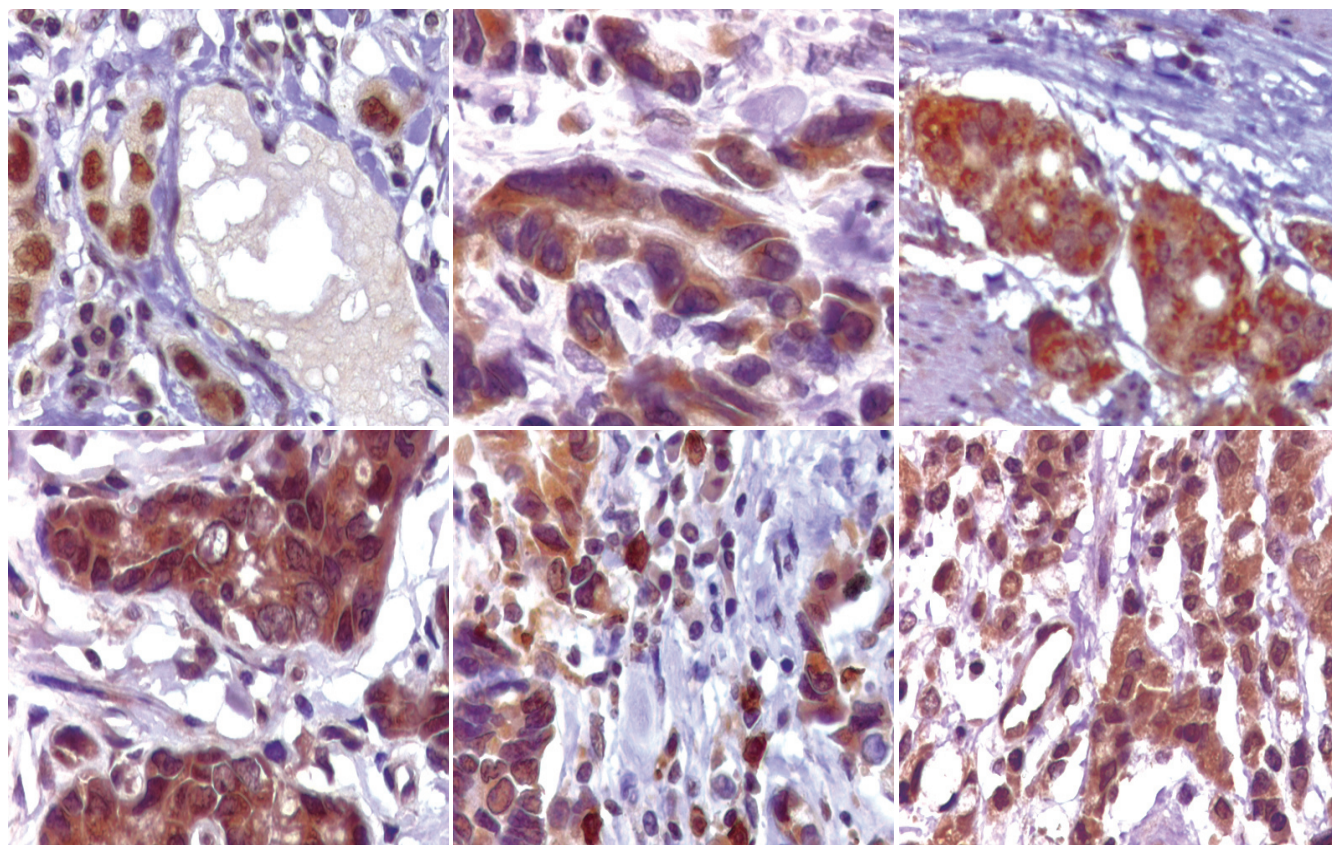


# 世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2006 年 8 月 28 日 第 14 卷 第 24 期 (Volume 14 Number 24)



24 / 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
陈红松副研究员	北京
陈积圣教授	广州
陈建荣副教授	南通
陈立波副教授	武汉
陈凇教授	北京
陈其奎教授	广州
陈强谱教授	滨州
陈仕珠主任医师	西安
陈卫昌教授	苏州
陈耀凯副教授	重庆
陈贻胜教授	福州
陈知水教授	武汉
陈治水主任医师	哈尔滨
陈祖林副教授	重庆
程爱国教授	唐山
程红岩教授	上海
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
杜群副研究员	广州
樊红副教授	南京
范建高教授	上海
范志宁主任医师	南京
房静远教授	上海
傅春彬主任医师	吉林
高成新教授	上海
高春芳研究员	上海
高峰教授	西安
高润平教授	长春
戈之铮教授	上海
龚国忠教授	长沙
龚建平教授	重庆
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 8 月 28 日 第 14 卷 第 24 期 (总第176期)

## 述 评

2367 胃肠道间质瘤的病理诊断和预后 马大烈, 白辰光

## 基 础 研 究

2372 SK&F96365对大鼠肝缺血再灌注损伤后Kupffer细胞钙池操纵的钙通道电流的影响

姜楠, 张宗明, 郭金星, 刘亮, 张驰, 张嫣璐, 张子超

2377 西咪替丁治疗大鼠非乙醇性脂肪性肝炎

闻勤生, 徐辉, 王旭霞, 常青, 张亚飞, 李军

2382 乙型肝炎病毒截短型表面抗原中蛋白结合蛋白的筛选

田江克, 成军, 刘妍, 崔玉芳, 纪冬, 王琳, 程勇前, 钟彦伟, 徐东平

2386 中药调肝理脾方对大鼠乙醇性肝病肝纤维化的影响

徐光福, 褚月虎, 王晓阳, 田德禄, 王新月, 李澎涛, 杨晋翔, 姜良铎

2395 抗人大肠癌双价单链抗体基因的构建及表达

严丹丹, 杨福辉, 方瑾

2401 不同营养支持途径给予谷氨酰胺对烧伤大鼠肠上皮细胞线粒体呼吸功能的影响

吕尚军, 彭曦, 孙勇, 张勇, 尤忠义

## 临 床 研 究

2406 末梢血活性氧毒性物在肝癌诊断中的价值

贾克东, 石淑仙, 阮幼冰

2411 结肠腺癌LYVE-1, ICAM-1及LFA-1的表达与淋巴道转移的关系

王晓蕾, 李晓冬, 周显礼, 李玉兰, 赵玲辉, 张雅芳

2416 胃腺癌组织P53, P63和P73蛋白表达的意义

刘荣, 贺降福, 朱尤庆, 吕永红, 肖绍树

2421 淋巴管内皮细胞透明质酸受体-1在胃癌组织中的表达及意义

李蕾, 张翠萍, 赵清喜, 刘晖, 李玉军

## 文 献 综 述

2425 脐血干细胞转化为肝细胞的研究进展 赵淑磊, 刘吉勇, 杨崇美

2428 壁虎治疗肿瘤的研究进展 杨金霞, 王学美

2432 Cajal间质细胞研究进展 徐爱忠, 彭洪云

2436 基质金属蛋白酶基因多态性在食管癌中的研究进展

邓学杰, 马洪升

2440 活体生物荧光成像技术新进展 宿华威, 崔云甫, 吴德全, 韩德恩

## 研 究 快 报

2444 电针足三里穴抗大鼠应激性胃黏膜损伤作用与NTS内受体的关系

黄碧兰, 王秋桂, 余良主, 唐琼, 丁洁琼

## 临 床 经 验

2448 c-Fos, c-Jun与Bcl-2蛋白在胃癌组织中的表达及意义

侯仁好, 初晓艺, 刘希双

2452 肝硬化门静脉高压症患者断流术后转归的影响因素分析

梅斌, 陈孝平, 刘飞龙

2456 肝硬化并胆囊结石的临床特点与成因分析

杜鹏辉, 邓长生

2460 中国大陆地区克罗恩病临床误诊的汇总分析

沈志坤

## 病 例 报 告

2464 胰肾联合移植术后肺部感染的防治4例

江艺, 吕立志, 胡还章, 张小进, 陈永标, 张坤, 陈少华, 张绍庚



附 录	2467 世界华人消化杂志投稿须知
致 谢	2472 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	<p>2376 《世界华人消化杂志》简介</p> <p>2400 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》</p> <p>2405 专家门诊</p> <p>2415 2004年度《世界华人消化杂志》、《World Journal of Gastroenterology》的影响因子在1608种中国科技论文统计源期刊中的排位</p> <p>2424 全国消化系疾病的诊疗进展学习班通知</p> <p>2439 2006年第十二届华北区消化学术会议征文通知</p> <p>2455 第三届亚洲大洋洲光生物学大会</p> <p>2459 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</p> <p>2463 第八届中西医结合实验医学研讨会</p> <p>2466 2006年即将召开的国际会议</p>
封面故事	<p>Maria D Begnami, Andre L Montagnini, Andre L Vettore, Sueli Nonogaki, Mariana Brait, Alex Y Simoes-Sato, Andrea Q A Seixas, Fernando A Soares. Differential expression of apoptosis related proteins and nitric oxide synthases in Epstein Barr associated gastric carcinomas. <i>World J Gastroenterol</i> 2006; 12(31): 4959-4965</p> <p><a href="http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/4959.asp">http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/4959.asp</a></p>
国际会议	<p>7th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association September 3-7, 2006 <a href="mailto:convention@edinburgh.org">convention@edinburgh.org</a> <a href="http://www.edinburgh.org/conference">www.edinburgh.org/conference</a></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 <a href="http://www.uegw2006.de">www.uegw2006.de</a></p>

# 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 2006-08-28  
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

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会

出版 世界胃肠病学杂志社  
100023, 北京市2345信箱  
E-mail: [wjgd@wjgnet.com](mailto:wjgd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>  
电话: 010-85381901  
传真: 010-85381893

印刷 北京科信印刷厂

发行 国内: 北京报刊发行局  
国外: 中国国际图书贸易总公司  
(100044, 北京市399信箱)

订购 全国各地邮电局

邮购 世界胃肠病学杂志社发行部  
(100023, 北京市2345信箱)  
电话: 010-85381901  
传真: 010-85381893

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

## 特别声明

本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。

2006年版权归世界胃肠病学杂志社所有

ISSN 1009-3079  
CN 14-1260/R

邮发代号  
82-262

国外代号  
M 4481

国内定价  
每期24.00元 全年864.00元

广告经营许可证  
1401004000050

[www.wjgnet.com](http://www.wjgnet.com)

# World Chinese Journal of Digestology

**August 2006 Contents in Brief Volume 14 Number 24**

<b>EDITORIAL</b>	2367 Advances in pathological diagnosis and prognosis of gastrointestinal stromal tumor <i>Ma DL, Bai CG</i>
<b>BASIC RESEARCH</b>	<p>2372 Effect of SK&amp;F96365 on store-operated <math>\text{Ca}^{2+}</math> channel currents of Kupffer cells after hepatic ischemia and reperfusion injury in rats <i>Jiang N, Zhang ZM, Guo JX, Liu L, Zhang C, Zhang YL, Zhang ZC</i></p> <p>2377 Experimental study on cimetidine in treatment of nonalcoholic steatohepatitis in rats <i>Wen QS, Xu H, Wang XX, Chang Q, Zhang YF, Li J</i></p> <p>2382 Screening and identification of proteins interacting with C-terminally truncated middle surface protein of hepatitis B virus <i>Tian JK, Cheng J, Liu Y, Cui YF, Ji D, Wang L, Cheng YQ, Zhong YW, Xu DP</i></p> <p>2386 Effect of <i>Tiaogan lipi</i> decoction on alcoholic liver disease in rats <i>Xu GF, Chu YH, Wang XY, Tian DL, Wang XU, Li PT, Yang JX, Jiang LD</i></p> <p>2395 Construction and expression of bivalent single-chain antibody against human colorectal carcinoma <i>Yan DD, Yang FH, Fang J</i></p> <p>2401 Effects of different nutritional supplements with glutamine on mitochondrial respiratory function of intestinal epithelium in burned rats <i>Lv SJ, Peng X, Sun Y, Zhang Y, You ZY</i></p>
<b>CLINICAL RESEARCH</b>	<p>2406 Values of reactive oxygen toxic species of finger blood dot in the diagnosis of hepatocellular carcinoma <i>Jia KD, Shi SX, Ruan YB</i></p> <p>2411 Correlations of lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1, intercellular adhesion molecular-1 and lymphocyte function-associated antigen-1 expression with lymphatic metastasis in colon adenocarcinoma <i>Wang XL, Li XD, Zhou XL, Li YL, Zhao LH, Zhang YF</i></p> <p>2416 Expression of P53, P63 and P73 protein and their significances in gastric adenocarcinoma <i>Liu R, He JF, Zhu YQ, Lv YH, Xiao SS</i></p> <p>2421 Expression of lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor-1 and its significance in gastric cancer <i>Li L, Zhang CP, Zhao QX, Liu H, Li YJ</i></p>
<b>REVIEW</b>	<p>2425 Advance in differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes <i>Zhao SL, Liu JY, Yang CM</i></p> <p>2428 Roles of gecko in tumor treatment <i>Yang JX, Wang XM</i></p> <p>2432 Research progress in interstitial cells of Cajal <i>Xu AZ, Peng HY</i></p> <p>2436 Polymorphism of matrix metalloproteinase gene in esophageal carcinoma <i>Deng XJ, Ma HS</i></p> <p>2440 New progress of <i>in vivo</i> bioluminescence imaging <i>Su HW, Cui YF, Wu DQ, Han DE</i></p>

<b>RAPID COMMUNICATION</b>	<p>2444 Effect of electroacupuncture <i>Zusanli</i> point on stress-induced gastric mucosal injury and its relationship with receptors in nucleus tractus solitarius <i>Huang BL, Wang QG, Yu LZ, Tang Qiong, Ding JQ</i></p>
<b>CLINICAL PRACTICE</b>	<p>2448 Expression of c-Fos, c-Jun and Bcl-2 and their significances in gastric carcinoma <i>Hou RH, Chu XY, Liu XS</i></p> <p>2452 Influential factors for the consequence of devascularization in patients with liver cirrhosis and portal hypertension <i>Mei B, Chen XP, Liu FL</i></p> <p>2456 Clinical characteristics and formation causes of gallstone complicated with hepatic cirrhosis <i>Du PH, Deng CS</i></p> <p>2460 A combined analysis of clinical misdiagnosis for Crohns' disease in Chinese, mainland <i>Shen ZK</i></p>
<b>CASE REPORT</b>	<p>2464 Prevention and treatment of pulmonary infections after pancreas-kidney transplantation: an analysis of 4 cases <i>Jiang Y, Lv LZ, Hu HZ, Zhang XJ, Chen YB, Zhang K, Chen SH, Zhang SG</i></p>
<b>APPENDIX</b>	<p>2467 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology</p>
<b>ACKNOWLEDGMENT</b>	<p>2472 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
<b>COVER</b>	<p><i>Begnami MD, Montagnini AL, Vettore AL, Nonogaki S, Brait M, Simoes-Sato AY, Seixas AQA, Soares FA.</i> Differential expression of apoptosis related proteins and nitric oxide synthases in Epstein Barr associated gastric carcinomas. <i>World J Gastroenterol</i> 2006; 12(31): 4959-4965 <a href="http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/4959.asp">http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/4959.asp</a></p>
<b>INTERNATIONAL MEETINGS</b>	<p>7th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association September 3-7, 2006 <a href="mailto:convention@edinburgh.org">convention@edinburgh.org</a> <a href="http://www.edinburgh.org/conference">www.edinburgh.org/conference</a></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 <a href="http://www.uegw2006.de">www.uegw2006.de</a></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 August 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](mailto:wjgd@wjgnet.com)

<http://www.wjgnet.com>

**ISSN** 1009-3079 CN 14-1260/R

**Copyright** © 2006 by The WJG Press



# 胃肠道间质瘤的病理诊断和预后

马大烈, 白辰光

马大烈, 白辰光, 第二军医大学长海医院病理科 上海市 200433

马大烈, 第二军医大学长海医院病理科教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事肿瘤病理和免疫病理研究, 近年来专于胃肠道间质瘤和淋巴瘤的相关研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30070743和No. 30471702

通讯作者: 马大烈, 200433, 上海市长海路174号, 第二军医大学长海医院病理科, madalie@126.com

电话: 021-25074853 传真: 021-25074604

收稿日期: 2006-04-18 接受日期: 2006-06-26

## 摘要

胃肠道间质瘤(GIST)是胃肠道最常见的间叶源性肿瘤, GIST中*c-kit*基因功能获得性突变的发现和基因靶向治疗药物格列卫(STI-571)的问世, 使GIST的相关研究已成为热点。近年来的研究认为GIST是发生于胃肠道的CD117阳性, 或者存在*c-kit*/*PDGFRA*基因突变, 由梭形或/和上皮样细胞构成的间叶源性肿瘤。其起源于比Cajal细胞更原始、向Cajal细胞分化的间叶干细胞。根据目前相关基因学研究可将GIST分为3大类: *c-kit*基因突变型、*PDGFRA*基因突变型和野生型GIST。肿瘤的生物行为从良性到显著恶性不等, 准确判断肿瘤预后仍有困难。多数研究显示, 肿瘤的预后与其发生部位、大小、核分裂数密切相关, 肿瘤的免疫表型、基因改变以及手术方式等因素对其预后判断也有一定的参考价值, 但有待进一步细化研究。

**关键词:** 胃肠道间质瘤; 病理诊断; 预后

马大烈, 白辰光. 胃肠道间质瘤的病理诊断和预后. 世界华人消化杂志 2006;14(24):2367-2371

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2367.asp>

## 0 引言

胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumor, GIST)是胃肠道最常见的间叶源性肿瘤<sup>[1-3]</sup>, 他是有别于平滑肌或神经源性肿瘤的一种独立肿瘤类型。患者以50-70岁最多, 且无性别差异<sup>[3-5]</sup>。1998年, Hirota *et al*<sup>[6]</sup>发现GIST特异性表达*c-kit*基因蛋白(CD117), 且该基因存在功能获得性突变。特别是基因靶向治疗药物格列卫(STI-571)

的问世<sup>[7-8]</sup>, 使GIST的相关研究成为热点, 在GIST的发生学、诊断、分子遗传学和预后评估方面取得诸多进展。但是GIST的良恶性判断和预后评估依然是难点, 尚无统一标准。因此我们总结国内外文献, 并结合自己的研究, 以GIST的病理诊断和预后为题进行叙述。

## 1 GIST的概念和起源

早期, 人们认为消化道间叶发生的梭形细胞肿瘤都是平滑肌肿瘤。1983年, Mazur *et al*<sup>[9]</sup>应用免疫组化和电镜观察发现, 多数胃平滑肌肿瘤起源不明, 缺乏向平滑肌和神经鞘膜分化的确切证据, 因此1990年版世界卫生组织(WHO)消化系统肿瘤分类使用“间质肿瘤(stromal tumor)”特指此类肿瘤。随后研究发现, GIST多数表达CD34, 而真正的平滑肌肿瘤不表达CD34<sup>[10]</sup>, 其逐渐成为一个独立肿瘤类型。近年来相继发现GIST中存在*c-kit*基因<sup>[6]</sup>和血小板源性生长因子受体A(platelet derived growth factor receptor A, *PDGFRA*)基因<sup>[11]</sup>的功能获得性突变, 且Kit蛋白存在较特异的阳性表达, 这为GIST的诊断和研究提供了良好的标志物。2000年WHO消化系统肿瘤分类<sup>[12]</sup>将GIST正式独立出来, 与平滑肌肿瘤和神经鞘瘤等并列。

起初人们推断GIST起源于消化道间质的Cajal细胞(interstitial cell of Cajal, ICC)<sup>[13-14]</sup>, 因为免疫组化研究显示ICC和GIST均表达CD117, 且ICC的超微结构同时具有平滑肌细胞和神经细胞的某些特征。近来多数研究认为, GIST起源于比ICC更原始、向ICC分化的间叶干细胞。因为动物实验证实, ICC和平滑肌细胞均起源于一种更早的祖细胞, 肿瘤的平滑肌和神经分化更易解释。遗传学研究亦发现肿瘤周边ICC与肿瘤存在相同的突变<sup>[15]</sup>。GIST还可发生于没有ICC的网膜和肠系膜等部位, 也说明GIST并非起源于ICC, 而是起源于更原始的间叶多能干细胞<sup>[16]</sup>。

## 2 GIST的病理诊断

GIST患者常因肿瘤位于黏膜下层和肌层而无

## ■背景资料

目前公认胃肠道间质瘤是胃肠道最常见的间叶源性肿瘤, 但其诊断尚未标准化, 仍存在许多不同的认识, 特别是肿瘤良恶性判断和预后评估依然是难点。

## ■研发前沿

目前GIST相关研究主要集中在肿瘤分子基因学特征方面。特异性基因靶向治疗药物研究仍将是未来GIST研究的热点,并将为其他肿瘤的基因靶向治疗提供可借鉴的经验。

特征性症状,故术前诊断较为困难。传统的辅助检查缺乏特异性,内镜和影像学检查仅有助于确定肿瘤部位。应用超声内镜下细针穿刺活检,GIST的诊断准确率虽然高,但获取组织量少,且有引起肿瘤播散的危险。因此,GIST的诊断应结合临床症状、体征、消化道内镜及影像学检查,但最终必须依靠病理诊断。

**2.1 发生部位** GIST在整个消化道均可发生,最常见于胃(60%-70%)和小肠(20%-30%),结直肠(5%)和食管(5%以下)较少见<sup>[17]</sup>。阑尾、胆囊、大网膜、肠系膜和腹膜后均有发生。我们认为,大网膜、肠系膜和腹膜后GIST经仔细检查大多与胃和小肠有联系,可视为相应脏器的肿瘤。其他部位GIST也有报道,例如肝脏<sup>[18]</sup>、脾脏<sup>[19]</sup>和前列腺<sup>[20]</sup>等,但有待于进一步验证,需排除胃肠道原发GIST转移的可能性。GIST的诊断还应特别注意与其他部位的间质肿瘤相区别,他们虽然名称相同,但是组织来源、免疫表型和遗传学特征均不同。对那些确实与消化道没有联系,且表达CD117的间叶源性肿瘤,建议暂时应用“GIST样肿瘤”命名,并进行*c-kit*基因突变等分子遗传学检测,待病例数多后再做详细研究。

**2.2 形态学特征** GIST主要由梭形细胞和上皮样细胞构成,少数可见多形性肿瘤细胞,甚至破骨细胞样巨细胞。依据梭形和上皮样细胞的比例可分为上皮样细胞型、梭形细胞型和混合细胞型。排列方式多样,梭形细胞多以束状、漩涡状和栅栏状排列为主,上皮样细胞常呈弥漫片巢状排列。部分肿瘤可伴有囊性变、透明变性、黏液变性、钙化,并可见核周空泡细胞和印戒样肿瘤细胞,少数肿瘤间质可见“丝团样纤维”(skeinoid fiber, SF)。

**2.3 免疫组化特征** CD117是GIST敏感且特异的标记物<sup>[21-22]</sup>,随后发现巢蛋白(nestin)以及功能未知蛋白(discovered on GIST-1, DOG1)也是诊断GIST良好的标记物<sup>[3]</sup>,且无部位及良恶性的差异。此外,约70%的GIST表达CD34,与CD117联合应用有助于提高诊断准确率,具有一定的特异性<sup>[23]</sup>。最近研究发现,蛋白激酶C $\theta$ (PKC $\theta$ )是诊断GIST的一个新免疫组化标记物,尤其是诊断CD117阴性的GIST<sup>[24]</sup>,但有待进一步观察。GIST亦可有肌源性或神经源性标志物的表达,如平滑肌肌动蛋白(SMA)、S-100蛋白、蛋白基因产物9.5(PGP 9.5)等,但大多在肿瘤中呈局灶弱阳性表达。结蛋白(desmin)在GIST中为弱阳性或阴性表达,这一特点有助于GIST与平滑肌肿

瘤的鉴别,因为真正的平滑肌肿瘤弥漫强表达desmin<sup>[5]</sup>。

**2.4 分子基因特征** 随着GIST基因学研究的深入,越来越多的基因改变被人们所发现。目前具有特征性的只有*c-kit*和*PDGFRA*基因,他们同属于III型酪氨酸激酶家族,两者不仅结构相似,且基因都定位于4q11-13<sup>[25]</sup>。

1998年Hirota *et al*<sup>[6]</sup>首次报道GIST特异性高表达Kit蛋白,且存在该基因功能获得性突变。此后研究发现GIST中*c-kit*基因突变大部集中于由外显子11编码的邻近膜区,突变率在50%-60%之间<sup>[1,3,6]</sup>,主要表现为缺失、插入或点突变。我们的研究也显示,该位点的突变率为41.5%,其中恶性组的突变率为54.8%<sup>[26]</sup>。此外,GIST中尚存在*c-kit*基因其他位点的突变,包括外显子9,13,14,15,17,但远低于外显子11<sup>[1,3]</sup>。所有这些位点的突变均可引起配体非依赖性C-kit受体二聚体形成,从而激活C-kit的酪氨酸激酶活性,导致肿瘤发生,我们的研究也予以证实<sup>[27]</sup>。

尽管GIST中存在*c-kit*基因不同位点的功能获得性突变,但仍有部分GIST中未能检测到*c-kit*突变,因此有人推测在GIST中存在C-kit以外的其他酪氨酸激酶受体参与了肿瘤的发生和C-kit的激活。2003年,Heinrich *et al*<sup>[11]</sup>发现GIST中存在*PDGFRA*基因的突变及表达,集中于外显子18和12,突变方式与*c-kit*基因相似,且*PDGFRA*突变阳性的病例*c-kit*突变均为阴性。国内近期的研究也取得相似的结果<sup>[28-29]</sup>。Heinrich *et al*<sup>[11]</sup>还发现*PDGFRA*和*c-kit*突变所激活的信号转导通路相似,提示*PDGFRA*基因突变参与了GIST的发生。

根据目前已发现的GIST相关基因改变可将肿瘤分为3类<sup>[3]</sup>(表1): (1)*c-kit*突变型(80%-85%); (2)*PDGFRA*突变型(5%-10%); (3)野生型GIST(10%)。近期有研究显示,极少数GIST与I型神经纤维瘤病相关,该型GIST不存在*c-kit*和*PDGFRA*基因的突变,表现为*NF1*等位基因的失活<sup>[30]</sup>。

总之,GIST是消化道最常见的间叶源性肿瘤,组织学富于梭形细胞和/或上皮样细胞,偶见多形性细胞,呈束状或弥漫排列,免疫表型表达CD117, nestin, DOG1和PKC $\theta$ ,遗传学存在频发性*c-kit*和*PDGFRA*基因突变。胃肠道自主神经肿瘤(gastrointestinal autonomic nerve tumor, GANT)与GIST具有相同的免疫组化和分子基因学特征,因此被视为GIST的一个变异型<sup>[21,31]</sup>。我们认

■创新盘点  
与其他相关文章相比, 本文侧重于GIST的病理诊断和预后评估, 总结出相对规范的GIST病理诊断标准, 并提出了临床病理工作中可使用的相对广义的GIST概念。

表 1 GIST基因突变类型与临床病理因素的关系

突变类型	突变频率	组织类型	肿瘤部位	对格列卫的反应	
				体外实验	体内实验
<i>c-kit</i> 突变	80%–85%	梭形细胞型为主	小肠	有	中等
外显子9	10%			有	良好
外显子11	60%–70%			有	部分 <sup>1</sup>
外显子13	1%			有	部分 <sup>1</sup>
外显子17	1%				
<i>PDGFRA</i> 突变	5%–10%	上皮样细胞型或混合细胞型	胃		
外显子12	1%			有	部分 <sup>1</sup>
外显子14	<1%			有	不明
外显子18	6%			不明	D842V反应差, 其他有反应
野生型	10%	多为梭形细胞型		无	差

<sup>1</sup>样本少, 部分患者对格列卫有反应。

为, 在临床工作中可使用相对广义的GIST概念, 即GIST指那些无确切平滑肌或神经分化证据的, 由梭形和/或上皮样细胞构成的胃肠道间叶源性肿瘤。这样既能与真正的平滑肌源性肿瘤和神经源性肿瘤有所区分, 又涵盖了那些没有任何定向分化和特异性基因改变, 且CD117阴性的胃肠道间叶源性肿瘤。

3 GIST的病理分级

GIST的生物学行为从良性到显著恶性不等, 判断其生物学行为需综合考虑肿瘤的大体、组织形态和临床情况, 目前尚无统一的病理分级标准。Rosai<sup>[32]</sup>曾将胃肠道间叶来源的一大类梭形细胞肿瘤统称为GIST, 并将其分为良性、潜在恶性和恶性3类。但随着研究的深入, 人们发现GIST似乎没有绝对良性的, 因为: (1)直径小于1 cm的肿瘤同样存在基因突变; (2)GIST表达CD117, CD34, nestin等原始干细胞标志物; (3)随访发现直径小于2 cm, 甚至1 cm的GIST也可复发或转移<sup>[1,33-34]</sup>。

我们认为GIST没有真正良性的, 良恶性之间并无截然界限, 从良性到恶性是一种渐进过程, 即随着肿瘤的生长, 其恶性特征会逐渐显现。2001年Fletcher *et al*<sup>[21]</sup>在美国国立卫生院会议上形成共识, 根据肿瘤大小和核分裂数目将GIST分为极低危、低危、中危和高危(表2)。该分类使用危险程度分级, 避免了良恶性这一敏感用语, 且分类指标少, 易于掌握, 又与肿瘤预后紧密联系。

4 GIST的预后判断

目前GIST的病理分级与肿瘤预后并不一致, 影响GIST预后的因素很多, 包括肿瘤大小、部

表 2 GIST NIH分级标准

危险程度	大小 (cm)	核分裂数 (个/50HPF)
极低危	<2	<5
低危	2–5	<5
中危	<5	5–10
高危	5–10	<5
	>5	>5
	>10	任何
	任何	>10

位、坏死、组织学类型、细胞密度、细胞异型性、有丝分裂计数、细胞增殖活性、临近器官侵犯、复发和转移等<sup>[23]</sup>。

4.1 部位 食管间质瘤少见且预后较好。胃间质瘤具有较好的生存率, 小于5 cm的肿瘤通常预后良好, 5-10 cm且核分裂数少的肿瘤也常常有较好的预后。半数小肠和十二指肠间质瘤预后差, 直径大于4.5 cm或核分裂多于2/50 HPF的十二指肠肿瘤常预后不良。结肠间质瘤少见, 但多预后不良, 而直肠肿瘤常有较好的预后。胃肠道外间质瘤也多预后较差<sup>[1]</sup>。

4.2 形态学 用于肿瘤预后判断的形态学指标主要是肿瘤大小和核分裂, 被各种分类广为采用。另外, 研究显示, 其他因素也与肿瘤预后有一定关系, 例如肿瘤细胞丰富, 肿瘤存在坏死均预示预后不良。肌层浸润对预后判断无意义, 但肿瘤侵犯黏膜提示预后差。黏膜溃疡的发生与肿瘤的大小相关, 但与肿瘤预后没有直接关系<sup>[1]</sup>。

4.3 免疫组化 CD117虽是诊断GIST良好的标记物, 却无助于判断患者的预后。SMA阳性的小肠肿瘤多预后较好, 但发生于胃的肿瘤缺乏此特点<sup>[1]</sup>。有研究显示, CD34阳性与肿瘤的预后相关, 但研究结果很不一致<sup>[35-36]</sup>。增殖细胞活性标记物Ki-67和PCNA对肿瘤预后判断具有重要意义,



## ■应用要点

本文的实际应用价值在于总结GIST病理诊断和预后的相关研究成果,有助于临床病理诊断和相关研究的标准化。

大于10%的肿瘤细胞阳性提示预后不良<sup>[22]</sup>。

**4.4 分子基因** 关于*c-kit*基因突变类型与预后的关系,我们和多数学者均认为,存在11号外显子突变的GIST在临床上表现的更具进展性,生物学行为更差,预后不良<sup>[1,4]</sup>。有人认为*c-kit*基因突变可能发生在GIST进展早期,需进一步研究证实,11号外显子突变的某一特殊亚型与GIST恶性行为相关<sup>[34]</sup>。近期有研究显示,*c-kit*外显子11单纯点突变比存在缺失突变预后好<sup>[37]</sup>。而9号外显子突变频率恶性GIST组明显高于潜在恶性和良性GIST组,且59%为小肠肿瘤,提示存在9号外显子突变与GIST的部位和不良预后相关。Sakurai *et al*<sup>[38]</sup>发现黏液上皮样GIST大部分有*PDGFRA*基因的突变,且患者无一死亡,提示黏液上皮样GIST可能是GIST中与*PDGFRA*基因突变密切相关的一个独特亚型,该型病人预后可能较好。Lasota *et al*<sup>[39]</sup>研究认为,*PDGFRA*基因突变主要发生于胃,且大多数生物学行为呈“良性”经过。我们检测到*PDGFRA*基因突变的4例GIST均小于5 cm,核分裂均少于5/50HPF,提示患者预后可能较好。但也有研究显示,*PDGFRA*基因突变多见于发生于网膜/肠系膜的高度侵袭危险性GIST<sup>[29]</sup>。

肿瘤抑制基因失活(甲基化)是肿瘤形成发展过程中的一个促动因素,因而有人推测在GIST中基因甲基化也许可用于预测肿瘤预后。House *et al*<sup>[40]</sup>对38例*c-kit*阳性的胃间质瘤进行了11个肿瘤抑制基因甲基化的研究,发现了6个最常见的甲基化基因,依次为:*MGMT*, *pl6*, *RASSF1A*, *E-cadherin*, *hMLH1*和*APC*,其中*E-cadherin*是GIST早期复发的一个独立预后指标。人们还发现,GIST中存在DNA拷贝数的变化,且恶性和转移性GIST中较良性GIST更常见,提示与GIST的预后有关<sup>[41]</sup>。Sabah *et al*<sup>[42]</sup>研究发现,所有的高危GIST端粒酶均阳性,而大部分低危GIST阴性,认为GIST进展时可出现端粒酶的活动。

**4.5 手术方式** 两组病例回顾性研究发现GIST患者行根治手术生存时间长于仅行肿瘤切除术<sup>[43-44]</sup>。因此,对于GIST患者主张尽量扩大手术范围,以提高存活时间。

总之,有关*c-kit*突变与肿瘤预后的研究有待细化,需要进一步证实*c-kit*基因某一特殊亚型与肿瘤预后的关系。与*c-kit*基因突变相比,*PDGFRA*基因突变,特别是突变亚型与肿瘤预后的关系更不明了,有待扩大样本进一步研究。野生型GIST虽然很少,是否有其他特征性基因学

改变亦有待研究。另外,肿瘤手术切除的安全距离有待确定,以便于肿瘤根治手术范围的确定。STI-571治疗GIST虽然有效,但治疗效果的评判尚不规范,且耐药性已经显现,肿瘤耐药机制有待研究,新的药物有待开发。

## 5 参考文献

- 1 Miettinen M, El-Rifai W, H L Sobin L, Lasota J. Evaluation of malignancy and prognosis of gastrointestinal stromal tumors: a review. *Hum Pathol* 2002; 33: 478-483
- 2 Duensing A, Heinrich MC, Fletcher CD, Fletcher JA. Biology of gastrointestinal stromal tumors: KIT mutations and beyond. *Cancer Invest* 2004; 22: 106-116
- 3 Rubin BP. Gastrointestinal stromal tumours: an update. *Histopathology* 2006; 48: 83-96
- 4 马大烈, 刘晓红, 白辰光, 谢强, 冯菲. *c-kit*基因突变对胃肠道间质瘤预后的影响. *中华外科杂志* 2004; 42: 140-144
- 5 侯英勇, 杨雄华, 谭云山, 许建芳, 王岫南, 曾海英, 宿杰·阿克苏, 高峰, 朱雄增. 不同部位胃肠道间质瘤免疫组化表达的研究. *临床与实验病理学杂志* 2005; 21: 142-146
- 6 Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, Kawano K, Hanada M, Kurata A, Takeda M, Muhammad Tunio G, Matsuzawa Y, Kanakura Y, Shinomura Y, Kitamura Y. Gain-of-function mutations of *c-kit* in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998; 279: 577-580
- 7 Dagher R, Cohen M, Williams G, Rothmann M, Gobburu J, Robbie G, Rahman A, Chen G, Staten A, Griebel D, Pazdur R. Approval summary: imatinib mesylate in the treatment of metastatic and/or unresectable malignant gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3034-3038
- 8 van Oosterom AT, Judson I, Verweij J, Stroobants S, Donato di Paola E, Dimitrijevic S, Martens M, Webb A, Scot R, Van Glabbeke M, Silberman S, Nielsen OS. Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study. *Lancet* 2001; 358: 1421-1423
- 9 Mazur MT, Clark HB. Gastric stromal tumors. Reappraisal of histogenesis. *Am J Surg Pathol* 1983; 7: 507-519
- 10 Monihan JM, Carr NJ, Sobin LH. CD34 immunoreactivity in stromal tumours of the gastrointestinal tract and in mesenteric fibromatosis. *Histopathology* 1994; 25: 469-473
- 11 Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, Singer S, Griffith DJ, Haley A, Town A, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA. *PDGFRA* activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 2003; 299: 708-710
- 12 Hamilton SR, Aaltonen LA. World health organization classification of tumours. pathology & genetics, tumours of the digestive system. Lyon: IARC Press. 2000: 62-65
- 13 Sircar K, Hewlett BR, Huizinga JD, Chorneyko K, Berezin I, Riddell RH. Interstitial cells of Cajal as precursors of gastrointestinal stromal tumors. *Am J Surg Pathol* 1999; 23: 377-389
- 14 Thomsen L, Robinson TL, Lee JC, Faraway LA, Hughes MJ, Andrews DW, Huizinga JD. Interstitial cells of Cajal generate a rhythmic pacemaker

- current. *Nat Med* 1998; 4: 848-851
- 15 Ogasawara N, Tsukamoto T, Inada K, Mizoshita T, Ban N, Yamao K, Joh T, Itoh M, Tatematsu M. Frequent c-Kit gene mutations not only in gastrointestinal stromal tumors but also in interstitial cells of Cajal in surrounding normal mucosa. *Cancer Lett* 2005; 230: 199-210
  - 16 Sakurai S, Hishima T, Takazawa Y, Sano T, Nakajima T, Saito K, Morinaga S, Fukayama M. Gastrointestinal stromal tumors and KIT-positive mesenchymal cells in the omentum. *Pathol Int* 2001; 51: 524-531
  - 17 Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors--definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Arch* 2001; 438: 1-12
  - 18 Hu X, Forster J, Damjanov I. Primary malignant gastrointestinal stromal tumor of the liver. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 1606-1608
  - 19 陶琨, 侯英勇, 袁亚, 朱雄增. 脾脏胃肠道间质瘤型间叶源性肿瘤1例. *临床与实验病理学杂志* 2002; 18: 460-461
  - 20 Van der Aa F, Sciort R, Blyweert W, Ost D, Van Poppel H, Van Oosterom A, Debiec-Rychter M, De Ridder D. Gastrointestinal stromal tumor of the prostate. *Urology* 2005; 65: 388
  - 21 Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, Miettinen M, O'Leary TJ, Remotti H, Rubin BP, Shmookler B, Sobin LH, Weiss SW. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Hum Pathol* 2002; 33: 459-465
  - 22 Hasegawa T, Matsuno Y, Shimoda T, Hirohashi S. Gastrointestinal stromal tumor: consistent CD117 immunostaining for diagnosis, and prognostic classification based on tumor size and MIB-1 grade. *Hum Pathol* 2002; 33: 669-676
  - 23 刘晓红, 马大烈, 吴丽莉, 白辰光, 胡宏杰. 原癌基因 c-kit 在胃肠道间质瘤中的表达及其临床意义. *中华外科杂志* 2002; 40: 277-279
  - 24 Duensing A, Joseph NE, Medeiros F, Smith F, Hornick JL, Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA. Protein Kinase C theta (PKCtheta) expression and constitutive activation in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Cancer Res* 2004; 64: 5127-5131
  - 25 Gronwald RG, Adler DA, Kelly JD, Distech CM, Bowen-Pope DF. The human PDGF receptor alpha-subunit gene maps to chromosome 4 in close proximity to c-kit. *Hum Genet* 1990; 85: 383-385
  - 26 马大烈, 刘晓红, 蔡在龙, 谢强. 胃肠道间质瘤中原癌基因 c-kit 突变及其蛋白表达. *中华肿瘤学杂志* 2002; 24: 461-464
  - 27 Bai CG, Liu XH, Xie Q, Feng F, Ma DL. A novel gain of function mutant in C-kit gene and its tumorigenesis in nude mice. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7104-7108
  - 28 贺慧颖, 项一宁, 李燕, 钟镐镐, 郑杰, 吴秉铨. 胃肠道间质瘤60例中C-kit和PDGFRA基因突变的检测. *北京大学学报(医学版)* 2005; 37: 320-324
  - 29 贺慧颖, 方伟岗, 钟镐镐, 李燕, 郑杰, 杜鹃, 衡万杰, 吴秉铨. 165例胃肠道间质瘤中C-kit和PDGFRA基因突变的检测和临床意义. *中华病理学杂志* 2006; 35: 262-266
  - 30 Maertens O, Prenen H, Debiec-Rychter M, Wozniak A, Sciort R, Pauwels P, De Wever I, Vermeesch JR, de Raedt T, De Paepe A, Speleman F, van Oosterom A, Messiaen L, Legius E. Molecular pathogenesis of multiple gastrointestinal stromal tumors in NF1 patients. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 1015-1023
  - 31 Lee JR, Joshi V, Griffin JW Jr, Lasota J, Miettinen M. Gastrointestinal autonomic nerve tumor: immunohistochemical and molecular identity with gastrointestinal stromal tumor. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 979-987
  - 32 Rosai J. Ackerman's Surgical Pathology. 8th ed. St. Louis: Mosby-Year Book Inc, 1996: 589-814
  - 33 Ballarini C, Intra M, Ceretti AP, Prestipino F, Bianchi FM, Sparacio F, Berti E, Perrone S, Silva F. Gastrointestinal stromal tumors: a "benign" tumor with hepatic metastasis after 11 years. *Tumori* 1998; 84: 78-81
  - 34 Tornoczky T, Kover E, Pajor L. Frequent occurrence of low grade cases among metastatic gastrointestinal stromal tumours. *J Clin Pathol* 2003; 56: 363-367
  - 35 Kim KM, Kang DW, Moon WS, Park JB, Park CK, Sohn JH, Jeong JS, Cho MY, Jin SY, Choi JS, Kang DY. Gastrointestinal stromal tumors in Koreans: it's incidence and the clinical, pathologic and immunohistochemical findings. *J Korean Med Sci* 2005; 20: 977-984
  - 36 Miettinen M, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 52-68
  - 37 Corless CL, Fletcher JA, Heinrich MC. Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3813-3825
  - 38 Sakurai S, Hasegawa T, Sakuma Y, Takazawa Y, Motegi A, Nakajima T, Saito K, Fukayama M, Shimoda T. Myxoid epithelioid gastrointestinal stromal tumor (GIST) with mast cell infiltrations: a subtype of GIST with mutations of platelet-derived growth factor receptor alpha gene. *Hum Pathol* 2004; 35: 1223-1230
  - 39 Lasota J, Dansonka-Mieszkowska A, Sobin LH, Miettinen M. A great majority of GISTs with PDGFRA mutations represent gastric tumors of low or no malignant potential. *Lab Invest* 2004; 84: 874-883
  - 40 House MG, Guo M, Efron DT, Lillemo K, Cameron JL, Syphard JE, Hooker CM, Abraham SC, Montgomery EA, Herman JG, Brock MV. Tumor suppressor gene hypermethylation as a predictor of gastric stromal tumor behavior. *J Gastrointest Surg* 2003; 7: 1004-14; discussion 1014
  - 41 El-Rifai W, Sarlomo-Rikala M, Andersson LC, Knuutila S, Miettinen M. DNA sequence copy number changes in gastrointestinal stromal tumors: tumor progression and prognostic significance. *Cancer Res* 2000; 60: 3899-3903
  - 42 Sabah M, Cummins R, Leader M, Kay E. Expression of human telomerase reverse transcriptase in gastrointestinal stromal tumors occurs preferentially in malignant neoplasms. *Hum Pathol* 2004; 35: 1231-1235
  - 43 Clary BM, DeMatteo RP, Lewis JJ, Leung D, Brennan MF. Gastrointestinal stromal tumors and leiomyosarcoma of the abdomen and retroperitoneum: a clinical comparison. *Ann Surg Oncol* 2001; 8: 290-299
  - 44 Pierie JP, Choudry U, Muzikansky A, Yeap BY, Souba WW, Ott MJ. The effect of surgery and grade on outcome of gastrointestinal stromal tumors. *Arch Surg* 2001; 136: 383-389

## 同行评价

本文总结出相对规范的GIST病理诊断标准, 并提出了临床病理工作中可使用的相对广义的GIST概念, 有一定的理论意义及应用价值. 文章观点新颖, 综述全面、重点突出.

电编 李琪 编辑 潘伯荣

# SK&F96365对大鼠肝缺血再灌注损伤后Kupffer细胞钙池操纵的钙通道电流的影响

姜楠, 张宗明, 郭金星, 刘亮, 张驰, 张嫣璐, 张子超

## ■背景资料

研究发现Kupffer细胞可能是肝缺血再灌注损伤的重要介导细胞, 有关机制不详。钙池操纵的钙通道几乎存在所有非兴奋细胞和部分兴奋细胞上, 尚未见Kupffer细胞SOC研究的报道。

姜楠, 刘亮, 张驰, 张嫣璐, 张子超, 同济大学附属同济医院普外科上海市 200065

张宗明, 郭金星, 清华大学第一附属医院消化中心普外科北京市 100016

姜楠, 2003年硕士研究生, 同济大学附属同济医院普外一科, 主要从事细胞离子通道与肝胆外科疾病的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30270532

教育部跨世纪优秀人才培养计划基金资助项目, 教技函(2002) 48号

上海市教委曙光计划基金资助项目, No. 02SG20

通讯作者: 张宗明, 100016, 北京市朝阳区酒仙桥一街坊6号, 清华大学第一附属医院消化中心普外科。

zhangzongming@mail.tsinghua.edu.cn

电话: 010-64372362 传真: 010-64361322

收稿日期: 2006-04-24 接受日期: 2006-06-30

## Effect of SK&F96365 on store-operated $\text{Ca}^{2+}$ channel currents of Kupffer cells after hepatic ischemia and reperfusion injury in rats

Nan Jiang, Zong-Ming Zhang, Jin-Xing Guo, Liang Liu, Chi Zhang, Yan-Lu Zhang, Zi-Chao Zhang

Nan Jiang, Liang Liu, Chi Zhang, Yan-Lu Zhang, Zi-Chao Zhang, Department of the General Surgery, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065, China

Zong-Ming Zhang, Jin-Xing Guo, Department of General Surgery, Digestive Medical Center, the First Hospital of Tsinghua University, Beijing 100016, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30270532; Trans-Century Training Program

Foundation for the Excellent Talents from the Ministry of Education of China, Official Letter No. 2002-48; Shuguang Program of Shanghai Education Committee, No. 02SG20

Correspondence to: Professor Zong-Ming Zhang, Department of General Surgery, Digestive Medical Center, the First Hospital of Tsinghua University, Beijing 100016, China. zhangzongming@mail.tsinghua.edu.cn

Received: 2006-04-24 Accepted: 2006-06-30

## Abstract

**AIM:** To investigate the changes of store-operated calcium channel currents ( $I_{\text{SOC}}$ ) after hepatic ischemia and reperfusion (I/R) injury in isolated Kupffer cells of rats, and the effects of  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers, SK&F96365, on  $I_{\text{SOC}}$  of Kupffer cells.

**METHODS:** The SD rat model of hepatic I/R

injury was established. Liver Kupffer cells were isolated from the rats by *in situ* perfusion via the portal vein with  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free Krebs buffer followed by collagenase digestion. Then Percoll Isopyknic gradient centrifugation was performed. Kupffer cells were purified after selective adhesion. The changes of  $I_{\text{SOC}}$  after I/R injury and the effect of SK&F96365 on  $I_{\text{SOC}}$  of Kupffer cells were investigated by whole-cell patch-clamp technique.

**RESULTS:**  $I_{\text{SOC}}$  was significantly increased from  $-78.7 \pm 25.2$  pA to  $-159.3 \pm 27.3$  pA ( $P < 0.01$ ,  $n = 15$ ) after I/R injury. SK&F96365 (5, 10, 20, 40, 50  $\mu\text{mol/L}$ ) induced a concentration-dependent inhibition of  $I_{\text{SOC}}$  with the rate  $43.9\% \pm 18.1\%$ ,  $59.2\% \pm 24.0\%$ ,  $66.3\% \pm 23.0\%$ ,  $73.8\% \pm 17.8\%$ ,  $80.9\% \pm 12.6\%$ , respectively, and the  $\text{IC}_{50}$  value was  $6.53 \mu\text{mol/L}$  ( $n = 8$ ).

**CONCLUSION:** I/R injury can enhance the  $I_{\text{SOC}}$  of Kupffer cells, which leads to the activation of the cells, further resulting in the injury of hepatocytes. Calcium channel blocker, SK&F96365, can protect livers from I/R injury by inhibiting the activation of Kupffer cells.

**Key Words:** Kupffer cell; Hepatic ischemia reperfusion injury; Store-operated calcium channel currents; Calcium channel blocker

Jiang N, Zhang ZM, Guo JX, Liu L, Zhang C, Zhang YL, Zhang ZC. Effect of SK&F96365 on store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channel currents of Kupffer cells after hepatic ischemia and reperfusion injury in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(24):2372-2376

## 摘要

**目的:** 研究缺血再灌注损伤对大鼠肝Kupffer细胞钙池操纵的钙通道电流( $I_{\text{SOC}}$ )的影响, 并筛选有效的钙通道阻滞剂进行拮抗。

**方法:** 建立SD大鼠肝缺血再灌注模型, 利用低浓度胶原酶循环灌注、差速离心、选择性贴壁的方法急性分离肝Kupffer细胞, 应用全细胞膜片钳记录技术, 研究肝缺血再灌注损伤



对大鼠肝Kupffer细胞 $I_{SOC}$ 的影响及钙通道阻滞剂SK&F96365的拮抗作用。

**结果:**大鼠Kupffer细胞的 $I_{SOC}$ 为:假手术组 $-78.7 \pm 25.2$  pA, 缺血再灌注组 $-159.3 \pm 27.3$  pA, 两组有显著统计学差异( $n = 15$ ,  $P < 0.01$ )。5-50  $\mu\text{mol/L}$ 的SK&F96365对Kupffer细胞 $I_{SOC}$ 的抑制呈浓度依赖性增强,  $I_{SOC}$ 由 $-152.7 \pm 42.5$  pA依次降至 $-81.4 \pm 24.2$  pA,  $-56.1 \pm 26.4$  pA,  $-45.2 \pm 21.6$  pA,  $-34.8 \pm 17.1$  pA,  $-25.6 \pm 13.4$  pA, SK&F96365对Kupffer细胞 $I_{SOC}$ 的抑制率逐渐增加, 分别为 $43.9\% \pm 18.1\%$ ,  $59.2\% \pm 24.0\%$ ,  $66.3\% \pm 23.0\%$ ,  $73.8\% \pm 17.8\%$ ,  $80.9\% \pm 12.6\%$ , 其 $IC_{50}$ 值为 $6.53 \mu\text{mol/L}$ 。

**结论:**缺血再灌注损伤可以促进SD大鼠Kupffer细胞上SOC的进一步开放, 导致 $I_{SOC}$ 的增大, Kupffer细胞活化, 进一步加重缺血再灌注损伤。SK&F96365对Kupffer细胞 $I_{SOC}$ 的抑制呈浓度依赖性增强, 对肝细胞损伤具有保护作用。

**关键词:** Kupffer细胞; 肝缺血再灌注损伤; 钙池操纵的钙通道电流; 钙通道阻滞剂

姜楠, 张宗明, 郭金星, 刘亮, 张弛, 张嫣璐, 张子超. SK&F96365对大鼠肝缺血再灌注损伤后Kupffer细胞钙池操纵的钙通道电流的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(24):2372-2376  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2372.asp>

## 0 引言

肝缺血再灌注损伤(hepatic ischemia reperfusion injury, HIRI)是肝移植、复杂肝切除等肝胆外科手术中经常遇到的病理生理过程。许多学者研究发现, Kupffer细胞可能是HIRI的重要介导细胞, Kupffer细胞活化并释放氧自由基、细胞因子、前列腺素、一氧化氮等生物活性介质而导致HIRI<sup>[1]</sup>。新近研究发现, 抑制Kupffer细胞可以减轻HIRI<sup>[2]</sup>, 从而从反面证明Kupffer细胞的活化在HIRI过程中具有重要作用。钙池操纵的钙通道(store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels, SOC)几乎存在于所有非兴奋细胞和部分兴奋细胞上<sup>[3-6]</sup>, 迄今尚未见Kupffer细胞SOC研究的报道。SK&F96365已在其他细胞上被发现是SOC通道的抑制剂。本研究探讨HIRI对大鼠Kupffer细胞钙池操纵的钙通道电流( $I_{SOC}$ )的影响及SK&F96365的拮抗作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** ♂SD大白鼠, 体质量200-300 g, 中国科学院上海实验动物中心提供; 胶原酶IV型

(collagenase IV), N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸(HEPES), 乙二醇-双(2-氨基乙基)四乙酸(EGTA), Trypan blue(台盼蓝), CsCl, CsOH, 美国Sigma公司产品; DMEM(美国Gibco公司); SK&F96365(德国默克公司); Thapsigargin (Alexis公司); 小牛血清(上海华美生物工程公司); 电子蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司); 硬质玻璃电极(Would Precision, USA); MP-285三维微操纵器(Sutter Instrument Co, USA); Axopatch 200B膜片钳放大器及pCLAMP 9.0软件包(AXON Instrument, USA); 防震台及静电屏蔽罩(IOI Technology Corporation Limited), Model P-97微电极拉制仪(Sutter Instrument Co, USA)。无 $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ 的K-H原位灌注液(mmol/L): KCl 5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1, NaCl 115, HEPES 25, EGTA 0.5, 用NaOH调pH至7.2-7.4。磷酸缓冲盐溶液(PBS, g/L): KCl 0.20,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.20, NaCl 8.00,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.08。标准电极外液(mmol/L): NaCl 145, KCl 2.8,  $\text{CaCl}_2$  10.0, CsCl 1.0,  $\text{MgCl}_2$  2.0, Glucose 10.0, HEPES 10.0, 用NaOH调pH至7.4。电极内液(mmol/L): CsCl 120.0,  $\text{MgCl}_2$  1.0, EGTA 10.0, HEPES 10.0, Thapsigargin 2  $\mu\text{mol/L}$ , 用CsOH调pH至7.3。

**1.2 方法** 大鼠HIRI模型: 参考Colletti *et al*<sup>[7]</sup>的方法, 加以修改如下: 大鼠用10 g/L戊巴比妥钠(5 mL/kg) ip麻醉, 同时予以肝素(1 U/g) ip抗凝。15 min后, 大鼠固定于操作台上, 脱毛及消毒后取腹部正中切口, 打开腹腔后, 用无损伤血管夹夹闭肝脏门静脉和肝动脉在中叶和左叶的分支, 造成部分肝脏缺血。20 min后移去无创动脉夹, 再灌注40 min后建立成缺血再灌注模型。假手术组不阻断大鼠肝脏门静脉和肝动脉在中叶和左叶的分支, 其余手术步骤同上。Kupffer细胞分离采用低浓度胶原酶循环灌注法: 游离门静脉, 结扎远端, 剪开血管, 置入直径4 mm的硅胶管, 深度不超过第一肝门, 立即用预热37℃的无 $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ 的K-H原位灌注液灌注, 用电子蠕动泵控制流速为20-30 mL/min。剪开胸腔, 夹闭下腔静脉。快速灌注1-2 min, 待肝脏由于灌注液的充盈而膨胀, 出现均匀性颜色苍白后, 再剪开肝下腔静脉, 放出积血积液, 同时置入直径6-8 mm的硅胶管, 供引流用。总计快速灌注冲洗5 min, 以流出液变清和肝表面呈黄白色为准。然后换无 $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ 的K-H原位灌注液为含0.2 g/L胶原酶IV的K-H灌注消化液(37℃预热)循环灌注, 速度5-10 mL/min, 持续10 min至肝变软、塌陷、弹性消失后停止。小心剪取肝脏中叶及左叶, 置入50 mL 预热37℃

## ■ 研发前沿

肝缺血再灌注损伤对Kupffer细胞SOC的影响以及SOC与Kupffer细胞激活的关系是人们关注的热点。

## ■应用要点

从离子通道角度, Kupffer细胞活化以及减轻HIRI为药物的研发提供了实验和理论依据。

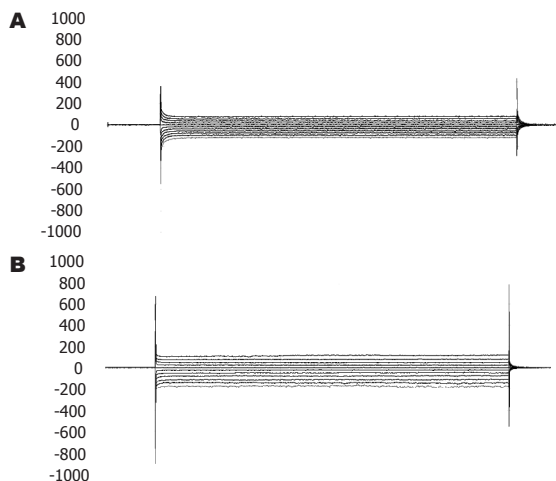


图1 膜电位钳制于-100 mV时, Kupffer细胞 $I_{SOC}$ . A: 假手术组; B: 缺血再灌注组.

的含0.1 g/L胶原酶IV的孵育液中, 剔除肝包膜和结缔组织, 使细胞散落. 孵育时间20 min, 其间水浴振荡200 r/min. 孵育液用200目的不锈钢筛网滤过, 得到肝组织细胞悬液. 差速离心及培养: 将细胞悬液离心(700  $g$ , 7 min), 弃上清. 向沉淀中加入PBS液20-30 mL, 充分吹打, 再离心(50  $g$ , 4 min), 留上清离心(700  $g$ , 5 min), 弃上清, 留沉淀. 向沉淀中加入DMEM, 充分吹打后滴入3.5 mm培养皿中, 置入37°C培养箱中培养. 培养1-2 h后取出, PBS冲洗, 取一培养皿用于细胞计数和鉴定, 对照组与缺血再灌注组分离得到的Kupffer细胞产量、纯度及活性无差异. 细胞产量 $(2.5-3.5) \times 10^6/g$ , 细胞纯度大于90%, 以4 g/L台盼蓝染色, 细胞活性大于85%. 其他加入2.0 mL标准电极外液, 置于倒置显微镜载物台上, 镜下选择细胞膜完整平滑、圆形、透亮、具立体感的细胞用于Kupffer细胞 $I_{SOC}$ 记录. 采用全细胞膜片钳技术, 在电压钳模式下记录Kupffer细胞 $I_{SOC}$ . 硬质玻璃电极经微电极拉制仪分两步拉制成尖端直径为1-2  $\mu m$ 的电极, 充满电极内液后阻抗为4-8  $M\Omega$ , 当电极尖端与细胞膜之间形成高阻封接( $>1 G\Omega$ )后, 负压或电击破膜, 使电极内液与细胞内液相通, 调节膜片钳放大器的电容一慢控制(C-slow)和电导-串联控制(G-series)抵消瞬时电流, 并记录调节值. 电流信号经放大器放大后通过接口Labmaster TL-1与一台奔腾4计算机相连, 取3 kHz滤波, 采样频率为5 kHz, 设定钳制电位(holding potential, HP)为0 mV, 实验电位(test potential, TP)为-120~+80 mV, 阶跃为20 mV, 持续时间200 ms. 信号采集与贮存, 结果分析等均借助计算机用pCLAMP 9.0软件完成.

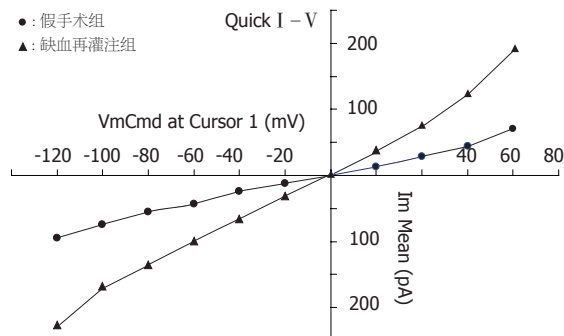


图2 膜电位钳制于-100 mV时, 缺血再灌注组、假手术组 $I_{SOC}$ .

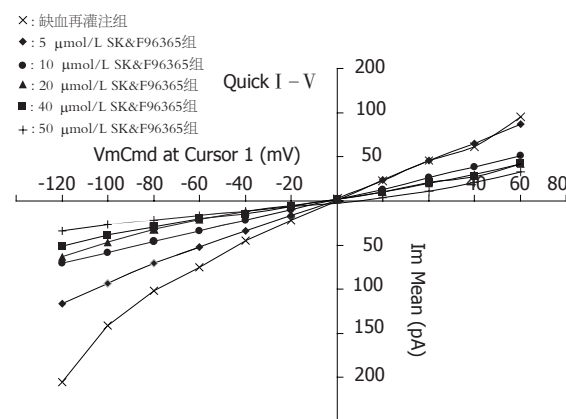


图3 膜电位钳制于-100 mV时, 5-50  $\mu mol/L$ 的SK&F96365对Kupffer细胞 $I_{SOC}$ 的抑制呈浓度依赖性增强.

**统计学处理** 采用SAS 6.12软件, 实验数据用均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示, 两组间均数比较采用 $t$ 检验, 各浓度实验组与对照组之间均数比较采用配对 $t$ 检验.  $P<0.05$ 表示差异有显著性,  $P<0.01$ 表示差异有高度显著性.

## 2 结果

**2.1 大鼠HIRI对Kupffer细胞 $I_{SOC}$ 的影响** 膜电位钳制于-100 mV时, 缺血再灌注组 $I_{SOC}$ 明显大于假手术组 $I_{SOC}$ . 假手术组 $I_{SOC}$ 为 $-78.7 \pm 25.2$  pA, 缺血再灌注组 $I_{SOC}$ 为 $-159.3 \pm 27.3$  pA, 两者有显著统计学差异( $P<0.01$ ,  $n=15$ , 图1). 但 $I_{SOC}$  I-V曲线线性关系和反转电位并不改变(图2). 分别测量各膜电位下的 $I_{SOC}$ , 以各脉冲下电流幅值对相应膜电位作图得到 $I_{SOC}$ 的 I-V曲线, 其反转电位约为0 mV.

**2.2 SK&F96365对HIRI Kupffer细胞 $I_{SOC}$ 的影响** 5-50  $\mu mol/L$ 的SK&F96365对Kupffer细胞 $I_{SOC}$ 的抑制呈浓度依赖性增强(表1, 图3). 根据寇式修正法计算的半数有效计量 $IC_{50}$ 为6.53  $\mu mol/L$ .

## 3 讨论

HIRI的防治是肝脏外科一项重要课题. 我们观

察到, 缺血再灌注损伤能增加Kupffer细胞的 $I_{SOC}$ , 引起Kupffer细胞内钙离子浓度的增加。可见, SOC的开放及 $I_{SOC}$ 的增大是导致HIRI时形成钙超载的重要原因之一。 $Ca^{2+}$ 作为第二信使, 在Kupffer细胞吞噬病原微生物、清除机体内毒素, 分泌多种细胞因子调节免疫和炎症反应等过程中起着重要作用<sup>[8]</sup>。HIRI过程中, Kupffer细胞由于细胞内 $Ca^{2+}$ 浓度升高活化, 激活磷脂酶和蛋白水解酶, 促进多种细胞因子和大量氧自由基(reactive oxygen species, ROS)生成, 并且ROS引起一系列的肝细胞的病理生理事件, 如凋亡、坏死和炎症<sup>[9-11]</sup>, 由此我们推测, ROS可能在SOC激活过程中起着重要的作用。我们的前期实验研究发现, 活性ROS可以明显增强HL-7702人肝细胞的 $I_{SOC}$ 。Broad *et al*<sup>[12]</sup>发现, 磷脂酶C和多磷酸肌醇是SOC激活所必须的。新近的资料发现, 在完好无损的细胞中, 具有活性的受体调节的磷脂酶C激活瞬时受体电位通道C3(transient receptor potential channel, TRPC<sub>3</sub>)是通过甘油二酯产物的作用来完成的, 而与蛋白G, 蛋白激酶或三磷酸肌醇无关<sup>[13]</sup>, 目前认为该离子通道的本质是瞬时受体电位通道蛋白家族<sup>[14]</sup>。本实验结果表明, 大鼠HIRI后可以激活Kupffer细胞, 进而产生大量的氧自由基, 与Kupffer细胞膜上的受体结合引起膜磷脂酶C的激活, 然后激活细胞膜上的SOC通道, 导致Kupffer细胞内钙离子超载。应用Kupffer细胞活化抑制剂可以明显减轻肝缺血再灌注损伤。

我们发现, SK&F96365对缺血再灌注损伤的Kupffer细胞 $I_{SOC}$ 具有抑制作用, 且呈浓度依赖性增强。SK&F96365是一种咪唑分离物, 最先被描述为RACCs的抑制剂: 发现可以抑制人中性粒细胞、血小板、内皮细胞等非兴奋细胞中激动剂诱发的钙内流,  $IC_{50}$ 为10  $\mu\text{mol/L}$ <sup>[15]</sup>。后来被证实可以抑制很多类型细胞, 如HL-60细胞<sup>[16]</sup>、鼠胸腺淋巴细胞<sup>[17]</sup>、甲状腺FRTL-5细胞<sup>[18]</sup>、血管平滑肌细胞<sup>[19]</sup>的SOC,  $IC_{50}$ 为1-4  $\mu\text{mol/L}$ 。SK&F96365同样可以抑制GH3垂体细胞和兔耳动脉平滑肌细胞的电压依赖性钙离子通道(voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels, VDCCs)<sup>[15]</sup>。所以, 应用SK&F96365作为SOC的抑制剂, 被严格限制于不具有VDCCs的非兴奋细胞中。Kupffer细胞被证实存在VDCCs, 但我们的前期研究发现, 用EGTA+TG的方法引导的钙离子内流并不能被VDCCs抑制剂维拉帕米所抑制。所以, 该方法并未激活Kupffer细胞的

表 1 SK&F96365对大鼠肝缺血再灌注Kupffer细胞 $I_{SOC}$ 的影响(TP: -100 mV,  $n = 8$ )

Group ( $\mu\text{mol/L}$ )	峰值电流 (pA)	抑制率 (%)
Control	-152.7 $\pm$ 42.5	
SK&F96365 (5)	-81.4 $\pm$ 24.2 <sup>b</sup>	43.9 $\pm$ 18.1
SK&F96365 (10)	-56.1 $\pm$ 26.4 <sup>b</sup>	59.2 $\pm$ 24.0
SK&F96365 (20)	-45.2 $\pm$ 21.6 <sup>b</sup>	66.3 $\pm$ 23.0
SK&F96365 (40)	-34.8 $\pm$ 17.1 <sup>b</sup>	73.8 $\pm$ 17.8
SK&F96365 (50)	-25.6 $\pm$ 13.4 <sup>b</sup>	80.9 $\pm$ 12.6

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs Control.

VDCCs, 有关SK&F96365的效应可以看作是对SOC作用的结果。本实验中由EGTA和TG诱发的钙电流可以被5-50  $\mu\text{mol/L}$ 的SK&F96365所抑制, 且抑制率随SK&F96365浓度的提高而增加, SK&F96365抑制SOC的具体机制仍不明确, 目前认为, SK&F96365是直接作用于SOC, 是SOC通道阻滞剂, 虽然这种分类仍然是假定性的, 但从SK&F96365可以抑制VDCCs和SOC这2种完全不同的信号路径的通道来看, 这种假定正确的可能性很大。

总之, 缺血再灌注损伤可以促进SD大鼠Kupffer细胞上SOC的进一步开放, 导致 $I_{SOC}$ 的增大。说明SOC参与缺血再灌注损伤, 造成进入Kupffer细胞的钙离子增加, 引起钙超载, 活化Kupffer细胞促进多种细胞因子和氧自由基大量生成, 进一步加重缺血再灌注损伤。而SK&F96365对Kupffer细胞起到保护作用, 并抑制Kupffer细胞的活化, 减少缺血再灌注肝组织损伤, 为保护HIRI的药物开发提供了实验依据和理论依据。

#### 4 参考文献

- 1 Smedsrod B, De Bleser PJ, Braet F, Lovisetti P, Vanderkerken K, Wisse E, Geerts A. Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells. *Gut* 1994; 35: 1509-1516
- 2 Zhong Z, Connor H, Mason RP, Qu W, Stachlewitz RF, Gao W, Lemasters JJ, Thurman RG. Destruction of Kupffer cells increases survival and reduces graft injury after transplantation of fatty livers from ethanol-treated rats. *Liver Transpl Surg* 1996; 2: 383-387
- 3 Vazquez G, Wedel BJ, Aziz O, Trebak M, Putney JW Jr. The mammalian TRPC cation channels. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1742: 21-36
- 4 Penner R, Fleig A. Store-operated calcium entry: a tough nut to CRAC. *Sci STKE* 2004; 2004: pe38
- 5 Putney JW Jr. Store-operated calcium channels: how do we measure them, and why do we care? *Sci STKE* 2004; 2004: pe37
- 6 Gregory RB, Hughes R, Riley AM, Potter BV, Wilcox RA, Barritt GJ. Inositol trisphosphate

#### ■名词解释

钙池操纵的钙通道(SOC): 几乎存在所有非兴奋细胞和部分兴奋细胞上一种受体依赖的钙离子通道, 是非兴奋细胞中钙离子进入胞质的重要钙通道, 主要依靠细胞内钙池耗竭而激活, 在细胞分裂、增殖、运动、分泌、能量代谢等方面起着重要作用。



## ■同行评价

本文应用膜片钳技术研究了大鼠肝缺血再灌注对Kupffer细胞膜SOC电流的影响以及SK&F96365对其的抑制作用,讨论了Kupffer细胞SOC在HIRI作用,为寻找减轻HIRI的药物提供了实验基础。实验方法先进,结论令人信服,具有科学性和创新性。

- analogues selective for types I and II inositol trisphosphate receptors exert differential effects on vasopressin-stimulated  $\text{Ca}^{2+}$  inflow and  $\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular stores in rat hepatocytes. *Biochem J* 2004; 381: 519-526
- 7 Colletti LM, Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DA Jr. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Clin Invest* 1990; 85: 1936-1943
- 8 Sokirchenko IA. Changes in the Kupffer cells after reversible ischemia of the liver in rats. *Biull Eksp Biol Med* 1993; 116: 548-550
- 9 Fan C, Zwacka RM, Engelhardt JF. Therapeutic approaches for ischemia/reperfusion injury in the liver. *J Mol Med* 1999; 77: 577-592
- 10 Pardini RS. Toxicity of oxygen from naturally occurring redox-active pro-oxidants. *Arch Insect Biochem Physiol* 1995; 29: 101-118
- 11 Losser MR, Payen D. Mechanisms of liver damage. *Semin Liver Dis* 1996; 16: 357-367
- 12 Broad LM, Braun FJ, Lievrement JP, Bird GS, Kurosaki T, Putney JW Jr. Role of the phospholipase C-inositol 1,4,5-trisphosphate pathway in calcium release-activated calcium current and capacitative calcium entry. *J Biol Chem* 2001; 276: 15945-15952
- 13 Trebak M, St J Bird G, McKay RR, Birnbaumer L, Putney JW Jr. Signaling mechanism for receptor-activated canonical transient receptor potential 3 (TRPC3) channels. *J Biol Chem* 2003; 278: 16244-16252
- 14 Clapham DE, Runnels LW, Strubing C. The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 387-396
- 15 Merritt JE, Armstrong WP, Benham CD, Hallam TJ, Jacob R, Jaxa-Chamiec A, Leigh BK, McCarthy SA, Moores KE, Rink TJ. SK&F 96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry. *Biochem J* 1990; 271: 515-522
- 16 Demarex N, Lew DP, Krause KH. Cyclopiazonic acid depletes intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores and activates an influx pathway for divalent cations in HL-60 cells. *J Biol Chem* 1992; 267: 2318-2324
- 17 Mason MJ, Mayer B, Hymel LJ. Inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  transport pathways in thymic lymphocytes by econazole, miconazole, and SKF 96365. *Am J Physiol* 1993; 264: C654-C662
- 18 Tornquist K. Activation of calcium entry by cyclopiazonic acid in thyroid FRTL-5 cells. *Cell Calcium* 1993; 14: 411-417
- 19 Zhou JG, Qiu QY, Zhang Z, Liu YJ, Guan YY. Evidence for capacitative and non-capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry pathways coexist in A10 vascular smooth muscle cells. *Life Sci* 2006; 78: 1558-1563

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。

# 西咪替丁治疗大鼠非乙醇性脂肪性肝炎

闻勤生, 徐辉, 王旭霞, 常青, 张亚飞, 李军

闻勤生, 徐辉, 王旭霞, 第四军医大学唐都医院消化内科 陕西省西安市 710038

常青, 中国人民解放军301医院干部病房 北京市 100078  
张亚飞, 李军, 第四军医大学唐都医院传染科 陕西省西安市 710038

闻勤生, 第四军医大学唐都医院消化内科教授、主任医师、医学博士, 主要从事消化内科临床与实验研究。

陕西省自然科学基金项目资助, No. 2003CJ035

通讯作者: 闻勤生, 710038, 陕西省西安市新寺路1号, 第四军医大学唐都医院消化内科. gastdy9@fmmu.edu.cn

电话: 029-84777421 传真: 029-84777597

收稿日期: 2006-06-06 接受日期: 2006-06-14

## Experimental study on cimetidine in treatment of nonalcoholic steatohepatitis in rats

Qin-Sheng Wen, Hui Xu, Xu-Xia Wang, Qing Chang, Ya-Fei Zhang, Jun Li

Qin-Sheng Wen, Hui Xu, Xu-Xia Wang, Department of Gastroenterology, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China  
Qing Chang, the 301<sup>st</sup> Hospital of Chinese PLA, Beijing 100078, China

Ya-Fei Zhang, Jun Li, Department of Infectious Diseases, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China

Supported by Natural Science Research Program of Shaanxi Province, No. 2003CJ035

Correspondence to: Dr. Qin-Sheng Wen, Department of Gastroenterology, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China. gastdy9@fmmu.edu.cn

Received: 2006-06-06 Accepted: 2006-06-14

## Abstract

**AIM:** To investigate the efficacy and mechanism of cimetidine in the treatment of rat nonalcoholic steatohepatitis (NASH).

**METHODS:** Thirty male Sprague Dawley rats were randomly and averagely divided into group A, B and C. High-fat diet was given to the rats in group A and B to induce NASH model, and those in group C served as normal controls. Moreover, the rats in group B were intragastrically treated with cimetidine (200 mg/d) for 12 wk. The levels of cytochrome P450 (CYP450), CYP2E1 and the damages of liver tissues, as well as the level changes of alanine aminotransferase

(ALT), aspartate aminotransferase (AST), blood glucose, insulin, and hyaluronic acid (HA) were measured. The pathological changes of liver tissues were observed under light microscope.

**RESULTS:** After modeling, the serum levels of ALT, AST, blood glucose, insulin, and HA, and the tissue contents of CYP450 and CYP2E1 were elevated. However, after cimetidine treatment, the levels of ALT ( $t = 5.16, P < 0.05$ ), AST ( $t = 5.45, P < 0.05$ ), and HA ( $T = 55, P < 0.05$ ), the contents of CYP450 ( $t = 3.91, P < 0.05$ ) and CYP2E1 ( $t = 1.95, P < 0.05$ ), and the wet weight of liver ( $t = 9.24, P < 0.05$ ), as well as the histological activity index ( $6.40 \pm 5.85$  vs  $7.80 \pm 4.60, t = 2.59, P < 0.05$ ) were decreased significantly. The serum levels of blood glucose and insulin were not significantly different between group A and B ( $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Cimetidine can lessen the damages of hepatocytes through inhibiting the expression of CYP450 and CYP2E1.

**Key Words:** Cimetidine; Nonalcoholic steatohepatitis; Cytochrome P450; Hyaluronic acid

Wen QS, Xu H, Wang XX, Chang Q, Zhang YF, Li J. Experimental study on cimetidine in treatment of nonalcoholic steatohepatitis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(24):2377-2381

## 摘要

**目的:** 探讨西咪替丁对大鼠非乙醇性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)的治疗作用及其可能的作用机制。

**方法:** 将30只♂SD大鼠随机分为对照组( $n = 10$ )、模型组( $n = 10$ )和治疗组( $n = 10$ ), 模型组和治疗组给予高脂饮食喂养, 治疗组给予西咪替丁200 mg/(kg·d)灌胃, 12 wk后处死大鼠取血测定ALT、AST、血糖、胰岛素和透明质酸含量, 观察肝脏组织学变化并测定肝组织CYP450及CYP2E1含量。光镜下观察肝组织病理学变化, 进行肝组织炎症活动计分。

**结果:** 与对照组比较, 模型组大鼠ALT、

## ■背景资料

NASH是临床常见病, 发病机制尚未完全明确, 亦缺乏有效的防治方法。有研究发现, NASH肝脏CYP450及其主要同功酶CYP2E1增高, 可能与NASH发病有关。另有研究发现, 西咪替丁具有抑制CYP450及CYP2E1表达的作用。

## ■创新盘点

本研究制备NASH动物模型,从肝脏功能及形态学等方面和肝组织CYP450及CYP2E1含量变化等方面观察西咪替丁对NASH的干预作用,国内外未见类似报道。

AST、血糖、胰岛素和透明质酸水平以及CYP450和CYP2E1含量升高,而治疗组ALT ( $t = 5.16, P < 0.05$ ), AST ( $t = 5.45, P < 0.05$ ), CYP450 ( $t = 3.91, P < 0.05$ ), CYP2E1 ( $t = 1.95, P < 0.05$ ), 肝湿质量( $t = 9.24, P < 0.05$ )及透明质酸( $T = 55, P < 0.05$ )均显著低于模型组,治疗组肝组织炎症活动度计分显著低于模型组( $6.40 \pm 5.85$  vs  $7.80 \pm 4.60, t = 2.59, P < 0.05$ ), 血糖、胰岛素与模型组比较无显著差异( $P > 0.05$ )。

**结论:** 西咪替丁能显著减轻NASH大鼠肝脏功能及形态损伤,可能是通过抑制肝细胞微粒体CYP450和CYP2E1的表达发挥作用。

**关键词:** 西咪替丁; 非乙醇性脂肪性肝炎; 细胞色素P450; 透明质酸

闻勤生, 徐辉, 王旭霞, 常青, 张亚飞, 李军. 西咪替丁治疗大鼠非乙醇性脂肪性肝炎. 世界华人消化杂志 2006;14(24):2377-2381

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2377.asp>

## 0 引言

非乙醇性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)具有隐匿地向肝纤维化、肝硬化发展的特点<sup>[1-5]</sup>, 目前对于NASH尚无明确有效的治疗方法. 有学者研究发现, NASH动物肝组织内细胞色素P450 (CYP450)和其同功酶CYP2E1明显升高, 认为CYP450及CYP2E1与NASH发病有一定关系<sup>[6-11]</sup>. 另有研究发现, H<sub>2</sub>受体拮抗剂西咪替丁具有抑制CYP450及CYP2E1生成的功能<sup>[12-14]</sup>. 为此, 我们制备NASH动物模型, 观察西咪替丁对NASH的干预作用并探讨其作用机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康♂成年SD大鼠30只, 体重200±20 g, 由第四军医大学动物中心提供. 高脂饲料配方: 猪油10%, 胆固醇2%, 基础饲料88%. 西咪替丁由山东方明药业股份有限公司生产. 透明质酸(hyaluronic acid, HA)放射免疫分析试剂盒购自上海海研医学生物技术中心, 胰岛素放射免疫分析试剂盒购自华西糖尿病科技开发研究所. FJ-2008PS型γ放免计数器, 西安核仪器厂生产. 日立SBA-300型全自动生化分析仪。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物模型制备** SD大鼠30只, 随机分为3组, 每组10只, 对照组给予正常饮食喂养, 模型组和治疗组每只大鼠每天给予25 g高脂饲料喂养, 其余以普通饲料补足, 模型组给予生理盐水灌

胃, 治疗组给予200 mg/(kg·d)西咪替丁灌胃, 每日1次, 实验时间共为12 wk. 期间动物自由饮水, 饲养于20±2℃明暗各12 h的清洁级动物的实验室. 12 wk末前夜禁食, 麻醉状态下断头取血处死大鼠, 称取大鼠体质量、肝湿质量, 常规制作血清标本和肝脏标本, 保存于-70℃冰箱内待测。

**1.2.2 血清标本各指标及CYP450和CYP2E1检测** 用日立SBA-300型全自动生化分析仪测定ALT, AST和血糖. HA及血清胰岛素含量测定按试剂盒说明操作, 使用FJ-2008PS型γ计数器进行测定. CYP450及CYP2E1测定按文献<sup>[15]</sup>所示方法操作。

**1.2.3 病理学观察** 40 g/L甲醛溶液固定肝标本, 石蜡切片进行HE染色, 光镜下评估肝脂肪变性和炎症活动情况. 炎症活动度计分标准参考1981年Knodell *et al*<sup>[16]</sup>提出的慢性肝炎组织学活动指数(HAI), 并结合王泰龄 *et al*<sup>[17]</sup>提出的慢性肝炎炎症活动计分方案, 分为汇管区炎症(P)、小叶内炎症(L)、碎片状坏死(PN)及桥接坏死(BN)4项, 每项依病变程度分别计为1, 2, 3, 4分, 因为BN, PN的严重度与预后直接相关, 故其计分2倍于其他病变, 计分公式为P+L+2 (PN+BN) (表1)。

**统计学处理** 采用SPSS 10.0统计软件处理, 实验数据以mean±SD表示, 组间比较采用*t*检验, HA比较采用等级资料的Wilcoxon法检验,  $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。

## 2 结果

模型组大鼠体质量、肝湿质量明显增加, 符合脂肪肝表现, 与对照组相比有显著差异( $t_{\text{体质量}} = 29.07, t_{\text{肝湿质量}} = 20.11, P < 0.05$ ). 治疗组给予西咪替丁后显著降低了大鼠肝湿质量的生长速度, 肝湿质量值显著低于模型组( $t_{\text{肝湿质量}} = 9.24, P < 0.05$ ). 与模型组比较, 治疗组血清ALT, AST均显著低于模型组( $t_{\text{ALT}} = 5.16, t_{\text{AST}} = 5.45, P < 0.05$ ). 与对照组比较, 模型组血糖、胰岛素均明显升高, 模型组与治疗组的血糖、胰岛素水平无显著差异( $t_{\text{胰岛素}} = 0.43, t_{\text{血糖}} = 0.12, P > 0.05$ ) (表2). 与对照组比较, 模型组大鼠CYP450及CYP2E1显著升高( $t_{\text{CYP450}} = 6.24, t_{\text{CYP2E1}} = 1.79, P < 0.05$ ), 经西咪替丁治疗后, CYP450及CYP2E1含量显著低于模型组( $t_{\text{CYP450}} = 3.91, t_{\text{CYP2E1}} = 1.95, P < 0.05$ ), 但仍高于对照组 (表3)。

**2.1 血清HA检测结果** 将HA测定值从小到大分

表 1 炎症活动度计分标准

计分	汇管区炎症(P)	小叶内炎症(I)	碎片状坏死(PN)	桥接坏死(BN)
0	无	无	无	无
1	部分汇管区少量炎细胞浸润	变性及少数点状坏死	局限PN	偶见BN
2	介于1-3之间	介于1-3之间	介于1-3之间	介于1-3之间
3	多数汇管区较多炎细胞浸润	多数坏死灶	多数汇管区PN达周长50%	少数BN
4	汇管区扩大, 炎细胞集聚, 淋巴滤泡形成	坏死灶融合成片	PN广泛大于周长50%达小叶中带	BN范围广, 小叶结构失常或多小叶坏死

■应用要点  
西咪替丁对高脂饮食引起的肝功能及肝组织损害有一定防护作用, 但仍需深入研究, 进一步探讨西咪替丁防治NASH的作用机制. 西咪替丁价格低廉, 应用方便, 可试用于临床.

表 2 各组大鼠体质量、肝湿质量及血清各指标的检测结果 (mean ± SD, n = 10)

指标	对照组	模型组	治疗组
体质量 (g)	390 ± 10	520 ± 10 <sup>a</sup>	500 ± 11 <sup>a</sup>
肝湿质量 (g)	16.6 ± 2.4	43.6 ± 3.5 <sup>b</sup>	31.2 ± 2.4 <sup>ac</sup>
ALT (U/L)	31.00 ± 6.06	62.75 ± 9.22 <sup>a</sup>	37.25 ± 12.63 <sup>c</sup>
AST (U/L)	102.75 ± 3.70	228.00 ± 25.50 <sup>a</sup>	126.50 ± 53.13 <sup>c</sup>
血糖 (mmol/L)	5.62 ± 1.25	10.50 ± 4.37 <sup>a</sup>	10.80 ± 6.34 <sup>a</sup>
胰岛素 (pmol/L)	240.20 ± 10.56	352.30 ± 12.58 <sup>a</sup>	349.50 ± 16.25 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 对照组; <sup>c</sup>*P*<0.05 vs 模型组.

为5级, 数值在400-500间的为“-”, 500-600间的为“+”, 600-700间的为“++”, 700-800间的为“+++”, >800的为“++++”,  $\gamma = 10-1 = 9$ , 采用等级资料处理方法, 用SPSS 10.0软件计算, 与对照组比较, 模型组HA含量显著升高 (*P*<0.05), 治疗组HA含量较模型组降低(Wilcoxon符号秩检验, *T* = 55, *P*<0.05)(表4).

2.2 肝脏病理学 模型组大鼠肝脏明显肿大, 表面不光滑, 包膜紧张, 边缘圆钝, 颜色奶黄色, 切面油腻. 治疗组大鼠肝脏肿大, 表面尚光滑, 包膜紧张, 边缘圆钝, 颜色奶黄色, 切面油腻. 对照组肝脏无肿大, 表面光滑, 颜色紫红色. 在光镜下, 治疗组与模型组均出现明显的肝细胞脂肪变性, 几乎所有肝细胞内都有明显的脂肪滴, 数量上无明显差别, 但治疗组肝细胞内脂滴体积明显小于模型组. 模型组所有大鼠肝组织均出现程度不同的弥漫性肝细胞气球样变, 肝细胞极度肿胀呈圆形, 体积较正常明显增加, 胞质疏松呈网状、透明, 肝窦狭窄. 100%存在小叶内炎症, 90% (9/10)出现汇管区炎症, 还有点状坏死, 并有2例出现碎片状坏死, 肝组织炎症细胞浸润以单核细胞为主, 并伴中性粒细胞浸润. 治疗组大鼠几乎所有肝细胞内都有明显脂滴, 数量上无明显差别, 但肝细胞体积正常, 胞质未见疏松化

表 3 大鼠肝微粒体细胞色素P450及CYP2E1测定结果 (mean ± SD, n = 10)

	对照组	模型组	治疗组
CYP450	3.59 ± 2.45	11.12 ± 2.92 <sup>b</sup>	5.83 ± 3.12 <sup>ac</sup>
CYP2E1	2.76 ± 2.02	8.20 ± 2.00 <sup>b</sup>	5.56 ± 3.79 <sup>ac</sup>

<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 对照组; <sup>c</sup>*P*<0.05 vs 模型组. (CYP450 nmol/mg pro, CYP2E1 nmol/mg pro).

表 4 各组大鼠HA测定结果 (n)

HA含量	对照组	模型组	治疗组
-	7	0	0
+	3	0	0
++	0	0	1
+++	0	0	3
++++	0	10	6

改变(图1). 治疗组(6.40 ± 5.85)和模型组(7.80 ± 4.60)炎症计分均高于对照组(0.33 ± 0.10), 治疗组计分显著低于模型组(*t* = 2.59, *P*<0.05).

### 3 讨论

关于NASH的发病机制, 目前被大多数学者认可的是“二次打击学说”<sup>[18-20]</sup>. 第一次打击指正常



### ■同行评价

西咪替丁已试图用于治疗乙醇性肝病,疗效尚在评估之中.该药是否对非乙醇性脂肪性肝炎也有效,尚未有这方面的报道.本文内容尚重要,信息尚充足,有一定的新颖性.

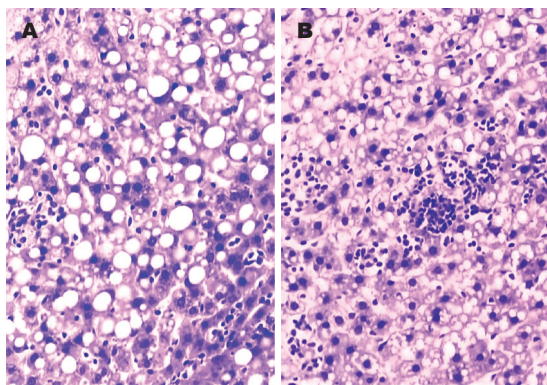


图1 肝脏组织学变化(H&E, ×100). A: 模型组; B: 治疗组.

肝脏变成脂肪肝,这主要是胰岛素抵抗的结果.肥胖、糖尿病、高胰岛素血症和高脂血症等代谢综合征几乎普遍存在胰岛素抵抗现象.具体表现为肝摄取游离脂肪酸增加、外周脂肪动员增强、肝细胞脂肪转运出肝能力受损,结果引起肝细胞内脂肪堆积.第二次打击即氧应激、脂质过氧化及由此诱导的活性氧产物增加和线粒体功能不全,使单纯性脂肪肝向NASH、肝纤维化发展.本实验成功地制备了NASH动物模型.结果表明,模型组血糖及胰岛素水平均高于对照组,提示存在胰岛素抵抗,模型组的ALT、AST、HA及炎症计分均显著高于对照组,表明发生了肝组织损伤及纤维化.

肝CYP450系统是定位于胞质滑面内质网上的一组混合功能氧化酶系,他与进入体内的外源性物质代谢有关.人类中确定的CYP450同功酶有20多种,CYP2E1是最主要的同功酶,是微粒体中脂质过氧化的主要催化剂,许多外源性物质既是CYP2E1的诱导剂,也是其作用的底物.随着CYP2E1的表达增强,脂质过氧化反应的终产物丙二醛的含量亦随之升高.在正常情况下,细胞内存在着自由基清除剂即抗氧化剂,如超氧化物歧化酶、谷胱甘肽、维生素E等,他们均是细胞内重要的自由基清除剂,可以随时清除不断生成的有害自由基,阻断自由基的链式放大反应,从而起到保护细胞的作用<sup>[21-24]</sup>.但是,一旦氧化抗氧化机制失去平衡,则对机体产生不利的影响.因此,测定CYP450及CYP2E1水平可反映机体内脂质过氧化的程度,间接反映肝细胞损伤程度.本研究结果表明,模型组的CYP450及CYP2E1均显著高于对照组,提示可能与肝功能与肝组织结构损害有关.

西咪替丁是一种H<sub>2</sub>受体拮抗剂,在临床上被广泛用于治疗胃酸分泌过多的相关疾病.有

研究发现他能够抑制CYP450及CYP2E1表达,但未见有关西咪替丁防治NASH的临床及实验研究报道.本研究观察到,应用西咪替丁后,虽然治疗组大鼠的体质量、空腹血糖及胰岛素与模型组相比无显著差异,但治疗组的肝湿质量、ALT、AST、HA、CYP450、CYP2E1及肝组织炎症计分均显著低于模型组,表明西咪替丁对高脂饮食引起的肝功能及肝组织损害有一定防护作用,可能与抑制CYP450及CYP2E1的表达有关,但治疗组的肝湿质量、HA、CYP450、CYP2E1及肝组织炎症计分仍显著高于对照组,提示NASH的发病机制是复杂的.

随着人们生活水平的提高,NASH的发病率会逐渐增高,因此需要加强对NASH发病机制及防治的研究.西咪替丁价格低廉,使用方便,可作为NASH的防治方法之一,但需进一步研究其作用机制,亦需注意观察西咪替丁本身对肝脏的毒副作用.此外,合用降脂药物及抗氧化药物(如维生素E)是否会增强西咪替丁疗效还需进一步深入研究.

### 4 参考文献

- 1 Poordad FF. Nonalcoholic fatty liver disease: a review. *Expert Opin Emerg Drugs* 2005; 10: 661-670
- 2 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
- 3 Marchesini G, Marzocchi R, Agostini F, Bugianesi E. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol* 2005; 16: 421-427
- 4 Villanova N, Moscatiello S, Ramilli S, Bugianesi E, Magalotti D, Vanni E, Zoli M, Marchesini G. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 42: 473-480
- 5 Feldstein AE, Gores GJ. Apoptosis in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *Front Biosci* 2005; 10: 3093-3099
- 6 Emery MG, Fisher JM, Chien JY, Kharasch ED, Dellinger EP, Kowdley KV, Thummel KE. CYP2E1 activity before and after weight loss in morbidly obese subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2003; 38: 428-435
- 7 Chalasani N, Gorski JC, Asghar MS, Asghar A, Foresman B, Hall SD, Crabb DW. Hepatic cytochrome P450 2E1 activity in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003; 37: 544-550
- 8 Robertson G, Leclercq I, Farrell GC. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G1135-1139
- 9 Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, Ponomarenko A, DeCarli LM. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 502-509
- 10 Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C,

- Ponomarenko A, DeCarli LM. Acarbose attenuates experimental non-alcoholic steatohepatitis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315: 699-703
- 11 Feher J, Lengyel G. A new approach to drug therapy in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *J Int Med Res* 2003; 31: 537-551
- 12 Park EJ, Cho HY, Lee YB. Effect of Cimetidine and Phenobarbital on metabolite kinetics of Omeprazole in rats. *Arch Pharm Res* 2005; 28: 1196-1202
- 13 Peng FC, Chen PC, Jeng YJ, Edwards RJ. Metabolism of teritrem B and C in liver microsomes from 14-wk-old Wistar rats is catalyzed by cytochrome P-450 3A. *J Toxicol Environ Health A* 2005; 68: 299-314
- 14 Strakowski SM, Keck PE Jr, Wong YW, Thyrum PT, Yeh C. The effect of multiple doses of cimetidine on the steady-state pharmacokinetics of quetiapine in men with selected psychotic disorders. *J Clin Psychopharmacol* 2002; 22: 201-205
- 15 朱曼, 王睿, 张永青, 梁蓓蓓. 大鼠肝微粒体细胞色素P450酶系检测方法学研究. *中国临床药理学与治疗学* 2004; 9: 500-503
- 16 Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan TW, Wollman J. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 1: 431-435
- 17 王泰龄, 刘霞, 周之平. 慢性肝炎炎症活动度及纤维化程度计分方案. *中华肝病杂志* 1998; 66: 195-197
- 18 Chitturi S, Farrell GC. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 27-41
- 19 Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest* 2000; 105: 1067-1075
- 20 Zou Y, Li J, Lu C, Wang J, Ge J, Huang Y, Zhang L, Wang Y. High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Life Sci* 2006; 79: 1100-1107
- 21 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
- 22 Laurent A, Nicco C, Tran Van Nhieu J, Borderie D, Chereau C, Conti F, Jaffray P, Soubrane O, Calmus Y, Weill B, Batteux F. Pivotal role of superoxide anion and beneficial effect of antioxidant molecules in murine steatohepatitis. *Hepatology* 2004; 39: 1277-1285
- 23 Oliveira CP, Faintuch J, Rascovski A, Furuya CK Jr, Bastos Mdo S, Matsuda M, Della Nina BI, Yahnosi K, Abdala DS, Vezozzo DC, Alves VA, Zilberstein B, Garrido AB Jr, Halpern A, Carrilho FJ, Gama-Rodrigues JJ. Lipid peroxidation in bariatric candidates with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) - preliminary findings. *Obes Surg* 2005; 15: 502-505
- 24 Koruk M, Taysi S, Savas MC, Yilmaz O, Akcay F, Karakok M. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Clin Lab Sci* 2004; 34: 57-62

电编 张敏 编辑 潘伯荣

## 乙型肝炎病毒截短型表面抗原中蛋白结合蛋白的筛选

田江克, 成军, 刘妍, 崔玉芳, 纪冬, 王琳, 程勇前, 钟彦伟, 徐东平

### ■背景资料

乙型病毒性肝炎是由HBV感染引起的世界性传染病, 目前还没有特效的治疗方法. HBV属嗜肝DNA病毒, 其基因组功能单位十分密集, 高度压缩, 重复利用, 目前已确定有4个主要的开放读码框, 编码至少7个蛋白, 包括3个表面抗原: 包膜蛋白前-S1前-S2、S; 核心抗原(HBcAg); e抗原(HBeAg); 病毒多聚酶(P); X蛋白(HBxAg). 其中MHBst为截短型表面抗原中蛋白, 其与肝细胞之间的具体作用机制尚不清楚, 研究MHBst与肝细胞间的相互作用蛋白, 可能是解决HBV感染的有效途径之一.

田江克, 崔玉芳, 解放军军事医学科学院放射与辐射医学研究所免疫学研究室 北京市 100850

田江克, 刘妍, 纪冬, 王琳, 程勇前, 钟彦伟, 徐东平, 解放军第302医院传染病研究所病毒性肝炎研究中心 北京市 100039

成军, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011

田江克, 主管技师, 军事医学科学院在职硕士生, 主要从事肝病的临床和基础研究.

北京市自然科学基金资助项目, No. 5042024

通讯作者: 成军, 100011, 北京市东城区安外大街地坛公园13号, 北京地坛医院传染病研究所. cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-64481639 传真: 010-64281540

收稿日期: 2006-02-13 接受日期: 2006-03-20

### Screening and identification of proteins interacting with C-terminally truncated middle surface protein of hepatitis B virus

Jiang-Ke Tian, Jun Cheng, Yan Liu, Yu-Fang Cui, Dong Ji, Lin Wang, Yong-Qian Cheng, Yan-Wei Zhong, Dong-Ping Xu

Jiang-Ke Tian, Yu-Fang Cui, Department of Immunology, Institute of Radiation Medicine, AMMS, Beijing 100850, China

Jiang-Ke Tian, Yan Liu, Dong Ji, Lin Wang, Yong-Qian Cheng, Yan-Wei Zhong, Dong-Ping Xu, Viral Hepatitis Research Center, Institute of Infectious Diseases, the 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Jun Cheng, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China

Supported by Beijing Natural Science Foundation, No. 5042024

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, 13 Ditan Park, Anwai Street, Dongcheng District, Beijing 100011, China. cj@genetherapy.com.cn

Received: 2006-02-13 Accepted: 2006-03-20

### Abstract

**AIM:** To screen and identify proteins interacting with C-terminally truncated middle surface protein of hepatitis B virus (MHBst) from human leukocyte cDNA library by yeast two-hybrid system.

**METHODS:** The MHBst fragment was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and MHBst binding protein bait plasmid pGBKT7-MHBst was constructed by yeast-two hybrid system.

Then plasmid pGBKT7-MHBst was transformed into yeast AH109 cells and the expression of MHBst was detected by SDS-PAGE and Western blotting assay. The transformed yeast cells were mated with yeast Y187 containing leukocyte cDNA library plasmid. Diploid yeast was plated on synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) and quadruple dropout (QDO) medium containing X- $\alpha$ -gal for selection. Subsequently, the plasmids of the blue colonies were extracted, transformed into *E. coli* (DH5 $\alpha$ ), and then selected by ampicillin. After extraction and digestion, the plasmids were analyzed by DNA sequencing and bioinformatics.

**RESULTS:** MHBst proteins were successfully cloned and expressed in yeast cells. Eight genes in positive colonies were obtained by yeast-two hybrid technique, including two ADP-ribosylation factor 1, one RAB6 interacting protein 1, one CCR4-NOT transcription complex subunit 10, one lipopolysaccharide binding protein, one aldolase B, one complement component 3 and one pyruvate dehydrogenase.

**CONCLUSION:** MHBst binding proteins in leukocytes are successfully cloned.

**Key Words:** Yeast-two hybrid technique; MHBst; Binding protein; Cloning

Tian JK, Cheng J, Liu Y, Cui YF, Ji D, Wang L, Cheng YQ, Zhong YW, Xu DP. Screening and identification of proteins interacting with C-terminally truncated middle surface protein of hepatitis B virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(24):2382-2385

### 摘要

**目的:** 用酵母双杂交技术筛选白细胞与乙型肝炎病毒截短型表面抗原中蛋白(MHBst)结合蛋白.

**方法:** PCR扩增MHBst基因, 连接入酵母表达载体pGBKT7中构建诱饵质粒, 转化酵母细胞AH109并在其内表达. 后与转化了人白细胞文库质粒的酵母细胞Y187进行配合, 在营养缺陷型培养基(SD/-Trp-Leu-His-Ade)和X- $\alpha$ -半



乳糖(X- $\alpha$ -gal)上进行双重筛选阳性菌落增菌后提出质粒转化入大肠杆菌(DH5 $\alpha$ ), 并经氨苄青霉素抗性筛选, 提取单克隆菌落质粒, 酶切鉴定, 序列测定后进行生物信息学分析。

**结果:** 应用酵母双杂交技术筛选出阳性克隆8个, 经生物信息学分析, 排除读码框架不正确者, 最后得到7种已知基因, 分别为ADP核糖基因子2种, RAB6相互作用蛋白(RAB6IP1)1种, CCR4-NOT转录复合体亚基10(CCR4-NOT-10)1种, 脂多糖蛋白结合蛋白(LBP) 1种, 醛缩酶B (ALDOB) 1种, 补体成分3(C3)1种, 丙酮酸脱氢酶(PDH)1种。

**结论:** 成功克隆出MHBst结合蛋白。

**关键词:** 酵母双杂交技术; MHBst; 结合蛋白; 克隆

田江克, 成军, 刘妍, 崔玉芳, 纪冬, 王琳, 程勇前, 钟彦伟, 徐东平. 乙型肝炎病毒截短型表面抗原中蛋白结合蛋白的筛选. 世界华人消化杂志 2006;14(24):2382-2385

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2382.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是一种严重危害人类健康的致病病毒因子, 除引起急、慢性病毒性肝炎, 慢性肝炎迁延不愈, 导致肝纤维化, 还与肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的发生密切相关<sup>[1]</sup>。虽然对于HBV相关性疾病的诊断、治疗有了长足的发展, 但目前具体的HBV致病(癌)机制尚不十分明确。其中HBV表面抗原组成最为复杂, 通过S开放读码框三个不同的起始密码子(ATG)编码前-S1、前-S2和主S蛋白, 组成表面抗原大蛋白(LHBs), 中蛋白(MHBs)和小(主)蛋白(SHBs)。研究表明, 羧基末端截短的乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白(MHBst)能够反式激活多种病毒和细胞基因组的表达, 影响细胞生长调节, 在HCC发生过程中起重要作用<sup>[2-3]</sup>。由于HBV表面抗原在患者血液中大量存在, 我们拟从蛋白质-蛋白质相互作用的角度, 采用白细胞文库和酵母双杂交技术, 进行筛选, 以期发现与免疫有关的一些基因。探索白细胞文库中与MHBst结合的蛋白, 进一步阐明MHBst致病的分子机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** *Saccharomyces cerevisiae* AH109酵母株、Y187酵母株(K1612-1)均购自Clontech公司; cDNA白细胞文库由本室构建; 酵母YPDA培养

基、SD/-Trp培养基SD/-Leu, SD/-Trp/-Leu, SD/-Trp/-Leu/-His, SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade, X- $\alpha$ -半乳糖苷酶(gal)等购自Clontech公司; 半硫酸腺苷、醋酸锂购自Sigma公司; 复杂高效感受态(FSB), 本室自制; 大肠杆菌(DH5 $\alpha$ ), 本室保存。

### 1.2 方法

**1.2.1 诱饵质粒的构建** 根据董菁 *et al*<sup>[4-5]</sup>发表的adr亚型HBV的基因序列, 分别设计MHBst编码区的上游和下游引物(上游引物: 5'-GGATCCTCCTGGAGGTAGAAGTAGAGGACAAAC-3', 下游引物: 5'-GGATCCTCAAATGTATACCCAAAGAC-3'), 同时在引物两端引入*Eco*R I/*Bam*H I 内切酶位点。反应体系25  $\mu$ L, 以G376-7(GenBank号: AF384371)质粒为模板, PE9600 PCR仪扩增。9 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果。PCR产物经玻璃奶回收后, 与pGEM-T载体及T4 DNA连接酶混匀, 16 $^{\circ}$ C连接过夜, 后转入用氯化钙法制备的大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞, 在铺有IPTG及X-gal的氨苄青霉素琼脂糖(LB)平板上进行蓝白菌落筛选, 挑取阳性菌落, 用碱裂解法提取质粒DNA 进行酶切鉴定及测序, 正确后亚克隆至pGBKT7 载体中, 转化DH5 $\alpha$ 感受态, 接种于卡那霉素LB平板上, 随机挑取平板上生长的菌落, 碱裂解法抽提质粒DNA, 双酶切及PCR鉴定所得质粒正确, 命名为pGBKT7-MHBst。

**1.2.2 MHBst的表达** 按Clontech公司操作手册, 用醋酸锂法转化酵母细胞AH109, 后铺板于SD/-Trp进行筛选。挑取2-3 mm大小的菌落过夜培养后, 提取酵母蛋白质, 操作步骤按Clontech公司试剂盒说明书进行。表达产物的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和Western免疫印迹分析均按常规方法进行。并在四缺培养基上培养排除其自身激活作用。

**1.2.3 诱饵与白细胞文库的酵母配合** cDNA白细胞文库进行增菌后, 提出质粒, 转化入酵母细胞(Y187), 经文库滴定, 确定文库细胞计数大于 $1 \times 10^{12}$ 细胞/L。挑取在SD/-Trp选择培养基上生长转化子(计数大于 $1 \times 10^{12}$ 细胞/L)与白细胞文库混合, 30 $^{\circ}$ C轻摇配合过夜, 24 h后铺板SD/-Trp/-Leu/-His 25块、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 25块。同时进行阳性对照实验及文库滴定。16 d后将大于3 mm的酵母集落, 在铺有 X- $\alpha$ -gal的QDO培养基上检查 $\alpha$ -gal活性, 在QDO培养基上生长且出现蓝色菌落的视为阳性集落。

**1.2.4 阳性质粒的克隆和分析** 挑取阳性集落按照试剂盒提供的操作指南Lyticase法提取酵母质粒。

### ■应用要点

通过深入的提示MHBst与其相关蛋白的相互作用, 为今后更加广泛深入地研究新基因的生物學功能打下基础。以期得到一些与HBV感染性疾病相关的基因, 从而为进一步理解HBV感染致病机制并且指导临床治疗、预防措施。

### ■名词解释

酵母双杂交(yeast two hybrid)系统是近年来新发展起来的一种分析真核细胞中蛋白/蛋白相互作用的有效的基因分析方法, 他的产生为研究蛋白在体内生理情况下的相互作用提供了一种新的遗传学方法, 酵母双杂交系统通过将两个推定有相互作用的蛋白X和Y分别融合到一酵母转录激活因子的BD和AD上, X与Y的相互作用重构了激活因子, 从而导致下游报告基因的转录, 产生容易探测到的表型。

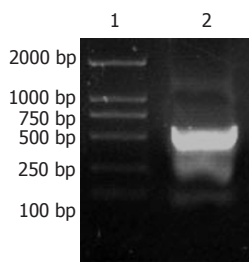


图1 MHBst PCR产物扩增结果. 1: DL 2000 DNA标准; 2: MHBst PCR产物.

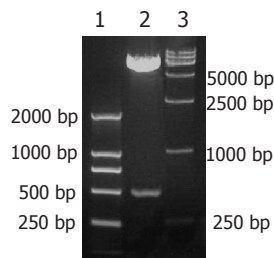


图2 pGBKT7-MHBst酶切鉴定结果. 1: DL 2000 DNA标准; 2: pGBKT7-MHBst酶切产物(*EcoRI*/*BamHI*); 3: DL 15000 DNA标准.

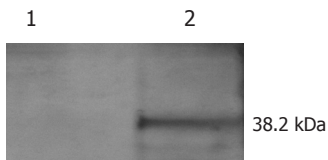


图3 酵母(AH109)蛋白提取免疫印迹分析结果. 1: 空酵母细胞对照组; 2: 转化了pGBKT7-MHBst的酵母细胞组.

提取的质粒以复杂冰冻高效感受态方法转化大肠杆菌, 于含有氨苄青霉素的SOB平板培养, 所获得的菌落酶切鉴定后测序. 阳性克隆DNA测序后, 提交GenBank, 进行生物信息学分析, 并将所获新的基因存入GenBank数据库.

## 2 结果

**2.1 MHBst酵母表达载体的鉴定** 利用自行设计的引物成功扩增出MHBst基因(图1), 连接pGEM-T载体后*EcoRI*/*BamHI*双酶切鉴定, 与预期片段符合, 回收酶切产物连接到用相同酶所切的pGBKT7载体中, 再次酶切鉴定结果正确(图2).

**2.2 MHBst基因在酵母细胞中的表达** 提取转化了pGBKT7-MHBst质粒的酵母细胞(AH109)蛋白质, 进行SDS-PAGE和Western免疫印迹分析. 结果显示对照无表达而转化了pGBKT7-MHBst的Western印迹分析可见明显目的条带且无杂带(图3).

**2.3 部分筛选克隆*Bgl*II酶切鉴定结果** pACT2内含有两个*Bgl*II酶切位点, 分别位于多克隆位点两侧, 使用该酶消化将释放出插入的白细胞文库片段(图4).

**2.4 cDNA测序与同源性分析初步结果** cDNA测序与同源性分析初步结果配合后筛选出在4缺

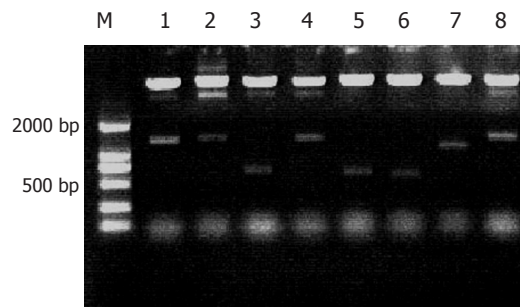


图4 几种不同的克隆*Bgl*II酶切鉴定. M: DL 2000 DNA标准; 1-8: 不同克隆酶切鉴定结果.

表1 与MHBst相互作用的白细胞蛋白分析结果

序号	同源基因	GenBank号	相同克隆数	同源性
1	脂多糖结合蛋白( <i>LBP</i> )	NM_004139	1	100%
2	CCR4-NOT转录复合体亚基10( <i>CNOT10</i> )	NM_015442.1	1	95%
3	ADP核糖基因子1	BC010415	2	100%
4	RAB6相互作用蛋白1( <i>RAB6IP1</i> )	NM_015213.2	1	100%
5	醛缩酶B( <i>ALDOB</i> )	X02747	1	100%
6	补体成分3( <i>C3</i> )	NM_000064	1	99%
7	丙酮酸脱氢酶( <i>PDH</i> )	AF334710	1	99%

(SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade)培养基与在铺有X- $\alpha$ -gal的4缺培养基上均能生长并变成蓝色的阳性菌落8个克隆并测序, 与GenBank数据库进行初步比较, 8个克隆与已知基因的部分序列高度同源(95%-100%)(表1).

## 3 讨论

酵母双杂交系统是近年来新发展起来的一种分析真核细胞蛋白-蛋白相互作用的一种有效的基因分析方法, 他的产生为研究蛋白在体内生理情况下相互作用提供了遗传学方法. 我们选用Clontech公司的Matchmaker酵母双杂交系统-3, 单倍体细胞株AH109带有4种报告基因分别为*HIS3*(组氨酸), *ADE2*(腺苷), *MEL1*( $\alpha$ -半乳糖苷酶), 加上两种载体中分别带有的*TRP1*(色氨酸)和*LEU2*(亮氨酸), 使得筛选后阳性菌落能在缺乏上述4种氨基酸营养的培养板上生长. 由于*MEL1*基因表达的 $\alpha$ -gal为分泌型蛋白, 可以在固相培养基中直接与X- $\alpha$ -gal底物相互作用, 显示为蓝色, 相对于检测 $\beta$ -gal来说操作得到了极大的简化. 该系统由于增加了报告基因的种类, 使筛选结果阳性率达到95%<sup>[6-7]</sup>. 我们应用酵母双杂交技术筛选MHBst, 从病毒蛋白-宿主蛋白相互作用的角度, 探索HBV感染的发病机制.

在所筛选到的蛋白中, 我们感兴趣的是脂

多糖(LPS)结合蛋白(LBP), 他是一种糖蛋白, 存在于正常人和动物血清中, 由肝细胞合成, 相对分子质量为60 kDa, 由456个氨基酸组成. LBP与LPS的脂质A具有高度亲和性, 能识别并结合LPS, 形成LPS/LBP复合物, 从而发挥病理、生理作用: (1)介导炎症反应. 一方面通过膜上LPS/LBP复合物受体膜结合CD14(mCD14), 激活单核巨噬细胞和中性粒细胞等, 使其产生TNF, IL-1, IL-6等炎性介质, 其中TNF最为重要. TNF是致机体产生炎症反应和休克的重要因子, LBP能明显增强LPS对TNF的诱生作用, 增加TNF mRNA转录的速度, 使TNF浓度从40 U/mL迅速上升到10000 U/mL. LBP本身并不能诱导TNF mRNA的转录和TNF的产生, 但缺少LBP的结合, LPS就不能明显地刺激TNF的产生. LPS-LBP与mCD14的结合能促使单核/巨噬细胞激活并释放多种细胞因子, 研究表明, 慢性肝炎患者血清LBP含量高于肝硬化患者, 说明LBP在早期肝脏损害中起关键作用<sup>[8-9]</sup>. 另一方面, 通过可溶性CD14(sCD14)激活、损伤血管内皮细胞, 促进炎性因子向血管外渗透, 促进单核细胞等与血管内皮细胞黏附并进入组织, 加重炎症反应; 进入细胞间质的LBP, 还可刺激巨噬细胞、上皮细胞和平滑肌细胞, 增强其对LPS的反应性. (2)缓解炎症反应. LBP可通过调理作用, 促进单核细胞等吞噬被调理的LPS或细菌, 及时清除进入体内的LPS和革兰阴性菌. LBP还可催化LPS与高密度脂蛋白(HDL)结合, 而HDL则能够结合LPS, 并中和LPS的生物学活性. 但LBP的生理功能是以传递LPS、介导细胞反应为主, 即LBP介导炎症反应的活性较缓解炎症反应的活性强<sup>[10]</sup>. 我们发现MHBst可以与LBP结合, 提示了其参与了肝细胞炎症的发

生、发展过程, 从而丰富了对HBV表面抗原功能的理解.

通过以上结果提供的线索, 我们可以进行更深入的研究, 进一步弄清各种蛋白对MHBst生物学功能的影响其确切的作用, 为寻找阻断HBV感染及HCC发生的有效方法开辟新道路. 当然, 这些结合蛋白的发现只是研究病毒蛋白功能的一个起点, 在极其复杂的体内环境中, 需要更多的实验证据来揭示这种结合的生物学意义.

#### 4 参考文献

- 1 Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004; 350: 1118-1129
- 2 刘妍, 成军, 张跃新, 段惠娟, 牟劲松, 韩萍, 李克, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 截短型HBsAg中蛋白反式激活基因的克隆. *中华传染病杂志* 2002; 20: 218-221
- 3 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. HCV核心蛋白与截短型HBV表面抗原中蛋白协同反式激活功能的研究. *中华肝脏病杂志* 2002; 10: 354-357
- 4 董菁, 李进, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 洪源, 李莉. 乙型肝炎病毒基因组准种与变异特点的研究. *解放军医学杂志* 2002; 27: 116-118
- 5 董菁, 成军, 王勤环, 王刚, 施双双, 刘妍, 夏小兵, 斯崇文. 外周血中乙型肝炎病毒截短型囊膜蛋白基因的克隆化与序列分析. *中华肝脏病杂志* 2001; 9: 163-165
- 6 Wang XZ, Jiang XR, Chen XC, Chen ZX, Li D, Lin JY, Tao QM. Seek protein which can interact with hepatitis B virus X protein from human liver cDNA library by yeast two-hybrid system. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 95-98
- 7 Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002; 185: 471-486
- 8 赵虎, 周庭银. 脂多糖结合蛋白及其拮抗剂的研究进展. *国外医学预防、诊断、治疗用生物制品分册* 1999; 22: 215-218
- 9 尹彪, 于敏, 曾争, 田庚善. 病毒性肝炎患者血清脂多糖结合蛋白检测及其意义. *中华实验和临床病毒学杂志* 2001; 12: 226-227
- 10 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

#### ■同行评价

本文研究首次使用白细胞文库进行MHBst的酵母双杂交筛选, 设计思路新颖, 实验方法简单可靠.

电编 李琪 编辑 潘伯荣



## 中药调肝理脾方对大鼠乙醇性肝病肝纤维化的影响

徐光福, 褚月虎, 王晓阳, 田德禄, 王新月, 李澎涛, 杨晋翔, 姜良铎

### ■背景资料

乙醇性肝病最重要的病理形态学变化是由轻到重的纤维化, 而一般饮酒者发生大面积肝细胞坏死的可能性和几率并不高, 这种纤维化发生是围绕肝窦, 肝窦毛细血管化和窦周纤维化是乙醇性肝病基础性改变, 其成分如何改变, 受何种因素影响就成为重要的问题。

徐光福, 褚月虎, 王晓阳, 北京中医药大学附属东直门医院感染疾病科 北京市 100700

田德禄, 王新月, 杨晋翔, 姜良铎, 北京中医药大学附属东直门医院消化内科 北京市 100700

李澎涛, 北京中医药大学基础医学院, 北京市 100029

徐光福, 博士, 副主任医师, 副教授, 主要从事中医药治疗慢性肝病、肝纤维化和肝硬化的临床和基础研究。

通讯作者: 徐光福, 100700, 北京市东城区海运仓3号, 北京中医药大学附属东直门医院感染疾病科. guangfuxu@hotmail.com

电话: 010-84013169

收稿日期: 2006-04-29 接受日期: 2006-06-05

### Effect of *Tiaogan lipi* decoction on alcoholic liver disease in rats

Guang-Fu Xu, Yue-Hu Chu, Xiao-Yang Wang, De-Lu Tian, Xin-Yue Wang, Peng-Tao Li, Jin-Xiang Yang, Liang-Duo Jiang

Guang-Fu Xu, Yue-Hu Chu, Xiao-Yang Wang, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Dongzhimen Hospital of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China

De-Lu Tian, Xin-Yue Wang, Jin-Xiang Yang, Liang-Duo Jiang, Department of Digestive Diseases, the First Affiliated Dongzhimen Hospital of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China

Peng-Tao Li, College of Basic Medicine, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Correspondence to: Guang-Fu Xu, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Dongzhimen Hospital of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China. guangfuxu@hotmail.com

Received: 2006-04-29 Accepted: 2006-06-05

### Abstract

**AIM:** To investigate the effects of *Tiangan Lipi* decoction (TLD) and *Dongbao Gantai* tablets (DGT) on the alcoholic liver diseases in rats.

**METHODS:** The male SD rats in model group were decollated and the livers were harvested after being fed with a mixture of alcohol for 63 d, and the others were randomly divided into natural recovery (NR) group (11 wk), TLD treatment group and DGT treatment group. After lavage treatment for 10 d, all the rats were executed and livers were harvested for observation of pathological changes of hepatocytes, hepatic stellate cells, sinusoidal endothelial cells, and

peri-sinus, respectively, under light and electron microscope, and three kinds of extracellular matrix (ECM) generation were also detected by immunohistochemistry.

**RESULTS:** The hepatocytes were tumid and turbid, with fatty denaturalization, and the hyperplasia of stromal cells appeared in model rats. Wire netting around hepatocytes and the incrassation of basilar membrane of central vein were clearly observed by Masson staining. The pathological changes, such as fibrosis, in NR group alleviated to some extent, and the changes recovered the most in TLD group. The incrassation of basilar membrane of sinus, with a great amount of fibril around, were found in model rats by electron microscopy. Microvilli of hepatocytes disappeared or fell down in large numbers, but changes of microstructures were markedly mitigated in DGT and TLD group in comparison with those in NR group. Collagen I and Laminin in TLD group had a better recovery than those in DGT and NRG group, while the recovery of collagen IV was the best in DGT group.

**CONCLUSION:** TLD is superior to DGT on the reversion of pathologically accumulated collagen I and Laminin, while DGT is superior to TLD on promoting the metabolism of accumulated collagen IV.

**Key Words:** Alcohol liver disease; Capillarization; Peri-sinusoid fibrosis; *Tiaogan Lipi* decoction; *Dongbao Gantai* tablets

Xu GF, Chu YH, Wang XY, Tian DL, Wang XU, Li PT, Yang JX, Jiang LD. Effect of *Tiaogan Lipi* decoction on alcoholic liver disease in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(24):2386-2394

### 摘要

**目的:** 研讨中药调肝理脾方和东宝肝泰片对乙醇性肝病肝纤维化的治疗效果。

**方法:** ♂ SD大鼠经过9 wk乙醇混合物灌胃后, 模型组被处死, 取得肝脏, 其他动物随机分成

自然恢复组(11 wk)、东宝肝泰片组和调肝理脾方组, 给予连续10 d的灌胃治疗, 然后处死并取得肝脏, 采用光镜、电镜观察肝细胞、肝星状细胞、肝窦内皮细胞、肝窦和窦周病理变化, 并以免疫组化方法观察3种细胞外基质分子变化。

**结果:** 模型组动物肝细胞混浊肿胀, 脂肪变性, 间质细胞增生, 细胞核深染, Masson染色并可见肝细胞周围铁丝网样纤维化和中央静脉基底膜增厚; 自然恢复组肝细胞病变有所好转, 纤维化也有好转, 调肝理脾方组好转最明显。电镜下显示, 模型组肝窦基底膜增厚, 窦周胶原原纤维大量增生, 肝细胞微绒毛大量减少、倒伏, 自然恢复组无明显好转, 调肝理脾方和东宝肝泰片片组有好转。I型胶原和层黏蛋白恢复结果以调肝理脾方组最好, IV型胶原恢复结果以东宝肝泰片组最好。

**结论:** 调肝理脾方对病理性堆积的I型胶原和层黏蛋白代谢有明显促进作用, 效果强于东宝肝泰片, 而且也能促进过多的IV型胶原恢复正常, 而东宝肝泰片在促进堆积的IV型胶原恢复方面强于调肝理脾方。

**关键词:** 乙醇性肝病; 肝窦毛细血管化; 窦周纤维化; 调肝理脾方; 东宝肝泰片

徐光福, 褚月虎, 王晓阳, 田德禄, 王新月, 李澎涛, 杨晋翔, 姜良铎. 中药调肝理脾方对大鼠乙醇性肝病肝纤维化的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(24):2386-2394  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2386.asp>

## 0 引言

乙醇性肝病机制复杂, 所诱发的肝纤维化轻重不等, 广泛存在于饮酒人群。一项前瞻性研究发现调肝理脾方能保护肝细胞, 并在一定程度上逆转肝纤维化。我们将更深入观察其对乙醇性肝病的效果。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** SD大鼠, ♂, 质量 $150 \pm 5$  g, 购自北京维通利华公司; 玉米油购自北京嘉乐福商场; 黄原胶和淀粉购自北京化学试剂公司; 食用乙醇由北京酿酒总公司友好馈赠; 羧基铁和吡啶购自美国Sigma公司; I, IV型胶原和层黏蛋白的多克隆一抗购自美国抗体试剂诊断公司; 二步法试剂盒PV-6001 Kits, ZLI-9030和ZLI9001均购自北京中山公司。调肝理脾方购自东直门医院中药房(由柴胡、益母草、炙鳖甲、丹参组成), 经过水煎浓缩

制成含生药为1220 g/L, 东宝肝泰片是复方药片, 主要成分是S-腺苷蛋氨酸等, 购自东直门医院药房, 由吉林省通化市东宝肝泰片片制药公司生产。  
**1.2 方法** 动物分为正常组6只, 模型组12只, 自然恢复组12只, 东宝肝泰片组15只, 调肝理脾方组15只。通过乙醇混合物灌胃制造模型, 剂量为乙醇每日5 g/kg, 吡啶30 mg/kg, 玉米油3 mL/kg, 羧基铁35 mg/kg, 4 wk后减为15 mg/kg, 少量黄原胶和糊精, 每周灌5 d, 休2 d, 每天1次, 直到第9周结束, 正常饲料, 自由进食、水。调肝理脾方使用剂量为10 mL/kg, 约相当于体质量为60 kg成年人临床用量的10倍。东宝肝泰片制成150片/L的混悬液, 使用剂量为10 mL/kg, 剂量约相当于体质量为60 kg成年人临床用量的10倍, 均通过灌胃给予。治疗从第10周开始, 每日1次, 连续10 d。灌胃结束后所有动物被处死, 肝脏标本速冻或固定以作为电镜、光镜HE染色、Masson复合染色及分子生物学和生化学检测之用。每个肝组织切片、脱蜡、I, IV型胶原和层黏蛋白免疫组化染色前采用胰蛋白酶消化处理恢复抗原, 3种细胞外间质分子的电子计算机图像半定量采集和分析在美国3Y公司生产的图像分析系统MIS2000上进行。

**统计学处理** 所有数据以均数±标准差表示, 统计软件采用SPSS 10.0, 单向ANOVA用以决定各组间差异,  $P < 0.05$ 被认为具有显著性差异。

## 2 结果

模型动物到第4周出现严重的综合症如精神萎靡、竖毛、消化不良和腹泻、体质量减轻、脱水甚至死亡, 从第5周羧基铁减量后大部分动物得以存活。自然恢复组动物在造模停止后有所恢复, 精神更活跃, 对周围有兴趣, 似有正常食欲, 体质量快速恢复, 毛发整齐、动作敏捷。东宝肝泰片组和调肝理脾方组在上述方面反较自然恢复组稍差, 可能与每天灌胃操作的伤害刺激有关。

**2.1 HE及HE-Masson复合染色** 模型动物肝脏弥漫性脂肪变性, 肝窦狭窄, 肝细胞肿胀或皱缩, 胞质混浊或有空泡, 间质细胞染色质深染、增厚, 核变成卵圆形, 边界清楚。上述改变在自然恢复组没有大的改善, 而东宝肝泰片组肝窦较宽, 肝细胞轮廓和胞质内容更清晰, 间质细胞核较薄、致密且不规则, 调肝理脾方组肝脏变化与东宝肝泰片组类似, 但整个肝脏组织切片看

### ■ 研发前沿

虽然机制研究更加复杂深入, 但形态改变的基础仍然是围绕基质金属蛋白酶及其抑制物系统来开展, 而形态改变是真正影响患者预后的决定因素。对临床来说如何确定可靠的药物、明确药物作用机制最有价值。



### ■相关报道

目前国内外相关报道很多. 西医多使用单方或化合物观察, 效果、机理均比较确实可靠. 中医偏重于复方, 不论从中医理论探索、病因病机分析、理法方药的组成思路还是实际临床效果方面来看, 都需要更多更踏实的工作.

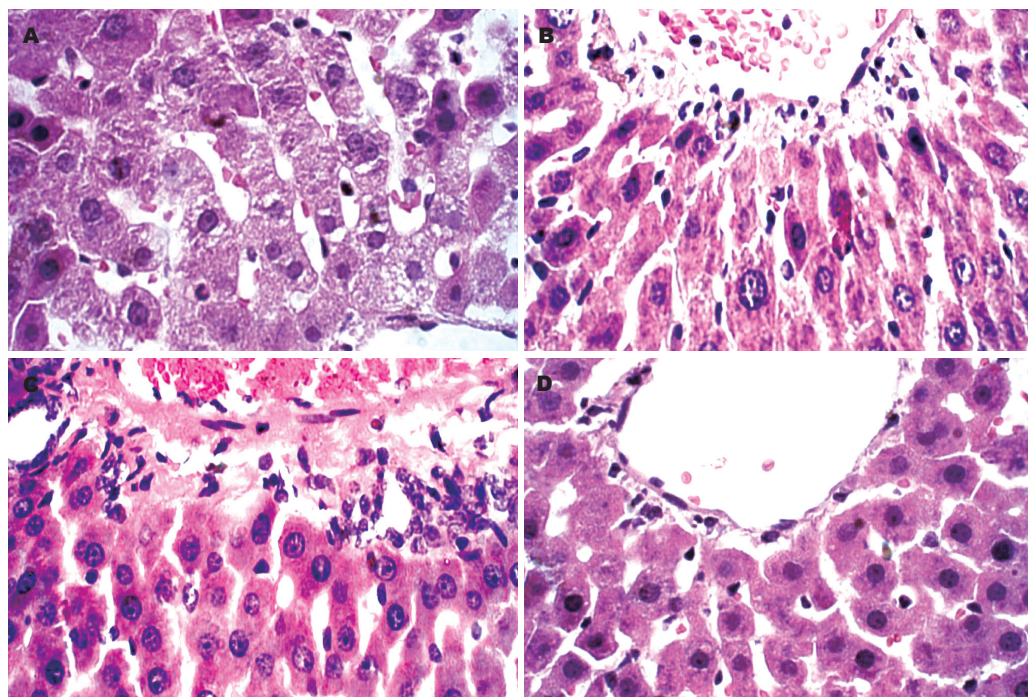


图1 各组大鼠肝脏切片HE染色. A: 模型组; B: 自然恢复组; C: 东宝肝泰片组; D: 调肝理脾方组.

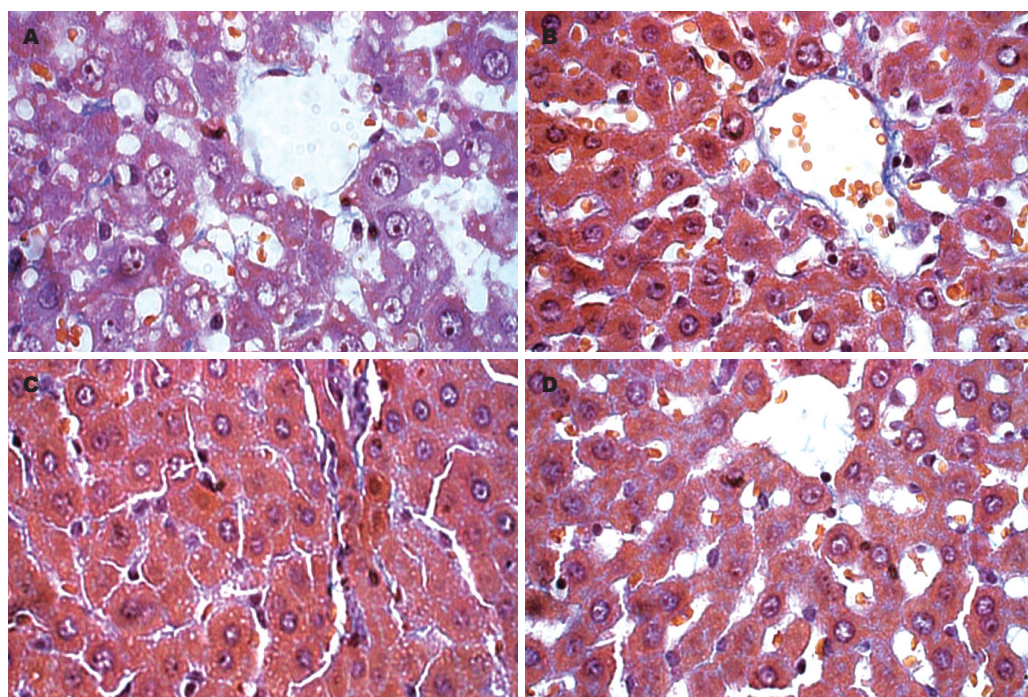


图2 各组大鼠肝脏切片Masson染色. A: 模型组; B: 自然恢复组; C: 东宝肝泰片组; D: 调肝理脾方组.

起来似更加自然, 肝细胞看起来更加丰满而且有活力(图1). HE-Masson复合染色: 除在HE染色看到的以外, 模型动物弥漫性脂肪变性, 肝细胞周围铁丝网样染色阳性, 中央静脉基底膜增厚, 自然恢复组和东宝肝泰片组与此类似, 但调肝理脾方组似乎较轻(图2).

2.2 电镜 模型动物肝细胞可见核皱缩, 线粒体肿

胀、嵴丢失甚至无嵴, 粗面内质网排列紊乱, 铁颗粒沉积, Mallory小体等. 肝窦内皮细胞轮廓变厚, 细胞器增多, 筛孔减少, 核增厚, 细胞周围有大量胶原原纤维. 星状细胞活化, 外形变成清晰深染的卵圆形, 周围有大量胶原原纤维. 肝窦基底膜清楚形成, 外周有大量胶原原纤维围绕. 在自然恢复组和东宝肝泰片片组肝窦周围胶原原



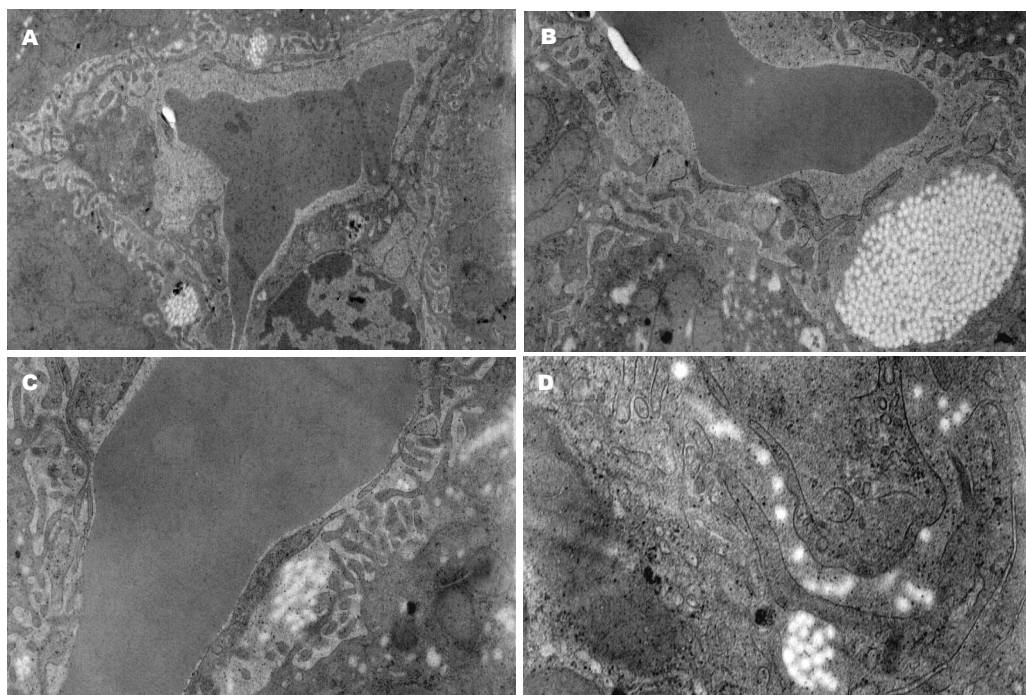


图 3 各组大鼠肝脏切片电镜. A: 模型组; B: 自然恢复组; C: 东宝肝泰片组; D: 调肝理脾方组.

#### ■应用要点

其实中医临床效果好的在动物不一定效果好, 反之亦然. 调肝理脾方优势在于价格便宜、效果较全面, 对证的话可以进一步使用、观察.

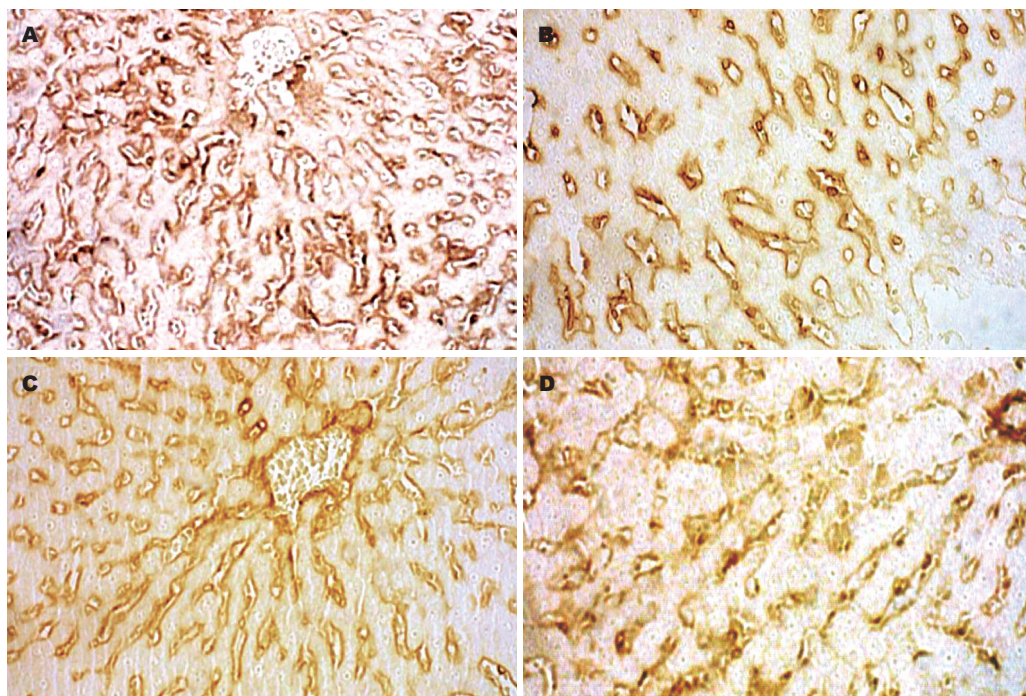


图 4 各组大鼠肝脏切片 I 型胶原染色. A: 模型组; B: 自然恢复组; C: 东宝肝泰片组; D: 调肝理脾方组.

纤维已经减少并接近正常, 但其他改善不大. 调肝理脾方组肝窦基底膜改善, 胶原原纤维也见明显减少, 肝细胞、星状细胞和内皮细胞病理形态似有改善但难以描述(图3).

**2.3 I、IV型胶原和层黏蛋白染色** I型: 模型动物肝窦和门管系统基底膜周围可见粗厚深染, 中央静脉基底膜不存在. 自然恢复组和东宝肝

泰片组表达较少, 调肝理脾方组表达最接近正常组(图4). IV型: 模型动物阳性染色较正常动物少, 自然恢复组和东宝肝泰片组有一定恢复, 调肝理脾方组与自然恢复组类似, 东宝肝泰片组最接近正常组(图5). 层黏蛋白: 模型动物显示致密和深染的阳性染色, 主要位于肝窦部位. 自然恢复组几乎无恢复, 东宝肝泰片组有所恢复, 但



### ■名词解释

1 调肝理脾的含义比较复杂,中医认为“肝藏血,体阴而用阳,主疏泄,开窍于目,其华在爪,……为黑极之本”等,是对活体功能的观察总结,理论层面肝血肝气皆“可调”.肝脾的关系是“见肝之病,知肝传脾,必先实脾”,肝病肯定影响脾胃,通过调理肝血肝气来调理脾胃,而不采取直接“健脾、醒脾、益气”等方法,是理论创新,体现在中药选用、份量斟酌和君臣佐使的安排上.

2 肝窦毛细血管化:肝血窦转变为连续毛细血管,发生于各种肝损伤过程中,时间上比较早,比较持续存在,影响肝细胞功能最重要、最原始、最基础的形态学改变,肝硬化病人临床好转的基础可能与此逆转有关,该过程牵涉到的最关键的三种纤维成分是:I型胶原、层黏蛋白和IV型胶原.

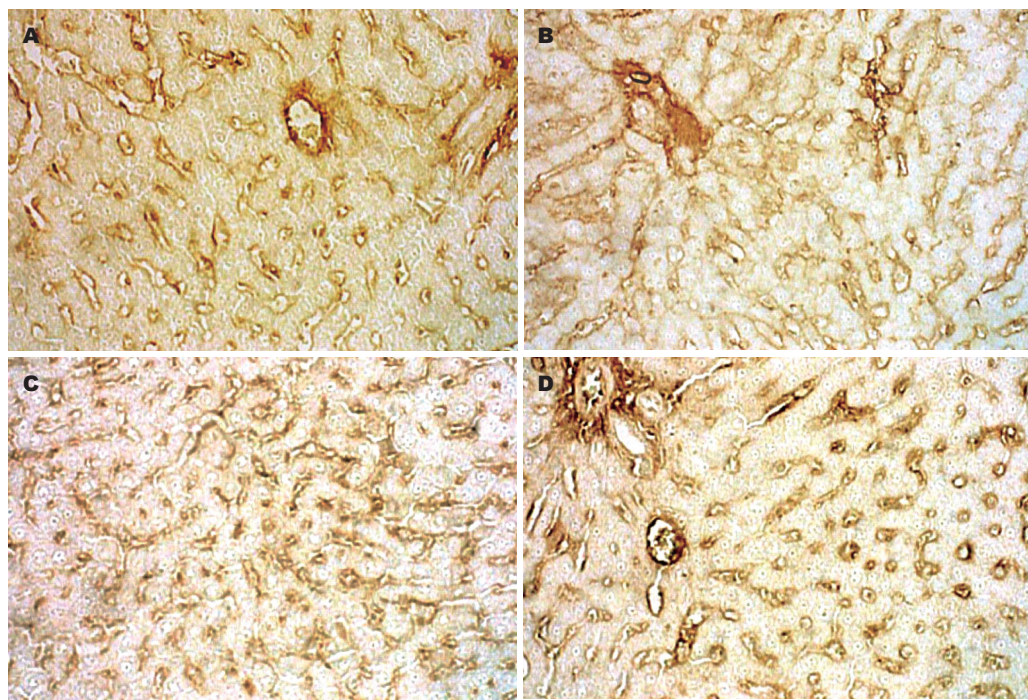


图5 各组大鼠肝脏切片IV型胶原染色. A: 模型组; B: 自然恢复组; C: 东宝肝泰片组; D: 调肝理脾方组.

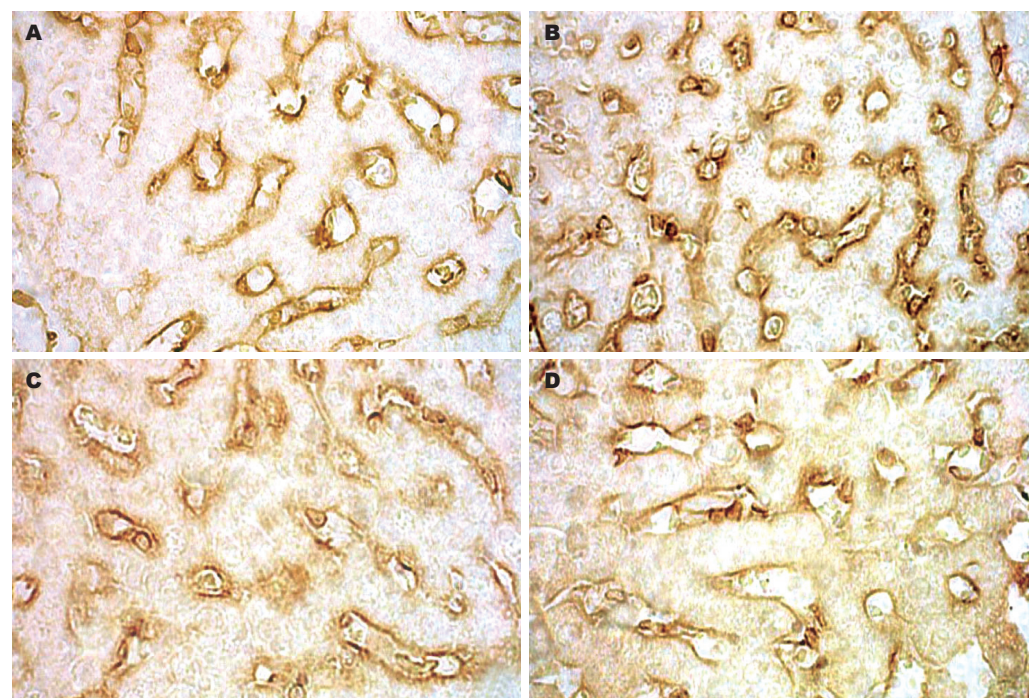


图6 各组大鼠肝脏切片层黏蛋白染色. A: 模型组; B: 自然恢复组; C: 东宝肝泰片组; D: 调肝理脾方组.

调肝理脾方组恢复最为显著(图6).各组I, IV型胶原和层黏蛋白免疫组化染色半定量及其比较结果见表1.

### 3 讨论

乙醇性肝病分乙醇性脂肪肝、乙醇性肝炎、乙醇性肝纤维化和乙醇性肝硬化4种类型,其共同的损伤机制与脂质过氧化<sup>[1]</sup>、内毒素<sup>[2-5]</sup>、乙醛及其所

诱发的免疫反应损伤<sup>[6-8]</sup>、性别状况<sup>[9]</sup>、铁离子沉积<sup>[10-17]</sup>以及自由基产生过多<sup>[18]</sup>、葡萄糖代谢紊乱、DNA损伤等<sup>[19]</sup>有关.对乙醇性肝纤维化来说,一是对其分布情况不清,二没有特殊针对性治疗.我们实验探讨的模型<sup>[20]</sup>完整再现了肝损伤到轻度肝纤维化的病理变化,其价值在于可能比较符合大量一般饮酒者的肝脏病理变化.国内外学者曾设计各种方法和药物治疗乙醇性



表 1 大鼠肝脏 I, IV 型胶原和层黏蛋白半定量结果

分组	n	I 型胶原	IV 型胶原	层黏蛋白
正常组	6	0.2874 ± 0.0224	0.3421 ± 0.0217	0.2263 ± 0.0010
模型组	8	0.4262 ± 0.0992	0.3202 ± 0.0039	0.3523 ± 0.0108
自然恢复组	8	0.3734 ± 0.1239 <sup>a</sup>	0.3249 ± 0.0119 <sup>a</sup>	0.3549 ± 0.0120
东宝肝泰片组	13	0.3691 ± 0.0098 <sup>a</sup>	0.3334 ± 0.0023 <sup>ac</sup>	0.3139 ± 0.0068 <sup>ac</sup>
调肝理脾方组	12	0.3379 ± 0.0022 <sup>ace</sup>	0.3258 ± 0.0031 <sup>ac</sup>	0.2807 ± 0.0016 <sup>ace</sup>

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs 模型组; <sup>c</sup>*P*<0.05 vs 自然恢复组; <sup>e</sup>*P*<0.05 vs 东宝肝泰片组。

肝病, 经复习文献发现S-腺苷甲硫氨酸、己酮可可碱、metadoxin、多不饱和卵磷脂、细胞色素P4502E1同工酶抑制剂可能较有价值<sup>[21]</sup>, 糖皮质激素和同化激素有副作用, 水飞蓟素对轻型病症的作用正在观察, 对肝硬化无效。Lee *et al*<sup>[22]</sup>发现乙醇性肝炎时肝脏蛋氨酸和谷胱甘肽代谢基因表达不正常, 可导致蛋氨酸、S-腺苷甲硫氨酸、半胱氨酸和谷胱甘肽代谢异常, 给患者补充这些物质有治疗意义。Rambaldi *et al*<sup>[23-24]</sup>报道系统回顾资料未能显示雄性类固醇对乙醇性肝病患者重要的预后和结局有显著性益处。Tome *et al*<sup>[25]</sup>报道营养支持、糖皮质激素、抗感染药物、抗氧化剂、抗纤维化药物如秋水仙碱、丙基硫脲嘧啶和抗氧化剂等均未能一致性地证明改善乙醇性肝损害进程。Lieber *et al*<sup>[26-28]</sup>总结大量S-腺苷甲硫氨酸在狒狒可对抗乙醇肝硬化, 在人类可以降低乙醇性肝硬化患者的死亡率, 并对抗由乙醇、酮体、和脂肪酸诱导细胞色素P4502E1(CYP2E1)所导致的氧化应激反应和乙醇性和非乙醇性脂肪型肝炎。在啮齿类和非人灵长类乙醇性肝病早期即使饮食合适, 已经有显著的S-腺苷甲硫氨酸缺乏, 补充S-腺苷甲硫氨酸有助于纠正肝脏缺乏和相关损害, 因此乙醇性肝病早期补充S-腺苷甲硫氨酸对肝脏线粒体损伤有益, 这可以在狒狒、其他模型甚至人类实验得到证明。己酮可可碱是TNF- $\alpha$ 的抑制因子, 可降低乙醇性肝炎患者死亡率。多不饱和磷脂酰胆碱(PPC)是一个从大豆中提取的抗氧化卵磷脂复合物, 其中50%是高级生物可利用的dilinoleoylphosphatidylcholine, 可恢复受损的细胞磷脂膜并恢复其酶活性, 包括磷脂酰乙醇胺转甲基酶。在狒狒PPC可以激活胶原酶活性并对抗脂质过氧化, 对乙醇性肝炎患者也有益, 对严重饮酒者可以对抗纤维化, 降低合并丙型肝炎患者的ALT。抗氧化剂水飞蓟素也可以对抗狒狒和部分患者的乙醇性肝硬化, 维生素E也有类似效果, 皮质类固醇和秋水仙碱治疗结果不一, 用长链

脂肪酸酯替代中链在实验中和临床上均可以对抗脂肪肝。McClain *et al*<sup>[29]</sup>报道外源性S-腺苷甲硫氨酸可以减轻肝损害和降低血清TNF- $\alpha$ 水平, 且呈现剂量依赖性。Ji *et al*<sup>[19]</sup>报道乙醇可以通过半胱氨酸诱发的内质网氧化应激机制导致小鼠肝细胞凋亡和脂肪合成基因表达, 甜菜碱则可以纠正之, 故可以防治乙醇性肝病。Farinati *et al*<sup>[30]</sup>报道锌制剂可以防治Wilson病患者血清谷胱甘肽和半胱氨酸的降低以及氧化型谷胱甘肽升高, 抑制脂质过氧化, 提高谷胱甘肽的可利用性, 因而对乙醇性肝病可能有帮助。Bettini *et al*<sup>[31]</sup>报道, 熊去氧胆酸450 mg/d治疗6 mo可使乙醇性肝病患者血清酶显著下降, 加上水飞蓟素400 mg/d效果更好。Yan *et al*<sup>[32]</sup>报道, fenofibrate可以显著降低乙醇性脂肪肝大鼠肝脏脂肪含量, 同时改善病理, 但对药物诱发者无效。Enomoto *et al*<sup>[33]</sup>报道, 镇静安眠药thalidomide可以通过抑制库普弗细胞产生TNF- $\alpha$ 而保护肝细胞防止乙醇损伤。Lieber *et al*<sup>[34]</sup>报道在狒狒水飞蓟素可以阻碍乙醇诱发的肝纤维化。Lirussi *et al*<sup>[35]</sup>报道水飞蓟素 $\beta$ 环糊精可以显著改善胰岛素活性并对抗脂质过氧化。Purohit *et al*<sup>[36]</sup>报道谷胱甘肽前体S-adenosyl-methionine(SAMe)可以修复线粒体谷胱甘肽转运系统, 削弱炎症刺激因子的毒性作用并促进DNA甲基化。Yi *et al*<sup>[37]</sup>报道, 环氧合酶参与了乙醇诱发的肝损伤, 其抑制剂celecoxib可以通过降低血栓素B2水平来减轻肝损伤。Rambaldi *et al*<sup>[38]</sup>报道, 没有证据表明对乙醇性肝病患者使用丙基硫脲嘧啶有益。Enomoto *et al*<sup>[39]</sup>发现过氧化物酶体受体激动剂 $\gamma$ 拮抗剂pioglitazone可以阻断大鼠肝脏巨噬细胞在饮用乙醇后对增加的LPS的反应, 从而保护肝脏免受损伤。Lambert *et al*<sup>[40]</sup>报道,  $\delta$  129 SvPCJ小鼠用硫酸锌(锌离子5 mg/kg)预先3次灌胃, 然后口服乙醇1次(6 g/kg), 血清中乙醇浓度上升, ALT上升, 肝脏细胞发生脂肪变性和坏死, ELISA检测发现, TNF- $\alpha$ 水平上升, 小肠损害非常显著, 通透性增大, 但在锌制



剂治疗后动物肝脏病理变化和TNF- $\alpha$ 升高被显著抑制, 小肠通透性显著下降, 提示锌制剂有潜在治疗价值. Aleynik *et al*<sup>[41]</sup>报道SD大鼠饲喂乙醇8 wk可以导致S腺苷甲硫氨酸缺乏, 而多不饱和卵磷脂可以纠正之, 恢复谷胱甘肽含量, 从而预防乙醇引起的氧化应激. Lieber *et al*<sup>[42]</sup>报道, 412名患者肝脏穿刺结果显示多不饱和磷脂酰胆碱治疗2 a不影响乙醇性肝纤维化进程, 但对转氨酶和胆红素恢复有帮助. Oh *et al*<sup>[43]</sup>报道, 麦芽提取物有助于减轻慢性乙醇中毒综合征, 帮助恢复, 可以显著提高HDL-C, 对抗服用乙醇后LDL-C、肝脏ALT、三酰甘油和胆固醇升高趋势, 对慢性乙醇性肝病相关病变的预防和恢复有利, 这可能与所含GABA有关. Yang *et al*<sup>[44]</sup>报道, 丙酮酸乙酯溶解于含钙离子的林格氏平衡液后使用可以减少肝细胞碎屑样坏死和脂肪变性、降低ALT、脂质过氧化、NF- $\kappa$ B因子活化、TNF- $\alpha$  mRNA表达, 从而减轻急性乙醇中毒小鼠肝脏损害. Senthilkumar *et al*<sup>[45]</sup>报道, 氨基己酸可显著抑制脂质过氧化、升高肝脏和脑谷胱甘肽、谷胱甘肽氧化酶、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶水平, 血清维生素E和C水平也接近正常, 光镜下肝脏炎症细胞浸润和脂肪变性减轻. McKim *et al*<sup>[46]</sup>报道, 可可豆所含的类黄酮可以减轻乙醇所引起的ALT升高、严重的脂肪堆积、轻微感染、肝组织坏死和氧化应激造成的蛋白加合物上升、完全阻断乙醇引起的TNF- $\alpha$ 升高. Saygi *et al*<sup>[47]</sup>报道, 土木香根水提取物对乙醇性肝、肾和睾丸损伤有轻微治疗效果. Nanji *et al*<sup>[48]</sup>报道, 姜黄素能够抑制NF-KappaB依赖基因诱导, 预防实验性乙醇肝病. Yeh *et al*<sup>[49]</sup>报道, 当归可抑制慢性摄入乙醇小鼠肝匀浆中丙二醛的含量并保护肝细胞, 可能通过抑制氧自由基产生而诱发的脂质过氧化来实现. Ji *et al*<sup>[50]</sup>报道, 中药复方清肝活血汤可以改善厌食、恶心、呕吐和黄疸, 以及降低ALT, AST和甘油三酯, 降低GGT, 改善肝纤维化指标和细胞因子, 减轻肝脏脂质过氧化损害, 明显改善脂肪肝. 该方可以对抗脂质过氧化、稳定细胞膜、调节肝脏脂类代谢, 改善免疫功能, 抗肝纤维化和促进肝脏乙醇代谢.

乙醇性肝病病理机制复杂, 病理变化多样, 因此在治疗上作用于单一环节的药物可能不够理想. 国产复方东宝肝泰片根据现代医学对乙醇性肝病的研究结果设计组成, 含有多种成分, 如S腺苷甲硫氨酸, 长期临床应用证明, 其对乙

醇性肝病效果稳定可靠. 我们发现该药新的作用机制, 即他可以促进肝窦毛细血管化的恢复, 特别是对肝窦基底膜IV型胶原的代谢, 其正向的恢复作用, 且强于调肝理脾方, 但对病理性质的层黏蛋白和I型胶原堆积的恢复作用不及调肝理脾方.

中医学“肝”的概念, 复杂深刻而不完全等同于现代医学的肝脏. 如《内经》云: “肝藏血, 体阴而用阳, 喜条达而恶抑郁”, 即肝脏可以储藏血液, 按阴阳分类其本质属阴, 但其用则为阳, 而且说明情绪可以影响免疫, 进而影响肝脏病理. 在中医学层面上容易发生的病机有肝气郁结、肝血亏损、肝阳上亢或肝血瘀阻, 可表现为一系列症状和体征, 出现在下列疾病如高血压病、痛经、视物昏花、帕金森病、Wilson病、慢性肝炎、乙醇性肝病、肝纤维化和肝硬化等. 古代先贤说肝病治法最杂, 也印证肝病的机制复杂和难以治疗特点.

很久以前国人祖先就掌握了酿酒技术, 他们把酒作为一种食品饮用, 或作为药品以治疗某些病症, 同时也非常清楚乙醇滥用的弊病. 许多医学文献警告人们滥饮必然伤身. 北京中医药大学东直门医院田德禄教授在总结、提炼文献的基础上, 提出自己的观点, 将乙醇性肝病的中医诊断分为三个阶段: “伤酒”、“酒癖”和“臌胀”, 分别对应于急性乙醇中毒和/或乙醇性肝炎、乙醇性肝纤维化和肝硬化. 鉴于乙醇对人体的损伤机制复杂而广泛, 单纯的治疗方法和药物常难以得到理想效果, 田教授从中医理论高度树立“调肝理脾”思想, 重视药物对机体的全面调整, 他认为治疗“酒癖”或者“臌胀”的关键是调节肝的阴阳气血, 进而才能达到保证脾脏运化正常的作用.

调肝理脾方由醋柴胡、益母草、生黄芪等组成, 有疏肝解郁、理脾活血等功效. 柴胡, 为伞形科植物柴胡*Bupleurum chinenses*的根, 味苦、微辛, 性平, 具有解表退热、疏肝解郁、升举阳气的功效, 主治风热感冒、百日咳、肝郁肋痛、风疹、疮毒节肿等. 柴胡根含挥发油, 柴胡皂苷(saikosaponins, SS) a, c, d, s及多糖, 茎叶含黄酮类, 既往研究发现其具有对抗肝损伤、抗肝纤维化和直接抑制细胞外基质合成等作用. 益母草为唇形科植物益母草*Leonurus heterophyllus Sweet*的干燥地上部分, 益母草能活血调经、化瘀生新、利尿消肿, 主治月经不调、胎漏难产、行经腹痛及产后瘀阻等, 其主

要成分水苏碱和益母草碱, 据认为就是其有效成分。将益母草用于治疗肝纤维化是田德录教授多年来行之有效的独特宝贵经验, 其理论基础就在于中医认为任、冲、督一源三歧, 肝属冲脉, 任主胞胎, 益母草活血调经功效独特, 几成妇科不可或缺的药物, 与其擅入肝经、擅长调理肝血有密切关系, 田教授创新性地将其用于肝纤维化的治疗, 临床证明功效独特。黄芪是常用的补益类中药, 可补肝虚, 具有补气升阳、益卫固表等功效。据报道黄芪含有黄芪总黄酮、总皂甙、黄芪多糖等有效成分, 可以对抗脂质过氧化、保护肝细胞、抑制肝星状细胞增殖、抗肝纤维化和肝硬化等, 调肝理脾方早期的前瞻性研究提示该方有保护肝细胞和抗脂质过氧化作用, 可能对肝纤维化有逆转作用。我们研究发现该方可以促进肝窦基底膜病理性 I 型胶原和层黏蛋白分解, 也能促进 IV 型胶原含量恢复正常, 且表明复方条件下各个药物间可能存在协同作用, 其具体特点尚待后续报道。

总之, 对乙醇性肝病来说, 治疗方面单一药物往往不如合理的复方照顾周全, 但中医学的立法处方需要多年经验积累和深厚理论造诣和指导。调肝理脾方有自己的特点, 价格低廉, 对肝窦部位 IV 型胶原、层黏蛋白和 I 型胶原代谢有一定正向影响, 临床辩证合适, 可以考虑酌情使用, 以便进一步观察疗效, 并加以改进使之更好地为患者服务。

#### 4 参考文献

- Chen WH, Liu P, Xu GF, Lu X, Xiong WG, Li FH, Liu CH. Role of lipidperoxidation in liver fibrogenesis induced by dimethylnitrosamine in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001; 9: 645-648
- Murohisa G, Kobayashi Y, Kawasaki T, Nakamura S, Nakamura H. Involvement of platelet-activating factor in hepatic apoptosis and necrosis in chronic ethanol-fed rats given endotoxin. *Liver* 2002; 22: 394-403
- Tamai H, Horie Y, Kato S, Yokoyama H, Ishii H. Long-term ethanol feeding enhances susceptibility of the liver to orally administered lipopolysaccharides in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2002; 26: 75S-80S
- Keshavarzian A, Choudhary S, Holmes EW, Yong S, Banan A, Jakate S, Fields JZ. Preventing gut leakiness by oats supplementation ameliorates alcohol-induced liver damage in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299: 442-448
- Mathurin P, Deng QG, Keshavarzian A, Choudhary S, Holmes EW, Tsukamoto H. Exacerbation of alcoholic liver injury by enteral endotoxin in rats. *Hepatology* 2000; 32: 1008-1017
- Jeter JM, Kohlmann W, Gruber SB. Genetics of colorectal cancer. *Oncology (Williston Park)* 2006; 20: 269-276; discussion 285-286, 288-289
- Shimada S, Yamauchi M, Takamatsu M, Uetake S, Ohata M, Saito S. Experimental studies on the relationship between immune responses and liver damage induced by ethanol after immunization with homologous acetaldehyde adducts. *Alcohol Clin Exp Res* 2002; 26: 86S-90S
- Searashi Y, Yamauchi M, Sakamoto K, Ohata M, Asakura T, Ohkawa K. Acetaldehyde-induced growth retardation and micro-heterogeneity of the sugar chain in transferrin synthesized by HepG2 cells. *Alcohol Clin Exp Res* 2002; 26: 32S-37S
- Colantoni A, Emanuele MA, Kovacs EJ, Villa E, Van Thiel DH. Hepatic estrogen receptors and alcohol intake. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 193: 101-104
- Boireau A, Marechal PM, Meunier M, Dubedat P, Moussaoui S. The anti-oxidant ebselen antagonizes the release of the apoptogenic factor cytochrome c induced by Fe<sup>2+</sup>/citrate in rat liver mitochondria. *Neurosci Lett* 2000; 289: 95-98
- Karbownik M, Reiter RJ, Garcia JJ, Cabrera J, Burkhardt S, Osuna C, Lewinski A. Indole-3-propionic acid, a melatonin-related molecule, protects hepatic microsomal membranes from iron-induced oxidative damage: relevance to cancer reduction. *J Cell Biochem* 2001; 81: 507-513
- Schumann K. Safety aspects of iron in food. *Ann Nutr Metab* 2001; 45: 91-101
- Valerio LG Jr, Petersen DR. Characterization of hepatic iron overload following dietary administration of dicyclopentadienyl iron (Ferrocene) to mice: cellular, biochemical, and molecular aspects. *Exp Mol Pathol* 2000; 68: 1-12
- MacDonald GA, Bridle KR, Ward PJ, Walker NI, Houglum K, George DK, Smith JL, Powell LW, Crawford DH, Ramm GA. Lipid peroxidation in hepatic steatosis in humans is associated with hepatic fibrosis and occurs predominately in acinar zone 3. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 599-606
- Raynard B, Balian A, Fallik D, Capron F, Bedossa P, Chaput JC, Naveau S. Risk factors of fibrosis in alcohol-induced liver disease. *Hepatology* 2002; 35: 635-638
- De Feo TM, Fargion S, Duca L, Cesana BM, Boncinelli L, Lozza P, Cappellini MD, Fiorelli G. Non-transferrin-bound iron in alcohol abusers. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25: 1494-1499
- Tsukamoto H. Iron regulation of hepatic macrophage TNF $\alpha$  expression. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 309-313
- Kono H, Bradford BU, Rusyn I, Fujii H, Matsumoto Y, Yin M, Thurman RG. Development of an intragastric enteral model in the mouse: studies of alcohol-induced liver disease using knockout technology. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2000; 7: 395-400
- Ji C, Kaplowitz N. Betaine decreases hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice. *Gastroenterology* 2003; 124: 1488-1499
- Xu GF, Wang XY, Ge GL, Li PT, Jia X, Tian DL, Jiang LD, Yang JX. Dynamic changes of capillarization and peri-sinusoid fibrosis in alcoholic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 238-243
- Stickel F, Seitz HK, Hahn EG, Schuppan D.

- Alcoholic liver disease--established treatment and new therapeutic approaches. *Z Gastroenterol* 2003; 41: 333-342
- 22 Lee TD, Sadda MR, Mendler MH, Bottiglieri T, Kanel G, Mato JM, Lu SC. Abnormal hepatic methionine and glutathione metabolism in patients with alcoholic hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 2004; 28: 173-181
- 23 Rambaldi A, Iaquinto G, Gluud C. Anabolic-androgenic steroids for alcoholic liver disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; : CD003045
- 24 Rambaldi A, Iaquinto G, Gluud C. Anabolic-androgenic steroids for alcoholic liver disease: a Cochrane review. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1674-1681
- 25 Tome S, Lucey MR. Review article: current management of alcoholic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 707-714
- 26 Lieber CS. New concepts of the pathogenesis of alcoholic liver disease lead to novel treatments. *Curr Gastroenterol Rep* 2004; 6: 60-65
- 27 Lieber CS. S-Adenosyl-L-methionine and alcoholic liver disease in animal models: implications for early intervention in human beings. *Alcohol* 2002; 27: 173-177
- 28 Lieber CS. S-adenosyl-L-methionine: its role in the treatment of liver disorders. *Am J Clin Nutr* 2002 76: 1183S-1187S
- 29 McClain CJ, Hill DB, Song Z, Chawla R, Watson WH, Chen T, Barve S. S-Adenosylmethionine, cytokines, and alcoholic liver disease. *Alcohol* 2002; 27: 185-192
- 30 Farinati F, Cardin R, D'inca R, Naccarato R, Sturniolo GC. Zinc treatment prevents lipid peroxidation and increases glutathione availability in Wilson's disease. *J Lab Clin Med* 2003; 141: 372-377
- 31 Bettini R, Gorini M. Use of ursodeoxycholic acid combined with silymarin in the treatment of chronic ethyl-toxic hepatopathy. *Clin Ter* 2002; 153: 305-307
- 32 Yan M, Meng FL, Lu RJ, Jia XQ, Zhao XC. Therapy effects of fenofibrate on alcoholic fatty liver and drug-induced fatty liver in rats. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2003; 11: 86-89
- 33 Enomoto N, Takei Y, Hirose M, Ikejima K, Miwa H, Kitamura T, Sato N. Thalidomide prevents alcoholic liver injury in rats through suppression of Kupffer cell sensitization and TNF-alpha production. *Gastroenterology* 2002; 123: 291-300
- 34 Lieber CS, Leo MA, Cao Q, Ren C, DeCarli LM. Silymarin retards the progression of alcohol-induced hepatic fibrosis in baboons. *J Clin Gastroenterol* 2003; 37: 336-339
- 35 Lirussi F, Beccarello A, Zanette G, De Monte A, Donadon V, Velussi M, Crepaldi G. Silybin-beta-cyclodextrin in the treatment of patients with diabetes mellitus and alcoholic liver disease. Efficacy study of a new preparation of an anti-oxidant agent. *Diabetes Nutr Metab* 2002; 15: 222-231
- 36 Purohit V, Russo D. Role of S-adenosyl-L-methionine in the treatment of alcoholic liver disease: introduction and summary of the symposium. *Alcohol* 2002; 27: 151-154
- 37 Yi H, Wang X, Miao JY, Du JP, Pan YL, Liu N, Zhang XM, Fan DM. Protective effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor on alcohol-induced liver injury in rats. *Zhonghua GanZangBing ZaZhi* 2003; 11: 663-666
- 38 Rambaldi A, Gluud C. Propylthiouracil for alcoholic liver disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2002
- 39 Enomoto N, Takei Y, Hirose M, Konno A, Shibuya T, Matsuyama S, Suzuki S, Kitamura KI, Sato N. Prevention of ethanol-induced liver injury in rats by an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, pioglitazone. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306: 846-854
- 40 Lambert JC, Zhou Z, Wang L, Song Z, McClain CJ, Kang YJ. Prevention of alterations in intestinal permeability is involved in zinc inhibition of acute ethanol-induced liver damage in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 305: 880-6
- Lambert JC, Zhou Z, Wang L, Song Z, McClain CJ, Kang YJ. Prevention of alterations in intestinal permeability is involved in zinc inhibition of acute ethanol-induced liver damage in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 305: 880-886
- 41 Aleynik SI, Lieber CS. Polyenylphosphatidylcholine corrects the alcohol-induced hepatic oxidative stress by restoring s-adenosylmethionine. *Alcohol Alcohol* 2003; 38: 208-212
- 42 Lieber CS, Weiss DG, Groszmann R, Paronetto F, Schenker S. II. Veterans Affairs Cooperative Study of polyenylphosphatidylcholine in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2003; 27: 1765-1772
- 43 Oh SH, Soh JR, Cha YS. Germinated brown rice extract shows a nutraceutical effect in the recovery of chronic alcohol-related symptoms. *J Med Food* 2003; 6: 115-121
- 44 Yang R, Han X, Delude RL, Fink MP. Ethyl pyruvate ameliorates acute alcohol-induced liver injury and inflammation in mice. *J Lab Clin Med* 2003; 142: 322-331
- 45 Senthilkumar R, Viswanathan P, Nalini N. Effect of glycine on oxidative stress in rats with alcohol induced liver injury. *Pharmazie* 2004; 59: 55-60
- 46 McKim SE, Konno A, Gabele E, Uesugi T, Froh M, Sies H, Thurman RG, Arteel GE. Cocoa extract protects against early alcohol-induced liver injury in the rat. *Arch Biochem Biophys* 2002; 406: 40-46
- 47 Saygi S, Konuklugil B, Kutsal O, Uzbay IT, Deniz G, Goren Z. Assessment of therapeutic effect of Inula heterolepis Boiss in alcoholic rats. *Phytother Res* 2003; 17: 683-687
- 48 Nanji AA, Jokelainen K, Tipoe GL, Rahemtulla A, Thomas P, Dannenberg AJ. Curcumin prevents alcohol-induced liver disease in rats by inhibiting the expression of NF-kappa B-dependent genes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284: G321-G327
- 49 Yeh ML, Liu CF, Huang CL, Huang TC. Hepatoprotective effect of Angelica archangelica in chronically ethanol-treated mice. *Pharmacology* 2003; 68: 70-73
- 50 Ji G, Wang YQ, Cao CL. Clinical study on treatment of alcoholic liver disease by qinggan huoxue recipe. *Zhongguo ZhongXiYiJieHe ZaZhi* 2004; 24: 13-16

电编 李琪 编辑 潘伯荣



# 抗人大肠癌双价单链抗体基因的构建及表达

严丹丹, 杨福辉, 方瑾

严丹丹, 杨福辉, 方瑾, 中国医科大学基础医学院细胞生物学教研室, 卫生部细胞生物学重点实验室 辽宁省沈阳市 110001

国家自然科学基金资助项目, No. 85-722-18-02, 20375047  
通讯作者: 方瑾, 110001, 辽宁省沈阳市和平区北二马路92号, 中国医科大学细胞生物教研室. jfang61@netease.com  
电话: 024-23256666-5347

收稿日期: 2006-06-07 接受日期: 2006-06-30

## Construction and expression of bivalent single-chain antibody against human colorectal carcinoma

Dan-Dan Yan, Fu-Hui Yang, Jin Fang

Dan-Dan Yan, Fu-Hui Yang, Jin Fang, Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Key Lab of Cell Biology Affiliated to Ministry of Public Health of China, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 85-722-18-02, 20375047

Correspondence to: Professor Jin Fang, Department of Cell Biology, China Medical University, 92 Beier Road, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. jfang61@netease.com

Received: 2006-06-07 Accepted: 2006-06-30

## Abstract

**AIM:** To construct the fusion gene of recombinant bivalent single-chain antibody ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> against human colorectal carcinoma and express it in *E. coli*.

**METHODS:** The two same ND-1scFv genes against human colorectal carcinoma were covalently linked by a 15-bp linker with sequences encoding GGGGS. The expression vector pET-28a(+)-ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> was constructed to express the ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> fusion protein in *E. coli*. The expressed product was purified by metal affinity chromatography using Ni-NTA resin and then detected by SDS-PAGE and Western blotting. Its immunity was analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and indirect immunofluorescence assay (IFA).

**RESULTS:** Sequencing results showed that the ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> gene was 1473 bp in length, includ-

ing two scFv of 729 bp and one GGGGS of 15 bp. SDS-PAGE and Western blotting showed that the relative molecular mass of fusion protein was about 55 kDa, in accordance with its predicted Mr value. ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> was expressed in the form of an inclusion body, and SDS-PAGE analysis of the purified ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> showed 90% purity. IFA and ELISA revealed that ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> had specific binding activity to the corresponding antigen-target cells, obviously higher than that of ND-1scFv.

**CONCLUSION:** ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> gene against human colorectal carcinoma is constructed and expressed successfully in *E. coli*. The obtained fusion protein exhibits an excellent immunity.

**Key Words:** Bivalent single-chain antibody; ND-1; Colorectal carcinoma; Immunity

Yan DD, Yang FH, Fang J. Construction and expression of bivalent single-chain antibody against human colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(24):2395-2400

## 摘要

**目的:** 构建抗人大肠癌重组双价单链抗体ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>的融合基因, 并在大肠杆菌中表达。

**方法:** 采用基因重组技术借助GGGGS Linker序列, 将2个相同的ND-1scFv基因共价连接, 构建pET-28a(+)-ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>表达载体, 并在大肠杆菌中表达双价单链抗体的融合蛋白。表达产物用Ni-NTA树脂亲和层析方法纯化, SDS-PAGE和Western blotting检测表达的目的蛋白。间接免疫荧光和ELISA检测抗体的免疫活性。

**结果:** 序列测定表明: ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>基因全长1473 bp, 包含了2个729 bp的scFv序列和15 bp的GGGGS序列。SDS-PAGE和Western blotting检测显示, 融合蛋白的M<sub>r</sub> 55 000, 与预期值一致。ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>表达产物以不溶性包涵体形式存在, 经亲和层析纯化后蛋白纯度达90%, 间接免疫荧光及ELISA检测表明, ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>保留了亲本抗体的免疫活性, 对表达有相应抗原的靶细胞具有特异结合活性, 其免疫活性明

## ■背景资料

大肠癌是常见的恶性肿瘤之一, 目前其发病率在我国位居第3位, 探讨有效的诊断和治疗手段是大肠癌研究的重要课题。肿瘤特异性mAb作为导向载体已经应用于肿瘤的放免诊断和治疗, 但由于其鼠源性、分子质量较大、在循环系统停留时间较长及具有较强的免疫原性等特点, 大大限制了其在临床肿瘤治疗中的应用。近年来, 人们用scFv为元件构建出来的基因工程双价抗体分子则显示出良好的应用前景。

## ■研发前沿

如何提高抗体的亲和力和效价是目前基因工程抗体研究的关键和热点。

显高于ND-1scFv。

**结论:**成功地构建了抗人大肠癌双价单链抗体ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>,并在大肠杆菌中高效表达。融合蛋白具有良好的免疫活性。

**关键词:**双价单链抗体; ND-1; 大肠癌; 免疫活性

严丹丹, 杨福辉, 方瑾. 抗人大肠癌双价单链抗体基因的构建及表达. 世界华人消化杂志 2006;14(24):2395-2400  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2395.asp>

## 0 引言

利用mAb进行导向诊断和治疗是肿瘤研究的重要课题。基因工程双价抗体作为一种新型的小分子抗体既具有scFv(single-chain Fv)分子质量小,组织穿透能力强及免疫原性低等特点,又具有类似于完整抗体IgG的双价结合位点,与scFv相比其抗体的亲和性大大提高,适中的分子质量(55-80 kDa)既保证了抗体在肿瘤组织的良好穿透能力,又大大改善了scFv在体内清除过快的缺点<sup>[1-3]</sup>。因此近年来,人们用scFv为元件构建的基因工程双价抗体分子在肿瘤的显像和治疗方面显示出良好的应用前景<sup>[4-5]</sup>。

ND-1是我们以人大肠癌细胞系CCL-187为免疫原制备的鼠抗人大肠癌mAb<sup>[6]</sup>,体内外一系列实验显示,该mAb特异性强,亲和力高,并优于目前广泛采用的美国商业产品抗CEA mAb<sup>[7]</sup>。以该mAb构建的基因工程抗体ND-1scFv亦显示了良好的体内外特异结合活性<sup>[8]</sup>。我们在此基础上,借助连接肽(Linker)将2个ND-1scFv基因共价连接,在大肠杆菌中表达双价单链抗体的融合蛋白,并对其活性进行了检测。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** CCL-187人大肠癌细胞株由美国哈佛大学医学院肿瘤所惠赠, Hela人宫颈癌上皮细胞株为本室保存。pET-28a(+)-ND-1scFv表达载体由本室构建。pMD18-T Vector及*E. coli* JM109感受态细胞、限制性内切酶、Taq DNA聚合酶为大连宝生物公司产品。DNA片段回收试剂盒为上海华舜生物公司产品。T4 DNA连接酶为New England Biolabs公司产品。Ni-NTA亲和层析填料为Qiagen公司产品。FITC荧光标记羊抗鼠抗体为Sigma公司产品,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体为Santa公司产品。抗His-Tag mAb为Invitrogen公司产品。TMB购自Boehringer mannheim公司。Western blotting检测试剂盒

(HisProbe™ Western Blotting Kit)为美国Pierce公司产品。引物P1, P2由大连宝生物公司合成,其序列如下:上游引物P1: 5'AATGTCGAC

*Sal* I

GGAGGCGGAGGCTCAGCCCAGGTGCA 3'

Linker

下游引物P2: 5'GCGAAGCTTTTATTTCCAGCT

*Hind* III stop codon

TGGTCCCCCTCCGAA3',其中斜体部分为添加的酶切位点,上游引物引入编码5个氨基酸GGGGS的Linker序列,下游引物引入终止密码子,扩增的基因片段为ND-1scFv,约750 bp。

### 1.2 方法

**1.2.1 ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>载体的构建和诱导表达** 以ND-1scFv表达质粒pET-28(+)-ND-1scFv为模板,以引物P1, P2进行PCR扩增形成5'端带有*Sal* I位点和Linker序列,3'端带有终止密码子和*Hind* III位点的Linker-ND-1scFv片段,产物经15 g/L琼脂糖凝胶电泳, DNA片段回收试剂盒回收,与pMD18-T Vector连接,转化*E. coli* JM109,随机挑取单菌落提取相应的质粒DNA,用*Sal* I/*Hind* III酶切鉴定,并采用Sanger双脱氧末端终止法用AbiprismTM377测序仪进行DNA序列测定。将测序正确的重组质粒pMD18-T-Linker-ND-1scFv用*Sal* I/*Hind* III双酶切,与相同酶切的pET-28a(+)-ND-1scFv载体于16℃连接过夜,转化宿主菌BL21,用*Eco*R I/*Hind* III双酶切鉴定有插入片段的克隆。挑取鉴定正确的阳性克隆接种于2 mL含50 mg/L卡那霉素LB培养基中,37℃振荡培养过夜,并以1%接种量转种到100 mL相同的LB培养基中,37℃振荡培养至A<sub>600</sub>为0.6左右,加入IPTG至终浓度1 mmol/L,继续培养3 h,离心收集菌体,获得诱导培养物,表达产物以SDS-PAGE鉴定,并用凝胶灰度扫描测定蛋白表达量。将诱导的菌体用裂解缓冲液冰上裂解30 min,并于冰浴上超声破碎,4℃,10 000 g离心20 min得到包涵体。将包涵体重悬于原培养物0.1倍体积的变性液中(0.1 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01 mol/L Tris, 6 mol/L盐酸胍, pH 8.0),待包涵体全部溶解后,17 000 g离心20 min,取上清加至Ni-NTA resin亲和层析柱中,按顺序分别用10倍柱体积的6 mol/L盐酸胍(pH 8.0)→8 mol/L尿素(pH 8.0)→8 mol/L尿素(pH 6.5)→8 mol/L尿素(pH 4.2)洗脱镍柱,收集8 mol/L尿素(pH 4.2)流出液。用变性液调整蛋白浓度至100 mg/L,加入4倍体积复性液(20 mmol/L Tris, 0.25 mol/L NaCl, 5 g/L

NP-40, 0.4 mmol/L PMSF, 2 mmol/L还原型谷胱甘肽, 0.2 mmol/L氧化型谷胱甘肽, 100 mmol/L EDTA)4℃复性24 h, 然后将复性样品转移至截留分子质量为8-10 kDa的透析袋中用透析液(20 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, 100 mL/L甘油)透析48 h, 超滤浓缩样品至适当体积, Bradford法检测蛋白浓度后, -20℃分装保存。

**1.2.2 ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>的Western blotting** 取含有重组质粒pET-28a(+)-ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>的BL21诱导表达菌液和诱导前的BL21菌体裂解物, 常规方法制备蛋白质电泳样品, 经120 g/L SDS-PAGE后, 湿转印至PVDF膜上, 用25 g/L BSA/TBST室温封闭1 h, TBST洗膜2次, 加HisProbe™-HRP抗体摇床孵育1 h, 再以TBST洗膜后加化学发光剂(enhanced : luminol = 1 : 1)覆盖PVDF膜室温5 min, 置X光胶片上曝光1 min分析结果。

**1.2.3 间接免疫荧光检测ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>免疫活性** 取对数生长期的人大肠癌细胞CCL-187和宫颈癌上皮细胞Hela分别传代于盖玻片上, 于37℃培养48 h后, 以ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>为一抗, 抗His-tag mAb为二抗, FITC标记的羊抗鼠IgG为三抗, 于37℃各孵育1 h, PBS冲洗后, 于荧光显微镜下观察。

**1.2.4 非竞争性ELISA检测抗体活性** 取处于对数生长期的人大肠癌细胞CCL-187, 以 $5 \times 10^4$ 接种于96孔培养板中, 100 μL/孔, 于37℃培养24 h, 弃去培养液, PBS涮洗3次, 25 mL/L戊二醛37℃固定5 min, PBS涮洗3次后, 每孔加入等摩尔的ND-1 mAb, ND-1scFv和ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>作为一抗, 阴性对照孔加PBS, ND-1scFv孔和ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>孔均以抗His-Tag抗体作为二抗, HRP-羊抗鼠抗体作为三抗; ND-1 mAb孔以HRP-羊抗鼠抗体作为二抗, 每孔分别加抗体100 μL, 于37℃分别孵育2 h, PBS涮洗后以底物TMB显色, 37℃暗处反应30 min, 1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 μL/孔终止反应后, 于酶标仪上波长450 nm测定吸光度值。

## 2 结果

**2.1 PCR产物Linker-ND-1scFv的鉴定** 以pET-28a(+)-ND-1scFv为模板, 加入引物P1, P2进行PCR, 产物经1%琼脂糖凝胶电泳得到长度约750 bp的基因片段(图1)。将带有“A”尾的PCR产物与pMD18-T克隆载体连接, 提取重组质粒, 用Sal I/Hind III进行双酶切电泳显示在750 bp处有一条带, 表明回收片段成功克隆到载体中。将酶切正确的重组质粒经Sanger双脱氧末端终止

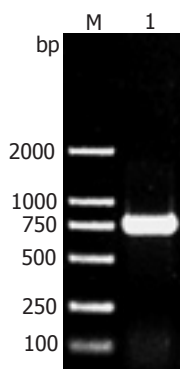


图1 PCR产物的琼脂糖凝胶电泳分析。M: DNA Marker; 1: PCR产物。

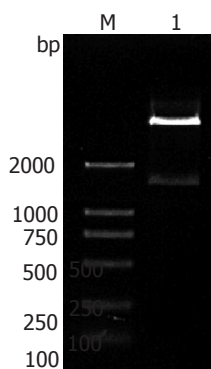


图2 质粒pET-28a(+)-ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>的双酶切结果。M: DNA Marker; 1: pET-28a(+)-ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>(EcoRI和Hind III)。

法测序, 得到的DNA序列与设计的理论序列比对结果完全一致。

**2.2 pET-28a(+)-ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>表达载体的构建和鉴定** 将测序正确的重组质粒pMD18-T-Linker-ND-1scFv用Sal I/Hind III双酶切, 与经同样双酶切的pET-28a(+)-ND-1scFv载体16℃连接过夜, 连接产物转化E. coli BL21, 提取重组子质粒, 经EcoRI/Hind III双酶切, 电泳显示在约1500 bp处呈现一明显条带, 提示Linker-ND-1scFv片段被克隆入pET-28a(+)-ND-1scFv载体中, 且插入方向正确(图2), 表明pET-28a(+)-ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>构建成功。综合上述测序和酶切结果证实ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>基因全长1473 bp, 包含了2个729 bp的scFv序列和15 bp的GGGGS序列, 两侧为EcoRI和Hind III位点。

**2.3 ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>在大肠杆菌中的表达** 将构建正确的表达质粒pET-28a(+)-ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>转化宿主菌BL21, 以1 mmol/L IPTG诱导表达。SDS-PAGE和Western blotting检测结果显示, 经诱导的菌体裂解物在分子质量约55 kDa处有一条特异性蛋白带, pET-28a(+)载体在多克隆位点的上游有一编码His-Tag小肽的基因, 因此, 在IPTG诱导下表达的是ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>蛋白与His-Tag及其上游序列的融合蛋白, 分子质量55 kDa[ND-1sc(Fv)<sub>2</sub> 51 kDa, His-Tag+上游序列4 kDa], 电泳结果与该融合蛋白的理论推算值相符(图3)。凝胶灰度

## ■创新盘点

本研究基于先前的的工作基础, 采用共价方式, 借助GGGGS Linker首次构建了抗人大肠癌才双价单链抗体ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>, 并在大肠杆菌中获得了高效表达, 融合蛋白具有良好的免疫活性, 提示该抗体有望成为大肠癌放免显像和治疗的理想载体。



### ■应用要点

本研究通过分子克隆技术构建了抗人大肠癌重组双价单链抗体,并证实了其免疫活性明显高于ND-1scFv,此研究结果对于开发肿瘤导向性药物具有重要的意义,且整个体系操作简单,重复性好,为构建其他双价和双特异的抗体分子提供了简洁、高效的方法。

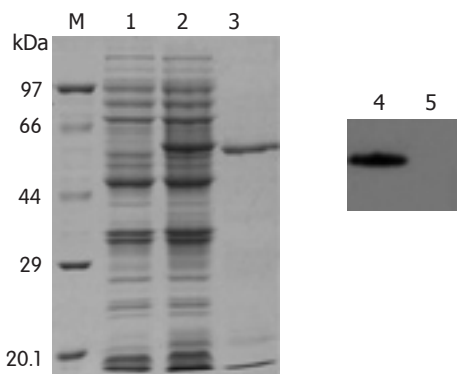


图3 ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>蛋白表达的SDS-PAGE和Western blotting检测。M: 蛋白Marker; 1: 诱导前菌体蛋白; 2: 诱导后ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>蛋白表达; 3: 纯化后的ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>蛋白; 4: 诱导后ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>蛋白; 5: 诱导前菌体蛋白。

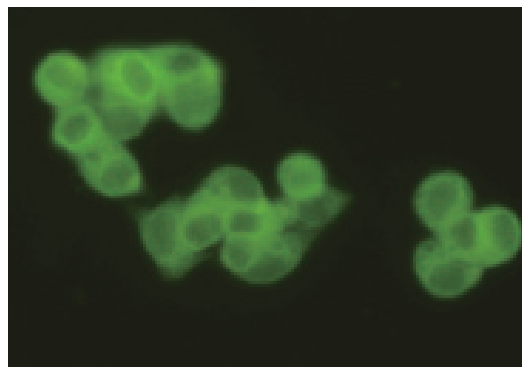


图4 ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>与CCL-187细胞上LEA抗原结合的IFA检测( $\times 400$ )。

扫描结果显示表达量占菌体总蛋白量的18%。

**2.4 表达产物的纯化和复性** SDS-PAGE分析显示,经IPTG诱导后的菌体裂解物上清中未见可溶性蛋白条带,故推断ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>蛋白主要以包涵体形式存在。通过盐酸胍变性溶解后,借助能与His序列特异结合的Ni-NTA亲和层析柱对变性的包涵体蛋白进行纯化,获得了高纯度的ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>(图3),Bradford法检测纯化后的蛋白浓度为1.1 g/L,凝胶灰度扫描显示蛋白纯度达90%。复性后的蛋白溶液澄清,且凝胶电泳呈单一条带,提示经复性处理后,ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>获得正确构象,且保持有效浓度。

**2.5 ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>免疫活性** 用复性的ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>进行的IFA显示,表达有ND-1 mAb相应抗原LEA的CCL-187细胞膜表面呈现明显的荧光;而不表达LEA的人宫颈癌细胞HeLa表面则未显示明显荧光(图4)。ELISA定量检测表明,ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>对表达有相应抗原的靶细胞CCL-187具有特异结合活性,其免疫活性明显高于ND-1scFv(图5)。

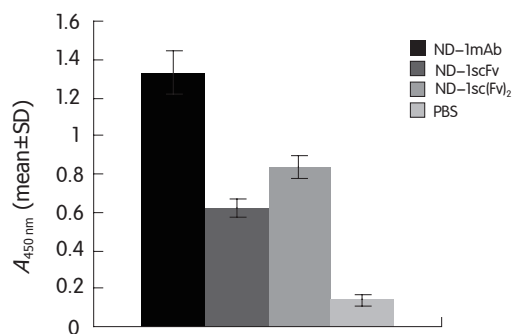


图5 ELISA检测抗体与CCL-187细胞的亲和活性。

### 3 讨论

肿瘤特异性mAb作为导向载体已经应用于肿瘤的放免诊断和治疗<sup>[9-10]</sup>,随着18种mAb产品的上市及100多种进入临床试验阶段,作为生物制药已经迎来了基因工程抗体时代<sup>[11]</sup>。目前使用的mAb及大的酶解片段具有较高的肿瘤浓集,但由于其鼠源性的特点,对人体有较强的免疫原性,分子质量较大,组织穿透能力差,血浆清除率较慢,所含有的Fc段易造成体内非特异性分布,对正常组织损害较大;而小分子抗体Fab及scFv分子质量小,穿透力强,具有快速的血浆清除率,此外不含Fc段,免疫原性低,可明显提高对肿瘤组织的特异性<sup>[12-14]</sup>,因而减少了对非特异组织的损害,但由于只有一个抗原结合位点,其亲和活性大大降低,分子质量过小,易在肾脏清除,使绝大部分抗体还未在肿瘤组织充分发挥作用就已从体内清除<sup>[15]</sup>。基因工程双价抗体是目前抗体应用研究的热点,他是将两条相同或不同来源的scFv组合成具有同种或两种不同抗原结合特征的新型抗体<sup>[4,16]</sup>,通过其双结合位点提高在肿瘤诊断和治疗中的有效性。Pavlinkova *et al*<sup>[17]</sup>构建的CC49 mAb的单链抗体( $M_r$  27 000)在荷瘤裸鼠体内的半衰期在10 min,而其双价抗体( $M_r$  60 000)是50 min,由此看出双价抗体与单价小分子抗体相比有着更长的体内滞留时间,因而,有可能获得更好的显像和治疗效果。我们借助GGGGS Linker序列将抗人大肠癌mAb的2个ND-1scFv基因共价连接,构建了高效表达的pET-28a(+)-ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>融合蛋白表达载体,在大肠杆菌中的表达量高达18%,经纯化后纯度达90%,整个体系操作简单,重复性好,为构建其他双价和双特异的抗体分子提供了简洁、高效的方法。

采用共价方式构建双价单链抗体其优势在于共价结合的稳定性高,适当的连接肽可以为抗体的2个结合部位提供足够的柔韧性,从而有

利于抗体分子同时交联双抗原位点. Beresford *et al*<sup>[3]</sup> 构建的CC49 mAb的双价单链抗体, 共价sc(Fv)<sub>2</sub>比非共价(scFv)<sub>2</sub>因具有更好的稳定性而显示出更高的肿瘤浓集和更长的肿瘤滞留时间. 我们采用共价方式构建了双价单链抗体, 细胞免疫荧光和ELISA检测表明, 该抗体保留了亲本抗体的免疫活性, 表达复性后的目的抗体4℃放置1 mo后, 仍具有良好的免疫活性(数据未显示), 提示以共价方式构建的双价单链抗体具有较好的稳定性. 我们以GGGGS作为Linker构建了抗人大肠癌双价单链抗体, GGGGS是ND-1scFv中连接VL, VH片段的Linker(GGGGS)<sub>3</sub>中的1个重复单位, 是目前众多scFv构建中普遍采用的Linker序列组成. 用于连接双价单链抗体的连接肽的长度和组成通常会对抗体的稳定性和功能产生影响, 过短的连接肽可在分子内部造成空间位阻, 影响抗体蛋白的正确折叠; 而过长的连接肽则可能增加抗体的免疫原性, 据有关文献报道过长的连接肽还可能影响抗体的活性和功能<sup>[18]</sup>. 目前用于构建共价双价单链抗体的Linker长度范围是6-25个氨基酸, 我们应用5个氨基酸的Linker构建了双价单链抗体, IFA和ELISA检测表明, ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>保留了亲本抗体的免疫活性, 对表达相应抗原的靶细胞具有特异结合活性, 其免疫活性明显高于ND-1scFv. 表明双价单链抗体ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>已折叠为正确的构象, 说明5个氨基酸可以作为构建双价单链抗体的连接肽. 但是, 值得注意的是尽管ELISA结果显示ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>较ND-1scFv的亲合性有较大提高, 但和ND-1 mAb相比, ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>在亲和性上并未达到与其相当的水平, 考虑可能的原因是5个氨基酸的Linker长度还不足以两个抗原结合位点提供有效的空间距离, 影响相互交联的稳定性, 但过长的Linker序列又会导致额外的免疫原性, 影响体内应用. 我们目前正在进行有关Linker序列长度对双价单链抗体活性影响方面的研究探讨, 有望将抗体亲和活性进一步提高. 我们通过基因工程技术成功构建了抗人大肠癌双价单链抗体ND-1sc(Fv)<sub>2</sub>, 并在大肠杆菌中获得了高效表达, 经过纯化并复性的抗体蛋白显示了良好的免疫活性, 与ND-1scFv相比其免疫活性明显提高, 达到了预期的结果, 为体内实验奠定了良好的基础, 有望成为大肠癌临床导向诊断的理想载体.

#### 4 参考文献

- 1 Wu AM, Chen W, Raubitschek A, Williams LE, Neumaier M, Fischer R, Hu SZ, Odom-Maryon T, Wong JY, Shively JE. Tumor localization of anti-CEA single-chain Fvs: improved targeting by non-covalent dimers. *Immunotechnology* 1996; 2: 21-36
- 2 Adams GP, Schier R, McCall AM, Crawford RS, Wolf EJ, Weiner LM, Marks JD. Prolonged in vivo tumour retention of a human diabody targeting the extracellular domain of human HER2/neu. *Br J Cancer* 1998; 77: 1405-1412
- 3 Beresford GW, Pavlinkova G, Booth BJ, Batra SK, Colcher D. Binding characteristics and tumor targeting of a covalently linked divalent CC49 single-chain antibody. *Int J Cancer* 1999; 81: 911-917
- 4 Kikuchi Y, Uno S, Kinoshita Y, Yoshimura Y, Iida S, Wakahara Y, Tsuchiya M, Yamada-Okabe H, Fukushima N. Apoptosis inducing bivalent single-chain antibody fragments against CD47 showed antitumor potency for multiple myeloma. *Leuk Res* 2005; 29: 445-450
- 5 Perez L, Ayala M, Pimentel G, Bell H, Canaan-Haden L, Bequet M, Gonzalez LJ, Miranda M, Ravelo R, Roque L, Acevedo B, Oliva JP, Gavilondo JV. A multivalent recombinant antibody fragment specific for carcinoembryonic antigen. *Biotechnol Appl Biochem* 2006; 43: 39-48
- 6 Bleday R, Song J, Walker ES, Salcedo BF, Thomas P, Wilson RE, Chen LB, Steele G Jr. Characterization of a new monoclonal antibody to a cell surface antigen on colorectal cancer and fetal gut tissues. *Cancer* 1986; 57: 433-440
- 7 莫志成, 宋今丹. 肿瘤相关抗原LEA与CEA在大肠癌表达的对比研究. *中国肿瘤临床* 1999; 26: 511-513
- 8 Fang J, Jin HB, Song JD. Construction, expression and tumor targeting of a single-chain Fv against human colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 726-730
- 9 Buchsbaum DJ, Rogers BE, Khazaeli MB, Mayo MS, Milenic DE, Kashmiri SV, Anderson CJ, Chappell LL, Brechbiel MW, Curiel DT. Targeting strategies for cancer radiotherapy. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 3048s-3055s
- 10 Hudson PJ. Recombinant antibody constructs in cancer therapy. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 548-557
- 11 Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 1126-1136
- 12 Yu B, Ni M, Li WH, Lei P, Xing W, Xiao DW, Huang Y, Tang ZJ, Zhu HF, Shen GX. Human scFv antibody fragments specific for hepatocellular carcinoma selected from a phage display library. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3985-3989
- 13 Hu X, O'Dwyer R, Wall JG. Cloning, expression and characterisation of a single-chain Fv antibody fragment against domoic acid in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 2005; 120: 38-45
- 14 Yang X, Hu W, Li F, Xia H, Zhang Z. Gene cloning, bacterial expression, *in vitro* refolding, and characterization of a single-chain Fv antibody against PreS1(21-47) fragment of HBsAg. *Protein Expr Purif* 2005; 41: 341-348
- 15 Colcher D, Pavlinkova G, Beresford G, Booth BJ, Batra SK. Single-chain antibodies in pancreatic cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 880: 263-280
- 16 Grosse-Hovest L, Wick W, Minoia R, Weller M, Rammensee HG, Brem G, Jung G. Supraagonistic, bispecific single-chain antibody purified from the serum of cloned, transgenic cows induces T-cell-

#### ■名词解释

单链抗体是将抗体的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)通过一段连接肽(Linker)连接而成的一种小分子抗体, 是抗体具有抗原结合部位的最小功能结构单位, 以分子质量小、体内半衰期短、免疫原性低、可在原核细胞系统表达、易于基因工程操作等特点而备受关注.

## ■同行评价

本研究目标明确, 实验设计合理, 技术先进, 结果可信, 可读性较强, 具有创新性, 能较好地反映我国胃肠病学基础研究的先进水平, 有应用潜力.

- 17 mediated killing of glioblastoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Int J Cancer* 2005; 117: 1060-1064
- Pavlinkova G, Beresford GW, Booth BJ, Batra SK, Colcher D. Pharmacokinetics and biodistribution of engineered single-chain antibody constructs of MAb CC49 in colon carcinoma xenografts. *J Nucl*

- Med* 1999; 40: 1536-1546
- 18 Le Gall F, Reusch U, Little M, Kipriyanov SM. Effect of linker sequences between the antibody variable domains on the formation, stability and biological activity of a bispecific tandem diabody. *Protein Eng Des Sel* 2004; 17: 357-366

电编 张焕兰 编辑 潘伯荣

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

• 消息 •

## 欢迎订阅 2006 年《世界华人消化杂志》

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

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

《世界华人消化杂志》2006年由北京报刊发行局发行, 国际标准刊号 ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 邮发代号82-262, 出版日期每月8, 18, 28日, 月价72.00, 年价864元.欢迎广大消化科医务工作者及科教人员、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.



# 不同营养支持途径给予谷氨酰胺对烧伤大鼠肠上皮细胞线粒体呼吸功能的影响

吕尚军, 彭曦, 孙勇, 张勇, 尤忠义

吕尚军, 彭曦, 孙勇, 张勇, 尤忠义, 第三军医大学西南医院全军烧伤研究所, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室 重庆市 400038

吕尚军, 2001年武警医学院学士, 第三军医大学硕士生, 医师, 主要从事烧伤代谢营养的基础研究。

通讯作者: 彭曦, 400038, 重庆市, 第三军医大学西南医院全军烧伤研究所, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室。pxlrmm@163.com

电话: 023-68754149-8056 传真: 023-65461646

收稿日期: 2006-05-20 接受日期: 2006-06-30

## Effects of different nutritional supplements with glutamine on mitochondrial respiratory function of intestinal epithelium in burned rats

Shang-Jun Lv, Xi Peng, Yong Sun, Yong Zhang, Zhong-Yi You

Shang-Jun Lv, Xi Peng, Yong Sun, Yong Zhang, Zhong-Yi You, Institute of Burn Research, Southwest Hospital, the Third Military Medical University; State Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined Injury, Chongqing 400038, China

Correspondence to: Dr. Xi Peng, Institute of Burn Research, Southwest Hospital, the Third Military Medical University; State Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined Injury, Chongqing 400038, China. pxlrmm@163.com  
Received: 2006-05-20 Accepted: 2006-06-30

### Abstract

**AIM:** To compare the effects of different nutritional supplements with glutamine on the mitochondrial respiratory function of intestinal epithelium in burned rats.

**METHODS:** One hundred and sixty Wistar rats inflicted with 30% total body surface area (TBSA) full thickness burns were employed as the model and randomly divided into four groups: normal control (C), burned control (B), parenteral nutrition with glutamine (PN+Gln) and enteral nutrition with glutamine (EN+Gln). Isonitrogenously and isocalorically, all the burned rats were supplemented with glutamine or tyrosine at 1.0 g/kg per day, respectively. The following indices including respiratory control rate (RCR),

oxygen extraction (Oext), phosphate-to-oxygen (P/O) ratio and intestinal mucosal blood flow (IMBF) were measured at a time table of post burn day (PBD) 1, 3, 5, 7, 10.

**RESULTS:** After burn injury, ST<sub>3</sub> (PBD3:  $54.4 \pm 8.5$  vs  $70.2 \pm 7.4$ ,  $P < 0.05$ ; PBD5:  $61.2 \pm 7.5$  vs  $72.7 \pm 8.2$ ,  $P < 0.05$ ; PBD7:  $67.2 \pm 7.6$  vs  $75.6 \pm 6.2$ ,  $P < 0.05$ ; PBD10:  $69.4 \pm 6.5$  vs  $71.2 \pm 7.5$ ,  $P < 0.01$ ) and RCR (PBD1:  $3.2 \pm 0.3$  vs  $3.4 \pm 0.3$ ,  $P < 0.01$ ; PBD3:  $3.1 \pm 0.2$  vs  $4.0 \pm 0.3$ ,  $P < 0.01$ ; PBD5:  $2.7 \pm 0.2$  vs  $3.5 \pm 0.2$ ,  $P < 0.01$ ; PBD7:  $2.9 \pm 0.2$  vs  $3.6 \pm 0.3$ ,  $P < 0.01$ ; PBD10:  $2.9 \pm 0.2$  vs  $3.6 \pm 0.3$ ,  $P < 0.01$ ) were decreased, while ST<sub>4</sub> was increased (PBD5:  $24.5 \pm 2.2$  vs  $21.3 \pm 2.0$ ,  $P < 0.05$ ; PBD7:  $24.1 \pm 2.8$  vs  $22.2 \pm 2.1$ ,  $P < 0.05$ ; PBD10:  $25.4 \pm 2.3$  vs  $20.2 \pm 1.8$ ,  $P < 0.05$ ). Moreover, the Oext (PBD5:  $0.31 \pm 0.04$  vs  $0.37 \pm 0.03$ ,  $P < 0.01$ ; PBD7:  $0.33 \pm 0.02$  vs  $0.44 \pm 0.02$ ,  $P < 0.01$ ; PBD10:  $0.31 \pm 0.02$  vs  $0.41 \pm 0.04$ ,  $P < 0.01$ ), P/O ratio (PBD3:  $1.78 \pm 0.22$  vs  $2.25 \pm 0.2$ ,  $P < 0.01$ ; PBD5:  $2.04 \pm 0.21$  vs  $2.58 \pm 0.18$ ,  $P < 0.01$ ; PBD7:  $2.14 \pm 0.23$  vs  $2.81 \pm 0.25$ ,  $P < 0.01$ ; PBD10:  $2.02 \pm 0.16$  vs  $2.55 \pm 0.18$ ,  $P < 0.01$ ) and IMBF (PBD3:  $98.35 \pm 11.54$  vs  $125.36 \pm 13.00$ ,  $P < 0.01$ ; PBD5:  $118.75 \pm 10.45$  vs  $138.52 \pm 11.33$ ,  $P < 0.01$ ; PBD7:  $135.40 \pm 13.60$  vs  $152.77 \pm 13.21$ ,  $P < 0.01$ ; PBD10:  $142.30 \pm 13.006$  vs  $162.37 \pm 12.00$ ,  $P < 0.01$ ) were declined remarkably in all the burned rats ( $P < 0.01$ ), but all above indices were markedly increased in PN+Gln and EN+Gln group ( $P < 0.05 \rightarrow 0.01$ ). Furthermore, the efficacy in EN+Gln group was more significant than that in PN+Gln group.

**CONCLUSION:** After burn injury, glutamine is beneficial to improve IMBF, increase Oext, abate the extent of mitochondrial respiratory dysfunction and promote oxidative phosphorylation, and enteral nutrition is more superior to parenteral nutrition.

**Key Words:** Glutamine; Enteral nutrition; Parenteral nutrition; Intestinal epithelium; Mitochondria; Burns

Lv SJ, Peng X, Sun Y, Zhang Y, You ZY. Effects of different nutritional supplements with glutamine

### ■背景资料

谷氨酰胺(Gln)是肠黏膜细胞重要的能源物质,在损伤状态下能减轻肠道受损程度,促进肠黏膜修复,尤其在烧伤后的高代谢反应中起重要作用。目前已应用到临床。但肠道和静脉营养支持途径给予Gln的疗效是否相当,还存在争议。

## ■应用要点

本文通过观察不同营养支持途径给予Gln对烧伤大鼠肠上皮细胞线粒体呼吸功能的影响,从而证明与经静脉补充Gln相比,通过肠道补充Gln的疗效更好。对临床上应用Gln有一定的参考意义。

on mitochondrial respiratory function of intestinal epithelium in burned rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(24):2401-2405

## 摘要

**目的:** 观察不同营养支持途径给予谷氨酰胺对烧伤大鼠肠上皮细胞线粒体呼吸功能的影响。

**方法:** Wistar大鼠160只采用30%体表面积Ⅲ°烧伤大鼠模型,随机分成正常对照(C)组、烧伤对照(B)组、经静脉补充谷氨酰胺(PN+Gln)组和经肠道补充谷氨酰胺(EN+Gln)组。各组烧伤大鼠采用等氮、等热卡的营养支持,谷氨酰胺使用剂量为1.0 g/(kg·d),B组使用同等剂量的酪氨酸。观察烧伤后1, 3, 5, 7, 10 d线粒体呼吸控制率(RCR)、磷氧比(P/O)、肠道氧摄取率(Oext)及肠黏膜血流量(IMBF)的变化及不同途径给予谷氨酰胺对其的影响。

**结果:** 烧伤后各组线粒体Ⅲ态呼吸率(ST3)明显下降(PBD3:  $54.4 \pm 8.5$  vs  $70.2 \pm 7.4$ ,  $P < 0.05$ ; PBD5:  $61.2 \pm 7.5$  vs  $72.7 \pm 8.2$ ,  $P < 0.05$ ; PBD7:  $67.2 \pm 7.6$  vs  $75.6 \pm 6.2$ ,  $P < 0.05$ ; PBD10:  $69.4 \pm 6.5$  vs  $71.2 \pm 7.5$ ,  $P < 0.01$ ), IV态呼吸率(ST4)升高(PBD5:  $24.5 \pm 2.2$  vs  $21.3 \pm 2.0$ ,  $P < 0.05$ ; PBD7:  $24.1 \pm 2.8$  vs  $22.2 \pm 2.1$ ,  $P < 0.05$ ; PBD10:  $25.4 \pm 2.3$  vs  $20.2 \pm 1.8$ ,  $P < 0.05$ ), RCR显著降低(PBD1:  $3.2 \pm 0.3$  vs  $3.4 \pm 0.3$ ,  $P < 0.01$ ; PBD3:  $3.1 \pm 0.2$  vs  $4.0 \pm 0.3$ ,  $P < 0.01$ ; PBD5:  $2.7 \pm 0.2$  vs  $3.5 \pm 0.2$ ,  $P < 0.01$ ; PBD7:  $2.9 \pm 0.2$  vs  $3.6 \pm 0.3$ ,  $P < 0.01$ ; PBD10:  $2.9 \pm 0.2$  vs  $3.6 \pm 0.3$ ,  $P < 0.01$ ), 同时P/O(PBD3:  $1.78 \pm 0.22$  vs  $2.25 \pm 0.2$ ,  $P < 0.01$ ; PBD5:  $2.04 \pm 0.21$  vs  $2.58 \pm 0.18$ ,  $P < 0.01$ ; PBD7:  $2.14 \pm 0.23$  vs  $2.81 \pm 0.25$ ,  $P < 0.01$ ; PBD10:  $2.02 \pm 0.16$  vs  $2.55 \pm 0.18$ ,  $P < 0.01$ ), Oext (PBD5:  $0.31 \pm 0.04$  vs  $0.37 \pm 0.03$ ,  $P < 0.01$ ; PBD7:  $0.33 \pm 0.02$  vs  $0.44 \pm 0.02$ ,  $P < 0.01$ ; PBD10:  $0.31 \pm 0.02$  vs  $0.41 \pm 0.04$ ,  $P < 0.01$ )及IMBF (PBD3:  $98.35 \pm 11.54$  vs  $125.36 \pm 13.00$ ,  $P < 0.01$ ; PBD5:  $118.75 \pm 10.45$  vs  $138.52 \pm 11.33$ ,  $P < 0.01$ ; PBD7:  $135.40 \pm 13.60$  vs  $152.77 \pm 13.21$ ,  $P < 0.01$ ; PBD10:  $142.30 \pm 13.006$  vs  $162.37 \pm 12.00$ ,  $P < 0.01$ )均明显降低。与B组比较,使用Gln的两组各项指标均低于烧伤对照组( $P < 0.05 \sim 0.01$ ),与经静脉补充Gln相比,通过肠道补充Gln的疗效更好( $P < 0.05 \rightarrow 0.01$ )。

**结论:** 严重烧伤后使用谷氨酰胺能改善肠道

血供,增加氧摄取率,减轻肠上皮细胞线粒体呼吸功能受抑程度。相比而言,通过肠道给予谷氨酰胺的疗效更佳。

**关键词:** 谷氨酰胺; 肠道营养; 静脉营养; 肠上皮细胞; 线粒体; 烧伤

吕尚军, 彭曦, 孙勇, 张勇, 尤忠义. 不同营养支持途径给予谷氨酰胺对烧伤大鼠肠上皮细胞线粒体呼吸功能的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(24):2401-2405

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2401.asp>

## 0 引言

肠上皮细胞是构筑肠黏膜屏障的核心,具有吸收、分泌和屏障等多种功能,在维持机体生命活动中居重要地位。但因对缺氧十分敏感,他又是烧伤损害的主要靶细胞之一,目前还缺乏有效的保护措施<sup>[1]</sup>。现已知,谷氨酰胺(glutamine, Gln)是肠黏膜细胞重要的能源物质,能减轻肠道受损程度,促进肠黏膜修复<sup>[2-3]</sup>。但Gln是否能改善肠黏膜能量代谢,维护线粒体生理功能,特别是不同营养支持途径给予Gln的疗效是否相当,还未见文献报道,这正是本实验的研究内容。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康成年Wistar大鼠160只,体质量 $215 \pm 25$  g,雌雄不拘。随机分成4组,正常对照(control, C)组、烧伤对照(burned, B)组、Gln静脉营养(Gln with parenteral nutrition, PN+Gln)组和Gln肠道营养(Gln with enteral nutrition, EN+Gln)组。C组不予烧伤,其他3组烧伤前禁食12 h,10 g/L戊巴比妥钠(40 mg/kg)ip麻醉,背部电推剃毛,称重后置剃毛区于92℃水浴中18 s,造成30%体表面积Ⅲ°烧伤(病理切片证实)。伤后按50 mL/kg ip乳酸林格液抗休克。大鼠静脉营养模型制作参见文献[4]。

**1.2 方法** 为了消除肠腔中食物对肠黏膜的刺激作用,使3组烧伤动物更具可比性,实验动物采用静脉营养支持方式,只有EN+Gln组每天按1.0 g/kg的剂量通过灌胃方式给予Gln(安凯舒,992 g/L L-Gln),其他营养素和能量均通过静脉支持途径获取,PN+Gln组给予等量的Gln双肽(200 g/L丙氨酰-Gln),B组给予等量的酪氨酸,使各组达到等氮等热卡。实验分烧伤后(PBD)1, 3, 5, 7, 10 d 5个时相点(每时相点包括PN+Gln, EN+Gln和B组共3组,每组每时相10只大鼠),各组于伤后2 h开始以微量泵静脉泵入营养液,速

表 1 肠黏膜线粒体ST<sub>3</sub>, ST<sub>4</sub>和RCR变化 (mean ± SD, mmol<sup>-1</sup> · mg<sup>-1</sup> · min<sup>-1</sup>, %, n = 10)

	分组	PBD1	PBD3	PBD5	PBD7	PBD10
ST <sub>3</sub> C组为 75.4 ± 11.6	B	35.5 ± 5.4	48.4 ± 6.1	53.4 ± 6.5	58.2 ± 8.5	62.5 ± 11.2
	PN+Gln	38.3 ± 8.6	54.4 ± 8.5	61.2 ± 7.5 <sup>a</sup>	67.2 ± 7.6	69.4 ± 6.5
	EN+Gln	44.2 ± 7.2	70.2 ± 7.4 <sup>bc</sup>	72.7 ± 8.2 <sup>bc</sup>	75.6 ± 6.2 <sup>bc</sup>	71.2 ± 7.5 <sup>a</sup>
ST <sub>4</sub> C组为 15.3 ± 1.3	B	13.6 ± 2.2	25.0 ± 2.9	27.2 ± 2.1	29.6 ± 2.3	28.4 ± 2.0
	PN+Gln	12.9 ± 1.7	18.1 ± 2.1	24.5 ± 2.2	24.1 ± 2.8	25.4 ± 2.3
	EN+Gln	12.8 ± 1.9	17.2 ± 2.6	21.3 ± 2.0 <sup>a</sup>	22.2 ± 2.1 <sup>a</sup>	20.2 ± 1.8 <sup>bc</sup>
RCR C组为 4.9 ± 0.4	B	2.8 ± 0.4	2.1 ± 0.3	2.0 ± 0.2	2.1 ± 0.2	2.3 ± 0.2
	PN+Gln	3.2 ± 0.3	3.1 ± 0.2 <sup>b</sup>	2.7 ± 0.2 <sup>b</sup>	2.9 ± 0.2 <sup>b</sup>	2.9 ± 0.2 <sup>b</sup>
	EN+Gln	3.4 ± 0.3 <sup>b</sup>	4.0 ± 0.3 <sup>bd</sup>	3.5 ± 0.2 <sup>bd</sup>	3.6 ± 0.3 <sup>bd</sup>	3.6 ± 0.3 <sup>bd</sup>

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01, vs B组; <sup>c</sup>P<0.05, <sup>d</sup>P<0.01 vs PN+Gln组.

表 2 肠黏膜线粒体P/O, Oext和IMBF的变化 (mean ± SD, n = 10)

	分组	PBD1	PBD3	PBD5	PBD7	PBD10
P/O C组为 2.65 ± 0.25	B	1.98 ± 0.21	1.58 ± 0.25	1.33 ± 0.18	1.55 ± 0.19	1.63 ± 0.15
	PN+Gln	2.03 ± 0.24	1.78 ± 0.22	2.04 ± 0.21 <sup>b</sup>	2.14 ± 0.23 <sup>b</sup>	2.02 ± 0.16 <sup>b</sup>
	EN+Gln	2.12 ± 0.24	2.25 ± 0.20 <sup>bc</sup>	2.58 ± 0.18 <sup>bd</sup>	2.81 ± 0.25 <sup>bd</sup>	2.55 ± 0.18 <sup>bd</sup>
Oext (%) C组为 0.45 ± 0.03	B	0.26 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.29 ± 0.02
	PN+Gln	0.26 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.31 ± 0.04	0.33 ± 0.02	0.31 ± 0.02
	EN+Gln	0.28 ± 0.04	0.33 ± 0.02	0.37 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.44 ± 0.02 <sup>bd</sup>	0.41 ± 0.04 <sup>bd</sup>
IMBF (mv) C组为 159.88 ± 8.32	B	77.80 ± 11.35	82.38 ± 12.40	105.83 ± 13.50	112.25 ± 12.20	113.55 ± 10.23
	PN+Gln	88.75 ± 12.55	98.35 ± 11.54	118.75 ± 10.45	135.40 ± 13.60 <sup>c</sup>	142.30 ± 13.00 <sup>b</sup>
	EN+Gln	85.40 ± 13.44	125.36 ± 13.00 <sup>bc</sup>	138.52 ± 11.33 <sup>bc</sup>	152.77 ± 13.21 <sup>bc</sup>	162.37 ± 12.00 <sup>bc</sup>

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01, vs B组; <sup>c</sup>P<0.05, <sup>d</sup>P<0.01 vs PN+Gln组; <sup>e</sup>P<0.05, <sup>f</sup>P<0.01 vs EN+Gln组.

度为1-2 mL/h, 自由饮水. EN+Gln组伤后2 h开始灌喂Gln溶液, 2次/d. 营养液按糖、脂、蛋白供热比55:30:15的比例配制营养液, 卡氮比为180:1, 糖、脂供热比为1.83:1. 在层流台上将各种营养成分混匀后分装, 4℃保存, 用前复温至37℃. 按每天732.2 kJ/kg即152 mL/kg的标准供给. 伤后1 d摄入标准量的1/3, 2 d摄入1/2, 3 d摄入全量, Gln从1 d起就给予全量. 肠黏膜上皮细胞分离、线粒体制备参见Watford *et al*<sup>[5]</sup>的方法并加以改进. 线粒体呼吸活性测定采用Estabrood法<sup>[6]</sup>. 测定全过程严格在低温操作, 2 h内完成, 测定III态呼吸率(ST<sub>3</sub>)和IV态呼吸率(ST<sub>4</sub>), 计算呼吸控制率RCR = ST<sub>3</sub>/ST<sub>4</sub>和磷氧比ADP/O. 小肠氧摄取测定参见文献[5], 在大鼠腹主动脉和肠系膜上静脉直接抽血各1 mL, 进行血气分析和血常规检测. 据公式计算氧摄取(Oext), Oext = (SaO<sub>2</sub> × Hba - SvO<sub>2</sub> × Hbv) / SaO<sub>2</sub> × Hba. 肠黏膜血流量采用微循环多普勒血流仪测定.

**统计学处理** 实验数据以mean ± SD表示, 采用SPSS 10.0统计软件包, 各组间比较采用单因素方差分析, P<0.05表示相差显著.

## ■同行评价

本文采用大鼠烧伤模型, 研究经静脉途径和经肠道途径给与Gln对肠上皮细胞线粒体呼吸功能的影响, 具有一定的科学性和先进性.

## 2 结果

**2.1 肠黏膜细胞ST<sub>3</sub>, ST<sub>4</sub>和RCR的变化** 烧伤后各组大鼠的ST<sub>3</sub>均低于正常对照组, 特别是伤后1 d, B组ST<sub>3</sub>仅为伤前的50%左右, 此后虽有所恢复, 但至伤后10 d仍低于伤前. 与其他两组比较, EN+Gln组ST<sub>3</sub>的恢复明显优于B组和PN+Gln组, 在伤后3-10 d存在显著差异(P<0.05→0.01). 而PN+Gln组大鼠ST<sub>3</sub>虽高于B组, 但仅在伤后5 d存在显著差异(P<0.05, 表1). 伤后各组大鼠ST<sub>4</sub>有所增加, 除伤后1 d低于正常对照组外, 其余各时相点各组均增高. EN+Gln组在伤后5-10 d明显低于B组(P<0.05→0.01), 在伤后10 d明显低于PN+Gln组(P<0.05, 表1). 烧伤后各组大鼠RCR均明显降低, 与其他两组比较, EN+Gln组RCR的恢复明显优于B组和PN+Gln组, 在伤后1-10 d明显高于B组(P<0.01), 在伤后3-10 d明显高于PN+Gln组(P<0.01). PN+Gln组大鼠RCR也明显高于B组, 在伤后3-10 d存在显著差异(P<0.01, 表1).

**2.2 肠组织P/O, Oext和IMBF的变化** 烧伤后各组大鼠P/O均显著下降, 与其他两组比较, EN+Gln组P/O的恢复明显优于B组和PN+Gln组, 在伤后



3-10 d明显高于B组和PN+Gln组( $P<0.05\rightarrow 0.01$ ). PN+Gln组大鼠P/O也明显高于B组,在伤后5-10 d存在显著差异( $P<0.01$ ,表2).烧伤后肠组织氧摄取率各组均显著降低,尤其以伤后1-3 d最为明显.与其他两组比较,EN+Gln组Oext的恢复明显优于B组和PN+Gln组,在伤后5-10 d明显高于B组,在伤后7-10 d明显高于PN+Gln组( $P<0.01$ ). PN+Gln组大鼠Oext也明显高于B组,在伤后7-10 d存在显著差异( $P<0.01$ ,表2).烧伤后1 d,各组动物肠黏膜血流量均显著低于伤前,仅为伤前的60%左右,此后虽有所恢复但B组在伤后10 d仍较低,仅为伤前的70%.而使用Gln的两组肠黏膜血流量明显增高,两组相比,EN+Gln组大鼠肠黏膜血流量的恢复较PN+Gln组快,恢复幅度也明显增加,两组在伤后3-10 d存在显著差异( $P<0.05\rightarrow 0.01$ ,表2).

### 3 讨论

肠道不仅是一个消化器官,还是体内最大的内分泌和免疫器官,肠道神经系统也是一个仅次于中枢神经系统的复杂体系.因此,肠道是外科创伤应激的中心器官这一概念已逐渐为人们接受.严重烧伤后肠道损害发生早、损伤重、持续时间长,若得不到有效治疗,有可能引发生内烧伤并发生MODS乃至MOF.引发生内烧伤后肠道损害的因素较多,但肠黏膜细胞能量代谢障碍是导致肠道损伤的主要原因<sup>[7-8]</sup>.因此,如何改善烧伤后肠黏膜能量代谢是维护肠黏膜组织结构和屏障功能的重要课题.实验结果显示,严重烧伤后肠上皮细胞线粒体 $ST_3$ 降低,而 $ST_4$ 则增加,说明线粒体在ADP存在时耗氧速率降低,而在ADP耗尽时耗氧速率增加,从而导致RCR明显降低. P/O在烧伤早期即下降,变化趋势与RCR相同,RCR和P/O显著降低表明线粒体的电子传递功能与氧化磷酸化功能均遭破坏,使ATP生成减少,而热能释放增多.由此我们推测线粒体呼吸功能受损可能与烧伤后全身高代谢反应及生物能量生成不足、浪费增多有关,是形成肠源性高代谢的主要机制.线粒体是细胞有氧氧化主要细胞器,其生理功能依赖于 $O_2$ 的充足供给和合理利用,包括良好的血液灌流、组织内气体弥散和交换的顺利进行及线粒体 $O_2$ 利用无障碍.实验结果显示,烧伤后肠黏膜血流量明显降低,肠道水肿明显,阻碍氧和营养物质进入细胞及 $O_2$ 在组织内的弥散,是线粒体呼吸功能受抑的

重要原因.有报道,肠道单纯缺血缺氧早期,线粒体呼吸功能轻微受损,机体代偿性增加氧摄取以维持细胞氧需求.当氧供进一步减少,增加氧摄取难以满足细胞氧耗时,则发生病理性氧供依赖性耗氧,同时乏氧代谢加强,乳酸堆积而致细胞酸中毒,最终使线粒体呼吸功能损害,细胞氧摄取率下降.因此,缺血缺氧是线粒体损害的主要原因之一,而线粒体功能紊乱又干扰了细胞氧的合理利用.两者互为因果,形成恶性循环.实际上,烧伤后组织器官受损的首要因素就是缺血缺氧性损害.尽管积极的抗休克能够保证全身大循环血流动力学基本稳定,但是肠道的血供却不能有效恢复,这与烧伤应激导致机体神经内分泌紊乱,特别是与肠道自身的神经内分泌紊乱密切相关.

尽管使用Gln并不能完全纠正烧伤后肠上皮细胞线粒体呼吸功能受损,氧化磷酸化失偶联的趋势,但其变化幅度明显小于烧伤对照组.其机制与Gln能降低烧伤后应激程度,调节肠道神经递质分泌,改善肠黏膜血流灌流,维持细胞正常代谢等密切相关<sup>[9-11]</sup>.实验结果显示,无论哪种途径给予Gln对维护肠上皮细胞线粒体呼吸功能都有积极意义.但经肠道给予Gln的疗效明显优于通过静脉补充.经肠道补充Gln能使肠黏膜血流量快速恢复,较经静脉给予谷氨酰胺早2 d,恢复程度也明显高于PN+Gln组.经肠道直接给予Gln,一方面通过Gln的直接刺激,改善肠黏膜血流灌流状况;另一方面,通过肠道给予的Gln能改善肠黏膜细胞能量代谢,恢复细胞活力,减轻应激反应,从而减轻肠道损伤,促进修复.与之对应,反映肠线粒体能量代谢的各项指标也显示,经肠道补充Gln的疗效明显优于经静脉补充,肠上皮细胞线粒体RCR, P/O及Oext均明显优于PN+Gln组.由此可见,经肠道补充Gln对改善烧伤后肠道能量代谢障碍,维护线粒体正常功能的疗效更明显.

目前营养支持的研究已从维持氮平衡、保持瘦肉体,深入到维护细胞代谢、改善器官功能、促进患者康复.营养支持也成为临床治疗,特别是危重患者治疗的重要手段, Gln作为一种疗效明确的营养药物无疑在提高营养支持的疗效方面会发挥重要作用.但同样是补充Gln,剂量也相同,为何疗效存在差异.可能的机制与Gln代谢特点有关:肠道是机体代谢Gln的重要器官,肠腔中的Gln和肠上皮细胞刷状缘直接接

触, 刺激刷状缘上的Gln转运系统, 增加Gln的转运, 并上调肠上皮细胞中Gln酶活性, 增加对Gln的利用, 这对有效地增加肠黏膜血流量和氧摄取率, 改善肠黏膜组织氧合, 减轻线粒体呼吸功能受抑程度, 增加有氧代谢和ATP生成都具有重要意义. 而经静脉补充Gln绕过了Gln的生理代谢途径, 对肠黏膜没有直接的刺激和营养作用, 此外目前临床使用的Gln静脉制剂渗透压太高, 必需和其他静脉制剂配合使用, 加大了输液容量, 对需控制入量的患者是不利的, 加之目前使用的Gln二肽多为丙氨酰谷氨酰胺, 在体内水解为丙氨酸和Gln, 而丙氨酸为主要的生糖氨基酸, 大量使用对控制创伤性高血糖不利. 因此, 无论从疗效、使用方便还是从患者的经济承受能力考虑, 只要没有口服用药禁忌, 如肠梗阻、肠衰竭、短肠综合征和重症胰腺炎等, 应优先考虑采用经肠道补充Gln.

#### 4 参考文献

- 1 朱云, 汪仕良, 尤忠义. 枯否细胞在早期肠道营养降低严重烧伤高代谢中的作用. 中华外科杂志 1996; 34: 566-568
- 2 彭曦, 汪仕良, 陶凌辉. 烧伤后清洁肠道与肠源性高代谢的实验研究. 中华烧伤杂志 2001; 17: 207-209
- 3 Kelly D, Wischmeyer PE. Role of L-glutamine in critical illness: new insights. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003; 6: 217-222
- 4 彭曦, 汪仕良, 谭银玲. 烧伤大鼠静脉营养模型的建立及应用. 第三军医大学学报 2000; 22: 1-4
- 5 Watford M, Lund P, Krebs HA. Isolation and metabolic characteristics of rat and chicken enterocytes. *Biochem J* 1979; 178: 589-596
- 6 Lessin MS, Schwartz DL, Wesselhoeft CW Jr. Multiple spontaneous small bowel anastomosis in premature infants with multisegmental necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2000; 35: 170-172
- 7 Jeppesen PB, Hoy CE, Mortensen PB. Differences in essential fatty acid requirements by enteral and parenteral routes of administration in patients with fat malabsorption. *Am J Clin Nutr* 1999; 70: 78-84
- 8 Kaufman SS, Lyden ER, Brown CR, Iverson AK, Davis CK, Sudan DL, Fox IJ, Horslen SP, Shaw BW Jr, Langnas AN. Disaccharidase activities and fat assimilation in pediatric patients after intestinal transplantation. *Transplantation* 2000; 69: 362-365
- 9 彭曦, 汪仕良, 王凤君. 不同营养支持途径对严重烧伤后大鼠肠黏液成分的影响. 肠外与肠内营养 2001; 8: 157-160
- 10 彭曦, 尤忠义, 王裴. 谷氨酰胺强化的肠内营养对烧伤后肠源性高代谢的影响. 外科理论与实践 2004; 9: 387-390
- 11 彭曦, 冯晋斌, 汪仕良. 烧伤大鼠小肠肌间神经丛中一氧化氮合酶的组织化学研究. 中华烧伤杂志 2000; 16: 343-345

电编 李琪 编辑 潘伯荣

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

## • 消息 •

### 专家门诊

**本刊讯** 《世界华人消化杂志》特设“专家门诊”固定专栏为广大消化病患者搭建一个信息平台, 欢迎副主任医师以上的消化内科、普通外科专家为专栏撰稿(附单位介绍信), 免收出版费, 写作格式如下:

胃溃疡诊断和治疗

个人简介(附3.5 cm × 5 cm照片一张)

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

0 引言

1 诊断

2 治疗

3 特色

4 门诊时间

## 末梢血活性氧毒性物在肝癌诊断中的价值

贾克东, 石淑仙, 阮幼冰

### ■背景资料

通过末梢血干血滴自由基轨迹诊断疾病起源于80年代美国学者Bradford自由基理论, 该理论认为人体全身各系统新陈代谢失调和机体应激状态下可以产生大量自由基, 自由基和体细胞相互作用, 在点滴干血片中镜下呈现白色多形性, 即活性氧毒性物(ROTS), 不同疾病ROTS大小、内含物的形态和颜色等特点不同。根据此理论, 国内近年来已有多家公司生产出布氏显微镜, 并进行了一些诊断学方面的探索, 初步证明在诊断肿瘤、亚健康状态方面具有一定的价值。

贾克东, 江西省人民医院消化内科 江西省南昌市 330006  
石淑仙, 华中科技大学同济医学院附属同济医院传染科 湖北省武汉市 430030

阮幼冰, 华中科技大学同济医学院超微病理室 湖北省武汉市 430030

贾克东, 2003年华中科技大学同济医学院博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事肝脏和消化疾病的临床医疗与研究工作。

国家自然科学基金资助项目, No.30070847

通讯作者: 贾克东, 330006, 江西省南昌市爱国路92号, 江西省人民医院消化内科, jiaikedong@tom.com

收稿日期: 2006-03-22 接受日期: 2006-05-08

### Values of reactive oxygen toxic species of finger blood dot in the diagnosis of hepatocellular carcinoma

Ke-Dong Jia, Shu-Xian Shi, You-Bing Ruan

Ke-Dong Jia, Department of Gastroenterology, Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Shu-Xian Shi, Department of Infectious Diseases, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

You-Bing Ruan, Department of Ultrastructural Pathology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China  
Supported by National Nature Science Foundation of China, No.30070847

Correspondence to: Ke-Dong Jia, Department of Gastroenterology, Jiangxi Provincial People's Hospital, 92 Aiguo Road, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. jiaikedong@tom.com

Received: 2006-03-22 Accepted: 2006-05-08

### Abstract

**AIM:** To observe the morphology and inclusion body of reactive oxygen toxic species (ROTS) of finger blood dot in hepatocellular carcinoma (HCC) and liver cirrhosis (LC) by multimedia microscopy and explore its value in the diagnosis of HCC.

**METHODS:** The finger blood dots were prepared from 28 patients with HCC, 43 patients with LC, 38 patients with other carcinomas. The blood dots were scanned and the morphology and inclusion body of ROTs were analyzed by high-vivid color pathology image analysis sys-

tem (HPIAS-1000) between different groups of patients.

**RESULTS:** The enlarged ROTs was detected in 20 of 28 patients with HCC and 16 of 43 patients with LC. Fifteen patients with HCC were found to have pricks, something like nails, or transparent body inside the enlarged ROTs, but only 8 patients with LC and no patients with other carcinomas showed ROTs morphological changes above. Regarding the pricks or transparent body as positive mark, the positive rate of HCC was 53.6%, significantly higher than that of LC (18.6%) ( $P = 0.0038$ ). Further study indicated that the levels of serum sialic acid and alpha-fetoprotein (AFP) in ROTs-positive patients with HCC were not significant higher than those of ROTs-negative ones. The ages of patients, the levels of alanine aminotransferase (ALT) and Child-Pugh grades for liver function were not significantly different between ROTs-positive and negative patients, either.

**CONCLUSION:** ROTs of finger blood dots in HCC patient shows morphological changes of pricks and transparent body by multimedia microscopy, which can be used to differentiate most HCC from LC patients.

**Key Words:** Hepatocellular carcinoma; Liver cirrhosis; Blood diagnosis

Jia KD, Shi SX, Ruan YB. Values of reactive oxygen toxic species of finger blood dot in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(24):2406-2410

### 摘要

**目的:** 通过多媒体显微镜对肝硬化和肝癌患者手指血干血滴镜下活性氧毒性物(ROTS)形态和内含物的观察, 探讨其在肝癌诊断中的价值。

**方法:** 选择临床确诊肝癌患者28例, 肝硬化患者43例, 其他癌症患者38例。制备手指血干血滴片, 进行计算机扫描, 应用高清晰度彩色病理图文分析系统(HPIAS-1000)对ROTS块的形状、内含物的情况进行观察比较。



**结果:** 肝癌患者28例中, 有20例出现ROTS块的增大, 其中15例在增大的ROTS块内可见到特异性刺突或者透明小体. 肝硬化患者43例中, 有16例出现ROTS块增大, 其中8例出现刺突或者透明小体改变. 以特异性刺突和/或透明小体为阳性标志, 肝癌阳性率为53.6%, 肝硬化阳性率为18.6%,  $\chi^2$ 检验前者阳性率显著高于后者( $P = 0.0038$ ). 观察其他癌症患者手指血涂片, 均未见上述阳性改变. 进一步研究发现, 在肝癌患者中ROTS阳性和阴性患者血清唾液酸和AFP水平无显著性差异. ROTs阳性改变与患者年龄、转氨酶水平及肝功能Child-Pugh评分均无相关性.

**结论:** 肝癌患者手指血ROTS块在多媒体显微镜下呈现刺突和透明小体特异性改变, 根据形态改变可以用以区分肝癌和肝硬化患者.

**关键词:** 肝细胞癌; 肝硬化; 血液诊断

贾克东, 石淑仙, 阮幼冰. 末梢血活性氧毒性物在肝癌诊断中的价值. 世界华人消化杂志 2006;14(24):2406-2410  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2406.asp>

## 0 引言

人体血液循环中自由基和血细胞相互作用形成一种活性氧毒性物(reactive oxygen toxic species, ROTs), 他的形成是全身各系统新陈代谢失调和机体应激和疾病状态的反映, 在干燥的血滴点片中, 呈现白色和多种形态, 其大小、形态、分布及其内含物的情况可以为临床诊断提供有意义的线索. 肿瘤患者自由基足迹增多, 形成特异性构象. 有研究发现恶性肿瘤患者呈现ROTS块增大、内含物出现等特点, 根据ROTS 区域的性状、颜色甚至可以区分恶性肿瘤的来源, 如肺癌ROTS块为铬黄色, 肝癌出现黑色光环、倒刺、针状体等变化<sup>[1-3]</sup>. 我们对肝硬化及肝癌患者进行了观察, 并对其在诊断肝癌中的价值进行了研究.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 肝硬化患者44例, 男38例, 女6例, 年龄20-68(平均43)岁, 肝硬化伴腹水12例, 肝硬化伴食管下端静脉曲张破裂出血5例, Child-Pugh评分A级2例, B级18例, C级24例. 肝癌患者28例, 其中男23例, 女5例, 年龄24-71(平均50)岁, 均经临床影像学、血清学或经手术后病理切片证实. 弥漫全肝1例, 浸润半肝1例, 2个以上结节4例, 其余均为单发结节, 肿瘤直径超过10 cm的

6例. 其他癌症患者38例, 包括直肠癌5例, 胃癌5例, 贲门癌3例, 食管癌10例, 壶腹周围癌1例, 肺癌10例, 宫颈癌3例, 胰腺癌1例, 均由病理组织学诊断.

**1.2 方法** 消毒手指末端, 自然干燥后, 应用一次性采血针迅速刺破指端皮肤, 待血液自然流出(不挤压), 快速点于事先准备好的玻片上, 每片7点. 自然干燥后, 进行计算机扫描, 应用高清晰度彩色病理图文分析系统(HPIAS-1000, 同济医科大学前屏影像工程公司), 对ROTS块的形状、内含物的情况进行观察. AFP测定应用中国原子能科学研究院同位素所(北京)生产的AFP同位素测定试剂盒, 曲线范围为10-1600  $\mu\text{g/L}$ . 测定采用竞争放射免疫分析法. 血清唾液酸(SA)的测定方法按海军医学研究所生物技术中心说明书进行,  $\text{SA含量} = (\text{A样本}/\text{A标准}) \times 500 \mu\text{g/L}$ .

**统计学处理** 肝硬化与肝癌患者阳性率的比较应用 $\chi^2$ 检验, 血清SA水平、年龄、肝功能Child-Pugh积分比较应用两独立样本的 $t$ 检验; 血清AFP、ALT比较应用SPSS非参统计方法.

## 2 结果

**2.1 ROTs观察** 应用HPIAS-1000多媒体显微镜观察发现(图1), 大多数的肝癌患者出现ROTS块的增大, 部分内部可见到特异性的透明小体及程度不同的刺突样改变. 在28例肝癌患者中, 有20例出现ROTS块增大, 以透明小体及刺突样改变为阳性标志, 有15例患者出现上述改变, 阳性率为53.6%. 在43例肝硬化患者中, 有8例患者出现上述改变, 但程度较轻, 阳性率为18.6%.  $\chi^2$ 检验肝癌患者阳性率显著高于肝硬化患者( $P = 0.0038$ ). 在以透明小体及刺突状改变判定为阴性的36例肝硬化患者手指血滴片中, 尚有8例患者出现单纯的ROTS块增大的改变, 虽未出现肝癌的特征性改变, 但与正常人和其他肿瘤患者手指血图像不同. 观察其他癌症患者, 仅少数病例手指血滴片出现ROTS块增大外, 均未见内部透明小体及刺突样改变.

**2.2 ROTs改变与血清SA含量的关系** 手指血ROTS呈现阳性异常改变的肝癌和肝硬化患者血清SA的含量均高于相应的未改变患者, 但除肝硬化患者统计学检验显示显著性差异外( $P < 0.05$ ), 肝癌患者未见显著性差异( $P > 0.05$ ). ROTs改变阳性和阴性的患者中, 肝癌患者SA的含量显著高于肝硬化患者( $P < 0.05$ ;  $P < 0.01$ )(表1).

**2.3 ROTs改变与血清AFP的关系** 手指血ROTS呈现阳性异常改变的肝癌和肝硬化患者血清

### ■应用要点

本文初步发现肝癌患者与肝硬化患者ROTS的形态有一定的差别, 特别是在肝癌患者中发现ROTS块呈现刺突样改变具有一定的临床诊断意义.

### ■同行评价

文章对末梢血ROTS形态诊断肝癌的价值进行了初步研究,有一定的科学性、创新性。

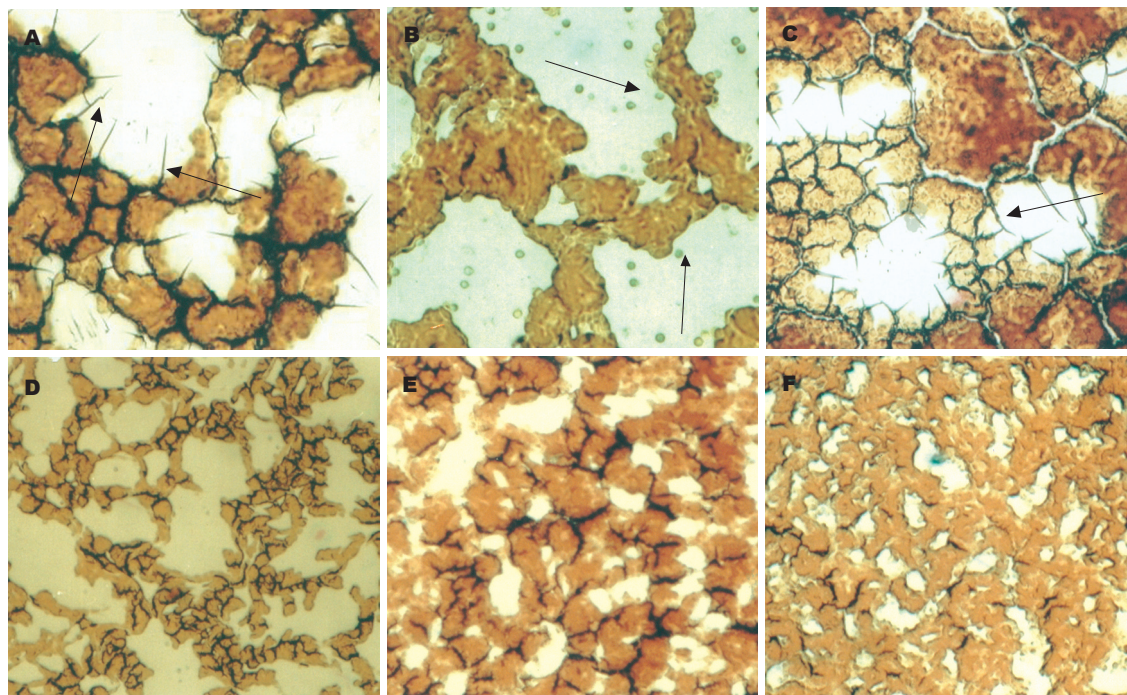


图1 手指血ROTS图像。A: 肝癌患者手指血ROTS图像(20×), 可见ROTS块增大及大量刺突形成。B: 肝癌患者手指血ROTS图像(20×), 可见ROTS块增大, 其内可见大量的唾液酸珠。C: 肝癌患者手指血ROTS图像(20×), 可见ROTS块增大及大量的刺突形成。D: 肝硬化患者异常手指血ROTS图像(10×)显示扩大的ROTS区; E: 肺癌患者异常手指血ROTS图像; 可见ROTS区扩大(10×); F: 正常人手指血ROTS图像(10×)。

AFP的含量均低于相应的ROTS改变阴性患者(表1), 其中ROTS呈现阳性改变的肝硬化患者低于ROTS阴性患者( $P<0.05$ ), 而肝癌患者差异尚未达到统计学标准( $P>0.05$ )。ROTS改变阳性和阴性的患者中, 肝癌患者AFP的含量均显著高于肝硬化患者( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。

**2.4 肝硬化ROTS改变与肝功能的关系** 分别对8例ROTS阳性和35例ROTS阴性的肝硬化患者肝功能情况及年龄、转氨酶水平和肝功能Child-Pugh评分进行统计学分析, 结果显示ROTS阳性改变与患者年龄、转氨酶水平及肝功能Child-Pugh评分均无显著性差异( $P=0.8, 0.18, 0.26$ )。

### 3 讨论

HCC是世界上最常见的五种恶性肿瘤之一, 不仅在我国具有较高的发病率, 在西方国家近年来发病率也在逐年上升, 其5 a的累积生存率不足10%, 严重的威胁着人类健康<sup>[4]</sup>。由于肝癌发病比较隐匿, 早期常常没有明显的临床症状, 及至出现症状并被诊断, 多数已至晚期, 而此时一些有效的治疗方法如手术、介入治疗及化疗等均不能奏效, 因此多数患者预后极差, 早期发现肝癌并及时采取有效治疗措施可以使肝癌治疗效果大大改善<sup>[5-8]</sup>。

肝硬化的自然病程中, 肝癌每年的发病率为

表1 肝病患者的手指血ROTS改变与SA及AFP含量的比较

ROTS	SA (mg/L)		AFP (μg/L)	
	肝癌	肝硬化	肝癌	肝硬化
阳性	544 ± 149 <sup>a</sup>	444 ± 78 <sup>c</sup>	604 <sup>a</sup>	89 <sup>c</sup>
阴性	530 ± 113 <sup>b</sup>	395 ± 102	14 330 <sup>b</sup>	297

<sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$  vs 肝硬化; <sup>c</sup> $P<0.05$  vs 阴性。

3%-10%, 因此肝硬化患者是肝癌发生的高危人群。长期以来围绕肝癌的早期诊断研究人员进行了大量的工作, 并取得了一系列的进展, 其中尽早确立高危人群, 通过血清标志物和影像学如B超的定期检查是实现肝癌早期诊断的重要手段<sup>[9-12]</sup>。但是血清学标志物的检测常常受到检测灵敏度、特异性和患者肝脏肿瘤的大小及同时存在的炎症状况的影响<sup>[13]</sup>。超声波虽然是一种有效的检测手段, 由于方法的改进, 可使近76%的患者在肝癌的早期阶段得以确诊, 但超声波诊断本身缺乏特异性, 即使配合血清AFP的检测, 仍会造成漏诊和误诊, 因此在肝硬化患者肝癌的筛查过程中, 需要一种更敏感、更特异的诊断手段<sup>[14-16]</sup>。

生理情况下, 在细胞生物氧化呼吸链电子传递过程中可以产生超氧离子( $O_2^{\cdot-}$ ), 体内其他物质代谢(如黄嘌呤)氧化也产生 $O_2^{\cdot-}$ ,  $O_2^{\cdot-}$ 可以进一



步生成 $H_2O_2$ 和羟基自由基( $\bullet OH$ ), 统称为活性氧类(reactive oxygen species, ROS), ROS化学性质活泼, 既可与细胞DNA、蛋白质、脂质和细胞膜作用, 引起细胞毒或者突变性损伤, 又可使磷脂分子中不饱和脂肪酸生成过氧化脂质对细胞膜产生损伤作用, 由此构成各种疾病发生的病理生理基础<sup>[17-18]</sup>.

正常情况下产生的ROS可分别被细胞液中以 $Cu^{2+}$ 和 $Zn^{2+}$ 为辅基的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)及线粒体内以 $Mn^{2+}$ 为辅基的SOD分解, 生成的 $H_2O_2$ 可进一步被活性更强的过氧化氢酶分解, 从而使正常机体免受ROS的破坏<sup>[19]</sup>. Valgimigli *et al*<sup>[20]</sup>通过对102例肝脏活检标本应用电子顺磁共振法(electron paramagnetic resonance, EPR)的测定, 结果发现肝病患者肝组织内ROS含量显著高于正常肝组织, 分别为 $5 \times 10^{-6}$  mol/g和 $3 \times 10^{-11}$  mol/g, 进一步观察发现ROS的含量在慢性肝炎中与炎症活动有关, 与肝细胞的增殖率、脂肪变性及转氨酶的水平无明显相关性. 分析慢性肝病患者自由基产生显著增多原因, 一方面可能与慢性肝病患者肝脏功能的下降, 使生理状态下, 在肝脏、中性粒细胞和小肠黏膜细胞中大量存在的与ROS代谢密切相关的过氧化氢酶及过氧化物酶活性下降有关, 另一方面肝病患者肝脏血液循环障碍导致细胞生物氧化不良, 从而导致大量ROS的产生<sup>[21]</sup>.

近年来研究发现, ROS在细胞内信号传导过程中具有重要的作用, 与细胞的许多生命活动有关, 其中肝病患者大量产生的ROS与肝癌的发生关系密切, Liu *et al*<sup>[22]</sup>体外研究发现, 应用 $H_2O_2$ (1-10  $\mu$ mol/L)对细胞进行处理, 或者细胞转化超氧化物歧化酶的反义核苷酸, 能够显著促进7721株人肝癌细胞的增殖. 进一步研究发现活性氧促进肿瘤细胞增殖的作用是通过蛋白激酶B(PKB)通路, 调控*c-fos*和*c-jun*基因的表达, 因而与肝癌的发生有关, 有可能为肝癌发生的研究提供一个新的途径.

全身各系统新陈代谢失调和机体在应激状态下或者疾病状态下均可能造成大量ROS的产生, 根据美国Bradford<sup>[1]</sup>理论, 血液中大量的ROS与血细胞相互作用, 在干血滴显微镜下可以观察到多形态白色的区域, 称为ROTS. 多媒体显微镜下通过对ROTS块形态、大小及其内含物的观察可以为临床疾病的诊断提供有益的线索. 有关手指血ROTS在肝癌诊断中的应用目前

尚未见相关正式报道, 本研究应用自由基学说的理论, 受多媒体显微诊断仪及Bradford理论的启发, 在初步实验的基础上对肝硬化和肝癌患者的手指血镜下ROTS的形状进行了观察, 结果在大多数的肝癌患者发现ROTS块的增大, 内部可见到特异性的透明小体及程度不同的刺突样改变, 以透明小体及刺突样改变为阳性标志, 28例肝癌患者中, 有15例出现上述改变, 阳性率为53.6%, 观察43例肝硬化患者, 有8例出现程度较轻的上述改变, 假阳性率为18.6%. 另外尚有8例肝硬化患者仅出现ROTS块面积的增大, 但未出现上述特征性改变. 同时观察直肠癌5例、胃癌5例、贲门癌3例、壶腹周围癌1例、食管癌10例、肺癌10例、宫颈癌3例、胰癌1例, 除观察到少数病例手指血滴片出现ROTS块增大外, 均未见内部透明小体及刺突样改变, 证明上述改变具有一定程度的特异性.

有资料介绍肝癌患者手指血干血滴滴片中所见到的透明小体为SA颗粒, SA是神经氨酸的酰基化合物, 在哺乳动物体内广泛分布, 作为细胞膜糖蛋白与糖脂糖基链非还原末端的主要成分, 研究显示恶性肿瘤细胞表面的糖蛋白和糖脂存在唾液酸含量的变化, 肿瘤细胞表面糖蛋白和糖脂中糖基成分的变化与恶性肿瘤细胞-细胞间识别、细胞黏附、抗原性和亲袭性等特点有关<sup>[23]</sup>. 已经发现血清SA在包括恶性黑色素瘤<sup>[24]</sup>、结肠癌<sup>[25]</sup>、口腔癌<sup>[26]</sup>等多种肿瘤患者中升高, 并以晚期肿瘤含量最高. 由于本研究前期工作已经证实肝癌患者血清SA含量明显升高, 如果镜下所见透明小体确实为SA形成, 可以解释肝癌患者ROTS块中透明小体出现的现象<sup>[8]</sup>. 基于上述思考, 为探讨肝癌患者ROTS形态出现特异性改变的原因, 本研究对ROTS阳性和阴性的肝癌患者及肝硬化患者分别进行了血清唾液酸和血清AFP的测定, 结果显示ROTS阳性与肝癌和肝硬化患者SA水平的升高有关, 肝癌患者和肝硬化患者均显示较高的SA水平, 其中肝硬化患者差别最明显( $P < 0.01$ ), 此结论支持上述关于ROTS区透明小体为SA珠的观点; 而ROTS阳性与肝癌和肝硬化患者AFP水平下降有关, 其具体原因有待进一步研究. 为探讨引起ROTS形态改变的其他原因, 我们对ROTS阳性和阴性的肝癌和肝硬化患者的年龄、血清转氨酶水平及肝功能Child-Pugh评分进行了比较, 结果均未发现有显著性差异.

总之, 应用多媒体显微镜观察患者手指血干



血滴片在肝癌患者中所见到的ROTS块的增大、刺突形成和透明小体的出现均有一定程度的肝癌特异性,与肝癌患者血清SA含量的升高有关,初步观察认为对肝癌的诊断具有一定的价值,由于该方法简便、经济,结果判断直观,值得进一步研究和开发。

#### 4 参考文献

- 1 陆建红, 陈国军, 董长林, 朱丽芳. 反应氧中毒物质诊断恶性肿瘤的应用价值探讨. *中国实验诊断学* 2003; 7: 342-344
- 2 顾丽贞, 白永泉, 王彦云, 陈朝, 段绍谨. 克感利咽口服液对流感病毒感染诱导ROTS块形成和白细胞吞噬功能下降的调节-布氏显微镜在中药药理中的应用实例. *中国中医药科技* 2001; 8: 17-18
- 3 党颖徐, 成居慧, 王辉. 布氏显微镜诊断仪的临床价值探讨. *中原医刊* 2005; 32: 52-53
- 4 Schurr R, Stolzel U, Schuppan D, Schwertner C, Steinberg J, Scherubl H. Increased incidence of hepatocellular and intrahepatic cholangiocellular cancer in the Northeast of Germany. *Dtsch Med Wochenschr* 2006; 131: 1649-1655
- 5 Bruix J, Hessheimer AJ, Forner A, Boix L, Vilana R, Llovet JM. New aspects of diagnosis and therapy of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006; 25: 3848-3856
- 6 Nakamura S, Nouse K, Sakaguchi K, Ito YM, Ohashi Y, Kobayashi Y, Toshikuni N, Tanaka H, Miyake Y, Matsumoto E, Shiratori Y. Sensitivity and Specificity of Des-Gamma-Carboxy Prothrombin for Diagnosis of Patients with Hepatocellular Carcinomas Varies According to Tumor Size. *Am J Gastroenterol* 2006
- 7 贾克东, 石淑仙, 阮幼冰. 血清标志物在肝炎肝硬化患者中诊断肝癌的价值. *胃肠病学和肝病杂志* 2004; 13: 58-62
- 8 贾克东, 石淑仙, 阮幼冰. 肝炎后肝硬化患者唾液酸水平的测定及在肝癌诊断中的意义. *临床肝胆病杂志* 2005; 21: 101-103
- 9 Wu GC, Zhou WP, Zhao YR, Guo SH, Wang ZY, Zou SB, Zhang QH, Ren H, Huang AL, Zhang DF. The natural history of chronic hepatitis B: a retrospective study. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003; 2: 566-570
- 10 Kim YS, Um SH, Ryu HS, Lee JB, Lee JW, Park DK, Kim YS, Jin YT, Chun HJ, Lee HS, Lee SW, Choi JH, Kim CD, Hyun JH. The prognosis of liver cirrhosis in recent years in Korea. *J Korean Med Sci* 2003; 18: 833-841
- 11 Miyazawa K, Moriyama M, Mikuni M, Matsumura H, Aoki H, Shimizu T, Yamagami H, Kaneko M, Shioda A, Tanaka N, Arakawa Y. Analysis of background factors and evaluation of a population at high risk of hepatocellular carcinoma. *Intervirolgy* 2003; 46: 150-156
- 12 贾克东, 石淑仙, 阮幼冰. 肝硬化和肝癌肝组织 Survivin基因表达与增生的关系. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 550-554
- 13 贾克东, 石淑仙, 林剑国, 陈红云, 王卫华. 肝硬化患者肝脏炎症对AFU诊断肝癌价值的影响. *肿瘤防治杂志* 2003; 10: 379-382
- 14 Chen TH, Chen CJ, Yen MF, Lu SN, Sun CA, Huang GT, Yang PM, Lee HS, Duffy SW. Ultrasound screening and risk factors for death from hepatocellular carcinoma in a high risk group in Taiwan. *Int J Cancer* 2002; 98: 257-261
- 15 Giannini EG. Review: MRI is more sensitive but less specific than ultrasonography or spiral CT for diagnosis of hepatocellular carcinoma. *ACP J Club* 2006; 145: 21
- 16 Bhosale P, Szklaruk J, Silverman PM. Current staging of hepatocellular carcinoma: imaging implications. *Cancer Imaging* 2006; 6: 83-94
- 17 Joseph JW, Koshkin V, Saleh MC, Sivitz WI, Zhang CY, Lowell BB, Chan CB, Wheeler MB. Free fatty acid-induced beta-cell defects are dependent on uncoupling protein 2 expression. *J Biol Chem* 2004; 279: 51049-51056
- 18 Tao F, Gonzalez-Flecha B, Kobzik L. Reactive oxygen species in pulmonary inflammation by ambient particulates. *Free Radic Biol Med* 2003; 35: 327-340
- 19 Parlakpınar H, Tasdemir S, Polat A, Bay-Karabulut A, Vardi N, Ucar M, Acet A. Protective role of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on gentamicin-induced acute renal toxicity in rats. *Toxicology* 2005; 207: 169-177
- 20 Valgimigli M, Valgimigli L, Trere D, Gaiani S, Pedulli GF, Gramantieri L, Bolondi L. Oxidative stress EPR measurement in human liver by radical-probe technique. Correlation with etiology, histology and cell proliferation. *Free Radic Res* 2002; 36: 939-948
- 21 Jessup JM, Battle P, Waller H, Edmiston KH, Stolz DB, Watkins SC, Locker J, Skena K. Reactive nitrogen and oxygen radicals formed during hepatic ischemia-reperfusion kill weakly metastatic colorectal cancer cells. *Cancer Res* 1999; 59: 1825-1829
- 22 Liu SL, Lin X, Shi DY, Cheng J, Wu CQ, Zhang YD. Reactive oxygen species stimulated human hepatoma cell proliferation via cross-talk between PI3-K/PKB and JNK signaling pathways. *Arch Biochem Biophys* 2002; 406: 173-182
- 23 Akcay F, Taysi S, Uslu C, Dogru Y, Gumustekin K. Levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 and total sialic acid in serum of patients with laryngeal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2001; 31: 584-588
- 24 Ros-Bullon MR, Sanchez-Pedreno P, Martinez-Liarte JH. Serum sialic acid in malignant melanoma patients: an ROC curve analysis. *Anticancer Res* 1999; 19: 3619-3622
- 25 Sebzda T, Saleh Y, Gburek J, Warwas M, Andrzejak R, Siewinski M, Rudnicki J. Total and lipid-bound plasma sialic acid as diagnostic markers in colorectal cancer patients: correlation with cathepsin B expression in progression to Dukes stage. *J Exp Ther Oncol* 2006; 5: 223-229
- 26 Rajpura KB, Patel PS, Chawda JG, Shah RM. Clinical significance of total and lipid bound sialic acid levels in oral pre-cancerous conditions and oral cancer. *J Oral Pathol Med* 2005; 34: 263-267

电编 李琪 编辑 潘伯荣

# 结肠腺癌LYVE-1, ICAM-1及LFA-1的表达与淋巴道转移的关系

王晓蕾, 李晓冬, 周显礼, 李玉兰, 赵玲辉, 张雅芳

王晓蕾, 周显礼, 哈尔滨医科大学附属第二医院超声科 黑龙江省哈尔滨市 150086

李晓冬, 李玉兰, 赵玲辉, 张雅芳, 哈尔滨医科大学解剖学教研室 黑龙江省哈尔滨市 150081

王晓蕾, 哈尔滨医科大学人体解剖与组织胚胎学博士生, 主治医师, 主要从事器官及肿瘤淋巴管方面的研究工作.

黑龙江省科技厅基金资助项目, No. GC03C606-1

通讯作者: 周显礼, 150086, 黑龙江省哈尔滨市学府路246号, 哈尔滨医科大学附属第二医院超声科. zhouxianli@hotmail.com  
电话: 0451-86605253

收稿日期: 2006-06-05 接受日期: 2006-06-30

## Correlations of lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1, intercellular adhesion molecular-1 and lymphocyte function-associated antigen-1 expression with lymphatic metastasis in colon adenocarcinoma

Xiao-Lei Wang, Xiao-Dong Li, Xian-Li Zhou, Yu-Lan Li, Ling-Hui Zhao, Ya-Fang Zhang

Xiao-Lei Wang, Xian-Li Zhou, Department of Ultrasonography, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China  
Xiao-Dong Li, Yu-Lan Li, Ling-Hui Zhao, Ya-Fang Zhang, Department of Anatomy, Harbin Medical University, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China  
Supported by the Science and Technology Foundation of Heilongjiang Province, No. GC03C606-1

Correspondence to: Xian-Li Zhou, Department of Ultrasonography, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 246 Xuefu Road, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. zhouxianli@hotmail.com  
Received: 2006-06-05 Accepted: 2006-06-30

## Abstract

**AIM:** To explore the mechanism of lymphatic metastasis by observing the expression of lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1 (LYVE-1), intercellular adhesion molecular-1 (ICAM-1) and lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) in colon adenocarcinoma and lymphatic vessels.

**METHODS:** Immunohistochemistry was used to detect the expression of LYVE-1, ICAM-1 and LFA-1 in 60 patients (30 cases with lymphatic

metastasis, 30 cases without lymphatic metastasis) with colon adenocarcinoma.

**RESULTS:** The number density ( $5.05 \pm 1.57$  vs  $3.45 \pm 1.84$ ,  $P < 0.01$ ) and absorbency ( $0.231 \pm 0.078$  vs  $0.196 \pm 0.089$ ,  $P < 0.05$ ) of lymphatic vessels in patients with lymphatic metastasis were markedly higher than those in ones without lymphatic metastasis, and the average area of single lymphatic vessel was decreased. The expression of ICAM-1 ( $0.069 \pm 0.036$  vs  $0.017 \pm 0.012$ ,  $P < 0.01$ ) was increased in the cancer cells from patients with lymphatic metastasis in comparison with that in ones without metastasis, and it was not found in lymphatic vessels. The expression of LFA-1 was detected in the blood vessels and some lymphatic endothelia of colon adenocarcinoma patients with lymphatic metastasis.

**CONCLUSION:** The expression of LYVE-1, ICAM-1 and LFA-1 may lead to hyperplasia and dilation of lymphatic vessels as well as the lymphatic metastasis of colon adenocarcinoma.

**Key Words:** Adenocarcinoma; Colon; Adhesion molecule; Lymphatic; Metastasis

Wang XL, Li XD, Zhou XL, Li YL, Zhao LH, Zhang YF. The Relationship of Expression of LYVE-1, ICAM-1 and LFA-1 in colon adenocarcinoma with Lymphatic Metastasis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006; 14(24): 2411-2415

## 摘要

**目的:** 探讨癌细胞淋巴管转移机制, 观察细胞黏附分子LYVE-1, ICAM-1及LFA-1在结肠腺癌组织及淋巴管的表达.

**方法:** 结肠腺癌患者术后组织标本60例, 其中淋巴结转移30例, 无淋巴结转移30例, 运用免疫组织化学的方法检测LYVE-1, ICAM-1及LFA-1在结肠腺癌组织及淋巴管的表达.

**结果:** 有淋巴结转移组的结肠腺癌淋巴管数密度( $5.05 \pm 1.57$  vs  $3.45 \pm 1.84$ ,  $P < 0.01$ )和吸光度( $0.231 \pm 0.078$  vs  $0.196 \pm 0.089$ ,  $P < 0.05$ )均比无淋巴结转移组增加, 单个淋巴管的平均面积减少; ICAM-1在淋巴结转移组结肠腺癌的

## ■背景资料

肿瘤的发生、发展、侵袭和转移是一个十分复杂的生物学现象, 受到许多复杂因素的影响和制约, 其中也包括黏附分子的表达. 目前较多研究认为, ICAM-1与肿瘤转移有关, 也可能为肿瘤侵袭、转移的促进因素之一, 但其如何促进肿瘤转移的机制尚未阐述清楚.

## ■研究前沿

在过去的10余年中,人们对肿瘤转移的研究热点主要集中在肿瘤新生血管的研究上,尤其是对血管内皮细胞生长因子(VEGF)的研究较多,肿瘤血管形成以及抗血管形成的研究取得了令人瞩目的成就,直到近几年,人们开始认识到,肿瘤淋巴管的形成在肿瘤的转移中同样发挥着重要的作用,而黏附分子在其中发挥着重要的作用,对其进行深入的研究,有望开辟肿瘤治疗的又一重要途径。

癌细胞中表达上调( $0.069 \pm 0.036$  vs  $0.017 \pm 0.012$ ,  $P < 0.01$ ),淋巴管不表达;LFA-1在结肠腺癌的血管及转移组部分淋巴管内皮上有表达。

**结论:** LYVE-1, ICAM-1及LFA-1在人结肠腺癌中的表达,可能与淋巴管增生和扩张,促进癌细胞的淋巴转移有关。

**关键词:** 腺癌; 结肠; 黏附分子; 淋巴管; 转移

王晓蕾, 李晓冬, 周显礼, 李玉兰, 赵玲辉, 张雅芳. 结肠腺癌 LYVE-1, ICAM-1及LFA-1的表达与淋巴道转移的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(24):2411-2415

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2411.asp>

## 0 引言

结肠癌是我国常见的恶性肿瘤之一,其发病机制尚未十分明了.由于饮食结构的改变等,结肠癌的发病率有逐年增加的趋势.结肠癌早期易发生淋巴道转移,他的侵袭和转移是造成宿主死亡的主要因素.因此,研究结肠癌淋巴道转移机制已成为预后判断和防治的迫切需要.近年来,研究细胞黏附分子在肿瘤组织中的表达及其在肿瘤发生、侵袭及转移过程中的规律性变化成为肿瘤学研究的热点.我们通过免疫组织化学的方法,观察LYVE-1, ICAM-1及LFA-1在结肠腺癌组织及淋巴管的表达情况,为探讨结肠腺癌细胞淋巴道浸润转移机制提供理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 结肠腺癌标本60例取自哈尔滨医科大学附属第二医院病理科,有淋巴结转移组和无淋巴结转移组各30例,男36例,女24例,年龄33-80(平均 $55.8 \pm 11.2$ )岁,标本均经HE染色病理诊断证实.兔抗大鼠LFA-1多克隆抗体及兔抗大鼠ICAM-1多克隆抗体购自博士德公司,兔抗人LYVE-1多克隆抗体购自Santa Cruz公司, PV-9000免疫组化试剂盒及SP-9002免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

**1.2 方法** 标本取结肠癌组织与正常组织交界处,40 g/L多聚甲醛固定,石蜡包埋,连续切片;石蜡切片常规脱蜡脱水,30 mL/L  $H_2O_2$ 浸30 min阻断内源性过氧化物酶;0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)抗原修复;血清封闭;滴加一抗(1:100),4℃冰箱过夜;加二抗37℃恒温烤箱内放置30 min;以上各步骤间均以0.01 mol/LPBS缓冲液冲

洗5 min $\times$ 3;DAB显色,苏木精复染,脱水,透明,中性树脂封片.采用真彩色病理图像分析系统4.0版本,以吸光度(A)表示黏附分子在组织和淋巴管上的表达强度,吸光度值越高,表达越强,如果值小于等于0,视为无表达.在每张载玻片上选取淋巴管或血管最多的5个视野进行统计,对肿瘤组织随机选取3个视野进行统计。

**统计学处理** 应用SPSS 10.0软件包进行统计分析,表达率的比较采用 $\chi^2$ 检验,  $P < 0.05$ 时差别有显著性。

## 2 结果

**2.1 LYVE-1的表达** 于癌组织中可见LYVE-1阳性表达的管状结构,呈褐色.这些管道管壁菲薄,并且不规则,管腔大,通常呈塌陷状,内皮细胞核大,向腔内突出,符合毛细淋巴管的典型形态学特征(图1A).淋巴管腔内有时可见絮状物质、淋巴细胞、肿瘤细胞及其碎片.毛细淋巴管主要分布在肿瘤组织与正常组织交界处,肿瘤中心处的实质内几乎无淋巴管.有淋巴结转移组的淋巴管数密度和吸光度均比无淋巴结转移组有明显增加,在统计学上有意义( $P < 0.05$ ).此结果显示,淋巴管数密度的增加、淋巴管壁吸光度的增强与淋巴结转移呈正相关.淋巴管面密度虽然在有淋巴结转移组稍增加,但无统计学意义( $P > 0.05$ ).平均单个淋巴管面积在两组间的差异虽然无统计学意义( $P > 0.05$ ),但可看出有下降的趋势。

**2.2 ICAM-1的表达** 所有60例标本中,ICAM-1对血管均有表达(图1B),血管吸光度值大于0.2,有淋巴结转移组与无淋巴结转移组的对比中,无统计学意义( $P > 0.05$ ).在对血管数密度统计中,显示有淋巴结转移组中的血管数密度明显大于无淋巴结转移组的血管数密度,有显著意义( $P < 0.01$ ).ICAM-1在所有标本的癌细胞中呈弱表达,其吸光度值在0.1以下,无淋巴结转移组的癌细胞中,一部分近乎无表达,其吸光度几乎为0,有淋巴结转移组与无淋巴结转移组的吸光度进行比较,差别有显著意义( $P < 0.01$ ),说明在有淋巴结转移组的结肠癌中,ICAM-1的表达上调(表1).在所有60例标本中均未见ICAM-1在淋巴管上表达。

**2.3 LFA-1的表达** LFA-1在所有标本的血管中都有表达(图1C),在无淋巴结转移组中,癌细胞未见表达,在有淋巴结转移组中可见有少量癌细胞表达(图1D),LFA-1在肠癌有淋巴结转移组的淋



表 1 结肠腺癌转移与淋巴管的密度及ICAM-1的表达 (mean  $\pm$  SD,  $n = 30$ )

观察指标	无转移组	转移组
淋巴管数密度(个/高倍视野)	3.45 $\pm$ 1.84	5.05 $\pm$ 1.57 <sup>b</sup>
淋巴管壁吸光度	0.196 $\pm$ 0.089	0.231 $\pm$ 0.078 <sup>a</sup>
淋巴管面密度	0.014 $\pm$ 0.011	0.015 $\pm$ 0.0093
单个淋巴管平均面积 ( $\mu\text{m}^2$ )	733.1 $\pm$ 543.1	689.9 $\pm$ 512.3
血管数密度(个/高倍视野)	5.44 $\pm$ 2.07	9.45 $\pm$ 4.25 <sup>b</sup>
血管壁吸光度	0.311 $\pm$ 0.064	0.304 $\pm$ 0.093
癌细胞吸光度	0.017 $\pm$ 0.012	0.069 $\pm$ 0.036 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 无转移组.

## ■创新盘点

以往对肿瘤转移的研究重点主要集中在微血管上, 对微小淋巴管的研究由于缺乏有效的淋巴管标记物, 研究较少. 本文立足于观察肿瘤淋巴转移、黏附分子、淋巴管3者的关系, 研究肿瘤淋巴管转移与黏附分子的关系.

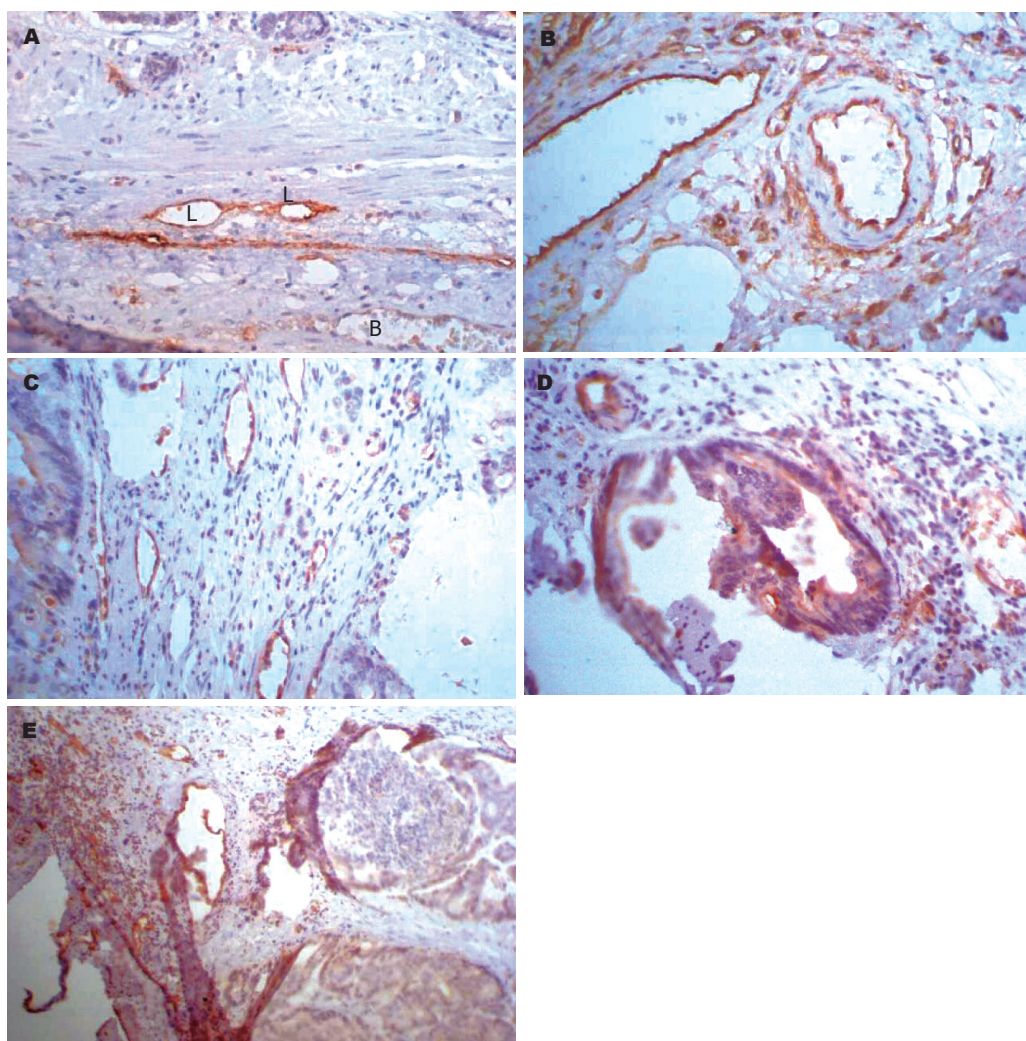


图 1 结肠腺癌LYVE-1, ICAM-1, LFA-1表达(SP  $\times$  200). A: LYVE-1淋巴管表达(L为淋巴管, B为血管); B: ICAM-1血管表达; C: LFA-1血管表达; D: LFA-1癌表达; E: LFA-1淋巴管表达.

巴管中有4例可见表达(图1E), 无淋巴结转移组未见LFA-1对淋巴管的表达.

### 3 讨论

关于肿瘤淋巴道转移机制研究的关键问题就是淋巴管的识别. 因为毛细血管和毛细淋巴管形态学上辨认较困难, 导致肿瘤淋巴管的研究远

远落后于血管的研究. LYVE-1可特异地结合细胞外基质成份中的透明质酸(HA)<sup>[1]</sup>, 而且只局限于淋巴管壁的腔面, 而完全不表达在血管内皮上. 有报道LYVE-1还可表达在肝细胞上<sup>[2]</sup>. 我们看到, LYVE-1阳性表达在管壁较薄且不规则, 管腔较大, 通常呈塌陷状的管道上, 内无红细胞, 由核大向腔内突出的单层内皮细胞构成, 这符

## ■应用要点

目前, 针对抑制肿瘤血管新生的药物有许多优点, 如这类制剂作用广泛、可用于多种肿瘤、不诱导肿瘤细胞的耐药性、可多次重复应用、副作用少等。因此对抑制淋巴管生成的研究无疑已成为当前抗癌研究的新热点。可以预见, 随着对肿瘤的抗淋巴转移治疗的进一步深入研究, 有可能开辟肿瘤治疗的一个重要有效的途径。

合毛细淋巴管的典型形态特征, 因此我们认为, LYVE-1可以作为癌组织淋巴管的特异性标记物。我们观察到有淋巴结转移组的结肠癌其淋巴管数密度及吸光度与无淋巴结转移组相比显著增加, 说明淋巴管数密度及吸光度的增加与淋巴结转移呈正相关, 这一结果也说明了肿瘤的发展和淋巴结的转移可以促进肿瘤与正常组织交界处的淋巴管新生, 而淋巴管的新生又可能促进肿瘤淋巴道的转移; 淋巴管的表达与淋巴管内皮中HA有关, 也就是说淋巴管内皮中HA的增加与肿瘤转移呈正相关。但也有研究显示, 在乳腺肿瘤内、肿瘤周边缺少淋巴管生成<sup>[3]</sup>。最近, 又有人利用LYVE-1标记淋巴管在前列腺癌<sup>[4]</sup>、非小细胞肺鳞癌中进行研究<sup>[5]</sup>, 表明肿瘤周边、肿瘤内淋巴管生成相差显著, 肿瘤周边高于肿瘤内淋巴管生成。

目前认为, 肿瘤细胞表达ICAM-1的意义包括矛盾的两方面, 其一是癌细胞与浸润性淋巴细胞的黏附可削弱癌细胞与癌细胞间的黏附, 促发癌细胞播散引起转移<sup>[6]</sup>; 另一方面, 癌细胞膜上的ICAM-1与T细胞表面的LFA-1结合后, 可为T细胞活化提供一种共刺激信号促进免疫系统对癌细胞的杀伤<sup>[7]</sup>。较多研究证明, ICAM-1的表达强度不仅随着癌肿的不断进展而增高, 而且与癌细胞的分化程度密切相关<sup>[8-10]</sup>。这些研究支持ICAM-1能促发癌细胞播散转移的作用。但是, 也有少数学者研究认为, 其表达随病情进展而减低, 与肿瘤转移呈负相关<sup>[11-15]</sup>。这又支持了ICAM-1作用的另一个方面, 即ICAM-1表达的降低, 使癌细胞膜上的ICAM-1与T细胞表面的LFA-1结合减少, 降低了免疫系统对癌细胞的杀伤力, 使癌肿增大、发展。我们的研究结果支持前一种观点。此外, 虽然ICAM-1在癌细胞中表达较弱, 但其表达随着癌肿的发展和转移而上调, 说明癌细胞表面的ICAM-1活性随着癌肿的发展和转移增强。本实验中, ICAM-1对所有血管均出现强表达, 有淋巴结转移组的血管密度明显高于无淋巴结转移组, 这说明血管的密度随着肿瘤的进展明显增加, 而且与淋巴结转移具有密切的关系, 也就是说, 这个结论有力的支持了血管密度的增加, 可以促进肿瘤转移的观点, 这可能与血管的增加不仅能更好地支持肿瘤生长, 也能给肿瘤经血道转移提供了更多的方便条件有关。我们还测定了ICAM-1在血管壁的吸光度, 在有淋巴结转移组与无淋巴结转移组的对比中, 无统计学意义, 说明血管对ICAM-1的

表达只是血管内皮的特有表达, 与肿瘤转移与否无内在联系或无明显联系。虽然ICAM-1在癌细胞中表达较弱, 其吸光度值在0.1以下, 但在有淋巴结转移组与无淋巴结转移组的对比中, 发现其表达随着癌肿的发展和转移而上调, 经统计学分析, 具有显著差异( $P<0.01$ ), 说明癌细胞表面的ICAM-1活性随着癌肿的发展和转移增强。我们同时观察到, 作为ICAM-1的配体LFA-1在有淋巴结转移组的淋巴管中有少数可见阳性表达, 而无淋巴结转移组均无表达。虽然例数不多, 但也是一个可喜的发现, 因为这提示我们想到ICAM-1有可能促使肿瘤细胞与有LFA-1活性的淋巴管内皮细胞黏附, 从而进入淋巴管, 造成淋巴道转移。我们还证实了LFA-1在所有的标本的血管中都有表达, 说明癌细胞可能通过对ICAM-1高度表达的血管造成远处转移。因此, 如若能阻止LFA-1在淋巴管上的表达, 就可能减少这一途径的远处淋巴结转移。

本研究显示, LYVE-1可以作为癌组织淋巴管的特异性标记物; ICAM-1及LFA-1这些黏附分子在肿瘤浸润和转移中发挥着重要的促进作用, 随着对其进行深入的研究, 有望开辟肿瘤治疗的又一重要途径。

## 4 参考文献

- 1 Yonemasu H, Takashima M, Nishiyama KI, Ueki T, Yao T, Tanaka M, Tsuneyoshi M. Phenotypical characteristics of undifferentiated carcinoma of the pancreas: a comparison with pancreatic ductal adenocarcinoma and relevance of E-cadherin, alpha catenin and beta catenin expression. *Oncol Rep* 2001; 8: 745-752
- 2 Cursiefen C, Schlotzer-Schrehardt U, Kuchle M, Sorokin L, Breiteneder-Geleff S, Alitalo K, Jackson D. Lymphatic vessels in vascularized human corneas: immunohistochemical investigation using LYVE-1 and podoplanin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 2127-2135
- 3 Williams CS, Leek RD, Robson AM, Banerji S, Prevo R, Harris AL, Jackson DG. Absence of lymphangiogenesis and intratumoural lymph vessels in human metastatic breast cancer. *J Pathol* 2003; 200: 195-206
- 4 Trojan L, Michel MS, Rensch F, Jackson DG, Alken P, Grobholz R. Lymph and blood vessel architecture in benign and malignant prostatic tissue: lack of lymphangiogenesis in prostate carcinoma assessed with novel lymphatic marker lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor (LYVE-1). *J Urol* 2004; 172: 103-107
- 5 沈小玥, 吴鄂生, 胡成平, 陈琼, 欧阳取长. 肺鳞癌组织中淋巴管密度和纵隔淋巴结转移的关系. *中国现代医学杂志* 2004; 14: 53-56
- 6 Natali P, Nicotra MR, Cavaliere R, Bigotti A, Romano G, Temponi M, Ferrone S. Differential

- expression of intercellular adhesion molecule 1 in primary and metastatic melanoma lesions. *Cancer Res* 1990; 50: 1271-1278
- 7 Lefor AT, Fabian DF. Enhanced cytolytic activity of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) derived from an ICAM-1 transfected tumor in a murine model. *J Surg Res* 1998; 75: 49-53
- 8 Wilting J, Tomarev SI, Christ B, Schweigerer L. Lymphangioblasts in embryonic lymphangiogenesis. *Lymphat Res Biol* 2003; 1: 33-40
- 9 Prevo R, Banerji S, Ferguson DJ, Clasper S, Jackson DG. Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium. *J Biol Chem* 2001; 276: 19420-19430
- 10 宿志弘, 李继承, 季一鸣. 结肠癌淋巴转移时细胞间黏附分子(ICAM-1)表达和树突状细胞分布. *浙江大学学报(理学版)* 2003; 3: 327-331
- 11 Ura H, Denno R, Hirata K. Correlation between nm23 protein and several cell adhesion molecules in human gastric carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1996; 87: 512-517
- 12 Heicappell R, Podlinski J, Buszello H, Ackermann R. Cell surface expression and serum levels of intercellular adhesion molecule-1 in renal cell carcinoma. *Urol Res* 1994; 22: 9-15
- 13 Tanaka H, Yashiro M, Sunami T, Ohira M, Hirakawa-Y S Chung K. Lipid-mediated gene transfection of intercellular adhesion molecule-1 suppresses the peritoneal metastasis of gastric carcinoma. *Int J Mol Med* 2002; 10: 613-617
- 14 Natali P, Nicotra MR, Cavaliere R, Bigotti A, Romano G, Temponi M, Ferrone S. Differential expression of intercellular adhesion molecule 1 in primary and metastatic melanoma lesions. *Cancer Res* 1990; 50: 1271-1278
- 15 Lefor AT, Fabian DF. Enhanced cytolytic activity of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) derived from an ICAM-1 transfected tumor in a murine model. *J Surg Res* 1998; 75: 49-53

## ■同行评价

本文研究的内容比较新颖, 通过研究得出了一定的数据与结果, 提供了有意义的信息, 具有科学性与创新性。

电编 王晓瑜 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 •

## 2004年度《世界华人消化杂志》、《World Journal of Gastroenterology》的影响因子在1608种中国科技论文统计源期刊中的排位

**本刊讯** 根据由中国科学技术信息研究所完成的“2004年度中国科技论文统计与分析结果”, 在收录的1608种中国科技论文统计源期刊中, 总被引频次平均值433.61次/刊, 影响因子平均值0.386。

《世界华人消化杂志》的总被引频次为3353, 位居1608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1608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。

《World Journal of Gastroenterology》的总被引频次为4127, 位居1608种中国科技论文统计源期刊的第3位, 内科医学类, 28种期刊的第1位。《World Journal of Gastroenterology》的影响因子为2.654, 位居1608种中国科技论文统计源期刊的第4位, 内科医学类28种期刊的第1位。《World Journal of Gastroenterology》的即年指标0.399, 他引总引比0.58, 地区分布数27, 基金论文比0.52, 国际论文比0.26。



## 胃腺癌组织P53, P63和P73蛋白表达的意义

刘荣, 贺降福, 朱尤庆, 吕永红, 肖绍树

### ■背景资料

p53是研究较为广泛的抑癌基因, 随着p53的广泛和深入研究, 其家族成员p63与p73陆续被发现后, 即成为人们关注的热点。

刘荣, 贺降福, 吕永红, 肖绍树, 湖北省黄石市第五人民医院  
消化内科 湖北省黄石市 435005

朱尤庆, 武汉大学中南医院消化内科 湖北省武汉市 430071

通讯作者: 刘荣, 435005, 湖北省黄石市下陆大道98号, 黄石市  
五医院消化内科. rongl66@yahoo.com.cn

电话: 0714-5321186 传真: 0714-5328212

收稿日期: 2006-06-05 接受日期: 2006-07-10

### Expression of P53, P63 and P73 protein and their significances in gastric adenocarcinoma

Rong Liu, Jiang-Fu He, You-Qing Zhu, Yong-Hong Lv,  
Shao-Shu Xiao

Rong Liu, Jiang-Fu He, Yong-Hong Lv, Shao-Shu Xiao,  
Department of Gastroenterology, the Fifth People's Hospital  
of Huangshi City, Huangshi 435005, Hubei Province, China  
You-Qing Zhu, Department of Gastroenterology, Zhongnan  
Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Prov-  
ince, China

Correspondence to: Rong Liu, Department of Gastroen-  
terology, the Fifth People's Hospital of Huangshi City, 98  
Xialu Street, Huangshi 435005, Hubei Province,  
China. rongl66@yahoo.com.cn

Received: 2006-06-05 Accepted: 2006-07-10

### Abstract

**AIM:** To explore the relationships between the expressions of P53, P63 and P73 protein and the carcinogenesis of gastric adenocarcinoma (GAC).

**METHODS:** Immunohistochemistry method was used to detect the expressions of P53, P63 and P73 proteins in tissues from 72 GACs and adjacent normal tissues.

**RESULTS:** The positive rates of P53, P63 and P73 expression in GAC were significantly higher than those in the normal tissues ( $\chi^2 = 4.72, P < 0.05$ ;  $\chi^2 = 5.51, P < 0.05$ ;  $\chi^2 = 9.75, P < 0.01$ ). The expression of P53 protein was distinctly higher in GAC of diffuse type than that in GAC of intestinal type ( $\chi^2 = 4.68, P < 0.05$ ), and marked differences were observed between lowly-differentiated GAC and highly-, moderately-differentiated GAC ( $\chi^2 = 7.06, P < 0.05$ ) as well as between GAC of stage I, II and stage III, IV ( $\chi^2 = 3.95, P < 0.05$ ). There was significant difference for P63 expression between lowly-differentiated GAC and highly-, moderately-differentiated

GAC ( $\chi^2 = 7.36, P < 0.05$ ). The expression of P73 was significantly lower in patients of stage I and II than that of stage III and IV ( $\chi^2 = 4.14, P < 0.05$ ). P73 expression was not correlated with the differentiation, tumor location and Lauren types. P63 and P73 expression were not markedly different between P53-positive and negative patients.

**CONCLUSION:** The expression of P53, P63 and P73 are associated with the carcinogenesis of GAC, but no correlations exist among them.

**Key Words:** Gastric adenocarcinoma; P53, P63, P73 protein; Immunohistochemistry

Liu R, He JF, Zhu YQ, Lv YH, Xiao SS. Expression of P53, P63 and P73 protein and their significances in gastric adenocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(24):2416-2420

### 摘要

**目的:** 探讨P53, P63和P73蛋白表达与胃腺癌临床病理特征之间的关系。

**方法:** 用免疫组织化学技术, 检测72例胃腺癌及其癌旁正常组织中P53, P63和P73蛋白表达情况。所有研究对象均为湖北地区汉族人。其中, 癌肿位于胃远端(胃窦、胃角)51例, 胃近端(胃底、胃体)21例; 肠型GAC 44例、弥漫型28例; 高分化腺癌20例、中分化腺癌29例、低分化和未分化腺癌23例; TNM分期: I和II期13例, III和IV期59例。

**结果:** 胃腺癌组织中P53, P63和P73蛋白阳性表达率均明显高于正常组织( $\chi^2 = 4.72, P < 0.05$ ;  $\chi^2 = 5.51, P < 0.05$ ;  $\chi^2 = 9.75, P < 0.01$ ); 胃窦/胃角腺癌与胃底/胃体腺癌组织P53蛋白表达率无显著差异( $P > 0.05$ ); 在弥漫型胃腺癌中的表达率明显高于肠型胃腺癌( $\chi^2 = 4.68, P < 0.05$ ); 在低分化腺癌与高中分化腺癌之间以及III、IV期腺癌与I、II期胃腺癌之间的表达率的差异均有显著性( $\chi^2 = 7.06, P < 0.05$ ;  $\chi^2 = 3.95, P < 0.05$ )。P63蛋白在低分化腺癌组织中表达率明显高于高中分化腺癌( $\chi^2 = 7.36, P < 0.05$ ); 在胃窦/胃角腺癌与胃底/胃体腺癌之间、在弥

漫型与肠型胃腺癌之间、在Ⅰ,Ⅱ期胃腺癌与Ⅲ,Ⅳ期腺癌之间均无显著差异. P73蛋白在Ⅰ,Ⅱ期胃腺癌组织中的阳性表达率明显低于Ⅲ,Ⅳ期腺癌( $\chi^2 = 4.14, P < 0.05$ ),在胃窦/胃角腺癌与胃底/胃体腺癌之间、在弥漫型与肠型胃腺癌之间、在高、中及低分化胃腺癌之间均无显著差异. 在P53蛋白阳性与阴性表达的胃腺癌之间, P63和P73蛋白阳性表达率的差异无显著性.

**结论:** P53, P63和P73过度表达与胃腺癌的发生相关联,但并无交互作用.

**关键词:** 胃癌; P53, P63, P73蛋白; 基因; 免疫组化

刘荣, 贺降福, 朱尤庆, 吕永红, 肖绍树. 胃腺癌组织P53, P63和P73蛋白表达的意义. 世界华人消化杂志 2006;14(24):2416-2420

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2416.asp>

## 0 引言

应用免疫组织化学技术, 检测胃腺癌及其癌旁正常组织中的P53, P63和P73蛋白表达情况, 探讨P53, P63和P73蛋白表达与胃腺癌临床病理特征之间的关系.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 黄石市第五人民医院病理科1997年至今存档且经病理证实湖北地区汉族人胃腺癌(GAC)及距癌旁5 cm外正常黏膜组织各72例, 其中, 新鲜肿瘤组织及其癌旁正常组织共6例, 一式2份, 一份常规石蜡包埋, 另一份放-80℃保存. 并收集患者年龄、性别、肿瘤发生部位、临床分期、分化程度等临床资料. 其中男39例, 女33例, 年龄30-68(平均56±12)岁, >60岁29例, <60岁43例; 癌肿位于胃远端(胃窦、胃角)51例, 胃近端(胃底、胃体)21例; 肠型 44例, 弥漫型28例; 高分化20例, 中分化29例, 低分化和未分化23例; TNM Ⅰ, Ⅱ期13例, Ⅲ, Ⅳ期59例. 手术前无放、化疗或免疫治疗, 术前3 mo无抗生素及非甾体抗炎药服用史; 无食管或肠道其他恶性病变者; 无胃手术史及胃癌家族史者. 小鼠抗人P53, P63, P73 mAb, SP试剂盒 (Ultra Sensitive™ S-P Kit), 3-3'-二氨基联苯胺(DAB)显色剂, 均购自福州迈新生物技术公司.

**1.2 方法** 采用免疫组织化学SP法进行染色, 操作过程参照试剂盒说明书. PBS缓冲液代替一抗作为阴性对照. DAB显色, 苏木素复染, 中性树胶封固. 染色结果由病理医师(未提供临床资料)单独读片.

表 1 胃癌组织P53, P63和P73蛋白表达  $n$  (%)

研究对象	$n$	P53	P63	P73
肿瘤组织	72	40 (55.6) <sup>a</sup>	47 (65.3) <sup>a</sup>	35 (48.6) <sup>b</sup>
胃窦/胃角	51	30 (58.8)	36 (70.6)	27 (52.9)
胃底/胃体	21	10 (47.6)	11 (52.4)	8 (38.1)
肠型	44	20 (45.5)	31 (70.5)	25 (56.8)
弥漫型	28	20 (71.4) <sup>a</sup>	16 (57.1)	10 (35.7)
高分化	20	9 (45.0)	12 (60.0)	8 (40.0)
中分化	29	13 (44.8)	15 (51.7)	13 (44.8)
低分化	23	18 (78.3) <sup>b</sup>	20 (87.0) <sup>b</sup>	14 (60.9)
Ⅰ, Ⅱ期	13	4 (30.8)	6 (46.2)	3 (23.1)
Ⅲ, Ⅳ期	59	36 (61.0) <sup>a</sup>	41 (69.5)	32 (54.2) <sup>a</sup>
>60岁	29	19 (65.5)	21 (72.4)	18 (62.1)
<60岁	43	21 (48.8)	26 (60.5)	17 (39.5)
正常组织	72	27 (37.5)	33 (45.8)	17 (23.6)

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ .

表 2 P63, P73与P53蛋白的交互作用

P53	$n$	P63		P73	
		阳性 (%)	阴性 (%)	阳性 (%)	阴性 (%)
阳性	40	29 (72.5)	11 (27.5)	22 (55.0)	18 (45.0)
阴性	32	18 (56.3) <sup>1</sup>	16 (43.7)	13 (40.6)	19 (59.4)

每张切片随机观察5个高倍视野, 计算阳性细胞数占总细胞数的比例. 肿瘤P53蛋白表达的评价参考文献[1], 阳性细胞少于5%为阴性, 大于5%为阳性. 参照国外学者P63, P73阳性病例评判标准, 切片阳性细胞率≥20%者为阳性病例, <20%者为阴性病例. 以试剂盒中阳性切片作为染色的阳性对照. 图象分析采用全自动图象分析仪: 显微摄像系统(Olympus BX50); 数码相机(Dalariod DMCI); 联想2000型计算机; HPIAS2000图像分析软件(同济大学千屏影像工程公司).

**统计学处理** 计数资料采用 $\chi^2$ 检验或确切概率法, 多个样本均数的比较采用单因素方差分析( $F$ - $q$ 检验).  $P < 0.05$ 为有统计学差异.

## 2 结果

**2.1 P53, P63和P73蛋白的表达** 阳性染色均为细胞核含黄色均匀颗粒. 细胞核含深黄色者为P53阳性细胞, 暗黄色者为P63阳性细胞, 黄褐色者为P73阳性细胞(图1, 表1).

**2.2 P63, P73 与P53的相关性** P53蛋白表达阳性的胃癌组织中, P63, P73蛋白的阳性检出率分别为72.5%, 55.0%, 其间无统计学相关性(表2).

## 3 讨论

p53是最重要的抑癌基因之一, 人类50%以上的肿瘤组织存在P53蛋白的异常表达. P53蛋白的

## ■ 研发前沿

尽管作为p53家族的新成员, p63与p73的产物与P53蛋白有许多相似之处, 但p63与p73在肿瘤的发生发展过程中似乎更多的起癌基因的作用. 可能原因是P63与P73存在功能截然不同的异构体, 但目前有关P63与P73异构体的研究还不多.



## ■相关报道

已经有人对P63, P73与P53的结构相似而功能差异进行了较为深入的研究,认为P63, P73在肿瘤中很少发生突变,而且与正常组织相比表达增加;DNA的损伤也不诱导P63, P73的表达增加,表明他们在肿瘤中发挥的作用与P53存在明显的差异.

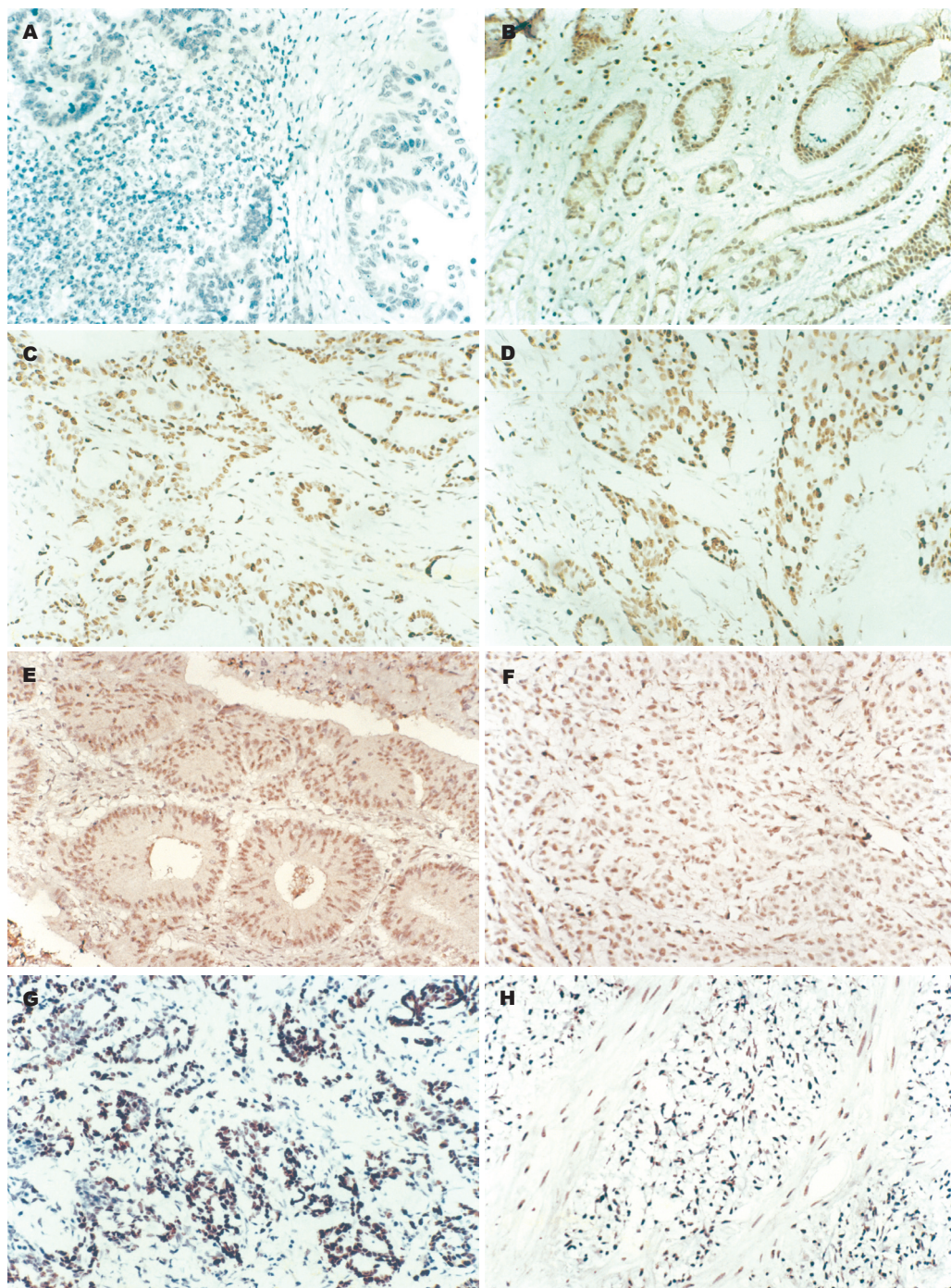


图1 胃腺癌P53, P63, P73表达(SP×200). A: 低分化P53阴性; B: 慢性胃炎中度不典型增生P53阳性; C: 中分化P53强阳性; D: 低分化P53强阳性; E: 高分化P63强阳性; F: 低分化P63强阳性; G: 低分化P73强阳性; H: 低分化P73弱阳性.

生物学功能可概括为肿瘤抑制(包括对细胞周期G1/S和G2/M转变的抑制)和诱导凋亡,他在多种肿瘤的发生和组织损伤中发挥重要作用. 其转录翻译出的蛋白分子P53通过与凋亡相关靶基因*p21*, *MDM2*, *Bax*, *PERP*作用而使有潜在癌变倾向的细胞凋亡,一些DNA损伤诱发的细胞凋亡过程也依赖于*p53*分子的启动. *p63*和*p73*基因均为新近发现的*p53*基因家族成员,其蛋白分子P63和P73与P53有结构上的相似性,且功能亦

与细胞凋亡相关,但P63和P73在细胞周期和肿瘤发生中的作用,与*p53*基因(或蛋白)和其他相关分子的相互作用、及其诱导细胞凋亡的详细机制尚且不清. 目前,同时检测P53, P63, P73在胃腺癌中表达情况的国内外相关文献报道较少. Tannapfel *et al*<sup>[2]</sup>检测32例胃腺癌患者68块肿瘤标本中P53, P63和P73蛋白的表达情况,18例患者中34%(23/68)肿瘤组织存在*p53*基因突变,24例患者中48.5%(33/68)肿瘤组织P73阳性表达,21例



患者中36.8%(25/68)肿瘤组织P63阳性表达. P63蛋白阳性表达与胃腺癌分化程度有关, 肠上皮化生和慢性萎缩性胃炎组织中, P63蛋白表达也明显升高. P53, P63和P73均与胃腺癌患者的预后无关. 且p73和p63基因在胃腺癌组织极少突变, P63在中度分化胃癌中表达增加, 认为P53, P63和P73与胃癌发生有关. Victorzon *et al*<sup>[3]</sup>报道242例胃癌患者癌肿组织中, P53蛋白强阳性表达率为39%, P53蛋白表达与胃癌的临床分期( $P<0.01$ )、远位器官的转移( $P=0.04$ )、肠型胃癌( $P=0.04$ )明显相关, 与患者的发病年龄、淋巴结转移无明显相关, P53高表达组的患者, 其平均生存时间为19 mo, 明显低于P53低表达组(65 mo), P53蛋白高表达与胃癌患者的预后负相关( $P=0.0005$ ). Sud *et al*<sup>[4]</sup>研究26例胃癌组织中p53基因突变和杂合性缺失情况, 发现31%(8/26)组织存在p53基因突变, p53基因突变的8例肿瘤组织中, 7例肿瘤组织p53野生型基因表达缺失, 92.3%的肿瘤组织中至少存在一处突变(P53基因第5-8外显子中), p53基因杂合性缺失率为37.5%, 认为p53基因变异在胃癌的发生中起着重要作用. Hsieh *et al*<sup>[5]</sup>报道80例原发性胃癌组织中, 22.5%肿瘤组织(18例)存在p53基因突变(第5-8外显子), 以乳头状腺癌多见(58.3%), 肠型腺癌(37.5%)中p53基因的突变率显著高于弥漫型胃腺癌(12.5%), 认为p53基因遗传性改变可能与肠型胃癌有关. Kataoka *et al*<sup>[6]</sup>用免疫组化技术检测胃腺癌组织中P53蛋白的表达情况, 胃腺癌组织中P53阳性表达率为50%(21/42), P53蛋白阳性表达与肿瘤浸润的深度显著相关. 6例无淋巴结转移的早期胃癌中, P53蛋白表达均为阴性, 认为P53蛋白表达与进展期胃腺癌有关. 我们的研究表明, P53蛋白在胃腺癌组织中阳性表达率均明显高于正常组织, 其表达率的差异有显著性( $P<0.05$ ), P53蛋白在胃窦/胃角腺癌与胃底/胃体腺癌组织中表达率的差异无显著性( $P>0.05$ ); 在弥漫型胃腺癌中的表达率(71.4%)明显高于肠型胃腺癌(45.5%), 其表达率的差异有显著性( $P<0.05$ ); 在低分化腺癌与高、中分化腺癌之间以及III、IV期腺癌与I、II期胃腺癌之间的表达率的差异均有显著性( $P<0.05$ ); 在>60、<60岁胃腺癌患者中表达率的差异无显著性( $P>0.05$ ), 我们认为, P53蛋白过度表达与胃腺癌的发生相关联, 肿瘤多为低分化腺癌, 以弥漫型胃腺癌和III或IV期腺癌多见, 与胃腺癌的发生部位、患者的发病年龄无关. 此结论与上述观点相似.

P63, P73与P53结构上的相似性并不决定功能上的一致性, 与P53不同, 经PCR-SSCP检测的细胞株和人类肿瘤(如肺癌、前列腺癌、大肠癌和膀胱癌等)极少有p73基因的突变<sup>[7-10]</sup>, p63在前列腺癌<sup>[11]</sup>、卵巢癌<sup>[12]</sup>、肝癌<sup>[13]</sup>等肿瘤中也未发现突变. 在p73和p63基因敲除小鼠实验中发现, p73基因缺失的小鼠并不易患肿瘤, 却有脑和免疫系统的发育异常<sup>[14]</sup>; p63基因缺失的小鼠有上皮组织和肢体发育严重缺陷<sup>[15]</sup>, 在细胞内DNA受损时, P53可被诱导表达, 放线菌素D和紫外线辐射处理细胞引起的DNA损伤, 均不能诱导P73的表达, 这表明p73, p63可能并不像p53基因那样作为细胞的“安全卫士”<sup>[16]</sup>. 一些能与P53相互作用导致P53蛋白失活的病毒癌蛋白, 包括腺病毒的E1B55K、SV40的大T抗原、人乳头状瘤病毒的E6对P73的稳定性或转录活性并无影响<sup>[17]</sup>, P63亦被证实不能和SV40的大T抗原、人乳头状瘤病毒的E6结合而影响转录<sup>[18]</sup>, 因此, P73, P63并不是病毒诱导细胞转化所必须的作用靶. 由此可见, 作为p53基因家族的每一个成员, 他们的结构、功能既有一些重叠性, 又存在较大的差异性. Ishida *et al*<sup>[19]</sup>在一系列比较实验中认为, p63与p53基因在功能上有相近之处. 另有学者用半定量RT-PCR对32例胃癌与正常胃组织的P73及P63的转录水平分析表明, 与相应正常胃组织P73阳性表达率相比, 胃癌组织中P73过表达明显, 两者之间有显著性差异( $P<0.01$ ), TNM III、IV期胃癌组织的P73阳性表达率明显高于TNM I、II期( $P<0.05$ ). 由此可见, P73过表达与胃癌的进程密切相关. P63在胃癌组织中的表达量亦明显高于正常胃组织( $P<0.05$ ). 有研究表明, P73 mRNA, P63 mRNA水平在胃癌组织中呈现明显的增高态势, 且在胃癌中存在P53的高突变率, 提示细胞癌变后, P73和P63有可能取代P53发挥对肿瘤细胞的生长调节作用. 认为, P73和P63以高表达方式参与胃癌发生发展, 与胃癌的进程密切相关.

我们的研究结果表明, P63和P73蛋白在胃腺癌组织中阳性表达率均明显高于正常组织, 其表达率的差异均有统计学意义(P63:  $P<0.05$ ; P73:  $P<0.01$ ); P63蛋白低分化腺癌组织中表达率明显高于高、中分化腺癌, 其差异有统计学意义( $P<0.05$ ); P63蛋白的表达率在胃窦/胃角腺癌与胃底/胃体腺癌之间、在弥漫型与肠型胃腺癌之间、在I、II期胃腺癌与III、IV期腺癌之间、在老年与非老年胃腺癌之间的差异均无统计学

#### ■同行评价

研究内容有特色, 指标较先进, 结论较明确, 讨论部分条理分明, 有较系统的理论分析, 但方法较简单.

义; P73蛋白在 I, II 期胃腺癌组织中的阳性表达率明显低于 III, IV 期腺癌, 其阳性表达率的差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), P73 蛋白的表达率在胃窦/胃角腺癌与胃底/胃体腺癌之间、在弥漫型与肠型胃腺癌之间、在高、中及低分化胃腺癌之间、在老年与非老年胃腺癌之间的差异均无显著性。认为, P63 蛋白过度表达与胃腺癌的发生相关联, 肿瘤多为低分化腺癌, 与肿瘤的组织类型、发生部位、临床分期及发病年龄均无关联; P73 蛋白过度表达与胃腺癌的发生相关联, 多见于 III 或 IV 期腺癌, 与胃腺癌其他临床特征无明显的相关性。此外, 我们还做了 p53, p63 和 p73 基因的相关性研究。结果发现, 在 P53 蛋白阳性与阴性表达的胃腺癌之间, P63 蛋白阳性表达率的差异无显著性, P73 蛋白阳性表达率的差异也无显著性。我们认为, P53, P63 和 P73 在胃腺癌发生发展过程中并无交互作用, 此与国外学者的研究结果有相似之处。总之, P53, P73 和 P63 以高表达方式参与胃癌发生发展, 与胃癌的进程密切相关。至于 p53 基因家族各成员在胃癌发生发展中的具体作用, 仍有待于进一步研究。

#### 4 参考文献

- 1 Tang H, Hokita S, Che X, Baba M, Aridome K, Kijima F, Tanabe G, Takao S, Aikou T. Comparison of p53 expression in proximal and distal gastric cancer: histopathologic correlation and prognostic significance. *Ann Surg Oncol* 1997; 4: 470-474
- 2 Tannapfel A, Schmelzer S, Benicke M, Klimpfinger M, Kohlhaw K, Mossner J, Engeland K, Wittekind C. Expression of the p53 homologues p63 and p73 in multiple simultaneous gastric cancer. *J Pathol* 2001; 195: 163-170
- 3 Victorzon M, Nordling S, Haglund C, Lundin J, Roberts PJ. Expression of p53 protein as a prognostic factor in patients with gastric cancer. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 215-220
- 4 Sud R, Wells D, Talbot IC, Delhanty JD. Genetic alterations in gastric cancers from British patients. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; 126: 111-119
- 5 Hsieh LL, Hsieh JT, Wang LY, Fang CY, Chang SH, Chen TC. p53 mutations in gastric cancers from Taiwan. *Cancer Lett* 1996; 100: 107-113
- 6 Kataoka M, Okabayashi T, Johira H, Nakatani S, Nakashima A, Takeda A, Nishizaki M, Orita K, Tanaka N. Aberration of p53 and DCC in gastric and colorectal cancer. *Oncol Rep* 2000; 7: 99-103
- 7 Nimura Y, Mihara M, Ichimiya S, Sakiyama S, Seki N, Ohira M, Nomura N, Fujimori M, Adachi W, Amano J, He M, Ping YM, Nakagawara A. p73, a gene related to p53, is not mutated in esophageal carcinomas. *Int J Cancer* 1998; 78: 437-440
- 8 Mai M, Yokomizo A, Qian C, Yang P, Tindall DJ, Smith DI, Liu W. Activation of p73 silent allele in lung cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 2347-2349
- 9 Marin MC, Kaelin WG Jr. p63 and p73: old members of a new family. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1470: M93-M100
- 10 Kang MJ, Park BJ, Byun DS, Park JI, Kim HJ, Park JH, Chi SG. Loss of imprinting and elevated expression of wild-type p73 in human gastric adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1767-1771
- 11 Takahashi H, Fukutome K, Watanabe M, Furusato M, Shiraishi T, Ito H, Suzuki H, Ikawa S, Hano H. Mutation analysis of the p51 gene and correlation between p53, p73, and p51 expressions in prostatic carcinoma. *Prostate* 2001; 47: 85-90
- 12 Shinozaki H, Okamoto A, Shimizu K, Saito M, Yokota J, Ochiai K. Absence of p51 alteration in human ovarian cancer. *Int J Oncol* 2001; 18: 549-552
- 13 Hamada K, Koyama T, Shimizu K, Ikawa S, Kawate S, Yokota J, Ohwada S, Morishita Y. Absence of p51 mutation in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2000; 148: 161-164
- 14 Yang A, Walker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, Bonnin J, Vagner C, Bonnet H, Dikkes P, Sharpe A, McKeon F, Caput D. p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* 2000; 404: 99-103
- 15 Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* 1999; 398: 708-713
- 16 Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 1997; 90: 809-819
- 17 Marin MC, Jost CA, Irwin MS, DeCaprio JA, Caput D, Kaelin WG Jr. Viral oncoproteins discriminate between p53 and the p53 homolog p73. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 6316-6324
- 18 Roth J, Dobbstein M. Failure of viral oncoproteins to target the p53-homologue p51A. *J Gen Virol* 1999; 80 (Pt 12): 3251-3255
- 19 Ishida S, Yamashita T, Nakaya U, Tokino T. Adenovirus-mediated transfer of p53-related genes induces apoptosis of human cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91: 174-180

电编 李琪 编辑 张焕兰

# 淋巴管内皮细胞透明质酸受体-1在胃癌组织中的表达及意义

李 蕾, 张翠萍, 赵清喜, 刘 晖, 李玉军

李蕾, 张翠萍, 赵清喜, 青岛大学医学院附属医院消化内科  
山东省青岛市 266003

刘晖, 李玉军, 青岛大学医学院附属医院病理科 山东省青  
岛市 266003

通讯作者: 张翠萍, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大  
学医学院附属医院消化科. Jianyilu16@yahoo.com.cn

电话: 0532-82767938

收稿日期: 2006-05-19 接受日期: 2006-07-19

## Expression of lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor-1 and its significance in gastric cancer

Lei Li, Cui-Ping Zhang, Qing-Xi Zhao, Hui Liu, Yu-Jun Li

Lei Li, Cui-Ping Zhang, Qing-Xi Zhao, Department of  
Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Qingdao Uni-  
versity Medical College, Qingdao 266003, Shandong Pro-  
vince, China

Hui Liu, Yu-Jun Li, Department of Pathology, the Affiliated  
Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao  
266003, Shandong Province, China

Correspondence to: Dr. Cui-Ping Zhang, Department of  
Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Qingdao Uni-  
versity Medical College, Qingdao 266003, Shandong Pro-  
vince, China. Jianyilu16@yahoo.com.cn

Received: 2006-05-19 Accepted: 2006-07-19

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1 (LYVE-1) and its clinical significance in gastric cancer.

**METHODS:** Tissue microarray technique and immunohistochemistry were used to detect the expression of LYVE-1 and lymphatic vessel density (LVD) in 85 cases of gastric cancer tissues and 40 cases of normal gastric tissues.

**RESULTS:** LYVE-1 was expressed in the endothelial cytoplasm of lymphatic vessels, showing as brown and yellow staining. The values of LYVE-1-positive LVD in gastric cancer and peritumoral tissues were significantly higher than those in normal gastric and intratumoral tissues ( $7.89 \pm 2.14$  vs  $1.15 \pm 1.62$ ,  $P < 0.01$ ;  $9.28 \pm 1.18$  vs  $4.75 \pm 1.19$ ,  $P < 0.01$ ). In gastric cancer tissue, the

value of LYVE-1-positive LVD was markedly higher in the cases with low differentiation ( $9.21 \pm 2.32$ ), clinical stage III-IV ( $9.46 \pm 2.45$ ), lymph node metastasis ( $9.37 \pm 3.39$ ) or distant metastasis ( $9.55 \pm 3.50$ ) than that in the ones with well and moderate differentiation ( $7.56 \pm 2.24$ ), clinical stage I-II ( $7.58 \pm 2.36$ ), and without lymph node metastasis ( $7.23 \pm 2.74$ ) or distant metastasis ( $7.35 \pm 2.25$ ), respectively ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The high value of LYVE-1-positive LVD in gastric cancer and peritumoral tissues indicates that lymphatic angiogenesis mainly locates in peritumoral tissues, which promotes lymphatic metastasis. Tissue microarray is a feasible, rapid, economic and accurate approach for screening clinical tissue specimens in a large scale.

**Key Words:** Gastric neoplasms; Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1; Lymphatic angiogenesis; Lymphatic vessel density; Tissue microarray

Li L, Zhang CP, Zhao QX, Liu H, Li YJ. Expression of lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor-1 and its significance in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(24):2421-2424

## 摘要

**目的:** 探讨淋巴管内皮细胞透明质酸受体-1(LYVE-1)在胃癌组织中的表达及临床意义。

**方法:** 采用组织芯片技术和免疫组化方法对85例胃癌组织和40例正常胃组织中LYVE-1的表达及淋巴管密度(LVD)进行检测。

**结果:** LYVE-1的阳性产物表达于淋巴管内皮细胞胞质中, 呈棕黄色染色。胃癌组织中LYVE-1阳性LVD显著高于正常胃组织( $7.89 \pm 2.14$  vs  $1.15 \pm 1.62$ ,  $P < 0.01$ ); 瘤周的LYVE-1阳性LVD明显高于瘤内组织( $9.28 \pm 1.18$  vs  $4.75 \pm 1.19$ ,  $P < 0.01$ ); 低分化( $9.21 \pm 2.32$ )、III-IV期( $9.46 \pm 2.45$ )、有淋巴结转移( $9.37 \pm 3.39$ )和远处转移( $9.55 \pm 3.50$ )的胃癌组织中LYVE-1

## ■背景资料

近年来, 随着淋巴管生成特异性调控因子以及淋巴管内皮细胞特异性标志物的相继发现, 已有大量的实验研究表明, 淋巴管生成在肿瘤转移过程中起着不容忽视的作用。目前多数学者倾向于肿瘤淋巴管生成发生在肿瘤周边而不是肿瘤内, 肿瘤细胞淋巴道转移主要是通过诱导肿瘤周边新生淋巴管生成而完成的。

## ■研发前沿

淋巴管生成在肿瘤的淋巴转移过程中可能起着不容忽视的作用。进一步研究肿瘤淋巴管生成、抗淋巴管生成与肿瘤转移的关系, 可能成为下一步研究的前沿和热点。



## ■相关报道

Bono *et al*在对浸润性导管乳腺癌的研究中表明肿瘤内部缺少淋巴管生成,而肿瘤周边淋巴管是增殖的,且肿瘤周边淋巴管密度与乳腺癌的淋巴结转移及不良预后有关。

阳性LVD分别比高中分化( $7.56 \pm 2.24$ )、I-II期( $7.58 \pm 2.36$ )、无淋巴结转移( $7.23 \pm 2.74$ )和远处转移( $7.35 \pm 2.25$ )的明显增高( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。

**结论:** 胃癌组织内及瘤周的LYVE-1阳性LVD明显增高,提示胃癌组织内的新生淋巴管主要位于瘤周,从而促进了肿瘤淋巴道转移。应用组织芯片大规模高效检测临床组织标本是可行的,具有快速、方便、经济、准确的特点。

**关键词:** 胃肿瘤; LYVE-1; 淋巴管生成; 淋巴管密度; 组织芯片

李蕾, 张翠萍, 赵清喜, 刘晖, 李玉军. 应用组织芯片技术研究LYVE-1在胃癌组织中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2006;14(24):2421-2424

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2421.asp>

## 0 引言

胃癌是消化道最常见的恶性肿瘤,淋巴转移是胃癌最常见的转移途径,也是影响胃癌术后复发及5 a生存率的主要原因之一。但是长期以来由于缺乏淋巴管内皮细胞特异性标志物,因而对肿瘤淋巴管生成的研究一直滞后于肿瘤血管生成的研究。而最近发现的淋巴管内皮细胞透明质酸受体-1(LYVE-1)被认为是目前特异性最强的淋巴管内皮细胞标志物之一。本研究应用组织芯片技术和免疫组化方法检测LYVE-1在胃癌组织中的表达,计数淋巴管密度(LVD),以分析胃癌组织中的淋巴管生成情况,并进一步探讨淋巴管生成与肿瘤转移的关系。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集青岛大学医学院附属医院2004-12/2005-10手术切除并经病理证实为胃腺癌的石蜡包埋标本85例。所有患者术前均未接受放疗和化疗。其中高、中分化腺癌29例,低分化腺癌56例;有淋巴结转移者53例,无淋巴结转移者32例;有远处转移者8例,无远处转移者77例;TNM分期: I-II期27例, III-IV期58例。另取40例正常胃组织的石蜡包埋标本(经病理证实基本正常或慢性浅表性胃炎标本)作为对照。

**1.2 方法** 取85例胃腺癌及40例正常胃组织的石蜡包埋标本切片, HE染色, 阅片, 标记HE染色切片上的典型病变区域; 根据需要将组织按不同的种类或顺序设计组织样品的排列方式; 用组织芯片仪(tissue arrayer)在无组织的空白芯片蜡

表 1 胃癌和正常胃组织中LYVE-1阳性LVD的比较 (mean  $\pm$  SD)

组织	n	LVD
胃腺癌组织	85	$7.89 \pm 2.14^b$
瘤周	85	$9.28 \pm 1.18^d$
瘤内	85	$4.75 \pm 1.19$
正常胃组织	40	$1.15 \pm 1.62$

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常胃组织; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 瘤内组织。

块上钻孔(直径2 mm); 借助玻片上的标记找准标本蜡块上的相应部位, 钻孔采集组织芯; 将组织芯转移到空白芯片蜡块的孔中。如此反复将数十个组织芯整齐有序地安插在空白芯片蜡块中, 制成组织芯片蜡块。将组织芯片蜡块3-4  $\mu$ m连续切片, 胶片捞片, 常规HE染色复核诊断。用PV-9000二步法免疫组化染色, 兔抗人LYVE-1多克隆抗体工作浓度为1:200。操作步骤按照试剂盒说明书进行, 以PBS溶液代替一抗作为阴性对照, 用已知LYVE-1阳性肺鳞癌组织切片作为阳性对照。LYVE-1免疫组化染色阳性物质主要定位于细胞质, 呈棕黄色细颗粒状。将LYVE-1染色棕黄色的内皮细胞簇或内皮细胞形成的条状、隙状结构及有管腔者作为一个淋巴管计数。每例组织首先在低倍镜下随机选择3个淋巴管着色最密集的区域, 然后在200倍光镜下分别计数淋巴管数, 取3个视野的均值作为LVD。

**统计学处理** 采用SPSS 11.0统计学软件进行方差分析和t检验。

## 2 结果

**2.1 LYVE-1和LYVE-1阳性LVD在胃癌和正常胃组织中的表达** LYVE-1的阳性产物表达于淋巴管内皮细胞胞质中, 呈棕黄色染色。胃癌组织中LYVE-1阳性的管腔为新生的淋巴管, 主要位于瘤周间质内, 在扩张的LYVE-1阳性的淋巴管腔中可发现肿瘤栓子。胃癌组织中LYVE-1阳性LVD高于正常胃组织( $P < 0.01$ , 表1); 瘤周的LYVE-1阳性LVD高于瘤内( $P < 0.01$ , 表1, 图1)。

**2.2 LYVE-1阳性LVD与胃癌临床病理特征的关系** 低分化胃腺癌中的LVD显著高于高、中分化胃腺癌( $P < 0.01$ ); TNM分期: III-IV期的LVD显著高于I-II期( $P < 0.05$ ); 有淋巴结转移的LVD显著高于无淋巴结转移的( $P < 0.01$ ); 有远处转移的LVD显著高于无远处转移的( $P < 0.05$ , 表2)。

## 3 讨论

临床和病理研究已经证实淋巴道转移是大多数

## ■应用要点

本文观察LYVE-1在胃癌组织中的表达, 计数淋巴管密度, 以分析胃癌组织中的淋巴管生成情况, 并进一步探讨淋巴管生成与肿瘤转移的关系, 为胃癌的治疗提供依据。

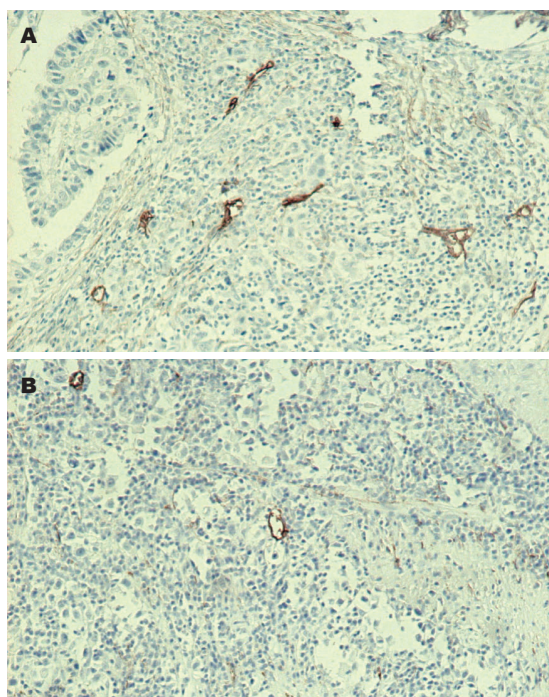


图1 胃癌组织LYVE-1阳性淋巴管( $\times 200$ )。A: 瘤周; B: 瘤内。

实体肿瘤播散的早期事件,是肿瘤细胞播散的重要途径之一<sup>[1-2]</sup>。近年来,随着淋巴管生成特异性调控因子以及淋巴管内皮细胞特异性标志物的相继发现,已有大量的实验研究表明,淋巴管生成在肿瘤转移过程中起着不容忽视的作用<sup>[3-4]</sup>。目前多数学者倾向于肿瘤淋巴管生成发生在肿瘤周边而不是肿瘤内,肿瘤细胞淋巴道转移主要是通过诱导肿瘤周边新生淋巴管生成而完成的。检测肿瘤组织中的淋巴管密度,可作为评价肿瘤淋巴管生成及判断肿瘤转移与预后的一个指标<sup>[5-6]</sup>。

LYVE-1被认为是特异性最强的淋巴管内皮细胞标志物之一,本实验采用免疫组化方法对胃癌中LYVE-1表达及淋巴管生成情况的研究发现,LYVE-1表达在淋巴管内皮细胞胞质中,呈棕黄色细颗粒状。胃癌组织中LYVE-1阳性LVD明显高于正常胃组织,瘤周的LYVE-1阳性LVD明显高于瘤内的,低分化、III-IV期、有淋巴结转移和远处转移的胃癌组织中LYVE-1阳性LVD明显高于高中分化、I-II期、无淋巴结转移和远处转移的,差异均有统计学意义;表明胃癌组织内有新生淋巴管生成,且淋巴管生成主要位于瘤周,从而增加了肿瘤发生淋巴道转移的机会。目前肿瘤抗淋巴管生成治疗尚处于实验阶段,我们可以进一步在动物模型中进行胃癌抗淋巴管生成研究,从而探索抗淋巴管生成技术在降低淋巴

表2 LYVE-1阳性LVD与胃癌临床病理特征的关系(mean  $\pm$  SD)

临床病理特征	n	LVD
分化程度		
高、中分化腺癌	29	7.56 $\pm$ 2.24
低分化腺癌	56	9.21 $\pm$ 2.32 <sup>b</sup>
TNM分期		
I-II期	27	7.58 $\pm$ 2.36
III-IV期	58	9.46 $\pm$ 2.45 <sup>a</sup>
淋巴结转移		
阳性	53	9.37 $\pm$ 3.39 <sup>b</sup>
阴性	32	7.23 $\pm$ 2.74
远处转移		
阳性	8	9.55 $\pm$ 3.50 <sup>a</sup>
阴性	77	7.35 $\pm$ 2.25

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

管生成进而抑制肿瘤淋巴道转移方面的作用。

组织芯片又称组织微阵列(tissue microarray, TMA),是1998年由Kononen *et al*<sup>[7]</sup>在cDNA微阵列的基础上发明的一种特殊的生物芯片。其原理是根据不同需要,将成百上千个小块组织样本高密度地固定排列在一个阵列蜡块上,然后切片进行免疫组化、原位杂交或其他分子病理检测,以研究目的基因或其表达产物在不同组织、不同肿瘤以及肿瘤不同发展阶段之间的表达差异情况。组织芯片具有体积小、信息含量高、并可根据不同需要进行组合和设计的特点,一次性实验即可获得大量结果<sup>[8]</sup>。该技术对于原始病理资料的保存和大量样本的回顾性研究具有重要的意义<sup>[9]</sup>。目前,有不少研究者已经通过实验证实应用组织芯片进行原位杂交和免疫组化检测所得结果与常规切片技术所得结果具有很高的一致性<sup>[9-12]</sup>。组织芯片还可与基因芯片组成联合检测系统,快速、高效地分析鉴定基因芯片筛选出的众多候选标志基因及其表达产物<sup>[13]</sup>。一个组织芯片蜡块除了可做100张以上连续切片,还可利用同一套组织芯片迅速地对上百种生物分子标记进行分析、检测,因而倍受组织病理学家的重视。我们制作了85例胃癌和40例正常胃组织的组织芯片,每张组织芯片上40-50个样品,排列整齐,外形为圆形或类圆形,没有脱片现象。仅用几张芯片就完成了全部实验,极大节约了研究经费,降低了劳动量。因此,应用组织芯片大规模高效检测临床组织样本是可行的,具有快速、方便、经济、准确的特点。

#### 4 参考文献

- 1 Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin

#### ■名词解释

1 淋巴管内皮特异性标志物:是指可以确认淋巴管内皮的特异分子,是区分淋巴管内皮与血管内皮的重要标志。  
2 组织芯片又称组织微阵列(TMA):是将数十个、数百个乃至上千个小块组织样本高密度地固定排列在一个阵列蜡块上,然后切片进行免疫组化、原位杂交或其它分子病理检测,以研究目的基因或其表达产物在不同组织、不同肿瘤以及肿瘤不同发展阶段之间的差异表达情况。

## ■同行评价

本文研究LYVE-1在胃癌组织中的表达,并对LYVE-1阳性表达淋巴管密度进行检测,发现其与胃癌分化程度、分期及转移显著相关,具有较高的科学价值,研究采用组织芯片这一较新的技术,结果可靠,文字叙述简明清晰。

- ME, Alitalo K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 573-583
- 2 He Y, Karpanen T, Alitalo K. Role of lymphangiogenic factors in tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1654: 3-12
- 3 Williams CS, Leek RD, Robson AM, Banerji S, Prevo R, Harris AL, Jackson DG. Absence of lymphangiogenesis and intratumoural lymph vessels in human metastatic breast cancer. *J Pathol* 2003; 200: 195-206
- 4 Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, Kubo H, Yla-Herttuala S, Jaattela M, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res* 2001; 61: 1786-1790
- 5 Nathanson SD, Zarbo RJ, Wachna DL, Spence CA, Andrzejewski TA, Abrams J. Microvessels that predict axillary lymph node metastases in patients with breast cancer. *Arch Surg* 2000; 135: 586-593; discussion 593-594
- 6 Maeda K, Chung YS, Ogawa Y, Takatsuka S, Kang SM, Ogawa M, Sawada T, Sowa M. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 1996; 77: 858-863
- 7 Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998; 4: 844-847
- 8 周小鸽, 张劲松, 张小平, 张野. 组织芯片. 中华病理学杂志 2002; 31: 70-72
- 9 Pacifico MD, Grover R, Richman P, Daley F, Wilson GD. Validation of tissue microarray for the immunohistochemical profiling of melanoma. *Melanoma Res* 2004; 14: 39-42
- 10 Hendriks Y, Franken P, Dierssen JW, De Leeuw W, Wijnen J, Dreef E, Tops C, Breuning M, Brocker-Vriends A, Vasen H, Fodde R, Morreau H. Conventional and tissue microarray immunohistochemical expression analysis of mismatch repair in hereditary colorectal tumors. *Am J Pathol* 2003; 162: 469-477
- 11 Fernebro E, Dictor M, Bendahl PO, Ferno M, Nilbert M. Evaluation of the tissue microarray technique for immunohistochemical analysis in rectal cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126: 702-705
- 12 Gancberg D, Di Leo A, Rouas G, Jarvinen T, Verhest A, Isola J, Piccart MJ, Larsimont D. Reliability of the tissue microarray based FISH for evaluation of the HER-2 oncogene in breast carcinoma. *J Clin Pathol* 2002; 55: 315-317
- 13 Hao X, Sun B, Hu L, Lahdesmaki H, Dunmire V, Feng Y, Zhang SW, Wang H, Wu C, Wang H, Fuller GN, Symmans WF, Shmulevich I, Zhang W. Differential gene and protein expression in primary breast malignancies and their lymph node metastases as revealed by combined cDNA microarray and tissue microarray analysis. *Cancer* 2004; 100: 1110-1122

电编 李琪 编辑 张焕兰

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

• 消息 •

## 全国消化系疾病的诊疗进展学习班通知

本刊讯 由福建医科大学附属协和医院承办的国家级继续医学教育项目《消化系疾病的诊疗进展》将于2006-10-14/18在福建省武夷山市举行, 学习班授予 I 类继续教育学分11分, 欢迎全国消化系病专业中高级医务人员报名参加。

联系人: 陈运新, xinxinge75@sohu.com, 0591-83357896转8482.

地址: 福建省福州市新权路29号福建医科大学附属协和医院, 邮编: 350001.



# 脐血干细胞转化为肝细胞的研究进展

赵淑磊, 刘吉勇, 杨崇美

赵淑磊, 刘吉勇, 杨崇美, 山东大学山东省立医院消化科 山东省济南市 250021

山东省自然科学基金资助课题, No. Y2002C10

通讯作者: 刘吉勇, 250021, 山东省济南市, 山东省立医院消化科. wenzhu24@yahoo.com.cn

电话: 0531-86641972

收稿日期: 2006-06-08 接受日期: 2006-06-23

## 摘要

自进行第1例脐血干细胞移植以来, 各国科研机构相继开展对于脐血干细胞的研究, 脐血库也纷纷建立. 随着再生医学的发展, 众多国内外学者在尝试进行非肝源性细胞向肝细胞分化方面的研究, 并已经证实脐血干细胞在特定的微环境下可以在体内和体外转化为肝样细胞, 为脐血干细胞在肝脏疾病中的应用奠定了基础. 本文就脐血干细胞向肝细胞转化的最新研究进展作一综述.

**关键词:** 脐血; 干细胞; 肝细胞

赵淑磊, 刘吉勇, 杨崇美. 脐血干细胞转化为肝细胞的研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(24):2425-2427

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2425.asp>

## 0 引言

干细胞具有特定的分化潜能, 表现为他具有全能性、多能性和专能性的特点. 近年来, 已经在几乎所有的组织中发现了干细胞的存在. 因此, 如果科学家能够控制干细胞的分裂过程, 从而诱导其向特定的功能细胞分化, 就能够制造出不同的细胞及器官, 用于细胞或器官移植. 目前, 胚胎干细胞以及各种成体干细胞(包括骨髓干细胞、脐血干细胞以及各种组织来源的干细胞)已经成功地在体外被分离、培养和鉴定. 然而胚胎干细胞虽具有全能性, 理论上可以向各个胚层分化, 但分离培养困难以及所存在的伦理学问题限制了他的发展; 骨髓干细胞及各组织来源干细胞都存在来源有限的缺点; 与之相比, 脐血干细胞来源广泛、对于供者无痛苦、易于接受, 且较骨髓干细胞更为“幼稚”, 从而使其具有更诱人的应用前景.

## 1 脐血干细胞转化为肝细胞的研究

1.1 体外 研究表明, 通过添加几种生长因子, 脐血干细胞可以被诱导分化成为有功能的肝样细胞, 并且表达肝细胞相关的标记. 目前常用于诱导分化的生长因子, 包括成纤维细胞生长因子(FGF)、干细胞因子(SCF)、白血病抑制因子(LIF)、表皮生长因子(EGF)、肝细胞生长因子(HGF)、制瘤素M (OSM)等, 其中以HGF最为重要. Kakinuma *et al*<sup>[1]</sup>通过比较各种不同的生长因子组合对于脐血干细胞向肝细胞转化的影响, 发现在含有HGF, FGF-1, FGF-2, SCF, LIF的培养基内ALB mRNA的表达最强, 而缺乏HGF时则几乎检测不到ALB mRNA的表达; 有学者认为, HGF可能对于白蛋白的表达并不起到增强的作用, 但是缺少HGF时却不能诱导干细胞转化为有功能的肝细胞<sup>[2-3]</sup>, Wang *et al*<sup>[4]</sup>证实在含有硬化的肝贮脂细胞(CFSC)和HGF的饲养层培养条件下可以诱导脐血来源的 $\beta_2m^+c\text{-Met}^+$ 细胞表达肝细胞谱系标志(ALB, AFP, CK18, CK19等); McGuckin *et al*<sup>[5]</sup>第一次报道了在通过免疫磁珠法分离去除粒细胞、红细胞及某些造血祖细胞后, 在与血小板生成素、flt3配基及c-Kit配基共同培养7 d后, 可以观察到类似胚胎克隆的胚胎样干细胞成簇生长, 并检测到了胚胎干细胞特有的标志(如TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA-4, SSEA-3, Oct-4)的表达, 提示可以通过脐血干细胞诱导生成具有向各个胚层分化潜能的胚胎干细胞, 并且在处于含有HGF, bFGF, EGF, c-Kit配基的肝脏三维培养系统中培养4 wk后检测到肝样细胞的产生; Lee *et al*<sup>[6]</sup>将分离于脐血的间充质干细胞(MSC)通过2步法分别诱导其分化和成熟, 可以产生有功能的肝细胞, 并表达肝细胞特征性的标记, 认为HGF和OSM分别能够促进MSC向肝细胞的转化以及肝细胞自身的成熟; 另外还关于联合应用FGF4和HGF成功诱导脐血MSC定向分化为肝细胞的报道<sup>[7-8]</sup>.

1.2 体内 脐血干细胞向肝细胞的转化最早是在动物实验中得到证实, 研究者通过将干细胞注入急性肝损伤小鼠体内, 数日后可以在小鼠肝

## ■背景资料

随着社会经济和科学技术的发展, 许多疑难病症都已经找到了有效的治疗方法, 尤其是预防疫苗和强力抗生素的应用, 严重威胁人类健康的烈性传染性疾病已经得到了有效的控制和消除. 但许多疾病, 如肝硬化、恶性肿瘤、糖尿病、帕金森氏病、心脑血管病等临床上仍然没有理想的治疗措施. 最近几年, 干细胞技术的发展为这些难治性疾病的彻底治愈带来了新的希望.

## ■研发前沿

由于来源广泛、对供者无痛苦、免疫原性低, 对于脐血干细胞的研究越来越受到国内外学者的重视. 脐血干细胞在体内外向肝样细胞的成功转化也屡见报道, 但如何将其应用于临床尚存在难点.

## ■相关报道

已经发现多种生长因子可以在体外诱导脐血干细胞向肝细胞分化,并证实将脐血干细胞移植到NON-SCID鼠体内可以检测到肝细胞标记的表达。

组织切片中检测到肝细胞谱系的标记,表明肝组织损伤可能是激活干细胞增殖和分化的前提;但有文章提出在没有肝损伤的动物体内移植脐血干细胞后,也可以实现这种转化<sup>[9-11]</sup>。(1)肝损伤动物模型的建立:非肥胖型糖尿病合并免疫缺陷(NON-SCID)小鼠是一种经改造后的重度复合免疫缺损小鼠,他不会排斥所移植的细胞,在连续7 d给NON-SCID鼠注射肝细胞增殖抑制剂2-乙酰氨基(2-AAF)后进行部分肝切除术,从而建立肝损伤模型<sup>[1]</sup>,然后通过门静脉进行脐血干细胞移植;其他的肝损伤模型包括四氯化碳肝损伤模型、乙醇肝损伤模型以及放射性肝损伤模型等;另外在Fas介导的肝损伤模型输入脐血后也可以检测到肝细胞谱系标记<sup>[12]</sup>。(2)脐血干细胞移植:Kakinuma *et al*<sup>[11]</sup>通过将脐血单个核细胞移植入肝损伤小鼠体内,在4-55 wk均检测到了肝细胞相关基因的表达,并在20 wk后可以通过FISH检测到小鼠肝脏组织切片中人X染色体着丝粒DNA的存在;Danet *et al*<sup>[13]</sup>分离于脐血单个核细胞的C1qRp<sup>+</sup>干细胞在受体鼠内同样也可以实现这种转化,推测C1qRp<sup>+</sup>干细胞可能是一种同时具有分化为造血细胞和肝细胞潜能的新型干细胞,他在CD34<sup>+</sup>和CD34<sup>-</sup>细胞都有表达;Nonome *et al*<sup>[12]</sup>将CD34<sup>+</sup>和CD34<sup>-</sup>细胞植入Fas介导的肝损伤小鼠模型体内,均检测到了肝细胞标记的表达,且两者没有显著性的差异;Kollet *et al*<sup>[14]</sup>以及Son *et al*<sup>[15]</sup>通过体内外研究认为SDF-1-CXCR4轴、HGF-c-Met轴以及MMP可能在脐血干细胞向受损伤肝组织的浓集中起重要作用。

## 2 脐血干细胞向肝细胞转化的标记

为了证实脐血干细胞能够转化为肝细胞,我们必须明确转化成功后的检测标记。例如通过RT-PCR可以检测到ALB, AFP, CK18, CK19, HGF, TAT, GS, CPS, HNF4, GAPDH, PEPCK等肝细胞特有蛋白或酶mRNA的表达,利用免疫组化、免疫荧光染色、Western印记等方法检测肝细胞胞质内AFP, ALB, CK18, CK19等特异性蛋白的存在;基于转化中基因表达的阶段性,我们把这些肝细胞谱系标志划分为两组<sup>[16]</sup>:ALB, AFP, CK18, CK19, GS属于早期肝细胞标记,而TAT, HGF, PEPCK, CPS等则归为晚期肝细胞标记,细胞在不同的分化及成熟阶段可以检测到不同的肝细胞标记的表达;同时还需要检测反映成熟肝细胞功能的指标,包括肝细胞分泌尿素及摄取LDL的能力、苯巴比妥诱导肝细胞色素P450

的活性、PAS染色鉴定糖原贮存功能等。此外,在转化过程中干细胞也会发生相应的形态学改变。

## 3 脐血干细胞向肝细胞转化的机制

虽然在体内和体外均有转化成功的报道,但是究竟是脐血中哪种干细胞通过何种方式转化为肝细胞还不是十分明确。

3.1 转化的干细胞类型 脐血中含有包括造血干细胞(HSC)、间充质干细胞(MSC)和多能祖细胞(MAPC)等在内的多种类型的干细胞,但在诱导分化中究竟是哪一种干细胞实现了转化尚存在分歧。Ishikawa *et al*<sup>[17]</sup>将分离的CD34<sup>+</sup>或CD45<sup>+</sup>细胞移植到NON-SCID鼠体内,通过免疫组化证实人白蛋白的表达,受体鼠骨髓内人CD45<sup>+</sup>细胞占21.0%-45.9%;Danet *et al*<sup>[13]</sup>则报道源于脐血的C1qRp<sup>+</sup>干细胞可以在受体鼠内转化为肝细胞;而脐血来源的 $\beta_2$ m<sup>+</sup>c-Met<sup>+</sup>细胞在体外一定条件下也能实现这种转化<sup>[4]</sup>。总之,HSC和一些源于HSC的成体祖细胞可能对于这种分子重构起着重要的作用。2000年,Erices *et al*<sup>[18]</sup>将分离的脐血单个核细胞在体外培养获得MSC以来,他的地位越来越受到重视,很多研究小组已通过各种不同的方法在体外成功诱导脐血MSC向肝细胞转化<sup>[6-8,16]</sup>。

3.2 转化的方式 在关于干细胞通过与已存在的分化细胞自发性地融合产生肝样细胞的报道<sup>[19-20]</sup>后,成体干细胞的可塑性一度受到质疑。但Jang *et al*<sup>[21]</sup>将造血干细胞与受损伤的肝组织共同培养,并在两者之间隔以0.4  $\mu$ m尼龙膜,仍然检测到了干细胞向肝细胞转化的证据,认为造血干细胞可以在没有融合的前提下数日内转化为肝细胞。另外,一些研究显示,通过FISH分析可以检测到受体鼠肝组织人着丝粒DNA的存在,从而排除了在转化中自发性细胞融合的可能<sup>[1]</sup>。尽管对于是融合还是转化促成这种改变还存在争议,但是从临床的观点出发,最重要的一点就是产生了有功能的肝细胞,并使受损的肝组织得到了恢复。

目前,我国乙肝携带者超过1亿,每年死于终末期肝病的人数大于30万。异基因肝移植仍被认为是治疗终末期肝病的最佳手段,但由于供体有限、移植后GVHD发生率高、需长期服用抗排斥药物及费用昂贵,其应用受到了很大的限制,迫切需要一种替代疗法。因此,脐血干细胞向肝细胞转化的研究倍受重视,但其诱导

## ■应用要点

对于难以逆转的慢性肝病和终末期肝衰竭,肝移植或肝细胞移植是最理想的治疗途径,但两者都存在肝源有限的缺点。如果能够在体外诱导脐血干细胞转化为肝细胞,并用他来替代坏死或损伤的肝组织,将为肝病患者的带来希望。

分化机制以及促转化因子等尚存在难点. 一旦问题得到解决, 利用脐血干细胞作为肝细胞移植的来源治疗终末期肝病将成为一种新的治疗肝功能衰竭的手段, 不但能够替换坏死和损伤的肝细胞, 而且还有利于患者造血功能及免疫功能的改善. 如果我们能够冷藏保存新分离的脐血干细胞, 并在体外大规模地诱导其转化为肝细胞以作为肝细胞移植的来源, 就能够最终解决异基因肝移植存在的供体短缺和伦理学问题, 将对终末期肝病的治疗引入一个新的境界.

#### 4 参考文献

- Kakinuma S, Tanaka Y, Chinzei R, Watanabe M, Shimizu-Saito K, Hara Y, Teramoto K, Arii S, Sato C, Takase K, Yasumizu T, Teraoka H. Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. *Stem Cells* 2003; 21: 217-227
- Chinzei R, Tanaka Y, Shimizu-Saito K, Hara Y, Kakinuma S, Watanabe M, Teramoto K, Arii S, Takase K, Sato C, Terada N, Teraoka H. Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes. *Hepatology* 2002; 36: 22-29
- Kania G, Blyszczuk P, Jochheim A, Ott M, Wobus AM. Generation of glycogen- and albumin-producing hepatocyte-like cells from embryonic stem cells. *Biol Chem* 2004; 385: 943-953
- Wang Y, Nan X, Li Y, Zhang R, Yue W, Yan F, Pei X. Induction of umbilical cord blood-derived beta2m-c-Met+ cells into hepatocyte-like cells by coculture with CFSC/HGF cells. *Liver Transpl* 2005; 11: 635-643
- McGuckin CP, Forraz N, Baradez MO, Navran S, Zhao J, Urban R, Tilton R, Denner L. Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. *Cell Prolif* 2005; 38: 245-255
- Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004; 40: 1275-1284
- 孙艳, 段芳龄, 陈香宇, 孙嫣, 李玉龙, 曾艳丽, 王豪勋. 体外诱导人脐血间充质干细胞向肝细胞样细胞分化的研究. *胃肠病学和肝病杂志* 2004; 13: 239-243
- Kang XQ, Zang WJ, Bao LJ, Li DL, Song TS, Xu XL, Yu XJ. Fibroblast growth factor-4 and hepatocyte growth factor induce differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7461-7465
- Huang S, Yam H, Pang C, Chen M, Gong Z, Zeng F, Ling S, Zeng Y. The expression of human specific proteins in liver tissue of chimeric goats engrafted with human hematopoietic stem cells. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002; 82: 894-898
- Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170
- Almeida-Porada G, Porada CD, Chamberlain J, Torabi A, Zanjani ED. Formation of human hepatocytes by human hematopoietic stem cells in sheep. *Blood* 2004; 104: 2582-2590
- Nonome K, Li XK, Takahara T, Kitazawa Y, Funeshima N, Yata Y, Xue F, Kanayama M, Shinno E, Kuwae C, Saito S, Watanabe A, Sugiyama T. Human umbilical cord blood-derived cells differentiate into hepatocyte-like cells in the Fas-mediated liver injury model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G1091-1099
- Danet GH, Luongo JL, Butler G, Lu MM, Tenner AJ, Simon MC, Bonnet DA. C1qRp defines a new human stem cell population with hematopoietic and hepatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 10441-10445
- Kollet O, Shvitzel S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, Kahn J, Spiegel A, Dar A, Samira S, Goichberg P, Kalinkovich A, Arenzana-Seisdedos F, Nagler A, Hardan I, Revel M, Shafritz DA, Lapidot T. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest* 2003; 112: 160-169
- Son BR, Marquez-Curtis LA, Kucia M, Wysoczynski M, Turner AR, Ratajczak J, Ratajczak MZ, Janowska-Wieczorek A. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells* 2006; 24: 1254-1264
- Hong SH, Gang EJ, Jeong JA, Ahn C, Hwang SH, Yang IH, Park HK, Han H, Kim H. In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330: 1153-1161
- Ishikawa F, Drake CJ, Yang S, Fleming P, Minamiguchi H, Visconti RP, Crosby CV, Argraves WS, Harada M, Key LL Jr, Livingston AG, Wingard JR, Ogawa M. Transplanted human cord blood cells give rise to hepatocytes in engrafted mice. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 996: 174-185
- Erices AA, Allers CI, Conget PA, Rojas CV, Mingueíl JJ. Human cord blood-derived mesenchymal stem cells home and survive in the marrow of immunodeficient mice after systemic infusion. *Cell Transplant* 2003; 12: 555-561
- Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003; 422: 897-901
- Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003; 422: 901-904
- Jang YY, Collector MI, Baylin SB, Diehl AM, Sharkis SJ. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 532-539

#### ■同行评价

本文综述了脐血干细胞向肝细胞分化的研究进展, 对同行有一定参考意义, 对脐血干细胞移植治疗肝病有启示作用.

电编 张敏 编辑 潘伯荣



# 壁虎治疗肿瘤的研究进展

杨金霞, 王学美

## ■背景资料

恶性肿瘤严重危害人类健康, 寻找治疗肿瘤的有效药物具有重大的现实意义. 大量的临床报道证明, 壁虎治疗恶性肿瘤效果显著, 尤其是消化道肿瘤.

杨金霞, 王学美, 北京大学中西医结合研究所, 北京大学第一医院中西医结合研究室 北京市 100034  
杨金霞, 北京大学中西医结合研究所, 北京大学第一医院中西医结合研究室博士生, 主要研究抗癌中药药理学.  
国家中医药管理局资助项目, No. 04-05ZP04  
国家自然科学基金资助项目, No. 30472137  
通讯作者: 王学美, 100034, 北京市西城区西什库大街8号, 北京大学中西医结合研究所, 北京大学第一医院中西医结合研究室.  
wangxuemei64@sohu.com  
电话: 010-66551122-3053 传真: 010-66551328  
收稿日期: 2006-05-10 接受日期: 2006-07-08

## 摘要

壁虎在治疗恶性肿瘤方面有确切疗效. 本文就壁虎在治疗肿瘤的临床应用及其药理作用进行了综述. 并结合我们的工作对壁虎治疗肿瘤的研究进行了小结和展望.

**关键词:** 壁虎; 抗肿瘤

杨金霞, 王学美. 壁虎治疗肿瘤的研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(24):2428-2431  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2428.asp>

## 0 引言

中药壁虎别名蝎虎、天龙、守宫, 守宫始见于《本草经集注》. 为爬行纲有鳞目壁虎科无蹼壁虎(*Gekko swinhonis* Gunther)或多痣壁虎(多疣壁虎*Gekko japonicus* Cdumerit et Bi)及其他几种壁虎的干燥全体. 大量的临床报道证明, 壁虎治疗恶性肿瘤效果显著, 尤其是消化道肿瘤. 现将壁虎在治疗肿瘤的临床应用及其药理作用作一综述.

## 1 壁虎抗肿瘤的临床应用

壁虎抗肿瘤临床用法主要有内服和外用2大类.

1.1 内服 (1)煎剂: 辨证论治是中医的精髓, 将壁虎加入复方中辨证应用, 效果相得益彰. 李建生 *et al*<sup>[1-4]</sup>治疗大肠癌、肺癌、食道癌和胃癌, 壁虎是常用中药基本方固定的一味, 并加服金龙胶囊, 可以明显控制肿瘤发展, 延长生存期, 提高生活质量. 骆洪道<sup>[5]</sup>以痰瘀并化、软坚散结之法, 将全蝎与壁虎配对, 结合现代药理研究进行辨证选药, 治疗颈部肿瘤如甲状腺腺瘤、咽后

壁乳头状瘤、舌根部恶性淋巴瘤获得良效. 周岱翰 *et al*<sup>[6]</sup>治疗肺癌, 临床上辨证施治, 几乎每个方中均用壁虎, 临床疗效显著, 明显延长生存期. 单国英 *et al*<sup>[7]</sup>用华虎内攻汤(由多味中药制成, 用炙壁虎6 g)及热敷消癌散(多味中药制成, 用炙壁虎20 g)治疗原发性肝癌118例, 治愈34例, 占28.81%, 临床治愈39例, 占33.05%, 显效40例, 占33.90%, 无效5例, 占4.24%, 总有效率为95.76%. 经观察瘤块消失时间最长者用药150 d, 最短者用药60 d, 平均用药时间105 d. (2)散剂: 魏西云<sup>[8]</sup>取活壁虎1只, 烘黄研末温开水冲服, 每日1只, 同时加用壁虎酒, 用于治疗肝脏转移癌1例, 服药3 d后疼痛明显减轻, 精神好转, 食欲增加, 1 mo疼痛完全消失, B超示肝脏体积及肿块明显缩小, 服药期间未发现不良反应. 金汉明<sup>[9]</sup>用壁虎1.2 g/d, 研细末分2次吞服, 配以硼砂、槟榔、丁香、荞麦面适量按照一定的制作方法, 制成治食管癌的验方, 患者服2 mo临床症状消失. 吴本端<sup>[10]</sup>用复方壁虎粉(制备方法: 将壁虎微火焙干至黄色或黄褐色, 研为细末备用以3 g壁虎粉和5-FU 100 mg, 研为细末混匀)来治疗中晚期食管癌105例. 临床观察证明, 口服此复方壁虎粉, 结合放疗能迅速缓解食管癌患者吞咽困难的症状, 值得临床推广使用. 朱秀山 *et al*<sup>[11]</sup>用昭黄散(由壁虎、三七、大黄、藤梨根、蓬术、太子参、白术等组成)来治疗胃癌, 通过对72例中晚期胃癌的临床观察, 结果显示, 该药近期有效率为33.3%, 与化疗组相近, 而在防止肿瘤进展, 提高生存质量, 延长生存期方面均明显优于化疗组, 而其毒副作用则较化疗为轻. (3)丸剂: 叶淑华 *et al*<sup>[12]</sup>用抗癌通道丸(硼砂、丁香、姜半夏、壁虎、乳香、人参、三七粉、白矾、麝香、皂刺、儿茶、全蝎、雄黄等), 治疗晚期食道癌食道梗阻42例, 可显著改善梗阻症状, 延长患者的生存期. (4)酒剂: 易林桂<sup>[13]</sup>报道壁虎酒(活壁虎加白酒制成)治疗中晚期食道癌1例, 随访9 a未复发, 说明壁虎酒有一定的远期疗效. 李建华<sup>[14]</sup>用天龙酒(壁虎、半枝莲、急性子、威灵仙、白酒等经加工

炮制)治疗食管癌贲门癌143例, 患者服用后进食效果明显. 华安<sup>[15]</sup>提到用壁虎酒(壁虎50 g, 夏季用活壁虎10条, 泽漆100 g, 锡块50 g, 用黄酒1000 mL浸泡5-7 d, 滤去药渣, 制成), 治疗42例食道癌患者, 患者的治愈率达31%, 总有效率为93%. 魏西云<sup>[18]</sup>提到的壁虎酒是将一只活壁虎放入锡壶内加白酒100 mL煮沸, 治疗肝脏转移癌1例, 效果显著. 陈光伟<sup>[16]</sup>采用壁虎酒治疗食道癌, 对改善食道癌引起的吞咽困难、胸痛症状有明显的效果. (5)冻干粉: 近年来, 金龙胶囊治疗癌症取得了一定疗效. 金龙胶囊主要由鲜壁虎、鲜金钱白花蛇、鲜蕲蛇3味动物药组成, 壁虎具有透筋达络滋阴破瘀散结解毒的功效, 是治癌要药, 为君药. 金钱白花蛇功能通络、搜风、破郁、降痰、解毒、散结、止痉, 辅助君药以加强破瘀散结、解郁通络的功能. 蕲蛇入肝经, 性善走窜, 内走于脏腑, 外彻于皮毛, 透骨通经散结, 既可加强君药破瘀散结解毒, 又可使臣药的通络解郁散结力量加强, 为方中之佐使药. 3味药合用共奏滋阴破瘀散结, 解郁通络之功<sup>[17]</sup>. 金龙胶囊的最大特点是整个工艺过程采用温和条件, 不经强酸、强碱、高温及有机溶剂(或其他化学试剂)处理, 其最终产物保留了天然动物、植物所含的丰富物质<sup>[18]</sup>. 而传统的动物药加工方法是将动物的药用部分晒干或焙干, 或服用时进行煎煮, 破坏了动物体内大部分非常有价值的生物活性物质, 尤以蛋白类物质变性与破坏最为突出, 大大降低了动物药的疗效, 加之保存条件的限制, 动物药临床疗效的提高受到了很大的限制<sup>[19]</sup>. 金龙胶囊是经超低温破碎及反复冻融处理, 使胞内各种有效成分充分释放, 并在低温下迅速进行生化技术处理而制成的, 制作工艺中尽可能地提取了药物的全部有效成分并保持了生物分子的天然活性. 近年来, 有关金龙胶囊治疗肿瘤的临床报道很多, 尤其常用于原发性肝癌、食道癌、胃癌等多种消化道肿瘤的治疗, 或作为辅助治疗方法, 均有较好的疗效, 能显著提高患者的生存质量<sup>[20-44]</sup>.

1.2 外用 壁虎末外敷缓解肿瘤疼痛效果显著. 司百忍 *et al*<sup>[45]</sup>采用中药透皮治疗癌性疼痛25例, 药物按照以下比例配成: 马钱子1、洋金花1、蜈蚣4、全虫4、壁虎4、水蛭4、山甲4、川乌2、草乌2、南星2、细辛2、冰片2. 取药粉适量用食醋调成糊状敷于疼痛部位, 敷药面积要超出疼痛面积边缘约0.3-0.5 cm, 3-5 d换药1次, 直

至疼痛减轻或消失为止. 均用本方止痛, 不用其他止痛药物. 结果全部有效. 疼痛完全缓解13例, 明显缓解11例, 缓解1例. 本方止痛起效时间10-15 min, 持续时间3-5 d, 止痛强度相当于2-4支杜冷丁.

## 2 壁虎抗肿瘤的实验研究

2.1 含壁虎的复方抗肿瘤的实验研究 朱秀山 *et al*<sup>[41]</sup>发现昭黄散(含有壁虎的复方散剂)对实验性肿瘤有显著的抑制作用, 抑瘤率在35%以上, 且能延长荷瘤小鼠的生存期, 加强其免疫功能. 昭黄散的抑瘤率虽不如环磷酰胺, 但对荷瘤小鼠的生命延长率和免疫功能的影响都显著优于环磷酰胺. 许继平 *et al*<sup>[46]</sup>对昭黄散抗肿瘤作用及其对免疫状态的影响进行了实验研究, 结果表明, 昭黄散抗肿瘤作用虽然没CTX抑瘤率明显, 但抑瘤作用在同类清热解毒中药中比较明显, 其抑瘤率对S180荷瘤小鼠在35.2%-41.4%之间, 肝癌实体瘤荷瘤小鼠在38.8%-45.5%, 提示抗肿瘤作用显著. 同时对免疫功能的4项指标中, 对白细胞素II、T、B淋巴细胞转化率、NK细胞活性都有明显的促进作用, 与单纯荷瘤组、CTX组对比差异显著, 提示在抗肿瘤的基础上又有明显的促免疫功能及双向调节作用. 杨勤建 *et al*<sup>[47-48]</sup>采用血清药理学和分子生物学的技术方法, 研究发现以白术、半夏、壁虎、九香虫等组方的香龙散含药血清, 不仅可以造成人胃癌细胞的DNA链断裂, 进而诱导其凋亡, 并且能够使抑制细胞凋亡的**bcl-2**基因表达减弱, 使促进细胞凋亡的**bax**, **p16**基因表达增强; 不同的含药血清浓度、不同的作用时间与细胞凋亡有一定的相关性. 赵冬梅 *et al*<sup>[49]</sup>研究金龙胶囊对人白血病细胞的作用及其机制发现金龙胶囊对白血病细胞有诱导凋亡的作用, 主要作用于S期. 刘玉琴 *et al*<sup>[50-52]</sup>发现金龙胶囊可显著抑制肿瘤的复发、转移, 作用机制包括促进肿瘤细胞分化和促进肿瘤细胞间通讯.

### 2.2 单味壁虎抗肿瘤的实验研究

2.2.1 干、鲜壁虎抗肿瘤的比较研究 祖国医学认为鲜药具有药鲜、汁醇、气味俱纯的特点. 如金元四大医家之一刘完素所说: “采其鲜者, 其力足耳.” 从大量的古代本草及方书文献中可以发现, 鲜药在治疗疑难杂症、危急重症及解毒外治等方面有着别于干药的特殊效用. 在我国第一部药学专著《神农本草经》中, 述及

### ■创新盘点

本文全面综述目前关于壁虎在治疗肿瘤的临床应用及其药理作用.

### ■应用要点

应采用中药化学、药物分析、中药药理等多学科研究手段,寻找干、鲜壁虎抗肿瘤的有效成分,为进一步探讨其作用机制、蛋白结构与药效活性关系,为中药新药的研制,指导临床用药等奠定基础。

“干地黄”和“干姜”的条文下均记有“生者尤良”;此“生”即是“鲜”而言。近年来利用现代科学技术对一些干、鲜植物药进行了化学成分及药效学的研究,表明部分鲜药在干制过程中,化学成分会发生很大变化,从而使药物的药效优于或有别于干品,然而有关干、鲜壁虎抗肿瘤作用的比较研究尚未见报道。

**2.2.2 鲜壁虎抗肿瘤的研究** 近年来我们课题组对鲜壁虎抗肝癌、脑瘤作用进行了体内、体外的药效学研究。首先对鲜壁虎提取液冻干粉(按照专利<sup>[53]</sup>方法加工)抗脑胶质瘤作用进行了研究。采用立体定向技术,在大鼠尾状核注射 $2 \times 10^6$ 的C6胶质瘤细胞,建立大鼠C6胶质瘤模型。结果表明,鲜壁虎冻干粉可显著延长C6胶质瘤模型鼠生存期,显著抑制C6胶质瘤模型鼠肿瘤体积,提高鼠血清TNF- $\alpha$ 水平,与对照组相比有显著的统计学意义( $P < 0.01$ )<sup>[54]</sup>。研究了鲜壁虎冻干粉对C6胶质瘤细胞的致凋亡作用及其方式,结果显示,经50 mg/L鲜壁虎冻干粉处理的C6胶质瘤细胞,增殖能力降低;5 mg/L, 30 mg/L, 50 mg/L鲜壁虎冻干粉均可以使C6细胞显示明显凋亡征象,有DNA断裂现象,并有浓度和时间依赖性。鲜壁虎冻干粉在体外能诱导C6胶质瘤细胞凋亡,抑制细胞增殖<sup>[55]</sup>。我们采用血清药理学的方法来探讨鲜壁虎冻干粉对C6胶质瘤细胞凋亡的影响。结果形态学变化、流式细胞仪分析和TUNEL法结果均证实含鲜壁虎血清在体外可诱导C6胶质瘤细胞凋亡;鲜壁虎组与空白对照组比较,细胞内的**bcl-2**基因表达无明显变化,**bax**基因表达升高,提示含鲜壁虎血清能够诱导细胞凋亡,其机制可能与上调**Bax**基因有关<sup>[56]</sup>。我们还对鲜壁虎抗肝癌进行了体内药效学研究,结果表明,鲜壁虎冻干粉可显著抑制荷实体型肝癌(H22)小鼠肿瘤生长,减少肿瘤体积,延长生存期,并可降低肿瘤组织血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞因子(bFGF)蛋白的表达,使肿瘤组织内微血管密度下降。提示鲜壁虎冻干粉抑制H22小鼠肿瘤生长可能与下调VEGF, bFGF蛋白的表达有关<sup>[57]</sup>。

### 3 结论和展望

多年临床实践表明,干、鲜壁虎的单味药及其复方治疗肿瘤均有一定的疗效,尤其是对食道癌、胃癌、肝癌等恶性肿瘤的治疗效果较为明显,值得临床推广应用。药理实验显示干、鲜壁

虎均有一定的抑瘤作用,其机制可能与调节免疫功能、诱导细胞凋亡、抑制肿瘤血管新生等有关。这些结果提示干、鲜壁虎可能含有抗肿瘤的活性成分,有待我们对其抗癌的物质基础进行深入研究。

近十几年来,随着科学技术的发展,一些新理论、新方法、新技术、新设备不断的被应用到中医药领域,如中药指纹图谱具有特征性、重现性和可操作性特点,因此被认为其不仅是一种中药质量控制模式和技术,更是一种进行中药理论研究的模式和方法<sup>[58]</sup>。将现代中药指纹图谱的分离分析手段应用于研究祖国传统中药蛋白类有效成分,建立其指纹图谱,可以保证用于药理、药效学研究的蛋白类有效成分的批间一致性及研究结果的可靠性及重现性。我们研究小组的前期动物实验表明,在抗脑胶质瘤方面鲜壁虎优于干壁虎,这可能由于在抗癌有效成分方面存在着差异所致。为了研究干、鲜壁虎抗肿瘤药效成分的差异,应在以往研究的基础上,采用现代分离分析技术(高效液相色谱及高效毛细管电泳等),建立干、鲜壁虎的色谱指纹图谱并比较其异同。结合已建立的肝癌、脑胶质瘤体内外模型,对干、鲜壁虎的抗癌有效蛋白分子群进行筛选和活性跟踪。以活性作用为先导,寻找和发现鲜壁虎中的抗癌活性物质,对所发现的活性物质进行结构与活性强度的比较分析。利用蛋白分离技术进行分离纯化。对得到的活性物质进行色谱指纹图谱分析,以确定干、鲜壁虎抗肝癌药效成分指纹图谱与抗肝癌活性成分间的关系。如是单一蛋白可进行进一步测序,建立相应的cDNA文库,为其在原核或真核微生物中的高效表达提供依据。

总之,我们应采用中药化学、药物分析、中药药理等多学科研究手段,寻找干、鲜壁虎抗肿瘤的有效成分,为进一步探讨其作用机制、蛋白结构与药效活性关系,为中药新药的研制,指导临床用药等奠定基础。

### 4 参考文献

- 1 武迎梅. 李建生治疗大肠癌的经验. 北京中医 2004; 23: 212-213
- 2 崔永玲. 李建生治疗肺癌的经验. 北京中医 2005; 24: 15-16
- 3 崔永玲. 李建生治疗食管癌的经验. 北京中医 2005; 24: 269-270
- 4 崔永玲. 李建生治疗胃癌的经验. 北京中医 2005; 24: 339-340
- 5 骆洪道. 颈部肿瘤治验三则. 四川中医 2001; 19: 39-40
- 6 陈华良. 周岱翰教授治肺癌临证精粹. 天津中医药



- 2005; 22: 101-103
- 7 宋洪恩, 宋慧敏, 单国英, 宋辉. 华虎内攻汤及热敷消癌散治疗原发性肝癌118例. 江苏中医 1996; 17: 22-23
- 8 魏西云. 壁虎治疗肝脏转移癌一例. 实用医技杂志 2000; 7: 623
- 9 金汉明. 壁虎临床应用治验3则. 山西中医 2003; 19: 40
- 10 吴本端. 复方壁虎粉治疗中晚期食管癌105例临床观察. 中国中西医结合杂志 1999; 19: 502
- 11 朱秀山, 许继平, 黄德辉, 黄国荣, 应翔华. 壁虎藤梨根治疗胃癌临床及实验研究. 中国民间疗法 1999; 7: 43-44
- 12 叶淑华, 关新胜. 抗癌通道丸治疗晚期食道癌食道梗阻42例. 中国中医急症 2005; 14: 475
- 13 易林桂. 壁虎酒治疗食道癌存活九年一例. 湖北中医杂志 1985; 7: 38-39
- 14 李建华. 天龙酒治疗食管癌贲门癌开关进食疗效观察. 实用中医内科杂志 1994; 8: 28
- 15 华安. 善祛顽疾的壁虎. 家庭中医药 2005: 53
- 16 张扶莉, 方瑜. 陈光伟主任医师治疗肿瘤思想辨析. 陕西中医学院学报 2005; 28: 36-37
- 17 程艳红. 生者尤良金无限量-我国首例抗癌鲜动物药金龙胶囊上市后再评价获突破性进展. 首都医药 2004; 11: 44-45
- 18 李玉衡. 多成分现代鲜药对肿瘤的影响-金龙胶囊能明显抑制肿瘤生长、复发、转移. 首都医药 2006; 13: 39-40
- 19 李杰, 李建生. 现代鲜动物中药在肿瘤治疗中的应用和特点. 中国肿瘤 2004; 13: 645-646
- 20 石怀芝. 金龙胶囊配合辨证施治治疗原发性肝癌30例临床观察. 北京中医 2000; 19: 30-32
- 21 时水治, 蔡秀莲, 李建生. 金龙胶囊配合中药治疗晚期食道癌46例临床观察. 北京中医 2000; 19: 57-59
- 22 徐晓燕. 金龙胶囊配合中草药治疗乳腺癌39例. 武警医学 2000; 11: 463-464
- 23 时水治. 中医辨证与金龙胶囊治疗晚期胃癌43例临床观察. 香港医学纵横 2001; 2: 13-14
- 24 徐晓燕, 石怀芝, 孙桂芝. 金龙胶囊合并中药治疗胃癌33例疗效观察. 北京中医 2001; 20: 61-62
- 25 时水治, 武迎梅. 通窍搜瘤汤配合金龙胶囊治疗脑胶质瘤30例临床观察. 北京中医 2001; 20: 61-63
- 26 石怀芝, 徐晓燕. 金龙胶囊配合中药治疗子宫颈癌114例临床观察. 北京中医 2001; 20: 64-65
- 27 王红. 金龙胶囊联合化疗治疗晚期恶性肿瘤疗效观察. 肿瘤研究与临床 2001; 13: 209
- 28 崔永玲, 时水治, 李建生. 金龙胶囊配合中药治疗肺癌30例临床观察. 北京中医 2001; 20: 55-57
- 29 武迎梅, 时水治. 中草药配合金龙胶囊治疗中晚期膀胱癌30例临床观察. 北京中医 2002; 21: 127-128
- 30 武迎梅, 时水治. 金龙胶囊配合中草药治疗中晚期胰腺癌21例临床观察. 北京中医 2002; 21: 349-351
- 31 杨光伟, 高时荣, 覃强. 金龙胶囊合并放射治疗鼻咽癌临床观察. 中国肿瘤临床 2002; 29: 529-532
- 32 徐晓燕, 石怀芝, 张东杰. 疏肝利胆汤加减配合金龙胶囊治疗胆管癌157例临床观察. 北京中医 2002; 21: 320-321
- 33 王作胜, 丁志勇, 赵文. 金龙胶囊在改善晚期肺癌患者生活质量的观察. 光明中医 2003; 18: 39
- 34 赵红星, 张小莉. 金龙胶囊治疗晚期癌症疗效观察. 河南肿瘤学杂志 2003; 16: 215-216
- 35 朱霞. 金龙胶囊治疗晚期原发性肝癌的疗效观察. 现代中西医结合杂志 2003; 12: 1739-1740
- 36 古宏晖. 金龙胶囊治疗晚期恶性肿瘤40例临床观察. 甘肃中医 2004; 17: 10
- 37 尹立杰, 赵国华, 丁田贵, 彭兆祥, 侯秀芬. 金龙胶囊联合全身伽玛刀治疗晚期胰腺癌临床观察. 中国肿瘤临床 2004; 31: 1129-1131
- 38 时水治. 李建生治疗非霍奇金淋巴瘤临证举隅. 北京中医 2005; 24: 83-85
- 39 梁铁军, 秦成勇, 张才擎, 赵小茜. 金龙胶囊联合肝动脉化疗栓塞治疗原发性肝癌疗效观察. 中国肿瘤临床 2005; 32: 641-643
- 40 李俊, 王三虎, 范先基, 张定进, 石戡, 王志祥, 胡正刚. 金龙胶囊配合辨证用药治疗中晚期恶性肿瘤40例. 第四军医大学学报 2005; 26: 1667
- 41 张捷, 王海, 张咏梅. 金龙胶囊联合HFL方案治疗晚期胃癌. 首都医药 2005; 12: 33-34
- 42 陈熙. 金龙胶囊合并化疗治疗晚期非小细胞肺癌的临床观察. 实用肿瘤杂志 2006; 21: 267-268
- 43 孙建梅, 杨水生, 马燕凌. 金龙胶囊对晚期肝癌生存质量及生存期的影响. 湖北中医杂志 2006; 28: 34
- 44 崔永玲. 金龙胶囊结合中药辨证治疗食管癌60例疗效观察. 北京中医 2006; 25: 381-382
- 45 司百忍, 甘同杰, 贾爱勤. 中药透皮治疗癌性疼痛25例. 中国民间疗法 1996; 4: 23
- 46 许继平, 应翔华, 李端扬. 昭黄散抗肿瘤作用及其对免疫状态影响的实验研究. 中国中医药科技 1999; 6: 81-82
- 47 杨勤建, 雷良蔚, 潘希雄, 李波. 中药复方香龙散(含药血清)诱导人胃癌细胞凋亡的研究. 湖北中医学院学报 1999; 1: 43-45
- 48 杨勤建, 雷良蔚, 李波, 潘希雄, 郑从义. 香龙散诱导人胃癌细胞凋亡的机理探讨. 中医杂志 2000; 41: 428-430.
- 49 赵冬梅, 石永进, 关大创, 曹香红, 刘素宾, 武淑兰. “金龙胶囊”抑制HL-60细胞生长并诱导细胞凋亡. 中国医药学报 2002; 17: 346-348
- 50 刘玉琴, 高进, 赵雪梅, 顾蓓, 薛克勋, 李建生. 金龙胶囊(JLC)抑制癌细胞转移及复发的实验观察. 中国肿瘤生物治疗杂志 2001; 8: 65-66
- 51 刘玉琴, 高进, 顾蓓, 李建生. 金龙胶囊(JLC)对肿瘤细胞诱导分化作用的研究. 中国肿瘤临床 2004; 31: 380-383
- 52 刘玉琴, 高进, 李建生. 金龙胶囊抗肿瘤复发、转移的实验研究. 北京医学 2005; 27: 554-557
- 53 谢东泽, 王学美. 一种治疗肿瘤的中药及其生产方法. 专利申请中华人民共和国国家知识产权局2003, 申请专利号: 031093264
- 54 谢爽. 鲜壁虎抗脑胶质瘤作用及其机理的初步研究. 北京大学硕士研究生学位论文
- 55 谢爽, 王学美, 谢东泽. 鲜壁虎提取物抑制C6胶质瘤细胞增殖和诱导细胞凋亡的研究. 肿瘤防治研究 2003; 30: 458-461
- 56 宋萍, 王学美, 谢爽, 卜定方, 富宏, 刘庚信. 鲜壁虎冻干粉诱导C6胶质瘤细胞凋亡的血清药理学研究. 中国中西医结合杂志 2004; 24: 919-921
- 57 宋萍, 王学美, 谢爽, 卜定方. 鲜壁虎冻干粉抑制H22肿瘤血管生成机理的实验研究. 中国中西医结合杂志 2006; 26: 58-62
- 58 罗国安, 王义明. 中药指纹图谱的分类和发展. 中国新药杂志 2002; 11: 46-51

#### ■同行评价

本文参考了大量的文献, 较全面的综述了壁虎在临床抗肿瘤的应用和有关的研究现状, 目前无同类综述. 该文宜明确阐述作者以往对鲜壁虎研究成果, 再多一些证据.

电编 张焕兰 编辑 张焕兰

# Cajal间质细胞研究进展

徐爱忠, 彭洪云

## ■背景资料

ICC是一类非神经但又与神经紧密相关的间质细胞,系西班牙神经解剖学家Cajal在消化道肌肉层首次发现,后来人们进一步发现他在调节胃肠道动力学方面有重要作用,很多胃肠动力障碍性疾病都与他的数量和形态学异常有关。直到近年来人们发现胃肠道以外的器官组织中也存在ICC,于是开始对他们展开实验研究。

徐爱忠, 彭洪云, 南昌大学第二附属医院普外科 江西省南昌市 330006

江西省自然科学基金资助项目, No. 0540148

通讯作者: 徐爱忠, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第二附属医院普外科研究生. xuaizhong2004@yahoo.com.cn

电话: 0791-6362416

收稿日期: 2006-05-16 接受日期: 2006-07-26

## 摘要

西班牙神经解剖学家Cajal首次在消化道肌肉层观察并描述了Cajal间质细胞的形态结构,发现他们在肠道内源性神经系统末梢发挥作用。后来人们进一步研究发现,他们是胃肠道起搏细胞,胃肠动力障碍性疾病与他们的分布和形态学异常有关。但在最近几年,人们在腺体、脉管系统、泌尿生殖系统中陆续鉴定出此类Cajal间质细胞,人们开始重视Cajal间质细胞在胃肠道以外器官和组织中的作用,试图阐明他们的形态结构和生理功能。这些细胞在形态学上与胃肠道Cajal间质细胞十分相似,但也存在少量迥异之处,他们很可能属于Cajal间质细胞新的亚型。这些发现将会使人们对Cajal间质细胞产生新的认识,同时也对Cajal间质细胞重新分类有着重要影响。

**关键词:** Cajal间质细胞; 慢波; 起搏点

徐爱忠, 彭洪云, Cajal间质细胞研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(24):2432-2435

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2432.asp>

## 0 引言

Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)是一种非神经但又与神经密切相关的特殊间质细胞,1893年由西班牙神经解剖学家Cajal用甲基蓝及嗜银染色法在肠神经系统中观察到,形态学上与胃肠平滑肌细胞和神经末梢纤维有密切联系。过去100多年,人们针对胃肠道中ICC做了大量基础研究,而在最近几年陆续有研究报道在人体的其他部位,如腺体、脉管系统、泌尿生殖系统中也存在他的踪影并进行了相关研究。现就将ICC近期研究成果加以整理并作一综述。

## 1 形态和发育

**1.1 ICC的形态** ICC主要分布在胃肠道自主神经末梢与平滑肌细胞之间,不同物种和区域的ICC形态结构存在一定差异。一般的,光镜下ICC呈纺锤状或星状,细胞核大,圆形或卵圆形,染色质分散,核周胞质少,一般有2-5个长的突起,相互连接形成网络。ICC的超微结构特征为:存在丰富的线粒体及中间丝,滑面内质网发达,高尔基体发育良好,有内质网小泡和大量胞膜窖,具有中型及细的微丝,粗面内质网比较稀疏,几乎没有微管和游离核糖体,基板多不连续。ICC突起之间以及ICC突起与平滑肌细胞之间存在大量的缝隙连接,胞体与神经末梢紧密相连<sup>[1]</sup>。

**1.2 ICC的发育** Wallace *et al*<sup>[2]</sup>研究人类胚胎中ICC的发育情况,发现9 wk胎儿消化道间质出现ICC,11 wk ICC开始环绕肠肌丛神经节,并建立紧密连接,14 wk形成了较完整的ICC网络。研究证实了C-kit受体在ICC发育过程中的重要作用。胚胎期18 d, C-kit阳性前体细胞若失去C-kit信号,则细胞发育为纵形肌细胞,而一直接受C-kit信号通路持续刺激作用的细胞则持续表达C-kit,最终发育为ICC,成为胃肠道起搏细胞。C-kit信号是ICC表型发育的必需因素,这种信号传导的慢性丧失或缺失会导致ICC网络的断裂或消失,最终损害其正常生理功能。在肌间ICC发育成熟后,若阻断C-kit信号传递亦能导致ICC细胞表型向平滑肌细胞表型转变。Torihashi *et al*<sup>[3]</sup>给出生后8 d的小鼠注射抗Kit的mAb(Ack2),发现Kit受体被阻滞,小鼠肠道中ICC几乎完全消失,但在ICC分布区域并没有发现细胞凋亡,取而代之的是平滑肌表型细胞。这提示肠道起搏区域ICC与纵形肌细胞由共同的C-kit阳性前体细胞发育而来, C-kit信号通路对维持ICC表型起着至关重要的作用,缺乏此信号ICC会转化为平滑肌表型细胞。因此C-kit信号不仅决定了ICC发育的谱系、形态和功能,而且在维持ICC出生后的细胞表型方面起着关键作用。

## 2 ICC与消化系统

自从100多年前在胃肠道中发现ICC后, 胃肠道中ICC一直是研究的热点. 目前普遍认为ICC具有控制胃肠自主节律性运动的功能, 主要参与胃肠道慢波电位产生和传播, 他是胃肠道慢波的起搏细胞, 同时在推进电活动的传播以及介导神经信号传递中起着重要作用.

**2.1 参与胃肠起搏** 多数胃肠道区域在缺少外界刺激时, 会自发产生电活动和机械活动. 当观察胃肠道中平滑肌细胞电活动时, 可以探测到持续的去极化波(慢波)有规律释放, 而这些慢波是依赖于ICC产生<sup>[4]</sup>. ICC产生起搏电流是胃肠道肌肉活动的基础, 作为胃肠道电活动起搏点的ICC, 在胃、小肠为肌间丛ICC, 在结肠为肌间丛ICC和黏膜下层ICC. Nakagawa *et al*<sup>[5]</sup>在野生型小鼠空肠内能明显记录到自上而下的肠蠕动波, 但在肠肌层缺少ICC的突变型W/WV小鼠空肠内没有发现肠蠕动波, 结果提示了肠肌层ICC是引起自发性肠蠕动的必需要素. ICC产生慢波的具体机制尚不完全清楚, 目前认为ICC起搏是通过Ca<sup>2+</sup>通道产生非选择性电压依赖的Ca<sup>2+</sup>内向离子流<sup>[4]</sup>, 促使ICC除极化后触发慢波, 一旦达到阈电位后产生动作电位, 引起平滑肌收缩. 近来发现, Cl<sup>-</sup>通道也参与了胃肠道起搏活动, 他主要与静息膜电位以及慢波平台期兴奋性有关<sup>[6]</sup>. 由低阈值Ca<sup>2+</sup>电流提供足够的内向离子流激起起搏活动, 电压依赖性K<sup>+</sup>通道完成复极循环是ICC起搏的基本离子机制.

**2.2 参与电活动的传播** 胃肠道大多数区域的ICC至少可以分为2个独立的类, 一类ICC形成网络, 产生起搏电位; 另一类ICC沿着平滑肌细胞分布, 彼此之间形成紧密连接, 参与慢波的传播. 慢波通过ICC网络以及和ICC相连的平滑肌细胞传至远端肠道, 进而引起和调制胃肠平滑肌的自发节律性收缩. 有人去除狗结肠黏膜下ICC网络, 残余的环形肌层没有慢波产生, 但慢波仍然存在于已切除的肌层中. Yanagida *et al*<sup>[7]</sup>研究发现, 老鼠回肠部分切除术后肠道动力的消失与ICC网络的破坏有关, 术后24 h慢波和机械活动在吻合口处部分恢复. 降低细胞外Ca<sup>2+</sup>浓度或抑制电压依赖的Ca<sup>2+</sup>通道都会阻断慢波传播, 电压依赖的Ca<sup>2+</sup>内流是慢波传播的基础, 他可以促进慢波的有效传播<sup>[8]</sup>. 慢波电位引起胃肠道一定区域去极化, 当局部去极化达到阈电位时, 动作电位被激发, 沿着胃肠道壁内ICC网络向各个方向扩散, 其扩散的距离因受刺激的强弱程度而不同.

**2.3 介导神经信号传递** 研究证实ICC与胃肠道神经元之间存在紧密联系, 参与胃肠道神经信号的传递, 他是神经元与平滑肌细胞之间信号传输的纽带<sup>[9]</sup>. Ward *et al*<sup>[10]</sup>发现肠神经元与肌内ICC有紧密接触点, 同时肌内ICC又与平滑肌细胞形成缝隙连接. 缺少肌内ICC的W/WV老鼠对胆碱能反应明显减弱, 这与肠道神经元和肌内ICC之间缺少紧密突触连接有关, 肌内ICC在接受胆碱能刺激输入方面起着重要的作用. 胃肠道神经选择性地支配ICC, 控制释放多种兴奋性或抑制性神经递质作用于ICC, 影响ICC慢波频率, 从而间接调节周围胃肠道平滑肌细胞活性, 调制胃肠道蠕动机性收缩<sup>[11]</sup>. 目前, 在胃肠道ICC细胞膜上发现了多种受体<sup>[12]</sup>, 如M2, M3毒蕈碱受体, 神经激肽受体(NK-1, NK-3), 血管活性肠肽受体(VIP-1)等, 这表明神经递质和激素等生物活性物质可以通过结合ICC细胞膜上相应受体, 影响ICC慢波的产生, 进而决定胃肠道平滑肌位相性收缩的频率, 调节其推进性活动的传播速度和方向.

## 3 参与腺体分泌

Popescu *et al*<sup>[13]</sup>发现胰腺内存在的C-kit阳性间质细胞符合消化道ICC表型特征. 胰腺ICC呈网状分布, 有2-3个由胞体发出的长突起, 并同胰腺内毛细血管、腺泡、神经纤维建立紧密的空间联系. 免疫组化证实这些细胞呈CD117和CD34阳性, 这些特征都符合ICC的诊断标准. 我们期待着更进一步的超微结构研究以及关于这些细胞与胰腺中其他细胞, 特别是与内源性神经元及平滑肌细胞关系的研究. Shafik *et al*<sup>[14]</sup>报道了C-kit阳性间质细胞在人前列腺中存在, 其形态学和免疫学表型与胃肠道中ICC十分相似, 并且推测这些ICC的异常分布可能跟前列腺疾病有关. Popescu *et al*<sup>[15]</sup>用亚甲蓝染色在人类正常乳腺中找到一种间质细胞, 这些细胞拥有特征性的念珠形细长胞突, 免疫组化证实呈CD117阳性, 在哺乳期这些细胞的空间分布会发生一些改变. 目前有更多的实验正在检测这些细胞的具体功能, 以探明腺体的分泌是否是由这些间质细胞引起.

## 4 在脉管中的作用

以前关于脉管系统中的ICC鲜有报道, McCloskey *et al*<sup>[16]</sup>第一次证实绵羊的肠系膜淋巴管中存在C-kit阳性细胞. Povstyan *et al*<sup>[17]</sup>采用

### ■创新盘点

关于胃肠道ICC的相关研究报道和综述屡见不鲜, 但由于胃肠道以外器官组织中ICC的实验研究起步不久, 因此相关报道较少, 人们对其认识有限. 文章遂从这个崭新视角出发, 总结前人的一些研究成果, 以便让我们能够更全面地了解ICC的功能及分布.



### ■应用要点

目前,人们普遍认为ICC是一种起搏细胞,他的缺失会引起器官的动力学障碍.因此研究并掌握ICC的生物学功能将有助于我们采取措施,来预防这些疾病的发生、发展,甚至使其恢复正常的生理形态以达到治疗目的.

免疫组化和亚甲蓝染色,首次在家兔门静脉的肌肉层中发现ICC,这直接论证了脉管组织中存在ICC.这些ICC拥有2种不同的形态学类型.一类是具有星形胞体的多极ICC,另一类是有许多树枝状突起的梭状ICC.这些ICC与脉管的自发性收缩活动密切相关,他们产生电信号,作为家兔门静脉平滑肌细胞的起搏点,并释放一些未知的扩散性物质,引起平滑肌细胞去极化<sup>[18]</sup>. Bobryshev<sup>[19]</sup>报道,在人类大动脉血管壁内存在ICC,这些动脉ICC位于动脉壁中、外层之间,拥有典型的ICC超微结构特征,他们是一群C-kit阴性细胞,但表达血管活性肠肽受体1(VIPR1)及神经激肽1受体(NK-1R).动脉ICC的重要功能尚不清楚,可能与动脉粥样硬化或者其他血管疾病有关,但还需要得到进一步研究证实.

## 5 泌尿和生殖系统中的ICC

**5.1 泌尿系统** 当人们越来越清楚的认识到了ICC在控制和调节胃肠道动力方面的重要作用后,学者们开始研究ICC是否会出现泌尿系统中,膀胱和输尿管的蠕动着收缩是否与ICC有关. Klemm *et al*<sup>[20]</sup>发现,豚鼠上泌尿道中存在ICC样细胞,这是第一次关于ICC出现在泌尿系统的报道.后来英国学者McCloskey *et al*<sup>[21]</sup>研究证实,ICC存在于豚鼠膀胱平滑肌束周围,与神经有密切联系,在拟胆碱药刺激下会激发Ca<sup>2+</sup>流,能够产生自发活动,这暗示他们是作为膀胱活动起搏点或者是神经信号传递至平滑肌细胞的媒介.后来在人类膀胱中也发现ICC<sup>[22]</sup>,这些细胞位于膀胱肌肉层,长梭形, C-kit呈现阳性,单个存在或者通过树枝状突起形成细胞网络,在膀胱顶部大量存在,构成主要起搏点,产生慢波传播至其它膀胱壁. Pezzone *et al*<sup>[23]</sup>使用免疫组化在小鼠输尿管壁中发现C-kit阳性的星形ICC组成细胞网络,他们位于输尿管盆部的固有层和肌间层.这些ICC产生慢波,沿着输尿管壁内ICC网络传播,使输尿管产生蠕动着收缩,从而保证将尿液从肾脏排入膀胱.任何原因引起的输尿管ICC密度减少或者ICC网络破坏,都会导致排尿不畅,引起泌尿系统的疾病<sup>[24-25]</sup>.

**5.2 生殖系统** 以前关于人类子宫中存在Cajal样间质细胞偶有报道, Ciontea *et al*<sup>[26]</sup>运用多种方法进行研究论证,他们在子宫肌层冰冻切片和细胞培养物中发现有ICC样细胞.这些细胞对亚甲蓝和詹纳斯绿B活体染料有亲和力,拥有2-3

条特征性的念珠形细长突起,突起的膨大部分线粒体丰富,超微结构完全符合ICC的透射电子显微镜标准,免疫荧光显示CD117阳性,并且在体外可以记录到自发的电活动.近来在人类输卵管管壁中也鉴定出ICC<sup>[27]</sup>,输卵管ICC在输卵管固有层和平滑肌层呈网络状分布,表达CD117、CD34、窖蛋白、S-100等多种细胞标记物,可以观察到持久的自发电活动.此外他可能是一种未定型的双潜能祖细胞,拥有分化潜能,在正常或病理情况下转化表型.输卵管ICC可能在起搏、分泌、调节神经传递和调节细胞间信号方面发挥着重要作用. Hashitani *et al*<sup>[28]</sup>首次报道ICC大量分布于豚鼠阴茎组织的平滑肌网眼中,在阴茎组织中发挥着起搏和信号传递的重要作用,他可以促使阴茎平滑肌收缩和松弛,以维持阴茎勃起和消退状态.进一步研究发现,细胞内Ca<sup>2+</sup>贮存和缝隙连接是产生自发性兴奋的关键基础,关于阴茎ICC生理功能研究可为临床上治疗勃起功能障碍疾病提供新的机遇.

人类研究胃肠道中ICC已有逾百年历史,我们已经知道他在产生和控制胃肠道动力学方面的重要作用,ICC产生和传导慢波,传递神经信号的具体机制也逐渐地被人们所揭示.近几年来,在人体胃肠道以外其他器官组织中越来越多地发现ICC,人们开始试图了解这些ICC的具体作用及其作用机制,目前已经取得了一定的研究成果.人体每个器官和组织都有他们自己独特类型的间质细胞,拥有不同的染色亲和力、超微结构及功能,在他们中有些细胞可能被归为ICC.因此我们需要进行更多相关的基础研究,以鉴别和区分C-kit阳性间质细胞、ICC样细胞以及ICC.相信不久的将来,随着人体各个器官组织中ICC得到进一步深入研究,人们会对ICC的结构和功能又有新的认识.

## 6 参考文献

- 1 Komuro T, Seki K, Horiguchi K. Ultrastructural characterization of the interstitial cells of Cajal. *Arch Histol Cytol* 1999; 62: 295-316
- 2 Wallace AS, Burns AJ. Development of the enteric nervous system, smooth muscle and interstitial cells of Cajal in the human gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res* 2005; 319: 367-382
- 3 Torihashi S, Nishi K, Tokutomi Y, Nishi T, Ward S, Sanders KM. Blockade of kit signaling induces transdifferentiation of interstitial cells of cajal to a smooth muscle phenotype. *Gastroenterology* 1999; 117: 140-148
- 4 Sanders KM, Koh SD, Ward SM. Interstitial cells

- of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. *Annu Rev Physiol* 2006; 68: 307-343
- 5 Nakagawa T, Misawa H, Nakajima Y, Takaki M. Absence of peristalsis in the ileum of W/W(V) mutant mice that are selectively deficient in myenteric interstitial cells of Cajal. *J Smooth Muscle Res* 2005; 41: 141-151
- 6 Park SJ, Mckay CM, Zhu Y, Huizinga JD. Volume-activated chloride currents in interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G791-797
- 7 Yanagida H, Yanase H, Sanders KM, Ward SM. Intestinal surgical resection disrupts electrical rhythmicity, neural responses, and interstitial cell networks. *Gastroenterology* 2004; 127: 1748-1759
- 8 Ward SM, Dixon RE, de Faoite A, Sanders KM. Voltage-dependent calcium entry underlies propagation of slow waves in canine gastric antrum. *J Physiol* 2004; 561: 793-810
- 9 Wang XY, Sanders KM, Ward SM. Intimate relationship between interstitial cells of cajal and enteric nerves in the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res* 1999; 295: 247-256
- 10 Ward SM, Beckett EA, Wang X, Baker F, Khoyi M, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal mediate cholinergic neurotransmission from enteric motor neurons. *J Neurosci* 2000; 20: 1393-1403
- 11 Forrest AS, Ordog T, Sanders KM. Neural regulation of slow-wave frequency in the murine gastric antrum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G486-495
- 12 Epperson A, Hatton WJ, Callaghan B, Doherty P, Walker RL, Sanders KM, Ward SM, Horowitz B. Molecular markers expressed in cultured and freshly isolated interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279: C529-539
- 13 Popescu LM, Hinescu ME, Ionescu N, Ciontea SM, Cretoiu D, Ardelean C. Interstitial cells of Cajal in pancreas. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 169-190
- 14 Shafik A, Shafik I, el-Sibai O. Identification of c-kit-positive cells in the human prostate: the interstitial cells of Cajal. *Arch Androl* 2005; 51: 345-351
- 15 Popescu LM, Andrei F, Hinescu ME. Snapshots of mammary gland interstitial cells: methylene-blue vital staining and c-kit immunopositivity. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 476-477
- 16 McCloskey KD, Hollywood MA, Thornbury KD, Ward SM, McHale NG. Kit-like immunopositive cells in sheep mesenteric lymphatic vessels. *Cell Tissue Res* 2002; 310: 77-84
- 17 Povstyan OV, Gordienko DV, Harhun MI, Bolton TB. Identification of interstitial cells of Cajal in the rabbit portal vein. *Cell Calcium* 2003; 33: 223-239
- 18 Harhun MI, Gordienko DV, Povstyan OV, Moss RF, Bolton TB. Function of interstitial cells of Cajal in the rabbit portal vein. *Circ Res* 2004; 95: 619-626
- 19 Bobryshev YV. Subset of cells immunopositive for neurokinin-1 receptor identified as arterial interstitial cells of Cajal in human large arteries. *Cell Tissue Res* 2005; 321: 45-55
- 20 Klemm MF, Exintaris B, Lang RJ. Identification of the cells underlying pacemaker activity in the guinea-pig upper urinary tract. *J Physiol* 1999; 519 Pt 3: 867-884
- 21 McCloskey KD, Gurney AM. Kit positive cells in the guinea pig bladder. *J Urol* 2002; 168: 832-836
- 22 Shafik A, El-Sibai O, Shafik AA, Shafik I. Identification of interstitial cells of Cajal in human urinary bladder: concept of vesical pacemaker. *Urology* 2004; 64: 809-813
- 23 Pezzone MA, Watkins SC, Alber SM, King WE, de Groat WC, Chancellor MB, Fraser MO. Identification of c-kit-positive cells in the mouse ureter: the interstitial cells of Cajal of the urinary tract. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284: F925-929
- 24 Solari V, Piotrowska AP, Puri P. Altered expression of interstitial cells of Cajal in congenital ureteropelvic junction obstruction. *J Urol* 2003; 170: 2420-2422
- 25 Schwentner C, Oswald J, Lunacek A, Fritsch H, Deibl M, Bartsch G, Radmayr C. Loss of interstitial cells of Cajal and gap junction protein connexin 43 at the vesicoureteral junction in children with vesicoureteral reflux. *J Urol* 2005; 174: 1981-1986
- 26 Ciontea SM, Radu E, Regalia T, Ceafalan L, Cretoiu D, Gherghiceanu M, Braga RI, Malincenco M, Zagrean L, Hinescu ME, Popescu LM. C-kit immunopositive interstitial cells (Cajal-type) in human myometrium. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 407-420
- 27 Popescu LM, Ciontea SM, Cretoiu D, Hinescu ME, Radu E, Ionescu N, Ceausu M, Gherghiceanu M, Braga RI, Vasilescu F, Zagrean L, Ardeleanu C. Novel type of interstitial cell (Cajal-like) in human fallopian tube. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 479-523
- 28 Hashitani H, Suzuki H. Identification of interstitial cells of Cajal in corporal tissues of the guinea-pig penis. *Br J Pharmacol* 2004; 141: 199-204

# 同行评价

本文阐述了ICC的基本生物学特性、体内分布及其主要生物学功能,对同行学习、了解和研究Cajal间质细胞生物学功能有一定指导作用。

电编 王晓瑜 编辑 潘伯荣

# 基质金属蛋白酶基因多态性在食管癌中的研究进展

邓学杰, 马洪升

## ■背景资料

基因多态性研究是近年来的研究热点。遗传学的研究已证明, 基质金属蛋白酶(MMPs)家族中的很多成分存在基因多态现象。在MMPs基因启动子区发现多个自发的序列变异, 对MMPs基因启动子转录活性有等位基因特异性影响, 进一步可能影响个体MMPs水平及其相关病变的易感性。

邓学杰, 马洪升, 四川大学华西医院消化内科 四川省成都市 610041

通讯作者: 邓学杰, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院消化内科, dengxuejie124@tom.com

电话: 028-85439860

收稿日期: 2006-06-06 接受日期: 2006-07-18

## 摘要

基质金属蛋白酶(MMPs)是一族结构与功能上相关的蛋白水解酶类, 不仅可以介导肿瘤细胞对宿主细胞外基质的降解, 还控制肿瘤新生血管的生成, 影响细胞黏附分子的功能及调控肿瘤细胞的生长。大量研究已发现, MMPs与食管癌的发生发展有密切关系。基因多态性是指由遗传因素造成的个体差异, 其本质是各种原因引起染色体中核苷酸排序变化, 即产生的DNA片段和DNA序列在个体内的差异, 终生保持不变。近年来研究表明, MMPs基因一些多态性位点可能影响其表达及功能, 且与疾病的发生、发展有关。我们就近年来对MMPs基因多态性在食管癌中的研究进展作一综述。

**关键词:** 食管癌; 基质金属蛋白酶; 基因多态性

邓学杰, 马洪升. 基质金属蛋白酶基因多态性在食管癌中的研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(24):2436-2439

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2436.asp>

## 0 引言

食管癌是常见的消化道恶性肿瘤, 尽管现在的诊断及治疗水平有很大的提高, 但食管癌因其早期淋巴结及血行的转移使其临床进展迅速并且预后很差。肿瘤的分级分期、DNA的倍性、p53基因以及淋巴结和血行转移对食管癌患者的生存率有着重要的影响。大量的研究表明, 癌细胞浸润转移能力与其诱导产生的蛋白酶降解细胞外基质、基底膜的能力密切相关。基质金属蛋白酶(MMPs)是一族结构与功能上相关的内肽水解酶类, 属于Metzincin超家族, 迄今为止, 人体已有22种MMPs被发现。目前研究认为, MMPs不但介导肿瘤细胞对宿主细胞外基质的降解, 还控制肿瘤新生血管的生成, 影响细胞

黏附分子的功能及调控肿瘤细胞的生长等<sup>[1]</sup>。而肿瘤血管生成是肿瘤生长和转移所必须的, 被认为是很重要的预后因素<sup>[2-3]</sup>。MMPs是在肿瘤的浸润和转移中起着重要作用的一组蛋白酶<sup>[4]</sup>。MMPs根据底物作用不同, 可以分为5类: (1)间质胶原酶类: 包括MMP1, MMP8等, 其作用底物主要是I型和III型胶原。(2)明胶酶类: 包括MMP2, MMP9, 其作用底物是IV型胶原。(3)基质溶解素类: 包括MMP3, MMP7等, 其作用底物是层黏蛋白, 纤维蛋白和蛋白多糖核心蛋白。(4)模型MMPs类: 如MMP14, MMP15等, 其作用底物是明胶酶A前体。(5)其他: 如MMP19, MMP20等, 其作用底物尚不清<sup>[5]</sup>。至少有3种调节机制可能影响MMPs的活化, 包括: 转录调节、潜在MMP的活化及金属蛋白酶的抑制因子, 其中最重要的可能是基因转录调节, 因为大多数MMP基因仅在活跃的生理组织或病理组织重构时表达。因此, MMP在转录水平的表达调控中显得至关重要。基因多态性是指由遗传因素造成的个体差异, 其本质是各种原因引起染色体中核苷酸排序变化, 即产生的DNA片段和DNA序列在个体内的差异, 终生保持不变。越来越多的证据表明, MMP基因启动子序列的自然突变可以导致个体中不同的MMP表达, 这些基因多态性被证明与一些疾病发生的易感性有关, 包括心血管疾病、类风湿关节炎、动脉硬化及肿瘤<sup>[6-9]</sup>等。

## 1 MMP2基因多态性

IV型胶原是细胞外基质和基底膜的主要结构蛋白, 明胶类MMP则是降解IV型胶原三螺旋结构的主要酶系, MMP2可以降解胰岛素样生长因子结合蛋白, 释放胰岛素样生长因子, 后者可以刺激细胞增殖和抑制凋亡。大量研究表明, MMP2与恶性肿瘤的浸润转移有关, 在胃癌、大肠癌、膀胱癌<sup>[10-12]</sup>中表达均增加。有文献报道, MMP2在多数食管癌组织中的表达显著增加, 并与淋巴结转移密切相关, MMP2过度表达可能是食管癌发生过程中肿瘤细胞获得侵袭能



力的原因之一<sup>[13-14]</sup>. MMP2能在许多肿瘤细胞中表达, 其蛋白酶的产物不仅由肿瘤细胞产生, 也由正常的间质细胞产生<sup>[13-14]</sup>, 这就预示着MMP2的过度表达可能是由于转录的改变, 而不是由于基因的扩增或者突变. 在MMP2启动子区发现2个基因多态性位点: T790G和C735T. 在对其他疾病研究中发现, 他们与慢性心力衰竭有关, 患者中, -790T/G的C等位基因频率增高明显, 具有统计学意义, -735C/T基因多态性中的CT杂合基因型病人患慢性心力衰竭的风险更高<sup>[15]</sup>. 人类的MMP2启动子区域包括很多顺式作用调控元件及一些转录因子, 包括P53, Sp1, Sp3和AP-2, 参加了对此蛋白酶表达的调控<sup>[16-17]</sup>. 在MMP2启动子区域的一个单核苷酸多态-1306C/T[在Sp1(CCACC盒)核心识别序列的-1306的胞嘧啶(C)替代胸腺嘧啶(T)]的突变, 使Sp1结合区域失活, 因此抑制了启动子的活化. 最近在-735核苷酸区域发现有C替代T的突变, 可能通过Sp1结合位点来打断一致序列<sup>[18]</sup>, 预示着这个基因多态性可能有影响MMP2转录的作用. 因为Sp1是一种广泛表达的能调控多种不同基因的转录因子<sup>[17, 19-20]</sup>, 故影响Sp1结合区域的基因序列变化, 诸如MMP-2基因-735C/T和-1306C/T的多态性可能改变基因转录的活性及水平. 用荧光素检测食管癌组织中的MMP2的mRNA在-735C和-735T等位基因中的转录活性有极大的不同, 更为重要的是当-735C和-1306C同时在MMP2的启动子区域表达时转录活性会增加, 提示这2个单核苷酸多态是具有相加作用的单倍型. 这些数据说明, 在-735C和-1306C的Sp1结合序列的表达增加了MMP2的转录, 从而产生高水平的MMP2蛋白的表达. 因为MMP2在肿瘤发生及侵袭转移中的重要作用, 故带有C-1306, C-735单倍型的个体会有更高的发生食管癌及转移的易感性<sup>[21]</sup>.

## 2 MMP7基因多态性

MMP7是一种基质溶解素, 他能降解弹性蛋白、蛋白多糖、纤维结合蛋白以及IV型胶原, 且MMP7能清除细胞表面一些非基质来源的酶底物, 包括E-钙黏蛋白、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 及Fas配体等<sup>[22]</sup>. MMP7基因主要在上皮来源的细胞中表达, 在正常黏膜上皮细胞中为弱表达或不表达, 在基质细胞中则不表达<sup>[23]</sup>. 有研究发现, MMP7在多种肿瘤中的表达均较高, 包括胃癌、胰腺癌、食管癌<sup>[24-26]</sup>等, 并在其转移途径中起关键作

用. MMP7基因位于11q21-q22, 是MMP家族中最小的一个<sup>[27]</sup>, 有2个基因多态性位点: -181A/G和-153C/T. 在与其他疾病关系的研究中发现, -181A/G基因多态性的G等位基因频率和-153C/T多态性的T等位基因频率在冠状动脉疾病中均增高, 从而推断出这2个多态性位点与冠状动脉疾病易感性相关<sup>[28]</sup>. 也有研究表明, -181A/G的多态性与许多肿瘤有关, 位于-181G等位基因的基因型可能会增加对食管癌的易感性, 这就意味着MMP7的181A/G的多态性基因可以用于筛选个体发生食管癌的风险性. 在MMP7基因转录起始位点上游区的第181个碱基对处的A(腺嘌呤)替代G(鸟嘌呤)的突变可以通过影响启动子的转录活性从而影响某些疾病的进程, 其发生的机制可能与-181G等位基因启动子激活的多样性有关. 转染实验表明, 在同一序列-181G等位基因启动子的活性比-181A等位基因启动子的活性高2-3倍, -181G等位基因的活化可能通过增加MMP7 mRNA表达, 进而增加MMP7蛋白表达<sup>[29]</sup>. 含有-181G等位基因活性的个体可能更容易通过MMP7蛋白而发生恶性转化. 尚无证据表明-153基因多态性改变MMP7基因启动子的活性. 另外, 由-181G等位基因引起的MMP7的表达增加也可能导致MMPs家族中其他成员如MMP2的活化, 后者可以参与细胞生长、血管生成及免疫调节<sup>[1, 30]</sup>.

## 3 MMP9基因多态性

PMMP9又称明胶酶B, 是MMPs家族中分子量最大的酶. MMP9一方面降解破坏靠近肿瘤细胞表面的细胞外基质和基底膜, 另一方面则通过促进毛细血管再生, 使肿瘤发生局部浸润和血行转移. 大量研究表明, MMP9在多种恶性肿瘤中呈现过度表达. El-Kenawy *et al*<sup>[31]</sup>通过免疫组化等方法测定MMP9在食管癌和正常组织中的表达, 得出结论: 不同的分期分级的食管癌组织中MMP9及微血管计数的表达有很大的不同, 高度表达MMP9的病人微血管计数也很高. 因此, MMP9的表达及瘤内微血管的计数可能影响食管癌的转移. 人类MMP9基因包括13个外显子和12个内含子, 位于染色体20q12-q13. Morgan *et al*<sup>[32]</sup>发现, 在MMP9启动子-1562 bp位点由于胞嘧啶替代胸腺嘧啶(C-T)而产生的基因多态性对转录有影响, 并且与冠状动脉疾病的严重程度有关. 研究发现, MMP9基因有2个多态性位点: C-1562T和CA-repeat, 但目前尚无研究表明

### ■应用要点

大量研究表明, MMPS基因多态性与食管癌的发生发展及预后有关. 进一步对基因多态性的研究可以为食管癌的早期诊断及治疗提供更好的分子生物学基础.

# ■同行评价

该文对MMPs基因多态性在食管癌中的研究进展作一综述,内容较新,目前关于此方面发表的文章尚少,故有指导意义。

他们与食管癌发生有关系。

吸烟、嗜酒、营养不良以及暴露于某些化学物质都被认为是食管癌的危险因素,但并不是所有的暴露者都发展成食管癌,这就说明基因在食管癌发生发展中起着重要的作用。越来越多的证据显示, MMPs的基因多态性可能与食管癌的易感性及预后有关。要提高食管癌患者的生存率就要确立早期诊断的特异性生物学指标,并研究新的治疗策略。进一步对MMP家族基因多态性的研究可以为食管癌的早期诊断及治疗提供更好的分子生物学基础。

## 4 参考文献

- Borgers D. Mild hypertension: drug prophylaxis or primary prevention? *MMW Munch Med Wochenschr* 1979; 121: 1407-1410
- Ledic S, Lisanin L, Cernic M, Markovic B. Sponge kidney. *Vojnosanit Pregl* 1975; 32: 623-628
- Ahn MJ, Jang SJ, Park YW, Choi JH, Oh HS, Lee CB, Paik HK, Park CK. Clinical prognostic values of vascular endothelial growth factor, microvessel density, and p53 expression in esophageal carcinomas. *J Korean Med Sci* 2002; 17: 201-207
- Hofmann UB, Eggert AA, Blass K, Bocker EB, Becker JC. Expression of matrix metalloproteinases in the microenvironment of spontaneous and experimental melanoma metastases reflects the requirements for tumor formation. *Cancer Res* 2003; 63: 8221-8225
- Parsons SL, Watson SA, Brown PD, Collins HM, Steele RJ. Matrix metalloproteinases. *Br J Surg* 1997; 84: 160-166
- Nojiri T, Morita H, Imai Y, Maemura K, Ohno M, Ogasawara K, Aizawa T, Saito A, Hayashi D, Hirata Y, Sugiyama T, Yamazaki T, Nagai R. Genetic variations of matrix metalloproteinase-1 and -3 promoter regions and their associations with susceptibility to myocardial infarction in Japanese. *Int J Cardiol* 2003; 92: 181-186
- Dawson RM. The reaction of choline and 3,3-dimethyl-1-butanol with the acetylcholinesterase. *J Neurochem* 1975; 25: 783-787
- Fiotti N, Zivadinov R, Altamura N, Nasuelli D, Bratina A, Tommasi MA, Bosco A, Locatelli L, Grop A, Cazzato G, Guarnieri G, Giansante C, Zorzon M. MMP-9 microsatellite polymorphism and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2004; 152: 147-153
- Yu C, Pan K, Xing D, Liang G, Tan W, Zhang L, Lin D. Correlation between a single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 promoter and risk of lung cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 6430-6433
- 汪泳, 刘昕, 朱任之, 张方信, 钱震, 孙少华. 基质金属蛋白酶-2, E-钙黏附素和DNA含量与胃癌侵袭、转移的相关性研究. *肿瘤研究与临床* 2003; 15: 85-88
- 陶雅军, 陈英杰, 任新, 温冬青. 组织金属蛋白酶抑制剂-2与大肠癌浸润转移的关系. *实用肿瘤学杂志* 2003; 17: 1-3
- 张雪培, 周芳坚, 申鹏飞, 周成, 魏金星. MMP2活性测定在判断膀胱癌移行细胞癌侵袭中的意义. *癌症*

- 2003; 22: 637-639
- Samantaray S, Sharma R, Chattopadhyaya TK, Gupta SD, Ralhan R. Increased expression of MMP-2 and MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130: 37-44
- Yamashita K, Upadhyay S, Mimori K, Inoue H, Mori M. Clinical significance of secreted protein acidic and rich in cysteine in esophageal carcinoma and its relation to carcinoma progression. *Cancer* 2003; 97: 2412-2419
- Vasku A, Goldbergova M, Holla LI, Spinarova L, Spinar J, Vitovec J, Vacha J. Two MMP-2 promoter polymorphisms (-790T/G and -735C/T) in chronic heart failure. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: 1299-1303
- Bian J, Sun Y. Transcriptional activation by p53 of the human type IV collagenase (gelatinase A or matrix metalloproteinase 2) promoter. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 6330-6338
- Qin H, Sun Y, Benveniste EN. The transcription factors Sp1, Sp3, and AP-2 are required for constitutive matrix metalloproteinase-2 gene expression in astrogloma cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 29130-29137
- Vasku V, Vasku A, Tschoplova S, Izakovicova Holla L, Semradova V, Vacha J. Genotype association of C(-735)T polymorphism in matrix metalloproteinase 2 gene with G(8002)A endothelin 1 gene with plaque psoriasis. *Dermatology* 2002; 204: 262-265
- Turner J, Crossley M. Mammalian Kruppel-like transcription factors: more than just a pretty finger. *Trends Biochem Sci* 1999; 24: 236-240
- Margana RK, Boggaram V. Functional analysis of surfactant protein B (SP-B) promoter. Sp1, Sp3, TTF-1, and HNF-3alpha transcription factors are necessary for lung cell-specific activation of SP-B gene transcription. *J Biol Chem* 1997; 272: 3083-3090
- Yu C, Zhou Y, Miao X, Xiong P, Tan W, Lin D. Functional haplotypes in the promoter of matrix metalloproteinase-2 predict risk of the occurrence and metastasis of esophageal cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 7622-7628
- Haro H, Crawford HC, Fingleton B, Shinomiya K, Spengler DM, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase-7-dependent release of tumor necrosis factor-alpha in a model of herniated disc resorption. *J Clin Invest* 2000; 105: 143-150
- Mori M, Barnard GF, Mimori K, Ueo H, Akiyoshi T, Sugimachi K. Overexpression of matrix metalloproteinase-7 mRNA in human colon carcinomas. *Cancer* 1995; 75: 1516-1519
- 郭源, 万远廉, 魏群, 刘玉村, 高随宽, 徐文怀. 基质金属蛋白酶-7基因在胃癌中的表达. *中华普通外科杂志* 2000; 15: 82-84
- 胡育新, 李平, 刘姝, Watanabe Hiroyuki, Sawabu Norio. 胰腺癌组织中基质金属蛋白酶-7(MMP-7)的表达. *癌症* 2000; 19: 521-523
- Tanioka Y, Yoshida T, Yagawa T, Saiki Y, Takeo S, Harada T, Okazawa T, Yanai H, Okita K. Matrix metalloproteinase-7 and matrix metalloproteinase-9 are associated with unfavourable prognosis in superficial oesophageal cancer. *Br J Cancer* 2003; 89: 2116-2121
- Knox JD, Boreham DR, Walker JA, Morrison DP, Matrisian LM, Nagle RB, Bowden GT. Mapping of the metalloproteinase gene matrilysin (MMP7) to human chromosome 11q21-->q22. *Cytogenet Cell*

- Genet* 1996; 72: 179-182
- 28 Jormsjo S, Whatling C, Walter DH, Zeiher AM, Hamsten A, Eriksson P. Allele-specific regulation of matrix metalloproteinase-7 promoter activity is associated with coronary artery luminal dimensions among hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1834-1839
- 29 Zhang J, Jin X, Fang S, Wang R, Li Y, Wang N, Guo W, Wang Y, Wen D, Wei L, Dong Z, Kuang G. The functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-7 promoter increases susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma, gastric cardiac adenocarcinoma and non-small cell lung carcinoma. *Carcinogenesis* 2005; 26: 1748-1753
- 30 Barille S, Bataille R, Rapp MJ, Harousseau JL, Amiot M. Production of metalloproteinase-7 (matrilysin) by human myeloma cells and its potential involvement in metalloproteinase-2 activation. *J Immunol* 1999; 163: 5723-5728
- 31 El-Kenawy Ael-M, Lotfy M, El-Kott A, El-Shahat M. Significance of matrix metalloproteinase 9 and CD34 expressions in esophageal carcinoma: correlation with DNA content. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 791-794
- 32 Morgan AR, Zhang B, Tapper W, Collins A, Ye S. Haplotypic analysis of the MMP-9 gene in relation to coronary artery disease. *J Mol Med* 2003; 81: 321-326

电编 王晓瑜 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.



# 活体生物荧光成像技术新进展

宿华威, 崔云甫, 吴德全, 韩德恩

## ■背景资料

活体生物荧光成像技术(*in vivo* bioluminescence imaging)是近年来发展起来的一项崭新的分子、基因表达的分析检测系统。近5 a来随着荧光成像设备的进一步完善以及转基因动物的构建开发,在欧美等发达国家活体生物荧光成像技术已被广泛地应用于感染、肿瘤免疫及治疗、自身免疫性疾病、器官移植、基因治疗、药物开发等实验领域并取得了许多成果。

宿华威, 崔云甫, 吴德全, 韩德恩, 哈尔滨医科大学附属第二医院肝胆胰器官移植外科 黑龙江省哈尔滨市 150086  
通讯作者: 宿华威, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区保健路246号, 哈尔滨医科大学附属第二医院肝胆胰器官移植外科。  
huawei97@msn.com  
电话: 0451-88671108  
收稿日期: 2006-05-23 接受日期: 2006-06-30

## 摘要

活体生物荧光成像技术(*in vivo* bioluminescence imaging)是近年来发展起来的一项崭新的分子、基因表达的分析检测系统。与传统的检测方法相比具有巨大的优越性,堪称是分子基因检测领域的革命性技术。随着荧光成像设备的进一步完善以及转基因动物的构建开发,在欧美等发达国家活体生物荧光成像技术已被广泛地应用于感染、肿瘤免疫及治疗、自身免疫性疾病、器官移植、基因治疗、药物开发等实验领域。本文就活体生物荧光成像技术的发展和应用作如下综述。

**关键词:** 活体生物荧光成像; 萤光素; 萤光素酶

宿华威, 崔云甫, 吴德全, 韩德恩. 活体生物荧光成像技术新进展. 世界华人消化杂志 2006;14(24):2440-2443  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2440.asp>

## 0 引言

活体生物荧光成像技术(*in vivo* bioluminescence imaging)是近年来发展起来的一项崭新的分子、基因表达的分析检测系统。他由敏感的萤光照相机(charge coupled device camera, CCD camera)及其分析软件和作为报告子的萤光素酶(luciferase)和萤光素(luciferin)组成。与传统的检测方法相比具有巨大的优越性,堪称是分子基因检测领域的革命性技术<sup>[1-2]</sup>。近5 a来随着荧光成像设备的进一步完善以及转基因动物的构建开发,在欧美等发达国家活体生物荧光成像技术已被广泛地应用于感染、肿瘤免疫及治疗、自身免疫性疾病、器官移植、基因治疗、药物开发等实验领域,并取得了许多成果。

活体生物荧光成像技术是指在小的哺乳动物体内利用报告基因-萤光素酶基因表达所产生

的萤光素酶蛋白与其小分子底物萤光素在氧、 $Mg^{2+}$ 离子存在的条件下消耗ATP发生氧化反应,将部分化学能转变为可见光能释放。然后在体外利用敏感的CCD camera设备定量检测体内所发射的光子数量并将之转换成图像。萤光素酶基因可以被插入多种基因的启动子(promoter)之后,这样就成了此种基因表达的报告基因,通过监测报告基因从而实现目标基因表达的监测<sup>[3-4]</sup>。

多种生物包括细菌、藻类、腔肠动物、珊瑚、萤火虫等体内存在萤光素酶基因,其中以北美萤火虫(North America firefly)的萤光素酶基因应用的最为广泛。此种基因可编码产生550个氨基酸的萤光素酶蛋白。生物萤光实质是一种化学萤光,北美萤火虫萤光素酶在氧化其特有底物萤光素的过程中可以释放波长广泛的可见光光子,其平均波长为560 nm(460-630 nm),这其中包括重要的波长超过600 nm的红光成分。在哺乳动物体内血红蛋白是吸收可见光的主要成分,能吸收中蓝绿光波段的大部分可见光;水和脂质主要吸收红外线,但其均对波长为590-800 nm的红光至近红外线吸收能力较差,因此波长超过600 nm的红光虽然有部分散射消耗但大部分可以穿透哺乳动物组织被敏感的CCD camera检测到。除了北美萤火虫萤光素酶之外,其他种类的萤光素酶在氧化萤光素过程中所产生的可见光成分主要为波长较短的蓝绿光(平均波长480 nm),大多数被组织所吸收。这也是北美萤火虫萤光素酶基因被广泛应用的主要原因<sup>[5-7]</sup>。

北美萤火虫萤光素酶的底物-萤光素是一种水溶性小分子[D-(-)-2-(6'-hydroxy-2'-benzothiazdyl)thiazone-4-carboxylic acid],经ip或iv后可以迅速渗透通过细胞膜并广泛地分布于哺乳动物体内,而且可以顺利通过血脑屏障和胎盘屏障。目前研究尚未发现其具有毒副作用。

## 1 活体生物荧光成像技术的优势

活体生物荧光成像技术具有以下几个常规检测手段所不具备的优点: (1)无创伤性; (2)可多次重复在不同时间点检测; (3)快速扫描成像(时

间少于5 min); (4)可以使实验动物整体成像. 活体生物荧光成像技术与转基因动物相结合可以实时示踪许多重要细胞和分子, 特别是肿瘤细胞、免疫相关细胞和介质, 从而洞悉其在疾病发生发展过程中所扮演的角色, 为揭示多种疾病病理过程提供了线索<sup>[8-9]</sup>. 活体生物荧光成像技术的无创检测报告基因表达这一能力与传统的将实验动物处死后再进行组织染色、酶活性分析的方法相比有巨大优势. 活体生物荧光成像技术在实验中可在同一实验动物体内获得全部时间点的整体数据, 可以用极少的实验动物而迅速获得更全面的数据, 这样就大大地节省了实验动物、时间以及实验经费. 由于能够对同一动物进行连续检测这样就最大程度减少了不同实验动物之间的个体差异以及传统检测方法误差所造成的对实验结果的影响. 更重要的是活体生物荧光成像技术的敏感性极高, Edinger *et al*<sup>[10]</sup>报道活体生物荧光成像技术检测肿瘤细胞的敏感性甚至超过了流式细胞仪体外检测的敏感性. 与其他用于检测细胞游走增殖的标记技术如荧光染料、放射性探针等相比活体生物荧光成像技术对靶细胞无毒副作用, 并且也不会因靶细胞增殖分裂, 信号稀释而丧失标记作用.

## 2 活体生物荧光成像技术的发展及应用

**2.1 在肿瘤方面的应用** 借助活体生物荧光成像技术实时监测肿瘤发生发展的病理过程是当前在欧美医学发达国家一个非常重要、发展迅速的前沿研究领域. 他可以快速的测量各种癌症模型中肿瘤的生长, 并可对癌症治疗中癌细胞的变化进行实时观测评估; 可以无创伤地定量检测小鼠整体的原位瘤、转移瘤及自发瘤. Contag *et al*<sup>[11]</sup>研究使用荧光素酶和GFP作为报告子活体成像肿瘤细胞, 并探讨了使用这些报告基因在细胞分子水平研究肿瘤的前景. 同时发现活体生物荧光成像技术的敏感性是超前的, 在追踪肿瘤的生长过程方面具有很大的优越性. Rehemtulla *et al*<sup>[12]</sup>使用荧光素酶基因稳定地转染qL大鼠的胶质肉瘤细胞(qLluc)建立了原位脑肿瘤模型. 此后荧光素酶转染其他 肿瘤细胞系不断出现, 经过ip, sc或iv进入实验动物体内, 研究肿瘤生长的动力性改变以及对治疗的反应. 令人感到兴奋的是使用活体生物荧光成像技术获得的实验结果与MRI成像的结果达到了91%的一致性, 这进一步证明活体生物荧光成像技术在活体分析肿

瘤的时间空间分布方面是一个极其优秀的工具. MRI测出的肿瘤体积与活体生物荧光成像测得的肿瘤组织所产生的光子数呈线性相关. 由于MRI测得的体积还包括肿瘤周边的水肿、浸润的细胞、死亡细胞的残骸, 而活体生物荧光成像测得的却只有具有代谢活力的肿瘤细胞因此更具研究价值. Alvarnas *et al*<sup>[13]</sup>报道将细胞活素诱导产生的杀伤细胞(主要成分是CD3<sup>+</sup>和CD56<sup>+</sup>细胞)注入已存在荧光素酶标记的肿瘤细胞的小鼠体内, 无论在活体内还是在体外CD3<sup>+</sup>和CD56<sup>+</sup>细胞均显示出抗多种肿瘤细胞的活性. Scheffold *et al*<sup>[14]</sup>用荧光素酶基因标记表达HER2的人类卵巢癌细胞, 并建立异种移植的小鼠模型. 在输注CD8<sup>+</sup>NK-T细胞后使用活体生物荧光成像证实其对卵巢癌细胞具有杀灭作用. Edinger *et al*<sup>[10]</sup>将BALB/C来源的淋巴瘤细胞用荧光素酶基因标记, 然后利用活体生物荧光成像在小鼠体内示踪淋巴瘤细胞的增殖、游走、器官浸润, 并定量分析全身的肿瘤细胞负荷. Jenkins *et al*<sup>[15]</sup>将靶了荧光素酶基因的人类前列腺癌细胞PC-3M-luc-C6输注到小鼠体内, 并利用活体生物荧光成像活体监测前列腺癌细胞化疗后的复发和转移情况. Hollingshead *et al*<sup>[16]</sup>利用人类胶质瘤细胞系U251构建U251-HRE细胞, 其中的荧光素酶基因表达受可诱导启动子的操控, 低氧状态为其诱导条件, 因此在细胞处于低氧状态下荧光素酶基因开始表达. 将此肿瘤细胞sc于裸鼠体内, 肿瘤增殖早期并无明显荧光素酶表达, 当肿瘤达到了300-500 mg时, 局部组织出现低氧状态, 此时可监测到荧光素酶显著表达. 这种方法不仅仅监测肿瘤本身, 更重要的是可以监测肿瘤细胞所处的微环境.

**2.2 在监测感染和炎症方面的应用** 利用活体生物荧光成像技术可以检测到荧光素酶基因标记的病毒和细菌, 并能连续观察其对机体的侵袭过程以及抗病毒药物和抗生素对其病理过程的影响. Contag *et al*<sup>[17]</sup>用细菌荧光素酶标靶沙门菌, 并用活体生物荧光成像追踪细菌感染. Francis *et al*<sup>[18]</sup>luxABCDE标靶葡萄球菌, 并将此种葡萄球菌im于小鼠体内. 然后利用活体生物荧光成像技术对小鼠进行全身成像可以定位葡萄球菌侵袭的组织并能区分不同的感染来源、感染发生的进程以及抗生素的疗效. Sadikot *et al*<sup>[19]</sup>利用NF-kappaB-luc转基因小鼠研究肝脏冷冻消融术所引起的多系统损害. 通过活体生物荧光成像证实35%的肝脏冷冻消融术后会发生剩余肝

### ■同行评价

本文综述的活体生物荧光成像技术是目前国际上刚刚兴起的一种实验技术, 在国内尚未开展, 因此具有新意. 文章立意新颖, 为国内首次, 对国内医学实验研究具有重要指导意义.



脏以及多个远位脏器的NF-kappaB转录因子的激活,继而在肝脏的直接损伤后引发多个系统损伤. Gray *et al*<sup>[20]</sup>将活体生物荧光成像技术应用到急性胰腺炎的研究中. 他们构建了由依赖转录因子NF-kappaB的启动子操控photinus萤光素酶表达的转基因小鼠. NF-kappaB在胰腺、肝脏、肺脏中的活性可通过萤光素酶表达程度反映. 在造成急性胰腺炎模型后证实肝脏和肺脏中NF-kappaB活性均明显升高,根据所得数据推断肝脏在调节胰腺炎诱导的SIRS中发挥了重要作用. Nguyen *et al*<sup>[21]</sup>将活体生物荧光成像技术应用于对环加氧酶-2(COX-2)的研究. 将转染鼠COX-2启动子和萤光素酶基因的嵌合体的肿瘤细胞进行异种移植,在注射脂多糖(LPS)或内毒素后可观察到萤光素酶表达,从而实现了对COX-2表达的监测. Zhang *et al*<sup>[22]</sup>利用iNOS-luc转基因小鼠观察炎症过程中可诱导一氧化氮合成酶(iNOS)的表达. 在小鼠的败血症模型中观察到iNOS在肝脏中的表达,并提出此种转基因诱导是时间、剂量依赖的,所产生的光子数量与肝脏中的iNOS mRNA的水平是相关的. 同年作者评估了此种转基因小鼠在关节炎中的应用,在膝关节中注射酵母聚糖(zymosan)后利用活体生物荧光成像可观测到其诱导的iNOS-luc表达. 因此, iNOS-luc转基因小鼠模型为今后研究诱导iNOS表达的各种病理过程和研究各种抗炎因子提供了一个有价值的工具. Hardy *et al*<sup>[23]</sup>利用活体生物荧光成像发现可以引起致命感染的单核细胞增多利斯特菌增殖侵袭、定位于小鼠的胆囊内,并由此推测人类此病菌的感染灶很可能也位于此处.

**2.3 活体生物荧光成像技术和细胞示踪** 活体生物荧光成像技术除了已广泛用于多种肿瘤细胞和病原体的体内示踪,最近开始应用到免疫细胞、干细胞、细胞凋亡等研究领域. Costa *et al*<sup>[24]</sup>在小鼠模型上实现了直接对转染了萤光素酶基因的CD4<sup>+</sup>T细胞的活体成像. 在一个模拟多发性硬化病的小鼠模型上,实验性地诱导自身免疫性脑脊髓炎. T淋巴细胞通过PGC逆转录载体转导表达萤光素酶,通过活体生物荧光成像可以追踪到T淋巴细胞聚集于中枢神经系统. Wang *et al*<sup>[25]</sup>将萤光素酶基因稳定地转导于人类造血干细胞(HSC)中,利用活体生物荧光成像揭示了HSC及其前体细胞在受体小鼠骨髓腔中植活、增殖的动态信息. Kim *et al*<sup>[26]</sup>将萤光素酶基因转染于神经前体细胞(NPC),然后注射于使用夹闭大脑中

动脉方法造成的小鼠脑梗模型中,利用活体生物荧光成像显示神经前体细胞迅速游走聚集至梗塞病灶处. 同年Lu *et al*<sup>[27]</sup>将萤光素酶基因利用慢病毒载体成功转导于胰岛细胞,并将此胰岛细胞移植于用链脲霉素处理过的NOD-scid小鼠. 利用活体生物荧光成像观察移植后的胰岛细胞及排斥反应,证明移植后胰岛细胞的功能并没有受到病毒转导、萤光素酶基因表达的影响. 这为胰岛移植后监测胰岛细胞的存活提供了一个全新的和更为直接的手段.

### 3 活体生物荧光成像技术与放射性活体成像技术的比较

活体生物荧光成像技术与放射性活体成像技术如PET, SPECT相比敏感性更高而且易操作,在应用方面,因为可以同时成像多个动物,并且图像采集时间短少于5 min,因此效率更高;不需要回旋加速器,无放射性损害;成像设备价格相对较低,单次成像成本低廉;底物萤光素相对便宜,稳定易保存,而放射性核素标靶的探针合成既昂贵又费时. 活体生物荧光成像其主要缺点在于成像深度较浅暂时不能应用于临床和较大的实验动物,而且目前不具备断层成像功能. 活体生物荧光成像这一新兴的技术由于具有巨大的优势,因此在生物医学方面的应用领域目前仍在不断地扩大. 他的出现已打破了以往许多研究禁区堪称一项革命性的技术. 目前活体生物荧光成像为二维图像,在不远的将来将会发展为三维断层成像,并且与PET和MRI相结合取长补短进一步扩大应用领域,突破更多的研究瓶颈,及早应用于临床造福人类.

### 4 参考文献

- 1 Contag CH, Bachmann MH. Advances in *in vivo* bioluminescence imaging of gene expression. *Annu Rev Biomed Eng* 2002; 4: 235-260
- 2 McCaffrey A, Kay MA, Contag CH. Advancing molecular therapies through *in vivo* bioluminescent imaging. *Mol Imaging* 2003; 2: 75-86
- 3 Caitlin E, O'Connell-Rodwell, Stacy M, Burns, Michael H, Bachmann, Christopher H, Contag. Bioluminescent indicators for *in vivo* measurements of gene expression. *Trends in Biotechnology* 2002; 20: 19-23
- 4 Weissleder R, Mahmood U. Molecular imaging. *Radiology* 2001; 219: 316-333
- 5 Contag PR. Whole-animal cellular and molecular imaging to accelerate drug development. *Drug Discov Today* 2002; 7: 555-562
- 6 Contag PR, Olomu IN, Stevenson DK, Contag CH. Bioluminescent indicators in living mammals. *Nat*



- Med* 1998; 4: 245-247
- 7 Greer LF, Szalay AA. Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. *Luminescence* 2002; 17: 43-74
  - 8 Hardy J, Edinger M, Bachmann MH, Negrin RS, Fathman CG, Contag CH. Bioluminescence imaging of lymphocyte trafficking *in vivo*. *Exp Hematol* 2001; 29: 1353-1360
  - 9 Weissleder R, Ntziachristos V. Shedding light onto live molecular targets. *Nat Med* 2003; 9: 123-128
  - 10 Edinger M, Cao YA, Verneris MR, Bachmann MH, Contag CH, Negrin RS. Revealing lymphoma growth and the efficacy of immune cell therapies using *in vivo* bioluminescence imaging. *Blood* 2003; 101: 640-648
  - 11 Contag CH, Jenkins D, Contag PR, Negrin RS. Use of reporter genes for optical measurements of neoplastic disease *in vivo*. *Neoplasia* 2000; 2: 41-52
  - 12 Rehemtulla A, Stegman LD, Cardozo SJ, Gupta S, Hall DE, Contag CH, Ross BD. Rapid and quantitative assessment of cancer treatment response using *in vivo* bioluminescence imaging. *Neoplasia* 2000; 2: 491-495
  - 13 Alvarnas JC, Linn YC, Hope EG, Negrin RS. Expansion of cytotoxic CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> cells from peripheral blood progenitor cells of patients undergoing autologous hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; 7: 216-222
  - 14 Scheffold C, Kornacker M, Scheffold YC, Contag CH, Negrin RS. Visualization of effective tumor targeting by CD8<sup>+</sup> natural killer T cells redirected with bispecific antibody F(ab')(2)HER2xCD3. *Cancer Res* 2002; 62: 5785-5791
  - 15 Jenkins DE, Yu SF, Hornig YS, Purchio T, Contag PR. *In vivo* monitoring of tumor relapse and metastasis using bioluminescent PC-3M-luc-C6 cells in murine models of human prostate cancer. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20: 745-756
  - 16 Hollingshead MG, Bonomi CA, Borgel SD, Carter JP, Shoemaker R, Melillo G, Sausville EA. A potential role for imaging technology in anticancer efficacy evaluations. *Eur J Cancer* 2004; 40: 890-898
  - 17 Contag CH, Contag PR, Mullins JL, Spilman SD, Stevenson DK, Benaron DA. Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts. *Mol Microbiol* 1995; 18: 593-603
  - 18 Francis KP, Joh D, Bellinger-Kawahara C, Hawkinson MJ, Purchio TF, Contag PR. Monitoring bioluminescent *Staphylococcus aureus* infections in living mice using a novel luxABCDE construct. *Infect Immun* 2000; 68: 3594-3600
  - 19 Sadikot RT, Wudel LJ, Jansen DE, Debelak JP, Yull FE, Christman JW, Blackwell TS, Chapman WC. Hepatic cryoablation-induced multisystem injury: bioluminescent detection of NF-kappaB activation in a transgenic mouse model. *J Gastrointest Surg* 2002; 6: 264-270
  - 20 Gray KD, Simovic MO, Chapman WC, Blackwell TS, Christman JW, Washington MK, Yull FE, Jaffal N, Jansen ED, Gautman S, Stain SC. Systemic nf-kappaB activation in a transgenic mouse model of acute pancreatitis. *J Surg Res* 2003; 110: 310-314
  - 21 Nguyen JT, Machado H, Herschman HR. Repetitive, noninvasive imaging of cyclooxygenase-2 gene expression in living mice. *Mol Imaging Biol* 2003; 5: 248-256
  - 22 Zhang N, Weber A, Li B, Lyons R, Contag PR, Purchio AF, West DB. An inducible nitric oxide synthase-luciferase reporter system for *in vivo* testing of anti-inflammatory compounds in transgenic mice. *J Immunol* 2003; 170: 6307-6319
  - 23 Hardy J, Francis KP, DeBoer M, Chu P, Gibbs K, Contag CH. Extracellular replication of *Listeria monocytogenes* in the murine gall bladder. *Science* 2004; 303: 851-853
  - 24 Costa GL, Sandora MR, Nakajima A, Nguyen EV, Taylor-Edwards C, Slavin AJ, Contag CH, Fathman CG, Benson JM. Adoptive immunotherapy of experimental autoimmune encephalomyelitis via T cell delivery of the IL-12 p40 subunit. *J Immunol* 2001; 167: 2379-2387
  - 25 Wang X, Rosol M, Ge S, Peterson D, McNamara G, Pollack H, Kohn DB, Nelson MD, Crooks GM. Dynamic tracking of human hematopoietic stem cell engraftment using *in vivo* bioluminescence imaging. *Blood* 2003; 102: 3478-3482
  - 26 Kim DE, Schellingerhout D, Ishii K, Shah K, Weissleder R. Imaging of stem cell recruitment to ischemic infarcts in a murine model. *Stroke* 2004; 35: 952-957
  - 27 Lu Y, Dang H, Middleton B, Zhang Z, Washburn L, Campbell-Thompson M, Atkinson MA, Gambhir SS, Tian J, Kaufman DL. Bioluminescent monitoring of islet graft survival after transplantation. *Mol Ther* 2004; 9: 428-435

电编 李琪 编辑 潘伯荣

# 电针足三里穴抗大鼠应激性胃黏膜损伤作用与NTS内受体的关系

黄碧兰, 王秋桂, 余良主, 唐琼, 丁洁琼

## ■背景资料

NTS是脑干内接受内脏初级传入信息的重要核团, 含有多类神经肽和递质, 并存在多种受体, 通过这些肽类或递质与外周神经和中枢其他部进行信息传递。本文课题组在前期工作中已证明了NTS参与了EA对胃黏膜损伤的保护作用。

黄碧兰, 余良主, 唐琼, 丁洁琼, 咸宁学院医学院生理学教研室 湖北省咸宁市 437100

王秋桂, 咸宁学院医学院组织胚胎学教研室 湖北省咸宁市 437100

院科研基金资助项目, No. KY0539

通讯作者: 黄碧兰, 437100, 湖北省咸宁市, 咸宁学院医学院生理学教研室. huangbilan@etang.com

电话: 0715-8175615

收稿日期: 2006-05-13 接受日期: 2006-07-10

## Effect of electroacupuncture Zusanli point on stress-induced gastric mucosal injury and its relationship with receptors in nucleus tractus solitarius

Bi-Lan Huang, Qiu-Gui Wang, Liang-Zhu Yu, Qiong Tang, Jie-Qiong Ding

Bi-Lan Huang, Liang-Zhu Yu, Qiong-Tang, Jie-Qiong Ding, Department of Physiology, School of Medicine, Xianning College, Xianning 437100, Hubei Province, China

Qiu-Gui Wang, Department of Histology and Embryology, School of Medicine, Xianning College, Xianning 437100, Hubei Province, China

Supported by the Science Research Foundation of Xianning College, No. KY0539

Correspondence to: Bi-Lan Huang, Department of Physiology, School of Medicine, Xianning College, Xianning 437100, Hubei Province, China. huangbilan@etang.com

Received: 2006-05-13 Accepted: 2006-07-10

## Abstract

**AIM:** To investigate the relationship between the effect of electroacupuncture (EA) Zusanli point on the stress-induced gastric mucosal injury and the receptors in nucleus tractus solitarius (NTS) in rats.

**METHODS:** Fifty-six male SD rats were randomly divided into 8 groups, and gastric ulcer was induced in all the rats by constraint cold method. Except those in model group, the rats were treated with EA, NS+EA, prazosin+EA, yohimbine+EA, propranolol+EA, atropine+EA, and naloxone+EA, respectively. The ulcer indexes were observed after microinjection of various receptor antagonists into NTS.

**RESULTS:** In comparison with that in model group, the UI was significantly reduced in NS+EA or EA group ( $26.3 \pm 3.5$ ,  $25.4 \pm 3.1$  vs  $37.5 \pm 4.2$ ,  $t = 5.42$ ,  $t = 6.13$ , both  $P < 0.01$ ). In comparison with that NS+EA stress group, the UI was markedly increased in prazosin+EA or tropine+EA group ( $34.6 \pm 3.4$ ,  $33.1 \pm 3.7$  vs  $26.3 \pm 3.5$ ,  $t = 4.50$ ,  $t = 3.53$ , both  $P < 0.01$ ), but it was not notably different from that in yohimbine+EA, propranolol+EA and naloxone-EA group.

**CONCLUSION:** Electroacupuncture plays a protective role in gastric mucosa against stress-induced injury in rats, which is partly mediated by  $\alpha_1$  and M type receptors, but not related to  $\alpha_2$ ,  $\beta$  and opioid receptors.

**Key Words:** Electroacupuncture; Zusanli; Nucleus tractus solitarius; Receptor antagonist; Stress-induced gastric mucosal injury

Huang BL, Wang QG, Yu LZ, Tang Qiong, Ding JQ. Effect of electroacupuncture Zusanli point on stress-induced gastric mucosal injury and its relationship with receptors in nucleus tractus solitarius. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(24):2444-2447

## 摘要

**目的:** 探讨(EA)足三里穴抗大鼠应激性胃黏膜损伤作用与NTS(NTS)内受体关系。

**方法:** 健康♂SD大白鼠56只随机分为8组: 应激模型组、EA-应激组、生理盐水(NS)-EA-应激组、哌唑嗪-EA-应激组、育亨宾-EA-应激组、心得安-EA-应激组、阿托品-EA-应激组、纳络酮-EA-应激组。采用束缚-冷方法制备大鼠应激性胃溃疡模型, 观察NTS内微量注入不同受体阻断剂, 胃溃疡指数(UI)的变化。

**结果:** NS-EA-应激组、EA-应激组大鼠胃黏膜损伤明显减轻, UI分别为 $26.3 \pm 3.5$ ,  $25.4 \pm 3.1$ , 与应激模型组 $37.5 \pm 4.2$ 比较有显著性差异( $t = 5.42$ ,  $t = 6.13$ ,  $P < 0.01$ )。哌唑嗪-EA-应激组UI为 $34.6 \pm 3.4$ 明显高于NS-EA-应激组( $t = 4.50$ ,  $P < 0.01$ )。育亨宾-EA-应激组和心得安-EA-应

激组分别与NS-EA-应激组比较, UI无显著性差异. 阿托品-EA-应激组大鼠UI为 $33.1 \pm 3.7$ 明显高于NS-EA-应激组( $t = 3.53, P < 0.01$ ), 纳络酮-EA-应激组与NS-EA-应激组比较, UI无显著性意义.

**结论:** EA对大鼠应激性胃黏膜损伤的保护作用部分是通过NTS内 $\alpha_1$ , M受体介导的, 而与 $\alpha_2$ ,  $\beta$ 和阿片肽受体无明显关系.

**关键词:** NTS; 受体阻断剂; 应激性胃黏膜损伤

黄碧兰, 王秋桂, 余良主, 唐琼, 丁洁琼. EA足三里穴抗大鼠应激性胃黏膜损伤作用与NTS内受体关系的研究. 世界华人消化杂志 2006;14(24):2444-2447

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2444.asp>

## 0 引言

针刺足三里穴对应激性胃黏膜损伤的保护作用, 已被大量的临床和实验研究所证实<sup>[1-2]</sup>, 但其确切机制仍不明确, 尤其是中枢核团对其调控的资料很少. 孤束核(nucleus tractus solitarius, NTS)是脑干内接受内脏初级传入信息的重要核团, 含有多种神经肽类和递质, 并存在多种受体, 通过这些肽类或递质与外周神经和中枢其他部进行信息传递<sup>[3]</sup>. 有资料报道, NTS参与大鼠胃缺血-再灌注损伤的调控作用<sup>[4]</sup>. 我们在前期工作也观察到损毁大鼠双侧NTS, 电针(EA)足三里穴对应激性胃黏膜损伤的保护作用减弱, 证明了NTS参与了EA对胃黏膜损伤的保护作用. 但这一作用是否由NTS内的受体介导或由何种受体介导? 我们通过核团内微量注射不同受体阻断剂, 以探讨EA足三里穴抗大鼠应激性胃黏膜损伤作用与NTS内受体关系, 从而为EA防治应激性胃黏膜损伤提供理论和实验依据.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康♂SD大鼠56只, 体质量 $230 \pm 20$  g(由本院实验动物中心提供). 动物随机分为8组: 应激模型组、EA-应激组、生理盐水(NS)-EA-应激组、哌唑嗪-EA-应激组、育亨宾-EA-应激组、心得安-EA-应激组、阿托品-EA-应激组、纳络酮-EA-应激组. 哌唑嗪(prazosin)、育亨宾(yohimbine)Sigma公司产品. 心得安(propranolol)江苏丹阳制药厂生产. 阿托品(atropine)徐州第二制药厂生产. 纳络酮(naloxone)北京四环制药厂生产. 脑立体定位仪(DW-5型)成都泰盟科技有限公司.

**1.2 方法** NTS埋管及微量注射: 大鼠用戊巴比妥钠(30 mg/kg) ip麻醉后, 借助于脑立体定位仪, 参照Paxinos *et al*<sup>[5]</sup>脑图谱, 向双侧NTS(坐标AP13 mm, L或R0.6-0.8 mm, H7.7-7.8 mm)埋植直径0.6 mm不锈钢导管. 导管插入术后7 d, 将外径0.3 mm注射管插入该导管内, 恒速注入药液或NS(注药量为阿托品0.5 g/L, 心得安1 g/L, 育亨宾2 g/L, 哌唑嗪1 g/L, 纳络酮2 g/L), 药液注入30 min后进行EA. 实验完毕向两侧NTS注入少量溴胺天蓝, 动物处死后取脑置于40 g/L甲醛溶液, 然后作脑切片以确定注射点部位, 未注中者不纳入统计. EA处理: 大鼠放置特制的鼠笼内, 双后肢充分暴露. 在大鼠双后肢膝关节下方腓骨小头内5 mm处取足三里穴, 用CDM1-2型双频针麻治疗仪刺激, 频率20 Hz, 强度以大鼠下肢轻微抖动为度, 连续EA 30 min后再应激. 束缚-冷应激性胃溃疡模型制备: 大鼠禁食24 h, 禁水2 h, 乙醚轻度麻醉后, 束缚四肢于自制木板上, 待其清醒后放入4℃冰箱, 应激3 h取出, 将大鼠处死剖腹, 于胃幽门和贲门两处用线结扎, 并向胃腔内注入40 g/L甲醛溶液8-10 mL, 取出胃置同一浓度的甲醛溶液固定. 沿胃大弯剪开展平, 按Guth *et al*<sup>[6]</sup>指数评定法计算胃黏膜溃疡指数(UI): 溃疡面的长度小于1 mm为1分, 1-2 mm为2分, 2-3 mm为3分, 3-4 mm为4分, 大于4 mm将其分割为若干段, 每段按上法计算. 溃疡宽度大于1 mm则分值 $\times 2$ , 累积得分, 即为该大鼠胃黏膜UI.

**统计学处理** 数据均采用SPSS 11.0软件包进行统计学分析. 实验结果以均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示, 组间比较采用 $t$ 检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 肾上腺素能受体阻断剂对EA抗应激性胃黏膜损伤的影响** NS-EA-应激组、EA-应激组大鼠胃黏膜损伤明显减轻, UI分别为 $26.3 \pm 3.5$ ,  $25.4 \pm 3.1$ , 与应激模型组(UI为 $37.5 \pm 4.2$ )比较有显著性差异( $P < 0.01$ , 图1). 哌唑嗪-EA-应激组UI为 $34.6 \pm 3.4$ 明显高于NS-EA-应激组( $P < 0.01$ ). 育亨宾-EA-应激组UI  $27.1 \pm 3.0$ 、心得安-EA-应激组UI  $25.7 \pm 3.2$ 分别与NS-EA-应激组比较无显著性差异( $P > 0.05$ , 图2). 结果表明, 哌唑嗪可削弱EA对胃黏膜损伤的保护作用, 育亨宾、心得安对EA的作用无明显的影响.

**2.2 阿托品对EA抗应激性胃黏膜损伤的影响** 阿托品-EA-应激组大鼠, 胃黏膜损伤加重, UI为

### ■ 研发前沿

机体对应激性的反应发动于中枢神经系统, 然后影响到外周神经系统和体液因素. 因而中枢神经系统功能的变化在应激性溃疡的发病过程中无疑是非常重要的. EA对胃黏膜损伤的保护作用机制涉及到多种复杂因素综合的作用, 目前的研究主要集中在中枢神经递质、受体、激素在EA抗应激性胃黏膜损伤中的作用以及他们之间相互作用关系.



### ■创新盘点

本文通过NTS注射不同受体阻断剂,证实了NTS参与EA对应激性胃黏膜损伤保护作用,此作用部分是通过NTS内 $\alpha_1$ 和M受体介导的,而与 $\alpha_2$ ,  $\beta$ 和阿片受体无明显关系。

33.1 $\pm$ 3.7升高,与NS-EA-应激组比较有显著性意义( $P<0.01$ ,图3),结果表明,阿托品可部分阻断EA对胃黏膜损伤的保护作用。

**2.3 纳络酮对EA抗应激性胃黏膜损伤的影响** 纳络酮-EA-应激组UI为28.1 $\pm$ 3.5,与NS-EA-应激组比较,无显著性意义(图3)。结果提示,纳络酮对EA保护胃黏膜损伤作用无明显影响。

## 3 讨论

EA足三里穴对胃黏膜的保护作用已被大量临床观察和实验研究所证实。它是一种复杂的多因素综合作用的病理生理过程,其机制可能通过下丘脑和某些胃肠激素及神经肽的影响来实现的,如对一氧化氮合酶、生长抑素、表皮生长因子、生长激素、前列腺素E2、降钙素基因相关肽等的影响来调节胃的分泌、血流及黏膜和黏膜屏障的再生和修复<sup>[7-8]</sup>。但有关EA对应激性胃黏膜损伤的保护作用中枢机制仍不明确,尤其是中枢核团及受体对其调控的资料很少。NTS是结构和功能非常复杂的神经核团,位于延髓背侧,在吻尾方向上形成y字型的细胞柱,其吻侧1/3是味觉初级传入的终止部位,尾侧2/3是接受胸腹腔脏器初级传入的中枢<sup>[9]</sup>。Kalia *et al*<sup>[10]</sup>根据细胞构筑将NTS分为9个亚区,胃肠道的初级传入纤维通过迷走神经主要终止于NTS的内侧亚核,其次为背侧亚核、连合亚核和胶状质亚核。胃的牵拉反应及饱胀感觉经迷走传入神经可到达NTS<sup>[11-12]</sup>,且NTS和迷走神经背核之间存在P物质(SP)、胆囊收缩素(CCK)等肽能神经纤维的投射<sup>[13]</sup>。而迷走神经背核是支配胃的迷走神经传出纤维的起始核。有文献报道<sup>[8]</sup>,心理性应激条件可以导致延髓的迷走神经背核神经元细胞自发放电频率呈现相对紊乱状态,给予EA刺激其迷走神经背核自发放电频率较应激组有相对稳定的趋势。由于NTS与迷走神经背核有密切的联系,NTS是调节胃生理功能的重要中枢结构<sup>[14]</sup>。

有资料表明,在NTS内有多种肽类或神经递质和受体,并参与信息传递与中枢其他部位存在复杂的结构和功能联系<sup>[15-16]</sup>。由于NTS内的神经递质、受体种类较多,因而其生理功能呈多样性。有文献报道,NTS参与室旁核加压素能神经元对大鼠胃缺血-再灌注损伤的调控作用<sup>[17]</sup>。水浸束缚应激能导致胃溃疡的产生,可能与伤害性刺激激活脑干儿茶酚胺能神经元,后者进一步增强下丘脑室旁核、脑干NTS的活动有关<sup>[18]</sup>。我们前期工作也观察到损毁大鼠双侧NTS,可削弱

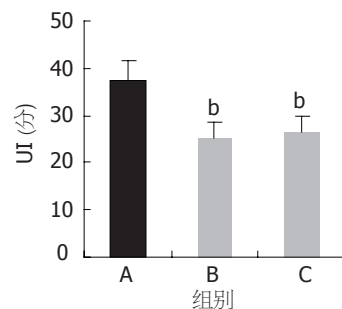


图1 EA对应激性胃黏膜损伤保护作用。<sup>b</sup> $P<0.01$  vs 应激模型组。A: 应激模型组; B: EA-应激组; C: NS-EA-应激组。

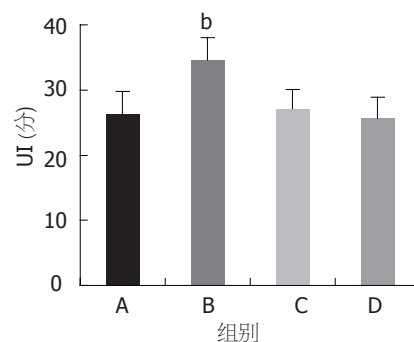


图2 肾上腺素能受体阻断剂对EA抗应激性胃黏膜损伤的影响。<sup>b</sup> $P<0.01$  vs NS-EA-应激组。A: NS-EA-应激组; B: 哌唑嗪-EA-应激组; C: 育亨宾-EA-应激组; D: 心得安-EA-应激组。

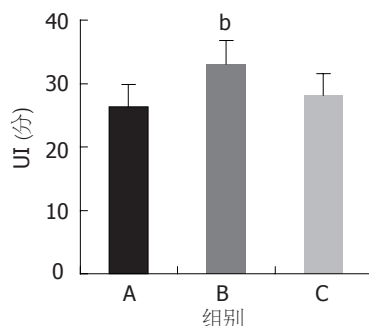


图3 阿托品、纳络酮对EA抗应激性胃黏膜损伤的影响。<sup>b</sup> $P<0.01$  vs NS-EA-应激组。A: NS-EA-应激组; B: 阿托品-EA-应激组; C: 纳络酮-EA-应激组。

EA对应激性胃黏膜损伤保护作用,证明了NTS参与了EA对应激性胃黏膜损伤保护作用。但这一作用是否由NTS内的受体介导以及由何种受体介导?为此我们通过核团内分别微量注射肾上腺素能 $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ 受体阻断剂哌唑嗪、育亨宾、心得安和胆碱能M受体阻断剂阿托品以及阿片受体阻断剂纳络酮。结果显示,NTS注入哌唑嗪或阿托品,大鼠UI增大,EA对应激性胃黏膜损伤的保护作用减弱;而NTS注入育亨宾、心得安、纳络酮对EA的作用无明显的影响。结果提示,EA对应激性胃黏膜损伤有保护作用,此作用可

能部分是通过NTS内 $\alpha_1$ 和M受体介导的, 而与 $\alpha_2$ ,  $\beta$ 和阿片受体无明显关系. 已有文献证实<sup>[3]</sup>, NTS内存在许多肾上腺素能纤维, 其末梢与NTS内的胞体、轴体和树突构成突触, 放射自显影法也证实NTS内存在 $\alpha$ 和 $\beta$ 受体; 另外在NTS内的一些细胞体存在乙酰胆碱, 在NTS尾部和中间部存在胆碱乙酰转移酶和胆碱能受体. 但至于NTS内 $\alpha_1$ 受体或M受体是如何介导EA作用, 其具体机制还有待进一步研究.

#### 4 参考文献

- 1 黎喜平, 严洁. 针灸对胃黏膜损伤保护作用机制的研究进展. 针刺研究 2005; 30: 60-63
- 2 郑长毅, 郑师碧, 韦立新. 针刺对消化性溃疡患者内源性多肽的影响. 上海针灸杂志 2002; 21: 10-11
- 3 康颂建. NTS内的神经递质及其生理作用. 生理科学进展 1992; 23: 62-64
- 4 张建福, 张咏梅, 阎长栋, 周秀萍, 祁友键. 下丘脑室旁核大鼠胃缺血-再灌注损伤调控的神经机制. 中国神经科学杂志 2001; 17: 321-325
- 5 Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd Revised. Sydney: Academic Press, 1986: F23-F26; F70-F72
- 6 Guth PH, Aures D, Paulsen G. Topical aspirin plus HCl gastric lesions in the rat. Cytoprotective effect of prostaglandin, cimetidine, and probanthine. *Gastroenterology* 1979; 76: 88-93
- 7 秦明, 黄裕新, 王景杰, 张少玲, 赵保民, 王旭霞. 预防性针刺足三里穴对冷应激大鼠胃黏膜损伤的影响. 西南国防医药 2005; 15: 133-136
- 8 王景杰, 黄裕新, 郭庆东, 秦明, 高巍, 王庆莉. 心理性应激状态下针刺对大鼠DMV放电、胃电和胃黏膜损伤的影响. 第四军医大学学报 2001; 22: 804-809
- 9 槐瑞托, 李俊敏, 牛丽静, 管振龙. 大鼠NTS和最后区向中脑导水管周围灰质的直接投射. 神经解剖学杂志 2005; 21: 64-68
- 10 Kalia M, Sullivan JM. Brainstem projections of sensory and motor components of the vagus nerve in the rat. *J Comp Neurol* 1982; 211: 248-265
- 11 Carlson SH, Osborn JW. Splanchnic and vagal denervation attenuate central Fos but not AVP responses to intragastric salt in rats. *Am J Physiol* 1998; 274: R1243-1252
- 12 Carlson SH, Beitz A, Osborn JW. Intragastric hypertonic saline increases vasopressin and central Fos immunoreactivity in conscious rats. *Am J Physiol* 1997; 272: R750-R758
- 13 Berk ML, Smith SE. Local and commissural neuropeptide-containing projections of the nucleus of the solitary tract to the dorsal vagal complex in the pigeon. *J Comp Neurol* 1994; 347: 369-396
- 14 刘健华, 李江山, 严洁, 易受乡, 林亚平, 常小容. 针刺足三里穴对大鼠NTSP物质的影响. 针刺研究 2003; 28: 5-9
- 15 Ladic LA, Buchan AM. Three-dimensional spatial relationship of neuropeptides and receptors in the rat dorsal vagal complex. *Brain Res* 1998; 795: 312-324
- 16 Dixon MK, Nathan NA, Hornby PJ. Immunocytochemical distribution of neurokinin 1 receptor in rat dorsal vagal complex. *Peptides* 1998; 19: 913-923
- 17 张咏梅, 张建福, 阎长栋, 周秀萍, 祁友键. NTS参与室旁核加压素能神经元对大鼠胃缺血-再灌注损伤的调控作用. 中国病理生理杂志 2002; 18: 923-926
- 18 郭洪志, 王蕾. 延髓内脏带与内脏器官功能障碍关系的研究进展. 中国脑血管病杂志 2004; 1: 569-572

#### ■应用要点

本文探讨了EA足三里穴抗大鼠应激性胃黏膜损伤作用与NTS内受体关系, 阐述了针灸对应激性胃黏膜损伤保护作用的部分中枢机制, 从而为EA防治应激性胃黏膜损伤提供理论和实验依据.

电编 李琪 编辑 潘伯荣

## c-Fos, c-Jun与Bcl-2蛋白在胃癌组织中的表达及意义

侯仁好, 初晓艺, 刘希双

### ■背景资料

研究表明, 胃癌的发生与胃黏膜上皮细胞凋亡、增殖调控失衡关系密切。c-fos, c-jun作为原癌基因, 参与细胞增殖和凋亡的调控, 其表达异常增加可促进肿瘤形成; bcl-2作为重要的抑制肿瘤细胞凋亡的基因, 通过延长肿瘤细胞生存、阻止细胞凋亡发生而参与肿瘤的发生、发展过程。

### ■研发前沿

细胞凋亡是一个复杂的生理病理过程, 受多种基因的控制。许多证据表明肿瘤的发生与细胞凋亡的调节紊乱有着密切的关系。有关学者认为, 通过改变重要的执行死亡基因的表达改变细胞的存活能力, 以达到治疗疾病的目的。由此看来恶性肿瘤的细胞凋亡的研究对认识肿瘤的发病机制有着非常重要的意义, 而且在肿瘤治疗及预后评价方面都有重要意义。

侯仁好, 初晓艺, 威海市威海卫人民医院消化科 山东省威海市 264200

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

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。still72@tom.com  
电话: 0532-85956961

收稿日期: 2006-03-22 接受日期: 2006-04-16

### Expression of c-Fos, c-Jun and Bcl-2 and their significances in gastric carcinoma

Ren-Hao Hou, Xiao-Yi Chu, Xi-Shuang Liu

Ren-Hao Hou, Xiao-Yi Chu, Department of Gastroenterology, Weihaiwei People's Hospital, Weihai 264200, Shandong Province, China

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

Correspondence to: Xi-Shuang Liu, Center of Endoscopy, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, 16 Jiangsu Road, Qingdao 266003, Shandong Province, China. still72@tom.com

Received: 2006-03-22 Accepted: 2006-04-16

### Abstract

**AIM:** To detect the expression of c-Fos, c-Jun and Bcl-2 protein in gastric carcinoma and explore their correlations with the development and biological behavior of gastric carcinoma.

**METHODS:** SABC immunohistochemistry was used to detect the expressions of c-Fos, c-Jun and Bcl-2 protein in specimens ( $n = 54$ ) from gastric carcinoma and the corresponding cancer-adjacent tissues. The data were analyzed by Chi-Square test using SPSS software.

**RESULTS:** The positive rates of c-Fos, c-Jun and Bcl-2 expression were significantly higher in cancer tissues than those in cancer-adjacent ones (68.5% vs 27.8%,  $\chi^2 = 17.95$ ,  $P < 0.01$ ; 63.0% vs 24.1%,  $\chi^2 = 16.61$ ,  $P < 0.01$ ; 64.8% vs 25.9%,  $\chi^2 = 16.48$ ,  $P < 0.01$ ). The significant difference was present in the expression of c-Fos and c-Jun among different histological types ( $P = 0.018$ ;  $P = 0.032$ ), but wasn't among different status of re-

gional lymph node metastasis and TNM stages. Bcl-2 expression was markedly different among different histological types, status of regional lymph node metastasis and TNM stages ( $P = 0.035$ ;  $P = 0.032$ ;  $P = 0.009$ ). There was a positive correlation between expression of Bcl-2 and c-Fos ( $r = 0.336$ ,  $0.688$ ,  $P < 0.05$ ), Bcl-2 and c-Jun ( $r = 0.318$ ,  $0.512$ ,  $P < 0.05$ ) as well as between c-Fos and c-Jun ( $r = 0.719$ ,  $0.586$ ,  $P < 0.001$ ).

**CONCLUSION:** The expression of c-Fos, c-Jun and Bcl-2 are closely correlated with the carcinogenesis, development, and histological types.

**Key Words:** Apoptosis; c-Fos; Jun; Bcl-2; Gastric neoplasm; Immunohistochemistry

Hou RH, Chu XY, Liu XS. Expression of c-Fos, c-Jun and Bcl-2 and their significances in gastric carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(24):2448-2451

### 摘要

**目的:** 探讨c-Fos, c-Jun, Bcl-2在胃癌中的表达与胃癌的发生、发展及生物学行为的关系。

**方法:** 应用免疫组织化学SABC法, 检测54例胃癌及癌旁组织中c-Fos, c-Jun, Bcl-2蛋白的表达, 结果采用SPSS统计软件包及 $\chi^2$ 检验分析。

**结果:** 胃癌组织中c-Fos, c-Jun, Bcl-2的表达显著高于癌旁组织(68.5% vs 27.8%,  $\chi^2 = 17.95$ ,  $P < 0.01$ ; 63.0% vs 24.1%,  $\chi^2 = 16.61$ ,  $P < 0.01$ ; 64.8% vs 25.9%,  $\chi^2 = 16.48$ ,  $P < 0.01$ )。c-Fos, c-Jun的表达在胃癌不同组织学分级间有显著性差异( $P = 0.018$ ;  $P = 0.032$ ), 在淋巴结转移、TNM分期期间无显著性差异; Bcl-2的表达在胃癌不同组织学分级、淋巴结转移、TNM分期期间有显著性差异( $P = 0.035$ ;  $P = 0.032$ ;  $P = 0.009$ )。胃癌及癌旁组织中Bcl-2与c-Fos、c-Jun ( $r = 0.336$ ,  $0.688$ ,  $P < 0.05$ ;  $r = 0.318$ ,  $0.512$ ,  $P < 0.05$ )及c-Fos与c-Jun ( $r = 0.719$ ,  $0.586$ ,  $P < 0.001$ )之间的表达呈正相关。

**结论:** c-Fos, c-Jun, Bcl-2的表达与胃癌的发生、发展以及组织学分级密切相关。



**关键词:** 凋亡; Fos; Jun; Bcl-2; 胃癌; 免疫组织化学

侯仁好, 初晓艺, 刘希双. c-Fos, c-Jun与Bcl-2蛋白在胃癌组织中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2006;14(24):2448-2451  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2448.asp

## 0 引言

胃癌的发生与胃黏膜上皮细胞凋亡、增殖调控失衡有关. 细胞凋亡是指在一定的生理或病理条件下, 由基因编程控制的细胞主动性死亡过程. 越来越多的研究表明, 细胞凋亡与细胞增殖一样, 与肿瘤的发生、发展以及临床治疗有密切的关系. *bcl-2*可对多种因素诱导的细胞凋亡起抑制作用, 使细胞生存期延长, 又称“存活基因”. *c-fos*, *c-jun*作为核内原癌基因, 参与细胞增殖和凋亡的调控<sup>[1]</sup>, 其表达异常增加可促进肿瘤形成. 我们应用免疫组织化学方法检测胃癌及癌旁组织中c-Fos, c-Jun和Bcl-2蛋白的表达, 探讨他们之间的关系以及在由癌旁组织向胃癌演变过程中的意义.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选择临床及病理资料完整的手术切除并经病理证实为胃管状腺癌的标本54例, 全部病例术前均未经过放化疗. 男34例, 女20例, 年龄38-78(平均59.6)岁. 高、中、低分化腺癌分别是19例、16例、19例, 无淋巴结转移的19例, 有转移的35例. 根据1997年国际抗癌联盟(UICC)制定的TNM分期标准<sup>[2]</sup>进行临床分期: I期10例, II期11例, III期12例, IV期21例.

**1.2 方法** 采用免疫组织化学SABC法, 切片经常规脱腊至水后, 浸入30 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液中灭活内源性过氧化物酶, 微波抗原修复. 一抗c-Fos, c-Jun和Bcl-2均为美国Santa Cruz公司产品(购自武汉博士德公司). 用已知阳性的切片作阳性对照, 正常小鼠、兔血清和PBS代替一抗作阴性对照. 具体操作按说明书进行. 以细胞内出现均匀棕黄色颗粒为阳性细胞, 结果参照文献[3]根据染色阳性细胞数和染色强度分别评分, 两者积分乘积≥2分确定为阳性. 阳性细胞数: 0分为阴性, 1分为阳性细胞数≤10%, 2分为11%-50%, 3分为51%-75%, 4分为>75%. 染色强度: 根据染色强度划分为4级: 0分为无色, 1分为淡黄色, 2分为棕黄色, 3分为棕褐色.

**统计学处理** 应用SPSS软件进行统计学处理, 各项指标间的差别应用 $\chi^2$ 检验, 应用等级相

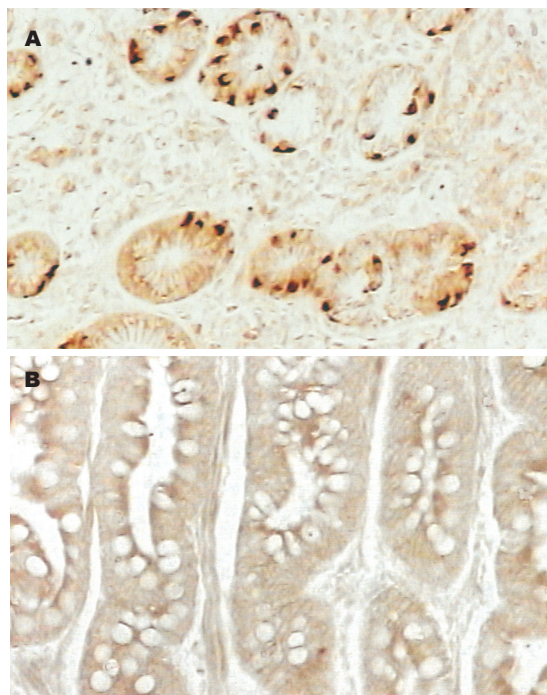


图 1 c-Fos在胃癌及癌旁组织中的表达( $\times 100$ ). A: 胃癌组织中c-Fos呈阳性表达; B: 癌旁组织中c-Fos呈阴性表达.

表 1 c-Fos, c-Jun, Bcl-2在胃癌组织中的表达  $n(\%)$

组织类型	<i>n</i>	Bcl-2	c-Fos	c-Jun
胃癌组织	54	35 (64.8)	37 (68.5)	34 (63.0)
癌旁组织	54	14 (25.9) <sup>b</sup>	15 (27.8) <sup>b</sup>	13 (24.1) <sup>b</sup>
组织学分级				
高分化	19	15	17	15
中分化	16	12	13	11
低分化	19	8 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>
淋巴结转移				
有转移	35	19	26	24
无转移	19	16 <sup>a</sup>	11	10
TNM分期				
I + II	21	18	14	12
III + IV	33	17 <sup>b</sup>	23	22

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ .

关计数检验三者之间的相关性,  $P < 0.05$ 有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 c-Fos, c-Jun, Bcl-2的表达** c-Fos, c-Jun蛋白表达阳性者染色主要定位于细胞核中, 在肿瘤细胞中呈高表达, 在正常细胞中呈低表达; Bcl-2蛋白表达阳性者染色主要定位于细胞质中, 在肿瘤细胞中呈高表达, 在正常细胞中呈低表达; 阳性表达均为粗细不一的棕黄色颗粒(图1-3). 胃癌与癌旁组织中c-Fos, c-Jun, Bcl-2的表达均有显著性差异( $P < 0.01$ , 表1).

**2.2 c-Fos, c-Jun, Bcl-2的表达与胃癌临床病理的关**

### ■ 相关报道

王理伟 *et al* 研究了*c-fos*, *bcl-2*基因表达与肠型、弥漫型胃癌的关系. 该研究应用免疫组织化学方法检测原癌基因*c-fos*和*bcl-2*在肠型和弥漫型胃癌表达及特点, 探讨两型胃癌的发生与c-Fos、Bcl-2蛋白表达的关系及特点, 为胃癌的分型、早期诊断提供了分子病理学指标.

### ■ 创新盘点

胃癌组织中c-Fos, c-Jun, Bcl-2的表达与胃癌临床病理行为之间的关系及三者表达相关性的研究较少, 本研究对c-Fos, c-Jun, Bcl-2的检测可用于胃癌的诊断, 对于胃癌患者的预后具有提示作用, 同时为胃癌的诱导凋亡治疗提供部分理论依据, 具有较强的理论与临床意义.

### ■应用要点

研究表明*bcl-2*通过抑制肿瘤细胞凋亡的方式参与了胃癌的形成与发展, *c-fos*, *c-jun*则通过促进肿瘤细胞增殖的方式参与了其中. 因此对*c-Fos*, *c-Jun*, *Bcl-2*蛋白的检测可用于胃癌的诊断, 对于胃癌患者的预后具有提示作用. 对有关疾病产生细胞凋亡独特机制的深入了解, 有可能用于疾病的治疗, 从而开辟基因治疗的新领域.

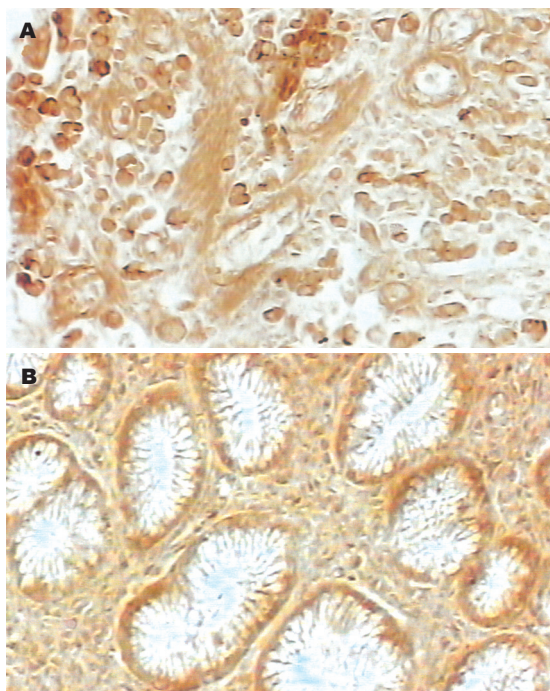


图2 c-Jun在胃癌及癌旁组织中的表达( $\times 100$ ). A: 胃癌组织中c-Jun呈阳性表达; B: 癌旁组织中c-Jun呈阴性表达.

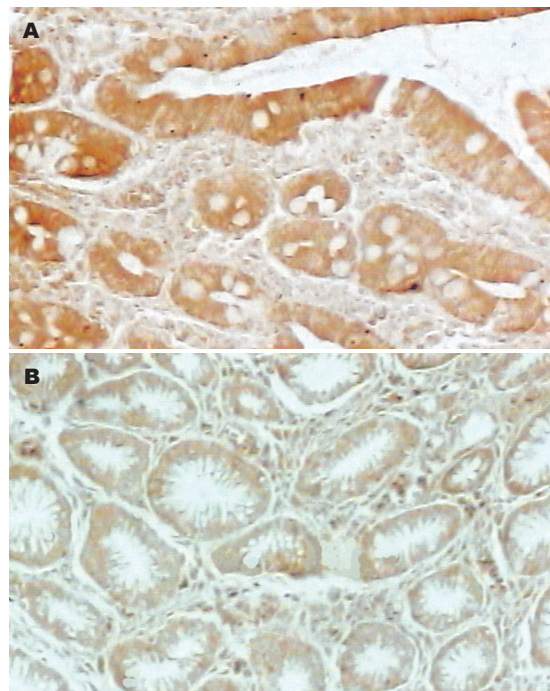


图3 Bcl-2在胃癌及癌旁组织中的表达( $\times 100$ ). A: 胃癌组织中Bcl-2呈阳性表达; B: 癌旁组织中Bcl-2呈阴性表达.

表2 胃癌、癌旁组织中Bcl-2与c-Fos, c-Jun表达的相关性

组织		Bcl-2		<i>r</i>	<i>P</i>
		(+)	(-)		
胃癌	c-Fos (+)	28	9	0.336	0.013
	(-)	7	10		
	c-Jun (+)	26	8	0.318	0.019
	(-)	9	11		
癌旁组织	c-Fos (+)	11	4	0.688	< 0.001
	(-)	3	36		
	c-Jun (+)	8	5	0.512	< 0.001
	(-)	6	35		

系 *c-Fos*, *c-Jun*, *Bcl-2*在高分化胃癌中阳性表达率高于中分化胃癌, 在中分化胃癌中阳性表达率高于低分化胃癌; *c-Fos*, *c-Jun*蛋白的阳性表达率在淋巴结转移、TNM分期间无差别; *Bcl-2*在淋巴结转移组的阳性表达率低于非淋巴结转移组; 在胃癌TNM分期 I, II 期的阳性表达率明显高于III, IV期( $P<0.05$ , 表1).

**2.3 胃癌及癌旁组织中c-Fos, c-Jun, Bcl-2表达的相关性** *c-Fos*, *c-Jun*, *Bcl-2*在胃癌中的表达均高于癌旁组织, 胃癌及癌旁组织中*c-Fos*, *c-Jun*, *Bcl-2*三者之间两两呈正相关(表2, 3).

### 3 讨论

细胞凋亡又称为细胞程序性死亡(PCD), 其调控障碍与肿瘤的发生密切相关. 肿瘤的发生与控

表3 胃癌、癌旁组织中c-Fos与c-Jun表达的相关性

组织		c-Fos		<i>r</i>	<i>P</i>
		(+)	(-)		
胃癌	c-Jun (+)	32	2	0.719	< 0.001
	(-)	5	15		
癌旁组织	c-Jun (+)	9	4	0.586	< 0.001
	(-)	6	35		

制细胞增殖的癌基因的过度表达有关, 也与抑制细胞凋亡的基因的高表达及诱导细胞凋亡的抗癌基因的变异失活有关<sup>[4]</sup>. 细胞凋亡机制被不适当的终止后, 为细胞癌变提供了重要前提. 凋亡过程的受抑对肿瘤的发生发展起重要作用. 现已证明*bcl-2*是最重要的抑制肿瘤细胞凋亡的基因, *Bcl-2*的过度表达并不影响细胞增殖和加速细胞分裂, 而是延长肿瘤细胞生存、阻止细胞凋亡的发生<sup>[5]</sup>. *bcl-2*基因功能在于与细胞色素c和caspase-9相互作用, 干扰凋亡的正常进行. 研究发现, 从正常胃黏膜→萎缩性胃炎→肠化生→不典型增生→胃癌, *Bcl-2*表达逐渐增强, 而细胞凋亡指数逐渐下降, 提示*Bcl-2*蛋白表达与细胞凋亡指数呈负相关<sup>[6]</sup>. 另有研究表明*Bcl-2*在高、中分化胃癌中表达率高于低分化胃癌, 在淋巴结未受侵犯者中表达率高于有淋巴结转移者, 且*Bcl-2*阳性患者常表现出较好的存活趋势, 尤其在有2组以上淋巴结转移的患



者, Bcl-2阳性者的生存期明显长于Bcl-2阴性者, 提示Bcl-2阳性表达与肿瘤的较好分化程度及低度恶性行为有关<sup>[7]</sup>, 这些研究表明, Bcl-2可为临床提供一个重要的预后参数. 本实验显示Bcl-2在胃癌组织中呈高表达, 癌旁组织中呈低表达, 由癌旁组织向胃癌演变过程中, Bcl-2表达阳性率明显升高. 随着肿瘤组织分化程度的降低、淋巴结转移及TNM分期发展到III, IV期, Bcl-2表达阳性率降低. 提示**bcl-2**蛋白可能通过抑制细胞凋亡过程进而促进肿瘤发生, 且Bcl-2基因表达异常可能是早期事件, 其表达强度可能与肿瘤的恶性程度有关. 这与上述研究基本相符.

胃癌的发生、发展及转归与细胞增殖、凋亡平衡失调以及细胞增殖和细胞凋亡的相互消长有关. 在正常机体内, 细胞增殖和细胞凋亡处于一种动态平衡. 当受到外来刺激或/及内在基因发生突变, 细胞凋亡下降, 增殖的表达增强, 使本应进入凋亡程序的细胞没有被识别, 从而允许分裂细胞的累积和阻止驱除带有恶性潜能基因的改变, 从而促进肿瘤的发生<sup>[8]</sup>. *c-fos*, *c-jun*为核内原癌基因, 属即刻早期应答基因(immediate early response gene), 其编码的蛋白为重要的转录因子, 可诱导其下游基因mRNA转录和蛋白表达, 参与细胞增殖和凋亡的调控. 其表达异常增加可诱发细胞转化和肿瘤形成<sup>[1]</sup>. 研究表明Bcl-2通过抑制细胞凋亡的方式参与了胃癌的形成与发展, c-Fos, c-Jun则通过促进细胞增殖的方式参与了其中. 我们证实了Bcl-2与c-Fos, c-Jun的表达有相关性, 提示他们可能由一种或多种共同的因素介导而参与了胃癌的形成与发展. 有文献报告在癌前病变及早期癌中c-Fos和c-Jun的表达高于中、晚期癌<sup>[9]</sup>, 提示c-Fos和c-Jun的异常表达在癌变早期的作用大于中、晚期癌, 其表达异常可能是胃癌发生过程中的一个早期分子事件, 检测c-Fos, c-Jun表达状况有助于胃癌的早期诊断. 我们的实验结果与之相符. 本研究显示c-Fos, c-Jun在胃癌组织中的表达明显高于癌旁组织, 随肿瘤组织分化程度的降低, c-Fos, c-Jun表达阳性率降低, 其与肿瘤组织淋巴结转移、TNM分期无相

关性. 上述结果说明了c-Fos, c-Jun基因蛋白表达变化发生在肿瘤细胞形态变化之前, 可作为胃癌早期诊断的分子病理学指标.

总之, c-Fos, c-Jun和Bcl-2蛋白在胃癌的发生和演化中呈高表达, 三者间呈正相关, 且与胃癌的发生、发展及生物学行为有关, 揭示了癌基因蛋白与胃癌的内在联系.

#### 4 参考文献

- 1 Wagstaff SC, Bowler WB, Gallagher JA, Hipskind RA. Extracellular ATP activates multiple signalling pathways and potentiates growth factor-induced c-fos gene expression in MCF-7 breast cancer cells. *Carcinogenesis* 2000; 21: 2175-2181
- 2 Yoo CH, Noh SH, Kim YI, Min JS. Comparison of prognostic significance of nodal staging between old (4th edition) and new (5th edition) UICC TNM classification for gastric carcinoma. International Union Against Cancer. *World J Surg* 1999; 23: 492-497; discussion 497-498
- 3 Iseki K, Tatsuta M, Uehara H, Iishi H, Yano H, Sakai N, Ishiguro S. Inhibition of angiogenesis as a mechanism for inhibition by 1 $\alpha$ -hydroxyvitamin D3 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 of colon carcinogenesis induced by azoxymethane in Wistar rats. *Int J Cancer* 1999; 81: 730-733
- 4 Haldar S, Negrini M, Monne M, Sabbioni S, Croce CM. Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res* 1994; 54: 2095-2097
- 5 侯宝华, 卿三华, 董凤英, 赵峰, 姚学清, 彭明, 齐德麟. 热疗联合DDP诱导大肠癌细胞凋亡和bcl-2表达的实验研究. *湖北医科大学学报* 2000; 21: 133-135
- 6 Staunton MJ, Gaffney EF. Apoptosis: basic concepts and potential significance in human cancer. *Arch Pathol Lab Med* 1998; 122: 310-319
- 7 Krajewska M, Fenoglio-Preiser CM, Krajewski S, Song K, Macdonald JS, Stemmerman G, Reed JC. Immunohistochemical analysis of Bcl-2 family proteins in adenocarcinomas of the stomach. *Am J Pathol* 1996; 149: 1449-1457
- 8 Aizawa K, Ueki K, Suzuki S, Yabusaki H, Kanda T, Nishimaki T, Suzuki T, Hatakeyama K. Apoptosis and Bcl-2 expression in gastric carcinomas: correlation with clinicopathological variables, p53 expression, cell proliferation and prognosis. *Int J Oncol* 1999; 14: 85-91
- 9 Kogan EA, Shtabskii AB, Sekamova SM, Mazurenko NN, Kiselev FL. Nuclear oncoprotein expression in lung precancer and cancer at various stages of tumor progression studies at the level of light- and electron-immunohistochemistry. *Arkh Patol* 1994; 56: 44-49

#### ■同行评价

该文应用免疫组织化学方法研究了c-Fos, c-Jun, Bcl-2等癌基因蛋白与胃癌发生的内在关系, 证实了国外的研究结果, 对早期胃癌的分子病理学诊断有一定意义. 虽然国外已有相关研究报道, 但国内迄今尚未见同时观测上述三种癌基因蛋白与胃癌关系的研究报告, 因此研究内容较新颖.

电编 李琪 编辑 潘伯荣



# 肝硬化门静脉高压症患者断流术后转归的影响因素分析

梅斌, 陈孝平, 刘飞龙

## ■背景资料

肝硬化门静脉高压症在我国是常见病, 每年新发病例高达数十万, 其中很大一部分需要外科治疗。目前, 断流术是治疗肝硬化门静脉高压症食道胃底曲张静脉破裂出血的主要术式之一, 其疗效已被国内外学者广泛证实。

梅斌, 陈孝平, 刘飞龙, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝脏外科中心 湖北省武汉市 430030

通讯作者: 梅斌, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院同济医院肝脏外科中心。

meibingluke@sina.com

收稿日期: 2006-03-08 接受日期: 2006-04-30

## Influential factors for the consequence of devascularization in patients with liver cirrhosis and portal hypertension

Bin Mei, Xiao-Ping Chen, Fei-Long Liu

Bin Mei, Xiao-Ping Chen, Fei-Long Liu, Center of Hepatic Surgery, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Bin Mei, Center of Hepatic Surgery, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. meibingluke@sina.com

Received: 2006-03-08 Accepted: 2006-04-30

## Abstract

**AIM:** To investigate the influential factors for the consequence of devascularization in patients with liver cirrhosis and portal hypertension.

**METHODS:** The clinical data of 158 patients with liver cirrhosis and portal hypertension, who received devascularization operation, were retrospectively analyzed. The patients were divided into high-risk and common group according to the complications after operation. Regarded as independent variables, 23 clinical factors were analyzed using Logistic regression.

**RESULTS:** Single-factor analysis showed that the prothrombin time (PT), Child grades, the degrees of liver cirrhosis with naked eyes during operation, the values of anteroposterior diameter tested by B ultrasound, and the degrees of esophageal gastric varicose were significantly different between high-risk and common group ( $P = 0.007$ ;  $P = 0.001$ ;  $P = 0.002$ ;  $P = 0.023$ ;  $P = 0.010$ ). Logistic regression analysis showed that the PT, Child grades, the degrees of liver cirrho-

sis were also significantly different between the two groups.

**CONCLUSION:** The risk factors of devascularization in patient with liver cirrhosis and portal hypertension are Child grade, PT and the degrees of liver cirrhosis with naked eyes during operation.

**Key Words:** Liver cirrhosis; Portal hypertension; Devascularization; Logistic regression

Mei B, Chen XP, Liu FL. Influential factors for the consequence of devascularization in patients with liver cirrhosis and portal hypertension. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(24):2452-2455

## 摘要

**目的:** 研究肝硬化门静脉高压症患者断流术后转归的影响因素。

**方法:** 回顾性分析行断流术的肝硬化门静脉高压症患者158例。根据术后并发症情况将患者分为高危组和一般组2组。将其作为因变量, 将23个临床指标作为自变量, 进行Logistic回归分析。

**结果:** 影单因素分析显示, 高危组和一般组凝血酶原时间(PT,  $P = 0.007$ )、Child分级( $P = 0.001$ )、术中所见肝硬化程度( $P = 0.002$ )、B型超声测得盆腔腹水前后径值( $P = 0.023$ )、胃镜所见食道胃底静脉曲张程度( $P = 0.010$ )有显著性差异。Logistic回归分析显示, Child分级、PT和术中所见肝脏硬化程度在两组间仍有显著差异。

**结论:** 肝硬化门静脉高压症患者断流术后转归的影响因素为Child分级、PT和术中所见肝脏硬化程度。

**关键词:** 肝硬化; 门静脉高压症; 断流术; Logistic回归分析

梅斌, 陈孝平, 刘飞龙. 肝硬化门静脉高压症患者断流术后转归的影响因素分析. *世界华人消化杂志* 2006;14(24):2452-2455  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2452.asp>

## ■研究前沿

断流术治疗门静脉高压症食道胃底曲张静脉破裂出血的疗效确切。然而, 由于患者术前肝脏储备功能差, 术后可能出现肝功能衰竭等并发症。因此, 如何在术前预测手术的安全性, 一直是外科医生关注的焦点。

## 0 引言

肝硬化门静脉高压症在我国是常见病, 每年新发病例高达数十万, 其中很大一部分需要外科治疗<sup>[1-4]</sup>。目前, 断流术是治疗肝硬化门静脉高压症食道胃底静脉曲张破裂出血的主要术式之一, 其疗效已被国内外学者广泛证实<sup>[5-7]</sup>。然而, 由于肝硬化门静脉高压症患者大多术前肝脏储备功能差, 很多患者不能耐受断流术, 接受手术者亦面临手术风险大、术后可能出现肝功能衰竭等并发症的危险。因此, 如何在术前预测患者对手术的耐受性和手术的安全性<sup>[8-9]</sup>, 一直以来是外科医生关注的焦点。有鉴于此, 我们对行断流术的肝硬化门静脉高压症患者的手术转归与术前临床指标的相关性进行了研究, 以期找到影响手术安全性的敏感指标。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 回顾性分析了2001-01/2004-06我院收治的行断流术的肝硬化门静脉高压症患者158例。男131例, 女27例; 年龄14-72(平均46.4±13.1)岁。肝炎后肝硬化126例, 血吸虫肝硬化24例, 门静脉海绵样变5例, 布一加综合征3例。术前肝功能Child A级39例(26.6%), B级92例(56.3%), C级27例(17.1%)。所有患者均行脾切除及贲门周围血管离断术。

**1.2 方法** 术前指标包括性别、年龄、肝硬化类型、胃镜所见食道胃底静脉曲张程度、B型超声测得盆腔腹水前后径、门静脉主干直径、脾脏厚度、术前消化道出血次数、术前1 wk内有无消化道出血及其出血量、术前化验指标(WBC, Hb, PLT, ALT, TP, ALB, T-BIL, D-BIL, T-Chol, Cr, BUN, PT, KPTT)。术中指标包括术中所见肝硬化程度、肝脏体积、腹水量、手术时间、出血量、输血量。术后指标主要包括术后并发症, 如肝功能衰竭、肾功能衰竭、多器官功能衰竭、腹腔内出血、消化道出血、门静脉系统血栓、切口裂开、膈下脓肿、胸腔积液、肺部感染、顽固性腹水、脾热、皮肤淤斑等。根据术后并发症情况将患者分为高危组和一般组2组。符合下列条件之一者为高危组: (1)术后出现肝功能衰竭或肾功能衰竭或多器官功能衰竭者, 或患者死亡; (2)术后腹腔内出血量大于1000 mL; (3)术后出现消化道出血大于400 mL; (4)术后出现严重的肺部或其他部位感染, 体温>39℃。将其作为因变量, 将以下23个指标作为自变量, 进行logistic回归分析: 性别、年龄、胃镜所见食管胃底静脉

表 1 不同Child分级患者手术转归比较  $n$  (%)

项目	Child分级		
	A	B	C
手术时间 (min)	134 ± 31	142 ± 37	149 ± 43
出血量 (mL)	369 ± 127	387 ± 113	401 ± 132
输血量 (mL)	393 ± 134	404 ± 125	423 ± 129
肝功能衰竭	0 (0)	2 (2.2)	3 (11.1) <sup>ac</sup>
肾功能衰竭	1 (2.6)	2 (2.2)	2 (7.4) <sup>c</sup>
腹腔内出血	2 (5.1)	3 (3.3)	2 (7.4)
消化道出血	1 (2.6)	2 (2.2)	3 (11.1) <sup>ac</sup>
门静脉系统血栓	5 (12.8)	11 (12.0)	8 (30.0) <sup>ac</sup>
肺部感染	0 (0)	2 (2.2)	1 (3.7)
顽固性腹水	1 (2.6)	3 (3.3)	2 (7.4)
膈下脓肿	1 (2.6)	2 (2.2)	1 (3.7)
脾热	2 (5.1)	5 (5.4)	3 (11.1) <sup>ac</sup>
死亡	0 (0)	1 (1.1)	1 (3.7)
高危组	4 (10.2)	11 (12.0)	11 (40.7) <sup>ac</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs A级; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs B级。

曲张程度、B型超声测得盆腔腹水前后径、门静脉主干直径、脾脏厚度、术前消化道出血次数、术前1 wk内消化道出血量、术中所见肝硬化程度、术前WBC、Hb、PLT、ALT、TP、ALB、T-BIL、D-BIL、T-Chol、Cr、BUN、PT、KPTT、Child分级。根据患者术前Child分级将其分为3组, 比较其手术时间、出血量、输血量及术后并发症情况。

**统计学处理** 使用SPSS 10.0软件包进行, 对计量指标采用 $t$ 检验, 对计数指标采用 $\chi^2$ 检验。

## 2 结果

**2.1 单因素分析** 高危组患者26例, 一般组132例。在上述23个指标中, 以下5个因素有显著性意义: (1)PT( $P = 0.007$ ); (2)Child分级( $P = 0.001$ ); (3)术中所见肝硬化程度( $P = 0.002$ ); (4)B型超声测得盆腔腹水前后径( $P = 0.023$ ); (5)胃镜所见食道胃底静脉曲张程度( $P = 0.010$ )。

**2.2 多因素分析** 经Logistic回归分析, 最后得出影响手术转归的独立因素为Child分级、PT和术中所见肝硬化程度, 其他2个指标被剔除。(1)不同Child分级患者手术转归比较(表1)。不同Child分级患者间手术时间、出血量、输血量无显著性差异。不同Child分级患者组间术后并发症发生率存在显著性差异, Child C级患者组肝功能衰竭、肾功能衰竭、消化道出血及门静脉系统血栓的发生率高于Child A, B级患者组。所有患者除Child C级组1例死于肝功能衰竭, Child B级组1例死于再发上消化道大出血外, 均经治疗后痊愈出院。(2)PT延长值(s): 高危组5.02±3.11, 比较一般组3.25±2.99( $P = 0.007$ )。 (3)高危组与一般组之间

## ■相关报道

此前曾有报道应用APACHE II 连续评分判断门静脉高压症合并上消化道出血患者不同手术方式的预后, 其对手术安全性及预后判断有一定的临床意义。

## ■创新盘点

本文用Logistic回归分析的方法, 找到影响肝硬化门静脉高压症患者断流术后转归的独立因素, 提供了在术前预测手术安全性的新方法, 较传统方法更全面、客观。

#### ■应用要点

本文提出Child C级并非手术绝对禁忌证,而是相对禁忌证的观点,以及对于严重脾亢的患者,在评价肝功能时,T-BIL水平的价值应与非脾亢患者区别对待,可供术者在临床实践中借鉴。

T-BIL:  $26.7 \pm 19.3$  vs  $27.4 \pm 13.2$   $\mu\text{mol/L}$  ( $P = 0.155$ ) 和D-BIL  $6.9 \pm 5.7$  vs  $6.3 \pm 4.2$   $\mu\text{mol/L}$  ( $P = 0.293$ ), 水平无显著差异。术前T-BIL水平波动于 $9.3$ - $91.6$   $\mu\text{mol/L}$ 之间。为了研究术前不同T-BIL水平患者术后临床转归的不同,以 $51$   $\mu\text{mol/L}$ 为界,将其分为高T-BIL组和低T-BIL组,其术后临床转归情况无相关性( $P = 0.697$ )。

### 3 讨论

断流术是治疗肝硬化门静脉高压症食管胃底曲张静脉破裂出血的主要术式之一,它具有手术操作较简便、近期止血率高的优点,在我国得到了广泛的应用。然而,由于肝硬化门静脉高压症患者大多术前肝脏储备功能差,许多患者不能耐受手术或术后出现严重的并发症,影响手术疗效<sup>[10-14]</sup>。因此,选择断流术治疗肝硬化门静脉高压症食管胃底曲张静脉破裂出血应掌握恰当的适应证。目前临床上常用的标准是Child分级,即Child A、B级患者可考虑行断流术治疗,Child C级则为手术禁忌证。这个标准用于指导手术治疗发挥了巨大作用,但Child C级为手术禁忌证则使部分可能通过手术治疗挽救生命的患者失去了手术机会,近年来已受到质疑。本研究中影响手术转归的独立因素为Child分级、PT和术中所见肝脏硬化程度3个指标。由此可见,Child分级仍然是评价手术安全性的重要指标。本研究结果中Child分级各分项指标如ALB、T-BIL、腹水作为独立因素对手术转归没有意义,而将上述因素综合评价的指标Child分级则是重要的影响因素( $P = 0.001$ )。这说明,Child分级是对肝脏功能综合评价的一个敏感指标,其作用目前仍然不可替代。

PT为另一个影响手术转归的独立因素。分析其一方面反映肝脏的功能状况,另一方面与血小板数量密切相关,反映脾功能亢进的程度及凝血功能受损情况。而术后肝功能衰竭和腹腔内出血正是断流术后最危险的并发症。因此,PT作为评价手术安全性的敏感指标,应在临床上受到足够重视。本研究结果,PT延长 $5$  s应视为高危因素。术中所见肝脏硬化程度是对肝脏病变的直观评价,因而亦能较好地反映肝脏的功能状况,成为手术转归的影响因素。但是,其结果可能因人而异,带有很多的主观性;且不能在术前评估,因而难以用于手术安全性的评价。此外,国内对肝功能分级尚有1983年武汉会议标准<sup>[15]</sup>,其在Child分级的基础上增加了PT指标。

从本研究结果看来,此分级标准可能更能敏感评价手术安全性。

我们还发现,Child C级患者手术时间、出血量、输血量与Child A、B级患者比较无显著性差异。两者在部分术后并发症发生率及高危病例比例方面存在显著性差异,但手术死亡率无差异。一方面是因为Child C级患者是经过选择的临床状况较好的一部分患者,不能代表其全组情况;另一方面也说明,Child C级并非手术绝对禁忌证,只是相对禁忌证,部分病情较轻患者经过精心的术前准备和周密的术后治疗是可以获得良好疗效的。本研究结果中,虽然Child C级患者组高危病例比例为 $40.7\%$ ,出现肝功能衰竭、肾功能衰竭、消化道出血、肺部感染、顽固性腹水及门静脉系统血栓等严重并发症,但除1例死于肝功能衰竭外,其余均经治疗后痊愈出院,充分证明了这一点。我们还发现,有许多患者T-BIL水平较高,甚至高达 $91.6$   $\mu\text{mol/L}$ ,而D-BIL水平相对较低,且经较长时间护肝治疗改善甚微,因而常被误认为肝功能不良。其实此类患者往往是由于脾功能亢进严重而造成的溶血性黄疸,而非非肝功能不良的表现。 $\chi^2$ 检验结果提示两者无相关性,亦证明了这一点。对此类患者手术是安全的,断流术后T-BIL迅速恢复正常。因此,对于严重脾亢的患者,在评价肝功能时,T-BIL水平的价值应与非脾亢患者区别对待。

总之,影响肝硬化门静脉高压症患者断流术后转归的独立因素为Child分级、PT和术中所见肝脏硬化程度3个指标。Child分级仍然是评价手术安全性的重要指标。Child C级并非手术绝对禁忌证,而是相对禁忌证。

### 4 参考文献

- 1 Idezuki Y. Progress and changes in surgery: portal hypertension. *World J Surg* 1998; 22: 759-766
- 2 Wright AS, Rikkers LF. Current management of portal hypertension. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 992-1005
- 3 Henderson JM, Boyer TD, Kutner MH, Galloway JR, Rikkers LF, Jeffers LJ, Abu-Elmagd K, Connor J. Distal splenorenal shunt versus transjugular intrahepatic portal systematic shunt for variceal bleeding: a randomized trial. *Gastroenterology* 2006; 130: 1643-1651
- 4 Elwood DR, Pomposelli JJ, Pomfret EA, Lewis WD, Jenkins RL. Distal splenorenal shunt: preferred treatment for recurrent variceal hemorrhage in the patient with well-compensated cirrhosis. *Arch Surg* 2006; 141: 385-388
- 5 杨镇, 裘法祖. 脾切除贲门周围血管离断术治疗门静脉高压症的疗效. *中华外科杂志* 2000; 38: 645-648
- 6 Feng LS, Chen XP. Combined splenocaval or mesocaval C shunt and portoazygous

#### ■名词解释

Logistic回归分析是用于多因素分析的一种常用统计学方法,他比线性回归分析更能准确分析二值数据或等级分组数据之间的关系。在医学上常被用于疾病危险因素的研究。



- devascularization in the treatment of portal hypertension: analysis of 150 cases. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006; 5: 70-73
- 7 黄庭庭, 王维民, 戴植本. 国内门静脉高压症外科的现状调查. *中华外科杂志* 1998; 36: 324-326
- 8 于昕, 罗蒙, 王祥瑞, 吴志勇. 应用动态APACHE II 评分指导门静脉高压症外科治疗. *肝胆外科杂志* 2004; 12: 255-257
- 9 Papazoglou LG, Monnet E, Seim HB 3rd. Survival and prognostic indicators for dogs with intrahepatic portosystemic shunts: 32 cases (1990-2000). *Vet Surg* 2002; 31: 561-570
- 10 Cao H, Hua R, Wu ZY. Effects of combined splenorenal shunt devascularization and devascularization only on hemodynamics of the portal venous system in patients with portal hypertension. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 385-388
- 11 Dong YH, Lu YF, Qiu Q, Huang H, Wei H. Clinical analysis of pericardial devascularization by preserving vagus trunks in 42 patients with portal hypertension. *Asian J Surg* 2004; 27: 108-113
- 12 Xu CE, Zhang SG, Yu ZH, Li GX, Cao LL, Ruan CL, Li ZT. Combined devascularization and proximal splenorenal shunt: is this a better option than either procedure alone? *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2004; 11: 129-134
- 13 Han HS, Yi NJ, Kim YW, Fleischer GD. New operative method for fundal variceal bleeding: fundectomy with periesophagogastric devascularization. *World J Surg* 2004; 28: 406-410
- 14 冷希圣. 加强对肝硬化门静脉高压症的外科治疗研究. *中华普通外科杂志* 2002; 17: 133-134
- 15 吴阶平, 裘法祖. 黄家驷外科学. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 1244-1245

#### ■同行评价

该文虽然讨论的是较古老的问题, 但作者课题设计较细致, 观察较全面, 有一些新的信息, 提出了颇具临床意义的新观点.

电编 李琪 编辑 潘伯荣

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

#### • 消息 •

### 第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(三星级), 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](mailto: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](mailto:wangyue@sun5.ibp.ac.cn)).

# 肝硬化并胆囊结石的临床特点与成因分析

杜鹏辉, 邓长生

## ■背景资料

肝硬化并胆囊结石是目前国内外医学界研究的热点和难点, 特别是在外科领域, 研究主要关注肝硬化并胆囊结石的手术治疗方式。临床观察表明肝硬化并胆囊结石临床多无明显症状, 易被内科医师所忽视, 使患者失去了择期手术的机会, 影响预后, 肝硬化易并发胆囊结石, 但其机制尚不清楚。

杜鹏辉, 邓长生, 武汉大学中南医院消化内科 湖北省武汉市 430071

通讯作者: 邓长生, 430071, 湖北省武汉市武昌区东湖路169号, 武汉大学中南医院消化内科. Liu2009948@sohu.com  
电话: 027-87331114

收稿日期: 2006-06-06 接受日期: 2006-07-10

## Clinical characteristics and formation causes of gallstone complicated with hepatic cirrhosis

Peng-Hui Du, Chang-Sheng Deng

Peng-Hui Du, Chang-Sheng Deng, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Correspondence to: Chang-Sheng Deng, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, 169 Donghu Road, Wuchang District, Wuhan 430071, Hubei Province, China. Liu2009948@sohu.com

Received: 2006-06-06 Accepted: 2006-07-10

## Abstract

**AIM:** To investigate the clinical characteristics and the formation causes of gallstone complicated with liver cirrhosis.

**METHODS:** We retrospectively analyzed 131 patients with hepatic cirrhosis from February, 2003 to February, 2006. Meanwhile, 790 cases received medical examination served as the controls. Sexual differences, gallbladder abnormality and hypersplenism were assessed by Chi-square test.

**RESULTS:** The incidence rate of hepatocirrhosis associated with gallstone was 41.22%. In the controls, the incidence rate of gallstone was 6.96%. The morbidity rate did not differ between the males and females with cirrhosis ( $P > 0.05$ ), but it significantly differed between the patients with cirrhosis and the controls among the males (39.58% vs 5%,  $P < 0.05$ ) and females (48.57% vs 10.53%,  $P < 0.05$ ). The incidence rate of gallstone in patients with gallbladder abnormality complicated with hepatocirrhosis was significantly higher than that in ones without cirrhosis (48.39% vs 26.32%,  $P < 0.05$ ), and the incidence rate was

also significantly different between the patients with hypersplenism and the controls (54.44 % vs 6.96%,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Gallstone frequently occurs in patients with liver cirrhosis, which has no correlation with the sex of patients, but correlates with liver function, dysfunction of gallbladder motility, and hypersplenism.

**Key Words:** Hepatocirrhosis; Gallstone; Liver function; Hypersplenism

Du PH, Deng CS. Clinical characteristics and formation causes of gallstone complicated with hepatic cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(24):2456-2459

## 摘要

**目的:** 探讨肝硬化并胆囊结石的临床特点及其发病机制。

**方法:** 回顾性分析我院2003-2/2006-2住院的131例肝硬化患者, 并以同期门诊行体检者790例作为对照组, 分析的指标包括肝硬化并胆囊结石患者的性别差异、与对照组性别差异、肝病性胆囊改变在肝硬化胆囊结石发生中的作用、肝硬化并脾功能亢进在肝硬化胆囊结石发生中的作用。

**结果:** 肝硬化胆囊结石的发生率为41.22%, 对照组胆结石的发生率为6.96%; 肝硬化患者胆囊结石的发生率无性别差异( $P > 0.05$ ); 男性与女性肝硬化患者与对照组比较, 胆囊结石发生率均有显著差异(39.58% vs 5%,  $P < 0.05$ ; 48.57% vs 10.53%,  $P < 0.05$ ); 肝病性胆囊改变及肝硬化并脾功能亢进在胆囊结石发生中起着重要作用。肝病性胆囊改变患者胆囊结石发病率明显高于无肝病性胆囊改变者(48.39% vs 26.32%,  $P < 0.05$ ), 肝硬化并脾功能亢进胆结石的发生率与对照组比较差异也有显著性(54.44 % vs 6.96%,  $P < 0.05$ )。

**结论:** 肝硬化患者易发生胆囊结石, 与性别无关而与肝功能、胆囊运动功能障碍、脾功能亢进等有关。

**关键词:** 肝硬化; 胆囊结石; 肝功能; 脾功能亢进

杜鹏辉, 邓长生. 肝硬化并胆囊结石的临床特点与成因分析. 世界华人消化杂志 2006;14(24):2456-2459  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2456.asp

## 0 引言

临床报道表明, 肝硬化患者胆结石的发生率明显高于非肝硬化群体, 且肝硬化程度越重胆结石的发生率越高<sup>[1-4]</sup>, 主要表现为非特异性炎症和胆结石. 国外亦有报道肝硬化患者易并发胆结石. 本研究回顾性分析我院2003-02/2006-02住院的131例肝硬化患者(乙肝后肝硬化114例, 占87.02%; 其他原因的肝硬化17例, 占12.98%)的临床资料, 旨在对肝硬化发生胆囊结石的成因进行探讨.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 经2000年第10次全国病毒性肝炎防治及肝病学术会议修订的肝硬化诊断标准<sup>[5]</sup>确诊的肝硬化病例131例(男96例, 女35例), 并胆囊结石55例(男38例, 女17例); 影像学(B超、CT)检查有肝病性胆囊改变93例, 无肝病性胆囊改变38例; B超检查有腹水者104例, 无腹水者27例; 骨髓细胞学检查有脾功能亢进90例, 无脾功能亢进41例.

**1.2 方法** 回顾性分析我院2003-02/2006-02住院的131例肝硬化患者(乙肝后肝硬化114例, 占87.02%; 其他原因的肝硬化17例, 占12.98%), 并以同期门诊行体检者790例作为对照组, 分析的指标包括肝硬化并胆囊结石患者的性别差异、与对照组性别差异、肝病性胆囊改变在肝硬化胆囊结石发生中的作用、肝硬化并脾功能亢进在肝硬化胆囊结石发生中的作用. 所有病例均行B超、CT、骨髓细胞学检查, 血细胞分析.

**统计学处理** 组间比较, 用卡方检验,  $P < 0.05$ , 差异有显著性.

## 2 结果

**2.1 性别** 肝硬化组胆囊结石的发病率男女比较差异无显著性(表1); 肝硬化组男性胆囊结石发病率高于对照组, 两者比较差异有显著性(39.58% vs 5%,  $P < 0.05$ , 表2); 肝硬化组女性胆囊结石发病率高于对照组, 两者比较差异亦有显著性(48.57% vs 10.35%,  $P < 0.05$ , 表3).

**2.2 肝病性胆囊改变** 肝硬化患者常出现胆囊壁水肿、胆囊床及其周围的局限性积液, 一般呈环形包绕胆囊<sup>[6]</sup>, 借助CT及B超了解胆囊轮廓、胆囊

表 1 肝硬化患者不同性别胆囊结石发病比较  $n$  (%)

性别	胆囊结石	无胆囊结石	合计
男	38 (39.58)	58 (60.42)	96
女	17 (48.57)	18 (51.43)	35
合计	55	76	131

表 2 肝硬化组与对照组男性胆囊结石发病比较  $n$  (%)

分组	胆囊结石	无胆囊结石	合计
男性肝硬化	38 (39.58) <sup>a</sup>	58 (60.42)	96
男性对照组	25 (5)	475 (95)	500
合计	63	533	596

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 男性对照组.

表 3 肝硬化组与对照组女性胆囊结石发病比较  $n$  (%)

分组	胆囊结石	无胆囊结石	合计
女性肝硬化	17 (48.57) <sup>a</sup>	18 (51.43)	35
女性对照组	30 (10.35)	260 (89.65)	290
合计	47	278	325

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 女性对照组.

表 4 有肝硬化肝病性胆囊改变与胆囊结石发病比较  $n$  (%)

分组	胆囊结石	无胆囊结石	合计
并肝病性胆囊改变	45 (48.39) <sup>a</sup>	48 (51.61)	93
无肝病性胆囊改变	10 (26.32)	28 (73.68)	38
合计	55	76	131

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 无肝病性胆囊改变组.

表 5 肝硬化脾功能亢进胆囊结石发病与对照组比较  $n$  (%)

性别	胆囊结石	无胆囊结石	合计
肝硬化脾功能亢进	49 (54.44) <sup>a</sup>	41 (45.56)	90
对照组	55 (6.96)	735 (93.04)	790
合计	104	776	880

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组.

周围积液形态及流动性, 有助于肝病性胆囊改变与炎症性胆囊改变的鉴别, 肝病性胆囊改变在胆囊结石形成的过程中起了重要作用(表4).

**2.3 肝硬化并脾功能亢进** 与对照组比较, 肝硬化并脾功能亢进胆囊结石的发生率与对照组比较差异有显著性(表5).

**2.4 胆结石的临床表现** 55例肝硬化并胆囊结石患

## ■创新盘点

女性肝硬化患者是否比正常女性更易患胆囊结石, 国内各家报道不一. 本研究通过临床观察, 卡方检验, 得出了肯定的回答, 而这一结论可通过肝硬化肝功能受损致雌激素水平升高来解释.



#### ■应用要点

本文根据分析肝硬化并胆囊结石的临床特点,提出了其可能机制,并指出肝硬化并胆囊结石临床多无明显症状,因此,内科医师应充分认识这一特点,以免延误病情。

者仅一例出现右上腹疼痛、发热,给予抗生素治疗后症状消失。

### 3 讨论

肝硬化患者容易合并胆结石,此为综合因素作用的结果,国外报道B型超声发现肝硬化胆囊结石的发生率为29.0%-34.6%,国内近年尚未见大样本的调查。本组病例肝硬化胆囊结石的发生率为41.98%,明显高于对照组(无论男女),差异均有显著性;肝病性胆囊改变及脾功能亢进病例胆囊结石的发生率明显增加;总之,肝硬化患者胆囊结石的发生与性别无关而与肝功能、胆囊运动功能障碍、脾功能亢进等有关。(1)肝硬化时肝脏对雌激素灭活减少,酮转化为雌二醇增多,以及血浆中性激素结合球蛋白水平增高等因素,促使肝硬化患者雌二醇水平增高,而雌二醇可明显降低肝微粒体内二磷酸尿苷葡萄糖醛酸转移酶的活性,减少肝内葡萄糖醛酸胆红素的形成。因此,非结合胆红素水平增高,有利于胆色素结石的形成。雌激素水平增高还可影响胆红素排空,有利于胆囊结石的形成,肝硬化时无论男女患者均存在雌激素灭活减弱,故肝硬化胆结石的发生无性别差异。(2)肝硬化时胆囊静脉扩张、胆囊壁黏膜下充血、水肿、增厚甚至胆囊壁部分纤维化,导致胆囊壁顺应性降低、动力减弱,使胆囊内容易形成结石。胆囊动力异常是结石好发的重要应素<sup>[7]</sup>。肝硬化患者体内胃肠激素水平异常<sup>[8]</sup>,可通过引起胆囊炎症而影响胆囊排空促进结石形成;另外,肝硬化时由于枯否细胞减少,细胞免疫功能降低,容易造成胆系感染,在肝硬化胆囊结石发生过程中细菌迁移入胆囊是很普遍的,胆道黏膜充血、缺血、坏死脱落成为结石核心。临床和实验研究表明,胆囊运动功能障碍在肝硬化胆结石的形成过程中起重要作用<sup>[3]</sup>。(3)肝硬化脾功能亢进时胆囊结石发生率明显增加<sup>[9]</sup>。肝硬化脾功能亢进导致慢性溶血、胆红素产生过多,使血中、胆汁中未结合胆红素水平升高,其与胆汁中钙结合成为结石核心;另一方面,脾功能亢进时,红细胞、血红蛋白降低,胆囊壁缺血、缺氧、水肿、胆囊动力障碍,进一步促进了胆囊结石形成。(4)肝功能损害也是胆结石形成的促发因素,本研究131例肝硬化中129例是失代偿期病例,肝功能减退使肝脏对许多物质如雌激素、胰高血糖素、血管活性肠肽、组胺、生长抑素等灭活降低,血中浓度升高。这些物质可松弛胆囊平滑肌,引起

胆囊扩张。其中生长抑素还可抑制胆囊收缩和胆道运动<sup>[10]</sup>;血管活性肠肽对基础情况下和由胆囊收缩素刺激引起的胆囊运动具有强烈的拮抗作用,胆囊平滑肌含有血管活性肠肽能神经纤维,电刺激迷走神经可使门脉血内血管活性肠肽浓度升高,推测它具有神经递质功能,在局部调节胆囊平滑肌的张力,使胆囊舒张<sup>[11]</sup>,胆汁易于沉积,利于胆囊结石形成。(5)肝硬化并胆囊结石临床多无明显症状<sup>[12]</sup>,主要原因是胆结石的形成是慢性过程,临床常见纳差、腹胀、右上腹不适等症状,容易被肝硬化症状所掩盖,肝硬化胆囊结石发生率高,且以胆色素结石为主,胆色素砂样结石易通过胆道排泄而不易完全梗阻<sup>[10]</sup>,因此,临床很少出现症状,易被临床医师所忽视。

肝硬化胆囊结石发生并发症,如急性胆管炎、胆管炎梗阻化脓时,需行急诊手术,这类患者毛细血管脆性增加、肝脏合成凝血因子减少、脾功能亢进、血小板减少是手术中出血的综合性因素,同时由于其免疫力低下<sup>[13]</sup>,术后易并发内毒素血症、败血症、肝功能衰竭,手术危险性大。

### 4 参考文献

- 1 del Olmo JA, Flor-Lorente B, Flor-Civera B, Rodriguez F, Serra MA, Escudero A, Lledo S, Rodrigo JM. Risk factors for nonhepatic surgery in patients with cirrhosis. *World J Surg* 2003; 27: 647-652
- 2 Acalovschi M, Blendea D, Feier C, Letia AI, Ratiu N, Dumitrascu DL, Veres A. Risk factors for symptomatic gallstones in patients with liver cirrhosis: a case-control study. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1856-1860
- 3 Acalovschi M, Dumitrascu DL, Nicoara CD. Gallbladder contractility in liver cirrhosis: comparative study in patients with and without gallbladder stones. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 17-24
- 4 Silva MA, Wong T. Gallstones in chronic liver disease. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 739-746
- 5 中华医学会. 病毒性肝炎防治方案. *中华传染病杂志* 2001; 19: 56-62
- 6 段建军, 欧强, 沙新平. 肝炎和肝硬化病人胆囊超声改变的观察与分析. *中国现代医学杂志* 2003; 13: 67-68
- 7 Moschetta A, Stolk MF, Rehfeld JF, Portincasa P, Slee PH, Koppeschaar HP, Van Erpecum KJ, Vanberge-Henegouwen GP. Severe impairment of postprandial cholecystokinin release and gallbladder emptying and high risk of gallstone formation in acromegalic patients during Sandostatin LAR. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 181-185
- 8 郝瑞瑞, 王惠吉. 胆囊运动功能障碍在肝硬化患者胆结石形成中的作用. *医学临床研究* 2005; 22: 1717-1719

- 9 Beckingham IJ. ABC of diseases of liver, pancreas, and biliary system. Gallstone disease. *BMJ* 2001; 322: 91-94
- 10 Montet JC, Caroli-Bosc FX, Ferrari P, Piche T, Baize N, Anty R, Montet AM, Rampal P, Tran A. Gallbladder motility and gut hormone plasma levels in subjects with and without gallstones. *Gastroenterol Clin Biol* 2005; 29: 569-572
- 11 Degen LP, Peng F, Collet A, Rossi L, Ketterer S, Serrano Y, Larsen F, Beglinger C, Hildebrand P. Blockade of GRP receptors inhibits gastric emptying and gallbladder contraction but accelerates small intestinal transit. *Gastroenterology* 2001; 120: 361-368
- 12 Vitetta L, Best SP, Sali A. Single and multiple cholesterol gallstones and the influence of bacteria. *Med Hypotheses* 2000; 55: 502-506
- 13 Abou-Assi SG, Mihas AA, Gavis EA, Gilles HS, Haselbush A, Levy JR, Habib A, Heuman DM. Safety of an immune-enhancing nutrition supplement in cirrhotic patients with history of encephalopathy. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2006; 30: 91-96

电编 李琪 编辑 王晓瑜

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。

# 中国大陆地区克罗恩病临床误诊的汇总分析

沈志坤

## ■背景资料

克罗恩病(CD)是一种胃肠道的慢性、反复发作性和非特异性的全肠壁炎,临床缺乏特异性病理学表现,症状多样化,给临床医生诊断带来很大困难。

沈志坤,湖州师范学院医学院 浙江省湖州市 313000  
通讯作者: 沈志坤, 313000, 浙江省湖州市新华路601号, 浙江省湖州师范学院医学院. shenzq@hutc.zj.cn  
电话: 0572-2321200  
收稿日期: 2006-04-04 接受日期: 2006-04-29

## A combined analysis of clinical misdiagnosis for Crohn's disease in Chinese, mainland

Zhi-Kun Shen

Zhi-Kun Shen, School of Medicine, Huzhou Teachers College, Huzhou 313000, Zhejiang Province, China  
Correspondence to: Zhi-Kun Shen, School of Medicine, Huzhou Teachers College, 601 Xinhua Road, Huzhou 313000, Zhejiang Province, China. shenzq@hutc.zj.cn  
Received: 2006-04-04 Accepted: 2006-04-29

## Abstract

**AIM:** To investigate the clinical features of Crohn's disease in China, especially the status, the locations of lesions and its misdiagnosis in clinics.

**METHODS:** The literatures published in the recent 50 years (1950-1959) about CD were collected from the Chinese database of Biology and Medicine (CBM, 1979-01/2003-12) by computer and tracing back year by year. All the data about the locations of lesions and misdiagnoses, as well as other demography features were recorded, pooled and statistically analyzed.

**RESULTS:** There were 1644 cases of CD patients, of which 19.33% were misdiagnosed as intestinal obstruction and looping, 19.89% as intestinal tumors, 10.00% as abdominal mass, 13.95% as ileocecal space-occupying lesions, 14.47% as intestinal tuberculosis, 12.25% as ulcerative colitis, 33.85% as chronic enteritis, and 17.54% as appendiceal diseases.

**CONCLUSION:** CD has no specificity on clinical features, can affect any segment (often many segments) of the gastrointestinal tract from the mouth to anus, and induce the diver-

sified clinical manifestations and high misdiagnosis.

**Key Words:** Crohn's disease; Misdiagnosis; Combined analysis

Shen ZK. A combined analysis of clinical misdiagnosis for Crohn's disease in Chinese, mainland. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(24):2460-2463

## 摘要

**目的:** 了解我国大陆地区克罗恩病(Crohn's disease, CD)的临床特征,尤其是病变部位及其累及情况,以及临床诊断上的误诊情况,为临床医生快速准确地诊断提供重要线索。

**方法:** 对我国近50 a来报道的CD文献资料通过计算机CBM与文献追溯检索,对符合文献入选标准的63篇文献有关误诊情况的数据进行摘录、登记、统计分析。

**结果:** 计入统计的CD患者共有1644例,误诊为肠梗阻与套叠为19.33%、肠道肿瘤为19.89%、腹部肿块为10.00%、回盲部占位为13.95%、肠结核为14.47%、溃疡性结肠炎为12.25%、慢性肠炎为33.85%、阑尾病变为17.54%。

**结论:** CD的临床表现缺乏特异性,病变侵犯胃肠道任意部位,且常常侵犯多个部位,给临床诊断带来困难,极易导致误诊。

**关键词:** 克罗恩病; 误诊情况; 汇总分析

沈志坤. 中国大陆地区克罗恩病临床误诊的汇总分析. *世界华人消化杂志* 2006;14(24):2460-2463  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2460.asp>

## 0 引言

克罗恩病(Crohn's disease, CD)是一种胃肠道的慢性、反复发作性和非特异性的全肠壁炎,病变呈节段性分布,可发生于胃肠道的任何部位,临床缺乏特异性病理学表现,症状多样化,误诊



率极高, 给临床医生诊断带来很大困难, 我们旨在对该病误诊情况进行探讨, 希望能为临床医生快速准确地诊断本病提供重要线索。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 通过计算机文献检索中国生物医学文献光盘数据库检索系统(CBM), 文献追溯检索。检索主题词为: 炎症性肠病、克隆病、克罗恩病与Crohn's disease。收集临床回顾分析1950-01/2004-12年间住院患者发表和全国性会议交流的所有文献共1102条目录。所有研究CD的临床、病理、诊断及误诊及描述性流行病学资料的文献, 无同一单位、同一作者的重文献用做报道病例统计分析, 排除非临床、病理、诊断、误诊及描述性流行病学资料的文献。对来自同一单位、同一作者的文献一并收集用做临床、病理、诊断及误诊变量数据收集。

**1.2 方法** 逐篇复习文献, 进行质量评估。对所选用的文献中所有的一般人口学特征、临床、病理、诊断及误诊有关变量特征的数据进行转换、摘录。两个评论员独立选择试验并提取资料, 如遇不一致, 通过讨论解决。

**统计学处理** 本文涉及描述性流行病学资料汇总, 对一般人口学特征数据采用Excel统计软件进行分类汇总, 对每篇文章中涉及病变部位及误诊有关变量特征的数据先转换成绝对数, 再转换成率, 标准误的计算采用总分析例数进行校正以计算95%可信区间。

$$Sp = \sqrt{\frac{(1-n/N)p(1-p)}{(n-1)}}$$

$n$ 为观察例数,  $N$ 为校正参数 = 1644,  $p$ 为特征检出率,  $Sp$ 为率的标准误。

## 2 结果

**2.1 研究的描述** 经CBM与人工检索, 初检出有关文献1102条目录, 阅读标题和摘要, 排除1039篇重复、无具体实质相关内容、与本研究无关的文献。共收集符合文献纳入与排除标准的文献共63篇<sup>[1-63]</sup>, 全部查找到原文。合计报道例数1895例, 分析例数1644例。男934例, 女666例(有44例未进行性别描述), 男:女=1.40:1。发病年龄1-84岁, 发病高峰为20-50岁的中青年, 平均年龄38.20±7.20岁。

**2.2 误诊情况** 误诊为肠梗阻与套叠为19.33%, 肠道肿瘤为19.89%, 腹部肿块为10.00%(5.41%-14.59%), 回盲部占位为13.95%, 肠

表1 CD误诊情况

误诊情况	$n$	率 (%)	95%CI (%)
食管癌与炎症	6	11.76	2.97-20.55
胃癌与胃炎	6	4.38	1.09-7.67
肠梗阻与套叠	116	19.33	16.81-21.85
肠道肿瘤	112	19.89	17.21-22.57
腹部肿块	15	10.00	5.41-14.59
回盲部占位	12	13.95	6.78-21.12
肠结核	103	14.47	12.52-16.42
溃疡性结肠炎	49	12.25	19.45-15.05
慢性肠炎	22	33.85	22.49-45.21
腹膜炎急腹症	43	11.03	8.31-13.75
阑尾病变	107	17.54	15.14-19.94
穿孔与肠瘘	13	4.68	2.41-6.95
菌痢	5	4.95	0.80-9.07
淋巴瘤	9	3.66	1.49-5.83
总误诊率	558	68.22	65.96-70.48

结核为14.47%, 溃疡性结肠炎为12.25%, 慢性肠炎为33.85%, 阑尾病变为17.54%, 总误诊率及95%CI为68.22%及65.96%-70.48% (表1)。

## 3 讨论

CD临床表现涉及肠道本身及其他多个系统, 缺乏特异性, 而且病变可累计从口腔到肛门的整个消化道, 呈节段性分布, 常同时侵犯多个部位, 其中小肠、回肠、回肠末端、回盲部、盲肠、结肠、左半结肠都是CD较易累及的病变部位, 其中两个及其以上部位累及率为32.60%。本病误诊率较高, 可高达70.9%<sup>[53]</sup>。本分析结果表明总误诊率为68.22%, 95%CI为65.96%-70.48%, 与之类似。本病误诊为肠梗阻与套叠、肠道肿瘤、腹部肿块、回盲部占位、肠结核、溃疡性结肠炎、慢性肠炎、阑尾病变的误诊率较高。分析其误诊原因如下: (1)本病属不常见病, 对本病临床多样性特别是全身性肠道外症状认识不足, 必须详细询问病史才能被发现; (2)本病患者同时累计胃肠道多个部位, 包括从口腔到肛门, 使症状多样化, 给诊断带来困难; (3)在诊断上过于强调病理学及肉芽肿的诊断意义。为提高CD的确诊率, 以下几点值得考虑: (1)因CD的临床表现多样性, 要提高了对本病的认识, 收集临床资料要完整, 尤其是病史中的腹痛、腹胀要详细询问。如果患者为中青年, 表现以腹痛和腹泻为主要症状, 而且有低热、消瘦、贫血及皮肤、关节与肛周等多系统症状, 在分析病情时要考虑本病的可能性。此外, 腹痛的性质与部位, 常可反映出病变的性质与部位, 如以右下腹痛多见, 其病变多位于回盲部及其邻近部位; 脐周或全腹痛, 病变多在空肠

## ■应用要点

本文旨在对该病误诊情况进行探讨。通过计算机文献检索中国生物医学文献光盘数据库检索系统, 收集临床回顾分析1950-2004年间所有发表和交流文献资料, 逐篇复习, 进行评估, 误诊率极高。通过本文的综合分析, 希望能为临床医生快速准确地诊断CD提供重要线索。

# 同行评价

克罗恩病的临床表现复杂, 涉及肠道本身及其他多个系统, 而且缺乏特异性, 因此极易导致误诊。本文引文全面, 阐述较为严密, 能给广大的临床医生提供该病的一些重要信息, 便于临床医生进行正确的诊断, 有指导意义。

及其横结肠, 腹泻也以糊状稀便为主, 少有便血或脓血便。(2)综合检查手段的运用, CD的临床诊断较为困难, 其诊断在很大程度上取决于肠道特征性X线表现及内镜检查, 这些有助于确定病变性质、部位、范围及严重程度。不能忽视X线的诊断价值, 国外报道有经验的放射科医生可以使诊断正确率达到90%。肠镜下活检尤其是确诊的可靠手段, 结肠镜对结肠和末端回肠的CD有重要的诊断价值, 但瘻管容易被遗漏, 两者结合能显著提高诊断率。但常用的内镜及X线检查对小肠-肠系膜瘻的探查有较大的局限性, 且不能显示脓肿, 此时可以考虑腹部肠道超声(TABS), 证实TABS对肠狭窄的敏感性与特异性分别为100%与91%, 对腹腔内瘻管分别为87%与90%, 对腹腔内脓肿分别为100%与92%<sup>[57]</sup>。如临床高度怀疑本病应及早行肠镜下黏膜活检, 并设法通过回盲瓣以观察回肠末端, 而对于各种内科难以控制的急腹症、消化道出血, 则应及时剖腹探查。不要过于强调肉芽肿的诊断意义以及过于依赖病理学检查, 因为肉芽肿性反应是对被挤出的隐窝蛋白发生的非特异性反应, 并不是诊断CD的特异性指标, 而且不管CD侵犯胃肠道的那一部位, 其基本的病理学改变均相似, 即兼有破坏性与增殖或修复性病变, 这是CD具有鉴别诊断价值的重要特点之一。

## 参考文献

- 王健, 邹伟荣, 高良辉, 于吉人. 克隆病急诊12例临床分析. 浙江临床医学 2002; 4: 516-517
- 陈晓奇, 吕宾, 徐毅. 33例克隆病和肠结核的中西医结合临床分析. 现代中西医结合杂志 2001; 10: 45-46
- 韩正良生, 马庆蓬. 克隆氏病34例临床分析. 中国肿瘤临床与康复 1995; 2: 46-47
- 陈子清, 应则贵. 阑尾切除对回肠克隆病的影响. 浙江临床医学 2001; 3: 711-712
- 姚玉玲, 吴毓麟. 克隆氏病38例临床分析. 镇江医学院学报 2000; 10: 34-35
- 郑家驹, 史肖华, 褚行琦, 贾黎明. 克罗恩病的临床多样性. 中华消化杂志 2002; 22: 226-229
- 叶庆艾, 胡兆洪. 克隆病13例临床分析. 南京医学院学报 1991; 11: 321-322
- 国永忠, 张承坤. 克隆病误诊阑尾炎手术1例. 医学理论与实践 2002; 15: 1263
- 王瑞华, 罗国经. 16例克隆病的X线表现特点. 苏州医学院学报 1995; 15: 319-320
- 纪小龙, 尹彤. 溃疡性结肠炎与结肠克隆病病理诊断的鉴别要点. 临床与实验病理学杂志 2002; 18: 427-428
- 汪良, 陈易人. 克隆病的外科治疗(附16例报告). 中国实用外科杂志 1998; 18: 36-37
- 胡善时, 牛成山, 范中光, 刘祥平. 克隆病X线征象与病理对照分析(附26例分析). 医学影像学杂志 2001; 11: 109-111
- 张月峰, 李保庆, 田子强, 李勇, 郭明. 食管克隆病合

- 并早期食管癌、食管憩室. 罕见疾病杂志 2002; 9: 45-46
- 刘庆立, 马奎志, 李庆花. 克罗恩病并肠梗阻12例手术治疗的疗效(摘要). 齐鲁医学杂志 2000; 15: 180
- 程宝泉, 上官红, 乔立烘, 张尚忠. 上消化道Crohn病21例误诊分析. 临床内科杂志 2001; 18: 228-229
- 张代成, 杜坚力, 李端兰. 胃克隆病误诊为胃癌一例. 中华普通外科杂志 2002; 17: 125
- 许俊海. 食管克隆病3例. 罕见病杂志 2002; 9: 26
- 袁祖成. 克隆病误诊13例分析. 中国综合临床 2002; 18: 462
- 王行环, 王怀鹏, 古维灿, 马胜利, 罗则民, 庄恒国. 克隆病膀胱病变4例报告. 中华泌尿外科杂志 2002; 23: 407-408
- 俞薇薇, 温文, 万红萍. 27例克隆病临床病理分析. 江西医学院学报 2002; 42: 141-142
- 许文集, 房太勇, 何秋玉. 食道克隆病误诊为食管癌症1例. 中国误诊学杂志 2001; 1: 1597-1598
- 刘宏业, 刘金成. 克隆病误诊为腹腔结核2例报告. 中国普外基础与临床 2001; 8: 380
- 梁英杰. 炎症性肠病: 溃疡性结肠炎和克隆病. 广东医学杂志 2001; 22: 984-985
- 马桂兰. 小肠克隆病8例诊断学分析. 中国中西医结合外科杂志 2000; 6: 106-107
- 沙莎, 吴云林. 35例克罗恩病临床分析. 诊断学理论与实践 2002; 1: 255-256
- 甘华田, 欧阳钦, 邱春华, 韩盛玺, 李贞茂, 邱雄. 成都市55例克罗恩病临床病理分析. 临床内科杂志 2000; 17: 301-303
- 王鲁平, 邓永江, 丁华野, 周景, 虞积耀. 克隆病及其异型增生与癌变的临床病理学分析. 诊断病理学杂志 2000; 7: 99-100
- 缪应雷, 欧阳钦, 陈岱云. 内镜及病理学检查在克罗恩病和肠结核鉴别诊断中的价值. 中华消化内镜杂志 2002; 19: 9-12
- 黄春, 刘红专, 龙波. 11例不典型克隆氏病误诊原因分析. 川北医学院报 1998; 13: 46-47
- 张英. 克隆氏病若干问题探讨(附46例分析). 大肠肛门病外科 1995; 1: 33-34
- 鲍军保. 结肠Crohn病X线诊断. 中国医学影像学杂志 2002; 10: 313-314
- 张宗友, 王新, 兰梅. 克罗恩病20例临床诊治体会. 临床内科杂志 2001; 18: 72-73
- 吕建一. 11例克罗恩病的外科诊治体会. 腹部外科 2002; 15: 185
- 武华, 牛树凯, 鲍民生. 克隆病的诊治(附24例报告). 山西医学院继续教育杂志 1995; 5: 12-13
- 邓会芬, 林莉莉. 克隆病的临床分型与诊断(附47例分析). 新医学 1994; 25: 31-32
- 麦海妍, 周宇, 叶文桃. 32例克隆病临床内镜分析. 中国内镜杂志 2000; 6: 59-60
- 赵广峰, 鲁培荣. Crohn病13例误诊分析. 广州医学院学报 2001; 29: 56-57
- 邓剑, 谢贤营, 沈跃辉. 克隆氏病12例误诊原因分析. 广东医学 1995; 16: 563-564
- 杨炳裕. 小肠克隆病并急性出血10例. 1996; 14: 185-186
- 王迪彬, 李秀云, 刘秋莹. 克隆病6例误诊分析. 华北煤炭医学院学报 2000; 2: 65
- 吴飞雄. 克隆病诊断的探讨(附45例分析). 海南医学 2000; 11: 34
- 徐野航, 何昕, 赵铁铮. 克隆氏病的X线分析. 齐齐哈尔医学院学报 1999; 20: 133-134
- 尹荣成. 克隆氏病10例误诊原因分析. 大肠肛门病外科杂志 1997; 3: 46-47
- 孙鲁梅, 姜若兰, 刘春荣, 赵丽娟. 70例克隆病误诊原

- 因分析. 辽宁医学杂志 1997; 11: 158-161
- 45 冯世军, 彭东升, 祝华山. 结肠克隆病10例误诊分析. 河南外科学杂志 1999; 5: 268-269
- 46 高山, 刘景顺, 尹为民. 克隆氏病25例诊治分析. 吉林医学 1995; 16: 145-146
- 47 李龙. 小儿克隆病的诊断与治疗. 中国实用儿科杂志 2000; 15: 147-148
- 48 张学东, 孙卫国, 翟保平. 外科治疗克隆氏病43例报告. 山东医药 2002; 42: 47
- 49 王亚青, 黄平, 陈丰. 手术与药物治疗克罗恩病的转归分析. 中华消化杂志 2001; 21: 125-126
- 50 关晓峰, 高春芳, 魏东, 鲁明良. 克隆病13例误诊分析. 临床误诊误治 1999; 12: 69
- 51 蒋天业. 克隆病三例误诊误治分析. 临床误诊误治 1999; 12: 69
- 52 杜强. 克隆病3例误诊分析. 中国实用外科杂志 1998; 18: 756-757
- 53 孙国强, 刘凯, 曾津津, 严克. 小儿克隆病9例报告. 北京医学 1998; 20: 289
- 54 丁仕义, 吴崎. 胃肠道克隆病的影像诊断. 中国医学影像技术 1997; 13: 153-155
- 55 李珉, 张北斗. 克隆病肠穿孔误诊9例临床分析. 中国农村医学 1997; 25: 60
- 56 王爱英, 林三仁, 贾翠英. 肠道克隆病X线诊断. 胃肠病学和肝病学杂志 1997; 6: 347-349
- 57 孙刚, 罗莹. 克罗恩病74例临床特点分析. 疑难病杂志 2002; 1: 200-202
- 58 沈惠青, 王惠玲, 申芳娥. 儿童炎症性肠病53例临床分析. 中国实用儿科杂志 2003; 18: 667-670
- 59 张锦蓉, 滑炎卿, 张国桢. 克隆氏病的CT诊断. 上海医学影像杂志 1995; 4: 151-152
- 60 阳惠湘, 林敏娟, 陈爱莲. 克隆病20例临床分析. 湖南医科大学学报 2001; 26: 490
- 61 王怀鹏, 马胜利, 王宇琴. 克隆病临床误诊16例分析. 湖北医科大学学报 2000; 21: 220-221
- 62 王虹, 刘宾. 关于克隆氏病研究的回顾和展望. 华人消化杂志 1998; 6: 911-912
- 63 杨炼, 戴文, 王孝英. 儿童克隆病的X线诊断. 放射学实践 2001; 16: 42-44

电编 李琪 编辑 潘伯荣

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

## • 消息 •

### 第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.

[www.wjgnet.com](http://www.wjgnet.com)



## 胰肾联合移植术后肺部感染的防治4例

江 艺, 吕立志, 胡还章, 张小进, 陈永标, 张 坤, 陈少华, 张绍庚

### ■背景资料

胰肾联合移植术已成为糖尿病伴肾功能衰竭的标准治疗方法。由于受体是长期的糖尿病, 加上并发尿毒症肾功能衰竭, 营养障碍等因素, 在此种情况下, 患者要接受复杂的胰肾联合移植手术, 术后还需用大量免疫抑制药物, 因而, 胰肾联合移植术后易发生感染。感染是胰肾联合移植术死亡的主要原因。

江艺, 吕立志, 胡还章, 张小进, 陈永标, 张坤, 陈少华, 张绍庚, 福州总医院南京军区肝胆外科研究所 全军器官移植中心 福建省福州市 350002

通讯作者: 江艺, 350002, 福州市西二环北路156号, 福州总医院南京军区肝胆外科研究所, 全军器官移植中心。

jiangyi183@yahoo.com.cn

电话: 0591-22859377 传真: 0591-87880013

收稿日期: 2006-05-12 接受日期: 2006-05-29

### 摘要

本文报道胰肾联合移植治疗终末期糖尿病伴肾功能衰竭6例, 4例术后肺部感染, 2例分别为巨细胞病毒和难辨梭杆菌感染者成功治愈, 2例分别为埃希大肠杆菌和金黄色葡萄球菌感染, 因呼吸衰竭死亡。胰肾联合移植术后并发肺部感染的防治, 重在积极预防, 术后一旦出现肺部感染, 大幅度削减免疫抑制剂量, 对提高抢救成功率尤为重要。

**关键词:** 胰肾联合移植; 肺部感染

江艺, 吕立志, 胡还章, 张小进, 陈永标, 张坤, 陈少华, 张绍庚. 胰肾联合移植术后肺部感染的防治4例. 世界华人消化杂志 2006; 14(24): 2464-2466

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2464.asp>

### 0 引言

胰肾联合移植术已成为糖尿病伴肾功能衰竭的标准治疗方法。但由于受体是长期糖尿病患者, 胰肾联合移植手术复杂, 并发症多样, 加上术后免疫抑制药物的应用, 一旦发生术后感染, 常常导致手术失败, 是死亡的主要原因。我院开展胰肾联合联合移植6例, 术后肺部感染4例, 进一步讨论胰肾联合移植术后肺部感染的防治问题。

### 1 病例报告

例1, 男, 45岁, 糖尿病20<sup>+</sup>a, 胰岛素20-30 U/d, sc. 入院前2<sup>+</sup>mo自觉视物模糊, 尿量减少, 每周需2次血液透析。查体: 神志清, 双眼视力0.4, 眼底视网膜水肿, 少量出血, 眼底动脉硬化II级。血糖14 μmol/L, 肌酐761 μmol/L, 尿素氮32.5 μmol/L, C肽1.5 μg/L。诊断: II型糖尿病并发肾功能衰竭。2002-02行胰肾联合移植术。

手术当天给予抗Tac mAb 50 mg, 术后4 d抗Tac mAb 50 mg; 术后免疫抑制剂方案: 他克莫司(FK506)+霉酚酸脂+强的松。他克莫司血浓度维持10-14 ng/L, 霉酚酸脂2 g/d, 甲基强的松龙500 mg/d, 每天减少40 mg, 至维持量20 mg/d。术后血糖正常, 肾功能恢复; 术后1 mo出院。术后3 mo, 突发胸闷, 气急, 口唇紫绀; 血气分析: 动脉血PO<sub>2</sub> 55 mmHg, PCO<sub>2</sub> 65 mmHg; 胸片: 双肺大片模糊阴影, 痰培养阴性, CMV(+), 抗CMV-IgM 1:200, 考虑巨细胞病毒肺炎, 呼吸功能不全。治疗: 双水平通气呼吸机辅助呼吸, 他克莫司剂量减到原剂量的2/3, 停用霉酚酸脂2 g/d和强的松10 mg/d; 给予更昔洛韦250 mg, 2/d, 抗病毒治疗; 同时防细菌感染、控制输液量、保肝、保肾等治疗, 63 d后全愈出院。

例2, 男, 52岁, 糖尿病12<sup>+</sup>a, 胰岛素20-40 U/d, sc. 入院前5 mo自觉视力下降, 尿量减少, 血压进行性升高, 每周需2次血透。查体: 神志清, 双眼视力0.6, 眼底视网膜水肿, 少量出血, 眼底动脉硬化I级。血糖12.5 μmol/L, 肌酐406 μmol/L, 尿素氮32 μmol/L, C肽0.13 μg/L。诊断: I型糖尿病并发肾功能衰竭。2004-02行胰肾联合联合移植术。术后免疫抑制剂方案是三联他克莫司+霉酚酸脂+强的松。免疫抑制剂用量及方法同例1。术后1 wk血糖正常, 肾功能恢复; 术后21 d突发脑梗塞, 意识丧失, 呼吸骤停, 经抢救神志恢复; 胸片: 双肺炎; 支气管镜吸痰, 痰液培养结果: 难辨梭杆菌。治疗: 给予气管切开, 呼吸机辅助呼吸, 2 mo后拔气管插管; 他克莫司减为原剂量60%, 停用霉酚酸脂2 g/d和强的松20 mg/d; 去甲万古霉素500 mg/次, 2/d; 经保胰, 保肾等多器官维护治疗, 术后4 mo全愈出院。

例3, 男, 60岁, 糖尿病19<sup>+</sup>a, 胰岛素20-40 U/d, sc. 入院时无视力, 仅有光感, 尿量减少, 血压进行性升高, 每周需2次血透。查体: 神志清, 双眼视力0, 眼底视网膜水肿, 少量出血, 眼底动脉硬化III级。血糖12.5 μmol/L, 肌酐406 μmol/L, 尿素氮32 μmol/L, C肽0.13 μg/L。

诊断: I型糖尿病并发肾功能衰竭. 2004-04行胰肾联合联合移植术. 免疫抑制剂用量及方法同例1. 术后2 wk因肾急性排斥反应, 先甲基强地松龙400 mg/d, 3 d后治疗效果不佳; 随后给抗胸腺细胞球蛋白(ATG)冲击治疗, 排斥反应好转. 但血白细胞升高至 $30 \times 10^9/L$ , 胸片: 双肺炎, 痰培养是金黄色葡萄球菌. 治疗: 他克莫司减为原剂量的60%, 停用霉酚酸酯和激素. 给予去甲万古霉素500 mg/次, 2/d等抗感染治疗, 术后24 d终因肺部严重感染, 呼吸衰竭死亡.

例4, 女, 46岁, 糖尿病20<sup>+</sup>a伴肾病1 a, 胰岛素20-40 U/d, sc. 尿量500-900 mL/d, 血压正常, 每周需2次血透. 查体: 神志清, 双眼视力视力1.0, 眼底视网膜水肿轻度, 无出血及眼底动脉硬化. 血糖12.5  $\mu\text{mol/L}$ , 肌酐406  $\mu\text{mol/L}$ , 尿素氮32  $\mu\text{mol/L}$ , C肽0.13  $\mu\text{g/L}$ . 诊断: I型糖尿病并发肾功能衰竭. 2004-04行胰肾联合联合移植术. 术后1 wk因移植肾发生急性排斥反应, 先后给予甲基强地松龙和抗胸腺细胞球蛋白冲击治疗, 术后2 wk, 高热, 白细胞高达 $40 \times 10^9/d$ , 胸片: 双肺感染, 以右肺为主; 痰培养是大肠埃希杆菌. 治疗: 他克莫司减为原剂量的60%, 先后给予哌拉西林/他佐巴坦2 g, 2/d, 拜复乐2 g, 2/d抗感染, 积极保肾, 保胰等多器官维护治疗, 术后32 d终因肺炎、呼吸衰竭死亡.

## 2 讨论

由于加强了有效的预防性抗感染的治疗措施和有效的特异性较强的免疫抑制剂使用, 器官移植术后感染率有下降趋势, 但威胁移植受体生命的感染始终存在. 肺是易感染器官, 在心 and 肺移植中, 肺部感染是最主要部位; 肝移植中, 肺部感染排在第2位; 在肾移植中肺部感染率15%可能是最低的, 其原因可能与肾移植手术创伤相对较小和较低免疫抑制剂维持量有关. 胰肾联合移植手术较单个肾移植手术创伤增加, 胰液引流术式的不同如胰肠引流或胰膀胱引流方式和移植胰腺的手术相关并发症以及胰肾移植术后免疫抑制剂的较高剂量使用等因素无容置疑地增加了术后易感染的风险. 巨细胞病毒感染的预防和控制对需服用免疫抑制剂的器官移植患者具有重要意义, 巨细胞病毒的感染有可能诱发其他细菌和霉菌的感染, 甚至诱导排斥反应发生. 据报道, 如不进行巨细胞病毒感染的预防, 心肺联合移植术后巨细胞病毒感染发生率是39%, 肝脏和胰腺移植术后巨细胞病毒感染是29%, 心脏和肾

脏移植术后巨细胞病毒感染分别是25%和8%<sup>[1]</sup>. Linhares *et al*<sup>[2]</sup>报道45胰肾联合联合移植术后巨细胞病毒感染发生率是12%. 巨细胞病毒的感染往往与过强免疫抑制治疗有关, 如常规服用的免疫抑制剂较大, 或为加强抗急性排斥反应的治疗, 使用了抗胸腺细胞球蛋白或大剂量的抗CD3 mAb等. 分析例1术后肺部巨细胞病毒感染的救治过程有以下几点体会: (1)胰肾移植术后没有进行正规的预防巨细胞病毒感染治疗. 本例患者术后预防应用更昔洛韦500 mg/d, 仅持续了1 wk. 术后也未能坚持口服更昔洛韦药物治疗. Chiu *et al*<sup>[1]</sup>推荐的治疗方法是口服阿昔洛韦800 mg, 4/d, 维持3-12 mo; 或口服更昔洛韦1000 mg, 3/d, 维持3 mo; 或静脉5 mg/kg, 2/d, 维持7-14 d, 后改每日静脉5 mg/kg, 维持3mo; (2)胰肾移植术后常规免疫抑制剂量可能过大, 没有及时根据术后胰肾功能恢复情况进行递减用药剂量, 以至于受体免疫功能过低, 诱发巨细胞病毒感染. 如患者因交通不便未能及时回医院监测他克莫司的浓度, 以至其浓度一直在较高水平15-20 ng/L; 霉酚酸酯也一直是术后近期的剂量2/d; (3)在治疗胰肾移植术后发生肺部巨细胞病毒感染中, 应密切观察移植胰、肾功能同时迅速、大胆削减常规免疫抑制剂量, 可能是成功救治的关键. 在例1救治中, 成功削减他克莫司剂量60%, 停用霉酚酸酯和强的松, 移植胰和肾器官均未发生排斥反应; (4)采用双水平通气呼吸机面罩给氧辅助呼吸, 成功地纠正低氧血症而又避免了因气管切开继发肺部细菌感染风险; (5)在巨细胞病毒感染肺部引起呼吸功能衰竭的治疗中, 应注意加强环境隔离, 谨防继发细菌和霉菌感染, 严格控制输血量, 加强抗凝和疏通微循环等综合治疗, 我们的体会微量输液泵静脉注入肝素, 维持PT15-20 s, 有利于保护移植胰和移植肾的功能, 有利于肺功能的恢复.

器官移植术后的肺部的细菌感染常常属医源性或获得性感染. 多以革兰阴性菌、金黄色葡萄球菌、军团菌等为主. 如果术后一开始给予经验性预防抗生素使用, 耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌的感染应值得高度警惕. 肺部细菌感染的主要因素有需术后较长时间维持机械通气、术后误吸、腹部较大创伤影响排痰等<sup>[3]</sup>. 本例2、例4痰培养分别是革兰阴性杆菌难梭杆菌和大肠埃希杆菌; 例3痰培养金黄色葡萄球菌. 分析其感染的原因: (1)3例细菌感染患者均术后带气管插管进行通气支持治疗; (2)3例细菌感染患者均有

## ■创新盘点

据报道胰肾联合移植死亡率3%-25%. 感染是其死亡的主要因素可高达77%. 肺部感染常因发病隐匿、明确诊断不易, 给成功救治带来困难. 因而肺部感染是胰肾联合移植术后引发呼吸衰竭的主要因素. 针对胰肾移植术后的感染, 治疗原则是重在预防, 一旦发生感染, 积极寻找病原, 进行针对性治疗, 已经成为大多学者的共识. 本文所提供的经验或体会是, 除上述治疗原则外, 还应注意相关免疫抑制药物的大幅度削减或停用, 也是成功救治的重要一环.

### ■同行评价

胰肾联合移植术后肺部感染是最严重的并发症, 本组有4例发生感染, 并提出感染原因及救治措施, 仅2例死亡. 本文可作为今后胰肾联合移植术后预防和救治肺部感染的借鉴.

过强免疫抑制剂治疗, 如例3和例4术后都曾因急性排斥反应而进行激素冲击和使用抗胸腺细胞球蛋白治疗; (3)例2因术后并发严重脑梗, 呼吸骤停, 经抢救行气管切开, 支气管镜吸痰等操作, 也是诱发肺部感染的重要原因.

总结例术后肺部细菌感染的治疗经验和教训, 我们体会治疗中, 除根据药敏试验选择抗菌素是抗感染的关键外; 根据移植器官功能变化, 大胆削减免疫抑制剂量, 对控制细菌感染, 提高抢救成功率具有非常重要的意义. 一般情况下我们在抗细菌感染的同时削减他克莫司约50%-60%, 完全停用霉酚酸酯和激素, 然后根据

移植物功能变化和血药浓度来调整剂量.

### 3 参考文献

- 1 Chiu LM, Domagala BM, Park JM. Management of opportunistic infections in solid-organ transplantation. *Prog Transplant* 2004; 14: 114-129
- 2 Linhares MM, Gonzalez AM, Trivino T, Barbosa MM, Schraibman V, Melaragno C, Moura RM, Silva MH, Sa JR, Aguiar WF, Rangel EB, Serra CB, Succi T, Pestana JO. Simultaneous pancreas-kidney transplantation: infectious complications and microbiological aspects. *Transplant Proc* 2004; 36: 980-981
- 3 Kotloff RM, Ahya VN, Crawford SW. Pulmonary complications of solid organ and hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 22-48

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

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

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

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

New York Society for Gastrointestinal  
Endoscopy  
13-16 December 2006  
New York  
www.nysge.org



# 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, LD<sub>50</sub>, 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<sup>H</sup>, *H. pylori*不能写成HP,  $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或T<sub>1/2</sub>, Vmax不能Vmax,  $\mu$ 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),  $\rho$ (密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L),  $\phi$ (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<sub>r</sub>* 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<sub>r</sub>*(*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×10<sup>12</sup>/L, WBC数用×10<sup>9</sup>/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. *M<sub>r</sub>*明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1

N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm×6 cm×4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO<sub>2</sub>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B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、维生素B<sub>6</sub>、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B<sub>12</sub>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<sup>-3</sup> g与5×10<sup>-7</sup> 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% CO<sub>2</sub>, 50 mL/L CO<sub>2</sub>; 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<sup>-6</sup>; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

2.5 统计学符号 (1)*t*检验用小写*t*; (2)*F*检验用英文大写*F*; (3)卡方检验用希文小写 $\chi^2$ ; (4)样本的相关系数用英文小写*r*; (5)自由度用希文小写*v*; (6)样本数用英文小写*n*; (7)概率用英文斜体大写*P*. 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 统计学显著性用<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01(*P*>0.05不注). 如同一表中另有一套*P*值, 则<sup>c</sup>*P*<0.05, <sup>d</sup>*P*<0.01; 第三套为<sup>e</sup>*P*<0.05, <sup>f</sup>*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,  $3.5 \pm 0.5$  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 $3.6 \pm 0.4$  kg,过多的位数并无意义。又如 $8.4 \pm 0.27$  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 $\leq 100$ ,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](mailto: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 $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片,并考入磁盘内;彩色图请提供冲洗的彩色照片,请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$ ,必须使用双面胶条黏贴在正文内,不能使用浆糊黏贴。

致谢 致谢后加冒号,排在讨论后及参考文献前,左齐。

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名,则需在“Pang *et al*”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注码号。如马连生<sup>[1]</sup>报告……,潘伯荣 *et al*<sup>[2-5]</sup>认为……;

PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>。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软盘寄回编辑部; 逾期寄回的, 作重新投稿处理。

4.5 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》、《中文生物医学期刊/会议文献数据库》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录。

4.6 投稿清单 (1)投稿函; (2)第1部分为题名及作者, 作者及单位, 第1作者简介, 基金资助项目, 通讯作者Email, 电话, 传真, 收稿日期, 接受日期; (3)第2部分英文摘要; (4)第3部分中文摘要; (5)第4部分为0引言, 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法, 统计学处理, 2 结果, 3 讨论, 致谢, 4 参考文献。

4.7 投稿地址 在线投稿: <http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>。邮局寄送(已在线提交的稿件不必再寄): 请将打印的稿件一式2份(附高质量的图)、存有全文(文字、图表)的磁盘和其他信息(全部文件的清单, 各文件的名称、格式和使用平台等)寄往: 100023, 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社。

世界胃肠病学杂志社  
100023, 北京市2345信箱  
郎辛庄北路58号院怡寿园1066号  
电话: 010-85381901  
传真: 010-85381893  
Email: [wcjd@wjgnet.com](mailto: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), 本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!

曹洁 副教授  
第二军医大学微生物学教研室

陈凇 教授  
中国人民解放军总医院普通外科

陈卫昌 教授  
苏州大学附属第一医院

程英升 副教授  
上海交通大学附属第六人民医院科教处

杜群 副研究员  
广州中医药大学脾胃研究所

房静远 教授  
上海交通大学医学院附属仁济医院消化所

何超 教授  
邵逸夫医院肛肠外科

黄晓东 副主任医师  
武汉市中心医院消化内科

黄颖秋 教授  
本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

江学良 副教授  
济南军区总医院消化科

金瑞 教授  
北京佑安医院

李军祥 教授  
北京中医药大学附属东方医院消化内科

李永哲 副教授  
北京市东城区帅府园1号北京协和医院检验科

林勇 讲师  
第二军医大学附属长征医院消化内科

刘宝瑞 主任医师  
南京市鼓楼医院肿瘤科

陆云飞 教授  
广西医科大学第一附属医院外科

吕宾 教授  
浙江中医药大学附属医院消化科

吕云福 教授  
海南省人民医院普外科

潘兴华 副主任医师  
昆明总医院医学实验科

秦成勇 教授  
济南市经五纬六路山东省立医消化内科

秦环龙 教授  
上海交通大学附属第六人民医院外科

沈洪 主任医师  
江苏省中医院消化科

施瑞华 教授  
南京医科大学第一附属医院消化内科

石统东 副教授  
重庆医科大学附属第二医院感染病科

王广义 教授  
吉林大学第一医院普外科

王正康 教授  
北京中日友好医院普通外科

肖恩华 教授  
中南大学湘雅二医院放射教研室

阎晓初 教授  
第三军医大学西南医院病理学研究所

杨建勇 教授  
中山大学附属第一医院放射科

杨维良 教授  
哈尔滨医科大学附属第二医院普外科

余宏宇 教授  
第二军医大学附属长征医院病理科

张锦生 教授  
复旦大学上海医学院病理学系

张学 教授  
中国协和医科大学基础医学院医学遗传学系

周士胜 教授  
大连大学医学院医学研究中心