难于全面开展胃癌普查工作, 是胃癌5 a生存率难于提高的重要原因. 目前重要的是寻找一种简便、快捷的诊断胃癌的方法. 本研究结果显示, 胃癌血清VEGF和bFGF的表达水平分别与胃癌组织中的表达水平一致, 呈正相关关系. 说明血清VEGF和bFGF的检查可能替代组织中VEGF和bFGF的检查, 为胃癌术前诊断、术后随访、复发转移监测、评价抗血管生成药物疗效和化疗效果判定提供新的肿瘤标志物. 这与Komorowski *et al*^[12]研究外周血VEGF和bFGF的浓度是肿瘤诊断的附加标志的结果相一致. 如以肿瘤组织为标本检测肿瘤生长情况, 只能在术后一次性完成, 对复发转

■名词解释

血管新生: 是指在已经存在血管的基础上以发芽的方式形成新的微血管. 血管新生存在于很多生理和病理过程中, 其与实体瘤的生长、浸润、转移及预后密切相关.

移的患者需进行创伤性检查才能取得标本,费用高、时间长、依从性差,而以血清为标本,取材方便、费用低、时间短、患者依从性好,便于各级医院开展.血清VEGF, bFGF的检查作为一种无创、简便易行的检查反映肿瘤血管生成指标的方法,具有较大的社会效益.

我们还发现,胃癌患者血清VEGF和bFGF表达水平存在正相关,胃癌患者组织中的VEGF和bFGF表达水平也存在正相关,说明二者都是促进胃癌血管生成的重要因素,在胃癌的发生、发展、转移和预后过程中起重要作用.在肿瘤血管生成过程中Tamura *et al*^[13]发现VEGF与bFGF有协同作用.1998年Seghezzi *et al*^[14]报道,尽管静息期的内皮细胞不表达VEGF,但加入外源重组bFGF能引起内皮细胞合成VEGF及小鼠角膜血管形成,VEGF抗体则能抑制此作用.Goldman *et al*^[15]的研究表明,VEGF的促细胞作用比bFGF大3倍,但是少量的bFGF能使VEGF的作用增加2-3倍.此外, Soker *et al*^[16]发现,VEGF和bFGF在局部缺血的动物模型中显示出强大的促血管作用.目前已有文献报道通过应用抗血管生成因子来抑制肿瘤血管生成,从而达到治疗肿瘤的目的.总之,研究VEGF和bFGF在胃癌中的表达及临床意义,以及二者的相互关系对揭开胃癌发生、发展、转移机制和指导临床治疗提供重要的理论价值.VEGF, bFGF也有望成为抗肿瘤治疗的新靶点,从而为肿瘤治疗开辟新天地.

4 参考文献

- 1 孙燕. 内科肿瘤学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2001; 549-572
- 2 赵军, 刘叙仪, 张青云, 蒋薇. 晚期非小细胞肺癌患者外周血VEGF和bFGF及MMP-9水平与预后的关系. 中华肿瘤杂志 2005; 27: 676-679
- 3 Padro T, Ruiz S, Bieker R, Burger H, Steins M, Kienast J, Buchner T, Berdel WE, Mesters RM. Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2000; 95: 2637-2644
- 4 Feng CW, Wang LD, Jiao LH, Liu B, Zheng S, Xie XJ. Expression of p53, inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in gastric precancerous and cancerous lesions: correlation with clinical features. *BMC Cancer* 2002; 2: 8
- 5 Eastham JA, Truong LD, Rogers E, Kattan M, Flanders KC, Scardino PT, Thompson TC. Transforming growth factor-beta 1: comparative immunohistochemical localization in human primary and metastatic prostate cancer. *Lab Invest* 1995; 73: 628-635
- 6 Harlozinska A. Progress in molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. *Anticancer Res* 2005; 25: 3327-3333
- 7 李容. 血管内皮生长因子与肿瘤治疗. 国外医学·生理、病理科学与临床分册 2002; 22: 475-477
- 8 Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Polychronidis A, Zbar A, Kouraklis G, Simopoulos C, Karatzas G. Circulating VEGF levels in the serum of gastric cancer patients: correlation with pathological variables, patient survival, and tumor surgery. *Ann Surg* 2002; 236: 37-42
- 9 Qin LX, Tang ZY. The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 385-392
- 10 McCabe CJ, Khaira JS, Boelaert K, Heaney AP, Tannahill LA, Hussain S, Mitchell R, Olliff J, Sheppard MC, Franklyn JA, Gittos NJ. Expression of pituitary tumour transforming gene (PTTG) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in human pituitary adenomas: relationships to clinical tumour behaviour. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003; 58: 141-150
- 11 谢志杰, 赵挺. bFGF在胃癌中的表达及其临床意义探讨. 浙江实用医学 2002; 7: 323-324
- 12 Komorowski J, Jankewicz J, Stepień H. Vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF) and soluble interleukin-2 receptor (sIL-2R) concentrations in peripheral blood as markers of pituitary tumours. *Cytobios* 2000; 101: 151-159
- 13 Tamura M, Ohta Y, Kajita T, Kimura K, Go T, Oda M, Nakamura H, Watanabe G. Plasma VEGF concentration can predict the tumor angiogenic capacity in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2001; 8: 1097-1102
- 14 Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, Gualandris A, Pintucci G, Robbins ES, Shapiro RL, Galloway AC, Rifkin DB, Mignatti P. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J Cell Biol* 1998; 141: 1659-1673
- 15 Goldman CK, Kim J, Wong WL, King V, Brock T, Gillespie GY. Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Mol Biol Cell* 1993; 4: 121-133
- 16 Soker S, Machado M, Atala A. Systems for therapeutic angiogenesis in tissue engineering. *World J Urol* 2000; 18: 10-18

电编 张敏 编辑 潘伯荣

胃癌和癌前病变中错配修复基因hMLH1的表达及意义

肖桂珍, 刘希双

肖桂珍, 刘希双, 青岛大学医学院附属医院内镜诊治中心 山东省青岛市 266003

肖桂珍, 1989年毕业于菏泽医学专科学校, 2004级青岛大学医学院在读研究生。

通讯作者: 刘希双, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院内镜诊治中心。liuxishuang1@sina.com

电话: 0532-82911525

收稿日期: 2006-05-15 接受日期: 2006-06-27

Expression of DNA mismatch repair gene hMLH1 and its significance in gastric cancer and premalignant lesions

Gui-Zhen Xiao, Xi-Shuang Liu

Gui-Zhen Xiao, Xi-Shuang Liu, Center of Endoscopy, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Correspondence to: Dr. Xi-Shuang Liu, Center of Endoscopy, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, 16 Jiangsu Road, Qingdao 266003, Shandong Province, China. liuxishuang1@sina.com

Received: 2006-05-15 Accepted: 2006-06-27

Abstract

AIM: To investigate the expression of DNA mismatch repair gene hMLH1 and its clinical significances in gastric cancer and premalignant lesions.

METHODS: Immunohistochemical technique was used to detect the expression of hMLH1 protein in 20 cases of chronic superficial gastritis, 20 cases of chronic atrophic gastritis complicated with intestinal metaplasia, 8 cases of adenomatous polyp, 58 cases of gastric cancer and the corresponding cancer-adjacent mucosa.

RESULTS: The hMLH1 protein was expressed mostly in epithelial cytoplasm and a little in cell nucleus. The positive rate of hMLH1 expression in chronic superficial gastritis and chronic atrophic gastritis with intestinal metaplasia were all 90%, which were significantly higher ($\chi^2 = 9.741, P = 0.02$) than those in adenomatous polyp (62.5%) and the corresponding cancer-adjacent mucosa (62.1%). The positive rate of hMLH1 expression was not significantly different between

gastric cancer (72.4%) and the others ($P > 0.05$). Of 58 cases of cancer-adjacent mucosa, 21 (36.2%) were with chronic superficial gastritis, and 37 (63.8%) with chronic atrophic gastritis and intestinal metaplasia. The positive rates of hMLH1 expression were similar between the 21 and 37 cases, but they were both markedly lower than those in the nonneoplastic mucosa ($\chi^2 = 9.885, P = 0.02$).

CONCLUSION: Absence of hMLH1 expression may be one of the early molecular events in the carcinogenesis of gastric cancer. Timely visiting and monitoring chronic gastric patients with absence of hMLH1 protein expression may help to achieve early diagnosis of gastric cancer.

Key Words: Mismatch repair gene; hMLH1; Gastric neoplasm; Adenomatous polyp; Gastritis; Immunohistochemistry

Xiao GZ, Liu XS. Expression of DNA mismatch repair gene hMLH1 and its significance in gastric cancer and premalignant lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(21):2093-2097

摘要

目的: 探讨DNA错配修复基因hMLH1在胃癌和癌前病变中的表达及临床意义。

方法: 应用免疫组织化学技术PV-6000二步法检测20例慢性浅表性胃炎、20例慢性萎缩性胃炎伴肠化生、8例胃腺瘤性息肉、58例胃癌患者癌组织及其癌旁组织的hMLH1基因蛋白表达。

结果: hMLH1基因蛋白主要表达于黏膜上皮的细胞质内, 少量表达于细胞核。在慢性浅表性胃炎上皮细胞和慢性萎缩性胃炎伴肠化生的阳性表达率(均为90%)明显高于胃腺瘤性息肉及胃癌旁组织上皮细胞的阳性表达率(分别为62.5%和62.1%), 差别有统计学意义($\chi^2 = 9.741, P = 0.02$)。hMLH1基因蛋白在胃癌细胞的表达率为72.41%, 与前四者之间差别无统计学意义。在58例癌旁组织中, 21例(36.2%)为慢性浅表性胃炎, 37例(63.8%)为慢性萎缩性

■背景资料

hMLH1是一种错配修复基因, 其表达缺失与多种肿瘤的发生有关。我们对hMLH1在胃黏膜相关疾病中表达进行研究, 初步探讨hMLH1表达与胃癌演进的关系, 为深入研究打下基础。

■研究前沿

hMLH1有望成为胃癌检测的早期指标, hMLH1蛋白表达缺失的机制有待于进一步研究, 以便用于胃癌的预防.

胃炎伴肠化生, 二者hMLH1蛋白阳性表达率相近, 但明显低于非胃癌患者慢性浅表性胃炎和慢性萎缩性胃炎伴肠化生的阳性表达率, 差别具有统计学意义($\chi^2 = 9.885, P = 0.02$).

结论: hMLH1表达缺失可能是胃癌的早期分子事件, 对hMLH1蛋白表达缺失的慢性胃炎患者进行随访、监测, 可能有利于胃癌的早期诊断.

关键词: 错配修复基因; hMLH1; 胃肿瘤; 腺瘤性息肉; 胃炎; 免疫组化

肖桂珍, 刘希双. 胃癌和癌前病变中错配修复基因hMLH1的表达及意义. 世界华人消化杂志 2006;14(21):2093-2097

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2093.asp>

0 引言

胃癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率及死亡率居消化道恶性肿瘤之首, 他的发生、发展涉及多基因和多步骤的过程. 错配修复(MMR)基因是由一系列错配修复碱基的酶分子(包括hMLH1)组成, 他的缺陷导致基因组不稳定性、出现微卫星不稳定(microsatellite unstable, MSI)、对肿瘤易感. 我们应用免疫组织化学技术, 检测错配修复基因hMLH1蛋白在慢性浅表性胃炎、慢性萎缩性胃炎伴肠化生、腺瘤性息肉、癌旁组织以及癌组织的表达情况, 以探讨其表达与胃癌的关系和意义.

1 材料和方法

1.1 材料 2005-01/2005-08外科手术切除的胃癌58例, 男35例, 女23例, 年龄35-80(中位62)岁, 术前未经放化疗. 另胃镜活检慢性浅表性胃炎20例, 男9例, 女11例, 年龄14-65(中位40)岁; 慢性萎缩性胃炎伴肠化生20例, 男7例, 女13例, 年龄34-75(中位50)岁; 胃腺瘤性息肉8例, 男5例, 女3例, 年龄46-79(中位60)岁. 全部病例均经病理证实, 无癌症病史, 无肿瘤家族史. 标本经40 g/L中性甲醛固定, 常规石蜡包埋. hMLH1多克隆抗体购自Santa Cruz公司, PV-6000试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 为Zymed公司推出的二步法免疫组化检测试剂.

1.2 方法 采用免疫组化PV-6000两步法. 对石蜡包埋的标本连续切为3-4 μm 厚的薄片, 展平黏于挂胶的载玻片上, 置烤片箱内60℃烤6 h; 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化; 30 mL/L的过氧化氢孵育10 min; 微波抗原修复(修复液为pH 6.0 的

表1 hMLH1蛋白在不同胃黏膜上皮细胞的阳性表达率

分组	n	hMLH1阳性表达(率%)
慢性浅表性胃炎	20	18 90
慢性萎缩性胃炎伴肠化生	20	18 90
癌旁慢性浅表性胃炎	21	12 57.1 ^a
癌旁慢性萎缩性胃炎伴肠化生	37	24 64.9 ^a
腺瘤性息肉	8	5 62.5 ^a
癌旁组织	58	36 60.1 ^a
癌组织	58	42 72.4

^a $P < 0.05$ vs 慢性胃炎.

EDTA) 10 min; 滴加一抗hMLH1(工作浓度为1:50), 37℃温箱孵育60 min, PBS冲洗; 加入二抗, 温箱孵育20 min; DAB显色, 苏木素复染, 中性树脂胶封片. 取已知阳性组织作阳性对照, PBS取代一抗作阴性对照. 所有切片均由两位资深病理学专家阅片. 每张切片计数5个高倍视野, 每个视野取100个细胞, 阳性表达以黏膜上皮细胞质或核出现棕黄色颗粒为准. 根据Friedrichs *et al*^[1]判定结果: 不着色为0分, 浅黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分; 着色细胞占计数细胞百分率 $\leq 5\%$ 为0分, 6%-20%为1分, 21%-50%为2分, $\geq 51\%$ 为3分; 染色程度与染色细胞百分率得分乘积为最后得分: 0-1分为阴性病例, 2分以上为阳性病例.

统计学处理 采用 χ^2 检验, 应用统计软件SPSS 11.5进行统计学分析.

2 结果

2.1 hMLH1蛋白在胃上皮细胞的表达 hMLH1蛋白的阳性表达表现为黏膜上皮细胞质出现棕黄色颗粒, 少量细胞核出现棕黄色颗粒(图1). hMLH1蛋白在慢性浅表性胃炎和慢性萎缩性胃炎伴肠化生黏膜上皮细胞阳性表达率明显高于腺瘤性息肉和癌旁黏膜上皮细胞, 差异有显著性($\chi^2 = 9.741, P = 0.02 < 0.05$, 表1); hMLH1蛋白在癌细胞阳性表达率低于慢性浅表性胃炎和慢性萎缩性胃炎伴肠化生, 而高于腺瘤性息肉和癌旁黏膜上皮细胞, 但两两比较差异无显著性; 腺瘤性息肉和癌旁黏膜上皮细胞比较差异亦无显著性.

2.2 慢性胃炎黏膜上皮细胞hMLH1表达 在58例癌旁组织中, 21例(36.2%)为慢性浅表性胃炎, 37例(63.8%)为慢性萎缩性胃炎伴肠化生, 二者hMLH1蛋白阳性表达率相近, 但明显低于非肿

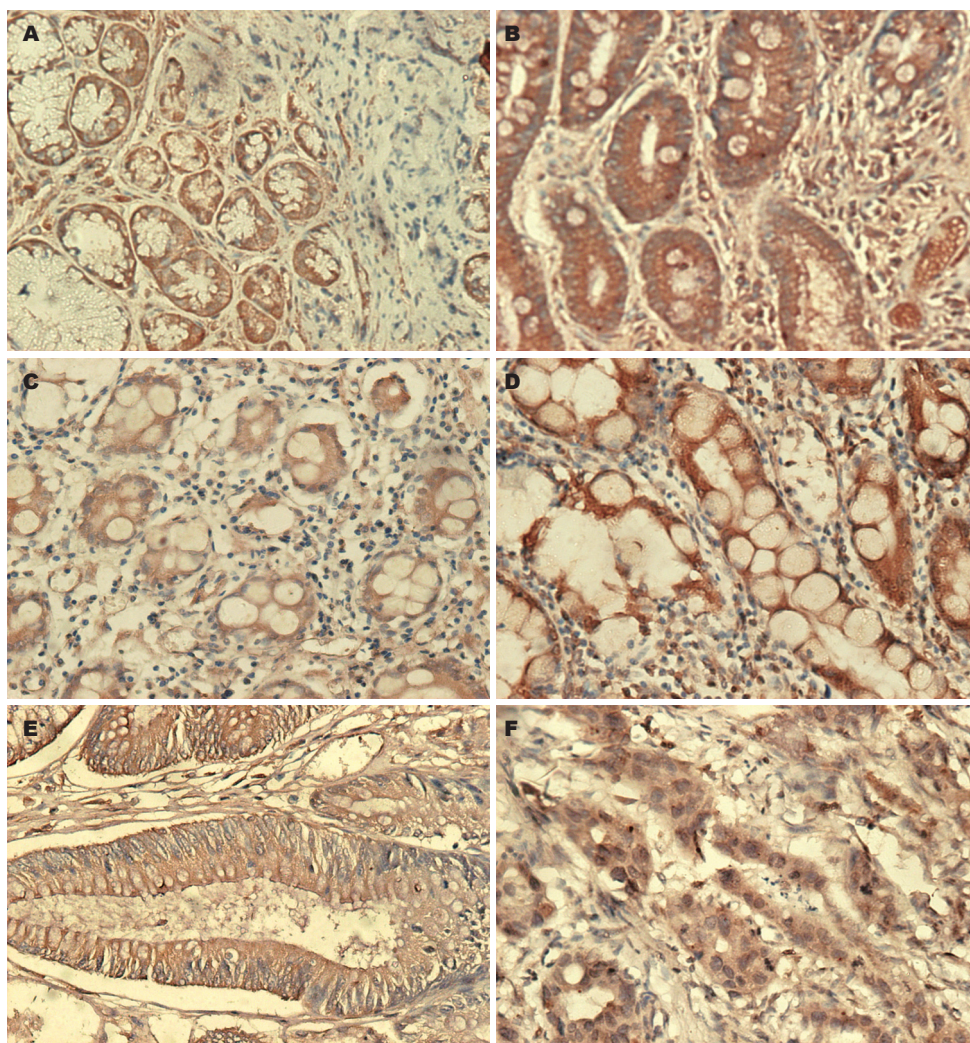


图1 胃黏膜中hMLH1表达 (PV6000 × 200). A: 慢性浅表性胃炎; B: 慢性萎缩性胃炎伴肠化; C: 癌旁慢性浅表性胃炎; D: 癌旁慢性萎缩性胃炎伴肠化; E: 胃腺瘤性息肉; F: 胃癌组织.

■创新盘点

胃慢性炎症、癌前病变与癌的演进过程中hMLH1的表达存在差异, hMLH1的表达缺失与胃癌的发生密切相关.

瘤患者慢性浅表性胃炎和慢性萎缩性胃炎伴肠化生的阳性表达率, 差别具有统计学意义($\chi^2 = 9.885, P = 0.02 < 0.05$, 表1). 而癌旁组织的慢性浅表性胃炎阳性表达率和慢性萎缩性胃炎伴肠化生的hMLH1蛋白阳性表达率相近, 差异无显著性.

3 讨论

MMR是生物进化过程中的保守基因, 具有修复DNA碱基错配、增强DNA复制忠实性、维持基因组稳定性和降低自发性突变的功能^[2-3]. 目前已发现人类9个MMR, 其中hMSH2, hMSH6, hMSH5, hMSH4和hMSH3为细菌MutS同源物; hMLH1, hPMS1, hPMS2和hMLH3为细菌MutL同源物. hMLH1是1994年克隆到的第2个与HNPCC发病有关的MMR, 大约30%的遗传性非息肉病性结肠癌(HNPCC)与hMLH1发病有

关. hMLH1位于3p21.3-23, 其基因组DNA全长约58 kb(不包括启动子), 含19个外显子, cDNA有2268 bp的开放阅读框架, 编码蛋白质756个氨基酸, 其编码的蛋白产物与PMS2/PMS1结合形成异源二聚体, 识别错配位点, 参与错配修复^[4]. 研究显示, hMLH1基因功能丧失与基因突变及启动子甲基化有关^[5-6]. 基因突变多位于基因的后半部分, 其中15和16号外显子为突变发生的热点, 约占突变的半数. 突变形式多为移码突变以及错义突变, 产生截短性蛋白或启动子甲基化导致基因转录与翻译的沉默使蛋白表达缺失, 不能与PMS2/PMS1形成复合物, 也就无法帮助MutS识别错配位点, 从而不能启动修复. 错配的DNA不能修复, 突变基因进一步积累, 引起基因组的不稳定, 导致肿瘤的发生^[7]. 目前研究认为, hMLH1基因蛋白表达缺失不仅与遗传性肿瘤的发生有关, 也参与散发性肿瘤的发生^[8]. 研究表明,

■应用要点

对hMLH1蛋白表达缺失的胃慢性炎症和癌前病变跟踪监测, 有助于胃癌的早期发现.

■名词解释

1 微卫星DNA: 是广泛分布于原核和真核生物基因组中简单的重复核苷酸序列,长约1-6 bp.

2 微卫星DNA不稳定性(microsatellite instable, MSI): 是指肿瘤组织与其相对应的正常组织相比其DNA等位基因结构发生简单重复序列的改变. 这种改变表现: 肿瘤组织与其相对应的组织的PCR产物, 经电泳后电泳条带出现增加、减少、条带位置发生改变以及条带密度改变.

hMLH1表达缺失使错配修复的功能丧失导致肿瘤的发生的机制可能为: (1)不能修复DNA复制中的错误^[9]; (2)增加癌基因或抑癌基因(如Bax, crbB-2, p53和TGF- β 等)的突变频率^[10]; (3)引起基因组不稳定, 即出现DNA MSI现象^[11]. MMR缺陷胃癌组织中MSI的发生率为13%-59%^[12], 有的甚至报道发生率高达64%, 一般为26.7%; 胃肠化生组织为9.3%, 说明从肠化生到癌的演进是基因不稳定的积累过程, 且MSI发生的频率在由癌前病变向癌转化的过程中逐渐增高, 提示错配修复和MSI参与胃癌的多步骤发生过程^[13].

胃癌的发生是一个漫长过程, 一般认为胃癌的发生过程是从正常胃黏膜上皮细胞经内外环境因素作用发生慢性胃炎到胃癌前病变, 包括腺瘤、肠化生和不典型增生, 经过一系列基因突变的积累最终导致胃癌的发生^[14]. 癌旁黏膜上皮与癌细胞处于同一机体, 有着同样的遗传背景, 受到同样的环境刺激, 有着同样基因突变的积累, 可被看作肿瘤易发组织. 本研究显示, 21例(36.2%)癌旁组织为慢性浅表性胃炎, 其hMLH1的阳性表达率(57.1%)明显低于非胃癌患者的慢性浅表性胃炎; 37例(63.8%)癌旁组织为慢性萎缩性胃炎伴肠化生, 其hMLH1的阳性表达率(64.9%)明显低于非胃癌患者的萎缩性胃炎伴肠化生, 差别具有统计学意义; 而癌旁组织的慢性浅表性胃炎阳性表达率和慢性萎缩性胃炎伴肠化生的hMLH1蛋白阳性表达率相近, 差异无显著性. 说明慢性萎缩性胃炎伴肠化生比慢性浅表性胃炎易发生癌变. 因而, 已将慢性萎缩性胃炎列为癌前疾病, 将肠化生列为癌前病变^[15]. 但癌旁黏膜上皮无论是浅表性胃炎还是萎缩性胃炎伴肠化生, hMLH1的表达明显降低, 这可能是其易发生癌变的基础; 也提示慢性胃炎上皮细胞hMLH1表达缺失的非胃癌患者的胃癌发生率可能高于hMLH1表达正常者, 但这一结论尚需进一步的前瞻性研究.

hMLH1蛋白表达缺失促使多种肿瘤的发生^[16-17]. Chaves *et al*^[18]发现, 76例散发性结直肠癌和癌旁组织hMLH1阴性表达率分别是11.8%和13.2%, 两者间hMLH1蛋白表达缺失无差异. Berends *et al*^[19]研究子宫内膜增生和子宫内膜癌hMLH1表达, 9/38子宫内膜癌hMLH1蛋白缺失, 3/11子宫内膜增生hMLH1蛋白缺失, 8例正常子宫内膜hMLH1蛋白表达正常. 本研究结果显示, hMLH1蛋白在胃腺瘤性息肉及癌旁组织的表达相近, 明显低于慢性浅表性胃炎及慢性萎

缩性胃炎伴肠化生的上皮细胞, 其结果与Semba *et al*^[20]研究相吻合, 也与Kim *et al*^[21]发现合并腺瘤的胃癌比单纯胃癌MSI的发生率高、由腺瘤发生胃癌常与MMR的缺陷有关的观点一致. hMLH1在癌细胞中的表达虽与慢性浅表性胃炎、慢性萎缩性胃炎伴肠化生、腺瘤性息肉及癌旁组织无明显差异, 但低于慢性胃炎而与腺瘤性息肉及癌旁组织接近, 提示hMLH1缺失可能是部分胃癌发生的早期分子事件. 本研究显示, 胃腺瘤性息肉或癌旁组织中hMLH1蛋白表达阳性率明显低于慢性胃炎, 提示hMLH1蛋白表达缺失发生在胃癌前病变, 可能是胃癌发生的早期分子事件, 与胃癌发生、发展密切相关. 对hMLH1蛋白表达缺失的慢性胃炎患者应进行随访、监测, 有利于胃癌的早期诊断和治疗, 以提高胃癌患者的生存率和生存质量.

4 参考文献

- 1 Friedrichs K, Gluba S, Eidtmann H, Jonat W. Overexpression of p53 and prognosis in breast cancer. *Cancer* 1993; 72: 3641-3647
- 2 Jacob S, Praz F. DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis. *Biochimie* 2002; 84: 27-47
- 3 Kulke MH, Thakore KS, Thomas G, Wang H, Loda M, Eng C, Odze RD. Microsatellite instability and hMLH1/hMSH2 expression in Barrett esophagus-associated adenocarcinoma. *Cancer* 2001; 91: 1451-1457
- 4 Peltomaki P. DNA mismatch repair and cancer. *Mutat Res* 2001; 488: 77-85
- 5 Wijnen J, Khan PM, Vasen H, Menko F, van der Klift H, van den Broek M, van Leeuwen-Cornelisse I, Nagengast F, Meijers-Heijboer EJ, Lindhout D, Griffioen G, Cats A, Kleibeuker J, Varesco L, Bertario L, Bisgaard ML, Mohr J, Kolodner R, Fodde R. Majority of hMLH1 mutations responsible for hereditary nonpolyposis colorectal cancer cluster at the exonic region 15-16. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 300-307
- 6 Yao Y, Tao H, Kim JJ, Burkhead B, Carloni E, Gasbarrini A, Sepulveda AR. Alterations of DNA mismatch repair proteins and microsatellite instability levels in gastric cancer cell lines. *Lab Invest* 2004; 84: 915-922
- 7 Yashiro M, Carethers JM, Laghi L, Saito K, Slezak P, Jaramillo E, Rubio C, Koizumi K, Hirakawa K, Boland CR. Genetic pathways in the evolution of morphologically distinct colorectal neoplasms. *Cancer Res* 2001; 61: 2676-2683
- 8 Deng G, Peng E, Gum J, Terdiman J, Sleisenger M, Kim YS. Methylation of hMLH1 promoter correlates with the gene silencing with a region-specific manner in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2002; 86: 574-579
- 9 Duval A, Hamelin R. Genetic instability in human mismatch repair deficient cancers. *Ann Genet* 2002; 45: 71-75
- 10 Lu SL, Akiyama Y, Nagasaki H, Saitoh K, Yuasa Y. Mutations of the transforming growth factor-beta

- type II receptor gene and genomic instability in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 216: 452-457
- 11 Modrich P. Mismatch repair, genetic stability, and cancer. *Science* 1994; 266: 1959-1960
- 12 Moskaluk CA, Rumpel CA. Allelic deletion in 11p15 is a common occurrence in esophageal and gastric adenocarcinoma. *Cancer* 1998; 83: 232-239
- 13 Leung WK, Kim JJ, Kim JG, Graham DY, Sepulveda AR. Microsatellite instability in gastric intestinal metaplasia in patients with and without gastric cancer. *Am J Pathol* 2000; 156: 537-543
- 14 Yokozaki H, Yasui W, Tahara E. Genetic and epigenetic changes in stomach cancer. *Int Rev Cytol* 2001; 204: 49-95
- 15 Correa P. Chronic gastritis as a cancer precursor. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1984; 104: 131-136
- 16 Ball CG, Dupre MP, Falck V, Hui S, Kirkpatrick AW, Gao ZH. Sessile serrated polyp mimicry in patients with solitary rectal ulcer syndrome: is there evidence of preneoplastic change? *Arch Pathol Lab Med* 2005; 129: 1037-1040
- 17 Handra-Luca A, Couvelard A, Degott C, Flejou JF. Correlation between patterns of DNA mismatch repair hmlh1 and hmsh2 protein expression and progression of dysplasia in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Virchows Arch* 2004; 444: 235-238
- 18 Chaves P, Cruz C, Lage P, Claro I, Cravo M, Leitao CN, Soares J. Immunohistochemical detection of mismatch repair gene proteins as a useful tool for the identification of colorectal carcinoma with the mutator phenotype. *J Pathol* 2000; 191: 355-360
- 19 Berends MJ, Hollema H, Wu Y, van Der Sluis T, Mensink RG, ten Hoor KA, Sijmons RH, de Vries EG, Pras E, Mourits MJ, Hofstra RM, Buys CH, Kleibeuker JH, van Der Zee AG. MLH1 and MSH2 protein expression as a pre-screening marker in hereditary and non-hereditary endometrial hyperplasia and cancer. *Int J Cancer* 2001; 92: 398-403
- 20 Semba S, Yokozaki H, Yamamoto S, Yasui W, Tahara E. Microsatellite instability in precancerous lesions and adenocarcinomas of the stomach. *Cancer* 1996; 77: 1620-1627
- 21 Kim HS, Woo DK, Bae SI, Kim YI, Kim WH. Microsatellite instability in the adenoma-carcinoma sequence of the stomach. *Lab Invest* 2000; 80: 57-64

■同行评价

本文选取慢性浅表性胃炎, 慢性萎缩性胃炎, 胃腺瘤性息肉, 癌旁组织及胃癌原发灶组织标本, 采用免疫组化方法检测hMLH1蛋白在上述组织中的表达, 结果有一定新意, 对理解胃癌与其癌前病变关系的分子机制有一定科学意义。

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 •

第三届亚洲大洋洲光生物学大会

本刊讯 由亚洲大洋洲光生物学学会发起, 中国生物物理学会光生物学专业委员会负责承办的第三届亚洲大洋洲光生物学大会(<http://www.aosp2006.org.cn/>)定于2006-11-17/20在北京举行. 会议将讨论和交流包括光化学、光物理、光技术、光感应、时间/节律生物学、光合作用、生物与化学发光、光医学、环境光生物学和紫外辐射效应在内的光生物学领域的所有重要进展, 会议还将为与会的光生物学、光医学各个领域的物理学家、化学家、生物学家和临床医生提供相互交流的极好机会. 会议可以办理国家 I 类继续教育学分10学分.

1 会议安排

会议时间: 2006-11-17报到, 18-20日会议; 会议地点: 北京西郊宾馆(五星级), 有关大会报告及15个分会邀请报告的内容请见会议网页<http://www.aosp2006.org.cn/>; 会议工作语言: 英语; 截止日期: (1)论文摘要: 2006-09-15; (2)会前注册: 2006-09-15.

2 会议联系人

投稿摘要: 魏舜仪, 100101, 北京朝阳区大屯路15号中国生物物理学会(电话: 010-64889894; 传真: 010-64889892; E-mail: wsy@moon.ibp.ac.cn). 注册: 王悦, 100101, 北京朝阳区大屯路15号中国生物物理学会(电话: 010-64889894; 传真: 010-64889892; E-mail: wangyue@sun5.ibp.ac.cn).

体表超声判定胃癌生物学行为的意义

张艳华, 郭存丽, 顾秀娟, 潘丽霞

■背景资料

胃癌的治疗观念不断更新, 胃癌患者有一个较准确的术前分期, 对治疗方案的制定有重要的指导价值。经体表超声检查能够判定胃癌的浸润深度、浸润范围及转移情况, 为胃癌的术前分期诊断提供依据。

张艳华, 郭存丽, 顾秀娟, 潘丽霞, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院超声科 黑龙江省哈尔滨市 150040

张艳华, 1985年哈尔滨医科大学本科毕业, 2000年哈尔滨医科大学硕士研究生毕业, 副教授, 主要从事腹部肿瘤的超声诊断。

通讯作者: 张艳华, 150040, 黑龙江省哈尔滨市哈平路150号, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院超声科. haibindai@hotmail.com

电话: 0451-86298203

收稿日期: 2006-03-02 接受日期: 2006-03-29

Value of transabdominal ultrasonography in investigating biological action of gastric carcinoma

Yan-Hua Zhang, Cun-Li Guo, Xiu-Juan Gu, Li-Xia Pan

Yan-Hua Zhang, Cun-Li Guo, Xiu-Juan Gu, Li-Xia Pan, Department of Ultrasonography, Tumor Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Dr. Yan-Hua Zhang, Department of Ultrasonography, Tumor Hospital of Harbin Medical University, 150 Haping Road, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China. haibindai@hotmail.com

Received: 2006-03-02 Accepted: 2006-03-29

Abstract

AIM: To investigate the clinical value of transabdominal color Doppler ultrasound (TAS-CD) in judging the biological action of gastric carcinoma.

METHODS: TAS-CD was performed in 102 patients with gastric cancer, and the results were comparatively analyzed with the pathological changes after operation.

RESULTS: The accuracy rates of TAS-CD were 80.4% and 67.6% in determining the depth and range of gastric cancer invasion, respectively, and the accuracy rates were 60%, 87.7%, 81.4% and 100% in judging the T₁-T₄ stages for gastric carcinoma. The accuracy rates were 79.4% and 47.4% in diagnosing the tumor with the diameter of less than or equal to 6.0 cm and more than 6.0. The specificities of TAS-CD in determination of liver and ovarian metastasis, ascites pancreatic infiltration were all 100%, and the accuracy in the diagnosis of lymphatic metastasis was 74.6%.

■研究前沿

胃癌已从定性诊断发展到定量诊断, 胃癌的定量诊断是本领域中的研究热点, 而胃癌的十二指肠、横结肠系膜及大网膜浸润的超声诊断亟待探讨。

CONCLUSION: TAS-CD is useful in determining some biological action and T staging of gastric carcinoma before operation.

Key Words: Color Doppler ultrasound; Gastric cancer; Depth of invasion; Range of invasion

Zhang YH, Guo CL, Gu XJ, Pan LX. Value of transabdominal ultrasonography in investigating biological action of gastric carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(21):2098-2101

摘要

目的: 探讨体表超声对胃癌的某些生物学行为判定的价值及临床意义。

方法: 胃癌患者102例术前进行超声检查并与手术病理进行对比分析。

结果: 体表超声对胃癌浸润深度及浸润范围的判定与术后病理的符合率分别为80.4%和67.6%。其中对浸润深度T₁-T₄各期判断符合率分别为60%, 87.7%, 81.4%和100%; 对胃壁浸润范围≤6.0 cm和>6.0 cm判断符合率分别为79.7%和47.4%, 对肝、卵巢转移, 腹水及胰腺浸润的诊断符合率均为100%, 胃周淋巴结转移的诊断符合率为74.6%。

结论: 体表超声能判定胃癌的某些生物学行为, 为胃癌的术前分期提供重要依据。

关键词: 超声检查; 胃癌; 浸润深度; 浸润范围

张艳华, 郭存丽, 顾秀娟, 潘丽霞. 体表超声判定胃癌生物学行为的意义. 世界华人消化杂志 2006;14(21):2098-2101

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2098.asp>

0 引言

近年来, 对胃癌生物学行为的研究已被国内外学者重视^[1-10]. 外科医师只有正确掌握胃癌病灶的生物学特性及进展程度, 才能正确估计胃癌的恶性程度, 准确分期, 选择最佳治疗方案, 以达到个性化治疗的目的. 现就102例胃癌的超声诊断及某些生物学行为的判断与手术病理对照如下。

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌患者102例均为住院手术患者, 均经术前超声检查、胃镜检查并活检确诊, 术后病理证实。男73例, 女29例, 年龄31-77(平均56.4)岁。使用飞利浦HDI-5000, GE LOGIQ 9型超声诊断仪, 探头频率为C4-2, C5-2超宽频带探头。

1.2 方法 患者禁食水12 h。首先平卧位, 观察腹段食道至贲门、胃体窦部、胃周及腹主动脉旁淋巴结、肝脾、胰腺、卵巢等脏器有无异常改变。肝肾隐窝及盆腔肠间隙是否有液性暗区, 再饮水400-800 mL内加入胃B超快速显像剂10 mL, 使胃腔适度充盈。采用平卧位、半卧位、左右斜卧位、坐位、站立位, 在中上腹部, 胃的体表投影区纵横斜切面扫查, 连续滑动探头, 侧动探头及旋转探头扫查。根据不同部位的病灶随时调整相应体位和扫查切面, 以达到图像清晰显示。顺次观察贲门、胃底、胃体、窦部和幽门管、十二指肠、胃周淋巴结及邻近器官。对病变部位, 先观察病变中央部位的胃壁层次结构改变, 判定浸润深度, 而后移动探头渐向浸润边缘部观察, 直至显示正常胃壁结构为止, 测量上下边界距离, 判定浸润范围大小, 超声测量与手术病理对照, 误差在1.5 cm以内, 判定为符合。所有患者的超声检查均由同一人完成, 检查结果需经2名以上医生评定。

统计学处理 样本数据采用mean±SD表示, 组间比较采用t检验。

2 结果

适量饮水后, 正常胃腔充盈良好, 胃壁厚度5 mm左右, 胃壁在声像图上分为5层结构。1, 3, 5层为高回声, 分别为黏膜层, 黏膜下层和浆膜层; 2, 4层为低回声, 分别为黏膜肌层和肌层。这与胃壁组织结构相符合(图1A)。根据国际TNM分期将胃癌的浸润深度分为4期^[11]。(1)肿瘤侵入黏膜层或黏膜下层(T_1): 表现为1-3层结构破坏, 多呈低回声改变, 第3层变薄或稍增厚, 但仍见其连续性(图1B), 胃壁蠕动局部减弱或正常;(2)肿瘤侵入肌层或浆膜下(T_2): 表现为1-4层结构破坏, 层次不清, 大多呈低回声改变, 少数呈等回声改变, 第5层强回声厚度正常或稍增厚, 连续性完整(图1C), 胃壁蠕动明显减弱或消失;(3)肿瘤穿透浆膜层, 但未达相邻器官(T_3): 表现为1-5层结构完全破坏, 第5层强回声不清晰, 不平整, 呈不规则增厚, 胃壁呈等回声或低回声改变(图1D), 胃壁蠕动完全消失;(4)肿瘤穿透浆膜层

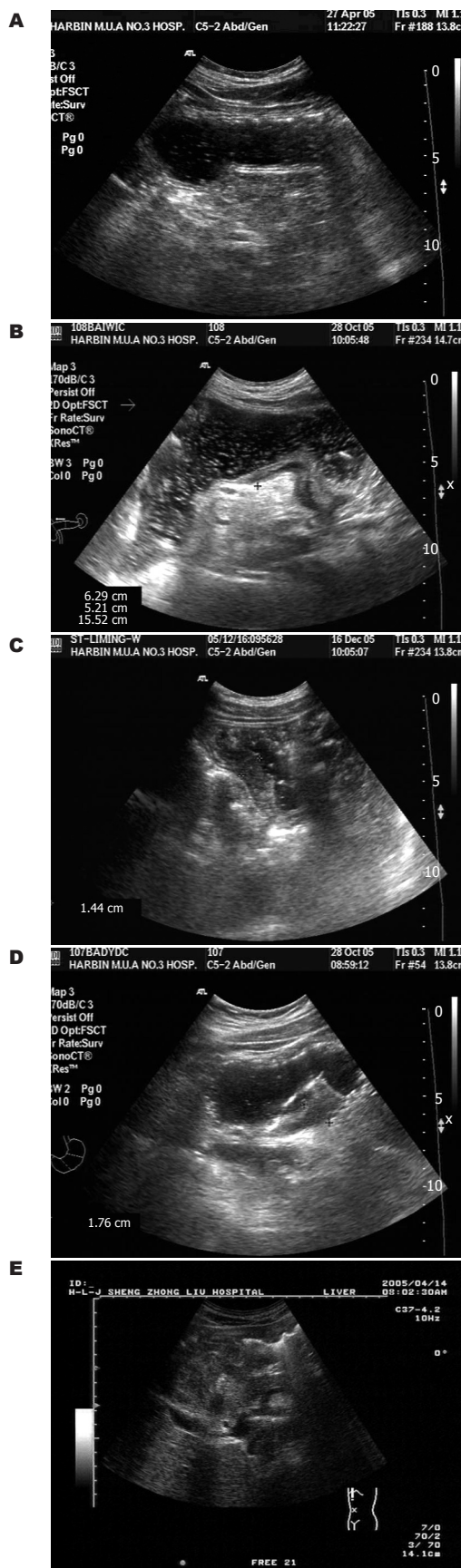


图1 胃癌体表超声诊断。A: 正常胃壁; B: 侵入黏膜层或黏膜下层1-3层结构破坏; C: 侵入肌层或浆膜下1-4层结构破坏; D: 肿瘤穿透浆膜层1-5层结构完全破坏; E: 突出浆膜层高回声带侵入胰腺并与之分界不清。

■创新盘点

胃癌随着浸润深度的增深, 胃壁厚度有增加的趋势, 但统计结果显示, 单纯依据胃壁厚度来推断浸润深度, 其结果并不可靠; 胃癌浸润范围的判定, 当浸润范围≤6.0 cm有一定意义, 当浸润范围>6.0 cm时其价值有限; 超声对转移及周围累及的诊断无假阳性, 只有假阴性。

■应用要点

体表超声判定胃癌生物学行为能够使胃癌患者术前准确分期, 确定手术切除范围, 选择最佳治疗方案, 以达到个性化治疗的目的。

表 1 体表超声胃癌102例胃壁浸润深度与手术病理对照

病理分期	n	超声浸润深度				超声诊断符合率(%)
		UT1	UT2	UT3	UT4	
PT ₁	20	12	6	2	0	60.0
PT ₂	16	2	14	0	0	87.7
PT ₃	54	0	10	44	0	81.4
PT ₄	12	0	0	0	12	100
合计	102	14	30	46	12	80.4

表 2 体表超声胃癌102例胃壁浸润范围与手术病理对照

病理范围(cm)	n	超声浸润范围		
		符合	不符合	符合率(%)
≤6	64	51	13	79.7
>6	38	18	20	47.4
合计	102	69	33	67.6

表 3 体表超声胃癌102例T1-T4各期胃壁平均厚度差别

期别	n	胃壁平均厚度(mm)
T1	20	10.80 ± 2.15 (8-14)
T2	16	11.0 ± 3.25 (8-15)
T3	54	16.82 ± 3.34 (10-22) ^{bd}
T4	12	20.33 ± 6.02 (12-28) ^b

^bP<0.01 vs T1; ^dP<0.01 vs T2, T4.

并侵犯相邻器官(T₄): 除T₃表现外, 肿瘤突出浆膜层高回声带侵入邻近器官并与之分界不清(图1E), 相应部位出现团块状低回声, 等回声改变。

本组102例胃癌, 胃壁浸润深度经体表超声与手术病理诊断符合率为80.4%(表1)。胃壁浸润范围经体表超声与手术病理诊断符合率为67.6%, 浸润范围≤6 cm, 诊断符合率为79.7%, 浸润范围>6 cm, 诊断符合率为47.4%(表2)。分析102例胃癌T₁-T₄各期胃壁平均厚度结果的比较, T₁与T₂无显著性差异($t = 0.15$, $P > 0.05$), T₁与T₃, T₄有显著性差异($t_{1,3} = 5.97$, $t_{1,4} = 4.63$, P 均<0.01); T₂与T₃, T₄有显著性差异($t_{2,3} = 4.58$, $t_{2,4} = 7.78$, P 均<0.01, 表3)。胃周浸润及转移超声与手术病理对照(表4)。分析T₄期12例胃癌患者经体表超声对胰腺和肝脏浸润转移、对卵巢转移和腹水的诊断符合率高达100%; 而与十二指肠、横结肠及大网膜的浸润缺乏特征性的声像图表现, 有待进一步探讨。正常胃周及腹膜后淋巴结超声图像不能显示。肿大的淋巴结表现为大小不等的圆形, 椭圆形低回声, 边界清。直径1.0-2.0 cm不等, 有的相互融合成较大的低回声团块。本组检出的淋巴结为74.6%(50/67), 高于以往文献[12-16]报道。超声对转移及周围累及的诊断无假阳性, 只有假阴性。

3 讨论

胃壁的5层结构是超声判定胃癌浸润深度的基础^[17]。胃癌的病理改变是从黏膜层开始的, 逐渐侵及黏膜下层, 肌层及浆膜层致胃壁不同程度的增厚, 各层结构相应消失。在检查中, 要重视对第3层和第5层高回声连续性完整的观察。如第3层高回声因癌肿浸润而断裂, 则表明侵入肌层为进展期癌。第5层强回声表现为增厚, 不平整断裂并局部胃壁蠕动消失, 则表明胃癌侵入浆膜外。因此, 仔细观察胃壁层次的变化及连续性极为重要, 他是判断肿瘤浸润深度的关键。随

着浸润深度的加深, 胃壁厚度也有增加的趋势(表3)。早期癌(T₁)与进展期癌(T₃, T₄)的胃壁厚度均数间有显著性差异(P 均<0.01); 但早期癌与进展期癌侵及肌层之间的胃壁厚度均数间无显著性差异; 进展期癌侵及肌层与浆膜层之间有显著性差异($P < 0.01$); 肿瘤穿透浆膜层、未侵及邻近器官和侵及邻近器官之间的胃壁厚度均数间有显著性差异($P < 0.05$)。统计结果显示, 单纯依据胃壁厚度来推断浸润深度, 其结果并不可靠。经体表超声可依据横切时胃角两边的胃腔(胃窦和胃体)切面构成的“双环征”作为胃癌病变的定位标志^[18]。本组胃癌浸润范围≤6 cm, 诊断符合率为79.7%; 浸润范围>6.0 cm, 诊断符合率为47.4%。分析原因: 由于较大范围的肿瘤, 受超声切面的限制, 不易展示全貌, 难以准确测量其大小; 癌旁组织的纤维化及炎细胞浸润, 导致病变范围测量过大; 患者胃肠道气体干扰及检查者的操作经验等原因也是导致胃壁浸润范围判定失误的因素之一^[19]。我们认为, 体表超声在判定胃癌胃壁浸润范围方面, 当浸润范围≤6.0 cm有一定意义, 当浸润范围>6.0 cm时其价值有限, 此时, 应根据X线及内镜检查来确定病变范围。

当胃癌肿块侵出浆膜层时, 应注意观察肿块与相邻脏器的分界面, 可利用呼吸运动、变换体位和外界推动力^[13], 有癌肿浸润时, 脏器与肿块界面声像模糊, 分界不清, 二者黏连不移动; 严重受侵时, 被侵犯脏器内部结构破坏, 二者融合成一体。本组7例胰腺受侵, 超声均作出正确

表 4 体表超声胃癌102例患者胃周浸润及转移与手术病理对照

	肝脏	胰腺	横结肠系膜	大网膜	十二指肠	淋巴结	卵巢	腹水	合计
超声	5	7	0	0	0	50	3	12	77
病理	5	7	2	9	3	67	3	12	108
超声检出率(%)	100	100	0	0	0	74.6	100	100	71.3

诊断;而与十二指肠、横结肠及大网膜的浸润,本组无一例诊断正确,其声像图特征有待进一步探讨。本组5例肝转移,3例卵巢转移,7例胰腺受侵及12例腹水,超声均诊断正确。超声在检查肝转移、卵巢转移、胰腺受侵、腹水方面的作用是公认的^[20-25]。实际上超声检出转移与腹水不足于此,一些病例由于转移较广,已失去手术机会,采取了其他的治疗方法,本组没有包括在内。胃周淋巴结肿大表现为圆形或椭圆形低回声结节,部分可融合成团,本组淋巴结检出率为74.6%(50/67)。超声不仅能直接显示肿大淋巴结的图像,而且能判定其部位。对淋巴结转移的程度和胃癌的分期诊断提供依据。

胃癌同其他恶性肿瘤一样,其主要的生物学特征之一,是具有向周围组织浸润扩展的能力,并能通过淋巴管和血管向远隔部位转移,形成转移癌^[26]。本结果表明,体表超声对胃癌胃壁浸润深度的判定符合率较高,对胰腺的浸润、肝转移、卵巢转移、腹水及淋巴结的转移,也有较高的显示率,对胃癌浸润范围的确定应结合X线及内镜检查,以此为胃癌患者术前准确分期,确定手术切除范围,选择最佳治疗方案,以达到个性化治疗的目的。

4 参考文献

- 李月春, 伍晓汀. 胃癌病理学与生物学特征的关系. 中国普外基础与临床杂志 2006; 13: 120-122
- 于吉人, 刘小孙, 张卿, 舒国通. 弥漫浸润型胃癌生物学行为及临床意义. 浙江预防医学 2004; 16: 11-12
- 程水良, 赵红刚. 胃癌的病理形态与浸润深度的关系. 咸宁学院学报(医学版) 2004; 18: 27-29
- Teicher BA, Holden SA, Ara G, Sotomayor EA, Huang ZD, Chen YN, Brem H. Potentiation of cytotoxic cancer therapies by TNP-470 alone and with other anti-angiogenic agents. *Int J Cancer* 1994; 57: 920-925
- He L, Wang J, Shan Y. Expression and significance of PTEN and Survivin between the primary foci and the lymph node metastases foci of laryngeal squamous cell carcinoma. *Linchuan Erbiyanhouke Zazhi* 2005; 19: 412-4, 416
- Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA. General mechanisms of metastasis. *Cancer* 1997; 80: 1529-1537
- Cai XM, Tao BB, Wang LY, Liang YL, Jin JW, Yang Y, Hu YL, Zha XL. Protein phosphatase activity of PTEN inhibited the invasion of glioma cells with epidermal growth factor receptor mutation type III expression. *Int J Cancer* 2005; 117: 905-912
- 王升, 吴本俨, 尤纬缔. 胃癌组织血管内皮生长因子表达对胃癌生物学行为的影响. 世界华人消化杂志 2005; 13: 716-719
- 黄庆兴, 鲍民生. 胃癌组织中CD105和CD31的表达及其与胃癌生物学行为的关系. 肿瘤研究与临床 2006; 18: 87-89
- 许静洪, 魏晓丽, 张晓华. 胃癌相关基因表达与其生物学行为关系研究. 山东医药 2004; 44: 8-9
- 裘法祖. 外科学. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 448-449
- 孟敏坤, 刘桂梅. 应用B型超声诊断胃癌淋巴结转移的研究. 中国超声医学杂志 2001; 17: 130-132
- 严超, 朱正纲, 詹维伟, 燕敏, 于颖彦, 刘炳亚, 尹浩然, 林言箴. 经腹超声检查对胃癌术前评估的价值. 中华胃肠外科杂志 2005; 8: 121-124
- Willis S, Truong S, Gribnitz S, Fass J, Schumpelick V. Endoscopic ultrasonography in the preoperative staging of gastric cancer: accuracy and impact on surgical therapy. *Surg Endosc* 2000; 14: 951-954
- 蔡叶萍, 高晓军. 彩色多普勒超声对胃癌淋巴结转移的诊断. 中国超声诊断杂志 2003; 4: 278-279
- 杨伟国, 严超, 朱正纲, 诸琦, 燕敏, 陈军, 刘炳亚, 尹浩然, 林言箴. 内镜超声检查对胃癌浸润深度淋巴结状况和可切除术前评估的价值. 中国误诊学杂志 2004; 4: 4-6
- 刘栋文, 青建芳. 高分辨力彩超和组织谐波检测胃内肿块的临床应用价值. 医学影像学杂志 2005; 15: 919-920
- 张艳华, 隋慧珍, 张国柱, 彭春花. 超声检查对胃癌某些生物学行为判断的意义. 中国医学影像技术 1997; 13: 61-63
- 湛玉华, 黄宜定, 涂小安. 超声对胃溃疡和胃癌诊断与内镜病理对照观察. 中国超声诊断杂志 2005; 6: 225-226
- 赵平, 金桂龙, 蒋阳平. 彩色多普勒血流显像对胃癌术前分期的价值. 肿瘤学杂志 2002; 8: 150-151
- 薛改琴, 陈敏华. 超声对胃肠道恶性肿瘤继发卵巢转移癌的诊断价值. 中国超声医学杂志 2002; 18: 946-948
- Fujiwara K, Ohishi Y, Koike H, Sawada S, Moriya T, Kohno I. Clinical implications of metastases to the ovary. *Gynecol Oncol* 1995; 59: 124-128
- Cho JY, Seong CK, Kim SH. Krukenberg tumor findings at color and power Doppler US; correlation with findings at CT, MR imaging, and pathology. Case reports. *Acta Radiol* 1998; 39: 327-329
- 王碧珍, 朱素琼. 超声对卵巢转移性印戒细胞瘤的诊断及临床价值. 中国临床医学影像杂志 2001; 12: 37-39
- 任刚摘. 超声内镜检测胃癌患者中腹水和预测腹膜转移的准确性. 国际肿瘤学杂志 2006; 33: 232
- 刘中宏, 李春明, 王秀江, 龙培滨. 胃癌微转移基因检测的临床应用. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2033-2035

电编 张敏 编辑 潘伯荣

■同行评价

本文选题具有实用性, 研究结果具有一定学术价值. 研究方案设计合理, 文字流畅, 表达准确, 可读性强.

胃癌相关基因在癌前病变中的表达

凌霄华, 汪丽燕, 关景明, 刘颖, 于欣

■背景资料

为提高早期胃癌的发现率, 增强对胃癌的早期发现意识, 研究胃黏膜在胃癌发生之前的一系列病变、胃癌相关基因在癌前病变中的表达及基因改变在癌变过程中的作用是非常重要的, 可以从分子水平揭开胃黏膜癌变的本质。

凌霄华, 汪丽燕, 关景明, 刘颖, 于欣, 哈尔滨医科大学附属第四医院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150001
黑龙江省科技厅公关课题, No. GB01C12403
通讯作者: 凌霄华, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第四医院消化内科. lingxh2004@yahoo.com.cn
电话: 0451-82576753
收稿日期: 2006-04-03 接受日期: 2006-05-22

摘要

目前认为癌的形成过程是多阶段、多过程的, 包括多个连续的独立的事件, 是多个遗传物质即基因积累改变的结果. 与胃癌发生、发展有关的基因有3种: 癌基因、抑癌基因、程序死亡基因. 原癌基因的激活和抑癌基因的失活可使细胞增生, 程序死亡基因的失活可能使细胞永生, 在胃癌的发生、发展的各个阶段, 至少有两种以上的基因突变, 他们各自发挥不同作用. 研究胃癌相关基因在癌前病变中的表达, 总结基因改变在癌变过程中的作用和地位, 可以从分子水平揭开胃黏膜癌变的本质, 进而明确胃癌发生、发展的分子机制。

关键词: 胃癌; 相关基因; 癌前病变; 表达

凌霄华, 汪丽燕, 关景明, 刘颖, 于欣. 胃癌相关基因在癌前病变中的表达. 世界华人消化杂志 2006;14(21):2102-2105
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2102.asp>

0 引言

为了增强对胃癌的早期发现意识, 提高早期胃癌的发现率, 研究胃黏膜在发生胃癌之前的一系列病变是非常重要的. 了解和掌握胃黏膜的癌前病变, 进而处理好这类病变成为降低胃癌发病率方面的一个重要的环节. 目前认为胃黏膜细胞癌变常历经浅表性胃炎——萎缩性胃炎/肠化生——不典型增生——腺癌等阶段^[1]. 常把肠化生, 不典型增生视为癌前病变. 在胃黏膜上皮癌变过程中的不同病理阶段, 常伴有遗传物质的改变, 如杂合缺失、AI、基因扩增、转移、甲基化的改变等. 胃癌相关基因在癌前病变中的表达已成为目前研究的热点. 胃癌的前体可以区分为2个类别: 癌前状态(precancerous conditions)和癌前病变(preneoplastic lesions). 癌

前状态是一个临床概念, 由此可导致胃癌的发病率较正常人群高; 而癌前病变是个病理概念, 是经过病理检查诊断的特定的组织学改变, 在此基础上可逐渐演变发展成胃癌. 胃癌的癌前病变包括: 胃黏膜上皮异型增生; 胃黏膜肠上皮化生. 常见的胃癌前状态包括: 慢性萎缩性胃炎、恶性贫血、慢性胃溃疡、胃息肉、残胃、Menetrier病等. 癌前状态与癌前病变具有不同的含义, 但二者又有密不可分的联系. 因为癌前病变很多都是发生在具有癌前状态的胃黏膜, 例如慢性萎缩性胃炎属于癌前状态, 而萎缩性胃炎时的上皮细胞异型增生则属于癌前病变. 无论是癌前病变或癌前状态, 都有发展成胃癌的可能, 但并非所有的癌前病变都能发展成胃癌, 有的可能在其进程中停止了发展, 也可能发生逆转而消失. 可以认为胃癌临床前期到临床期胃癌的形成过程是多基因变异积累的过程。

1 癌基因、抑癌基因和程序死亡基因

目前认为癌的形成过程是多阶段、多过程的, 包括多个连续的独立的事件, 是多个遗传物质即基因积累改变的结果. 与胃癌发生、发展有关的基因有3种: 第1种是癌基因如*ras*, *myc*; 第2种是抑癌基因如*p53*, *APC*, *p16*, *MCC*; 第3种是程序死亡基因如*bcl-2*等。

1.1 *ras*基因 *ras*癌基因家庭包括同源的*Ha-ras*, *Ki-ras*和*N-ras*, 均编码分子量为21 kDa结构相近的P21^{ras}蛋白, 人类正常细胞中的*ras*癌基因对细胞内的代谢、生长、分裂具有重要作用. *ras*基因的激活能启动和加速细胞的生长、增殖, 以至造成细胞的恶性转化. *c-ras*^K定位于人类第12号染色体, *c-ras*^H定位于人类11号染色体11q¹³. 人类肿瘤中*ras*p21基因突变位点均于第12, 13, 61位密码子, *ras*基因的点突变常见于人类肿瘤和癌前病变^[2-4]. P21^{ras}蛋白在胃各级病变中包括正常胃黏膜均有表达^[5]. 文献报道, 采用免疫组化S-P法, 检测P21蛋白在胃癌和胃癌前病变中的表达, 得P21^{ras}蛋白在慢性浅表性胃炎、异型增生、胃癌中阳性率分别为10% (2/10), 20%

(4/20), 52.5% (21/40), 差异有显著性($P<0.05$). 研究表明, 在胃癌前病变中, 不典型增生程度与P21表达量密切相关, 说明*ras*基因的激活在癌变过程中起重要作用, 而随增生程度的加重, 其作用逐渐增强. 免疫酶标法检测发现胃癌P21阳性率高达82%, 胃良性病变只有35%, 正常胃黏膜均为阴性. 免疫酶标技术检测胃肠道脱落细胞P21发现恶性肿瘤全部阳性, 良性病变阳性率不到10%, Viola *et al*^[3]认为P21^{ras}表达有希望作为癌变早期诊断的一个标志物.

1.2 *c-myc* *c-myc*癌基因最早于禽类骨髓瘤病毒MC29中发现, 定位于人第8号染色体的长臂上8q24, 编码一种439个氨基酸, 分子量为62 kDa的核蛋白即癌基因蛋白, 简称P62^{c-myc}, 它具有结合DNA的功能^[6], 其转录活性具有细胞特异性调节作用; 具有促进增殖和诱导凋亡的双重作用, 其作用的选择是由其他的因子和存在或刺激后决定. 应用抗*c-myc*癌基因蛋白P62^{c-myc}的单抗采用免疫组化ABC法对正常胃黏膜, 胃黏膜异型增生及胃癌进行标记, 发现正常胃黏膜腺体颈周区域偶*c-myc*基因蛋白的弱阳性表达, 而有黏膜异型增生则有较高的表达率, 在轻、中、重度异型增生中的阳性率分别为70%, 100%, 71.4%, 一旦胃黏膜癌变后, 表达率有所下降, 在早期及进展期胃癌中的阳性率分别为38.9%和73.3%. 这表明在不典型增生病变中, 已有相当病例在基因水平上已发生了改变. 文献报道, *c-myc*癌基因表达水平涉及细胞的增殖, 与细胞分裂速率密切相关. *c-myc*癌基因的活化可能是癌变的前提条件之一^[7]. 另外, *c-myc*癌基因高表达也存在于其他肿瘤如乳腺癌与乳腺纤维腺囊束性增生症的研究; 前列腺癌分前列腺良性肥大症以及大肠癌分大肠息肉的研究.

1.3 *APC*基因 *APC*基因最初是在结肠腺瘤性息肉(denomatour polyposis coli)患者中发现的^[8], 并以此命名, *APC*基因定位于染色体5q21-22. *APC*基因突变将引起编码蛋白异常, 进一步导致细胞的黏附、生长、分化增生及凋亡的重要改变, 应用光镜及电镜原位杂交对胃癌前病变*APC*基因进行细胞和超水平观察, 发现*APC*基因的阳性率以正常黏膜最高为83.3%. 轻中、轻、重异型增生分别为77.8%, 67.%, 25.9%, 重度者明显低于前两者, 癌组织则更低, 为6.7%-8.2%. 肠上皮化生中, *APC*基因阳性率大肠型高于小肠型, 不完全性高于完全性, 大肠型不完全性最高; 电镜下*APC*基因杂交信号位于正常胃黏膜壁细胞, 异

型增生及癌细胞胞质基质内, 其信号逐渐减弱直至阳性. 这说明*APC*基因表达异常重要位于胃癌前病变——重度异型增生上皮中, 系胃癌发生过程中的早期事件^[9]. *APC*基因LOH即可见于早期癌. 研究发现, 犬胃黏膜肠化生阶段即有*APC*蛋白异常表达. 检测胃黏膜*APC*基因可预测其癌变倾向, 有助于胃癌早期发现.

1.4 *p53*基因 *p53*基因定位于人的17p染色体, 全长16-20 kb, 有11个外显子. 正常的*p53*基因为野生型, 发生变异者为突变体. *p53*基因是因其蛋白质产物分子质量命名的, 他的产物是53 kDa的核磷酸蛋白. *p53*基因监护细胞基因的完整性如DNA受损(尤其是G₁期). P53蛋白累积、复制、停止, 以利于DNA修复. 如果修复失败则*p53*基因引导凋亡程序使细胞“自杀”, 阻止其向恶性转化. 野生型*p53*基因过量表达可阻断细胞周期的进程. *p53*基因异常在胃癌形成过程中起着重要作用, 其异常表达出现在胃黏膜癌变的早期阶段^[10], 贯穿于癌变过程. 正常黏膜上皮无P53蛋白表达, 慢性浅表性胃炎偶见散在的弱阳性表达萎缩性胃炎、轻度不典型增生、胃腺癌有程度不同的P53蛋白的表达, 表达率随病变加重而增高; 基因异常广泛表达可出现于胃癌前病变——不典型增生的上皮中, 不出现于小肠上皮化生的一般慢性萎缩性胃炎中, 即他可能是胃癌前病变的晚期标志物之一. *p53*基因的突变以等位基因丢失、颠换、转损为主, 导致误义发生. 突变*p53*基因不但丧失了其抑癌活性, 而且具有促进恶性转化的功能. *p53*突变率在肠化、不典型增生、胃癌分别为37.1% (3/8), 42.1% (8/19), 53.2% (16/30), 正常组织, 浅表胃炎未发现*p53*突变. 多数研究报告认为*p53* exon5-8在胃癌中的突变率为27%-60% (2/9)^[11-13], 突变型可有G: C→A: T. 研究表明*p53*基因与多种肿瘤有关, 如肝癌、乳腺癌、膀胱癌、结肠癌. Uchino *et al*^[14]认为免疫组化染色检查*p53*可作为鉴别胃正常黏膜癌前组织和癌组织的常规方法, 但也有人认为尚为时过早.

1.5 *p16*基因 *p16*基因又称MTS1 (multiple tumor suppressor 1)或CDK4I (cdk4 inhibitor), 定位于人9号染色体的p21区域, 由3个外显子和2个内含子组成, 全长8.5 kb, 外显子又是*p16*基因最常发生改变的部位^[15]. 肿瘤抑制基因*p16*的抑癌作用在于他抑制了细胞从G₁-S期转变, 在此过程中起关键作用的是CDK4的功能, *p16*基因以多种机制参与肿瘤的发生, 纯合性缺失、启动子区甲基

■同行评价

本文全面综述了胃癌相关基因在癌前病变中的表达, 有一定意义.

化、转录后调节等^[16]。文献报道, P16蛋白在正常胃黏膜上皮中呈高表达86.6% (13/15), 随着病变的发展, 表达率呈下降趋势, 表现为程度不同的蛋白水平表达缺失, 这种P16蛋白表达水平的降低以不典型增生病变最为明显, 表达率达31.8% (7/12), 至癌阶段略有回升, 但较正常上皮, 浅表性胃炎和萎缩性胃炎比仍呈明显的低表达状态。吕有勇 *et al*^[17]采用PCR, Southern杂交技术对胃癌组织的研究发现, 胃癌组织中有较高的p16基因缺失, 指出p16基因缺失与胃癌形成密切相关, 是胃黏膜癌变常见的并且是出现较早的分子学异常。

1.6 MCC基因 MCC基因即结肠癌突变基因 (mutated in colonectal cancer), 同APC基因一样也位于5q21, 仅与APC基因相隔15 kb, 胃癌组MCC基因可能在胃癌的早期发生阶段起作用, 采用细胞分选技术检测异倍体胃癌细胞MCC基因COH, 发现其位信息个体均存在COH, 认为MCC基因COH是胃癌最常见的基因改变之一, 是胃肠肿瘤发生的早期改变, 在胃癌前病变中的表达及突变, 目前未见具体报道。

1.7 bcl-2基因 bcl-2基因定位于线粒体, 内质网和核膜上, 是目前公认的抗凋亡基因, 其对细胞凋亡有明显的负性调节作用^[18]。其过度表达是通过t (14:18)染色体易位^[19-20], 有研究显示bcl-2基因与胃癌密切相关^[21]。慢性浅表性胃炎, bcl-2阳性表达率最低10.00% (2/20), 随着病变程度的演变和进展, bcl-2阳性逐渐增强, 肠上皮化生bcl-2阳性率33.33% (14/22), 异型增生58.22% (20/34), 胃癌80.26% (61/76), 在肠化生、异型增生已有bcl-2异常表达, 意味着胃癌变的早期阶段已出现bcl-2调节的失控, 这为应用基因逆转癌变过程提供了理论依据。bcl-2在胃黏膜正常上皮癌前病变和早期胃癌中的不同表达说明, bcl-2基因在胃黏膜上皮癌变中起着重要作用, 其机制可能不是加速细胞有丝分裂, 而是通过抑制细胞死亡, 延长细胞生命而使细胞数量增多, 导致肿瘤发生的^[22]。

2 胃癌相关基因在胃癌前病变中表达的意义

从遗传学的角度讲, 胃癌是一种基因病, 胃癌的发生不是单个基因突变的结果, 是瘤细胞单克隆性扩增的结果; 是机体免疫监视功能丧失的结果; 是一个长期的分阶段的、多种基因突变的结果。原癌基因的激活和抑癌基因的失活可使细胞增生, 程序死亡基因的失活可能使细胞

永生, 在胃癌的发生、发展的各个阶段, 至少有2种以上的基因突变, 他们各自发挥不同作用, 不同功能的基因突变对细胞产生的影响是相互关联的, 他们在时间上相继发生, 在空间上相互配合、协调地加快了转化过程, 在其他致癌因素作用下而致癌^[23-24]。以上基因产物的表达异常与胃黏膜癌变相关, 观察不同病理阶段胃黏膜的各种基因的表达, 将进一步明确胃癌发病机制; 确立癌基因在染色体的定位和染色体畸变的恒定性, 与胃癌发生、发展的关系, 将有助于应用遗传学的方法, 为肿瘤的早期诊断提供依据^[25]; 对抗癌基因研究的深化, 也有希望通过近代生物医学的手段, 在胃癌的研究上做出新的贡献; 把胃癌的分子学研究的新成果逐步推广于临床, 有助胃癌的早期诊断。随着基因技术的普及和方法的改进, 基因诊断技术将成为今后肿瘤早期诊断的重要手段之一。对于胃癌相关基因在胃癌前病变中表达的研究成果的实际应用, 对于胃癌的防治将有广阔的前景。

3 参考文献

- 1 El-Zimaity HM, Ota H, Graham DY, Akamatsu T, Katsuyama T. Patterns of gastric atrophy in intestinal type gastric carcinoma. *Cancer* 2002; 94: 1428-1436
- 2 Hand PH, Thor A, Wunderlich D, Muraro R, Caruso A, Schlom J. Monoclonal antibodies of predefined specificity detect activated ras gene expression in human mammary and colon carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 5227-5231
- 3 Viola MV, Fromowitz F, Oravez S, Deb S, Finkel G, Lundy J, Hand P, Thor A, Schlom J. Expression of ras oncogene p21 in prostate cancer. *N Engl J Med* 1986; 314: 133-137
- 4 Spandidos DA, Kerr IB. Elevated expression of the human ras oncogene family in premalignant and malignant tumours of the colorectum. *Br J Cancer* 1984; 49: 681-688
- 5 Carneiro F, David L, Sunkel C, Lopes C, Sobrinho-Simoes M. Immunohistochemical analysis of ras oncogene p21 product in human gastric carcinomas and their adjacent mucosas. *Pathol Res Pract* 1992; 188: 263-272
- 6 Neel BG, Jhanwar SC, Chaganti RS, Hayward WS. Two human c-onc genes are located on the long arm of chromosome 8. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 7842-7846
- 7 陈方宏. RNA-RNA原位杂交检测人肝癌C-myc和H-ras基因的表达. *肿瘤* 1991; 11: 193-194
- 8 Hamilton SR. Molecular genetics of colorectal carcinoma. *Cancer* 1992; 70: 1216-1221
- 9 Horii A, Nakatsuru S, Miyoshi Y, Ichii S, Nagase H, Kato Y, Yanagisawa A, Nakamura Y. The APC gene, responsible for familial adenomatous polyposis, is mutated in human gastric cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 3231-3233

- 10 Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 75: 805-816
- 11 Tamura G, Kihana T, Nomura K, Terada M, Sugimura T, Hirohashi S. Detection of frequent p53 gene mutations in primary gastric cancer by cell sorting and polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism analysis. *Cancer Res* 1991; 51: 3056-3058
- 12 Tohdo H, Yokozaki H, Haruma K, Kajiya G, Tahara E. p53 gene mutations in gastric adenomas. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1993; 63: 191-195
- 13 Yokozaki H, Kuniyasu H, Kitadai Y, Nishimura K, Todo H, Ayhan A, Yasui W, Ito H, Tahara E. p53 point mutations in primary human gastric carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 1992; 119: 67-70
- 14 Uchino S, Noguchi M, Hirota T, Itabashi M, Saito T, Kobayashi M, Hirohashi S. High incidence of nuclear accumulation of p53 protein in gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol* 1992; 22: 225-231
- 15 Aagaard L, Lukas J, Bartkova J, Kjerulff AA, Strauss M, Bartek J. Aberrations of p16Ink4 and retinoblastoma tumour-suppressor genes occur in distinct sub-sets of human cancer cell lines. *Int J Cancer* 1995; 61: 115-120
- 16 Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 1995; 55: 4525-4530
- 17 吕有勇, 高崇峰, 崔建涛, 孙梅, 程金泉. 胃癌中MTS1/p16基因缺失及表达异常的研究. *中华肿瘤杂志* 1996; 18: 189-191
- 18 何凤田. bcl-2与疾病. *国外医学·生理、病理科学与临床分册* 1998; 18: 230-233
- 19 Hockenbery D, Nunez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; 348: 334-336
- 20 Sheu LF, Chen A, Meng CL, Ho KC, Lin FG, Lee WH. Analysis of bcl-2 expression in normal, inflamed, dysplastic nasopharyngeal epithelia, and nasopharyngeal carcinoma: association with p53 expression. *Hum Pathol* 1997; 28: 556-562
- 21 Bronner MP, Culin C, Reed JC, Furth EE. The bcl-2 proto-oncogene and the gastrointestinal epithelial tumor progression model. *Am J Pathol* 1995; 146: 20-26
- 22 McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, Nunez G, Jaeger U, McKearn JP, Korsmeyer SJ. bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 1989; 57: 79-88
- 23 韩萍, 刘妍, 成军, 王刚, 陆荫英, 李克, 李莉. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白上调c-myc基因表达的研究. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 141-144
- 24 曾建新, 王文亮, 骆文静, 王知力. 抑制性消减杂交构建凋亡肝癌细胞差异表达cDNA文库. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 1233-1237
- 25 Ruol A, Parenti A, Zaninotto G, Merigliano S, Costantini M, Cagol M, Alfieri R, Bonavina L, Peracchia A, Ancona E. Intestinal metaplasia is the probable common precursor of adenocarcinoma in barrett esophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia. *Cancer* 2000; 88: 2520-2528

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 •

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

uPA纤溶途径与肝纤维化

安德明, 季光, 邢练军, 郑培永

■研究前沿

uPA纤溶途径与肝纤维化关系研究的热点主要集中在uPA, PAI对细胞外基质调控系统的影响, 尤其是对基质金属蛋白酶系统的调控、与肝纤维化相关细胞因子之间的关系以及在肝星状细胞增殖、迁移中的作用等。

安德明, 季光, 邢练军, 郑培永, 上海中医药大学附属龙华医院肝病研究室 上海市 200032

上海市教委基金资助课题, No. 05CZ10

通讯作者: 季光, 200032, 上海市, 上海中医药大学附属龙华医院肝病研究室, jiliver@vip.sina.com

电话: 021-64286261 传真: 021-64286261

收稿日期: 2006-05-09 接受日期: 2006-06-14

摘要

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积是肝纤维化的特征性表现, 纤溶系统尤其是尿激酶型纤溶酶原激活剂(urokinase-plasminogen activator, uPA)所介导的纤溶途径与肝纤维化关系密切, 其主要成分包括纤溶酶原、纤溶酶、纤溶酶原激活剂及其抑制剂。uPA纤溶途径位于ECM降解酶系的顶端, 肝纤维化时通过uPA-纤溶酶-基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)-ECM级联机制下调ECM降解, 促进ECM在肝内沉积, 而且可能在肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)增殖、迁移以及肝细胞再生等过程中起到重要作用。

关键词: uPA纤溶途径; 肝纤维化; 肝星状细胞

安德明, 季光, 邢练军, 郑培永. uPA纤溶途径与肝纤维化. 世界华人消化杂志 2006;14(21):2106-2111

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2106.asp>

0 引言

肝纤维化是肝脏对各种因素所致的慢性损伤的一种修复反应, 是大多数慢性肝病所共有的病理过程, 也是各种慢性肝病向肝硬化过度的中间环节, 其特征是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在肝内过度沉积^[1-5]。纤溶系统是纤溶酶原经特异性激活物作用转化为纤溶酶, 导致体内纤维蛋白不断溶解的反应体系。主要包括纤溶酶原、纤溶酶、纤溶酶原激活物及其抑制剂^[6]。目前研究证实, 纤溶系统, 特别是尿激酶型纤溶酶原激活剂(urokinase-plasminogen activator, uPA)所介导的纤溶途径与肝纤维化关系密切, 在肝脏ECM调控和肝细胞再生等过程中起着重要作用。现就uPA纤溶途径中主要成分

uPA, uPA受体(urokinase plasminogen activator receptor, uPAR)及其I型抑制剂(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)的生物学特性及其与肝纤维化的关系等综述如下。

1 uPA纤溶途径主要成分的结构与功能

1.1 uPA结构与功能 uPA是属于丝氨酸蛋白水解酶的成员, 他催化纤溶酶原转化为纤溶酶, 启动纤维蛋白和细胞外基质蛋白溶解级联反应。人uPA基因位于第10号染色体的长臂(10q24-qter)上, mRNA大小为2.4 kb, 基因大小为6.4 kb, 包含11个外显子和10个内含子。uPA本身以单链酶原(scu-PA或pro-uPA)的形式分泌出来。pro-uPA是由411个氨基酸组成的单链糖蛋白, 分子质量为50-55 kDa, 其活性很低。单链肽链中的Lys158-Ile159之间的肽键受纤溶酶(PI)水解发生断裂使之转换成由2个二硫键连接的具有活性的双链酶即tc-uPA^[7]。已知有2种形式的tc-uPA, 即高分子质量的tc-uPA (HMW-uPA)和低分子质量的tc-uPA (LMW-uPA), 活化的uPA由A链和B链组成, 有3个独立的结构域, A链氨基端包含Kringle结构域(kringke domain, KD)和生长因子结构域(growth factor-like domain, GFD), uPA借助GFD与细胞表面的uPAR结合; KD的功能还不清楚, 可能与细胞信号传导有关。uPAR可以与单链uPA和高分子量uPA相结合, 但不与低分子量uPA相结合。B链包含蛋白水解区域(proteolytic domain, PD), 这一区域与蛋白水解活性有关, 是其活性中心^[8]。一般来说, uPA主要在生理、病理条件下参与细胞的分化、迁移、组织重建、细胞外基质降解、肿瘤浸润及转移等过程。

1.2 uPAR的结构与功能 uPAR是细胞膜表面的一个多功能受体, 是一种新的纤溶因子^[9]。基因位于19号染色体的长臂(19q13)上, DNA全长23 kb, 包含有7个外显子和6个内含子, 成熟的uPAR由283个氨基酸残基构成^[10]。uPAR为高度糖基化的单链糖蛋白, 其分子质量为55-60 kDa, 具有3个同源结构域, 分别称为D1, D2, D3, 通过二硫键连接, 每个结构域约含90个氨基酸残

基, uPAR在Ser282和Gly283位点处以糖基化磷脂酰肌醇(GPI)锚定形式结合在细胞膜表面, 但羧基端不具有跨膜序列. 氨基端D1的87个氨基酸是与uPA的氨基末端片段(ATF)的生长因子区域相结合的部位, 其他2个结构域共同维持该结构域活性构象的稳定或直接参与配体结合过程^[11-12]. 在uPA激活纤溶酶原过程中, uPAR极为关键, 他不仅将uPA定位于细胞表面, 而且参与uPA的活化调节, 使uPA的蛋白裂解活性大大提高^[13]. uPAR并非简单将uPA定位于细胞表面, 还通过以下2个作用途径控制细胞表面uPA的活性: (1)uPAR通过选择性地内化和降解uPA/PAI-1复合物来控制细胞表面已结合的uPA的活性^[14]; (2)uPAR还可以将uPA定位于细胞表面的不连续区域, 从而指导正常组织的蛋白裂解活性和细胞对uPA的表达, 以调控正常组织中uPA的分布^[15], 并进一步调节由纤溶酶原介导的细胞表面的蛋白水解作用.

1.3 PAI-1的结构与功能 纤溶酶原激活剂的抑制剂主要包括PAI-1, PAI-2和PAI-3, 其中PAI-1的作用最为突出, 是纤溶系统的主要抑制物, 是uPA和tPA专一、快速和有效的生理抑制剂, 可以迅速、有效地抑制uPA和组织型纤溶酶原激活剂(tPA)的活性. PAI-1是一种分子质量约为50 kDa单链糖蛋白, 由379个氨基酸组成, 其活性中心为Arg346-Met347. 人PAI-1基因位于7号染色体长臂(7q21.3-22), 基因长度约为12.2 kb, 包含有9个外显子, 8个内含子. 他除了能与uPA或t-PA形成1:1复合物, 从而灭活纤溶酶原外, 还与其他配体如玻基结合素、脂多糖受体相关蛋白等结合来调节纤溶酶原的活性.

总之, 在细胞膜上sc-uPA或tc-uPA与uPAR结合, Pg与膜上成分结合形成相互活化的高效纤溶活化系统, 加上uPA的生理性抑制物PAI-1, PAI-2, PAI-3便构成了病理生理学的纤溶途径(uPA纤溶途径), 他是调节细胞与细胞之间、细胞与ECM之间相互反应的特殊纤溶途径^[16].

1.4 uPA纤溶途径与细胞外基质调控系统之间的关系 丝氨酸蛋白酶系统(PA/PAI)和基质金属蛋白酶系统(MMP/TIMP)是ECM代谢调控系统的两大主要酶系. 其中uPA又是纤溶系统的关键酶系, 在这一支点上连接纤溶和ECM代谢调控系统. 研究认为, uPA及PAI/纤溶酶系统是调节基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)活性和降解ECM的关键因素, 由uPA (PAI), 纤溶酶及MMPs构成的级联激活反应是调节ECM沉积

的主要途径之一. uPA位于这种级联激活反应的顶端, 如前所述他催化纤溶酶原活化转化为纤溶酶, 纤溶酶不仅可以直接降解纤维蛋白原和纤维蛋白, 还可以降解多种ECM成分, 包括纤维连接蛋白、层连蛋白等^[17]. 此外, 纤溶酶又是MMPs活化所必需的, 现在认为MMPs是最重要的一类降解ECM的蛋白酶类, MMPs直接以酶原的形式分泌到细胞外, 只有被活化后才能降解基质蛋白, 这是控制ECM的重要调节机制^[18-19]. 对于MMPs的活化, 人们提出了几种机制, 其中比较公认的是蛋白分解级联放大机制(瀑布机制)^[20]. 首先是纤溶酶原被tPA或uPA激活为纤溶酶, 纤溶酶激活部分间质胶原酶和基质分解素原. 活化的基质分解素可导致间质胶原酶的完全活化和超活化. 活化的MMPs可以切割一种或数种ECM成分, 但其活性可被TIMP抑制. uPA的启动区和MMPs一样也含有AP-1结合位点, 提示uPA的表达与MMPs酶原的表达协同调节, 使活化的瀑布机制进行下去^[21]. 在这一级联激活机制中, uPA活性的改变会直接影响纤维化的进程^[22]. PAI-1作为uPA的主要抑制剂也可由ECM分泌细胞产生, 他在控制活化的级联放大机制中起着负性调节作用. 已有多项研究结果显示, uPA基因敲除小鼠可自发性出现肝脏、肺脏及其他脏器ECM沉积, 诱发纤维化形成^[23-24], 而PAI-1基因缺失可以延缓纤维化进程^[25-26]. 纤溶酶原缺失明显加重了四氯化碳所致的肝纤维化进程^[27].

2 uPA纤溶途径与肝纤维化

2.1 uPA纤溶途径在肝纤维化期间的变化 肝纤维化的调控是多水平调节, 其中最主要的是肝星状细胞(HSC)活化, 进而合成大量ECM, 因此, HSC的激活是肝纤维化发生、发展的中心环节, 他是调控肝脏ECM的最主要的细胞^[28-32]. HSC调节ECM的重要途径之一就是uPA及PAI-1的差异表达, 在上游调控纤溶酶和MMPs的活性, 以维持ECM合成及降解之间的平衡. 体外测定HSC不同活化阶段纤溶成分的表达发现, 新分离的大鼠HSC可以表达uPA, uPAR及PAI-1, 在HSC活化的早期阶段(7 d)时, uPA mRNA合成和活性达到高峰, HSC完全活化的后期阶段(14-21 d)时, uPA活性逐渐下降, 而PAI-1活性则逐渐增高^[33]. 上述结果与肝纤维化早期MMPs轻度增高, 但肝纤维化中晚期MMPs活性明显下降, ECM大量沉积的病理变化相一致; 同时也与uPA和PAI-1在上游调控纤溶酶及MMPs的级联激活机

■创新盘点

本文从uPA纤溶途径主要成份的生物学特性、在细胞外基质代谢调控系统中的作用、与肝纤维化的关系等方面, 系统全面的综述了uPA纤溶途径与肝纤维化关系的研究进展.

■应用要点

目前uPA及其抑制剂(PAI)在肝纤维化形成中的作用越来越受到重视,将uPA及其抑制剂(PAI)作为肝纤维化治疗的靶点已经成为目前该领域的研究热点之一。大量实验和临床研究都尝试通过改变uPA纤溶途径的相关成份来阐明其在肝纤维化中的作用,进而为肝纤维化的治疗开辟更广阔的途径。

制相符合。体内研究发现,不同诱因肝损伤模型中纤溶成分的变化不尽一致。对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化的研究表明,在肝纤维化形成的早期,uPA,uPAR mRNA的表达分别增加2.8和1.8倍,而tPA,PAI-1 mRNA的水平不变;随着肝纤维化的发展,uPA,uPAR,tPA,PAI-1的mRNA表达都增加,但PAI-1的表达更加明显。PAI-1可来源于KFC,肝细胞和HSC(尤其在活化的HSC分泌表达明显增高),在肝纤维化形成后分离培养的HSC或者体外用TGF- β 1刺激后,HSC表达PAI-1的能力明显增强,这说明虽然肝实质细胞和间质细胞都可分泌PAI-1,但在肝纤维化期间HSC是PAI-1的主要来源^[34]。但是也有研究发现,高脂饮食诱导的家兔脂肪肝模型在脂肪性肝炎阶段,肝脏中PAI-1基因的表达明显增强^[35]。对大鼠酒精性肝病研究发现,在肝损伤早期尚未出现明显组织病理学改变时,即可诱导PAI-1基因在转录水平的过度表达^[36]。这些研究说明,PAI-1可能参与了这些诱因导致的早期肝损伤。而近年临床研究也证实慢性乙肝患者PAI-1蛋白表达着色积分随肝纤维化加重而显著升高^[37]。

2.2 uPA纤溶途径在肝纤维化不同阶段的作用现在初步阐明了uPA纤溶途径在肝纤维化发病机制中可能起重要作用。在肝纤维化的早期阶段即HSC激活的早期阶段,uPA活性上调,激活窦周间隙纤溶酶及MMPs,后两者降解肝脏组织中正常的ECM,由于缺乏正常的纤维组织的支撑和营养作用,肝细胞功能受到损害。在此阶段,uPA还可激活TGF- β 1,后者进一步促进HSC的激活,加速肝纤维化的发展。同样,在肺纤维化的研究中也发现,uPA可激活TGF- β 1,促进肺纤维化,同时TGF- β 1能诱导PAI-1表达,而PAI-1在肺损伤和胸膜损伤的修复中同样起关键作用^[38]。此后,各种刺激因子使HSC维持持续激活状态,不断分泌TGF- β 1,反馈性的引起PAI-1表达增加,虽然uPA和uPAR表达也增加,但PAI-1的表达更加明显,过多表达的PAI-1通过结合uPA抑制其纤溶激活作用,其结果仍然是uPA表达相对不足,导致纤溶酶和MMPs系统活性下调,ECM沉积明显增加,肝纤维化程度不断加重。体外研究发现,将uPA基因导入体外培养的大鼠HSC可以提高上清液中MMP-2的浓度,胞质内的I,III型胶原含量明显减少^[39]。体内研究也发现,通过uPA基因治疗实验性肝纤维化发现,uPA可以提高MMP-2的活性,促进ECM降解,延缓肝纤维化进程^[40]。已有研究表明,通过抑制TGF- β

的信号传导,可以减少HSC I型胶原的蓄积,同时也能下调PAI-1的表达^[41-42]。临床和实验研究都发现肝组织中TGF- β 1和PAI-1蛋白表达着色积分随纤维化加重而显著升高,在肝组织中的分布相似,均表达于病变肝组织的肝纤维化活跃的地方,而且两者蛋白表达着色积分呈正相关^[43-45]。此外,也有研究发现,uPA在HSC的增殖、迁移过程中起到非常重要的作用。因为正常情况下,HSC包埋在窦周间隙内,只有当ECM降解后才能增殖并迁移^[46]。肝损伤发生以后,HSC增殖并迁移到损伤区域,转化为肌成纤维样表型而活化。HSC分泌uPA至细胞外后,可以与该细胞或邻近细胞膜上的uPAR结合,通过自分泌和旁分泌机制催化HSC的增殖、侵袭和迁移,这一效应依赖于uPA和uPAR之间的相互作用。体外研究表明,uPA和uPAR结合可以启动信号并将信号传到细胞内,这一过程不依赖纤溶酶的产生^[47]。进一步研究认为,uPAR可能通过其细胞外区与整合素配体玻璃结合蛋白结合以及与整合素 β 1和 β 2相互作用参与了信号转导级联放大反应的启动,促进HSC的增殖和向特异性基质蛋白的迁移^[48]。PAI-1则通过抑制细胞先导面玻璃结合蛋白与整合素的结合以及与玻璃结合蛋白的结合起到抗迁移作用。研究还发现,uPA与HSC重要的两种促有丝分裂原血小板衍生生长因子和碱性成纤维生长因子有关^[47]。两者不仅能增强uPA,uPAR mRNA和蛋白的表达,而且能增强uPA和uPAR的结合,应用反义RNA和特异性抗体阻断uPA和uPAR结合,可以完全消除生长因子刺激的增殖和化学侵袭性。提示uPA和uPAR的结合对其他生长因子刺激的增殖和迁移程序是必不可少的。因此认为,纤溶系统在肝纤维化中不仅通过uPA-纤溶酶-MMPs-ECM级联机制下调ECM降解,而其有可能在HSC增殖、迁移过程中起到重要作用。

2.3 uPA纤溶途径在肝细胞增殖中的作用近年研究表明,uPA纤溶途径与肝细胞再生关系密切。研究发现,uPA基因敲除小鼠肝细胞再生明显延迟;相反,PAI-1基因敲除小鼠则肝细胞再生明显加快^[49]。uPA除了活化纤溶酶原外,还能催化肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)的活化形成有活性的双链HGF^[50-51],而提高HGF表达可以改善实验性肝纤维化程度^[52-54]。Salgado *et al*^[40]用非分泌型uPA重组腺病毒重组质粒经髂静脉注射治疗实验性肝损伤大鼠,发现uPA除了可以提高肝组织中MMP-2的活性、促进门

脉周围和小叶中心的纤维组织吸收外, 还能增加HGF及其受体(c-met)的表达, 促进肝细胞再生, 改善肝功能. 并且认为, uPA基因治疗改善肝功能的机制, 除激活HGF外, 可能还与促进ECM降解导致肝组织结构改建和血管新生、肝细胞增生空间扩大有关. 然而, 有学者将uPA基因分别导入体外培养的大鼠HSC, 发现uPA基因导入可以提高上清液中MMP-2的浓度, 降低胶原含量. 体内研究发现, uPA导入可以明显减少ECM含量, 但对肝功能未见明显改善^[55]. 对PAI-1基因敲除的胆汁淤积性急性肝损伤的研究发现, 在早期炎症阶段, 野生组肝组织中PAI-1基因表达显著增加, 与野生组比较基因敲除组明显减轻了胆管结扎所致的早期肝脏炎症, 这种保肝作用与HGF的表达增强有关^[56-57]. 有学者继续观察发现, 在纤维化阶段, 2组uPA, tPA的活性都增加, 但基因敲除组提高更明显, PAI-1基因敲除可以增加MMP-2和MMP-9(尤其是MMP-9)活性, ECM沉积明显比野生组轻. 而且后期野生组腹水的发生率为70%, 基因敲除组没有腹水发生, PAI-1基因敲除显著提高了c-met的磷酸化水平, 由此进一步证实PAI-1的致肝纤维化作用, 同时也说明uPA可以促进c-met表达而促进肝细胞再生^[56].

3 uPA纤溶途径与中医药治疗肝纤维化

中医虽无肝纤维化病名, 但根据临床表现认为肝纤维化属于中医学的“黄疸”、“胁痛”、“积聚”等范畴. 中医学认为本病形成主要与湿热久留体内, 饮食失调, 肝气郁结, 瘀血内滞, 脏腑功能失调等相关. 目前, 肝纤维化中医基本病机属血瘀、正虚两方面的理论已基本达成共识^[58]. 大量实验研究和临床研究证实, 中医药治疗肝纤维化有一定优势, 取得了可喜的成绩. 已有一些研究显示, 中医药可能通过下调PAI-1的表达而促进MMPs的活化起到抗肝纤维化的作用^[59-61]. 只是目前通过干预uPA纤溶途径治疗肝纤维化的报道不多, 但可以相信, 随着中西医结合研究肝纤维化的进展, 中医药必将为肝纤维化的治疗带来新的希望.

尽管针对纤溶系统在肝纤维化发生、发展中的作用研究取得了很大进展, 但有关纤溶系统各成分在肝纤维化进程中的确切机制尚未完全阐明, 加之肝纤维化的形成涉及诸多环节, 发病机制相当复杂, 许多重要的细胞因子和蛋白酶均参与肝纤维化过程. 随着许多针对肝纤维化发展的关键环节逐渐阐明, 有关纤溶系统特

别是uPA及其抑制剂(PAI)在肝纤维化形成中的作用越来越受到重视, 将uPA及其抑制剂(PAI)作为肝纤维化治疗的靶点已经成为目前该领域的研究热点之一. 可以预见随着对纤溶系统的研究的不断深入, 有可能为将来治疗肝纤维化提供新的策略, 进而为肝纤维化的治疗开辟更广阔的途径.

4 参考文献

- 1 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218
- 2 Prosser CC, Yen RD, Wu J. Molecular therapy for hepatic injury and fibrosis: where are we? *World J Gastroenterol* 2006; 12: 509-515
- 3 王宝恩. 肝星状细胞与肝纤维化. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 197-198
- 4 沈鼎明. 肝纤维化的发生机制. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 241-243
- 5 Valkova M. Hepatic fibrogenesis. *Bratisl Lek Listy* 2002; 103: 76-85
- 6 Nicholl SM, Roztocil E, Davies MG. Plasminogen activator system and vascular disease. *Curr Vasc Pharmacol* 2006; 4: 101-116
- 7 Pyke C, Kristensen P, Ralfkiaer E, Grondahl-Hansen J, Eriksen J, Blasi F, Dano K. Urokinase-type plasminogen activator is expressed in stromal cells and its receptor in cancer cells at invasive foci in human colon adenocarcinomas. *Am J Pathol* 1991; 138: 1059-1067
- 8 Idell S. Coagulation, fibrinolysis, and fibrin deposition in acute lung injury. *Crit Care Med* 2003; 31: S213-220
- 9 Behrendt N. The urokinase receptor (uPAR) and the uPAR-associated protein (uPARAP/Endo180): membrane proteins engaged in matrix turnover during tissue remodeling. *Biol Chem* 2004; 385: 103-136
- 10 Barnathan ES, Kuo A, Kariko K, Rosenfeld L, Murray SC, Behrendt N, Ronne E, Weiner D, Henkin J, Cines DB. Characterization of human endothelial cell urokinase-type plasminogen activator receptor protein and messenger RNA. *Blood* 1990; 76: 1795-1806
- 11 Behrendt N, Ronne E, Dano K. Domain interplay in the urokinase receptor. Requirement for the third domain in high affinity ligand binding and demonstration of ligand contact sites in distinct receptor domains. *J Biol Chem* 1996; 271: 22885-22894
- 12 Plesner T, Behrendt N, Ploug M. Structure, function and expression on blood and bone marrow cells of the urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR. *Stem Cells* 1997; 15: 398-408
- 13 Blasi F, Carmeliet P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 932-943
- 14 Ossowski L, Clunie G, Masucci MT, Blasi F. *In vivo* paracrine interaction between urokinase and its receptor: effect on tumor cell invasion. *J Cell Biol* 1991; 115: 1107-1112
- 15 Olson D, Pollanen J, Hoyer-Hansen G, Ronne E, Sakaguchi K, Wun TC, Appella E, Dano K, Blasi F. Internalization of the urokinase-plasminogen activator inhibitor type-1 complex is mediated by the urokinase receptor. *J Biol Chem* 1992; 267: 9129-9133

■名词解释

PAI-1: 是uPA和tPA专一、快速和有效的生理抑制剂, 可以迅速、有效的抑制uPA和tPA的活性. 除了能与uPA或tPA形成1:1复合物, 从而灭活纤溶酶原外, PAI-1还与其他配体如玻基结合素、脂多糖受体相关蛋白等结合起来调节纤溶酶的活性.

■同行评价

本文具有一定的理论意义和临床潜在的应用价值,特别是能与中医中药结合,且部分内容较新。

- 16 Schwartz BS, Espana F. Two distinct urokinase-serpin interactions regulate the initiation of cell surface-associated plasminogen activation. *J Biol Chem* 1999; 274: 15278-15283
- 17 陈香美. 凝血纤溶系统与细胞外基质调控系统在肾脏疾病中的作用. *中华肾脏病杂志* 2001; 17: 348-349
- 18 Brauer PR. MMPs-role in cardiovascular development and disease. *Front Biosci* 2006; 11: 447-478
- 19 Malemud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci* 2006; 11: 1696-1701
- 20 崔海燕, 刘成, 刘成海. 纤溶系统与肝纤维化的研究进展. *中西医结合肝病杂志* 2003; 13: 316-318
- 21 Wang Y. The role and regulation of urokinase-type plasminogen activator receptor gene expression in cancer invasion and metastasis. *Med Res Rev* 2001; 21: 146-170
- 22 Irigoyen JP, Munoz-Canoves P, Montero L, Koziczak M, Nagamine Y. The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell Mol Life Sci* 1999; 56: 104-132
- 23 Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, Ream B, Degen J, Bronson R, De Vos R, van den Oord JJ, Collen D, Mulligan RC. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* 1994; 368: 419-424
- 24 Swaisgood CM, French EL, Noga C, Simon RH, Ploplis VA. The development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice deficient for components of the fibrinolytic system. *Am J Pathol* 2000; 157: 177-187
- 25 Nicholas SB, Aguiniga E, Ren Y, Kim J, Wong J, Govindarajan N, Noda M, Wang W, Kawano Y, Collins A, Hsueh WA. Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency retards diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2005; 67: 1297-1307
- 26 Chuang-Tsai S, Sisson TH, Hattori N, Tsai CG, Subbotina NM, Hanson KE, Simon RH. Reduction in fibrotic tissue formation in mice genetically deficient in plasminogen activator inhibitor-1. *Am J Pathol* 2003; 163: 445-452
- 27 Ng VL, Sabla GE, Melin-Aldana H, Kelley-Loughnane N, Degen JL, Bezerra JA. Plasminogen deficiency results in poor clearance of non-fibrin matrix and persistent activation of hepatic stellate cells after an acute injury. *J Hepatol* 2001; 35: 781-789
- 28 Uemura M, Swenson ES, Gaca MD, Giordano FJ, Reiss M, Wells RG. Smad2 and Smad3 play different roles in rat hepatic stellate cell function and alpha-smooth muscle actin organization. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 4214-4224
- 29 Xu L, Hui AY, Albanis E, Arthur MJ, O'Byrne SM, Blaner WS, Mukherjee P, Friedman SL, Eng FJ. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut* 2005; 54: 142-151
- 30 Gabele E, Reif S, Tsukada S, Bataller R, Yata Y, Morris T, Schrum LW, Brenner DA, Rippe RA. The role of p70S6K in hepatic stellate cell collagen gene expression and cell proliferation. *J Biol Chem* 2005; 280: 13374-13382
- 31 Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 373-384
- 32 Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004; 1: 98-105
- 33 Leyland H, Gentry J, Arthur MJ, Benyon RC. The plasminogen-activating system in hepatic stellate cells. *Hepatology* 1996; 24: 1172-1178
- 34 Zhang LP, Takahara T, Yata Y, Furui K, Jin B, Kawada N, Watanabe A. Increased expression of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor during liver fibrogenesis of rats: role of stellate cells. *J Hepatol* 1999; 31: 703-711
- 35 范建高, 陈良华, 曾民德, 徐正婕, 王国良, 巫协宁. 普伐他丁对兔脂肪肝肝星1型纤溶酶原激活物抑制物mRNA表达的影响. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 70-72
- 36 周俊, 拓西平, 苗振春, 孙波, 韩易. 大鼠酒精性肝病早期1型纤溶酶原激活物抑制物mRNA表达及药物的影响. *中华消化杂志* 2002; 22: 573-574
- 37 李清华, 秦成勇, 劳萍. 纤溶酶原激活物抑制物在纤维化肝组织中的表达及其血浆活性检测. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 209-211
- 38 Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, Lanone S, Wang X, Koteliansky V, Shipley JM, Gotwals P, Noble P, Chen Q, Senior RM, Elias JA. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J Exp Med* 2001; 194: 809-821
- 39 林勇, 陈伟忠, 谢渭芬, 曾欣, 张新, 陈岳祥, 张忠兵, 杨秀疆. 导入外源人尿激酶型纤溶酶原激活剂基因对肝星状细胞胶原沉积的影响. *中华消化杂志* 2004; 24: 387-389
- 40 Salgado S, Garcia J, Vera J, Siller F, Bueno M, Miranda A, Segura A, Grijalva G, Segura J, Orozco H, Hernandez-Pando R, Fafutis M, Aguilar LK, Aguilar-Cordova E, Armendariz-Borunda J. Liver cirrhosis is reverted by urokinase-type plasminogen activator gene therapy. *Mol Ther* 2000; 2: 545-551
- 41 Liu X, Wang W, Hu H, Tang N, Zhang C, Liang W, Wang M. Smad3 specific inhibitor, naringenin, decreases the expression of extracellular matrix induced by TGF-beta1 in cultured rat hepatic stellate cells. *Pharm Res* 2006; 23: 82-89
- 42 Liu XJ, Ruan CM, Gong XF, Li XZ, Wang HL, Wang MW, Yin JQ. Antagonism of transforming growth factor-Beta signaling inhibits fibrosis-related genes. *Biotechnol Lett* 2005; 27: 1609-1615
- 43 李清华, 战淑慧, 卞鲁岩, 秦成勇, 劳萍. 转化生长因子-β1和纤溶酶原激活物抑制物-1在肝纤维化中的作用及关系. *中华消化杂志* 2004; 24: 113-114
- 44 武希润, 王玲, 闫新明, 王琦, 师水生, 郭文栋. 肝硬化患者纤溶酶原激活物以及基质金属蛋白酶抑制剂蛋白表达. *中国中西医结合消化杂志* 2005; 13: 369-372
- 45 朱颖炜, 曾欣, 谢渭芬, 张新, 林勇. 纤溶酶原激活物抑制剂-1在大鼠肝纤维化组织中的表达及其与 I、III型胶原的相关性分析. *肝脏* 2006; 11: 18-20
- 46 Sarem M, Znaidak R, Macias M, Rey R. Hepatic stellate cells: it's role in normal and pathological conditions. *Gastroenterol Hepatol* 2006; 29: 93-101
- 47 Fibbi G, Pucci M, Grappone C, Pellegrini G, Salzano R, Casini A, Milani S, Del Rosso M. Functions of the fibrinolytic system in human Ito cells and its control by basic fibroblast and platelet-derived growth factor. *Hepatology* 1999; 29: 868-878
- 48 Cao D, Mizukami IF, Garni-Wagner BA, Kindzelskii AL, Todd RF 3rd, Boxer LA, Petty HR. Human urokinase-type plasminogen activator primes neutrophils for superoxide anion release. Possible roles of complement receptor type 3 and calcium. *J Immunol* 1995; 154: 1817-1829
- 49 Shimizu M, Hara A, Okuno M, Matsuno H, Okada K,

- Ueshima S, Matsuo O, Niwa M, Akita K, Yamada Y, Yoshimi N, Uematsu T, Kojima S, Friedman SL, Moriwaki H, Mori H. Mechanism of retarded liver regeneration in plasminogen activator-deficient mice: impaired activation of hepatocyte growth factor after Fas-mediated massive hepatic apoptosis. *Hepatology* 2001; 33: 569-576
- 50 Naldini L, Vigna E, Bardelli A, Follenzi A, Galimi F, Comoglio PM. Biological activation of pro-HGF (hepatocyte growth factor) by urokinase is controlled by a stoichiometric reaction. *J Biol Chem* 1995; 270: 603-611
- 51 Taniyama Y, Morishita R, Nakagami H, Moriguchi A, Sakonjo H, Shokei-Kim, Matsumoto K, Nakamura T, Higaki J, Ogihara T. Potential contribution of a novel antifibrotic factor, hepatocyte growth factor, to prevention of myocardial fibrosis by angiotensin II blockade in cardiomyopathic hamsters. *Circulation* 2000; 102: 246-252
- 52 Xia JL, Dai C, Michalopoulos GK, Liu Y. Hepatocyte growth factor attenuates liver fibrosis induced by bile duct ligation. *Am J Pathol* 2006; 168: 1500-1512
- 53 Kim WH, Matsumoto K, Bessho K, Nakamura T. Growth inhibition and apoptosis in liver myofibroblasts promoted by hepatocyte growth factor leads to resolution from liver cirrhosis. *Am J Pathol* 2005; 166: 1017-1028
- 54 Kusumoto K, Ido A, Moriuchi A, Katsura T, Kim I, Takahama Y, Numata M, Kodama M, Hasuike S, Nagata K, Uto H, Inui K, Tsubouchi H. Repeated intravenous injection of recombinant human hepatocyte growth factor ameliorates liver cirrhosis but causes albuminuria in rats. *Int J Mol Med* 2006; 17: 503-509
- 55 Lin Y, Xie WF, Chen YX, Zhang X, Zeng X, Qiang H, Chen WZ, Yang XJ, Han ZG, Zhang ZB. Treatment of experimental hepatic fibrosis by combinational delivery of urokinase-type plasminogen activator and hepatocyte growth factor genes. *Liver Int* 2005; 25: 796-807
- 56 Bergheim I, Guo L, Davis MA, Duveau I, Arteel GE. Critical role of plasminogen activator inhibitor-1 in cholestatic liver injury and fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316: 592-600
- 57 Wang H, Vohra BP, Zhang Y, Heuckeroth RO. Transcriptional profiling after bile duct ligation identifies PAI-1 as a contributor to cholestatic injury in mice. *Hepatology* 2005; 42: 1099-1108
- 58 胡义扬. 中医药抗肝纤维化的研究. *实用临床医药杂志* 2005; 9: 18-22
- 59 崔红燕, 姜哲浩, 刘成, 刘成海. 扶正化瘀方对肝纤维化大鼠间质性基质金属蛋白酶活性的影响. *上海中医药大学学报* 2003; 17: 35-38
- 60 陈洪, 陆亚琴, 刘顺英, 陈平圣, 安艳丽, 张治国, 连桂芳. 蚯蚓提取物对肝纤维化大鼠 α -SMA、TGF β 1、uPA及PAI-1蛋白表达的影响. *江苏医药* 2005; 31: 443-445
- 61 王江蓉, 张斌. 柔肝冲剂对血瘀型肝纤维化大鼠纤溶酶原激活抑制因子-1影响. *江西中医学院学报* 2006; 18: 52-54

电编 张敏 编辑 潘伯荣

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

• 消息 •

更正与说明专栏

本刊讯 《世界华人消化杂志》为了对同行评议、编辑、校对、审读、文章价值等质量进行跟踪报道, 特设“更正与说明”固定专栏, 包括“事实纠错”、“文字更正”、“解释说明”三个子栏目, 不仅对前一期或近期出现的文字差错和事实错误进行更正、就引发歧义或晦涩难懂之处做解释说明, 而且针对文章的学术水平等进行讨论. 在此, 我们热烈欢迎读者、作者、编委等积极审读《世界华人消化杂志》, 给更正与说明栏目投稿.

糖尿病及其血管并发症的介入治疗

朱悦琦, 程英升

■背景资料

随着生活方式的改变和老龄化社会的加剧, 糖尿病的患病率和死亡率已呈快速上升趋势, 成为世界上继肿瘤、心血管病之后第3位严重危害人类健康的疾病。资料表明, 全球糖尿病患者人数已超过1.5亿人, 按目前增长中的发病率来说, 糖尿病将于数十年内成为全球最普遍疾病之一和最大的公众健康问题之一。

朱悦琦, 程英升, 上海交通大学附属第六人民医院放射科, 上海交通大学影像医学研究所 上海市 200233
上海市科技发展基金资助课题, No. 044119721
通讯作者: 程英升, 200233, 上海市, 上海交通大学附属第六人民医院放射科, 上海交通大学影像医学研究所。
cjr.chengyush@vip.163.com
电话: 021-64823392 传真: 021-64368920
收稿日期: 2006-04-27 接受日期: 2006-05-22

摘要

糖尿病(diabetes mellitus, DM)根据发病机制的不同, 可分为1型和2型。糖尿病介入治疗主要是针对1型DM由于胰岛 β 细胞缺乏造成胰岛素分泌绝对不足进行胰岛 β 细胞或者干细胞移植, 从而增加胰岛素分泌的绝对量达到治疗DM的目的。DM的血管并发症介入治疗, 最常见的是糖尿病足的治疗, 使用经皮经腔血管成形术(percutaneous transluminal angioplasty, PTA)和血管内支架为糖尿病足及其他周围血管病变提供了一个新的治疗途径。

关键词: 糖尿病; 经皮经腔血管成形术; 干细胞; 糖尿病足

朱悦琦, 程英升. 糖尿病及其血管并发症的介入治疗. 世界华人消化杂志 2006;14(21):2112-2115
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2112.asp>

0 引言

糖尿病(diabetes mellitus, DM)根据发病机制的不同可分为1型和2型, 其中1型DM主要是由于胰岛 β 细胞的破坏引起胰岛素分泌的绝对缺乏, 其发病机制与自身免疫反应性损伤有关, 好发于儿童和青少年, 酮症酸中毒倾向明显。2型DM的发病机制主要是由于遗传引起的胰岛素抵抗和胰岛素分泌相对不足引起的, 患者的胰岛素水平通常不低, 有时甚至还可以高于正常水平。糖尿病介入治疗主要是针对1型DM, 由于胰岛 β 细胞缺乏造成胰岛素分泌绝对不足进行胰岛 β 细胞或者干细胞移植, 从而增加胰岛素分泌的绝对量达到治疗DM的目的。DM的血管并发症同样是一个令人头痛的问题, 尤其是对于糖尿病足的治疗, 经皮经腔血管成形术(percutaneous

transluminal angioplasty, PTA)和血管内支架为糖尿病足及其他周围血管病变提供了一个新的治疗途径。

1 糖尿病的介入治疗

1.1 胰岛细胞移植 与传统的胰腺移植相比, 本法由于具有创伤小, 效果好以及排斥反应低等优点而具有广阔的应用前景。方法: 通常是将供体胰腺经分离纯化后提取胰岛细胞, 获得足量纯净的活性胰岛细胞是决定胰岛移植成功与否的关键, 而这中间胰腺的消化又是关键中的关键^[1]。分离纯化完成后, 患者取仰卧位, 在超声引导下用22G的Chiba针刺肝脏门脉成功后引入导丝和导管鞘至门脉主干, 造影证实后手工缓慢推入胰岛 β 细胞悬液^[2], 或者也可经右下腹作一2 cm的小切口, 分离肠系膜静脉的二级分支, 然后用21G的微穿刺针穿刺后引入导管导丝, 插管到门静脉, 移去导丝, 造影确定位于门静脉后, 缓慢注入胰岛细胞悬液, 注射完毕后行CO₂造影, 然后移去导管, 结扎肠系膜静脉^[3]。胰岛细胞移植过程中, 应当非常强调缓慢注入胰岛细胞, 因为过快注入一方面可引起门静脉阻塞, 另一方面可能破坏胰岛细胞团(胰岛细胞团移植效果要优于单个细胞)。或者也可常规经股动脉插管, 引入导丝和导管后, 插管到肝固有动脉或者相应的肝动脉及其分支, 然后依照上述方法注入胰岛细胞, 可达到相同效果。术后联合应用非类固醇激素进行免疫抑制, 使患者脱离或者降低胰岛素的使用量, 从而达到治疗糖尿病的目的。穿刺可导致肝包膜损伤引起出血、血胸、气胸和皮下淤血等并发症, 但都非严重并发症, 通过超声引导和仔细操作均可予以避免。有文献报道胰岛细胞移植后, 71%的患者可有轻度的腹痛, 59%的患者可有恶心反应, 但都是自限性的^[4]。胰岛细胞的移植效果可由外周血中C肽浓度来间接反应, 这是因为胰岛 β 细胞在分泌胰岛素的同时也以等分子量分泌C肽, C肽清除速率慢于胰岛素, C肽/胰岛素浓度通常>5。有文献报道通过 β 细胞的移植, 1 h后C肽水

平可由平均 $0.09\text{ }\mu\text{g/L}$ 上升到 $1.99\text{ }\mu\text{g/L}$, 再次移植后平均C肽水平也可达到 $1.65\text{ }\mu\text{g/L}$. 2 wk后C肽水平首次移植和再次移植则分别为 $0.88\text{ }\mu\text{g/L}$ 和 $0.74\text{ }\mu\text{g/L}$, 6 mo后86%的患者C肽水平超过 $0.5\text{ }\mu\text{g/L}$, 而这一水平充分表示移植 β 细胞能够很好的起作用. β 细胞的来源问题: 首先, 胰岛细胞不具有很强的分化活性, 不适宜于细胞培养增殖; 其次, 从每个供体中获得的胰岛数量通常小于总量的50%^[5], 这些都从某些方面限制了胰岛移植的广泛开展. 免疫抑制问题一直以来都是影响胰岛细胞成活和临床疗效的瓶颈. 尽管胰岛细胞的排斥反应较全胰腺移植要低, 并且通过生物技术方法减低胰岛细胞的免疫原性等研究都取得了很好的效果, 但是该问题始终未能得到解决, 药物抑制移植免疫反应仍然需要. 目前, 非激素免疫抑制方案是胰岛细胞移植研究的方向之一. Edmnton *et al*^[6-7]联合应用雷帕霉素, FK506及塞呢哌后, 80%的患者脱离胰岛素治疗达1 a以上. 现在, 免疫调节和诱导耐受以及胰岛细胞微囊化处理等方法正处于实验室研究阶段, 其避免服用免疫抑制剂的前景越来越受到人们的关注. 有实验证明将海藻酸钠-聚赖氨酸-海藻酸钠包埋的猪胰岛细胞移植到糖尿病大鼠后, 与非包埋对照组相比, 可以取得显著的效果^[8].

1.2 干细胞移植 干细胞(stem cell, SC)是一种具有自我更新和多向分化能力的一类细胞. 干细胞移植相对于胰岛细胞移植而言具有两个潜在的优点: 一是可以解决胰岛细胞供体来源不足的问题, 因为平均每例患者胰岛移植大概需要2个或以上供体胰腺, 即使在器官捐献非常发达的美国, 每年也只有6000左右捐献的胰腺可供使用, 而同时却有30 000例新的糖尿病患者等待治疗^[9]. 干细胞由于具有多向分化的能力, 一旦建立可以诱导分化成胰岛细胞的细胞系, 那么就能解决胰岛细胞的来源问题^[10]. 二是可以解决胰岛移植所带来的免疫排斥反应, 排斥反应不光是可以造成终生服用免疫抑制剂的麻烦, 同时免疫抑制药物也会不同程度的损伤胰岛细胞. 取自身的干细胞完全没有免疫排斥反应是较好的选择, 但是也有文献报道经诱导产生的胰岛样细胞, 其分泌胰岛素的能力较正常胰岛细胞要低. 干细胞可以分为胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)和成体干细胞(adult stem cell, ASC), 前者又可以分为胚胎来源干细胞和生殖细胞来源干细胞(embryonic germ cell,

EGC), 后者则可分为来源于脐血、骨髓和肝胰的成体干细胞等. 细胞在有白血病抑制因子存在的情况下, 在无分裂活性的鼠胚胎成纤维细胞组成的滋养层上生长, 可以保持未分化状态, 并且胰岛细胞谱系通常以集落形式生长, 而非杂乱散在生长^[11-13]. 去除白血病抑制因子和滋养层细胞后, ESC开始分化, 产生拟胚体, 拟胚体在无血清、存在碱性成纤维生长因子、含有葡萄糖的培养基中生长, 可以最终分化为胰岛素分泌细胞. 胰岛素分泌细胞还必须在生长因子的作用之下才能成熟, 并产生较强的分泌胰岛素的能力. 但是胰岛细胞最终的成熟还必须在较高浓度的葡萄糖刺激下才能完成, 此时的胰岛素分泌细胞可能具有很强的胰岛素分泌能力, 但是也有文献报道^[14], 这种高糖也可能会诱导细胞的凋亡、脱颗粒或者抑制细胞的完全成熟. 干细胞标志主要用来在细胞的诱导和培养过程中对能够分泌胰岛素的细胞进行筛选, 随着理论和实验技术的发展, 很多新的分子标志可能会出现, 同样许多以前所采用的分子标记也会被弃用. 目前所用较多的分子标记(大部分基于动物实验)主要有: (1)胰岛素促进因子是 β 细胞表达的一种调节胰岛素和抑生长素表达的转录因子, 是 β 细胞成熟的标志物. 内分泌细胞几乎都存在于胰岛素促进因子阳性细胞集落当中^[15]. (2)Nestin是胰岛干细胞的分子标志之一, 可以起到促进胰腺内分泌干细胞分化的作用. (3)胰腺特定转录因子1a, 该因子在早期胰腺胚芽形成过程中表达, 并且和胰岛素促进因子联合表达, 他负责胰腺上皮的形成. (4)神经原素Neurogenin3 (ngn3)在形成胰腺上皮过程中, ngn3对于内分泌谱系细胞的特定分化是必须的. 胰腺上皮细胞的亚系可以表达ngn3, ngn3与生长因子共同作用可使肝脏内胰岛素分泌水平明显提高^[16]. 其他有ck-19、胰岛素、端粒酶、 β -半乳糖苷酶等都可作为具有胰岛素分泌功能细胞的参考标记, 对于研究胰腺干细胞的发育以及信号传导机制均有重要的作用. 干细胞移植治疗糖尿病在理论上和动物实验阶段都被证明是可行的. Soria *et al*^[17]通过选择特定鼠类胚胎干细胞诱导产生的胰岛素分泌细胞, 移植到糖尿病小鼠体内后, 发现这些细胞不但能增殖数倍, 而且能保持其分泌胰岛素的功能. Ramiya *et al*^[18]将鼠胰导管内细胞分化得到的可分泌胰岛素的细胞, 移植到糖尿病小鼠体内后, 也起到了纠正高血糖的作用. 但是干细胞移植仍然存在不少的问题, 其中干细胞的诱导是关键, 尽管这些增殖细胞被

■应用要点

糖尿病介入治疗既要针对原发疾病进行治疗, 同时也要对糖尿病合并血管病变进行治疗, 实行标本兼治, 方可疗效持久.

■名词解释

1 经皮腔血管成形术(PTA):是指采用导管扩张技术使狭窄或闭塞的血管再通。

2 糖尿病足(diabetic foot, DF):是糖尿病患者并发的一种神经、血管、皮肤、肌腱甚至骨骼的慢性进行性病变,常合并感染。主要表现为足溃疡与坏疽。是糖尿病患者尤其是老年糖尿病患者最痛苦的一种慢性并发症,也是患者致残致死的主要原因之一。

认为可以取代胰岛细胞,能够诱导这些类型的特定的细胞表面标记和信号仍然不为人们所知。充分了解信号分子在成熟干细胞分化成熟过程中的作用将是一项艰苦的工作。其次,干细胞具有多向分化的能力,可以向各个胚层分化,所以干细胞诱导产生的细胞可能具有潜在的肿瘤形成风险以及形成畸胎瘤的可能。充分诱导干细胞形成成熟的内分泌细胞,以及提高成熟细胞的纯度可能是避免这一风险的有效途径之一。再次,来源于异体的干细胞诱导产物仍然面临免疫排斥反应的问题,免疫抑制剂的选用肯定将是干细胞移植临床应用过程中需要解决的重要问题。最后,干细胞还将面临伦理学上的一系列的问题。干细胞移植无疑还处于起步阶段,只有上述问题都能得到很好的解决之后,其临床应用才能广泛开展。

2 糖尿病血管并发症的介入治疗

2.1 糖尿病足 糖尿病患者因周围血管病变引起肢体坏死的几率是非糖尿病患者的50多倍^[19]。尽管外科旁路手术仍然是治疗严重下肢缺血的金标准,血管内治疗技术正在越来越多被临床所接受。经皮血管成形术及血管内支架已经成为治疗严重下肢缺血尤其是局部动脉狭窄和阻塞伴末端引流血管通畅的有效治疗措施^[20]。经皮血管成形术对于越来越多的患者成为首选,但是对于胫腓动脉却不提倡^[21]。Dougherty *et al*^[20]报道了大样本的肢体远端经血管和开放手术,结果血管成形术相对于开放手术不仅安全,而且非常简便,但是病变越靠近远端,血管内治疗的效果则相应减低。PTA适用于大多数伴缺血性溃疡的糖尿病患者,其对足血管重建是完全有效的。Staffa *et al*^[21]用PTA治疗了18例患者,随访6 mo后,其有效率达到78%。尽管有文献报道PTA对糖尿病患者的作用差于其他患者,但是这种方法避免了手术治疗甚至于截肢,同时也减少了溃疡的发生^[22]。Faglia *et al*^[23]对221例大样本糖尿病足病例做了报道,不论是股部动脉的狭窄或是膝以下部分抑或两者都有,经PTA治疗后,都取得了很好的效果。经股动脉常规插管进行动脉造影,明确狭窄部位后,选择性插管到动脉狭窄部位,交换导管引入球囊导管,充盈球囊扩张动脉,扩张完毕后进行造影观察管腔扩张程度,如有必要可进行再次扩张。注意一次扩张不宜过度,以防撕裂动脉,引起再狭窄。PTA的长期效果一般差于支架植入,支架植入可以较好的

的预防再狭窄的发生。如果管腔内伴血栓形成,则可通过导管注入尿激酶等溶栓药物,进行局部溶栓使血管再通。穿刺部位血肿形成,少数患者可以形成假性动脉瘤,通常小心操作可以避免。狭窄血管球囊扩张时破裂是严重的并发症,可以通过重复扩张达到所需的效果,单次扩张压力不宜过大可避免此类并发症的发生。

2.2 其他周围血管病变 糖尿病患者动脉粥样硬化发生的概率约为正常人的4倍,主要侵犯主动脉、冠状动脉、脑动脉、肾动脉等,其与糖尿病足治疗的基本方法相似,都可以通过PTA,支架植入以及局部溶栓等方法来改善临床症状,促进血运的重建。

总之,介入治疗不管是在糖尿病的病因治疗方面还是在其并发症对症治疗方面都有其独特应用前景。糖尿病作为一种古老的疾病,随着社会老龄化的发展,患者数量将大量增长,对治疗水平也将有更高的要求。在传统的治疗基础上,介入治疗作为一门新兴的学科,借助于不断发展的生命科学和材料科学,以及影像设备的飞速发展,在糖尿病治疗领域中必将发挥越来越大的作用。

3 参考文献

- 1 谢平,穆会君,徐卓群,徐汇义,张滨,张穆,诸明,阮钧,蔡兵,吴鸣宇.成人胰岛细胞的分离纯化及初步的临床应用.中华器官移植杂志 2005; 26: 350-352
- 2 Maleux G, Gillard P, Keymeulen B, Pipeleers D, Ling Z, Heye S, Thijs M, Mathieu C, Marchal G. Feasibility, safety, and efficacy of percutaneous transhepatic injection of beta-cell grafts. *J Vasc Interv Radiol* 2005; 16: 1693-1697
- 3 Osama Gaber A, Chamsuddin A, Fraga D, Fisher J, Lo A. Insulin independence achieved using the transmesenteric approach to the portal vein for islet transplantation. *Transplantation* 2004; 77: 309-311
- 4 Antonello P, Rodoifo A, Camillo R. Islet transplantation: steady progress and current challenges. *Current Opinion in Organ Transplantation* 2006; 11: 7-13
- 5 李永翔,谭建明.胰腺移植及胰岛移植的现状.国外医学移植与血液净化分册 2005; 3: 29-31
- 6 胡礼炳,徐卓群.胰岛细胞移植的临床免疫问题.国外医学移植与血液净化分册 2005; 3: 32-35
- 7 Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343: 230-238
- 8 李涛,杜智,孙铭,周道标,孙以鲁,宋继昌,孙锦方. APA微囊猪胰岛的实验研究.中国生物医学工程学报 2005; 24: 507-509
- 9 Zwillich T. Diabetes research. Islet transplants not yet ready for prime time. *Science* 2000; 289: 531-533
- 10 金建,郑景晨.胰腺干细胞移植研究进展.医学综述

- 2005; 11: 1012-1013
- 11 孙超, 金晓龙, 肖家诚. 干细胞移植治疗糖尿病. 上海第二医科大学学报 2005; 25: 431-433
- 12 Kahan BW, Jacobson LM, Hullett DA, Ochoada JM, Oberley TD, Lang KM, Odorico JS. Pancreatic precursors and differentiated islet cell types from murine embryonic stem cells: an *in vitro* model to study islet differentiation. *Diabetes* 2003; 52: 2016-2024
- 13 Brolen GK, Heins N, Edsbacke J, Semb H. Signals from the embryonic mouse pancreas induce differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing beta-cell-like cells. *Diabetes* 2005; 54: 2867-2874
- 14 Magliocca JF, Odorico JS. Embryonic stem cell-based therapy for the treatment of diabetes mellitus: a work in progress. *Current Opinion in Organ Transplantation* 2006; 11: 88-93
- 15 Oh SK, Choo AB. Human embryonic stem cells: technological challenges towards therapy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33: 489-495
- 16 Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, Younan P, Imaeda H, Maeda M, Chan L. NeuroD-beta-cellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice. *Nat Med* 2003; 9: 596-603
- 17 Soria B, Roche E, Berna G, Leon-Quinto T, Reig JA, Martin F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 2000; 49: 157-162
- 18 Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, Schatz DA, Peck AB, Cornelius JG. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated *in vitro* from pancreatic stem cells. *Nat Med* 2000; 6: 278-282
- 19 李超英, 任智, 姜健. 糖尿病足的诊治进展. 心肺血管病杂志 2005; 24: 63-64
- 20 Dougherty MJ, Young LP, Calligaro KD. One hundred twenty-five concomitant endovascular and open procedures for lower extremity arterial disease. *J Vasc Surg* 2003; 37: 316-322
- 21 Staffa R, Leypold J, Vojtisek B. Pedal bypass versus PTA (percutaneous transluminal angioplasty) of the crural arteries. *Rozhl Chir* 2003; 82: 516-521
- 22 Gibbons GW, Locke CM. Assessing and treating peripheral vascular disease in diabetes. *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes* 2003; 10: 256-258
- 23 Faglia E, Mantero M, Caminiti M, Caravaggi C, De Giglio R, Pritelli C, Clerici G, Fratino P, De Cata P, Dalla Paola L, Mariani G, Poli M, Settembrini PG, Sciangula L, Morabito A, Graziani L. Extensive use of peripheral angioplasty, particularly infrapopliteal, in the treatment of ischaemic diabetic foot ulcers: clinical results of a multicentric study of 221 consecutive diabetic subjects. *J Intern Med* 2002; 252: 225-232

■同行评价

本文综述了糖尿病治疗方法上有前景的发展方向, 角度很好, 条理清晰, 参考文献全面、较新, 提供了较充足的有意义的临床信息。

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●

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

脂肪性肝病的实验室诊断

陆元善

■背景资料

脂肪性肝病是以肝脏内脂肪蓄积为特征的一类疾病,肝活检虽为其诊断金标准,并可帮助疾病分类及了解病变程度,但具有一定的创伤性,不适合动态随访,而且存在很大程度的取样误差,所以发展非创性影像学和实验室诊断学检查就显得尤为重要。

陆元善,上海交通大学附属第一人民医院检验科脂肪肝诊治中心 上海市 200080

通讯作者: 陆元善, 200080, 上海市虹口区武进路85号, 上海交通大学附属第一人民医院检验科脂肪肝诊治中心. luyuanshan@126.com

电话: 021-63240090-4306 传真: 021-63240825

收稿日期: 2006-05-10 接受日期: 2006-05-24

摘要

随着生活方式的改变,脂肪性肝病的发病率呈上升趋势,准确的诊断和确切的疗效观察是控制脂肪性肝病从良性向恶性转归的关键。活检虽为诊断金标准,但存在许多局限性;实验诊断学方法具有创伤小、可重复操作等优点,易被患者和临床所接受。现就影响脂肪性肝病形成的血浆脂质、胰岛素抵抗、细胞因子和遗传因素及脂肪在肝脏沉积后引起肝细胞炎症反应、肝细胞损伤、纤维化的实验室指标进行概述,希望能为临床脂肪性肝病的诊治提供方便。

关键词: 脂肪性肝病; 实验室诊断

陆元善. 脂肪性肝病的实验室诊断. 世界华人消化杂志 2006;14(21):2116-2122

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2116.asp>

0 引言

脂肪性肝病是以肝脏内脂肪蓄积为特征的一类疾病,肝活检虽为其诊断金标准,并可帮助疾病分类及了解病变程度,但具有一定的创伤性,不适合动态随访,而且存在很大程度的取样误差^[1],所以发展无创性影像学和实验室诊断学检查就显得尤为重要。近年来,通过动物实验和临床研究,脂肪性肝病的病因、形成及临床转归得到进一步了解,同时也建立了一些判断肝脏内有无脂肪蓄积以及肝内脂肪浸润程度、疾病严重程度、是否合并肝内炎症和纤维化的实验室监测指标,为动态随访、反映药物疗效和疾病的预后提供了很大的帮助。实验室指标可分成两类,一类是影响脂肪肝形成的指标,另一类为脂肪肝形成后所表现出的血液学指标的变化,现从这二个方面对可能用于脂肪肝的实验室诊断

指标进行总结,希望能给临床脂肪性肝病的诊断和治疗带来帮助。

1 影响脂肪肝形成的指标

脂肪性肝病的病理进程大致可分为2步,脂肪在肝脏的蓄积是该病的起因。脂肪在肝脏内沉积受多种因素的诱导,形成了不同的实验室检测策略。

1.1 血浆脂质 脂肪在肝脏的蓄积是脂肪性肝病形成的先决条件,肝脏是脂肪代谢重要靶器官,游离的脂肪酸进入肝脏,重新酯化变成三酰甘油(TG)贮存于脂肪组织或用作肌肉能量,游离脂肪酸也可在肝脏中以乳糜微粒残体形式存在,然后经TG脂酶水解。当脂肪酸代谢有利于脂质合成时,肝内TG就会堆积。对非乙醇性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)患者断面研究发现脂肪肝患者血清总胆固醇、TG、低密度脂蛋白胆固醇、载脂蛋白B、脂蛋白(a)及游离脂肪酸显著高于对照组,高密度脂蛋白胆固醇及载脂蛋白A1水平低于对照组^[2-4],餐后血脂水平高于对照^[5]。TG和高密度脂蛋白胆固醇与肝细胞内脂肪含量之间的相关系数分别为0.3和-0.35^[6],游离脂肪酸通过激活JNK信号通路诱导肝细胞发生脂调亡^[7]。

1.2 胰岛素抵抗 肝脏被认为胰岛素抵抗或代谢综合征损伤的主要靶器官,胰岛素抵抗与肝脏脂肪堆积有关^[8]。NAFLD个体空腹C肽、胰岛素、血糖、TG和尿酸增高^[3],基础游离脂肪酸增加,胰岛素介导-脂解抑制的有效性降低^[4,9]。空腹血糖和空腹胰岛素与肝细胞内脂肪含量之间的相关系数分别为0.47和0.56,多因素判别分析和多重线性回归分析发现空腹胰岛素是与其他人体测量和代谢物测量无关的预示肝细胞内脂肪含量和ALT浓度独立的预示因子^[6]。HOMA胰岛素抵抗是NAFLD的预示因子,比数比为2.38,95%可信限为1.52-5.74^[10]。实验室检测胰岛素抵抗指标较多,包括葡萄糖耐量试验、C肽/胰岛素比值、HOMA模型胰岛素抵抗评估法、定量胰岛素敏感性检测指数、葡萄糖钳夹技术等。

临床上最常用的是HOMA模型, 而最可靠的为葡萄糖钳夹技术. 对日本人群血清铁蛋白浓度与内脏脂肪(visceral fat area, VFA)和皮下脂肪(subcutaneous fat area, SFA)及肝脂肪含量的研究发现, 血清铁蛋白与肝脏脂肪含量呈负相关($r: 0.28, P < 0.0001$), 与VFA和SFA呈正相关, $r: 0.254$ 和 0.231 , 与HOMA胰岛素抵抗呈正相关($r: 0.286, P = 0.0008$), 提示血清铁蛋白浓度可作为评估系统性脂肪含量和胰岛素抵抗程度指标^[11].

1.3 细胞因子 大多数NAFLD患者有中心脂肪堆积^[4], 体脂增加. 增加的脂肪组织除具有储存能量的功能外, 还具有自/旁分泌功能. 瘦素、脂联素和TNF- α 是脂肪细胞分泌的对NAFLD的形成起重要作用的细胞因子. 瘦素主要是通过抑制食欲、促进外周的脂肪分解及抑制脂肪的合成来调节体脂肪的稳定^[12-13]. 同时还参与肝脏对脂质代谢的调节作用, 减少TG合成, 促进脂肪氧化. 动物实验发现, NAFLD大鼠血清瘦素水平升高、肝脏瘦素受体表达下降^[14]. NAFLD患者血清瘦素水平明显高于对照组, 脂肪肝患者瘦素水平的升高可能是瘦素产生抵抗, 致高瘦素血症^[15]. NAFLD患者的血清瘦素水平是升高的, 且与脂肪肝的发生、发展有关. 脂联素通过激活AMP激酶和PPAR γ 途径, 使得肝细胞脂肪酸氧化增加, 合成减少, 并抑制葡萄糖的生成, 从而降低肝细胞内TG和糖元含量, 改善胰岛素抵抗^[16-19]. 非肥胖NASH患者血清脂联素水平降低, 与胰岛素、TNF- α 等相比, 血清脂联素是区分坏死性炎症等级和纤维化分值高低的唯一指标^[5,9,20-21]. 血清脂联素与高密度脂蛋白胆固醇呈正相关^[10], 与TG呈负相关($r = -0.22, P = 0.04$), 空腹胰岛素负相关($r = -0.37, P < 0.01$), HOMA胰岛素抵抗负相关($r = -0.39, P < 0.01$)^[10,20]. 多重回归分析发现, 脂联素与肝脂肪变性和坏死性炎症及纤维化呈负相关, NASH患者的餐后血脂水平高于对照, 而且与空腹脂联素有关. 对照组脂肪餐后血清脂联素水平升高, 而NASH患者则表现为轻微下降, 是NASH患者肝脏脂肪变性程度的独立预示因子. 两组实验对象血清游离脂肪酸对脂肪餐后的反应与脂联素相反, 餐后脂肪代谢损伤可能是低脂联素血症、NASH及高心血管危险相联系的又一机制^[5], 低脂联素水平可能是NAFLD的预示因子^[20,22]. 多重回归分析发现, 脂联素对NAFLD有保护作用, 比数比为 0.22 , 95% 可信限为 $0.09-0.55$. 提示低脂联素血症和胰岛素抵抗与NAFLD有关^[10], 低脂联素血症是与

胰岛素抵抗无关的NASH特征, 脂联素水平降低与NAFLD肝细胞更广泛围坏死性炎症有关^[21]. 超质量儿童及NAFLD患儿的血清脂联素水平低于正常体质量儿童, 血清脂联素水平与体质量指数、胰岛素、血糖和ALT呈负相关, 提示脂联素在儿童NAFLD发病中同样起较为直接的作用^[23]. 与脂联素的生理作用相反, TNF- α 有降低胰岛素敏感性和趋炎作用. NASH患者血清TNF- α 水平高于对照^[21,24], 可溶性肿瘤坏死因子受体(soluble tumor necrosis factor receptor, sTNFR)被认为是较好的TNF- α 生成和炎症疾病严重程度的指示剂, 对NASH患者的研究发现, NASH伴明显纤维化或中等程度炎症患者的血清sTNFR水平较纤维化不明显或炎症较轻或对照高, 但sTNFR与脂肪沉积等级无关. sTNFR与NASH患者肝纤维化之间有显著相关^[25].

1.4 遗传因素 NASH与脂类、糖和能量代谢有关, β -肾上腺素能受体在调节能量消耗中起重要作用. 通过对251例日本男性的研究发现, β -肾上腺素能受体基因的16和27位的多态性在肥胖人群与正常人群之间无差异, 但Gly16纯合子的高密度脂蛋白胆固醇低于Arg16纯合子, Gln27Glu27杂合子的血清TG浓度高于Gln27Gln27纯合子. Gln27Glu突变杂合子脂肪肝发病率较高, 其比数为 1.92 , 95% 可信限为 $1.01-3.68$ ^[26]. 肝脂肪病变在 β -脂蛋白缺乏血症和纯合子低 β -脂蛋白血症个体中均有报道, 肝细胞脂蛋白分泌不足, 尤其是选择性载脂蛋白B100缺乏与肝脏脂肪病变有关. 载脂蛋白B合成不足导致前 β -脂蛋白(极低密度脂蛋白)合成减少, 从而不能有效地将肝脏脂类运出^[27-31]. 对微粒体TG转运蛋白启动子区-493 G/T和锰-SOD基因1183 T/C多态性研究发现, NASH患者TG转运蛋白G等位基因和锰-SOD T等位基因携带频率较高. 转运蛋白基因启动子区G等位基因导致转运蛋白合成降低, 肝细胞的脂质输出减少, G等位基因的携带者有更大范围的肝小叶区脂肪浸润; 由T等位基因翻译的锰-SOD进入线粒体较少, 使线粒体的抗氧化损伤能力下降^[32]. 胱硫醚合成酶缺乏可导致严重的高同型半胱氨酸血症, 患者中肝脏脂肪变性较为常见. 在NAFLD患者中, 同型半胱氨酸与TG、极低密度脂蛋白胆固醇、胰岛素及胰岛素抵抗指数呈正相关, 与叶酸、维生素B12负相关. NAFLD患者血清同型半胱氨酸显著高于其他组, NASH患者血清同型半胱氨酸显著高于NAFLD患者, 血清同型半胱氨酸能显著预示NASH中坏死性炎症

■ 研发前沿

目前对脂肪性肝病形成后的实验室指标研究较多, 但对影响脂肪肝形成的指标研究较少, 而脂肪在肝脏的蓄积是脂肪性肝病形成的先决条件.

■相关报道

对脂肪性肝病形成后肝纤维化的研究表明多指标的联合应用较单个指标更有价值,如FibroTest。但影响脂肪肝形成的指标联合应用较少,多为单个指标使用具有局限性。

的严重程度。血清同型半胱氨酸是区分NASH和NAFLD的指标之一^[33]。血色素沉着病是一种慢性铁超负荷状态,多余的铁在组织内沉积,HFE基因C282Y突变与血色素沉着病有关,H63D突变本身虽然不会引起血色素沉着病,但与C282Y突变相关联则与血色素沉着病有关。NASH患者中HFE C282Y和H63D突变的比率显著高于对照人群。突变者的血清铁蛋白,铁,转铁蛋白饱和度及肝可染铁均高于无突变者。突变者的ALT水平亦高于无突变者,有C282Y突变者的肝纤维化程度较无突变者重^[4,34-35]。抗胰蛋白酶是肝脏产生的蛋白酶抑制剂,抗胰蛋白酶缺乏可引起肝脏和肺部疾病,较常见的两个突变是S (Glu264Val)和Z (Glu342Lys)等位基因,突变蛋白以Schiff阳性、淀粉酶抵抗包含体形式沉积在肝细胞粗面内质网,引起肝细胞损伤。NAFLD患者携带有抗胰蛋白酶PiS等位基因的频率显著高于正常对照,血清 α 1-抗胰蛋白酶的水平显著低于对照,携带有抗胰蛋白酶PiS等位基因NAFLD患者血清铁蛋白水平高于其他患者,高血压的发病率高于其他患者^[34,36-37]。TNF- α 基因启动子的多态性与其合成增加有关。对TNF- α 基因启动子区238位和308位基因多态性分析发现,NAFLD患者238位的突变频率较对照高,TNF- α 基因启动子有突变的NAFLD患者具有较高的胰岛素抵抗指数和较严重的葡萄糖耐量受损。TNF- α 基因启动子区的多态性可能是胰岛素抵抗、NAFLD和NASH的易感基因^[38]。

2 脂肪肝形成后引起的血液学改变

肝脏发生脂肪性病变时肝细胞内蓄积的脂质可直接和/或通过氧应激和脂质过氧化导致肝细胞坏死或凋亡以及炎症反应。肝细胞膜的通透性发生改变,细胞内成分渗出或漏出,血液中相关成分的浓度发生变化。

2.1 肝酶类 1999-2002年开展的美国国家健康与营养评估调查(national health and nutrition examination survey, NHANES)发现,排除丙型肝炎患者和酗酒者,人群中血清ALT>716.8 nkat/L和/或AST>716.8 nkat/L者占9.8%,较1988-1994年的调查异常率高,但引起转氨酶升高因素与1988-1994年的NHANES相似,主要与BMI、腰围、TG及血糖增高有关,与非乙醇性脂肪性肝病危险因素之间存在较强的相关性^[39]。经年龄、性别、人种和饮酒量校正后,ALT、ALP和CRP浓度处于上1/4分布者发生代谢综合征的危

险性较处于下1/4分布者显著增加相比,高ALT发生代谢综合征的比数比为2.5 (95%可信限为1.38-4.51)、ALP的比数比为2.28 (95%可信限1.24-4.2)、CRP的比数比为1.33 (95%可信限为1.09-1.63)。AST/ALT比值处于上1/4者发生代谢综合征的危险性较下1/4者显著降低,其比数比为0.40 (95%可信限为0.22-0.74)。进一步,经腰围、胰岛素敏感指数、急性胰岛素反应和受损糖耐量校正后,ALT和AST/ALT比值与代谢综合征发生之间的相关性仍然存在^[40]。多元回归分析显示,内脏性肥胖、高瘦素血症和高胰岛素血症与血清ALT增高密切相关。与其他肝病所致转氨酶升高不同,NASH患者转氨酶升高常有如下特点:(1)通常为轻度升高,多在正常值上限的2-3倍以内,甚至仅为正常值范围偏高,而5-10倍以上增高者较少见^[41-43];(2)持续时间长,短期内一般无明显波动,除非能够有效控制体质量^[41-42];(3)通常无临床症状,鲜见肝炎相关表现;(4)与乙醇性肝病相比,NASH患者的脂肪变性程度要严重,以ALT升高为主,AST/ALT比值小于1,即使发生脂肪性肝硬化,其比值亦小于1.3,故与乙醇性肝炎两者比值通常大于2.0相鉴别^[44-45];(5)通常合并ALP和GGT轻度至中度增高,GGT增高幅度通常大于ALP^[44-45]。

2.2 炎症因子 脂肪变性可增加氧化应激反应,NASH患者的总抗氧化应激能力较对照低,平均总过氧化水平和氧化应激指数要高于对照^[46-47]。肝脏抗氧化酶活性在NAFLD患者中升高,红细胞和血浆铜/锌SOD、谷胱甘肽过氧化物酶和促酶活性显著高于对照,然而,红细胞和血浆抗氧化防护并不能反映肝细胞内的过氧化反应^[48]。胰岛素抵抗、氧化应激反应和较低程度的系统性炎症状况与儿童肥胖相关肝病有关。NASH肥胖儿童的血铁蛋白、C反应蛋白和红细胞谷胱甘肽过氧化物酶活性高于转氨酶、肝脏正常的肥胖儿童,且NASH肥胖儿童空腹葡萄糖/胰岛素比值、铁蛋白和C反应蛋白同时异常人数占41%^[49]。与对照相比NASH患者血浆超敏C反应蛋白、纤维蛋白原、IL-8、IL-18和TNF- α 水平和血浆纤溶酶原激活抑制因子-1活性等趋炎生化标志显著升高,趋炎生化标志与年龄、BMI、血压、HOMA胰岛素抵抗积分、血浆TG和肝脏酶活性无关,与内脏脂肪有关^[11,24,50]。非肥胖NASH患者血清脂联素水平降低,与胰岛素、TNF- α 等相比,血清脂联素是区分坏死性炎症等级和纤维化分值高低的唯一指标^[9]。氧应激诱导

硫氧还蛋白(thioredoxin, TRX)生成,与健康人群或单纯性脂肪性肝病患者相比,NASH患者血清TRX水平显著升高,与血清铁蛋白正相关,与肝组织铁负荷及组织学严重程度密切相关。如降低肝细胞铁负荷,血清TRX和ALT水平显著下降。铁相关的氧应激参与了NASH的病理进程,血清TRX是区分NASH与单纯性脂肪性肝病的指标之一^[51-52]。Haukeland *et al*^[53]对NAFLD患者的研究发现,NAFLD患者的血清IL-6、CC-化学因子配体2/单核细胞趋化蛋白-1(CC-chemokine ligand2/monocyte chemoattractant protein-1,CCL2/MCP-1)和CCL19水平升高,NASH患者的血清CCL2/MCP-1较单纯性脂肪性肝病患者高。NASH患者的高血清CCL2/MCP-1可能在从单纯性脂肪性肝病到NASH的转变过程中起重要作用。NASH患者的总抗氧化应激能力较对照低,平均总过氧化水平(total peroxide level)和氧化应激指数要高于对照,总过氧化水平与总抗氧化反应的比值作为氧化应激指数。在NASH患者中,纤维化分值与总过氧化水平正相关、与总抗氧化反应负相关、与氧化应激指数正相关(r : 0.607, -0.506和0.728),没有观察到坏死性炎症等级与氧化状况参数之间有相关性。结果提示NASH与氧化能力增加有关,特别是与伴肝纤维化相关^[46]。由于缺少准确的诊断NASH的临床或生化指标,排除乙醇性肝炎的诊断就很有必要。但较难获得患者的精确饮酒量,特别是女性患者。慢性酗酒的生化标志:血清AST、ALT、GGT、透明质酸、平均红细胞体积(MCV)和糖链缺乏转铁蛋白(CDT)。乙醇性肝炎患者血清AST、AST/ALT比值、GGT、CDT和MCV水平较NASH患者高,除CDT外,这些生化指标在许多NASH与乙醇性肝炎之间有交叉。NASH患者的血清CDT水平低于阈值,2.66%,乙醇性肝炎患者的血清CDT水平高于阈值。提示血清CDT水平可用于NASH和乙醇性肝炎之间的区分^[54]。

2.3 纤维化指标 纤维化是NASH患者中常见的组织学发现,但诱导因素不清楚。NASH患者的血清透明质酸水平显著高于对照,肝硬化患者的血清透明质酸水平显著高于NASH和对照组。NASH患者和肝硬化患者血清TNF- α 和IL-8水平高于对照组,血清透明质酸与IL-8, TNF- α , ALT和AST水平缺乏相关性^[18]。血清透明质酸在不同等级的纤维化中有显著差异,且与纤维化程度显著正相关,诊断性能分析发现:血清透明质酸诊断不同程度肝纤维化的ROC曲线下的面积

为0.67,诊断中等程度肝纤维化ROC曲线下的面积为0.87,诊断严重程度肝纤维化ROC曲线下的面积为0.89,诊断肝硬化的ROC曲线下的面积为0.92。若NAFLD患者中严重程度肝纤维化的发病率20%,血清透明质酸的阈值取值46.1 ng/L,其诊断严重程度肝纤维化ROC曲线下的面积最大,灵敏度为85%,特异性为80%,阳性预示值51%,阴性预示值96%,测定NAFLD患者血清透明质酸有助于诊断严重程度肝纤维化和监测从纤维化到肝硬化转变^[55]。

NAFLD肝纤维化患者血清层黏蛋白、透明质酸、IV型胶原和谷草转氨酶水平较对照组高,层黏蛋白单项诊断性能最佳,层黏蛋白与IV型胶原组合的诊断总有效率虽然与层黏蛋白单项相同,特异性也得到提高(从89%升到100%),但诊断灵敏度从82%下降到64%,测定血清中细胞外基质成分,特别是层黏蛋白对确定NAFLD患者的肝纤维化有帮助^[56]。NAFLD患者循环抗脂质过氧化抗体IgG水平高于对照组,相同的抗体在进行性肝纤维化或肝硬化中升高。Logistic回归分析发现,抗丙二醛抗体滴度高于参考阈值的NAFLD患者较抗体滴度在参考范围的NAFLD患者有较高的进行性肝纤维化/肝硬化危险性,相对危险度比为2.82,95%的可信限为1.35-5.90, $P = 0.007$ 。提示氧化应激启动的免疫反应是NAFLD进展到明显纤维化的独立预示因子^[57]。利用肝纤维化对AST和血小板的不同作用,AST与血小板的比值即APRI积分预示严重肝纤维化和肝硬化的ROC曲线下的面积分别为0.80和0.89。APRI积分是一种简单的又相对准确的慢性肝脏疾病患者肝脏纤维化标志物^[58]。Ratziu *et al*^[59]将纤维化程度分为5级,从无纤维化到肝硬化,分别用F0到F4表示,对包含 α 2微球蛋白、载脂蛋白A1、触珠蛋白、总胆红素、 γ -GT和坏死性炎症及ALT在内的纤维化指数FibroTest在NAFLD患者肝纤维化诊断性能进行了评价,发现NAFLD患者的FT值高于对照组,其诊断NAFLD患者F3F4 ROC曲线下的面积分别为0.81-0.92,如阈值取0.3,其阴性预示值为90%,敏感性77%,如阈值取0.7,其阳性预示值为73%,特异性为98%,FibroTest是一种简单的、非侵入的、可靠地预示NAFLD患者肝纤维化的定量估价方法^[60-61]。

以上对目前常用的一些脂肪性肝病的实验室诊断指标进行了总结,随着对脂肪性肝病病理进程的进一步认识和生物技术的发展,新的

■创新盘点

本文对近年建立的一些判断肝脏内有无脂肪蓄积以及肝内脂肪浸润程度、疾病严重程度、是否合并肝内炎症和纤维化的实验室监测指标进行总结,希望能给临床脂肪性肝病的诊断和治疗带来帮助。

■应用要点

脂肪细胞因子对脂肪性肝病的辅助诊断价值较大,多指标的联合应用对脂肪性肝病形成后肝纤维化的诊断更有价值。

检测手段和指标会越来越多,如何选择诊断性能较佳的早期指标是临床和实验室所面临的新问题。

3 参考文献

- 1 Ratzliff V, Charlotte F, Heurtier A, Gombert S, Giral P, Bruckert E, Grimaldi A, Capron F, Poynard T. Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2005; 128: 1898-1906
- 2 Yang MH, Son HJ, Sung JD, Choi YH, Koh KC, Yoo BC, Paik SW. The relationship between apolipoprotein E polymorphism, lipoprotein (a) and fatty liver disease. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 1832-1835
- 3 Targher G, Bertolini L, Scala L, Zoppini G, Zenari L, Falezza G. Non-alcoholic hepatic steatosis and its relation to increased plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction in non-diabetic men. Role of visceral adipose tissue. *Diabet Med* 2005; 22: 1354-1358
- 4 Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001; 50: 1844-1850
- 5 Musso G, Gambino R, Durazzo M, Biroli G, Carello M, Faga E, Pacini G, De Michieli F, Rabbione L, Premoli A, Cassader M, Pagano G. Adipokines in NASH: postprandial lipid metabolism as a link between adiponectin and liver disease. *Hepatology* 2005; 42: 1175-1183
- 6 Ardigo D, Numeroso F, Valtuena S, Franzini L, Piatti PM, Monti L, Delsignore R, Reaven GM, Zavaroni I. Hyperinsulinemia predicts hepatic fat content in healthy individuals with normal transaminase concentrations. *Metabolism* 2005; 54: 1566-1570
- 7 Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW, Gores GJ. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *J Biol Chem* 2006; 281: 12093-12101
- 8 Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis and the metabolic syndrome. *Am J Med Sci* 2005; 330: 326-335
- 9 Musso G, Gambino R, Biroli G, Carello M, Faga E, Pacini G, De Michieli F, Cassader M, Durazzo M, Rizzetto M, Pagano G. Hypoadiponectinemia predicts the severity of hepatic fibrosis and pancreatic Beta-cell dysfunction in nondiabetic nonobese patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2438-2446
- 10 Yoon D, Lee SH, Park HS, Lee JH, Park JS, Cho KH, Kim SM. Hypoadiponectinemia and insulin resistance are associated with nonalcoholic fatty liver disease. *J Korean Med Sci* 2005; 20: 421-426
- 11 Iwasaki T, Nakajima A, Yoneda M, Yamada Y, Mukasa K, Fujita K, Fujisawa N, Wada K, Terauchi Y. Serum ferritin is associated with visceral fat area and subcutaneous fat area. *Diabetes Care* 2005; 28: 2486-2491
- 12 Sahu A. Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Front Neuroendocrinol* 2003; 24: 225-253
- 13 Ahima RS. Central actions of adipocyte hormones. *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16: 307-313
- 14 陆元善, 范建高, 方继伟, 丁晓东, 杨兆瑞. 瘦素及硬脂

酰CoA去饱和酶-1在高脂饮食大鼠非酒精性脂肪肝发病中的作用. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2327-2331

- 15 Tobe K, Ogura T, Tsukamoto C, Imai A, Matsuura K, Iwasaki Y, Shimomura H, Higashi T, Tsuji T. Relationship between serum leptin and fatty liver in Japanese male adolescent university students. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 3328-3335
- 16 Whitehead JP, Richards AA, Hickman IJ, Macdonald GA, Prins JB. Adiponectin-a key adipokine in the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab* 2006; 8: 264-280
- 17 Ma K, Cabrero A, Saha PK, Kojima H, Li L, Chang BH, Paul A, Chan L. Increased beta -oxidation but no insulin resistance or glucose intolerance in mice lacking adiponectin. *J Biol Chem* 2002; 277: 34658-34661
- 18 Shibata R, Ouchi N, Kihara S, Sato K, Funahashi T, Walsh K. Adiponectin stimulates angiogenesis in response to tissue ischemia through stimulation of amp-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 2004; 279: 28670-28674
- 19 Combs TP, Pajvani UB, Berg AH, Lin Y, Jelicks LA, Laplante M, Nawrocki AR, Rajala MW, Parlow AF, Cheeseboro L, Ding YY, Russell RG, Lindemann D, Hartley A, Baker GR, Obici S, Deshaies Y, Ludgate M, Rossetti L, Scherer PE. A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity. *Endocrinology* 2004; 145: 367-383
- 20 Sargin H, Sargin M, Gozu H, Orcun A, Baloglu G, Ozisik M, Seker M, Uygur-Bayramicli O. Is adiponectin level a predictor of nonalcoholic fatty liver disease in nondiabetic male patients? *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5874-5877
- 21 Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology* 2004; 40: 46-54
- 22 Targher G, Bertolini L, Rodella S, Zoppini G, Scala L, Zenari L, Falezza G. Associations between plasma adiponectin concentrations and liver histology in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 64: 679-683
- 23 Louthan MV, Barve S, McClain CJ, Joshi-Barve S. Decreased serum adiponectin: an early event in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *J Pediatr* 2005; 147: 835-838
- 24 Bahcecioglu IH, Yalniz M, Ataseven H, Ilhan N, Ozercan IH, Seckin D, Sahin K. Levels of serum hyaluronic acid, TNF-alpha and IL-8 in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 1549-1553
- 25 Tokushige K, Hashimoto E, Tsuchiya N, Kaneda H, Taniai M, Shiratori K. Clinical significance of soluble TNF receptor in Japanese patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29: 298S-303S
- 26 Iwamoto N, Ogawa Y, Kajihara S, Hisatomi A, Yasutake T, Yoshimura T, Mizuta T, Hara T, Ozaki I, Yamamoto K. Gln27Glu beta2-adrenergic receptor variant is associated with hypertriglyceridemia and the development of fatty liver. *Clin Chim Acta* 2001; 314: 85-91
- 27 Ogata H, Akagi K, Baba M, Nagamatsu A, Suzuki N, Nomiya K, Fujishima M. Fatty liver in a case with heterozygous familial hypobetalipoproteinemia. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 339-342
- 28 Chen Z, Fitzgerald RL, Li G, Davidson NO, Schon-

- feld G. Hepatic secretion of apoB-100 is impaired in hypobetalipoproteinemic mice with an apoB-38.9-specifying allele. *J Lipid Res* 2004; 45: 155-163
- 29 Whitfield AJ, Marais AD, Robertson K, Barrett PH, van Bockxmeer FM, Burnett JR. Four novel mutations in APOB causing heterozygous and homozygous familial hypobetalipoproteinemia. *Hum Mutat* 2003; 22: 178
- 30 Schonfeld G, Patterson BW, Yablonskiy DA, Tanoli TS, Averna M, Elias N, Yue P, Ackerman J. Fatty liver in familial hypobetalipoproteinemia: triglyceride assembly into VLDL particles is affected by the extent of hepatic steatosis. *J Lipid Res* 2003; 44: 470-478
- 31 Tarugi P, Lonardo A, Ballarini G, Erspamer L, Tondelli E, Bertolini S, Calandra S. A study of fatty liver disease and plasma lipoproteins in a kindred with familial hypobetalipoproteinemia due to a novel truncated form of apolipoprotein B (APO B-54.5). *J Hepatol* 2000; 33: 361-370
- 32 Namikawa C, Shu-Ping Z, Vyselaar JR, Nozaki Y, Nemoto Y, Ono M, Akisawa N, Saibara T, Hiroi M, Enzan H, Onishi S. Polymorphisms of microsomal triglyceride transfer protein gene and manganese superoxide dismutase gene in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2004; 40: 781-786
- 33 Gulsen M, Yesilova Z, Bagci S, Uygun A, Ozcan A, Ercin CN, Erdil A, Sanisoglu SY, Cakir E, Ates Y, Erbil MK, Karaeren N, Dagalp K. Elevated plasma homocysteine concentrations as a predictor of steatohepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1448-1455
- 34 Whitfield AJ, Barrett PH, Robertson K, Havlat MF, van Bockxmeer FM, Burnett JR. Liver dysfunction and steatosis in familial hypobetalipoproteinemia. *Clin Chem* 2005; 51: 266-269
- 35 Bonkovsky HL, Jawaide Q, Tortorelli K, LeClair P, Cobb J, Lambrecht RW, Banner BF. Non-alcoholic steatohepatitis and iron: increased prevalence of mutations of the HFE gene in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 1999; 31: 421-429
- 36 Ishak KG. Inherited metabolic diseases of the liver. *Clin Liver Dis* 2002; 6: 455-479, viii
- 37 Valenti L, Dongiovanni P, Guzzo A, Colombo S, Loria P, Piperno A, Casiraghi A, Ceriani R, Fracanzani AL, Fargion S. Increased prevalence of PiS α 1-antitrypsin allele in Italian patients with non alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2005; 42: 241
- 38 Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Santorelli G, Branchi A, Taioli E, Fiorelli G, Fargion S. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 274-280
- 39 Ioannou GN, Boyko EJ, Lee SP. The prevalence and predictors of elevated serum aminotransferase activity in the United States in 1999-2002. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 76-82
- 40 Hanley AJ, Williams K, Festa A, Wagenknecht LE, D'Agostino RB Jr, Haffner SM. Liver markers and development of the metabolic syndrome: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* 2005; 54: 3140-3147
- 41 Park SH, Kim BI, Kim HJ, Kim H, Kim SH, Park DI, Cho YK, Sung IK, Sohn CI, Jeon WK, Keum DK. Clinical features associated with improvement of fatty liver disease. *Intern Med J* 2005; 35: 473-477
- 42 Agarwal SR, Malhotra V, Sakhuja P, Sarin SK. Clinical, biochemical and histological profile of nonalcoholic steatohepatitis. *Indian J Gastroenterol* 2001; 20: 183-186
- 43 Kunde SS, Lazenby AJ, Clements RH, Abrams GA. Spectrum of NAFLD and diagnostic implications of the proposed new normal range for serum ALT in obese women. *Hepatology* 2005; 42: 650-656
- 44 Kojima H, Sakurai S, Uemura M, Takekawa T, Morimoto H, Tamagawa Y, Fukui H. Difference and similarity between non-alcoholic steatohepatitis and alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29: 259S-263S
- 45 Sorbi D, Boynton J, Lindor KD. The ratio of aspartate aminotransferase to alanine aminotransferase: potential value in differentiating nonalcoholic steatohepatitis from alcoholic liver disease. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1018-1022
- 46 Horoz M, Bolukbas C, Bolukbas FF, Sabuncu T, Aslan M, Sarifakiogullari S, Gunaydin N, Erel O. Measurement of the total antioxidant response using a novel automated method in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *BMC Gastroenterol* 2005; 5: 35
- 47 Nobili V, Pastore A, Gaeta LM, Tozzi G, Comparcola D, Sartorelli MR, Marcellini M, Bertini E, Piemonte F. Glutathione metabolism and antioxidant enzymes in patients affected by nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Chim Acta* 2005; 355: 105-111
- 48 Perlemuter G, Davit-Spraul A, Cosson C, Conti M, Bigorgne A, Paradis V, Corre MP, Prat L, Kuoch V, Basdevant A, Pelletier G, Oppert JM, Buffet C. Increase in liver antioxidant enzyme activities in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2005; 25: 946-953
- 49 Mandato C, Lucariello S, Licenziati MR, Franzese A, Spagnuolo MI, Ficarella R, Pacilio M, Amitrano M, Capuano G, Meli R, Vajro P. Metabolic, hormonal, oxidative, and inflammatory factors in pediatric obesity-related liver disease. *J Pediatr* 2005; 147: 62-66
- 50 Vecchiet J, Falasca K, Cacciatore P, Zingariello P, Dalessandro M, Marinopicolli M, D'Amico E, Palazzi C, Petrarca C, Conti P, Pizzigallo E, Guagnano MT. Association between plasma interleukin-18 levels and liver injury in chronic hepatitis C virus infection and non-alcoholic fatty liver disease. *Ann Clin Lab Sci* 2005; 35: 415-422
- 51 Nakashima T, Sumida Y, Furutani M, Hirohama A, Okita M, Mitsuyoshi H, Itoh Y, Okanoue T. Elevation of serum thioredoxin levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res* 2005
- 52 Sumida Y, Nakashima T, Yoh T, Furutani M, Hirohama A, Kakisaka Y, Nakajima Y, Ishikawa H, Mitsuyoshi H, Okanoue T, Kashima K, Nakamura H, Yodoi J. Serum thioredoxin levels as a predictor of steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2003; 38: 32-38
- 53 Haukeland JW, Damas JK, Konopski Z, Loberg EM, Haaland T, Goverud I, Torjesen PA, Birkeland K, Bjoro K, Aukrust P. Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. *J Hepatol* 2006; 44: 1167-1174
- 54 Ohtsuka T, Tsutsumi M, Fukumura A, Tsuchishima M, Takase S. Use of serum carbohydrate-deficient transferrin values to exclude alcoholic hepatitis from non-alcoholic steatohepatitis: a pilot study.

同行评价

本文对影响脂肪性肝病形成的血浆脂质、胰岛素抵抗、细胞因子和遗传因素及脂肪在肝脏沉积后引起肝细胞炎症反应、肝细胞损伤、纤维化的实验室指标进行了较全面而深入的综述,内容新颖且具有实用性。

- Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29: 236S-239S
- 55 Suzuki A, Angulo P, Lymp J, Li D, Satomura S, Lindor K. Hyaluronic acid, an accurate serum marker for severe hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2005; 25: 779-786
- 56 Santos VN, Leite-Mor MM, Kondo M, Martins JR, Nader H, Lanzoni VP, Parise ER. Serum laminin, type IV collagen and hyaluronan as fibrosis markers in non-alcoholic fatty liver disease. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38: 747-753
- 57 Albano E, Mottaran E, Vidali M, Reale E, Saksena S, Occhino G, Burt AD, Day CP. Immune response towards lipid peroxidation products as a predictor of progression of non-alcoholic fatty liver disease to advanced fibrosis. *Gut* 2005; 54: 987-993
- 58 Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, Lok AS. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 518-526
- 59 Ratziu V, Massard J, Charlotte F, Messous D, Imbert-Bismut F, Bonyhay L, Tahiri M, Munteanu M, Thabut D, Cadranet JF, Le Bail B, de Ledinghen V, Poynard T. Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol* 2006; 6: 6
- 60 Munteanu M, Messous D, Thabut D, Imbert-Bismut F, Jouys M, Massard J, Piton A, Bonyhay L, Ratziu V, Hainque B, Poynard T. Intra-individual fasting versus postprandial variation of biochemical markers of liver fibrosis (FibroTest) and activity (ActiTest). *Comp Hepatol* 2004; 3: 3
- 61 Poynard T, Imbert-Bismut F, Munteanu M, Ratziu V. FibroTest-FibroSURE: towards a universal biomarker of liver fibrosis? *Expert Rev Mol Diagn* 2005; 5: 15-21

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 •

2006上海中日早期胃肠肿瘤国际研讨会通告

本刊讯 由上海市胃肠肿瘤重点学科、日本早期胃癌检诊协会、上海交通大学瑞金医院消化肿瘤学科群共同主办“2006上海中日早期胃肠肿瘤国际研讨会”将于2006-11-09/11在上海召开。

1 会议内容

由日本及香港专家主讲: 功能性消化不良和早期胃癌的临床识别; 根除*H pylori*预防胃癌研究; 内镜诊断早期胃癌的深度及组织学类型; 早期胃癌EMR、ESD及外科手术治疗; 早期胃癌和大肠癌标本处理及病理检查规范及国际共识意见; 大肠锯齿状腺瘤、大肠癌及新生癌的诊断, 外科手术及综合治疗。

由中国专家主讲: 放大内镜诊断早期胃癌; 中国早期胃癌临床现状及前景; 胃肠肿瘤腹腔镜治疗; 大肠侧向生长型肿瘤诊治; 大肠癌早期诊断及筛查; 胶囊内镜、双气囊小肠镜及小肠超声内镜诊断小肠肿瘤及临床评估。

2 征文

征文内容包括胃癌、大肠癌、小肠肿瘤基础研究、流行病学调查, 早期胃肠癌诊断及治疗。论文(电子版)按中华消化杂志格式书写附500字以内中文摘要, 欢迎网上投稿。截止日期: 2006-08-10。来稿寄至: 上海市瑞金二路197号上海瑞金医院消化科 汤美萍 (请写明2006胃肠肿瘤大会稿件), 邮政编码: 200025。联系电话: 021-64370045-665246, E-mail: wuyunlin1951@163.com。

会议将授予国家继续教育 I 类学分8分。

RNAi的作用机制及抗病毒研究进展

陈煜, 谢小芳

陈煜, 谢小芳, 福建农林大学生命科学学院 福建省福州市 350002

通讯作者: 陈煜, 350002, 福建省福州市, 福建农林大学生命科学学院. Chenyuy521@126.com

电话: 0591-87694239

收稿日期: 2006-03-30 接受日期: 2006-05-22

摘要

由于RNAi具有特异性的抑制甚至关闭相关序列基因表达的特点, 已应用于重大传染病治疗、肿瘤治疗、基因功能研究和新基因的发现等领域. 现对近年来有关RNAi的机制、抗病毒应用及前景作一综述.

关键词: RNAi; 抗病毒

陈煜, 谢小芳. RNAi的作用机制及抗病毒研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(21):2123-2129

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2123.asp>

0 引言

RNAi (RNA interference)是1995年康奈尔大学Guo博士试图阻断线虫基因表达时被意外发现的, 是指内源或外源双链RNA (double-stranded RNA, dsRNA)分子在基因转录水平上关闭相应序列基因转录所致的细胞内有效、特异性的基因封闭. 其主要借助转录后加工特异性抑制目标mRNA的生成, 并导致相应蛋白合成的减少甚至停止. 1998年Fire将这一发现正式命名为转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS). 他广泛存在于生物界, 是生物体抵御病毒或其他外来核酸入侵而保持自身遗传稳定的保护性机制. 目前已在果蝇、真菌、昆虫、植物以及哺乳动物中均发现了RNAi现象, 由于其高效率、高特异性等特点, 一些科学家已将其以基因治疗的方式应用于一些重大传染病的治疗, 如HIV和HBV. 同时, 由于RNAi具有基因敲除的功能, 所以作为反向遗传学的工具已被广泛应用于基因功能的研究和新基因的发现. 现就其作用机制、抗病毒研究及应用前景和存在的问题进行综述.

1 RNAi的机制

1.1 RNAi的起始阶段 RNAi的一般机制是内源性或外源性dsRNA被切割成21-23 nt长度的小干扰RNA (small interference RNA, siRNA), 该过程由Dicer完成, Dicer是RNaseIII的成员之一. Brantl^[1]报道Dicer有以下结构域: 1个与Argonaute家族同源的PAZ结构域, 2个RNAase活性结构域, 1个dsRNA结合结构域, 1个DEAH/DCXH RNA解旋酶活性结构域. Dicer的处理结果是形成siRNA的复合物, 该复合物5'端磷酸化和3'羧基末端具有2-3个游离核苷酸. Chiu *et al*^[2]对siRNA的2'端的化学修饰研究表明, RNAi的过程并不需要2'羟基对siRNA的识别, 通过2'氟尿嘧啶和2'氟胞嘧啶的应用, 明显增加了siRNA的半衰期, 并延长了RNAi的作用. 利用该方法对人周期蛋白T1进行了研究, 发现在很长一段时间内能有效沉默内源性人类基因.

1.2 RNAi持续阶段或放大阶段 随后, 这些siRNA被RNA诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)识别, 现有研究表明, RISC包含有Argonaute蛋白家族的多个成员, 可能有转运siRNA到RISC上的功能, Hannon *et al*在果蝇S2细胞的提取物中也检测到Dicer与Argonaute的相互作用. siRNA与RISC结合后, RISC被活化, 大小为100 kDa, 活化的RISC复合物通过ATP依赖的过程促进siRNA的解旋, 解旋酶包括QDE-3, MUT-6, MUT-14. Chiu *et al*^[2]研究表明, siRNA结构的5'端的完整性对于RNAi非常重要, 而不是其3'端, 这表明siRNA对解旋起始的识别具有不对称的性质. 解旋的反义链指引活化的RISC到互补的mRNA并与之结合, 然后siRNA与mRNA换位, 再由RISC将靶mRNA切割成21-23 nt片段, 这些片段由于缺少PolyA尾巴及特定的头部而很易被降解, 导致翻译受阻, 产生转录后基因沉默(PTGS). 换位后的siRNA可继续充当起始诱导物, 重复参与PTGS过程, 产生级联放大效应, 同时siRNA可在(RNA依赖的RNA聚合酶)RdRp作用下大量扩增, 并且转运出细胞,

■背景资料

康奈尔大学Guo博士于1995年发现RNAi. 随后一些研究人员证实, 在果蝇、真菌、昆虫、植物等生物及哺乳动物细胞中也存在RNAi现象. 本文综述了自2000年以来该现象的研究机制以及应用于爱滋病病毒、乙肝病毒、丙肝病毒、流感病毒以及其他病毒病的治疗的最新进展.

■研究前沿

在RNAi机制方面,由于RNAi应用于动物病毒病的治疗上存在siRNA半衰期短的问题,因此对siRNA的2'羟基的化学修饰研究、siRNA的结构以及反义链与目标mRNA复合物的双螺旋结构进行了深入的研究。在应用方面,研发出了不同的可表达siRNA的载体以及制作方法,同时对使用不同启动子的载体对细胞的特异性也进行了比较。在抗病毒方面,HIV受到了很大的关注,针对病毒复制的各个时期采用了不同的策略,取得一定的效果。在其他病毒病的治疗中,RNAi也显示出其美好的前景。

扩散至整个机体。siRNA还可作为一种特殊的引物,利用RdRp,以靶mRNA为模板,合成新的dsRNA,后者又被RISC降解成为新的siRNA,新合成的siRNA又进入上述循环,这一过程被称为随机降解PCR反应(random degradative PCR)^[3]。

1.3 RNAi的效应阶段 目标mRNA被活化的RISC在单一位点切割。此过程要求反义链的5'端的磷酸化必须发生,同时反义链与目标mRNA复合物的双螺旋必须是A型^[4]。DNA-RNA杂合子不能诱导RNAi,其失败的主要原因是双螺旋的结构,A型双螺旋是决定RNAi的决定因素。Cummins *et al*^[5]基于循环二色性色谱的分析表明,DNA-RNA杂合子是介于A型双螺旋与B型双螺旋之间的一种结构。RISC的核酸部分起靶向性作用,蛋白质部分起降解mRNA的作用,使得靶基因发生转录后沉默。

1.4 哺乳动物细胞中的RNAi 哺乳动物RNAi与其他真核生物RNAi之间一个明显的区别是哺乳动物细胞中对于RNAi的长期持续存在缺少放大系统。例如,果蝇中,大约35个dsRNA可使1000个拷贝的目标mRNA沉默并且可持续存在几个世代^[6-7]。而在哺乳动物细胞中,RNAi平均只存在66 h,因为siRNA经过几代细胞分裂而被稀释^[4]。在苍蝇和其他低等真核生物中的放大现象可归于3方面的原因:(1)是由Dicer切割dsRNA成较小的siRNA的过程增加了放大的程度,然而在哺乳动物细胞中,长的起引发作用的dsRNA会激发干扰素应答,其可激活蛋白激酶PKR^[8]。这就表明,除非siRNA转染在哺乳动物细胞中没有引起其他副作用并成功引发RNAi,否则想通过对长的dsRNA的切割处理而实现放大现象将不会发生;(2)是RdRp的存在,RdRp已在植物、蠕虫和真菌中发现。RdRp是扩增目标mRNA的基本条件,他通过一个随机降解PCR的模式^[9-11],把目标mRNA扩增成dsRNA。然而,在哺乳动物细胞中还没有发现RdRp的同源物,而且RdRp依赖的降解PCR所需的3'羟基并不是哺乳动物RNAi所必须的^[12-13]。所以基于PCR的放大效应在哺乳动物细胞中不太可能发生;(3)或许是,在靶向及切割mRNA过程中,RISC的酶的转化率较高,导致RNAi效率降低。

在哺乳动物细胞中存在两种竞争dsRNA的途径:大于30 nt的长双链RNA可激活两种酶,一种为无活性蛋白激酶,激活后使翻译起始因子eIF2a磷酸化;另一种为无活性2',5'-寡腺苷酸合成酶,激活后使RNaseL激活,两者的特点是特异

性不强,可降解所有mRNA及抑制所有蛋白质合成,从而引起细胞死亡,所以目前应用于哺乳动物细胞的dsRNA的长度一般在21 nt左右。同时科学家们还发现了RNA介导的同源DNA甲基化(RdDM)现象,即在RNAi的PTGS机制中产生了引导同源mRNA降解的siRNA,与此引导RNA序列互补的短至30 nt的DNA序列可被甲基化,位点是DNA序列中的胞嘧啶,如甲基化发生于编码区,则转录正常进行,产生PTGS;若发生于启动子区则阻断转录而发生转录水平基因沉默(transcriptional gene silence, TGS)^[14]。

1.5 植物中的RNAi 转基因引发的基因沉默还可发生在转录阶段,称为转录阶段基因沉默。TGS与PTGS不同,TGS是不传递的,没有级联放大效应。Wassenegger *et al*^[15]首先表明在植物中,RNA介导的沉默结果经常是DNA的甲基化;同时Mette *et al*^[16]以拟南芥和烟草为研究对象也证明dsRNA是转录沉默和DNA甲基化的主要原因;Allshire^[17]通过对转基因植物的研究发现,基因沉默也可以发生在转录水平。TGS的原因可能是基因启动子的甲基化导致RNA合成减少;或是DNA异位配对的结果;或是dsRNA诱导的转基因启动子灭活的结果。siRNA在细胞核内与一种甲基化酶相互作用,引导同源的DNA序列甲基化^[18],产生TGS。除了siRNA,Llave *et al*^[19]和Doench *et al*^[20]报道还存在一些其他的沉默信号,如:Micro-RNAs(miRNAs)。Ahlquist^[21]报道在植物体内,RNAi还可以通过PTGS的干扰物实现,如P25(一种马铃薯病毒)运动蛋白可诱导马铃薯体内的基因沉默。植物转录水平的沉默中包括以下几个保守的原件:Argonaute4(ago4),Dicer样3(Dicer-like 3)和RNA依赖的RNA聚合酶2(RNA dependent RNA polymerase 2, RDRP2)^[22-24]。

2 siRNA的来源

2.1 化学合成 直接通过化学方法合成两条互补的21-23 nt RNA单链,然后退火形成双链siRNA。这是最早应用的方法,不过该方法成本较高。

2.2 体外转录合成 通过T7 RNA聚合酶,体外转录合成两条互补的21-23 nt RNA单链,然后退火形成双链siRNA。该方法适用于筛选最有效的siRNA,尤其是需要制备多个siRNA而化学合成的成本较高时,但该方法不适用于特定siRNA进行长期研究。

2.3 用RNase III消化长片段dsRNA 用体外转录的方法制备200-1000 bp的dsRNA,然后用RNase III

(或Dicer)在体外消化, 得到各种不同的siRNA的混合物. 该方法省时、省力, 但缺点是有可能导致非特异性的基因沉默, 特别是与之同源或密切相关的基因.

2.4 利用质粒或病毒载体表达siRNA 通过转染含有RNA聚合酶II启动子U6或H1, 及其下游一小段特殊结构的质粒或病毒载体到宿主细胞体内, 转录出短发夹RNA (short hairpin RNA, shRNA), 有的学者在表达载体的同一启动子下加入报告基团, 如绿色荧光蛋白基因^[25], 使表达产物的检测更趋于简单化. 转录出的shRNA在胞内被Dicer酶剪切成siRNA. 该方法的优点是细胞特异性强. 也有使用聚合酶III的启动子的, 包括U6, H1和tRNA启动子, 但这些启动子的弊端是特异性不高, 可导致非靶序列的沉默和非特异性结果, 例如干扰素的应答和细胞毒性反应^[26-27].

2.5 PCR方法 利用引物延伸法进行PCR, 产生包含一个RNA聚合酶III启动子U6或H1、一小段编码shRNA的DNA模板和一个RNA聚合酶III终止位点的表达框架, 然后直接转染到细胞内表达shRNA. 其主要缺点是很难转染到细胞中^[28], 但一旦转染成功可建立稳定的细胞系.

3 RNAi抗病毒的研究

由于RNAi可以特异性地抑制基因表达, 所以可用于病毒感染的治疗及预防. 目前病毒病的治疗主要依赖于药物和干扰素, 但此两者随着时间的推移一些弊端就显露出来, 药物的长期应用产生了耐药性病毒株, 而且一种新药的开发需要几年、十几年甚至几十年的时间; 而干扰素是由细胞产生的一种非特异性的反应, RNAi的出现为抗病毒研究提供了新思路, 为病毒病的治疗带来了美好的前景.

3.1 防治HIV *Jacque et al*^[29]针对HIV-1复制的早期和晚期, 设计针对HIV-1基因组不同区域的siRNAs, 并转染人类细胞系、原始淋巴细胞及CD4⁺HeLa细胞, 结果证明RNAi能够降低HIV-1基因组的RNA. *Sijen et al*^[30]针对HIV-1共同受体CXCR4设计的siRNA可高效抑制细胞表面CXCR4蛋白的表达, 阻断HIV-1株对CXCR4-U87-C细胞的急性感染, 并抑制病毒复制. *Boden et al*^[31]建立了经修饰的、来源于tRNA甲硫氨酸(MTD)的启动子, 可靠、高效的驱动了HIV-1特异的siRNA于细胞内表达. MTD启动子被用于驱动针对HIV-1转移刺激因子蛋白tat的shRNA

时, 和其他几个聚合酶III启动子如H1, U6+1和U6+27比较起来对病毒产量产生高达56%的抑制. *Lee et al*^[32]将慢病毒载体应用于HIV-1的治疗, 研究对象为HIV-1的tat转录因子和细胞的CCR5. 该载体可稳定表达特异性的针对HIV-1 tat转录因子和细胞的共受体, CCR5的siRNA, 结果诱导了选择性地降解他们的目标mRNA, 从而免受HIV-1感染. 通过阻断特异性病毒基因表达和应用病毒载体来稳定表达合适的siRNA以阻断细胞基因的表达, 该策略可使细胞免受HIV-1的吸附而达到预防的目的. *Pusch et al*^[33]证明, shRNA的中部和5'端区域的突变对shRNA的RNAi的效果影响最大. *Boden et al*^[34]将编码靶向HIV-1转录激活因子蛋白-tat的siRNA合并到人miR-30的miRNA前体骨架中, 于细胞中表达tat. 结果被当作miRNA前体运输的tat的siRNA比被表达为传统的siRNA在降低HIV-1 p24抗原产生上的效率高80%, 暗示该策略能被用于增加RNAi的抗病毒潜力.

亲环素(CyPA)并不是细胞活力所需, 但他是HIV-1复制所必须的, 因此*Liu et al*^[35]试图阻断他的合成来抑制HIV-1的复制. 他们使用了可干扰CyPA mRNA前体的切割反义U7小核RNA(snRNA)和靶向CyPA mRNA的小干扰RNA(siRNA). 结果表明, 对CyPA蛋白有很强的抑制作用. 同时证明使用慢病毒载体作为转导方式可延长该抑制效果. *Dave et al*^[36]以HIV-1的gp41, nef, tat和rev基因为靶子, 设计了针对他们的siRNA, 结果表明他们的转录产物被切割, 同时病毒的组装受到很大的影响, 从整体上抑制了病毒的产生. *Arrighi et al*^[37]利用表达shRNA的慢病毒载体来研究未成熟的树突状细胞表达的树突状细胞特异性细胞间黏附分子3-结合非整合素因子(DC-SIGN)-DC209对于预防HIV-1的作用, 结果表明DC-SIGN受到了明显的抑制, 而且抑制了HIV-1的gp120包膜糖蛋白对DC-SIGN的吸附, 进一步证明了DC-SIGN在感染性病毒从DC到T细胞转移过程中的重要角色. *Leonard et al*^[38]建立了一个新的随机计算模型, 在HIV基因组水平上同时对多个位点进行打靶提供数量预测, 该模型要求导入系统必须是相当高效的以排除其他未感染病毒的细胞. *Anderson et al*^[39]用包含CXCR4和CCR5 shRNA表达盒的双特异性XHR慢病毒载体转化CD34⁺细胞, 该细胞培养在包含细胞因子的培养基中产生了形态上的正常转基因巨噬细胞. 在巨噬细胞中产生了对共受体的

下调, 体外攻毒试验表明对包含R5和X4的HIV-1产生了抗性. FACS分析显示, 转化的巨噬细胞具有正常的表面标志如CD14, CD4, MHCII和B7.1; 同时转基因巨噬细胞在LPS的刺激下, 可上调共刺激分子; IL-1和TNF- α 细胞因子对于LPS刺激也产生正常的应答. 因此, 转基因巨噬细胞在表型和功能上是正常的. 该方法对构建慢病毒载体以用于基因治疗进行了尝试, 该载体同时针对多个HIV-1感染的细胞分子的shRNA来抑制HIV-1的复制, 同时这些载体在干细胞中的应用使其在HIV/AIDS的治疗上显示出广阔的前景.

3.2 治疗HBV McCaffrey *et al*^[40]利用RNAi可抑制细胞培养中以及HBV质粒转染有免疫活性和免疫缺陷小鼠细胞中HBV复制中间体的产生, 有效抑制培养在肝细胞内的HBV的复制. Shlomai *et al*^[41]针对HBV的核心抗原开放阅读框和X蛋白开放阅读框设计了两个siRNA片段, 有效地抑制了Huh-7细胞系中HBV的复制. Uprichard *et al*^[42]通过重组腺病毒得到了乙肝转基因鼠, 其肝细胞中可表达乙肝特异性的siRNA, 而且可抑制事先存在的HBV基因的表达和复制, 甚至可以达到26 d内检测不到病毒的水平. 这些结果表明有效的导入的siRNA应该可以沉默慢性感染的乙肝患者体内的HBV.

3.3 治疗丙肝病毒(HCV) Kapadia *et al*^[14]利用RNAi技术, 对HCV进行研究, 用针对HCV的2个RNAi与表达HCV的质粒共转染人的肝癌细胞株Huh-7细胞, 2 d后, Northern杂交检测HCV的RNA含量降低, 证明HCV特异的siRNA抑制了病毒的复制. 5'非翻译区是病毒巨蛋白翻译进入核糖体的位点, 而且, 5'UTR是丙肝病毒基因组最保守的区域, 这使他成为siRNA的理想靶位点. Yokota *et al*^[43]设计了针对HCV基因组的5'非翻译区的siRNA, 只用了2.5 nmol/L浓度的siRNA抑制大约80% HCV的复制. Wilson *et al*^[44]针对HCV基因组设计了双链siRNA被通过电穿孔法倒入人的肝细胞系Huh-7, 两个siRNA非常明显的降低了病毒特异的蛋白的表达, 而且RNA的合成比未经siRNA处理的细胞下降了90%. 这些siRNA还能够保护天然的Huh-7细胞免受HCV复制子RNA的攻击. 合成的siRNA对细胞的处理后, 其效果可维持大于72 h, RNAi持续的时间可超过3 wk, 其方法是用双顺反子表达载体稳定表达相关RNA的互补链.

3.4 治疗流感病毒 Ge *et al*^[45]根据流感病毒基因组保守区序列设计了siRNA, 有效的抑制流感

病毒在细胞和鸡胚中的产生. 同时发现针对病毒核衣壳(NP)或RNA转录酶(PA)成分的siRNA不仅使相应的mRNA的组装, 而且使病毒RNA和他的互补链的组装失败. 这些siRNA同时很广泛的抑制了其他病毒RNA, 而不是细胞RNA的组装. 这些发现揭示出新合成的NP和PA蛋白对于流感病毒的转录和复制是必须的, 而且这些结果为预防及治疗人流感病毒的siRNA的建立打下了基础. Ge *et al*^[46]针对流感病毒基因保守区设计了siRNA用于研究对鼠流感病毒的预防及治疗作用. 应用小剂量的包含siRNA的聚阳离子载体混合物的方式转染老鼠, 结果表明感染鼠肺中病毒的产生在病毒感染前和感染后均被siRNA所降低, 为人流感病毒的治疗提供了理论依据. 同时指出开发符合人使用的导入系统在预防和治疗人流感病毒方面具有潜在应用价值. Tompkins *et al*^[47]针对A型流感病毒核蛋白或酸性聚合酶高度保守区设计了siRNA, 治疗抑制了A型流感病毒在体内的复制. 这些siRNA的导入明显降低了感染鼠肺中的病毒滴度而且保护了鼠免于致死性的攻毒, 同时证明这种保护是特异性的, 而不是由抗病毒干扰素应答所介导的.

3.5 治疗其他病毒病 Yuan *et al*^[48]为了研究RNAi是否能够保护柯萨奇病毒B3 (CVB3)的感染, 通过使用针对病毒基因组不同区域的5个CVB3特异的siRNA, 分析了RNAi对生长于HeLa细胞和鼠心肌细胞中的病毒的抑制作用. 最有效的是siRNA-4, 其针对于病毒蛋白酶2A, 得到了对病毒复制92%的抑制. 该RNAi的特异性可持续48 h, 并且细胞活力分析实验显示90%由siRNA-4预处理的细胞仍然存活, 并在感染后48 h未能检测到病毒的感染. 而且, 在病毒感染后siRNA的应用可同样有效地抑制病毒的复制, 暗示他的治疗潜力. 通过组合, 进一步的分析发现, siRNA-4和其他4个候选物共同转染并不能提高抑制作用. siRNA作用机制的突变分析中, 发现siRNA通过靶向病毒的正义链而发挥作用, 并且需要与靶区域序列有较好的匹配, 同时发现反义链的3'端附近的错配比5'端的错配对其功能的发挥容忍性更高. Radhakrishnan *et al*^[49]根据人多瘤病毒JCV, 设计了针对靶向人星形胶质细胞中T抗原的表达和未知蛋白的siRNA, 两者的联合应用导致了病毒衣壳蛋白的合成完全停止, 暗示了siRNA高效抑制感染细胞中病毒复制的能力. 刘惠莉 *et al*^[50]针对鸡传染性支气管炎病毒的Pol, M, N基因筛选到12个siRNA, Vero细胞和

鸡胚的攻毒试验结果显示, 其中2个siRNA具有干扰作用, 并对siRNA有剂量依赖性. Chen *et al*^[51]针对口蹄疫病毒的VP1基因而设计了siRNA在BHK-21细胞和乳鼠中研究了VP1特异的siRNA对于口蹄疫病毒复制的抑制作用, 结果表明表达siRNA的质粒的转染对存在于BHK-21中的口蹄疫病毒的VP1基因产生了80%-90%的抑制作用. 而且, 用表达siRNA的质粒瞬时转染的BHK-21细胞当用100倍的50%病毒感染量的组织毒攻毒时, 发现对口蹄疫病毒有特异性的抵抗力, 而且抵抗力延长到感染后48 h. 同时, 用表达siRNA的质粒进行皮肤注射时, 乳鼠对口蹄疫病毒失去了易感性. Sanchez *et al*^[52]针对病毒L聚合酶和Z mRNAs所设计siRNA抑制了培养细胞中的沙粒病毒(LCMV), 结果分析显示, 针对LCMV的以RNAi为基础的治疗效果高度依赖于转导效应siRNA的方法. 认为化学合成的siRNA的转导在预防病毒增殖上是无效的. 相反, 应用复制缺陷型重组腺病毒表达系统在细胞内产生的针对病毒L和Z基因产物的siRNA非常高效的抑制了LCMV的增殖.

3.6 应用前景 RNAi从发现至今, 一直都是生物领域内的一大热点, 这是因为RNAi本身的保守性, 存在于各种生物中, 是机体维持自身核酸稳定的一种机制. 目前对于基因病、病毒性传染病和肿瘤的RNAi研究取得了令人满意的结果. RNAi作为一个工具, 他的应用范围可以从单细胞的原生动物一直扩展到人. 目前RNAi在线虫、果蝇以及植物等模式生物中的应用取得了很多成果, 特别是在基因功能的研究方面. 在哺乳动物中的研究和应用也取得不少进展. RNAi在疾病治疗中的应用前景是研究者以及大众热切关注的焦点, 利用RNAi有望在近几年内对AIDS, 乙肝等人类重大传染病的治疗实现突破性的进展. 在RNAi技术大规模临床使用之前, 还有以下问题亟待解决: (1)siRNA效应具有高度特异性, 1 bp的变化可大大降低siRNA的效力, 因此, 其对病毒的突变很敏感. 针对易变异的病毒, 如HIV, 可以设计一系列的预防病毒变异的siRNAs. 同时有些病毒RNA序列对siRNA不是很敏感, 可能原因是RNA的二级结构或高度折叠而影响RISC的识别; (2)siRNA导入细胞内的方式效率低. 转染对细胞系虽然有作用, 但对原代细胞的作用还不够满意. 电穿孔可引起大量细胞死亡(超过50%)^[44], 所以RNAi技术要想在实际的临床应用中获得成功, 给药的方式还有

待于进一步研究. 目前慢病毒载体在临床应用中被看好的一种途径. 另外, 一种非编码调节RNA, 可以用于转导抗病毒的RNAi^[34]; (3)siRNA的稳定问题. 为避免siRNA的降解, 导入病毒载体内的编码shRNA的DNA序列是一条有效的途径. 另外, Chiu *et al*^[4]通过2'氟尿嘧啶和2'氟胞嘧啶的应用, 明显增加了siRNA的半衰期, 并延长了RNAi的作用. 最近Arziman *et al*^[53]构建了网络平台, 可以对所要运用的dsRNA进行更优化的设计和评估. 新近发现病毒的某些蛋白可抑制RNAi介导的抗病毒防御机制. 从植物和动物病毒中都分离出RNAi抑制蛋白. 很多RNA病毒都编码dsRNA结合蛋白(dsRNA-binding protein, dsRBP), 在细胞内可灭活RNAi介导的宿主防御机制, 这些因素都为RNAi技术的应用造成了障碍.

总之, RNAi作为偶然发现的一种生物体的自然现象, 发现者本身可能并没有预料到其应用前景及潜在的价值, 但随着众多的研究人员的加入, 一个具有划时代意义的技术将有望使人类摆脱疾病的困扰.

4 参考文献

- 1 Brantl S. Antisense-RNA regulation and RNA interference. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1575: 15-25
- 2 Chiu YL, Rana TM. siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. *RNA* 2003; 9: 1034-1048
- 3 Nykanen A, Haley B, Zamore PD. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 2001; 107: 309-321
- 4 Chiu YL, Rana TM. RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol Cell* 2002; 10: 549-561
- 5 Cummins LL, Owens SR, Risen LM, Lesnik EA, Freier SM, McGee D, Guinosso CJ, Cook PD. Characterization of fully 2'-modified oligoribonucleotide hetero- and homoduplex hybridization and nuclease sensitivity. *Nucleic Acids Res* 1995; 23: 2019-2024
- 6 Kennerdell JR, Carthew RW. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* 1998; 95: 1017-1026
- 7 Zamore PD. RNA interference: listening to the sound of silence. *Nat Struct Biol* 2001; 8: 746-750
- 8 Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 227-264
- 9 Lipardi C, Wei Q, Paterson BM. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell* 2001; 107: 297-307
- 10 Nishikura K. A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst. *Cell* 2001; 107: 415-418
- 11 Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen KL, Parrish

- S, Timmons L, Plasterk RH, Fire A. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 2001; 107: 465-476
- 12 Schwarz DS, Hutvagner G, Haley B, Zamore PD. Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the Drosophila and human RNAi pathways. *Mol Cell* 2002; 10: 537-548
 - 13 Stein P, Svoboda P, Anger M, Schultz RM. RNAi: mammalian oocytes do it without RNA-dependent RNA polymerase. *RNA* 2003; 9: 187-192
 - 14 Kapadia SB, Brideau-Andersen A, Chisari FV. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 2014-2018
 - 15 Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Sanger HL. RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 1994; 76: 567-576
 - 16 Mette MF, Aufsatz W, van der Winden J, Matzke MA, Matzke AJ. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J* 2000; 19: 5194-5201
 - 17 Allshire R. Molecular biology. RNAi and heterochromatin-a hushed-up affair. *Science* 2002; 297: 1818-1819
 - 18 Zamore PD. Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science* 2002; 296: 1265-1269
 - 19 Llave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science* 2002; 297: 2053-2056
 - 20 Doench JG, Petersen CP, Sharp PA. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev* 2003; 17: 438-442
 - 21 Ahlquist P. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science* 2002; 296: 1270-1273
 - 22 Zilberman D, Cao X, Jacobsen SE. ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* 2003; 299: 716-719
 - 23 Chan SW, Zilberman D, Xie Z, Johansen LK, Carrington JC, Jacobsen SE. RNA silencing genes control de novo DNA methylation. *Science* 2004; 303: 1336
 - 24 Xie Z, Johansen LK, Gustafson AM, Kasschau KD, Lellis AD, Zilberman D, Jacobsen SE, Carrington JC. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol* 2004; 2: E104
 - 25 Zhou H, Xia XG, Xu Z. An RNA polymerase II construct synthesizes short-hairpin RNA with a quantitative indicator and mediates highly efficient RNAi. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: e62
 - 26 Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL, Iggo R. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 2003; 34: 263-264
 - 27 Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 635-637
 - 28 Sui G, Soohoo C, Affar el B, Gay F, Shi Y, Forrester WC, Shi Y. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 5515-5520
 - 29 Jacque JM, Triques K, Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 2002; 418: 435-438
 - 30 Sijen T, Vijn I, Rebocho A, van Blokland R, Roelofs D, Mol JN, Kooter JM. Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Curr Biol* 2001; 11: 436-440
 - 31 Boden D, Pusch O, Lee F, Tucker L, Shank PR, Ramratnam B. Promoter choice affects the potency of HIV-1 specific RNA interference. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 5033-5038
 - 32 Lee MT, Coburn GA, McClure MO, Cullen BR. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in primary macrophages by using Tat- or CCR5-specific small interfering RNAs expressed from a lentivirus vector. *J Virol* 2003; 77: 11964-11972
 - 33 Pusch O, Boden D, Silbermann R, Lee F, Tucker L, Ramratnam B. Nucleotide sequence homology requirements of HIV-1-specific short hairpin RNA. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 6444-6449
 - 34 Boden D, Pusch O, Silbermann R, Lee F, Tucker L, Ramratnam B. Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 1154-1158
 - 35 Liu S, Asparuhova M, Brondani V, Ziekau I, Klimkait T, Schumperli D. Inhibition of HIV-1 multiplication by antisense U7 snRNAs and siRNAs targeting cyclophilin A. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 3752-3759
 - 36 Dave RS, Pomerantz RJ. Antiviral effects of human immunodeficiency virus type 1-specific small interfering RNAs against targets conserved in select neurotropic viral strains. *J Virol* 2004; 78: 13687-13696
 - 37 Arrighi JF, Pion M, Wiznerowicz M, Geijtenbeek TB, Garcia E, Abraham S, Leuba F, Dutoit V, Ducrey-Rundquist O, van Kooyk Y, Trono D, Piguet V. Lentivirus-mediated RNA interference of DC-SIGN expression inhibits human immunodeficiency virus transmission from dendritic cells to T cells. *J Virol* 2004; 78: 10848-10855
 - 38 Leonard JN, Schaffer DV. Computational design of antiviral RNA interference strategies that resist human immunodeficiency virus escape. *J Virol* 2005; 79: 1645-1654
 - 39 Anderson J, Akkina R. CXCR4 and CCR5 shRNA transgenic CD34+ cell derived macrophages are functionally normal and resist HIV-1 infection. *Retrovirology* 2005; 2: 53
 - 40 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
 - 41 Shlomai A, Shaul Y. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology* 2003; 37: 764-770
 - 42 Uprichard SL, Boyd B, Althage A, Chisari FV. Clearance of hepatitis B virus from the liver of transgenic mice by short hairpin RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 773-778
 - 43 Yokota T, Sakamoto N, Enomoto N, Tanabe Y, Miyagishi M, Maekawa S, Yi L, Kurosaki M, Taira K, Watanabe M, Mizusawa H. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep* 2003; 4: 602-608
 - 44 Wilson JA, Jayasena S, Khvorova A, Sabatino S, Rodrigue-Gervais IG, Arya S, Sarangi F, Harris-Brandts M, Beaulieu S, Richardson CD. RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:

- 2783-2788
- 45 Ge Q, McManus MT, Nguyen T, Shen CH, Sharp PA, Eisen HN, Chen J. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 2718-2723
- 46 Ge Q, Filip L, Bai A, Nguyen T, Eisen HN, Chen J. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 8676-8681
- 47 Tompkins SM, Lo CY, Tumpey TM, Epstein SL. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 8682-8686
- 48 Yuan J, Cheung PK, Zhang HM, Chau D, Yang D. Inhibition of coxsackievirus B3 replication by small interfering RNAs requires perfect sequence match in the central region of the viral positive strand. *J Virol* 2005; 79: 2151-2159
- 49 Radhakrishnan S, Gordon J, Del Valle L, Cui J, Khalili K. Intracellular approach for blocking JC virus gene expression by using RNA interference during viral infection. *J Virol* 2004; 78: 7264-7269
- 50 刘惠莉, 陆承平, 朱伟云. 鸡传染性支气管炎病毒的RNA干扰. *中国病毒学* 2005; 20: 272-276
- 51 Chen W, Yan W, Du Q, Fei L, Liu M, Ni Z, Sheng Z, Zheng Z. RNA interference targeting VP1 inhibits foot-and-mouth disease virus replication in BHK-21 cells and suckling mice. *J Virol* 2004; 78: 6900-6907
- 52 Sanchez AB, Perez M, Cornu T, de la Torre JC. RNA interference-mediated virus clearance from cells both acutely and chronically infected with the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 2005; 79: 11071-11081
- 53 Arziman Z, Horn T, Boutros M. E-RNAi: a web application to design optimized RNAi constructs. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: W582-588

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8, 18, 28日, 月价72.00, 年价864元。欢迎广大消化科医务工作者及科教人员、各大图书馆订阅。联系地址: 100023 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社。联系电话: 010-85381901-1020; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; 网址: www.wjgnet.com。

溃疡性结肠炎的外科治疗指南

梁毅超, 卿三华

■背景资料

本篇译文的英文原文 practice parameters for the surgical treatment of ulcerative colitis 由美国结直肠外科医师协会标准实践工作组织编写, 并于2005年11月发表于Disease of the Colon & Rectum. 美国结直肠外科医师协会为结直肠疾病外科治疗方面的权威组织, 不定期公布各种结直肠疾病的外科治疗指南, 以指导全球结直肠外科医师对于相关疾病的治疗实践. 本次公布的《溃疡性结肠炎的外科治疗指南》是此疾病的最新治疗指南, 他以循证医学的观点详细阐述了各类型溃疡性结肠炎外科治疗的指导性意见, 其内容涵盖了许多随机对照研究的结果, 证据性很强, 为我们治疗溃疡性结肠炎提供了许多新的观点和方法.

美国结直肠外科医师协会标准实践工作组织
(The Standard Practice Task Force, The American Society Of Colon and Rectal Surgeon)
梁毅超, 卿三华, 编译. 南方医科大学南方医院普通外科 广东省广州市510515
通讯作者: 卿三华, 510515, 广东省广州市南方医科大学南方医院普通外科. sanhuaq@fimmu.com
电话: 020-62787626
收稿日期: 2006-06-08 接受日期: 2006-06-21

0 引言

此治疗指南是在Medline, PudMed以及循证医学Cochrane中心数据库中进行的一次回顾性资料的有组织查询分析. 其中关键词包括溃疡性结肠炎、回肠肛管储袋式吻合、回肠造瘘术、结直肠肿物、外科手术、回肠直肠吻合术和一些相关的主题. 循证医学水平和推荐等级见表1.

1 手术适应证

1.1 急性结肠炎 临床证据显示, 已经穿孔或即将出现穿孔的患者应施行急诊手术. [循证医学水平III; 推荐等级B(Class III; Grade B)]5%-15%的溃疡性结肠炎患者发展为重症急性结肠炎. 重症急性结肠炎以Truelove和Witts标准作为诊断基础, 定义为每天排6次以上鲜血大便, 发热(体温 $>37.5^{\circ}\text{C}$), 心动过速(心率 >90 次/min), 贫血(血红蛋白 $<$ 正常的75%), 血沉加快($\text{ESR}>30$ mm/h). 而中毒型或暴发型结肠炎则分别以每天排10次以上鲜血大便, 发热(体温 $>37.5^{\circ}\text{C}$), 心动过速(心率 >90 次/min), 贫血(需要输血输液), 血沉加快($\text{ESR}>30$ mm/h), 影像学上结肠扩张和腹部膨隆并伴有压痛作为临床特点; 当横结肠扩张超过6 cm, 即诊断为中毒型巨结肠. 20%-30%的中毒型结肠炎患者需要外科手术治疗. 中毒性结肠炎患者肠穿孔有很高病死率, 无论穿孔是包裹局限还是游离, 其病死率都可达到27%-57%. 当穿孔与实施手术治疗的间隔时间延长时, 病死率也就随之升高. 发生穿孔前接受手术治疗的中毒性结肠炎预后明显好于穿孔后才接受手术治疗. 中毒性结肠炎穿孔前没有明显的体征, 无结肠扩张, 没有典型腹膜炎表现也

可出现穿孔. 持续存在或加重的结肠扩张, 结肠积气征, 加重的局限性腹膜炎和全身多脏器衰竭是促进本病发生穿孔的因素. 局限性腹膜炎是局部炎症或是已发生穿孔的体征, 多系统器官衰竭(MSOF)也是一个不祥的预兆. 在一组180例中毒型结肠炎患者中, 11例发生了MSOF, 全组死亡率为6.7%; 死亡的12例患者中有8例出现了MSOF.

经药物治疗后病情恶化和虽经48-96 h合理用药但病情仍无明显好转的患者应行手术治疗. [循证医学水平III; 推荐等级B(Class III; Grade B)]如果患者病情在进行药物治疗时仍不断恶化或经过最初一段稳定时期后就不再有改善, 即认为药物治疗失败. 暂时有限的证据提示静脉用环孢霉素A在治疗重症结肠炎方面比标准的以类固醇类药物为基础的治疗更有效, 该药已被推荐为行结肠切除术前治疗溃疡性结肠炎的二线药物. 在经过最初一段改善时期后病情似乎进入了“平台期”, 该类患者的手术需要和手术时机常难判断. 大便8次/d以上或经过3 d治疗后仍3-8次/d, 并伴C反应蛋白 >45 mg/L的患者, 无论有无接受皮质类固醇或环孢霉素的治療, 在同次住院中都会有85%的可能行结肠切除术. 此外, 持续性结肠扩张似乎成为一类亚群患者的特征性表现, 这些患者对药物治疗效果不好且有较大风险发展为巨结肠. 延长这些患者的观察时限会增加耗竭生理储备的风险但并不一定会增加他们术前的发病率. 虽然关于药物试探性治疗的时限, 特别是关于二线药物试探性治疗的时限尚难确定, 但一般认为药物治疗48-96 h病情无改善就手术治疗.

1.2 难治性结肠炎 药物治疗无效的溃疡性结肠炎是外科手术治疗的指征. [循证医学水平III; 推荐等级B(Class III; Grade B)]难治性溃疡性结肠炎是最常见的外科手术指征, 药物治疗失败可由多种原因造成. 临床症状即使在大剂量药物治疗下仍不能充分控制, 患者生活质量欠佳. 另一种情况是患者对药物治疗反应良好, 但药物持续治疗(特别是长期皮质类固醇治疗)风险很大, 或患者

表 1 循证医学水平和推荐等级

水平, 证据来源	等级, 推荐等级
I 设计良好、假阴性及假阳性率低、多中心随机对照试验研究的Meta-分析(高检验效能)	A I类研究证据或自II, III类或IV类多中心研究所得出的一致结果.
II 至少一个设计良好的实验性研究; 假阴性或假阳性率高或两者均高的随机试验(低检验效能)	B II, III类或IV类研究所得出大体上一致的结果.
III 设计良好的实验性研究, 如非随机的, 对照的, 单组的, 手术前后对比、队列、时间或配对资料的对照序列研究	C II, III类或IV类研究所得出的不一致的结果.
IV 设计良好的非实验性研究, 如对比和相关的描述性研究及病例研究	D 非系统或不很系统的经验证据.
V 病例报告和临床个案	

无法耐受药物治疗的不良反应, 这类患者也应选择手术治疗, 手术治疗后, 患者生活质量可得到明显改善. 儿童药物治疗不断失败是另一种难治性结肠炎, 这种情况也需手术治疗. 患儿经过最大量营养支持及药物治疗后依然无效, 也应考虑手术治疗.

1.3 癌症的风险 长期溃疡性结肠炎患者应行内镜检查. [循证医学水平III; 推荐等级B(Class III; Grade B)]长期溃疡性结肠炎患者的结直肠癌变风险将增加, 虽然这一点很清楚, 但他的强度仍难以估计. 最近一份荟萃分析估计, 长期溃疡性结肠炎患者中前10 a患结直肠癌的比例为2%, 前20 a为8%, 前30 a为18%. 虽然还没有临床证据表明结肠镜检查可提高患者的生存率, 但仍建议这些患者进行结肠镜检查. 坚持进行结肠镜检查的患者, 可及时发现一些早期癌变, 他们预后通常比较理想. 广泛性结肠炎患者(近端镜下病变累及结肠脾曲)应在出现症状后8 a行结肠镜检查, 并每隔1-2 a行结肠镜复查. 如为左半结肠炎患者(镜下病变近端在结肠脾曲, 远端病变在直肠)应在出现症状后15 a行结肠镜检查. 由于考虑到有形成肿瘤的可能, 所以应在病情缓解时行结肠镜检查. 要达到90%的灵敏度就必须从结肠到直肠取33块组织, 同时在大肠的4个不同区域每间隔10 cm随机取材, 特别在任何狭窄部位或怀疑肿瘤部位取材行病理活检. 发育不良的息肉可行息肉切除, 附近扁平状黏膜应行病理活检以排除恶变. 一些研究显示, 溃疡性结肠炎患者合并原发性狭窄性胆管炎(PSC)出现结直肠癌的风险较高, 这一类患者出现癌症或不典型增生的风险: 发病10 a后为9%, 20 a后为31%, 25 a后为50%. 合并PSC的患者结肠炎病情通常稳定, 很难准确估计发病时间, 所以建议每年行一次肠镜检查.

肿瘤患者、非腺瘤样不典型增生或肿物(DALM), 高度不典型增生, 有症状或内镜不能

通过的低度不典型增生狭窄性病变, 建议以上患者行全结直肠切除. 不典型增生的病理诊断最好由2位独立的胃肠道病理医生来确诊. [循证医学水平III; 推荐等级C(Class III; Grade C)]传统的肠镜病理活检观察是否有不典型增生, 是鉴别溃疡性结肠炎患者是否有癌症风险的"金标准". 1994年前的10个前瞻性研究显示, 有43% DALM患者在行结肠切除术中发现癌肿. 这些癌肿42%为重度不典型增生, 19%为轻度不典型增生. 最初没有不典型增生患者最后发展成重度不典型增生、DALM或癌症的风险为2.4%, 非确定性不典型增生患者发展成上述病变的比例为18%而低度不典型增生患者则为29%. 另一回顾性研究中, 18例确诊为溃疡性结肠炎和低度不典型增生患者中有9例发展成进展期癌变, 在随访中他们被确定为腺癌, 隆起型不典型增生或高度不典型增生. 另一项研究表明, 低度不典型增生患者发展成为癌症或高度不典型增生的5 a预测值为54%. 一项研究对60例通过内镜检查确诊为肠道扁平黏膜低度不典型增生的患者进行了平均10 a的随访, 有73%的病例在随后肠镜检查中于其他部位发现了低度不典型增生, 其中有11例(18%)退化成高度不典型增生或与不典型增生相关的病变及肿物. 病理科医生在诊断时会出现不同偏差, 这就更影响了低度不典型增生的治疗. 最近一些报道建议, 腺瘤样DALM可行肠镜下切除, 特别是当附近的黏膜组织没有不典型增生病变的时候. 建议患者服用5-氨基水杨酸类(ASA)药物, 因为最近的研究表明, 规律服用5-ASA类药物可降低患结直肠癌的风险. 在一项病例对照研究中, 规律的5-ASA治疗以75%的比例降低癌症发病风险. 另一项研究显示, 药物治疗, 特别是磺胺类药物有很强的保护效应, 这种保护效应并不依赖疾病活动度. 一组长期服用5-ASA的152例患者中, 发展为癌症的为5例(3%), 而在另一组16例停止药物治疗或不

■研发前沿

本治疗指南系统介绍了关于各种类型、各种年龄阶段的溃疡性结肠炎的外科治疗方法和意见, 特别是对于溃疡性结肠炎外科手术的选择问题, 本篇指南给予了具体的阐述, 包括手术时机以及手术方式的选择, 这些都是对于溃疡性结肠炎外科手术尚存在很大争议的环节, 特别是对于储袋式手术、不同类型的储袋手术之间的比较, 是外科手术的难点所在. 同时对于老年患者及患儿以及对于难治性结肠炎的治疗策略, 都是临床治疗的难点.

■创新盘点

本篇溃疡性结肠炎的外科治疗指南优于以往的一般性综述文章在于本文从循证医学证据的角度详细地阐述了关于有效治疗溃疡性结肠炎的手段与措施。本文较多地引用了循证医学证据性较强的观点,如随机对照研究,以使本指南的意见更具客观性与指导性。同时本指南也对各种治疗或手术方式的局限性及副反应作了详细的描述,这使我们从更广阔的角度看待溃疡性结肠炎的治疗选择问题。

遵从治疗的患者中,发展为癌症的就有5例(31%)

溃疡性结肠炎患者出现狭窄,特别是长期患病,应行手术治疗。[循证医学水平III; 推荐等级A(Class III; Grade A)]溃疡性结肠炎患者出现狭窄的比例为5%-10%。虽大多数狭窄为良性病变,但仍有25%的狭窄是恶性病变,溃疡性结肠炎并发癌症的患者中恶性狭窄占30%。狭窄源自于长期病变,病变近端起于结肠脾曲或狭窄造成梗阻症状,这些都可能是恶性病变。内镜下活检可发现不典型增生或恶性病变。

2 外科手术的选择

2.1 急诊手术 溃疡性结肠炎最佳的急诊手术方式为全结肠或次全结肠切除并回肠末端造瘘术。

[循证医学水平III; 推荐等级B(Class III; Grade B)]急性发病时,所选择手术对于患者的康复应最可靠,当患者痊愈后进行重建时,所面临的风险应最小。结肠次全切除并回肠末端造瘘以及Hartmann's手术关闭远端肠管或行造瘘术是既有效又安全的方法。这种手术方式可切除大多数炎性肠管,避免了分离盆腔和肠道吻合。比起腹腔内关闭直肠残端,将关闭的直肠乙状结肠残端置于腹膜外的方法可使盆腔脓毒并发症减少,也便于进行盆腔分离。远端肠管残端经肛引流可降低盆腔脓肿的风险。为确定病变是否为溃疡性结肠炎或Crohn病,切除的结肠标本应行病理检查,因这两种病存在一定的相似性。对于溃疡性结肠炎患者,疾病晚期为切除残留病变并保存肠道连续性,这种情况下行结直肠切除术并回肠肛管储袋式吻合术(PIAA)是安全可行的。如诊断为Crohn病,同时患者直肠有适当的顺应性及扩张性,就应行回肠直结肠吻合术。

2.2 择期手术 全结直肠切除并回肠造瘘术是溃疡性结肠炎患者适当的手术选择。[循证医学水平III; 推荐等级B(Class III; Grade B)]对比其他术式,结直肠切除并回肠造瘘术是治疗溃疡性结肠炎的标准术式。虽然保留性结直肠切除并PIAA术在20年来越来越普及,但不愿行保留性结直肠切除术患者及对储袋手术有很大失败风险的患者,如肛门括约肌受损、既往有肛周疾病或继发性生理功能不全,直肠切除并回肠造瘘术仍是这类患者的一线手术方式。手术存在一些并发症,虽与吻合口相关的问题发生最多,如肠管脱垂,但也可出现与盆腹腔操作相关的并发症,包括小肠梗阻、感染或肠瘘、持续疼痛、伤口不愈、性功能受损及膀胱功能不全、

不育症。最近一项对44例患者进行的研究表明,直肠切除并永久性回肠造瘘术并发症的发生率明显低于保留性结直肠切除术(26%:52%)。

全结直肠切除并回肠肛管储袋式吻合术是大多数溃疡性结肠炎患者的一种合适的手术方式。[循证医学水平III; 推荐等级A(Class III; Grade A)]全结直肠切除并IPAA是溃疡性结肠炎患者最常使用的择期手术方式。此手术比较安全且效果持久,其并发症的发病率较低(19%-27%),死亡率也很低(0.2%-0.4%),生活质量接近正常水平。并发症包括任何腹部大手术可能发生的并发症,如不育症或性功能受损等,与储袋手术相关的并发症如储袋炎症。

全结直肠切除并IPAA是部分溃疡性结肠炎合并结直肠癌患者的一种比较合适的手术方式。[循证医学水平IV; 推荐等级C(Class IV; Grade C)]对侵袭性结肠或上段直肠癌但没有远处转移患者的研究得出了不同的发现。一些研究发现,溃疡性结肠炎合并癌肿的患者相对结肠炎而没有合并癌肿的患者,有发生术后并发症和功能障碍的可能,其中只有小部分患者发展为转移性病变。相反,一独立研究显示,接近20%接受IPAA的结肠炎合并癌症的患者死于转移性病变。一些专家建议在行结肠切除回肠造瘘术及保留性直肠切除术前,应先行至少12 mo的追踪观察以确保没有复发。转移性病变普遍被认为是行IPAA的禁忌症。对于这类患者应行结肠部分切除或结肠切除合并造瘘以便患者的早期排便,使患者在剩余的生命时间里免受并发症的困扰;另一类不适合行IPAA的为直肠中下段侵袭性癌肿患者。应在术前行辅助放射治疗,因为术后放射治疗引起的放射性肠炎和储袋功能不良或储袋功能丧失的发生率较高。溃疡性结肠炎合并盲肠癌的患者具有另一种表现,病变附近一段很长的回肠及其肠系膜要被切除,如不能达到无张力吻合,就须行回肠造瘘术。

全结直肠切除并IPAA对于部分溃疡性结肠炎的老年患者来说是一种比较合适的手术方式。[循证医学水平III, 推荐等级C(Class III; Grade C)]许多研究显示,在老年患者行IPAA是安全可行的。年龄本身并不能作为排除标准,因要考虑患者存在的合并症,以及患者的精神状态和肛门括约肌功能。一些研究发现患者术后10 a大便次数增加,另一些研究显示,大便次数增加可能是大便失禁造成的。

黏膜切除术和双排吻合器技术在大多数情

况下都是适用的。[循证医学水平Ⅱ, 推荐等级A(ClassⅡ; Grade A)]双排吻合器技术的优势在于他提高了手术操作的简便性, 避免了会阴部手术, 这种操作方式可使吻合口的张力减小, 同时也使术后肠道功能得到改善, 括约肌的损伤减少到最小, 同时肛管移行区以及支配此区的感觉神经末梢得到了保留。在不能使用或使用外科吻合器失败或手工吻合后吻合口张力很大的情况下, 使用IPAA和上述两种术式达到的效果相似。患者应取保留的柱状黏膜活检, 随访应在患者首次出现症状后8-10 a开始, 以后每2 a进行一次活检随访。

储袋式手术应根据手术者的习惯进行选择。[循证医学水平Ⅱ, 推荐等级B(ClassⅡ; Grade B)]虽在1970年代后期就出现了Parks创建的以3段肠袢组成的S式回肠储袋, 随后其他一些储袋手术也相继出现, 包括双袢J式储袋、外侧同向蠕动的H式储袋和4段肠袢组成的W式储袋。S式储袋早期出现的排泻问题与排出肠道过长有关(≥ 5 cm), 这通常需行储袋置管。如果将排出管道长度缩短到 ≤ 2 cm, 储袋置管将显著减少。H式储袋中过长的排出肠道会引起储袋扩张、淤积及储袋炎。现在主张行W式储袋手术, 因为他有较大的容量。但在J式与W式储袋手术之间进行的随机对照研究并没有证实后者在功能方面有所改善。一项研究显示, J式储袋与W式储袋术后的每日大便中位次数相同, 在失禁、便急、排便频率和使用抗腹泻药物方面, 两种储袋术式也没有差异。一项对照研究也表明, 在术后1年肠道功能方面J式储袋与W式储袋相似。与J式及W式储袋相比, S式储袋可提供额外的肠管长度(2-4 cm), 这可降低吻合时的张力。S式储袋所用的2 cm肠管可随时间而变长, 同时也可出现粪性肠梗阻。

一无需行转流性回肠造瘘术。[循证医学水平Ⅱ, 推荐等级B(ClassⅡ; Grade B)]前瞻性 & 回顾性研究表明, 部分患者可由经验丰富的外科医生行一期结直肠切除术。这种手术较有挑战性, 因为他可使患者早期康复, 但同时也会使吻合口破裂及盆腔脓毒并发症的发生率增加, 患者因脓毒并发症导致的3 a, 5 a和10 a累计储袋功能丧失率为20%, 31%和39%, 所以, 强调在行盆腔储袋而非暂时性转流手术时应更为谨慎。单排吻合器避免了关闭回肠造瘘所带来的风险, 这些风险包括关闭部位的吻合口瘘以及小肠梗阻。在一般情况下, 如吻合完全在无张力下进行、术中

大量出血或其他技术性困难、患者在手术前没有服用大剂量皮质类固醇药物, 可考虑不行回肠造瘘术。

无需常规行回肠储袋检查以了解回肠黏膜有无不典型增生[循证医学水平Ⅱ, 推荐等级B(ClassⅡ; Grade B)]大多数回肠储袋可观察到回肠表面绒毛高度降低及小囊隐窝密度增加的现象。这种回肠黏膜转化成结肠黏膜的化生现象是回肠黏膜为适应储袋功能而进行的调整, 储袋的慢性炎症也可引起这种转化。炎症在理论上可导致回肠黏膜的不典型增生及癌肿, 而储袋内的这种不典型增生和癌变却很少见。

IPAA后, 储袋炎症问题普遍。[循证医学水平Ⅱ, 推荐等级A(ClassⅡ; Grade A)]溃疡性结肠炎IPAA后最常见并发症为回肠储袋的非特异性炎症, 也就是储袋炎。溃疡性结肠炎患者在行结肠切除术前的一些肠外表现, 特别是硬化性胆管炎, 与储袋炎发病率升高有关。反流性回肠炎或疾病程度是否与储袋炎有关, 这一点仍不清楚。非特异性炎症的病因仍不明确, 可能是厌氧菌过度生长, 症状通常包括腹部绞痛、发热、盆腔疼痛和大便次数增加, 常需行内镜检查和储袋黏膜活检进行确诊, 单靠临床症状会导致误诊。储袋炎的治疗主要依靠使用抗生素, 如甲硝唑和环丙沙星, 现已成功使用抗生素以预防储袋炎并维持储袋炎的缓解状态。对于抗生素耐药的患者, 使用布地奈德灌肠或其他药物治疗可能会有效。慢性储袋炎患者应明确是否患有Crohn病, 难治性储袋炎在少数情况下需行回肠造瘘术及储袋切除。

不适合行结直肠切除术或行此手术失败的溃疡性结肠炎患者, 可行控制性回肠造瘘术。[循证医学水平Ⅲ, 推荐等级B(ClassⅢ; Grade B)]控制性回肠造瘘术仅限于括约肌功能不良、IPAA失败, 或行传统Brooke回肠造瘘术的患者。控制性回肠造瘘术重要性的降低主要是由于IPAA的成功开展, 控制性回肠造瘘术引起早期并发症的机率较高, 近四分之一患者出现早期并发症, 最常见的是脓毒血症(继发于吻合口瘘和吻合口组织坏死)和梗阻; 50%的患者出现晚期并发症, 包括失禁及继发于肛瓣破裂和功能不全的梗阻, 接近60%患者需行肛瓣修复手术, 虽肛瓣脱垂随着吻合器技术的发展已经有所降低, 但储袋功能丧失的比例却没有减少。一项研究显示, 控制性回肠造瘘术在29 a间的累计

■应用要点

本指南对于溃疡性结肠炎的外科治疗有很大的指导作用, 他使我们临床一线医生更全面地掌握溃疡性结肠炎的内科与外科治疗, 使结肠直肠外科医师对于不同阶段溃疡性结肠炎患者的外科手术方式和时机的选择有了更为全面的把握, 对于各种不同手术之间利弊有了更为全面的认识, 更好地根据循证医学的原则对溃疡性结肠炎的患者进行有效的治疗。

■名词解释

1 溃疡性结肠炎: 是发生在结肠的一类非特异性炎症性疾病, 通常与 Crohn病共同被称为炎症性肠病。

2 回肠储袋肛管吻合术(IPAA): 全结肠直肠切除后, 将末端回肠松解折叠, 折叠部分回肠彼此侧侧吻合扩大肠腔, 形成储袋后再与肛管吻合, 使末端侧侧缝合的回肠代替直肠, 起到储存粪便的作用。

成功率达到71%。2次重建、IPAA失败后进行的控制性回肠造瘘术, 其失败率(46%)比起1次重建术后(23%)要高。三分之二行功能控制性回肠造瘘术的患者, 其生活质量与行IPAA相同。

部分高选择性溃疡性结肠炎患者, 腹腔全结肠切除并回肠直肠吻合术是一个可接受的手术方式。[循证医学水平III, 推荐等级B(ClassIII; Grade B)]由于行全结肠切除并回肠直肠吻合术需要一段相对正常的直肠来进行吻合, 所以严重的直肠炎或直肠扩张性显著下降都是此手术的禁忌症。严重的肛门会阴部疾病在溃疡性结

肠炎患者中虽不常见, 但也不能行回肠直肠吻合术。此手术的其他禁忌症包括结肠发育不良或癌肿。对比IPAA, 全结肠切除并回肠直肠吻合术的优势在于他操作的简单性和可预计性, 而缺点是残留直肠可能发生病变。一些研究表明, 12%-50%患者在随访6 a以上出现手术失败。在给予患者建议和讨论其他可供选择的手术方式时, 此手术存在的剩余直肠出现癌肿的可能也应被考虑在内, 虽然癌肿的发病率很低(在长期随访中为0-6%), 但行全结肠切除并回肠直肠吻合术的患者仍需每年行肠镜检查。

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 •

《世界华人消化杂志》简介

《世界华人消化杂志》创刊于1993-01-15, 原刊名《新消化病学杂志》, 1999-03-25经国家科学技术部和国家新闻出版总署批准更名为《世界华人消化杂志》, 国科发财字[1999] 071号, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内外公开发行的综合性消化病学类学术期刊。2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001071号。《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》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。《世界华人消化杂志》综合介绍消化病学前沿基础与临床研究的发现, 覆盖消化病学领域中经临床实验证明的技术进展。从1993-2005《世界华人消化杂志》发表的文章可以在线<http://www.wjgnet.com>免费阅读全文。《世界华人消化杂志》综合介绍以下领域的内容: 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、消化护理、消化医学影像、消化病理、消化预防医学、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》开通了<http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>在线办公系统, 实现了在线投稿和审稿等功能。

尾静脉液压法注射转hIL-10在大鼠肝组织中的表达

成峰, 王学浩, 肇毅, 黄蓬

成峰, 王学浩, 南京医科大学第一附属医院肝脏移植中心 江苏省南京市 210029

肇毅, 南京医科大学第一附属医院普通外科 江苏省南京市 210029

黄蓬, 南京医科大学动物实验中心 江苏省南京市 210029

通讯作者: 成峰, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院肝脏移植中心. docchengfeng@sohu.com
电话: 025-83718836-6476 传真: 025-83672106

收稿日期: 2006-05-05 接受日期: 2006-05-29

Hydrodynamics-based delivery of human interleukin-10 gene in rats

Feng Cheng, Xue-Hao Wang, Yi Zhao, Peng Huang

Feng Cheng, Xue-Hao Wang, Liver Transplantation Center, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Yi Zhao, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Peng Huang, Animal Experiment Center, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Feng Cheng, Center of Liver Transplantation, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. docchengfeng@sohu.com

Received: 2006-05-05 Accepted: 2006-05-29

Abstract

AIM: To study hydrodynamics-based delivery of human interleukin-10 (hIL-10) transferred with Sleeping Beauty (SB) transposon system in rats.

METHODS: All the rats were injected with 20 mL Ringers solution within 10-12 s via the tail vein. The rats were divided into the following groups according to different treatments: Ringers control; 100 μ g empty liposome DOTAP; 100 μ g liposome DOTAP + 50 μ g pT-hIL-10; 50 μ g pT-hIL-10 + 5 μ g pCMV-SB ($n = 6$, in each group). The levels of alanine aminotransferase (ALT) were measured in each group, and the concentrations of hIL-10 in the serum were examined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) on postoperative day 1, 4, 7, 14 in transferred gene groups, respectively. The expression of hIL-10 mRNA was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: The levels of alanine aminotransferase were as follows: 4339 ± 602 , $13\ 516 \pm 535$, 6576 ± 347 , 4451 ± 465 ; 984 ± 125 , 4087 ± 600 , 2117 ± 243 , 1158 ± 130 ; 592 ± 85 , 2339 ± 300 , 1384 ± 165 , 667 ± 90 nkat/L on postoperative day 1, 4, 7 in the group of Ringers control, empty liposome DOTAP, liposome DOTAP + pT-hIL-10 and pT-hIL-10 + pCMV-SB, respectively. The concentrations of hIL-10 in the serum were 818.3 ± 24.9 , 640.7 ± 20.6 , 441.3 ± 25.4 , 322.3 ± 15.4 and 1008.3 ± 65.8 , 820.8 ± 20.9 , 675.8 ± 31.6 , 438.2 ± 26.0 μ g/L on postoperative day 1, 4, 7, 14 in the latter two groups, respectively, and there were significantly differences between the two groups ($P < 0.01$). In pT-hIL-10 + pCMV-SB transferred gene group, hIL-10 mRNA expression was still detected on postoperative day 14.

CONCLUSION: High level of hIL-10 gene can be expressed by hydrodynamics-based delivery in rats, and the transfection rate efficacy can be improved with combination of SB transposon system.

Key Words: Hydrodynamics-based delivery; Human interleukin-10; Sleeping Beauty transposon system; Rats

Cheng F, Wang XH, Zhao Y, Huang P. Hydrodynamics-based delivery of human interleukin-10 gene in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(21):2135-2138

摘要

目的: 采用尾静脉液压法注射SB转座元(sleeping beauty transposon)系统转人类白细胞介素10 (human interleukin-10, hIL-10)在大鼠肝组织中的表达。

方法: 采用Ringers溶液20 mL经尾静脉10-12 s内快速注射。实验分组: Ringers 20 mL对照组、DOTAP 100 μ g空白组、DOTAP 100 μ g+pT-hIL-10 50 μ g转基因组、pT-hIL-10 50 μ g+pCMV-SB 5 μ g共注射组(每组 $n = 6$)。尾静脉注射后采血检测肝功能和转基因组血清中hIL-10的表达。RT-PCR法检测转基因组术后7, 14 d肝组织中hIL-10 mRNA的表达。

■背景资料

裸质粒DNA注射介导外源基因转移和表达已被广泛应用,但存在着转染效率差、表达水平低等缺点。从小鼠尾静脉快速注射大容量DNA溶液,能够介导外源基因的高效表达,与常规方法相比能够提高100-1000倍。Sleeping Beauty转座元(SB)是近年发现的哺乳动物转座元,可在Sleeping Beauty转座酶作用下将所携带的外源基因整合到脊椎动物细胞染色体上,介导外源基因长期表达。

■相关报道

Maruyama *et al* 将Epo表达质粒通过尾静脉以25 mL/体重15 s速度注射到大鼠体内(100 mL/kg 体重)得到Epo的最大表达水平。由于大鼠对频繁采血监测血液参数更加耐受,因此更加适合生物医学研究。Yant *et al* 将SB转座元系统携带的人FIX注射到小鼠体内后,人FIX表达框架在5%-6%被转染的肝细胞中发生整合,人FIX在体内的77-105 ng/mL表达量持续5 mo以上。

结果:尾静脉注射后1, 4, 7 d Ringers 20 mL组、DOTAP组、DOTAP+pT-hIL-10组、pT-hIL-10+pCMV-SB共注射组ALT水平分别为:4339±602, 13 516±535, 6576±347, 4451±465; 984±125, 4087±600, 2117±243, 1158±130; 592±85, 2339±300, 1384±165, 40±663 nkat/L。DOTAP+pT-hIL-10组、pT-hIL-10+pCMV-SB共注射组术后1, 4, 7, 14 d血清hIL-10浓度分别为:818.3±24.9, 640.7±20.6, 441.3±25.4, 322.3±15.4和1008.3±65.8, 820.8±20.9, 675.8±31.6, 438.2±26.0 μg/L, 两组相比有显著差异($P<0.01$)。转座元转基因组2 wk后仍有hIL-10 mRNA表达,高于DOTAP转基因组。

结论:尾静脉液注法注射转hIL-10可在大鼠肝组织中较长时间表达,联合SB转座元系统转hIL-10可提高转基因的效率。

关键词:尾静脉液注法;人类白细胞介素10; SB转座元; 大鼠

成峰, 王学浩, 肇毅, 黄蓬. 尾静脉液注法注射转hIL-10在大鼠肝组织中的表达. 世界华人消化杂志 2006;14(21):2135-2138
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2135.asp

0 引言

质粒介导外源基因在体内的表达是研究基因功能和基因治疗的主要手段。自从Wolff *et al*^[1]最先证明骨骼肌可被DNA转染以来,裸质粒DNA注射介导外源基因转移和表达已被广泛应用。质粒具有制备简便、廉价,且安全性较高等优点,但也存在着转染效率差、表达水平低等缺点。因此如何提高裸DNA注射介导外源基因转移效率和表达水平是该研究领域的重点。Liu *et al*^[2]与Zhang *et al*^[3-4]从小鼠尾静脉快速注射大容量DNA溶液,能够介导外源基因的高效表达,与常规方法相比能够提高100-1000倍,在肝脏中荧光素酶表达水平最高,同时在脾、肾、心、肺中也检测到低水平的表达。该方法介导裸质粒转移及表达水平主要决定于注射时在体内形成的瞬时液注,被称为尾静脉液注法或尾静脉大容量快速注射法。我们在构建转座元表达质粒pT-hIL-10 (human interleukin-10)的基础上,采用尾静脉液注法注射SB转座元(sleeping beauty transposon)系统转hIL-10,并与阳离子脂质体DOTAP介导的方法相比较,研究转基因在大鼠肝组织中的表达。

表1 大鼠移植肝术后ALT变化(mean±SD, $n=6$)

分组	尾静脉液注法注射术后ALT的变化(nkat/L)		
	1 d	4 d	7 d
Ringers对照组	4339±602	984±125	592±85
DOTAP空白组	13516±535 ^{bd}	4087±600 ^{bd}	2339±300 ^{bd}
DOTAP转基因组	6576±347 ^b	2117±243 ^b	1384±165 ^b
SB转基因组	4451±465 ^d	1158±130 ^d	663±90 ^d

^b $P<0.01$ vs Ringers组; ^d $P<0.01$ vs DOTAP转基因组。

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠由江苏省实验动物中心提供,体质量200-220 g,均在南京医科大学动物中心无病理条件下饲养,术前12 h禁食。hcDNA片段插入带EF启动子的转座元表达质粒框架即pT-hIL-10(与上海复旦大学生命科学院基因治疗试验室卢斌博士合作完成),转座酶表达质粒pCMV-SB由Dr. Zoltan Ivics^[5]提供。

1.2 方法 所有实验组采用Ringers溶液20 mL经尾静脉10-12 s内快速注射,实验分组:Ringers 20 mL对照组($n=6$)、100 μg DOTAP空白组($n=6$)、100 μg DOTAP+50 μg pT-hIL-10转基因组($n=6$)、50 μg pT-hIL-10+5 μg pCMV-SB共注射组($n=6$)。尾静脉注射后1, 4, 7 d采血检测肝功能和转基因组1, 4, 7, 14 d检测血清中hIL-10的表达。RT-PCR法检测转基因组术后7, 14 d肝组织中hIL-10 mRNA的表达。肝穿刺取各组($n=3$)大鼠肝脏组织,液氮中速冻后转移至-70℃冰箱保存。取100 mg组织抽提总RNA, A_{260}/A_{280} 在1.8-2.0之间。hIL-10的引物上游5'GG(GAATTC)ATGCACAGCTCAGCACTGC3'括号内为EcoR I酶切位点;下游引物为5'CC(GATCC)GATTTTGGAGAC3',括号内为BamH I酶切位点,扩增片段为610 bp。β-actin的引物上游5'CCTTCCTGTGCATGGAGTCCT3',下游引物为5'GGAGCAATGATCTTGATCTTC3',扩增片段为202 bp。反应条件:94℃预变性5 min;94℃变性45 s, 55℃退火1 min, 72℃延伸1 min,共38个循环;再72℃延伸7 min, 4℃保存。

2 结果

2.1 大鼠移植肝术后ALT变化(表1) Ringers对照组术后4 d肝功能基本恢复正常,SB转座元组肝功能与Ringers对照组之间无差异, DOTAP组术后1, 4, 7 d ALT水平明显高于同一时间段的SB

转座元组和Ringers对照组($P<0.01$). DOTAP基因治疗组的肝功能损伤程度较DOTAP对照组轻, 两组之间有显著性差异($P<0.01$).

2.2 血清hIL-10的表达量 DOTAP+pT-hIL-10组、pT-hIL-10+pCMV-SB共注射组术后1, 4, 7, 14 d血清hIL-10浓度分别为: 818.3 ± 24.9 , 640.7 ± 20.6 , 441.3 ± 25.4 , 322.3 ± 15.4 和 1008.3 ± 65.8 , 820 ± 20.9 , 676 ± 31.6 , 438 ± 26.0 $\mu\text{g/L}$. 两组之间差异性显著($P<0.01$).

2.3 肝组织中hIL-10mRNA的表达 转座元转导hIL-10基因和DOTAP治疗组术后1 wk时均可检测到mRNA表达, 术后2 wk转座元转导hIL-10基因组仍可表达mRNA, 而DOTAP治疗组未能检测到mRNA表达(图1).

3 讨论

裸质粒作为基因表达及基因治疗载体, 与病毒载体相比有许多突出的优点, 如制备简易, 廉价, 注射后无载体本身引起的免疫反应, 安全性高等. 但由于裸质粒体内转染效率低, 所以应用受到了限制. 裸质粒体内转染效率的提高一直是该领域的研究热点. 液压法(hydrodynamics-based procedure, 又称尾静脉大容量快速注射法)是近年发展起来的血管注射途径介导裸质粒高水平表达的又一简易注射方法. 这种尾静脉液压法不仅可用于小鼠, 也可用于大鼠. Maruyama *et al*^[6]将Epo表达质粒通过尾静脉以25 mL体积15 s速度注射到大鼠体内(100 mL/kg体重)得到Epo的最大表达水平. 由于大鼠对频繁采血监测血液参数更加耐受, 因此更加适合生物医学研究. 血管注射途径介导的裸质粒转移效率及表达水平之高十分令人吃惊, 可与病毒载体相媲美, 液压法介导的DNA高效转移机制也成为近年来的研究热点. Budker推测可能的机制是: (1)细胞膜大面积破坏. 血管高压注射能介导外源基因在体内许多组织中高水平表达, 但需要大体积快速注射, 在血管中形成压力. 这种注射过程会产生两种力量破坏细胞膜: 作用于血管壁的总压力和液体由血管腔流到细胞造成的剪切力. 与膜破坏理论相悖的观点是, 靶器官中只有特定的细胞表达外源基因, 如肌肉中只有肌纤维, 肝脏中只有肝细胞表达外源基因(内皮细胞不表达). 所以此理论不能充分解释裸质粒DNA在肝脏和肌肉的实质细胞中的定位表达. (2)细胞膜小孔形成. 这一假说认为质粒DNA通过细胞膜上瞬间的穿孔进入细胞, 这种穿孔或

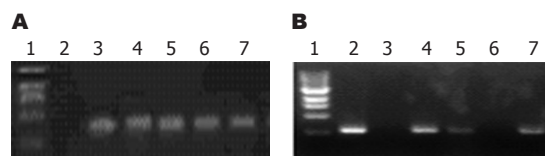


图1 RT-PCR法检测转基因组肝组织中hIL-10 mRNA表达. A: β -actin RT-PCR; B: hIL-10 mRNA RT-PCR. 1: DNA marker; 2: positive control; 3: negative control; 4, 5: livers of SB-pT-IL10 treated rat after 7, 14 d; 6, 7: livers of DOTAP-pT-IL10 treated rat after 14, 7 d.

者是自然产生, 或者由于注射过程造成. 注射早期质粒DNA的摄取可能由此介导. 尾静脉液压法介导质粒注射后外源基因在最初几天维持高水平表达, 此后迅速下降, 30 d时降到最底水平. 为了提高此方法的应用价值, 研究者们发展了许多延长外源基因表达的措施. SB转座元是近年发现的哺乳动物转座元, 可在SB转座酶作用下将所携带的外源基因整合到脊椎动物细胞染色体上, 介导外源基因长期表达. 他不存在病毒载体的缺点(多拷贝插入, 细胞复制时才整合, DNA大小的严格限制, 整合到表达易被削弱的位点, 外壳蛋白引起的免疫反应, 生产困难等). 尽管转座元作为基因转移载体仍存在许多潜在的问题, 如转座效率, 转座引起的后果, 以及将转座元载体有效转移到细胞核中等, 但转座元在基因治疗中的应用是必然的, 尤其在肝细胞生物学研究中具有重要的应用价值^[7-16]. Yant *et al*^[17]将转座元系统携带的人FIX注射到小鼠体内后, 人FIX表达框架在5%-6%被转染的肝细胞中发生整合, 人FIX在体内的77-105 $\mu\text{g/L}$ 表达量持续5 mo以上, 这些结果为基因治疗载体设计提供了新的策略.

我们采用液压法选择SB转座元介导hIL-10基因, 并与DOTAP包裹hIL-10质粒进行转基因比较其在大鼠肝组织中的表达. DOTAP可与带负电荷的DNA高效结合, 产生稳定的转染复合物与细胞结合, 将DNA释放入细胞内. DOTAP具有高效、低毒、适用细胞类型多的特点, 在有血清和无血清的情况下均可使用. 液压法对各实验组肝功能损伤的结果表明, Ringers对照组术后4 d肝功能基本恢复正常, SB转座元组肝功能与Ringers对照组之间无差异, DOTAP对大鼠肝功能的影响也不容忽略, 本组实验中术后1, 4, 7 d ALT水平明显高于同一时间段的SB转座元组和Ringers对照组($P<0.01$). 从而表明脂质体DOTAP对大鼠肝功能的损伤较大. 同时实

应用要点

尾静脉液压法注射SB转座元系统转hIL-10可提高转基因的效率, 转导的目的基因可较长时间高表达, 为转基因实验研究提供了一个简便有效的方法.

■同行评价

本研究采用尾静脉液压法注射SB转座元系统转hIL-10后,目的基因在大鼠肝组织中的表达效率,以寻求一种有效的裸质粒转染方法,具有一定的实验价值。

验中发现DOTAP基因治疗组的肝功能损伤程度较DOTAP对照组轻,两组之间有显著性差异($P<0.01$)。对此情况可能的解释是一方面DOTAP对肝组织有损伤,另一方面与转导的目的基因hIL-10有关,IL-10是强有力的炎症抑制因子,在炎症的发生中起重用的作用。Higuchi *et al*^[18]采用液压法注射转vIL-10基因在大鼠肝组织中的表达,术后vIL-10的峰值为656.1 $\mu\text{g/L}$,低于本实验中DOTAP转hIL-10组,从而表明DOTAP介导大鼠体内转基因治疗可提高基因的转导效率,但转导效率仍明显低于SB转座元组($P<0.01$),且维持高浓度表达hIL-10时间短,实验中术后1, 4, 7, 14 d hIL-10水平明显低于同一时间段的SB转座元组($P<0.01$);对转座元转导hIL-10基因检测表明术后2 wk仍可表达mRNA,明显高于DOTAP治疗组($P<0.01$)。液压法注射脂质体DOTAP介导的转基因治疗由于其肝功能损伤严重,转导后表达的目的基因持续时间较SB介导转基因短。尾静脉液压法注射转hIL-10可在大鼠肝组织中较长时间的表达,是一种简便、有效的转基因方法。尾静脉液压法注射SB转座元系统转hIL-10可提高转基因的效率,为我们进一步研究打下基础。

4 参考文献

- Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 1990; 247: 1465-1468
- Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther* 1999; 6: 1258-1266
- Zhang G, Budker V, Wolff JA. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 1735-1737
- Zhang G, Song YK, Liu D. Long-term expression of human alpha1-antitrypsin gene in mouse liver achieved by intravenous administration of plasmid DNA using a hydrodynamics-based procedure. *Gene Ther* 2000; 7: 1344-1349
- Ivics Z, Hackett PB, Plasterk RH, Izsvak Z. Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell* 1997; 91: 501-510
- Maruyama H, Higuchi N, Nishikawa Y, Kameda S, Iino N, Kazama JJ, Takahashi N, Sugawa M, Hanawa H, Tada N, Miyazaki J, Gejyo F. High-level expression of naked DNA delivered to rat liver via tail vein injection. *J Gene Med* 2002; 4: 333-341
- Frommolt R, Rohrbach F, Theobald M. Sleeping Beauty transposon system-future trend in T-cell-based gene therapies? *Future Oncol* 2006; 2: 345-349
- Boezaart AP, Raw RM. Sleeping beauty or big bad wolf? *Reg Anesth Pain Med* 2006; 31: 189-191
- Saeki Y. Stable CNS gene delivery with Sleeping Beauty armed with a high-capacity HSV virion. *Mol Ther* 2006; 13: 457-458
- Wilber A, Frandsen JL, Geurts JL, Largaespada DA, Hackett PB, McIvor RS. RNA as a source of transposase for sleeping beauty-mediated gene insertion and expression in somatic cells and tissues. *Mol Ther* 2006; 13: 625-630
- Score PR, Belur LR, Frandsen JL, Guerts JL, Yamaguchi T, Somia NV, Hackett PB, Largaespada DA, McIvor RS. Sleeping Beauty-mediated transposition and long-term expression in vivo: use of the LoxP/Cre recombinase system to distinguish transposition-specific expression. *Mol Ther* 2006; 13: 617-624
- Starr TK, Largaespada DA. Cancer gene discovery using the Sleeping Beauty transposon. *Cell Cycle* 2005; 4: 1744-1748
- Huang X, Wilber AC, Bao L, Tuong D, Tolar J, Orchard PJ, Levine BL, June CH, McIvor RS, Blazar BR, Zhou X. Stable gene transfer and expression in human primary T cells by the Sleeping Beauty transposon system. *Blood* 2006; 107: 483-491
- Eisenstein M. Wake-up call for Sleeping Beauty. *Nat Methods* 2005; 2: 637
- Izsvak Z, Ivics Z. Sleeping Beauty hits them all: transposon-mediated saturation mutagenesis in the mouse germline. *Nat Methods* 2005; 2: 735-736
- Converse AD, Belur LR, Gori JL, Liu G, Amaya F, Aguilar-Cordova E, Hackett PB, McIvor RS. Counterselection and co-delivery of transposon and transposase functions for Sleeping Beauty-mediated transposition in cultured mammalian cells. *Biosci Rep* 2004; 24: 577-594
- Yant SR, Meuse L, Chiu W, Ivics Z, Izsvak Z, Kay MA. Somatic integration and long-term transgene expression in normal and haemophilic mice using a DNA transposon system. *Nat Genet* 2000; 25: 35-41
- Higuchi N, Maruyama H, Kuroda T, Kameda S, Iino N, Kawachi H, Nishikawa Y, Hanawa H, Tahara H, Miyazaki J, Gejyo F. Hydrodynamics-based delivery of the viral interleukin-10 gene suppresses experimental crescentic glomerulonephritis in Wistar-Kyoto rats. *Gene Ther* 2003; 10: 1297-1310

电编 张敏 编辑 潘伯荣

针刺对功能性消化不良患者近端胃动力的影响

姚筱梅, 姚树坤, 张瑞星

姚筱梅, 姚树坤, 张瑞星, 河北医科大学第四医院消化内科
河北省石家庄市 050011
通讯作者: 姚筱梅, 050011, 河北省石家庄市健康路12号, 河北
医科大学第四临床医院消化内科. kylieyao@sohu.com
收稿日期: 2006-05-20 接受日期: 2006-05-29

Effect of acupuncture on proximal gastric motility in patients with functional dyspepsia

Xiao-Mei Yao, Shu-Kun Yao, Rui-Xing Zhang

Xiao-Mei Yao, Shu-Kun Yao, Rui-Xing Zhang, Department of Gastroenterology, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei Province, China

Correspondence to: Xiao-Mei Yao, Department of Gastroenterology, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, 12 Jiankang Road, Shijiazhuang 050011, Hebei Province, China. kylieyao@sohu.com

Received: 2006-05-20 Accepted: 2006-05-29

Abstract

AIM: To investigate the effect of acupuncture on the proximal gastric motility in patients with functional dyspepsia (FD) induced by mechanical gastric distention.

METHODS: Sixty patients were divided into group A and B. Isovolumetric gastric distention was performed on all the subjects. The patients in group A were given acupuncture with electrical stimulation of pulse train, while those served as the controlled group. The minimal distension pressure (MDP), initial and maximal tolerable volume, pressure and compliance (the ratio of volume to pressure) were recorded in the two groups.

RESULTS: MDP had no significant difference between group A and B ($P > 0.05$). In group A, the initial volume and pressure (560.9 ± 119.5 mL vs 352.0 ± 139.3 mL; 8.06 ± 2.95 mmHg vs 5.40 ± 2.41 mmHg), the maximal tolerable volume and pressure (810.7 ± 119.62 mL vs 504.1 ± 159.6 mL; 13.25 ± 2.23 mmHg vs 9.82 ± 1.9 mmHg) and the compliance (61.2 ± 18.6 mL/mmHg vs 51.4 ± 17.8 mL/mmHg) were significantly higher than

those in group B ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Acupuncture can improve proximal gastric motility and reduce visceral sensitivity in patients with FD.

Key Words: Functional dyspepsia; Mechanical gastric distention; Gastric motility

Yao XM, Yao SK, Zhang RX. Effect of acupuncture on proximal gastric motility in the patients with functional dyspepsia. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(21):2139-2141

摘要

目的: 观察针刺对功能性消化不良患者机械性胃扩张近端胃动力的影响。

方法: 功能性消化不良患者60例分为针灸组 and 对照组, 分别进行等容机械性胃扩张。观察近端胃动力参数: 最小牵张压(MDP), 初始容积和压力, 最大耐受容积、压力和顺应性(容积和压力的比值)。

结果: 两组最小牵张压无显著性差异(5.28 ± 2.62 mmHg vs 4.98 ± 1.87 mmHg, $P > 0.05$), 针灸组的初始压力和容积(8.06 ± 2.95 mmHg vs 5.40 ± 2.41 mmHg, 560.9 ± 119.5 mL vs 352.0 ± 139.3 mL), 最大耐受压力和容积(13.25 ± 2.23 mmHg vs 9.82 ± 1.9 mmHg, 810.7 ± 119.62 mL vs 504.1 ± 159.6 mL), 顺应性(61.2 ± 18.6 mL/mmHg vs 51.4 ± 17.8 mL/mmHg)均显著高于对照组($P < 0.05$)。

结论: 针灸可以显著提高功能性消化不良患者的近端胃动力, 降低内脏敏感性。

关键词: 功能性消化不良; 机械性胃扩张; 胃动力

姚筱梅, 姚树坤, 张瑞星. 针刺对功能性消化不良患者近端胃动力的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(21):2139-2141
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2139.asp>

0 引言

功能性消化不良(functional dyspepsia FD)是排除

■背景资料

功能性消化不良(FD)发病率较高, 其确切发病机理尚不明确。现代医学采用对症治疗, 如促动力药、抑酸药、黏膜保护药等, 均未取得满意疗效, 并存在一定副作用。针灸治疗功能性消化不良具有多环节、多靶点、疗效显著、副作用小等特点。

■创新盘点

针刺调节的机制研究大多是动物实验,有关针灸治疗功能性消化不良的临床报道较多,但有关针灸对功能性消化不良近端胃动力的研究未见报道,本实验采用电子恒压器技术检测功能性消化不良患者的近端胃动力指标,从针刺对近端胃动力和内脏感觉阈值方面探讨针刺治疗功能性消化不良的作用和机制。

■应用要点

近端胃动力障碍和内脏敏感性增高是功能性消化不良的重要发病机制之一,本研究提示针灸可以促进近端胃动力,降低内脏敏感性,对功能性消化不良有广泛的治疗前景。

器质性疾病,以上腹痛、腹胀、早饱、恶心等为主要症状的一组临床症候群,发病率较高,有关针灸对功能性消化不良患者胃肠动力的报道较多,但有关针灸对功能性消化不良近端胃动力的研究,国内未见报道。我们选取治疗胃肠疾病的常用经验穴位足三里(ST36)、内关(PC6)和天枢(ST25),通过电子恒压器检测近端胃动力参数,从而探讨针灸对功能性消化不良患者近端胃动力的影响,为针灸治疗功能性消化不良提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病例 2004-06/2005-10就诊于河北医科大学第四医院消化内科门诊FD患者60例,分为针刺组30例,男14例,女16例,平均年龄 34.0 ± 9.7 岁;对照组30例,男13例,女17例,平均年龄 32.0 ± 8.3 岁,两组临床资料比较无显著差异($P > 0.05$),均符合Rome II FD的诊断标准^[1],具有早饱、上腹胀,可伴有恶心、呕吐、烧心、厌食、上腹痛、嗝气等消化不良症状,且至少存在12 wk以上。所有病例在研究开始前2 wk内经胃镜检查除外上消化道器质性疾病;经B型超声、血生化等检查除外胆囊、胰腺、内分泌及全身性疾病;无腹部手术史,无妊娠及严重肾功能不全。自受试前1 wk开始,停用一切影响消化道功能的药物。所有患者都签署知情同意书。

1.1.2 仪器 苏州医疗用品厂生产的华佗牌毫针,长度40-50 mm,直径0.32 mm。脉冲发生器(Acupulser A310, World Precision Instrument, USA),刺激隔离器(Stimulus Isolator A385, World Precision Instrument, USA)。SVS/Barostat(Synergy Visceral Stimulator 内脏电子刺激器)(Medtronic synergetics, Sweden), Barostat能通过电子反馈机制,维持在设定的压力或容积水平上,测定气囊内气体容量或压力的相应变化。

1.2 方法 所有受试对象试验前夜至少禁食12 h。静卧5 min后,受试者斜靠于检查床(约成30°角),向受试者做好解释工作,使其放松,用20 g/L利多卡因局部喷雾麻醉咽部。校正Barostat,将缚在胃管上的聚乙烯气囊(最大容量1000 mL)内气体抽尽,并将气囊折叠好,经受试者口腔置入近端胃,将胃管与仪器连接。针刺组在等容胃扩张前开始针刺,并直到扩张结束。针刺方法:双侧足三里、内关和天枢穴,垂直进针,提插捻转得气后,内关和足三里穴接电针刺激,腹部天枢

表 1 不同胃扩张条件下的压力、容积值和顺应性变化比较 (mean \pm SD)

	针灸组	对照组
初始压力 (mmHg)	8.06 ± 2.95^a	5.40 ± 2.41
初始容积 (mL)	560.9 ± 119.5^a	352.0 ± 139.3
最大压力 (mmHg)	13.25 ± 2.23^a	9.82 ± 1.9
最大容积 (mL)	810.7 ± 119.62^a	504.1 ± 159.6
顺应性 (mL/mmHg)	61.2 ± 18.6^a	51.4 ± 17.8

^a $P < 0.05$ vs 对照组。

穴留针,但不接电针刺激(考虑胃内气囊充气扩张影响),工作参数:串脉冲刺激设定为刺激2 s,停3 s(即12 cpm),串脉冲的频率为40 Hz,波宽500 μ s,输出电流10 mA。对照组不进行针刺,直接进行等容胃扩张。方法:先向气囊内注入气体300 mL使气囊充分张开,确定气囊在胃底部后,再彻底放气,接着向气囊内注入气体30 mL,测出气囊内的压力,即最小牵张压(需要克服腹内压的压力, minimal distension pressure, MDP),通过SVS/Barostat进行等容扩张^[2]:即从0起,每2 min增加容积50 mL(稳定1 min后,记录后1 min的压力、容积和顺应性变化),分别记录达到初始容积(即受试者在接受胃扩张刺激时,开始感觉到上腹不适应或胀满时的容积)时和达到最大耐受容积时(即受试者在接受胃扩张刺激时,开始感觉到上腹疼痛或难以忍受时的容积),气囊内相应的压力和顺应性变化。观察近端胃动力参数:最小牵张压(MDP),初始容积和压力值,最大耐受容积和压力值,顺应性(容积和压力的比值)。

统计学处理 将所得资料用SPSS12.0分析软件进行处理,数据用mean \pm SD表示,组间两两比较用 t 检验分析。 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

针灸组和对照组的最小牵张压分别是 5.28 ± 2.62 mmHg和 4.98 ± 1.87 mmHg,两组比较无显著性差异($P > 0.05$)。针灸组的初始压力和容积,最大耐受压力和容积,顺应性均显著高于对照组($P < 0.05$,表1)。

3 讨论

胃从解剖上分成近端胃和远端胃两部分。近端胃的舒张功能是胃动力的重要组成部分,他包括容受性舒张功能和适应性舒张功能。近端胃的舒张和远端胃的节律性收缩、胃窦幽门十二指肠协调运动等一起影响胃排空。国外有研究

报道40%-70%的功能性消化不良患者存在近端胃动力障碍^[3-4], 远端胃的动力检查方法已开展了多年, 所获得的结果也得到了比较一致的认可^[5]. 而近端胃动力检查因设备技术、方法等方面的原因, 目前研究开展得不够广泛, 尤其是有关针灸对近端胃动力的影响几乎没有文献. 电子恒压器是测量近端胃张力的金标准^[6], 能准确地对胃敏感性、顺应性和近端胃容受性进行检测^[7]. 本研究通过电子恒压器进行等容机械性胃扩张, 观察了针灸对功能性消化不良患者近端胃内脏感觉阈值和顺应性等近端胃动力指标的影响. 初始容积、初始压力、最大耐受容积和最大耐受压力等指标可以反映近端胃的感觉阈值, 本研究显示, 针刺可以显著提高功能性消化不良患者的初始耐受容积和压力以及最大耐受容积和压力, 说明针刺可以显著提高功能性消化不良患者的内脏感觉阈值, 降低内脏敏感性. 胃的顺应性反映胃壁弹力特性, 我们发现, 针刺组的顺应性显著高于对照组, 说明针刺可以提高功能性消化不良患者近端胃壁的弹性, 提高近端胃的容受性与适应性舒张功能.

功能性消化不良的病因目前尚未明了, 目前尚无满意的治疗方法, 其发病可能与消化道运动异常、内脏感觉异常、幽门螺杆菌感染、胃酸、精神及环境等因素有关, 可能是多种因素的综合作用^[8]. Tack *et al*^[9]的研究结果提示在功能性消化不良的发病中, 胃排空障碍、胃敏感性增高和近端胃容受性障碍三者各自独立地起作用, 三者间彼此无相关关系. 所以, 单纯针对某种发病原因的治疗并未取得满意疗效, 如西药的促胃动力药和降低内脏敏感性的药物等^[10-12], 并且长期服用具有一定副作用. 针灸治疗功能性消化不良机制不明, 但长期的实践证明, 针灸治疗功能性消化不良具有副作用小, 疗效显著等特点^[13-15], 本研究数据显示, 针灸既能显著提高功能性消化不良患者的近端胃动力, 又可以降低内脏敏感性, 提示针灸治疗功能性消化不良的机制可

能与多种因素有关.

4 参考文献

- 1 Talley NJ, Stanghellini V, Heading RC, Koch KL, Malagelada JR, Tytgat GN. Functional gastroduodenal disorders. *Gut* 1999; 45 Suppl 2: II37-II42
- 2 Stendal Cha. Practical guide to gastrointestinal function testing. Victoria: Blackwell sci, 1997: 225-231
- 3 Di Stefano M, Miceli E, Mazzocchi S, Tana P, Corazza GR. The role of gastric accommodation in the pathophysiology of functional dyspepsia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2005; 9: 23-28
- 4 Thumshirn M, Camilleri M, Saslow SB, Williams DE, Burton DD, Hanson RB. Gastric accommodation in non-ulcer dyspepsia and the roles of *Helicobacter pylori* infection and vagal function. *Gut* 1999; 44: 55-64
- 5 周吕, 柯美云. 胃运动生理与病理生理及检查方法. 现代胃肠病学. 第1版. 北京: 科学出版社, 1994: 842-861
- 6 Azpiroz F, Malagelada JR. Gastric tone measured by an electronic barostat in health and postsurgical gastroparesis. *Gastroenterology* 1987; 92: 934-943
- 7 van der Schaar PJ, Lamers CB, Masclee AA. The role of the barostat in human research and clinical practice. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1999; 230: 52-63
- 8 Lee KJ, Kindt S, Tack J. Pathophysiology of functional dyspepsia. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18: 707-716
- 9 Tack J, Piessevaux H, Coulie B, Caenepeel P, Janssens J. Role of impaired gastric accommodation to a meal in functional dyspepsia. *Gastroenterology* 1998; 115: 1346-1352
- 10 Tack J, Lee KJ. Pathophysiology and treatment of functional dyspepsia. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: S211-S216
- 11 Talley NJ, Axon A, Bytzer P, Holtmann G, Lam SK, Van Zanten S. Management of uninvestigated and functional dyspepsia: a Working Party report for the World Congresses of Gastroenterology 1998. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13: 1135-1148
- 12 Cremonini F, Delgado-Aros S, Talley NJ. Functional dyspepsia: drugs for new (and old) therapeutic targets. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18: 717-733
- 13 陈广娥, 顾兴江, 谭善瑞. 针灸治疗功能性消化不良疗效观察. *中国针灸* 2000; 6: 345-347
- 14 杨安府, 朱莉, 蒙艳莉. 针灸治疗功能性消化不良的临床体会. *陕西中医* 2001; 22: 417-418
- 15 许广喜, 刘银波. 针刺治疗功能性消化不良的临床研究. *现代中西医结合杂志* 2005; 14: 3076-3077

■同行评价

功能性消化不良是临床常见疾病, 目前还没有理想的治疗方法. 文献查阅关于针刺对功能性消化不良患者近端胃动力的影响的研究报道, 具有一定创新性. 本文的研究内容虽然少, 但因为是临床直接观察并非动物实验, 因此, 对临床治疗功能性消化不良具有一定参考意义.

电编 李琪 编辑 潘伯荣

巨大胰腺假性囊肿的处理方法及时机选择

汪建初, 浦润, 李良波, 韦建宝, 韦忠恒, 马日海, 韦邦宁

■背景资料

临床上常常遇到巨大胰腺假性囊肿患者, 在期待性处理过程中常常破裂、出血或者感染。胰腺假性囊肿的处理方法多样, 但是对于巨大的胰腺假性囊肿常需采取综合性的治疗措施, 早期宜行干预治疗使囊肿变小, 减少并发症的发生率。

汪建初, 浦润, 李良波, 韦建宝, 韦忠恒, 马日海, 韦邦宁, 右江民族医学院附属医院肝胆外科 广西壮族自治区百色市533000

通讯作者: 汪建初, 533000, 广西壮族自治区百色市中山二路18号, 右江民族医学院附属医院肝胆外科. wjianchu@sina.com
电话: 0776-2836646

收稿日期: 2006-04-02 接受日期: 2006-06-06

Alternatives of timing and surgical treatments for giant pancreatic pseudocysts

Jian-Chu Wang, Jian Pu, Liang-Bo Li, Jian-Bao Wei, Zhong-Heng Wei, Ri-Hai Ma, Bang-Ning Wei

Jian-Chu Wang, Jian Pu, Liang-Bo Li, Jian-Bao Wei, Zhong-Heng Wei, Ri-Hai Ma, Bang-Ning Wei, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Youjiang Medical College for Nationalities, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Jian-Chu Wang, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Youjiang Medical College for Nationalities, 18 Zhongshan Er Road, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. wjianchu@sina.com

Received: 2006-04-02 Accepted: 2006-06-06

Abstract

AIM: To investigate surgical interventions and timing for giant pancreatic pseudocysts.

METHODS: Twenty-nine patients with giant pseudocysts were retrospectively analyzed. According to the surgical interventions, we divided the 29 cases into three groups: internal drainage group ($n = 14$), external drainage group ($n = 7$), and percutaneous acupuncture drainage group ($n = 8$).

RESULTS: Of the 14 cases in internal drainage group, 1 was complicated with obstruction of intestine and pseudocysts recurred in 4 patients. Of the 7 cases in external drainage group, abscess of pancreas was found in 1 case; pseudocyst recurred also in 1 case; fistula of pancreas and colon developed in 1 case; and the rest were cured with no complications. Of the 8 cases received percutaneous acupuncture drainage under B ultrasonography, 7 were cured completely

and 1 underwent cyst-jejunum anastomosis as the wall became thicker.

CONCLUSION: Percutaneous acupuncture drainage under B ultrasonography or computed tomography should be used in the early stage to make the pseudocyst mature or disappear. For the matured giant pseudocyst mature, surgical interventions should be chosen flexibly.

Key Words: Giant pancreatic pseudocysts; Surgical intervention; Surgical timing

Wang JC, Pu J, Li LB, Wei JB, Wei ZH, Ma RH, Wei BN. Alternatives of timing and surgical treatments for giant pancreatic pseudocysts. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(21):2142-2145

摘要

目的: 探讨巨大胰腺假性囊肿的外科处理方法及时机选择。

方法: 回顾性分析我院近10 a收治的29例巨大胰腺假性囊肿病例; 根据外科干预方法不同, 将病例分为内引流组($n = 14$), 外引流组($n = 7$)和B超定位穿刺置管引流组($n = 8$)。

结果: 29例巨大胰腺假性囊肿均需外科干预治疗, 内引流组中1例并发肠梗阻, 4例囊肿复发; 外引流病例中, 1例并发胰腺脓肿, 2例假性囊肿复发, 1例并发胰瘘和肠瘘; B超定位置管引流7例治愈, 1例囊肿成熟后行囊肿空肠内引流术治愈。

结论: 对于早期巨大胰腺假性囊肿, 可先行B超或CT定位置管引流, 使囊肿缩小或消失; 对于晚期成熟的假性囊肿, 可根据实际情况灵活选择手术方法。

关键词: 巨大胰腺假性囊肿; 手术时机; 手术方法

汪建初, 浦润, 李良波, 韦建宝, 韦忠恒, 马日海, 韦邦宁. 巨大胰腺假性囊肿的处理方法及时机选择. *世界华人消化杂志* 2006;14(21):2142-2145

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2142.asp>

0 引言

胰腺假性囊肿是胰腺炎或胰腺外伤常见的并发症, 临床处理方式多样, 期待性的处理方法常常延误治疗时机, 而且在等待过程中, 囊肿常并发出血、感染、破裂等并发症, 给患者造成很大的损失, 本文统计我院近10 a的假性囊肿病例, 将最大径超过10 cm称为巨大胰腺假性囊肿纳入研究对象, 对此类假性囊肿在早期即可经B超或CT定位置管外引流, 使囊肿缩小, 囊壁成熟, 部分囊肿可治愈; 晚期囊肿可根据实际情况选择相应的内引流术。

1 材料和方法

1.1 材料 本组男19例, 女10例, 平均年龄31岁; 住院1次18例, 住院2次10例, 住院3次1例, 平均住院天数47 d, 所有病例均经B超或CT诊断, 最大囊肿25 cm×16 cm, 最小11 cm×10 cm, 平均15 cm×13 cm, 急性胰腺炎引起15例, 慢性胰腺炎引起4例, 外伤引起6例, 其他原因4例。头部囊肿14例, 体部囊肿6例, 尾部囊肿7例, 2例患者同时有2个囊肿。

1.2 方法 (1)胃囊肿吻合内引流术4例, 囊肿均向胃小弯突出, 胃后壁构成囊肿壁的一部分, 囊肿不向胃结肠韧带或横结肠系膜突出。手术操作均先切开胃前壁, 然后细针抽吸定位囊肿部位, 继而切开胃后壁进入囊腔, 吸尽囊液后将囊壁和胃后壁吻合, 吻合口直径约4 cm。囊肿十二指肠吻合内引流术2例, 1例先分离胰头侧胃结肠韧带, 在囊肿贴近十二指肠处最低部位先悬吊2针, 与十二指肠平行切开囊壁3 cm, 然后将十二指肠纵向切开相等长度进行囊肿十二指肠吻合; 另外1例是位于十二指肠及胰头后的囊肿, 探查确定囊肿部位, 后经十二指肠前壁入路切开在十二指肠后壁及囊肿壁, 吻合口约2 cm。囊肿空肠Roux-en-Y吻合内引流7例, 所有内引流患者囊肿形成时间均在6 wk以上, 在囊肿低位切开约4-5 cm的囊壁游离约40-50 cm空肠襻。4例断端封闭, 在肠襻的对系膜缘切开, 与囊肿行侧壁吻合, 另3例直接予囊壁空肠断端吻合。所有内引流均切除部分囊壁送病理检查证实无内皮细胞, 且在吻合口周围放置腹腔引流管。(2)开腹外引流7例, 其中2例为急性胰腺炎后假性囊肿破裂, 行急诊外引流术, 2例囊肿产生压迫症状, 但囊壁尚未成熟, 3例合并感染, 均在囊内放置多孔硅胶管引流, 另放置腹腔引流管。(3)B超定位外引流8例, 本组8例均为急性胰腺炎后并发的

假性囊肿, 在B超实时引导定位下行囊肿穿刺置管, 引流管直径3 mm, 将前端10 cm长度管侧壁剪小孔, 以防堵塞不能起到有效引流, 若囊液黏稠用生理盐水冲洗抽吸, 保持通畅。B超确定假性囊肿位置, 选择距引流部位最近, 可避开腹腔内臓器和大血管为穿刺点, 并做标记, 先用PTC穿刺针试穿, 取得囊液后, 置入导丝, 更换穿刺针, 扩大穿刺孔。置入引流管(3 mm)并固定, 接引流袋。(4)囊肿胃内外一期引流术1例, 因无法显露囊肿, 故先切开胃前壁, 经胃后壁切开囊肿, 处理囊内容后经胃前后壁将内径1 cm的软管一端剪3或4个侧孔软皮管插入囊内, 将胃后壁黏膜翻入胃腔后在腔内做两层荷包, 在胃前壁腔外做两层荷包内翻缝合, 亦造成内翻。

2 结果

内引流组中1例术后3 mo并发肠梗阻, 行肠段切除。外引流组中1例胰尾外引流患者4 mo后并发胰瘘和结肠外瘘, 行结肠脾曲切除后治愈; 假性囊肿复发4例, 均行再次手术; 2例急性胰腺炎后并发假性囊肿患者在观察期间囊肿破裂, 均行急诊手术外引流, 其中1例假性囊肿再发, 后为预防再次破裂予以B超定位下行囊肿外引流术, 术后30 d拔除置入管, 未再复发, 另外1例术后2 wk并发胰腺脓肿, 后行再次手术, 再次手术后并发假性囊肿, 3 mo后行内引流术; 无死亡病例。B超定位穿刺置管引流中7例治愈, 1例囊肿缩小后行囊肿空肠Roux-en-Y吻合内引流术治愈。

3 讨论

巨大胰腺假性囊肿常难以自然吸收, 故多需要外科干预治疗。本文总结我院近10 a的巨大假性囊肿病例, 处理方法多样, 均有良好的效果。我们认为, 假性囊肿的治疗方法随着医疗技术水平的发展和对其疾病本身的认识加深, 治疗上更趋于微创, 从过去的期待性治疗过渡到主动干预治疗。常规外科干预时机, 囊肿形成时间需在6 wk以上, 囊壁厚度需大于1 cm, 囊肿大小需超过6 cm, 或者出现了明显的并发症。基于有这样的思想指导, 许多患者需长时间等待而得不到及时治疗, 造成了很大的身心损害, 本组有2例巨大囊肿患者在期待治疗期间破裂, 不得不行急诊手术, 而手术方式也仅能行外引流, 其中1例在外引流后1 mo内又形成巨大囊肿, 为防止囊肿再次破裂, 在多普勒超声定位引导下

■创新盘点

本文将直径大于10 cm的假性囊肿归为巨大胰腺假性囊肿, 并且提出对于巨大胰腺假性囊肿需早期干预, 避免并发症如破裂, 出血, 感染的发生。对于囊壁成熟的假性囊肿可以根据具体情况灵活的选择外科治疗方法。

■应用要点

对于巨大胰腺假性囊肿可早期行经皮置管引流术,一方面,部分患者可以得到治愈,对于不能治愈的患者可使囊壁张力减少,早期成熟,减少并发症的发生,为后期的内引流手术做准备。我们建议在处理假性囊肿方面可以借鉴张悱 *et al* 应用生物蛋白胶的经验。

行囊肿穿刺置管引流,1 mo后每日引流量少于10 mL,拔除引流管,囊肿消失,随访3 mo囊肿未复发。8例急性胰腺炎后早期形成的巨大囊肿,我们均在超声引导下穿刺置管引流治疗,对于囊液黏稠的患者,均给予生理盐水冲洗抽吸,7例治愈,1例穿刺置管后囊肿缩小,8 wk囊肿成熟后行内引流术治愈,均无明显并发症。张悱 *et al*^[1]对16例急性胰腺炎后2-4 wk形成的假性囊肿,除1例因出血改手术治疗外,其余15例均行B超或CT定位置管引流治愈,最长28 d,最短仅用8 d,对8例出现胰外瘘采用生长抑素抑胰分泌和生物蛋白胶封闭瘘口治愈;3例出现囊内感染,经冲洗、通畅引流、有效敏感抗生素应用,感染控制良好,15例治愈,治愈率93%,随访10例,随访率62.5%,无复发。在此值得一提的是用生物蛋白胶封闭胰瘘的治疗方法,我们尚未找到相关报道,生物蛋白胶封闭瘘口是比较新颖的方法,但是需要进一步研究可行性及实用性。国内有不少关于应用无水酒精行硬化治疗^[2-3],我们认为无水酒精可以导致周围组织坏死,加重胰腺假性囊肿对周围的侵蚀作用,出血和瘘的并发症有增加的危险;故我们不主张用无水酒精灌注治疗假性囊肿。Seki *et al*^[4]曾经在门诊反复抽吸一个囊肿形成时间8 wk,但是壁厚仅2 mm的患者,使囊肿缩小,囊壁得以成熟,后期顺利的行了囊肿空肠Roux-en-Y吻合。结合本组病例,我们认为对于囊肿过大、壁薄、有可能在观察期间破裂的假性囊肿患者,一般在囊肿出现后6 wk以内,先给予影像学定位引导下穿刺置管引流,一方面可以使囊肿缩小减少破裂的发生率,为尽早行手术治疗提供机会,另一方面可以起到治疗作用。对于行手术内引流治疗的时机问题,本组均系在囊壁成熟后行手术,但是吴河水 *et al*^[5]比较27例胰腺炎后4-8 wk出现的假性胰腺囊肿,行囊肿内引流术(早期手术组),与30例患者囊肿形成后,等待24 wk再施行手术的(晚期手术组)进行比较两组病例,早期手术组的术后吻合口漏发生率、平均住院时间、平均住院费用明显低于晚期手术组,晚期手术组有5例在等待手术的过程中出现并发症而急诊手术(1例囊肿内出血,2例囊肿内感染,2例囊肿破裂)。他们认为术前明确诊断,严格掌握手术指征,早期行假性胰腺囊肿内引流术是安全可行的,且避免了等待过程中囊肿感染、出血和破裂的发生。

随着对胰腺假性囊肿认识的加深,传统期

待性处理原则已经不太完善,新的治疗方法应根据囊肿的分类,亦即急性或慢性假性囊肿的发生、发展及其与主胰管的关系,采用灵活的治疗方法。对于巨大的假性囊肿,期待性的处理方法应慎重,巨大假性囊肿在期待性治疗期间极易破裂或者引起压迫、感染等症状。本组有2例患者观察期间囊肿破裂的前车之鉴,对所有新形成的巨大假性囊肿行多普勒超声实时引导下置管引流,目的是使囊肿变小,减少囊壁张力利于囊壁达到可以手术内引流的需要。7例引流1 mo后复查B超发现囊肿消失,拔除引流管后,随访3 mo囊肿未见复发。因此,对于早期巨大假性囊肿,我们可以早期影像学定位引导下穿刺置管引流,使巨大囊肿变成小的囊肿,对于不与主胰管相通的囊肿,有时候可以通过此方法治愈。Nealon *et al*^[6]研究认为胰管和囊肿相通的患者,采用经皮穿刺置管引流治愈率低,经皮穿刺引流对于胰管正常或者胰管狭窄,但是与囊肿不相通的患者治愈成功率高。对此,中华医学会外科学分会胰腺外科学组建议术前行ERCP检查,明确主胰管与囊肿关系^[7]。章爱斌 *et al*^[8]总结37例D'Egidio I型PPC中16例进行手术引流,8例发生并发症或复发,治疗成功率为50% (8/16);另11例行经皮穿刺引流,治疗成功率82% (9/11)。对于晚期的巨大假性囊肿,处理方法比较成熟,手术内引流或者外引流,技术条件好的医院还可以通过内镜^[9]或腹腔镜完成内引流手术。本组行手术内引流的都是成熟囊肿,有1例囊肿胃一期内外引流术,因为解剖囊肿困难,直接经过胃入路行内外引流术,手术后没有明显的并发症发生。周宏滔 *et al*^[10]进行19例一期内外引流术,近期无死亡,无胰瘘,1例切口感染,均获随访,时间2-18 a,均无复发。认为本法具有易于囊肿冲洗;观察出血情况;减压囊肿,促进吻合口愈合减少瘘的发生;拔管后继续发挥内引流作用等优点。

总之,对于早期巨大胰腺假性囊肿,我们主张先行B超或CT定位穿刺置管引流,而对于晚期成熟的假性囊肿病例可采用灵活的手术方法。

4 参考文献

- 1 张悱,黄毅为. 经皮穿刺置管治疗急性重症胰腺炎并发胰腺假性囊肿16例报告. 临床外科杂志 2006; 14: 54-55
- 2 金震东,刘枫,李兆申. 经皮穿刺无水乙醇灌注治疗胰腺假性囊肿一例报告. 胰腺病学 2003; 3: 80
- 3 熊国蓉,黄明文. 超声引导经皮穿刺置管外引流治疗15例早期巨大胰腺假性囊肿. 中国民康医学杂志 2003;

- 15: 427
- 4 Seki H, Ueda T, Kasuya T, Kotanagi H. Repeated percutaneous aspiration therapy prior to surgery for a pancreatic pseudocyst: report of a case. *Surg Today* 1998; 28: 559-562
- 5 吴河水, 张进祥, 王春友, 李定武, 熊炯. 重症急性胰腺炎继发假性胰腺囊肿手术时机探讨. *中华肝胆外科杂志* 2005; 11: 296-298
- 6 Nealon WH, Walser E. Surgical management of complications associated with percutaneous and/or endoscopic management of pseudocyst of the pancreas. *Ann Surg* 2005; 241: 948-957; discussion 957-960
- 7 中华医学会外科学分会胰腺外科学组. 重症急性胰腺炎诊治原则草案. *中华外科杂志* 2001; 39: 963-964
- 8 章爱斌, 郑树森. D'Egidio分型指导胰腺假性囊肿治疗方案选择. *中国实用外科杂志* 2004; 24: 605-607
- 9 Cahen D, Rauws E, Fockens P, Weverling G, Huibregtse K, Bruno M. Endoscopic drainage of pancreatic pseudocysts: long-term outcome and procedural factors associated with safe and successful treatment. *Endoscopy* 2005; 37: 977-983
- 10 周宏滔, 戴福生, 李宁, 刘杨. 假性胰腺囊肿胃肠道内外一期引流术. *中华普通外科杂志* 2005; 20: 603-604

■同行评价

本文报道29例直径超过10 cm的胰腺假性囊肿的治疗, 强调了囊肿破裂的危险性, 对于临床外科医生有参考意义。

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 •

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.

1 征文内容

会议征集的论文内容包括: (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临床操作表演; (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.

胃恶性间质瘤合并继发性血小板增多症1例

马向涛, 余力伟, 付静

■背景资料

血小板增多症分原发性和继发性两类, 原发性血小板增多症原因不明, 多见于成人。继发性血小板增多症的原因包括: 病毒、细菌感染、外伤、出血、营养缺乏、肾病、肿瘤与遗传性疾病等。GIST发病与转移机制是近期研究的重点。

马向涛, 余力伟, 北京市海淀医院外科 北京市 100080
付静, 北京市海淀医院病理科 北京市 100080
通讯作者: 马向涛, 100080, 北京市海淀区中关村大街29号, 北京市海淀医院外科. xiangtao_ma@pku.org.cn
电话: 010-62583013 传真: 010-62653601
收稿日期: 2006-04-28 接受日期: 2006-05-24

摘要

胃恶性间质瘤患者1例, 临床表现为继发性血小板增多症。手术后血小板数量恢复正常, 血小板增多症可能是反应肿瘤负荷的重要指标。

关键词: 血小板增多症; 胃肠道间质瘤

马向涛, 余力伟, 付静. 胃恶性间质瘤合并继发性血小板增多症1例. 世界华人消化杂志 2006;14(21):2146-2148
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2146.asp>

0 引言

血小板增多症(thrombocytopenia)分原发性和继发性两类, 原发性血小板增多症原因不明, 多见于成人, 血小板计数常在 $800 \times 10^9/L$ - $1000 \times 10^9/L$ 以上且形态功能异常, 有出血倾向和栓塞症状。继发性血小板增多症的原因很多, 如病毒、细菌感染、外伤、出血、营养缺乏、肾病、肿瘤与遗传性疾病等^[1-3], 我院收治1例胃恶性间质瘤患者合并继发性血小板增多症, 现报告如下。

1 病例报告

女, 56岁, 因左上腹胀痛伴坠胀感8 wk, 于2005-07-13入院。患者8 wk前无诱因出现左上腹胀痛伴坠胀感, 左侧卧位时胀痛感明显。开始持续数秒钟, 逐渐持续几分钟, 可自行缓解。患者自发病以来无烦躁易怒, 无多饮多食, 无多汗心悸, 无恶心呕吐, 无返酸嗝气。患者既往无特殊病史。查体: 腹平软, 左上腹肋下可触及约 $8 \text{ cm} \times 6 \text{ cm}$ 大小质硬肿物, 无压痛, 与皮肤无黏连。肝、脾肋下未触及。实验室检查: 血白细胞 $4.2 \times 10^9/L$, 中性粒细胞0.553, 血红蛋白126 g/L, 血小板 $623 \times 10^9/L$, PT 12.8 s, APTT 40.6 s。总蛋白68.3 g/L, 白蛋白41 g/L, 血电解质正常, CEA 0.45 $\mu\text{g/L}$ (正常值0-3.4 $\mu\text{g/L}$), CA19-9 4.6 kU/L

(正常值0-35 kU/L)。胸片: 双肺未见异常。腹部B超: 肝、胆、胰、脾及双肾未见异常。B超: 左上腹可见 $18 \text{ cm} \times 15 \text{ cm} \times 13 \text{ cm}$ 混合回声, 自胰尾部向左, 脾脏受压向下移位。腹部MRI: 左上腹巨大占位, 位于肝左叶及脾胃之间, 可见包膜。术前诊断为胃间质瘤, 完善术前准备后于2005-07-18全麻下行剖腹探查术。术中见肿瘤位于脾胃之间, 直径约18 cm, 色暗红, 表面遍布曲张血管, 有宽3 cm蒂连接于胃体大弯侧, 探查腹腔内其余脏器未见异常, 术中诊断为胃间质瘤, 完整切除肿瘤, 术后病理报告: 胃壁恶性间质瘤IV级, 直径约18 cm, 质量2000 g, 伴广泛出血坏死及囊性变, 累及浆膜层及深肌层, 免疫组化提示主要向神经分化。胃壁黏膜可见脐形溃疡形成, 黏膜及黏膜下未见肿瘤累及。术后患者恢复好, 血小板降至 $224 \times 10^9/L$, 患者目前仍在随访中。

2 讨论

临床上引起继发性血小板增多症的原因很多, 如病毒、细菌感染、外伤、出血、营养缺乏、肾病、肿瘤与遗传性疾病等, 其中肿瘤导致的继发性血小板增多症占有病因的1/3^[4-6]。引起血小板增多症的常见肿瘤包括: 肺癌、肾癌、乳腺癌、卵巢癌与白血病等^[7-11], 而继发于胃肠道间质瘤的病例国内外未见报道。胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumor, GIST)过去曾被诊为平滑肌源或神经源性肿瘤。近年来随着电镜和免疫组织化学等技术的应用和研究证实GIST是消化道独立的一类间叶肿瘤, 可能起源于Cajal间质细胞^[12-14]。继发性血小板增多症中血小板形态、功能与生存时间一般正常, 血小板计数大多在 $400 \times 10^9/L$ - $1000 \times 10^9/L$ ^[15-16]。本例患者诊断为胃恶性间质瘤的同时发现血小板增多症, 最高达 $623 \times 10^9/L$, 手术切除肿瘤后血小板计数下降至 $224 \times 10^9/L$ 。

本例继发性血小板增多症考虑为肿瘤本身分泌或代谢产物导致的副肿瘤综合征(paraneoplastic syndrome)。副肿瘤综合征是指由肿瘤产生

的生物活性物质导致的, 与肿瘤原发灶或转移部位无直接关系的各种症状和体征^[17-19]. 其中肿瘤导致的继发性血小板增多症与多种细胞因子的产生有关, 包括血小板生成素(TPO)、IL-6以及巨噬细胞集落刺激因子等^[20-23]. 血小板生成素作为巨核细胞生长因子主要于肝脏合成, 肾、骨髓与脾也可以合成TPO. 循环中TPO水平与调节巨核细胞及血小板生成的TPO受体水平成反比^[24-25]. 当血小板减少时, TPO受体下调, TPO水平升高, 促进血小板生成. 血小板富含血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)与血小板反应蛋白^[26-27]. PDGF与血小板反应蛋白在介导肿瘤细胞黏附过程中起重要作用, 并且可以通过尿激酶型纤溶酶原激活因子(urokinase-type plasminogen activator)促进肿瘤细胞转移^[28-30]. 研究发现, 合并有血小板增多症的肝癌患者血清中TPO水平也同步增高. 手术切除病灶或给与肝动脉栓塞化疗后, 血小板与TPO水平均下降, 血小板增多症可能是反应肿瘤负荷的重要指标^[31-33].

3 参考文献

- 1 Weiser MA, Cabanillas M, Vu K, Tamm EP, Wallace MJ, Escalante CP, Bresalier RS. Diagnostic evaluation of patients with a high suspicion of malignancy: comorbidities and clinical predictors of cancer. *Am J Med Sci* 2005; 330: 11-18
- 2 Finazzi G, Harrison C. Essential thrombocythemia. *Semin Hematol* 2005; 42: 230-238
- 3 Elliott MA, Tefferi A. Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythemia. *Br J Haematol* 2005; 128: 275-290
- 4 Shimada H, Oohira G, Okazumi S, Matsubara H, Nabeya Y, Hayashi H, Takeda A, Gunji Y, Ochiai T. Thrombocytosis associated with poor prognosis in patients with esophageal carcinoma. *J Am Coll Surg* 2004; 198: 737-741
- 5 Gucer F, Tamussino K, Keil F, Balkanli-Kaplan P, Yuce MA. Thrombocytosis in gynecologic malignancies. *Anticancer Res* 2004; 24: 2053-2059
- 6 Kandemir EG, Mayadagli A, Karagoz B, Bilgi O, Turken O, Yaylaci M. Prognostic significance of thrombocytosis in node-negative colon cancer. *J Int Med Res* 2005; 33: 228-235
- 7 Aoe K, Hiraki A, Ueoka H, Kiura K, Tabata M, Tanaka M, Tanimoto M. Thrombocytosis as a useful prognostic indicator in patients with lung cancer. *Respiration* 2004; 71: 170-173
- 8 Inoue K, Kohashikawa K, Suzuki S, Shimada M, Yoshida H. Prognostic significance of thrombocytosis in renal cell carcinoma patients. *Int J Urol* 2004; 11: 364-367
- 9 Taucher S, Salat A, Gnant M, Kwasny W, Mlineritsch B, Menzel RC, Schmid M, Smola MG, Stierer M, Tausch C, Galid A, Steger G, Jakesz R. Impact of pretreatment thrombocytosis on survival in primary breast cancer. *Thromb Haemost* 2003; 89: 1098-1106
- 10 Li AJ, Madden AC, Cass I, Leuchter RS, Lagasse LD, Karlan BY. The prognostic significance of thrombocytosis in epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004; 92: 211-214
- 11 Martin SE, DellaValla J. Untreated essential thrombocythemia evolving to biphenotypic leukemia, Philadelphia chromosome positive with monosomy 7: response to imatinib and reduced-intensity allogeneic stem cell transplant. *Leukemia* 2005; 19: 1095-1096
- 12 Hirota S, Isozaki K. Pathology of gastrointestinal stromal tumors. *Pathol Int* 2006; 56: 1-9
- 13 Rubin BP. Gastrointestinal stromal tumours: an update. *Histopathology* 2006; 48: 83-96
- 14 Tarn C, Godwin AK. Molecular research directions in the management of gastrointestinal stromal tumors. *Curr Treat Options Oncol* 2005; 6: 473-486
- 15 Kaftan O, Balcik OS, Cipil H, Ozet G, Bavbek N, Kosar A, Dagdas S. Plasma levels of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in primary and secondary thrombocytosis. *Clin Appl Thromb Hemost* 2005; 11: 449-454
- 16 Prchal JT. Classification and molecular biology of polycythemia (erythrocytoses) and thrombocytosis. *Hematol Oncol Clin North Am* 2003; 17: 1151-1158
- 17 Dropcho EJ. Update on paraneoplastic syndromes. *Curr Opin Neurol* 2005; 18: 331-336
- 18 Posner JB. Immunology of paraneoplastic syndromes: overview. *Ann NY Acad Sci* 2003; 998: 178-186
- 19 Kato N, Yasukawa K, Onozuka T, Kimura K. Paraneoplastic syndromes of leukocytosis, thrombocytosis, and hypercalcemia associated with squamous cell carcinoma. *J Dermatol* 1999; 26: 352-358
- 20 Werynska B, Ramlau R, Podolak-Dawidziak M, Jankowska R, Prais J, Usnarska-Zubkiewicz L, Kuliczowski K. Serum thrombopoietin levels in patients with reactive thrombocytosis due to lung cancer and in patients with essential thrombocythemia. *Neoplasma* 2003; 50: 447-451
- 21 Douglas VK, Tallman MS, Cripe LD, Peterson LC. Thrombopoietin administered during induction chemotherapy to patients with acute myeloid leukemia induces transient morphologic changes that may resemble chronic myeloproliferative disorders. *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 844-850
- 22 Kaser A, Brandacher G, Steurer W, Kaser S, Offner FA, Zoller H, Theurl I, Widder W, Molnar C, Ludwiczek O, Atkins MB, Mier JW, Tilg H. Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood* 2001; 98: 2720-2725
- 23 Tate J, Olencki T, Finke J, Kottke-Marchant K, Rybicki LA, Bukowski RM. Phase I trial of simultaneously administered GM-CSF and IL-6 in patients with renal-cell carcinoma: clinical and laboratory effects. *Ann Oncol* 2001; 12: 655-659
- 24 Randi ML, Putti MC, Pacquola E, Luzzatto G, Zanesco L, Fabris F. Normal thrombopoietin and its receptor (c-mpl) genes in children with essential thrombocythemia. *Pediatr Blood Cancer* 2005; 44: 47-50
- 25 Verbeek W, Faulhaber M, Griesinger F, Brittinger G. Measurement of thrombopoietic levels: clinical and biological relationships. *Curr Opin Hematol* 2000; 7:

■应用要点

血小板增多症可能是反应GIST肿瘤负荷的重要指标.

■同行评价

GIST报道逐年增多,但是合并血小板增多症的病例尚不多见,对临床有一定参考价值。

- 143-149
- 26 Rao AK, Jalagadugula G, Sun L. Inherited defects in platelet signaling mechanisms. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30: 525-535
- 27 Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest* 2005; 115: 3339-3347
- 28 Zhang L, Zhao ZS, Ru GQ, Ma J. Correlative studies on uPA mRNA and uPAR mRNA expression with vascular endothelial growth factor, microvessel density, progression and survival time of patients with gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3970-3976
- 29 Beyer BC, Heiss MM, Simon EH, Gruetzner KU, Babic R, Jauch KW, Schildberg FW, Allgayer H. Urokinase system expression in gastric carcinoma: prognostic impact in an independent patient series and first evidence of predictive value in preoperative biopsy and intestinal metaplasia specimens. *Cancer* 2006; 106: 1026-1035
- 30 Amir S, Margaryan NV, Otero-Marah V, Khalkhali-Ellis Z, Hendrix MJ. Maspin regulates hypoxia-mediated stimulation of uPA/uPAR complex in invasive breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 400-406
- 31 Hwang SJ, Luo JC, Li CP, Chu CW, Wu JC, Lai CR, Chiang JH, Chau GY, Lui WY, Lee CC, Chang FY, Lee SD. Thrombocytosis: a paraneoplastic syndrome in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2472-2477
- 32 Suzuki K, Aiura K, Kitagou M, Hoshimoto S, Takahashi S, Ueda M, Kitajima M. Platelets counts closely correlate with the disease-free survival interval of pancreatic cancer patients. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 847-853
- 33 Bensalah K, Leray E, Fergelot P, Rioux-Leclercq N, Tostain J, Guille F, Patard JJ. Prognostic value of thrombocytosis in renal cell carcinoma. *J Urol* 2006; 175: 859-863

电编 李琪 编辑 潘伯荣

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

• 消息 •

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

本刊讯 第二届国际肝胆胰协会中国分会学术会议将于2006-10在武汉举行。

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

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

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

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

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

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以内字, 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}, *V*_{max}不能写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 kDa改为*M_r* 30 000或30kDa(*M*大写斜体, *r*小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即*A_r*(*A*大写斜体, *r*小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-、±及-后列出. 如37.6±1.2°C, 45.6±24岁, 56.4±0.5 d. 3.56±0.27 pg/ml应为3.56±0.27 ng/L, 131.6±0.4 mmol/L, *t* =28.4±0.2°C. BP用kPa(mmHg), RBC数用×10¹²/L, WBC数用×10⁹/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. *M_r*明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或μmol/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)卡方检验用希腊文小写χ²; (4)样本的相关系数用英文小写*r*; (5)自由度用希腊文小写ν; (6)样本数用英文小写*n*; (7)概率用英文斜体大写*P*. 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 统计学显著性用^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度,例如6 347意指6 000分之一的精密度。任何一个数字,只允许最后一位有误差,前面的位数不应有误差。在一组数字中的mean \pm SD应考虑到个体的变差,一般以SD的1/3来定位数,例如 $3\ 614.5 \pm 420.8$ g, SD的1/3达一百多g,平均数波动在百位数,故应写成 3.6 ± 0.4 kg,过多的位数并无意义。又如 8.4 ± 0.27 cm,其SD/3=0.09 cm,达小数点后第2位,故平均数也应补到小数点后第2位。有效位数以后的数字是无效的,应该舍。末尾数字,小于5则舍,大于5则进,如恰等于5,则前一位数逢奇则进,逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍。末尾时只可1次完成,不得多次完成。例如23.48,若不要小数点,则应成23,而不应该 $23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24$ 。年月日采用全数字表达法,请按国家标准GB/T 7408-94书写。如1985年4月12日,可写作1985-04-12;1985年4月,写作1985-04;从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止,写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00;从1985年4月12日起至1985年6月15日止,写作1985-04-12/06-16,上午8时写作08:00,下午4时半写作16:30。百分数的有效位数根据分母来定:分母 ≤ 100 ,百分数到个位; $101 \leq$ 分母 $\leq 1\ 000$,百分数到小数点后1位;余类推。小数点前后的阿拉伯数字,每3位间空1/4阿拉伯数字距离,如1 486 800.475 65。完整的阿位伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求,本刊论文中的句号都采用黑圆点;数字间的起止号采用“-”字线,并列的汉语词间用顿号分开,而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开,参考文献中作者间一律用逗号分开;表示终了的标点符号,如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半,通常不用于一行之首;而表示开头的标点符号,如括号及书名号的前一半,不宜用于一行之末。标点符号通常占一格,如顿号、逗号、分号、句号等;破折号应占两格;英文连字符只占一个英文字符的宽度,不宜过长,如5-FU。外文字符下划一横线表示用斜体,两横线表示用小写,三横线表示用大写,波纹线表示用黑体。

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容,鲜明而有特色,阿拉伯数字不宜开头,不用副题名,一般20个字左右,最好不超过26个字。避免用“的研究”或“的观察”等非特定词。

3.2 作者 论文署名作者不宜过多,一般不超过8人,主要应限于参加研究工作并能解答文章有关问题、能对文稿内容负责者,对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中。作者署名的次序按贡献大小排列,多作者时姓名间用逗号,如是单名,则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格)。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
基金资助项目 格式如: Supported by National

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。

Natural Science Foundation of China, No.30224801
通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wjgd@wjgnet.com

收稿及接受日期 格式如: Received: Accepted:
摘要 包括目的、方法、结果、结论,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: $^aP<0.05$, $^bP<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值,则 $^cP<0.05$, $^dP<0.01$; 第3套为 $^eP<0.05$, $^fP<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字,如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等,注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字,共同的计量单位符号应注在表的右上方,表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测,“-”代表阴性未发现,不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片,并考入磁盘内;彩色图请提供冲洗的彩色照片,请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$,必须使用双面胶条黏贴在正文内,不能使用浆糊黏贴。

致谢 致谢后加冒号,排在讨论后及参考文献前,左齐。

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名,则需在“Pang *et al*”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码号。如马连生^[1]报告……,潘伯荣 *et al*^[2-5]认为……;

PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年核心期刊为准, 引用被PubMed收录的期刊文献用英文表达, 请附引用文献网上摘要打印件, 包括PMID编号(摘要的左下方)。按顺序编号装订, 并考入磁盘内。在引用参考文献页码末尾注明PMID编号; 无PMID编号的期刊请删除(重要文献必须保留者, 请附首页复印件)。期刊: 序号, 作者(列出全体作者), 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。参考文献格式如下:

- 1 Ma LS, Pan BR. Strengthen international academic exchange and promote development of gas-troenterology. *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磁盘寄回编辑部; 逾期寄回的, 作重新投稿处理。

4.5 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》、《中文生物医学期刊/会议文献数据库》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录。

4.6 投稿清单 (1)投稿函; (2)第1部分为题名及作者, 作者及单位, 第1作者简介, 基金资助项目, 通讯作者Email, 电话, 传真, 收稿日期, 接受日期; (3)第2部分英文摘要; (4)第3部分中文摘要; (5)第4部分为0引言, 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法, 统计学处理, 2 结果, 3 讨论, 致谢, 4 参考文献。

4.7 投稿地址 在线投稿: <http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>。邮局寄送(已在线提交的稿件不必再寄): 请将打印的稿件一式2份(附高质量的图)、存有全文(文字、图表)的磁盘和其他信息(全部文件的清单, 各文件的名称、格式和使用平台等)寄往: 100023, 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社。

世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市2345信箱
郎辛庄北路58号院怡寿园1066号
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

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!

陈耀凯 副教授
第三军医大学西南医院全军感染病研究所

陈治水 主任医师
解放军第211医院中医科

程英升 副教授
上海交通大学附属第六人民医院放射科

崔云甫 教授
哈尔滨医科大学第二附属医院普外一科

代文杰 教授
哈尔滨医科大学第一临床医学院普外二科

戴冬秋 教授
中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

邓长生 教授
武汉大学中南医院消化内科

房静远 教授
仁济医院消化所

韩天权 教授
上海交通大学医学院附属瑞金医院外科, 上海消化外科研究所

黄金华 副教授
中山大学肿瘤医院影像介入科

黄晓东 副主任医师
武汉市中心医院消化内科

江学良 主任医师
上海市第二军医大学长海医院消化科

匡安仁 教授
四川大学华西医院核医学科

蓝宇 教授
北京积水潭医院消化科

李定国 教授
上海交通大学医学院附属新华医院消化内科

李涛 主治医师
北京大学人民医院肝胆外科

李增山 副教授
第四军医大学病理教研室

刘作金 副教授
重庆医科大学附属第二医院肝胆外科

牛建昭 教授
北京中医药大学

欧希龙 副教授
东南大学中大医院消化科

秦成勇 教授
山东省立医院

邵成浩 讲师
长海医院普外科

沈洪 教授
南京中医药大学附属医院江苏省中医院消化科

沈薇 教授
重庆医科大学附属第二医院消化内科

石统东 副教授
重庆医科大学附属第二医院感染病科

孙学英 教授
哈尔滨医科大学第一附属医院黑龙江省肝脾外科中心

王鲁 副教授
复旦大学附属中山医院肝外科, 复旦大学肝癌研究所

王小众 教授
福建医科大学附属协和医院消化内科

王学美 研究员
北京大学第一医院中西医结合研究室

徐列明 教授
上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝二科

许文燮 教授
上海交通大学生命科学院生物医学工程系文选医学楼328室

杨维良 教授
哈尔滨医科大学附属第二医院普外四科

姚树坤 教授
北京中日友好医院

张锦生 教授
复旦大学上海医学院病理学系