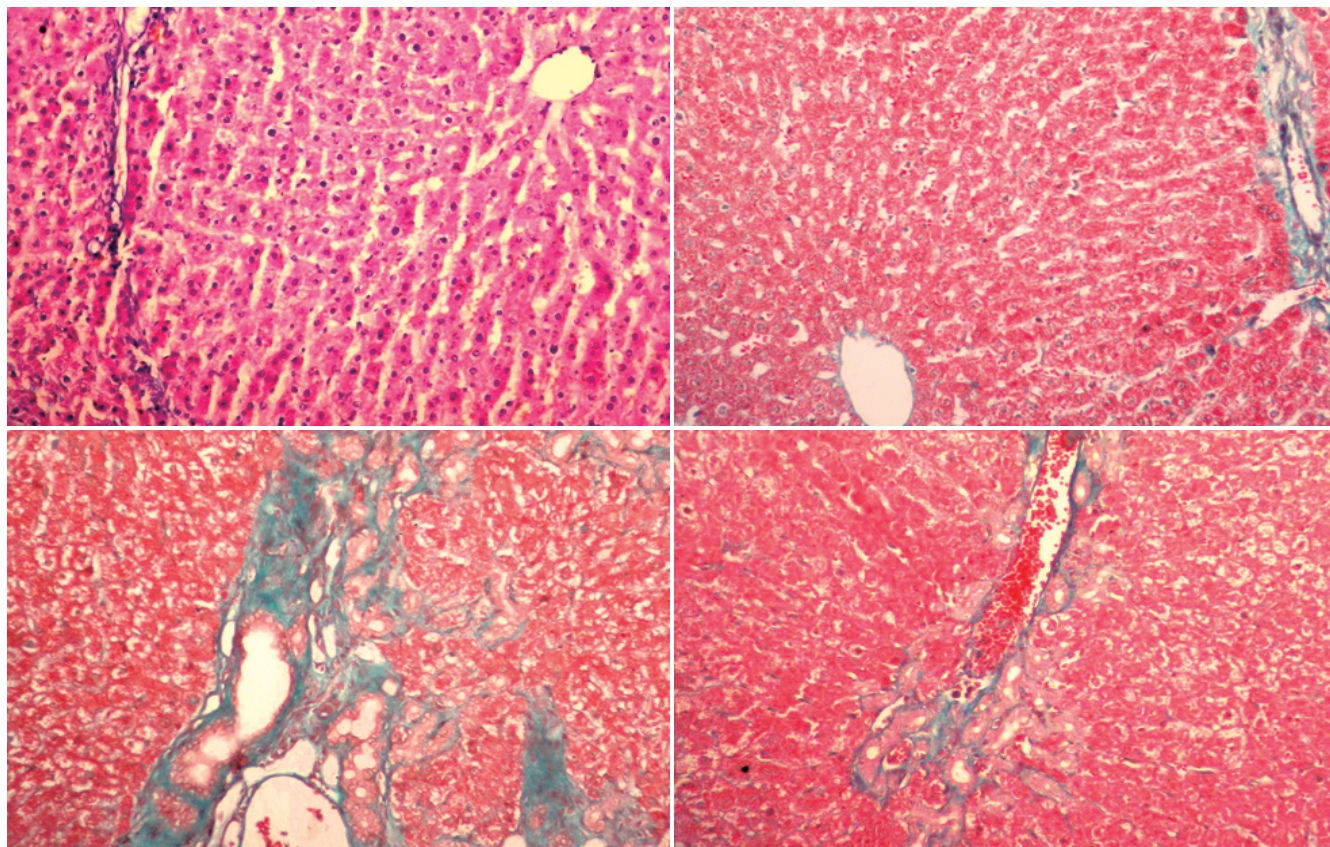


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2006 年 9 月 18 日 第 14 卷 第 26 期 (Volume 14 Number 26)



26 / 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
刘纪教授	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
刘正稳教授	西安
刘作金副教授	重庆
龙致贤教授	北京

世界华人消化杂志®

编辑委员会

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	唐霓副教授	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	杨林副教授	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	杨永生教授	北京
茅爱武主任医师	上海	屠红研究员	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	郑鹏远教授	郑州
邵永孚教授	北京	夏建川研究员	广州	智发朝教授	广州
沈洪教授	南京	向德兵讲师	重庆	周伯平教授	深圳
沈琳副教授	北京	肖恩华教授	长沙	周丁华主任医师	北京
沈薇教授	重庆	谢晓华副教授	广州	周国雄主任医师	南通
施诚仁教授	上海	徐爱民副教授	上海	周士胜教授	大连
施瑞华教授	南京	徐迎新研究员	北京	周霞秋教授	上海
石统东副教授	重庆	许春舫主任医师	苏州	周晓东研究员	广州
宋世兵主任医师	北京	徐存拴教授	新乡	庄林主任医师	昆明
宋振顺教授	西安	徐大华副主任医师	北京	朱传武副主任医师	苏州
孙诚谊教授	贵阳	徐德忠教授	西安	朱春兰主任医师	哈尔滨
孙殿兴主任医师	石家庄	徐列明教授	上海	朱立元教授	深圳
孙家邦教授	北京	徐小元教授	北京	朱人敏教授	南京
孙秀发教授	武汉	许玲副教授	上海	邹小明教授	哈尔滨
孙学英教授	哈尔滨	许文燮教授	上海	左国营副主任药师	昆明
邵升副教授	哈尔滨	许亚平副教授	镇江		
谭学瑞教授	汕头	闫惠平研究员	北京		

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2006 年 9 月 18 日 第 14 卷 第 26 期 (总第178期)

述 评

2579 HBV X基因和X蛋白的功能 王小众, 林纳

基 础 研 究

2586 热水致大鼠慢性萎缩性胃炎胃黏膜组织细胞HSP-70及Fas蛋白表达

张玲霞, 张沥, 陶梅, 王春梅, 陈丹, 宋瑛, 江梅, 曹广周

2590 清肝活血方对乙醇性肝纤维化大鼠肝星形细胞和肝细胞凋亡的影响

王磊, 柳涛, 郑培永, 邢练军, 季光

2596 氧应激对大鼠肝星状细胞增殖的影响及还原型谷胱甘肽的抗氧化作用

刘梅, 陆伦根, 陈尉华, 窦爱霞, 房静远, 曾民德, 郑瑞丹

2601 大鼠重症急性胰腺炎并发腹内压升高导致肺损伤

崔云甫, 黄睿, 郑宏群

2605 幽门螺杆菌5种候选疫苗抗原基因的克隆、表达及抗原性的鉴定

宁云山, 李妍, 龙敏, 董文其, 李明

临 床 研 究

2610 饮酒对慢性乙型病毒性肝炎患者肝脏炎症和纤维化的病理影响

牛凤丽, 洪尚游, 万谟彬

文 献 综 述

2613 细胞间黏附分子与胃癌侵袭、转移关系的研究进展

陈天池, 魏品康

2617 功能性胃肠病的根源——脑肠轴神经系统记忆假说

吴立平, 史维

2620 低氧诱导因子-1与消化道肿瘤的研究进展

周炜, 姜政

2626 凋亡抑制基因XIAP在肿瘤治疗中的研究进展

张曙光, 刘芝华, 张林

临 床 经 验

2632 胃癌组织中幽门螺杆菌cagA和vacA的表达及与其感染的相关性

佟书娟, 陈军, 詹臻, 杨丹丹, 刘亚平

2636 加味柴芍承气汤对重症急性胰腺炎肺损伤的作用

王国品, 滕晓琨, 杨莉, 徐肇敏, 黄晓丽, 王平, 曾皓明

2640 缓释渗透增敏化疗加放疗综合治疗食管癌50例

王志蕙, 侯海燕, 范士怀, 彭京凤

2645 高海拔地区无痛胃镜检查的临床观察

张晓华, 朱人敏, 白玛觉群

2649 慢性萎缩性胃炎24 h胃内pH值监测及血清胃泌素含量的意义

袁华魏, 李雪雁, 徐鸽鸽, 张恩民

2652 直肠癌周围黏膜下注射微粒子碳在TME术中的应用

张日平, 田素礼, 张好刚

附 录	2655 世界华人消化杂志投稿须知				
致 谢	2660 致谢世界华人消化杂志编委				
消 息	2595 《世界华人消化杂志》简介 2604 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 2609 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 2616 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 2619 第十九届全国中西医结合消化会议征文通知 2625 世界华人消化杂志关于作者署名的声明 2635 专家门诊 2639 全国消化系疾病的诊疗进展学习班通知 2644 第六届西太平洋幽门螺旋杆菌会议通知 2648 第三届亚洲大洋洲光生物学大会				
封面故事	Eken H, Ozturk H, Ozturk H, Buyukbayram H. Dose-related effects of dexamethasone on liver damage due to bile duct ligation in rats. <i>World J Gastroenterol</i> 2006; 12(33): 5379-5383 http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/5379.asp				
国际会议	<table> <tr> <td> 14th United European Gastroenterology Week 21-25 October 2006 Berlin United European Gastroenterology Federation www.uegw2006.de </td><td> World Congress on Controversies in Obesity Diabetes and Hypertension 25-28 October 2006 Berlin comtec international codhy@codhy.com www.codhy.com </td></tr> <tr> <td> XXX Panamerican Congress of Gastroenterology 11-16 November 2006 Cancun www.panamericano2006.org.mx </td><td> New York Society for Gastrointestinal Endoscopy 13-16 December 2006 New York www.nysge.org </td></tr> </table>	14th United European Gastroenterology Week 21-25 October 2006 Berlin United European Gastroenterology Federation www.uegw2006.de	World Congress on Controversies in Obesity Diabetes and Hypertension 25-28 October 2006 Berlin comtec international codhy@codhy.com www.codhy.com	XXX Panamerican Congress of Gastroenterology 11-16 November 2006 Cancun www.panamericano2006.org.mx	New York Society for Gastrointestinal Endoscopy 13-16 December 2006 New York www.nysge.org
14th United European Gastroenterology Week 21-25 October 2006 Berlin United European Gastroenterology Federation www.uegw2006.de	World Congress on Controversies in Obesity Diabetes and Hypertension 25-28 October 2006 Berlin comtec international codhy@codhy.com www.codhy.com				
XXX Panamerican Congress of Gastroenterology 11-16 November 2006 Cancun www.panamericano2006.org.mx	New York Society for Gastrointestinal Endoscopy 13-16 December 2006 New York www.nysge.org				

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 2006-09-18
原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生
编辑部主任 张海宁 英文编辑 张海宁
中文编辑 潘伯荣 张海宁 张焕兰 王晓瑜
电子编辑 张敏 李琪
本期审读 王晓瑜

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会

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

印刷 北京科信印刷厂

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

订购 全国各地邮电局

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

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

特别声明

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

2006年版权归世界胃肠病学杂志社所有

ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

邮发代号
82-262

国外代号
M 4481

国内定价
每期24.00元 全年864.00元

广告经营许可证
1401004000050

www.wjgnet.com

World Chinese Journal of Digestology

September 2006 Contents in Brief Volume 14 Number 26

EDITORIAL	2579 Role of hepatitis B virus X gene and protein <i>Wang XY, Lin N</i>
BASIC RESEARCH	<p>2586 Expression of HSP-70 and Fas protein in gastric mucosa with chronic atrophic gastritis induced by hot water in rats <i>Zhang LX, Zhang L, Tao M, Wang CM, Chen D, Song Y, Jiang M, Cao GZ</i></p> <p>2590 Effect of <i>Qinggan Huoxue</i> recipe on apoptosis of hepatic stellate cells and hepatocytes in rats with alcoholic liver fibrosis <i>Wang L, Liu T, Zheng PY, Xing LJ, Ji G</i></p> <p>2596 Effects of oxidative stress on proliferation of rat hepatic stellate cells and antioxidation of reduced glutathione <i>Liu M, Lu LG, Chen WH, Dou AX, Fang JY, Zeng MD, Zheng RD</i></p> <p>2601 Experimental study on severe acute pancreatitis-induced intra-abdominal hypertension complicated with acute lung injury <i>Cui YF, Huang R, Zheng HQ</i></p> <p>2605 Cloning, expression and antigenicity identification of five candidate vaccine antigen genes of human <i>Helicobacter pylori</i> <i>Ning YS, Li Y, Long M, Dong WQ, Li M</i></p>
CLINICAL RESEARCH	2610 Impact of alcohol intake on liver inflammation and fibrosis in patients with chronic hepatitis B <i>Niu FL, Hong SY, Wan MB</i>
REVIEW	<p>2613 Advance in relationship between intercellular adhesion molecule-1 and invasion, metastasis of gastric cancer <i>Chen TC, Wei PK</i></p> <p>2617 Origin of functional gastrointestinal disorders: memory hypothesis of brain-gut axis nervous system <i>Wu LP, Shi W</i></p> <p>2620 Advance in relationship between hypoxia inducible factor 1 and digestive neoplasm <i>Zhou W, Jiang Z</i></p> <p>2626 Research progress on X-linked inhibitor of apoptosis protein gene in treatment of cancer <i>Zhang SG, Liu ZH, Zhang L</i></p>
CLINICAL PRACTICE	<p>2632 Expression of <i>Helicobacter pylori</i> <i>cagA</i> and <i>vacA</i> and their correlations with <i>Helicobacter pylori</i> infection in gastric cancer <i>Tong SJ, Chen J, Zhan Z, Yang DD, Liu YP</i></p> <p>2636 Effects of <i>Chaishao Chengqi</i> decoction with ginkgo biloba leaf on lung injury induced by severe acute pancreatitis <i>Wang GP, Teng XK, Yang L, Xu ZM, Huang XL, Wang P, Zeng HM</i></p> <p>2640 Radiosensitizing effect of extended-release chemotherapy combined with radiotherapy in treatment of esophageal cancer: an analysis of 50 cases <i>Wang ZH, Hou HY, Fan SH, Peng JF</i></p> <p>2645 Clinical application and efficacy of analgesic gastroscopy in high-altitude region <i>Zhang XH, Zhu RM, Bai-Ma JQ</i></p>

	<p>2649 Significance of 24-h intragastric pH monitoring and serum concentration of gastrin in chronic atrophic gastritis <i>Yuan HW, Li XY, Xu LG, Zhang EM</i></p> <p>2652 Clinical application of submucosal injection of particulate carbon around the rectal cancer lesions in total mesorectal excision <i>Zhang RP, Tian SL, Zhang HG</i></p>
APPENDIX	2655 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology
ACKNOWLEDGMENT	2660 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<p><i>Halil Eken, Hayrettin Ozturk, Hulya Ozturk, Huseyin Buyukbayram.</i></p> <p>Dose-related effects of dexamethasone on liver damage due to bile duct ligation in rats. <i>World J Gastroenterol</i> 2006; 12(33): 5379-5383 http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/5379.asp</p>
INTERNATIONAL MEETINGS	<p>14th United European Gastroenterology Week 21-25 October 2006 Berlin United European Gastroenterology Federation www.uegw2006.de</p> <p>World Congress on Controversies in Obesity Diabetes and Hypertension 25-28 October 2006 Berlin comtec international codhy@codhy.com www.codhy.com</p> <p>XXX Panamerican Congress of Gastroenterology 11-16 November 2006 Cancun www.panamericano2006.org.mx</p> <p>New York Society for Gastrointestinal Endoscopy 13-16 December 2006 New York www.nysge.org</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 September 18, 2006

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

Edited by Editorial Board of

World Chinese Journal of Digestology

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Overseas Distributor

China International Book Trading Corporation

PO Box 399, Beijing 100044, China

Code No.M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381901

Fax: +86-10-85381893

Email: wjgd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

Copyright © 2006 by The WJG Press

HBV X基因和X蛋白的功能

王小众, 林 纳

王小众, 林纳, 福建医科大学附属协和医院消化研究所 福建省福州市 350001

王小众, 北京大学医学博士毕业, 纽约大学医学院访问医师, 教授, 主任医师, 博士生导师.

福建医科大学科学研究发展基金项目, No. FJGXY 04017

通讯作者: 王小众, 350001, 福州市新权路29号, 福建医科大学附属协和医院消化内科, drwangxz@pub6.fz.fj.cn

电话: 0591-83357896-8482

收稿日期: 2006-06-01 接受日期: 2006-06-14

摘要

HBV X基因编码的X蛋白(PX)是一种多功能蛋白, 在HBV感染和肝细胞癌(HCC)发展的不同阶段, 执行不同的生物学功能. PX参与调节病毒复制, 显著影响肝细胞信号传导、新陈代谢、凋亡、细胞因子产生、细胞周期调控和癌基因、抑癌基因等方面基因表达, 干扰线粒体氧化磷酸化等能量代谢过程, 造成细胞氧化损伤, 促进细胞凋亡.

关键词: HBV X基因; X蛋白; 反式激活

王小众, 林纳. HBV X基因和X蛋白的功能. 世界华人消化杂志 2006;14(26):2579-2585

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2579.asp>

0 引言

HBV X基因是HBV病毒基因组中最小的开放性读码框, 位于HBV基因组的1374-1838 bp处, 全长435-462 bp, 编码长度为154个氨基酸的蛋白. X基因序列在嗜肝病毒科中高度保守, 提示在HBV生物学功能上具有重要意义. 虽然对X基因和X蛋白(PX)的研究不断深入, 但是确切的功能尚无定论. 研究发现, PX不直接作用于双链DNA, 而是通过和细胞内的多种蛋白相互作用来调节细胞生物学功能. PX作为多功能蛋白, 广泛参与病毒的复制; 宿主细胞的基因调控和表达、蛋白质降解及细胞信号转导等过程; 并可通过影响正常的细胞周期, 干扰DNA的修复及调节肝细胞增殖、分化和凋亡, 在HBV病毒感染及原发性肝细胞癌(HCC)发生、发展中起关键作用.

1 X基因及其产物与HBV病毒复制

HBV X基因是病毒基因组的保守区域, 参与调

节病毒复制. PX天然反式激活作用的靶目标是病毒颗粒, 体内研究表明, 这对维持病毒基因的复制和表达十分重要. 将X基因缺陷型HBV转染入细胞后, 病毒复制水平仅为野生型HBV的10%^[1]. 缺少X基因的Woodchuck HBV病毒无法在宿主细胞内复制或复制水平明显降低, 而在已转染X基因的HepG₂细胞中, 病毒复制增加了5-10倍^[2]. Tang *et al*^[3]将X基因缺陷型HBV病毒转染HepG₂细胞, 病毒复制、转录均受影响. 通过构建一系列PX突变株的研究发现, PX的C末端2/3氨基酸(51-154位点)是反式激活作用必须的, 也是调节病毒复制的功能区域, 其中52-65位点和88-154位点是关键区域.

Zhang *et al*^[4]发现, X基因缺失使HBV病毒的复制下降, 加入蛋白酶抑制剂后, 病毒复制水平则大大提高, 甚至达到野生型复制水平, 提示PX可能通过蛋白酶依赖途径调控病毒复制. PX能与细胞内蛋白酶复合物组分结合, 可能通过抑制蛋白酶水解活性, 促进病毒复制. DDB1为细胞保守序列, 参与DNA修复和细胞周期循环的调控. Leupin *et al*^[5]发现, PX与DDB1结合不仅能调节细胞增殖, 还能调节病毒复制. PX突变后, 失去与DDB1结合的能力, 导致病毒复制、转录处于低水平. 他们还发现, PX与DDB1结合对病毒复制的调控作用主要是在mRNA水平. 此外, PX能激活酪氨酸激酶(Scr)及钙离子信号途径, 通过线粒体PTF, 调节病毒的复制, 而Scr激酶抑制剂和钙离子信号抑制剂可抑制病毒在细胞内的复制. 提示, PX对HBV复制的调控可能涉及钙离子信号和胞质内Scr激酶^[2]. HBV核心蛋白(HBcAg)对病毒复制至关重要, 其中155, 162和170位点丝氨酸的磷酸化尤其重要, PX通过刺激这些部位的丝氨酸磷酸化促进病毒的复制^[6]. Zhang *et al*^[7]通过酵母双杂交系统发现PX能与Hepsin在细胞内结合并相互作用, 在HepG2.2.1.5细胞系中刺激HBsAg的表达, 从而刺激病毒的复制.

■背景资料

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是通过逆转录复制基因组的嗜肝DNA病毒家族的一员, HBV感染可致急、慢性肝炎, 并同原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的进展密切相关. HBV具有一个编码16.5 kDa的X蛋白的开放阅读框, 此序列在所有哺乳动物嗜肝DNA病毒中高度保守. X蛋白是一个多功能的调节蛋白, 在HBV感染和HCC发展的不同阶段, 执行不同的生物学功能.

■研究前沿

HBV X基因是HBV病毒基因组中最小的开放性读码框,虽然对X基因和X蛋白(PX)的研究不断深入,但是确切的功能尚无定论.研究发现,不同表达量的X蛋白在细胞内的分布不同,提示其执行不同的生物学功能.最新的研究发现,PX可以定位在线粒体上,可能通过与线粒体外膜蛋白作用,增加外膜通透性,降低跨膜电压,干扰线粒体氧化磷酸化等能量代谢过程,造成细胞氧化损伤,促进细胞凋亡.

2 X基因及其产物在细胞核中的作用

在宿主细胞中表达的PX通过与一些转录调控蛋白质相互作用,在转录调控水平上激活或抑制靶基因的转录;或者直接通过与胞质蛋白质的相互作用,影响这些蛋白质的功能. HBV X基因转染肝细胞后以激光共聚焦显微镜观察可以发现,当X基因表达弱时,大部分位于细胞核内,少量在胞质.当表达水平提高时,主要在胞质累积,包括存在线粒体内^[8]. PX在细胞内不同的分布,提示其执行不同的生物学功能.真核细胞的基因表达调控主要是转录水平的调控,转录的调节则主要发生在影响转录初始复合体(PIC)的形成上. PIC是由6种普通转录因子即TFIA, TFIB, TFID, TFIE, TFIF和TFIH与RNA聚合酶(pol III)共同组成的聚合体. 众多研究表明, PX能和PIC中多个转录因子直接结合,调节宿主细胞转录.

RNA pol III在转录调控中起主导作用,他本身是由许多亚单位组成的复合体, RBP₅是一个重要的亚单位,位于转录起始部分附近,能与许多转录调节因子结合. Le *et al*^[9]用Far-Western方法,以³²P标记的PX为探针从人肝癌细胞株HepG₂的cDNA文库中筛选出了PX结合蛋白(XAP),并发现XAP与pol III的亚单位RBP₅氨基酸序列完全一致. PX通过C末端与RBP₅中央部分结合,促进细胞转录. 通过对RBP₅中央部分一系列位点突变的研究发现, F76, I104, T111, S113, V74和N98是结合的关键区域,其中T111和S113与转录起始区域非常接近,因此, PX可能通过调节RBP₅与DNA的结合来实现对基因的转录调控.

TF II B是重要的普通转录因子,在PIC形成过程中他主要作为桥梁介导pol III和TF II F复合体进入PIC. PX能直接与TF II B结合, PX的51-99位点和TF II B的125-295位点是相互作用的关键区域. 虽然PX与TF II B的作用机制没有明确,但普遍的观点认为, PX能稳定TF II B与DNA的结合,促进转录水平^[10]. 此外, PX还能与转录因子SP1相互作用,影响其DNA结合能力,下调TF II H两个亚单位XPB(p89)和XPD(p80)的表达,使TF II H修复DNA的功能受损^[11]. TATA盒结合蛋白(TBP)是唯一能直接结合TATA盒元件的普通转录因子, TBP和TBP协同因子(TAFs)共同组成TF II D. TF II D通过TBP和TF II A-DNA复合物结合,然后陆续接纳pol III和其他普通转录因子,组成PIC. TBP还是许多调节蛋白的结合对象,在转录调节中起十分重要的作用. PX可在ATP存

在的条件下与TBP结合,稳定TBP与TATA盒的结合,增加RNA聚合酶pol III和I的转录活性,提高转录水平^[12].

3 X基因及其产物在细胞质中的作用

3.1 PX与信号转导 在真核细胞中除了普通转录因子外,还存在许多细胞转录因子,他们主要结合启动子上游的特异DNA序列,起到调节转录的作用. 常见的这一类细胞转录因子如cAMP反应元件结合蛋白(CREB)/活化转录因子(ATF), AP-1, AP-2和NF- κ B等,他们被激活后进入细胞核,发挥反式激活作用. 分布于胞质中的PX广泛参与细胞信号转导过程,激活下游的细胞转录因子、凋亡信号等,被认为是PX的重要生物学功能之一. (1)PX与ERK/MAPK途径: Najihara *et al*^[13]将X基因通过肝细胞特异性病毒颗粒转入正常成年大鼠肝细胞中,发现细胞内的ERK活性增加. Guan *et al*^[14]将X基因稳定转染HepG₂细胞, ERK/MAPK信号传递途径的磷酸化程度增强,证明PX能激活ERK/MAPK信号转导途径. 研究发现, X蛋白C区(58-84位点)和D区(85-119位点)是激活ERK/MAPK途径的关键区域,而E区(120-140位点)则是非必要的. Bouchard *et al*^[15]研究发现, PX能激活FAK, FAK是Src激酶家族的调节因子,能激活Src激酶及下游的MAPK,而FAK的抑制因子能阻止PX对MAPK信号途径的激活. Klein *et al*^[16]报道, PX可激活Src激酶活性, Src激酶被激活后,促使Ras上游的shc, sos, Grb2及GTP结合到Ras,激活Ras, Ras激活Raf, Raf将上游信息传递给有丝分裂激活蛋白(MAP)激酶,分别通过刺激两种不同的MAP激酶家族调节成员: 细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinase, ERKs)和c-Jun末端激酶(JNKs)促进c-Fos和c-Jun的合成,使AP-1结合DNA能力增强,通过结合AP-1启动子上游反应元件的特异序列,使转录水平上调,完成信息传递. 此外, PX激活ERKs和JNKs导致AP-1-c-Fun复合物持久存在, AP-1-c-Fun复合物也将影响细胞的转录水平^[17]. Su *et al*^[18]实验证实, PX可通过激活Ras-Raf-MAPK激酶信号途径激活NF- κ B. NF- κ B是真核细胞中一类重要的转录调节因子,属于与癌基因v-Rel相关的蛋白家族. 在没有外来刺激因子的情况下, NF- κ B与特异性抑制因子结合,以无活性形式存在于胞质中,当受外界信号刺激后, NF- κ B与抑制因子分离,活化,向细胞核内转移,特异性结合NF- κ B反应元件,促进

转录. PX激活NF- κ B, 促使其发挥转录因子的作用, 调节一系列基因的表达. Lee *et al*^[19]实验发现, 在Hela和Chang细胞中, PX通过激活NF- κ B使淋巴毒素 α (LT α)转录水平增高, LT α 是一种细胞炎症因子, 能诱发肝脏炎症反应. NF- κ B还上调MMP-9的表达, 在肝癌侵袭和转移过程中起重要作用^[20]. NF- κ B途径下游的uPA与肿瘤侵袭和转移有关. 在PX阳性的肿瘤组织中, NF- κ B和uPA的活性明显增高, 肿瘤组织在血管侵袭, 肝内扩散及缺乏完整包膜等方面表现出更高的恶性程度^[21]. 因此, PX激活NF- κ B在HCC的发生和发展过程中起到重要的作用. PX通过Ras/ERK/MAPK途径刺激细胞产生多核、多中心纺锤体和有丝分裂失常, 使细胞DNA生成增多^[22]. MDR-1, MRP-1和LRP是肿瘤细胞内的抗化疗药物相关基因, 转染X基因的肿瘤细胞这些基因表达明显增多, 用ERK/MAPK途径抑制因子干预细胞, 则化疗药基因表达减少, 细胞凋亡增多, 说明PX可能通过激活ERK/MAPK信号通路促使肿瘤细胞表达化疗药物抗性基因, 使细胞耐受化疗药物的攻击^[14]. (2) PX与PI-3-K途径: PX能抑制TGF- β 诱导的凋亡. PX不改变TGF- β 受体的表达水平, 也不影响受TGF- β 激活的PAI-1基因启动子的活性, 而是只作用于TGF- β 本身. 在稳定表达X基因的Hep 3B细胞中, PI-3-K的活性及p85亚基丝氨酸残基磷酸化水平增高, TGF- β 介导的细胞凋亡也明显减少. 当加入PI-3-K的抑制剂时, 细胞凋亡增加, 因此, PX可能通过激活PI-3激酶途径拮抗TGF- β 的促凋亡作用^[23]. (3) PX与JNK/STAT途径: STATs是一类细胞转录因子, 一般以无活性形式存在于胞质中, 当受到细胞外信号的刺激(如IL-6和EGF), Scr残基磷酸化, STATs就活化, 进入细胞核, 与相关的DNA序列结合, 调节基因转录. Waris *et al*^[24]报道, 稳定转染X基因的HepG₂细胞在没有任何细胞外刺激因素存在的情况下, 细胞内总STAT-3水平没有发生变化, 但是磷酸化水平增高, 提示STAT-3活性增高. Lee *et al*^[25]发现, PX能激活Scr激酶家族成员Jak1, 使STATs Scr残基磷酸化而激活. 由于在肝细胞中Jak-STAT持续激活常与生长因子刺激有关, 因此, PX可能作为一种“内源性配体”激活生长因子信号转导途径. 此外, PX还能通过改变胞质内钙离子分布, 激活JNK/STAT信号转导途径^[26].

3.2 PX与细胞增殖和凋亡 在肝癌的发病过程中,

癌细胞和癌前细胞通常表现为凋亡增多伴随增殖增多^[27]. 大量的研究发现, PX对细胞凋亡有双重调节作用. PX抑制肝细胞的凋亡一直被认为是HBV导致HCC发生的重要原因之一, 而PX对肝细胞凋亡的促进作用也被认为是有利于HCC的发生和发展. 转染X基因的HepG₂细胞, 大部分细胞处于S期和G₀/M期, 说明X基因能刺激肝癌细胞的增殖^[28]. PX可通过多种途径抑制细胞凋亡. PX和Hepsin在细胞内结合并相互作用, 刺激细胞生长和抑制凋亡^[7]; Yun *et al*^[29]将X基因转染Chang细胞, DNA生成升高3倍, 没有明显凋亡表现. 当以NF- κ B抑制因子IKKB干预细胞后, 细胞凋亡增多, 说明PX通过NF- κ B促进细胞增殖, 抑制凋亡. 为防止DNA受损的细胞进入S期, P53可以直接诱发细胞凋亡, PX能抑制P53的促凋亡作用, 使DNA修复不完全的细胞得以存活^[30]; 下调Bcl-2家族中促凋亡成员如Bax, Bid等表达, 阻断其促进凋亡作用^[31-32]. PX可通过PI-3-K-Akt-Bad途径抑制caspase-3的活性而抑制凋亡, 这一作用是不依赖于P53途径^[33]. 通过激活PI-3-K途径, 抑制TGF- β 的促凋亡作用^[23]. PX不仅能抑制肝细胞凋亡, 还具有促进肝细胞凋亡, 抑制细胞增殖的作用, 且这一作用依赖于PX在细胞中的表达水平, 当PX的表达处于高水平时可诱导细胞凋亡^[34-36]. 在X基因转基因小鼠的实验中发现, 肝脏部分切除后, 肝细胞再生受到抑制^[37]. PX可上调Fas/FasL的表达, 可能通过以下机制诱导Fas/FasL表达: (1)通过与Egr位点结合, 加强其与辅助因子CBP结合, 刺激启动子活性, 促进FasL的表达, 同时刺激蛋白质功能的发挥^[38]; (2)IL-18是细胞炎症因子, 研究发现, IL-18有促进Fas/FasL表达的作用. PX能促进IL-18 mRNA的转录、蛋白质表达, 进而促进Fas/FasL的表达^[39]; (3)c-FLIP是DISC的关键调节因子, 能抑制由Fas/FasL介导的细胞凋亡. PX通过与c-FLIP的DED1区域相互作用, 拮抗c-FLIP对Fas/FasL介导的凋亡抑制作用, 还使细胞对极低浓度的TNF- α 诱导的凋亡十分敏感^[40-41]. 通过上调myc的表达, 使细胞对TNF- α 介导的凋亡信号敏感^[42-43], 与DDB1竞争性结合DDB2, 以DDB1非依赖形式介导细胞凋亡^[44]. Survivin是新发现的PX结合蛋白. 单独的这两种蛋白均不能和caspase-9前体结合, 但是如果二者结合后即可引起caspase-9募集Alfa, 激活线粒体/Cyt c凋亡途径^[45]. Bcl-2家族是重要的凋亡调控因子. 该

■应用要点

鉴于HBV感染是一个多步骤、多环节的慢性过程, 且PX在HBV感染及HCC发生、发展中起关键作用. 因此, 进一步深入研究X基因及其产物的作用机制, 早期阻断PX的细胞毒性作用对于防止病毒感染播散, 减缓肝细胞的恶变和肿瘤的发生具有十分重要的意义.

■创新盘点

本文从X基因和X蛋白对HBV复制的调节,对宿主细胞转录、信号转导、细胞增殖、凋亡、周期调控、癌基因及抑癌基因的表达调控,以及对线粒体结构和功能的影响等方面较全面的阐述,尤其是对线粒体的影响是近年来研究的热点、要点。

家族包含两种功能截然相反的蛋白:抑凋亡蛋白和促凋亡蛋白,二者在细胞中的比例在一定程度上决定了细胞对死亡信号的反应及细胞的命运^[31,46-49]。虽然酵母双杂交实验显示PX不能和Bcl-2家族的任何一种蛋白结合,但是PX能通过调节该家族成员的功能来调节细胞的增殖和凋亡。如拮抗Bcl-2的凋亡抑制作用,上调Bax和Bcl-XL等的表达,或抑制Bid介导的线粒体凋亡途径等^[31,50]。

3.4 PX与细胞周期调控 Wu *et al*^[51]构建了X基因的转基因小鼠,研究发现,PX能强烈刺激处于静止期的肝细胞由G₀期进入G₁期,抑制细胞G₁/S期转化,打破细胞周期进程,使细胞发生非正常死亡。Li *et al*^[28]研究却得出了相反的结论,转染X基因的HepG₂细胞,大部分细胞处于S期和G₀/M期,说明X基因能刺激肝癌细胞的增殖。Kwun *et al*^[52]的研究报道,PX自然变异Ser-101替代Pro-101能稳定P53,可能是保护P53避免MDM2的降解。包含Met-130的PX变异通过抑制Sp1抑制P21活性。因此由于PX不同的变异,使其对P21有不同的调节功能,表现出对细胞周期不同的调节,可以为解释PX截然相反的功能提供一些线索。Peng *et al*^[53]报道,PX整合后使肝癌和肝硬化患者基因组中cyclin A等基因表达发生显著改变^[53]。Klein *et al*^[54]研究发现,X基因能在转基因鼠的孕早期就诱导cyclin D1过表达。PX还能通过P53依赖和非依赖途径调控P21的表达,前者主要通过直接结合P53,抑制其功能,进而下调P21的表达,后者主要通过调节转录因子Sp1的活性来调节P21的表达^[55]。

3.5 PX与癌基因和抑癌基因 恶性肿瘤发病机制之一就是癌基因和抑癌基因的平衡被打破,癌基因被激活,抑癌基因表达被抑制或功能受破坏。大量研究证实,位于胞质内PX可以激活c-myc, c-fos, ras, raf, src等多种原癌基因,并抑制P53, PRB等抑癌基因。Ou *et al*^[56]对X基因转基因鼠进行研究,小鼠出生后,肝细胞即表现出增殖活跃,呈指数增长,伴随凋亡增多,这一现象一直持续到肝脏肿瘤发生,凋亡才减少。c-myc是一种细胞癌基因,目前较一致的观点认为,c-myc可与X基因协同作用,打乱细胞增殖和凋亡平衡,使细胞生长失控,引起细胞癌变^[57-58]。实验证明,PX可促进c-myc基因的转录,高表达的c-myc使表达PX的细胞对许多凋亡信号敏感,尤其是TNF- α 介导的凋亡信号。在没有TNF- α 存在的情况下,HBV X基因与c-myc共转染细胞,

就足以引起细胞凋亡,而同时加入TNF- α 后,细胞的凋亡率升高了7-10倍。此外,HBV X基因与c-myc协同作用还可拮抗NF- κ B的凋亡抑制作用^[42,59-61]。目前对于PX和P53基因关系的研究比较多。P53是一种抑癌基因,他参与基因的转录、DNA的合成与修复以及细胞凋亡等过程。他与细胞的转化和肿瘤的发生关系密切,其功能的正常发挥对维持基因稳定性、阻断异常细胞的生长、诱导凋亡起重要作用。PX通过c-myc与P53上游启动子结合,抑制P53的转录;直接抑制P53基因介导的功能,例如抑制P53基因介导的凋亡等^[30,60]。Choi *et al*^[61]将X基因转入HepG₂细胞中,发现pRB的肿瘤抑制作用削弱了,因此X基因可能干扰pRB的抑癌作用。

4 X基因及其产物与线粒体

线粒体是特殊的细胞器,氧化磷酸化等重要的细胞能量代谢都在线粒体内进行,是细胞能量产生的主要场所,此外,线粒体还参与细胞的凋亡信号转导,被认为是细胞凋亡的枢纽环节。最新的研究发现,PX可以定位在线粒体上,PX与线粒体的关系正逐渐成为目前研究的热点。有报道,PX的高表达导致PX线粒体的异常分布,如成块聚集等,但低水平表达时则此种现象缺如。另有学者观察到,PX在细胞质内的水平高于细胞核,且细胞质中的PX主要分布于线粒体外膜上^[8]。PX与线粒体结合的区域已经被定位在68-177位点氨基酸,这一区域是细胞凋亡必须的,但是对反式激活作用并不是必须的。Huh *et al*^[62]报道PX与线粒体结合的区域位于54-70位点氨基酸,而PX α -螺旋区的75-88位点和109-131位点氨基酸对蛋白定位于线粒体则起辅助作用。这与Boya *et al*^[63]的报道一致。PX和线粒体结合后,并不直接引起细胞色素C(cyt C)和AIF重分布,但线粒体跨膜电压却降低了,提示PX可能干扰了PTP的功能。Bcl-XL能通过稳定线粒体膜抑制PX的作用,进一步证实了PX能作用在PTP,降低线粒体跨膜电压。因此线粒体功能失调是X基因致癌的重要机制之一^[64]。PX能下调线粒体中参与氧化磷酸化反应离子转运相关酶的活性,增加线粒体ROS水平和脂质过氧化氢产物,通过氧化损伤对细胞造成直接损伤,ROS清除剂能抑制PX的作用^[65]。PX还可以和VDAC₃结合,引起线粒体跨膜电压的下降,激活包括STAT-3和NF- κ B在内的转录因子。这一过程对抗氧化物敏感,可能与PX能促进ROS的生成有关^[24,65-66]。Wang *et al*^[67]通过酵母双杂交系统

对成人正常肝细胞cDNA文库进行筛选, 发现了新的PX相关蛋白细胞色素c氧化酶III(COXIII), 并在离体结合试验及免疫共沉淀试验中验证了两者的特异性结合. COXIII复合体(复合体IV)是最具特征的呼吸链酶复合体, 由13个亚基组成, 其中较大的亚基COX I, COX II, COXIII由线粒体DNA(mtDNA)编码, 其余部分由细胞核DNA(nDNA)编码. COXIII在复合酶的聚集和稳定性中起重要作用, 并参与质子的传递和COX III介导的能量转换^[68]. PX与COXIII的作用尚未阐明, 可能通过干扰线粒体能量代谢, 诱发细胞氧化损伤. Zhang *et al*^[69]通过GST和免疫共沉淀系统发现, PX能与线粒体的HSP60和HSP70结合, 但X蛋白与二者间关系的研究尚未见报道.

总之, PX是一种多功能蛋白, 通过反式激活作用参与调节病毒复制; 与宿主细胞内的转录因子直接结合, 或通过信号转导途径激活细胞转录因子, 对宿主细胞基因转录进行调控, 激活细胞癌基因, 或抑制抑癌基因的表达和功能, 促使细胞表达各种与侵袭性有关的基因, 增加细胞侵袭能力, 或上调化疗药物的基因表达, 使细胞对化疗药物耐受; 打乱正常细胞周期, 干扰DNA受损细胞的修复, 造成遗传物质的不稳定性; 打破正常的细胞凋亡与增殖的平衡, 一方面促进细胞DNA合成, 增殖能力增强, 另一方面促进细胞凋亡, 刺激再生反应, 有利于病毒颗粒自凋亡细胞中释放并继续干扰其他细胞, 促进炎症发展, 凋亡效应还可增加突变机率, 使肝细胞生长失去抑制, 最终导致HCC的发生; 与线粒体外膜蛋白作用, 增加外膜通透性, 降低跨膜电压, 干扰线粒体氧化磷酸化等能量代谢过程, 造成细胞氧化损伤, 促进细胞凋亡. 在HBV感染和HCC发展的不同阶段, PX执行不同的生物学功能, 这主要取决于细胞的不同状态.

鉴于HBV感染是一个多步骤、多环节的慢性过程, 因此在早期阻断PX的细胞毒性作用对于防止病毒感染播散、减缓肝细胞的恶变和肿瘤的发生尤为重要. 基因治疗正逐渐成为抗HBV治疗的新方法. PX作为HBV基因治疗理想的靶蛋白, 可通过PX特异性干扰RNA来降低病毒的RNA和蛋白水平, 阻止或降低病毒复制, 或通过阻止、缓解PX对细胞的毒性作用, 达到治疗目的^[70].

5 参考文献

- 1 Zhang Z, Protzer U, Hu Z, Jacob J, Liang TJ. Inhibition of cellular proteasome activities enhances hepadnavirus replication in an HBX-dependent

- 2 Bouchard MJ, Puro RJ, Wang L, Schneider RJ. Activation and inhibition of cellular calcium and tyrosine kinase signaling pathways identify targets of the HBx protein involved in hepatitis B virus replication. *J Virol* 2004; 78: 4566-4572
- 3 Tang H, Delgermaa L, Huang F, Oishi N, Liu L, He F, Zhao L, Murakami S. The transcriptional transactivation function of HBx protein is important for its augmentation role in hepatitis B virus replication. *J Virol* 2005; 79: 5548-5556
- 4 Hu Z, Zhang Z, Kim JW, Huang Y, Liang TJ. Altered proteolysis and global gene expression in hepatitis B virus X transgenic mouse liver. *J Virol* 2006; 80: 1405-1413
- 5 Leupin O, Bontron S, Schaeffer C, Strubin M. Hepatitis B virus X protein stimulates viral genome replication via a DDB1-dependent pathway distinct from that leading to cell death. *J Virol* 2005; 79: 4238-4245
- 6 Melegari M, Wolf SK, Schneider RJ. Hepatitis B virus DNA replication is coordinated by core protein serine phosphorylation and HBx expression. *J Virol* 2005; 79: 9810-9820
- 7 Zhang JL, Zhao WG, Wu KL, Wang K, Zhang X, Gu CF, Li Y, Zhu Y, Wu JG. Human hepatitis B virus X protein promotes cell proliferation and inhibits cell apoptosis through interacting with a serine protease Hepsin. *Arch Virol* 2005; 150: 721-741
- 8 Henkler F, Hoare J, Waseem N, Goldin RD, McGarvey MJ, Koshy R, King IA. Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein. *J Gen Virol* 2001; 82: 871-882
- 9 Le TT, Zhang S, Hayashi N, Yasukawa M, Delgermaa L, Murakami S. Mutational analysis of human RNA polymerase II subunit 5 (RPB5): the residues critical for interactions with TFIIF subunit RAP30 and hepatitis B virus X protein. *J Biochem (Tokyo)* 2005; 138: 215-224
- 10 Yang Y, Ma Y, Zhen L, Chen Y, Ma W, Murakami S. HBV X protein (HBX) interacts with general transcription factor TFIIB both *in vitro* and *in vivo*. *Chin Med Sci J* 1999; 14: 152-157
- 11 Jaitovich-Groisman I, Benlimame N, Slagle BL, Perez MH, Alpert L, Song DJ, Fotouhi-Ardakani N, Galipeau J, Alaoui-Jamali MA. Transcriptional regulation of the TFIIF transcription repair components XPB and XPD by the hepatitis B virus x protein in liver cells and transgenic liver tissue. *J Biol Chem* 2001; 276: 14124-14132
- 12 Qadri I, Maguire HF, Siddiqui A. Hepatitis B virus transactivator protein X interacts with the TATA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 93: 1003-1007
- 13 Nijhara R, Jana SS, Goswami SK, Rana A, Majumdar SS, Kumar V, Sarkar DP. Sustained activation of mitogen-activated protein kinases and activator protein 1 by the hepatitis B virus X protein in mouse hepatocytes *in vivo*. *J Virol* 2001; 75: 10348-10358
- 14 Guan J, Chen XP, Zhu H, Luo SF, Cao B, Ding L. Involvement of extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway in multidrug resistance induced by HBx in hepatoma cell line. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3522-3527
- 15 Bouchard MJ, Wang L, Schneider RJ. Activation of focal adhesion kinase by hepatitis B virus HBx protein: multiple functions in viral replication. *J*

■名词解释

1 X基因: HBV X基因是HBV病毒基因组中最小的开放性读码框, 位于HBV基因组的1374-1838 bp处, 全长435-462 bp, 编码长度为154个氨基酸的蛋白. PX不直接作用于双链DNA, 而是通过和细胞内的多种蛋白相互作用来调节细胞生物学功能. PX作为多功能蛋白, 广泛参与病毒的复制、宿主细胞的基因调控和表达、蛋白质降解及细胞信号转导等过程、并可通过影响正常的细胞周期, 干扰DNA的修复及调节肝细胞增殖、分化和凋亡, 在HBV感染及HCC发生、发展中起关键作用.

2 反式激活作用: 真核细胞中与结构基因表达调控相关, 能够被基因调控蛋白特异性识别和结合的DNA序列称为顺式作用元件. 包括启动子、上游启动子元件、增强子、加尾信号和一些反应元件等. 反式作用因子是指真核细胞内含有大量可以通过直接或间接结合顺式作用元件而调节基因转录活性的蛋白质因子. 反式作用因子通过顺式调控元件对基因所起的调控作用称为反式激活作用.

- Virol* 2006; 80: 4406-4414
- 16 Klein NP, Schneider RJ. Activation of Src family kinases by hepatitis B virus HBx protein and coupled signaling to Ras. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 6427-6436
 - 17 Benn J, Su F, Doria M, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein induces transcription factor AP-1 by activation of extracellular signal-regulated and c-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinases. *J Virol* 1996; 70: 4978-4985
 - 18 Su F, Theodosios CN, Schneider RJ. Role of NF-kappaB and myc proteins in apoptosis induced by hepatitis B virus HBx protein. *J Virol* 2001; 75: 215-225
 - 19 Lee SH, Park SG, Lim SO, Jung G. The hepatitis B virus X protein up-regulates lymphotoxin alpha expression in hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1741: 75-84
 - 20 Chung TW, Lee YC, Kim CH. Hepatitis B viral HBx induces matrix metalloproteinase-9 gene expression through activation of ERK and PI-3K/AKT pathways: involvement of invasive potential. *FASEB J* 2004; 18: 1123-1125
 - 21 Chan CF, Yau TO, Jin DY, Wong CM, Fan ST, Ng IO. Evaluation of nuclear factor-kappaB, urokinase-type plasminogen activator, and HBx and their clinicopathological significance in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4140-4149
 - 22 Yun C, Cho H, Kim SJ, Lee JH, Park SY, Chan GK, Cho H. Mitotic aberration coupled with centrosome amplification is induced by hepatitis B virus X oncoprotein via the Ras-mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein pathway. *Mol Cancer Res* 2004; 2: 159-169
 - 23 Shih WL, Kuo ML, Chuang SE, Cheng AL, Doong SL. Hepatitis B virus X protein inhibits transforming growth factor-beta -induced apoptosis through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 2000; 275: 25858-25864
 - 24 Waris G, Huh KW, Siddiqui A. Mitochondrially associated hepatitis B virus X protein constitutively activates transcription factors STAT-3 and NF-kappa B via oxidative stress. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 7721-7730
 - 25 Lee YH, Yun Y. HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signaling. *J Biol Chem* 1998; 273: 25510-25515
 - 26 Oh JC, Jeong DL, Kim IK, Oh SH. Activation of calcium signaling by hepatitis B virus-X protein in liver cells. *Exp Mol Med* 2003; 35: 301-309
 - 27 Kim H, Lee H, Yun Y. X-gene product of hepatitis B virus induces apoptosis in liver cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 381-385
 - 28 Li DH, Chen XP, Zhang WG, Qiu FZ. HBx gene facilitates the proliferation activity of hepatoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Zhonghua WaiKe ZaZhi* 2004; 42: 104-106
 - 29 Yun C, Um HR, Jin YH, Wang JH, Lee MO, Park S, Lee JH, Cho H. NF-kappaB activation by hepatitis B virus X (HBx) protein shifts the cellular fate toward survival. *Cancer Lett* 2002; 184: 97-104
 - 30 Huo TI, Wang XW, Forgues M, Wu CG, Spillare EA, Giannini C, Brechot C, Harris CC. Hepatitis B virus X mutants derived from human hepatocellular carcinoma retain the ability to abrogate p53-induced apoptosis. *Oncogene* 2001; 20: 3620-3628
 - 31 Chen GG, Lai PB, Chan PK, Chak EC, Yip JH, Ho RL, Leung BC, Lau WY. Decreased expression of Bid in human hepatocellular carcinoma is related to hepatitis B virus X protein. *Eur J Cancer* 2001; 37: 1695-1702
 - 32 Terradillos O, de La Coste A, Pollicino T, Neuveut C, Sitterlin D, Lecoeur H, Gougeon ML, Kahn A, Buendia MA. The hepatitis B virus X protein abrogates Bcl-2-mediated protection against Fas apoptosis in the liver. *Oncogene* 2002; 21: 377-386
 - 33 Gottlob K, Fulco M, Leverero M, Graessmann A. The hepatitis B virus HBx protein inhibits caspase 3 activity. *J Biol Chem* 1998; 273: 33347-33353
 - 34 Song CZ, Bai ZL, Song CC, Wang QW. Aggregate formation of hepatitis B virus X protein affects cell cycle and apoptosis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1521-1524
 - 35 Chen HY, Tang NH, Zhang SJ, Chen ZX, Wang XZ. Construction of hepatitis B virus X gene expression vector in eucaryotic cells and its transfection in HL-7702 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004; 12: 614-617
 - 36 Wang H, Chen X, Bai X. Hepatic cell apoptosis was triggered by HBx accumulation and independent on verapamil. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 2004; 24: 281-283
 - 37 Tralhao JG, Roudier J, Morosan S, Giannini C, Tu H, Goulencok C, Carnot F, Zavala F, Joulin V, Kremsdorf D, Brechot C. Paracrine *in vivo* inhibitory effects of hepatitis B virus X protein (HBx) on liver cell proliferation: an alternative mechanism of HBx-related pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 6991-6996
 - 38 Yoo YG, Lee MO. Hepatitis B virus X protein induces expression of Fas ligand gene through enhancing transcriptional activity of early growth response factor. *J Biol Chem* 2004; 279: 36242-9
 - 39 Lee MO, Choi YH, Shin EC, Kang HJ, Kim YM, Jeong SY, Seong JK, Yu DY, Cho H, Park JH, Kim SJ. Hepatitis B virus X protein induced expression of interleukin 18 (IL-18): a potential mechanism for liver injury caused by hepatitis B virus (HBV) infection. *J Hepatol* 2002; 37: 380-386
 - 40 Korkolopoulou P, Goudopoulou A, Voutsinas G, Thomas-Tsagli E, Kapralos P, Patsouris E, Saetta AA. c-FLIP expression in bladder urothelial carcinomas: its role in resistance to Fas-mediated apoptosis and clinicopathologic correlations. *Urology* 2004; 63: 1198-1204
 - 41 Kim KH, Seong BL. Pro-apoptotic function of HBV X protein is mediated by interaction with c-FLIP and enhancement of death-inducing signal. *EMBO J* 2003; 22: 2104-2116
 - 42 Su F, Theodosios CN, Schneider RJ. Role of NF-kappaB and myc proteins in apoptosis induced by hepatitis B virus HBx protein. *J Virol* 2001; 75: 215-225
 - 43 Kalra N, Kumar V. c-Fos is a mediator of the c-myc-induced apoptotic signaling in serum-deprived hepatoma cells via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 2004; 279: 25313-25319
 - 44 Bontron S, Lin-Marq N, Strubin M. Hepatitis B virus X protein associated with UV-DDB1 induces cell death in the nucleus and is functionally antagonized by UV-DDB2. *J Biol Chem* 2002; 277: 38847-38854
 - 45 Zhang X, Dong N, Yin L, Cai N, Ma H, You J, Zhang H, Wang H, He R, Ye L. Hepatitis B virus X protein upregulates survivin expression in

- hepatoma tissues. *J Med Virol* 2005; 77: 374-381
- 46 Bouillet P, Strasser A. BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* 2002; 115: 1567-1574
- 47 Lakhtakia R, Kumar V, Reddi H, Mathur M, Dattagupta S, Panda SK. Hepatocellular carcinoma in a hepatitis B 'x' transgenic mouse model: A sequential pathological evaluation. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 80-91
- 48 Hung L, Kumar V. Specific inhibition of gene expression and transactivation functions of hepatitis B virus X protein and c-myc by small interfering RNAs. *FEBS Lett* 2004; 560: 210-214
- 49 Reed JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 1998; 17: 3225-3236
- 50 Lin N, Chen HY, Li D, Zhang SJ, Cheng ZX, Wang XZ. Apoptosis and its pathway in X gene-transfected HepG₂ cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4326-4331
- 51 Wu BK, Li CC, Chen HJ, Chang JL, Jeng KS, Chou CK, Hsu MT, Tsai TF. Blocking of G1/S transition and cell death in the regenerating liver of Hepatitis B virus X protein transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 340: 916-928
- 52 Kwun HJ, Jang KL. Natural variants of hepatitis B virus X protein have differential effects on the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 2202-2213
- 53 Peng Z, Zhang Y, Gu W, Wang Z, Li D, Zhang F, Qiu G, Xie K. Integration of the hepatitis B virus X fragment in hepatocellular carcinoma and its effects on the expression of multiple molecules: a key to the cell cycle and apoptosis. *Int J Oncol* 2005; 26: 467-473
- 54 Klein A, Guhl E, Tzeng YJ, Fuhrhop J, Levrero M, Graessmann M, Graessmann A. HBX causes cyclin D1 overexpression and development of breast cancer in transgenic animals that are heterozygous for p53. *Oncogene* 2003; 22: 2910-2919
- 55 Lin J, Zhu MH, Zhu S, Qu JH, Li FM, Ni CR. The role of hepatitis B virus X gene and p53 on hepatocellular carcinoma cell growth. *Zhonghua BingLiXue ZaZhi* 2003; 32: 43-47
- 56 Ou DP, Tao YM, Chang ZG, Tang FQ, Yang LY. Hepatocellular carcinoma cells containing hepatitis B virus X protein have enhanced invasive potential conditionally. *Dig Liver Dis* 2006; 38: 262-267
- 57 Terradillos O, Pollicino T, Lecoeur H, Tripodi M, Gougeon ML, Tiollais P, Buendia MA. p53-independent apoptotic effects of the hepatitis B virus HBx protein *in vivo* and *in vitro*. *Oncogene* 1998; 17: 2115-2123
- 58 Rabe C, Cheng B, Caselmann WH. Molecular mechanisms of hepatitis B virus-associated liver cancer. *Dig Dis* 2001; 19: 279-287
- 59 Schuster R, Gerlich WH, Schaefer S. Induction of apoptosis by the transactivating domains of the hepatitis B virus X gene leads to suppression of oncogenic transformation of primary rat embryo fibroblasts. *Oncogene* 2000; 19: 1173-1180
- 60 Lee SG, Rho HM. Transcriptional repression of the human p53 gene by hepatitis B viral X protein. *Oncogene* 2000; 19: 468-471
- 61 Choi BH, Choi M, Jeon HY, Rho HM. Hepatitis B viral X protein overcomes inhibition of E2F1 activity by pRb on the human Rb gene promoter. *DNA Cell Biol* 2001; 20: 75-80
- 62 Huh KW, Siddiqui A. Characterization of the mitochondrial association of hepatitis B virus X protein, HBx. *Mitochondrion* 2002; 1: 349-359
- 63 Boya P, Pauleau AL, Poncet D, Gonzalez-Polo RA, Zamzami N, Kroemer G. Viral proteins targeting mitochondria: controlling cell death. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1659: 178-189
- 64 Shirakata Y, Koike K. Hepatitis B virus X protein induces cell death by causing loss of mitochondrial membrane potential. *J Biol Chem* 2003; 278: 22071-22078
- 65 Lee YI, Hwang JM, Im JH, Lee YI, Kim NS, Kim DG, Yu DY, Moon HB, Park SK. Human hepatitis B virus-X protein alters mitochondrial function and physiology in human liver cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 15460-15471
- 66 Rahmani Z, Huh KW, Lasher R, Siddiqui A. Hepatitis B virus X protein colocalizes to mitochondria with a human voltage-dependent anion channel, HVDAC3, and alters its transmembrane potential. *J Virol* 2000; 74: 2840-2846
- 67 Wang XZ, Li D, Tao QM, Lin N, Chen ZX. A novel hepatitis B virus X-interactive protein: cytochrome C oxidase III. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 711-715
- 68 You KR, Wen J, Lee ST, Kim DG. Cytochrome c oxidase subunit III: a molecular marker for N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced oxidative stress in hepatoma cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 3870-3877
- 69 Zhang SM, Sun DC, Lou S, Bo XC, Lu Z, Qian XH, Wang SQ. HBx protein of hepatitis B virus (HBV) can form complex with mitochondrial HSP60 and HSP70. *Arch Virol* 2005; 150: 1579-1590
- 70 Shin D, Kim SI, Kim M, Park M. Efficient inhibition of hepatitis B virus replication by small interfering RNAs targeted to the viral X gene in mice. *Virus Res* 2006; 119: 146-153

电编 李琪 编辑 潘伯荣

热水致大鼠慢性萎缩性胃炎胃黏膜组织细胞HSP-70及Fas蛋白表达

张玲霞, 张沥, 陶梅, 王春梅, 陈丹, 宋瑛, 江梅, 曹广周

■背景资料

慢性萎缩性胃炎属于胃癌前状态, 他是胃癌发生的重要环节。如何预防萎缩性胃炎的发生、防止萎缩性胃炎向胃癌转变, 已成为胃癌防治工作中的一项重要内容。本研究采用热水灌胃制成大鼠萎缩性胃炎的动物模型, 证实食用过热饮食会造成胃黏膜损伤形成萎缩性胃炎, 从而引起国人对于不良饮食习惯导致胃部疾病的重视并探讨建立科学合理的饮食方式。

张玲霞, 张沥, 陶梅, 宋瑛, 江梅, 曹广周, 西安市中心医院消化科 陕西省西安市 710003

王春梅, 陈丹, 第四军医大学电子显微镜室 陕西省西安市 710033

张玲霞, 1986年西安医科大学本科毕业, 主任医师, 主要从事消化系统疾病的基础与临床研究工作。

西安市科技局科研基金资助项目, No. GG-05127

通讯作者: 张玲霞, 710003, 西安市西五路161号, 西安市中心医院消化科。lingxia63@163.com

电话: 029-87268355-3061

收稿日期: 2006-05-20 接受日期: 2006-07-10

Expression of HSP-70 and Fas protein in gastric mucosa with chronic atrophic gastritis induced by hot water in rats

Ling-Xia Zhang, Li Zhang, Mei Tao, Chun-Mei Wang, Dan Chen, Ying Song, Mei Jiang, Guang-Zhou Cao

Ling-Xia Zhang, Li Zhang, Mei Tao, Ying Song, Mei Jiang, Guang-Zhou Cao, Department of Gastroenterology, Xi'an Municipal Central Hospital, Xi'an 710003, Shaanxi Province, China

Chun-Mei Wang, Dan Chen, Center of Electron Microscopy, the Forth Military Medical University, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China

Supported by the Fund from Xi'an Science and Technology Bureau, No. GG-05127

Correspondence to: Ling-Xia Zhang, Department of Gastroenterology, Xi'an Municipal Central Hospital, 161 Xiwu Road, Xi'an 710003, Shaanxi Province, China. lingxia63@163.com

Received: 2006-05-20 Accepted: 2006-07-10

Abstract

AIM: To observe the expression of HSP-70 and Fas in gastric mucosa with chronic atrophic gastritis induced by hot water perfusion in rats and study the relationship between the pathogenesis of chronic atrophic gastritis and hot high-salt diet.

METHODS: The rat model of atrophic gastritis was constructed by hot water perfusion (55°C, 2.5 mL each time, once a day for 8-65 wk). The expression of HSP-70 and Fas in gastric mucosa were detected by immunofluorescence method and laser scanning confocal microscopy.

RESULTS: There was no expression of HSP-70

and Fas protein in normal gastric mucosa. After hot water perfusion for 24 wk, HSP-70 and Fas protein were expressed in the cytoplasm, exhibiting as granules. After 32-65 wk, the expression of HSP-70 and Fas proteins were more clearly, and both of them were detected by double marker assay.

CONCLUSION: Long time perfusion with hot water may lead to atrophy of gastric mucosa and increase expression of HSP-70 and Fas proteins.

Key Words: Hot water; Gastric mucosa; HSP; Fas; Immunofluorescence; Laser scan focus microscope

Zhang LX, Zhang L, Tao M, Wang CM, Chen D, Song Y, Jiang M, Cao GZ. Expression of HSP-70 and Fas protein in gastric mucosa with chronic atrophic gastritis induced by hot water in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(26):2586-2589

摘要

目的: 研究热水灌胃导致的大鼠萎缩性胃炎(CAG)时胃黏膜组织细胞HSP-70及Fas表达状态, 以探讨CAG发病机制及长期热饮食与慢性萎缩性胃炎发生的关系。

方法: 采用热水(55°C, 2.5 mL, 1次/d × 8-65 wk)灌胃建立大鼠萎缩性胃炎动物模型, 免疫荧光及激光扫描共聚焦显微镜技术检测热水组和正常组大鼠胃黏膜组织细胞HSP-70和Fas蛋白的表达情况。

结果: 正常组胃黏膜组织细胞未见HSP-70及Fas阳性表达, 热水组在24 wk胃黏膜在组织细胞的细胞质中可见HSP和Fas阳性表达, 呈均质颗粒状, 到32-65 wk时表达更加明显。双标记中可见两者共同表达。

结论: 热水长期灌胃可导致胃黏膜萎缩, 黏膜组织细胞的HSP及Fas表达增加。

关键词: 热水; 胃黏膜; HSP; Fas; 免疫荧光; 激光扫描共聚焦显微镜

张玲霞, 张沥, 陶梅, 王春梅, 陈丹, 宋瑛, 江梅, 曹广周. 热水致大鼠慢性萎缩性胃炎胃黏膜组织细胞HSP-70及Fas蛋白表达. 世界华人消化杂志 2006;14(26):2586-2589
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2586.asp>

0 引言

细胞凋亡是细胞死亡中的一种与众不同的死亡形式,发生于各种生理和病理条件下. Fas作为一种细胞膜抗原,主要功能是介导细胞凋亡,具有抵抗Bcl-2蛋白抑制细胞凋亡的作用. 热休克蛋白(HSP)与细胞的转化和恶变过程密切相关,癌基因转化的细胞和人类恶性肿瘤细胞系中, HSP表达增高^[1-3]. HSP通过调控细胞周期所必需的蛋白构象参与细胞的增殖和死亡过程. 我们利用激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)的高分辨性及同屏显示不同发射波长荧光色的特性,从形态学方面显示上述两种蛋白在大鼠萎缩性胃炎胃黏膜组织细胞中的共同表达.

1 材料和方法

1.1 材料 健康、性成熟的7 wk ♂ SD大鼠64只(由第四军医动物实验中心提供),体质量200-250 g,按随机化原则分为3组,即正常喂养组、正常对照组和热水组. 每组各20只. 采用架式笼养,恒温 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$,湿度50%-60%. 正常喂养组为正常喂养,饮白开水;正常对照组为 25°C 白开水灌胃,每次2.5 mL,1次/d;热水组为 55°C 蒸馏水灌胃,每次2.5 mL,1次/d. 实验开始,先处死正常组大鼠4只,并留取胃大体标本作为对照. 以后各组分别于4, 8, 12, 24, 32, 65 wk各随机取4只,以观察黏膜萎缩情况^[4-5].

1.2 方法 100 g/L戊巴比妥钠5 mL/kg麻醉,取出鼠胃,沿大鼠胃小弯条状取材,包括胃窦及部分胃体,做组织切片. 胃黏膜组织HSP和Fas蛋白表达采用激光共聚焦免疫荧光双标方法. 所需仪器(荧光显微镜、恒温箱、荧光分光光度仪、电镜、共焦镜等)由第四军医大学提供,免疫荧光双标记检测试剂盒由武汉博士德公司提供. (1)将组织切片在二甲苯中浸3次,每次10 min;脱蜡后切片依次浸入梯度乙醇中脱二甲苯,至蒸馏水中浸5 min,0.01 mol/L的PBS振洗3次,每次5 min;正常山羊血清封闭, 37°C , 30 min; (2)分别滴加50 μL 的1:1混合的兔抗大鼠Fas (1:100)和小鼠抗大鼠HSP70 (1:200),设空白对照(无一抗,加PBS)和抗体特异性对照(加一抗不加二

抗,加二抗不加一抗),所有切片同时染色. 切片一抗加入后,置于湿盒内, 4°C , 过夜; (3)取出后 37°C 复温60 min, 0.01 mol/L的PBS振洗3次,每次5 min;免疫荧光双标记分别滴加50 μL 的1:1混合的FITC标记的羊抗小鼠IgG和罗丹明标记羊抗兔IgG, 37°C , 40 min; 0.01 mol/L的PBS振洗3次,每次5 min; 100 mL/L的缓冲甘油封片; (4)所用LSCM的型号为MRC-1024, 装有Zeiss 100显微镜,用于FITC的激发波长为488 nm, 568 nm用于激发Texas Red, 用于图像采集的显微镜物镜为Plan-Neofluar 40 \times 油浸镜,数值孔径(NA)为1.3,图像存为512 \times 512像素类型,焦距值设为1.0,若需要更大的放大倍数时,可以选择更大的焦距值范围,扫描所用的激光值依据样本不同可以在共聚焦系统提供的梯值中选择.

2 结果

正常对照组于灌胃4, 8, 12, 32 wk时黏膜表面光滑,无糜烂,固有层无炎细胞浸润,黏膜下层无水肿,肌层无炎细胞浸润. 正常对照组于灌胃65 wk时可见黏膜肌层平滑肌轻度增生,呈钉突状向黏膜肌层插入,黏膜出现轻度萎缩改变. 热水组于热水灌胃后第24周大鼠胃黏膜出现腺体明显缩小,黏膜肌层的平滑肌呈束状增生插入黏膜固有层中. 腺体上1/3至2/3腺上皮萎缩,腺管腔增宽,胃小凹颈部黏膜宽度变窄,第32周时大鼠胃黏膜萎缩更加明显(图1). LSCM观察显示,正常组胃黏膜组织细胞未见阳性表达,热水组第24 wk,在细胞质中可见HSP和Fas表达,呈均质颗粒状;到24, 32及65 wk时表达更加明显. 双标记中可见HSP和Fas共同表达(图2).

3 讨论

萎缩性胃炎确切的病因尚未完全阐明,已有的有关萎缩性胃炎病因和发病机制的研究资料多来自流行病学调查资料. 目前认为,萎缩性胃炎的发生与*H pylori*感染有关,其他如酗酒、十二指肠胃反流、长期服用非甾体类消炎镇痛药、吸烟、精神因素、重盐饮食及免疫因素等亦有关. 由于萎缩性胃炎病因的复杂性及其与胃癌的相关性,建立一种萎缩性胃炎的动物模型,对其病因及发病机制进行研究具有重要的意义. 目前,国内外制备萎缩性胃炎动物模型的方法较少,主要有3种: (1)生物制模法,即以*H pylori*感染动物; (2)多种各类理化因子同时反复损伤胃黏膜形成慢性炎症的模型; (3)免疫因素制模

■应用要点

通过免疫荧光染色及激光扫描共聚焦显微镜的高分辨性及同屏显示不同发射波长荧光色的特性,对胃黏膜上皮组织细胞HSP和Fas等蛋白进行了双标记表达,为细胞和组织内部超微结构的研究提供了新的技术和方法.

■同行评价

在萎缩性胃炎形成过程中,细胞凋亡及其调控基因起着极其重要的作用,本文通过热水灌胃后经激光扫描共聚焦显微镜检测到大鼠胃黏膜上皮组织细胞HSP和Fas表达增高,参与了细胞的增殖和凋亡过程,对于临床具有一定参考价值。

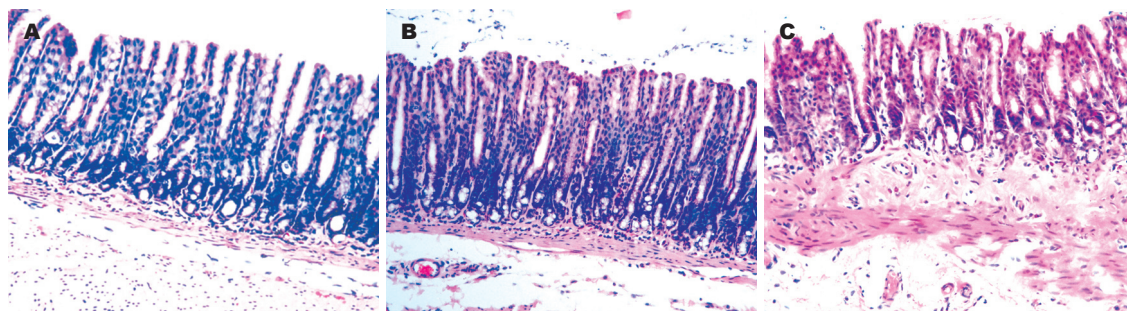


图1 大鼠胃黏膜病理变化($\times 200$). A: 正常对照组; B: 正常对照组65 wk; C: 热水组24 wk.

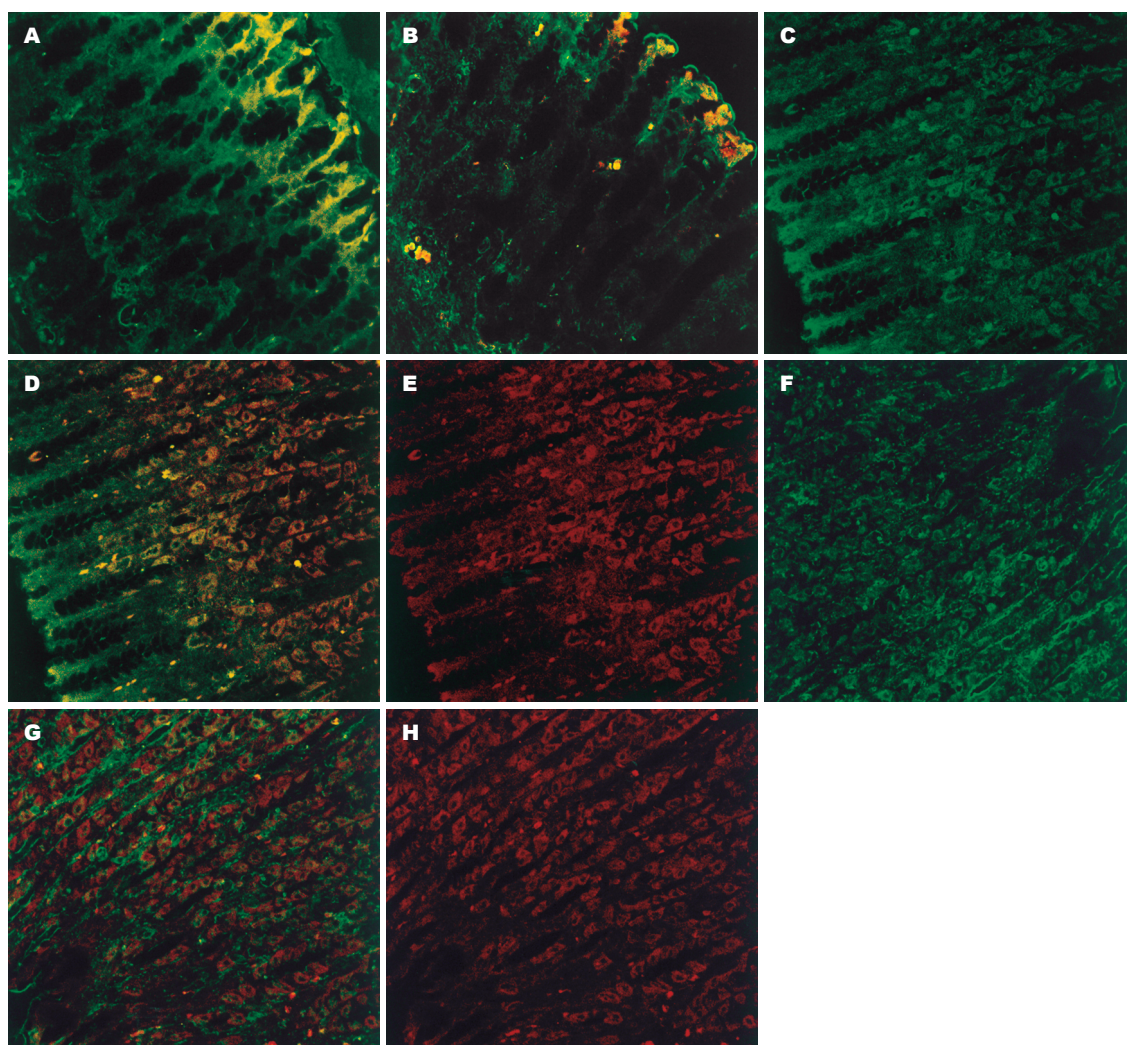


图2 大鼠胃黏膜HSP-70和Fas表达. A: 正常组(24 wk); B: 正常组(65 wk); C: 热水组, HSP-70单标(24 wk); D: 热水组, HSP-70和Fas双标(24 wk); E: 热水组, Fas单标(24 wk); F: 热水组, HSP-70单标(65 wk); G: 热水组, HSP-70和Fas双标(65 wk); H: 热水组, Fas单标(65 wk).

法,形成自体免疫性胃炎模型。仅有的制造萎缩性胃炎动物模型的研究方法多为多因素造模,造模方法复杂、或造模因素较多,或造模时间较长,使模型推广、应用受到限制。本研究采用与人类饮食结构密切相关的因素——温度,制备大鼠萎缩性胃炎动物模型,与国内外其他模

型相比,造模因素的选择更贴近人类饮食习惯,具有造模因素单一、造模时间短、造模方法简单(单纯热水)、造模成功率高、重复性好、病理结果可靠等优点。对于温度与萎缩性胃炎关系的研究提供了可靠的实验方法。

我国最新的一项流行病学调查研究显示,

热、烫饮食是上海市居民胃癌发生的重要危险因素^[6], 长期热、烫饮食可以导致慢性萎缩性胃炎. 研究表明, 慢性萎缩性胃炎与胃癌发生密切相关, 其被列为胃癌前状态^[7]. 在萎缩性胃炎形成过程中, 细胞凋亡及其调控基因起着极其重要的作用. Fas是细胞表面可以传递死亡信号的受体, 其作为一种细胞膜抗原, 主要功能是介导细胞凋亡, 具有抵抗Bcl-2蛋白抑制细胞凋亡的作用^[8-9]. 我们发现, 随着热水灌胃时间延长, 胃黏膜逐渐出现萎缩, 黏膜组织中Fas蛋白表达亦呈逐渐增加趋势, 提示在热盐水灌胃导致胃黏膜组织细胞病变的早期阶段Fas蛋白表达较高^[9]. HSP通过细胞信号转导、细胞周期调控、DNA损伤修复等多途径参与细胞生长繁殖. HSP与细胞的转化和恶变过程密切相关, 癌基因转化的细胞和人类恶性肿瘤细胞系中, HSP表达增高^[1-3], HSP通过调控细胞周期所必需的蛋白构象参与细胞的增殖和死亡过程. 我们发现, 随着热水灌胃时间延长, 胃黏膜组织细胞中HSP-70表达水平逐渐升高, 与正常对照组相比具有非常显著的差异, 其在胃黏膜组织细胞中的高表达可能起着与多种癌基因产物结合形成异源蛋白复合体, 介导癌蛋白构象成熟及转运, 从而参与细胞转化过程的作用.

采用LSCM检测技术对胃黏膜上皮组织细胞HSP和Fas等蛋白进行了双标记表达, 利用计

算机控制及图像处理技术, 实现图像的优化、三维重建和时空的程序控制, 从而得到了细胞内部超微结构的荧光图像, 其分辨率比以往光学成像的分辨率高出30%-40%, 灵敏度高, 为细胞和组织内部超微结构的研究提供了新的技术和方法.

4 参考文献

- 1 郭建成, 张学庸, 杨云生, 叶苓, 李继昌, 樊代明. 热休克蛋白70在人胃癌中呈过度表达. 癌症 1999; 18: 45-46
- 2 程书榜, 洪建琴, 王元和. 胃癌癌变过程中热休克蛋白70、p53蛋白的表达及其意义. 实用癌症杂志 2000; 15: 241-242
- 3 乔绘红, 赵玫, 袁兴华, 施一江, 周纯, 范云霞, 黄常志. 热休克蛋白90 α 的表达及其对体内肿瘤生长的影响. 中华肿瘤杂志 1999; 21: 19-21
- 4 张沥, 张玲霞, 徐俊荣, 曹广周, 江梅, 张宁霞, 贾长河. 热盐水致大鼠萎缩性胃炎动物模型建立. 世界华人消化杂志 2002; 10: 571-574
- 5 Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 1161-1181
- 6 鲍萍萍, 高立峰, 刘大可, 陶梦华, 金凡. 上海市居民饮食与胃癌关系的病例对照研究. 中国肿瘤 2003; 12: 66-70
- 7 Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 1988; 48: 3554-3560
- 8 张玲霞, 张沥. 细胞凋亡及其调控基因与萎缩性胃炎. 世界华人消化杂志 2002; 10: 581-583
- 9 张沥, 张玲霞, 徐俊荣, 贾长河, 张宁霞, 曹广周. 热盐水致胃黏膜细胞凋亡及对热休克蛋白表达影响. 世界华人消化杂志 2003; 11: 2038-2040

电编 张敏 编辑 潘伯荣

清肝活血方对乙醇性肝纤维化大鼠肝星形细胞和肝细胞凋亡的影响

王磊, 柳涛, 郑培永, 邢练军, 季光

■背景资料

酒精性肝纤维化是酒精性肝硬化的前期, 消除肝纤维化将成功阻断肝硬化的发生。星状细胞(HSC)的活化增殖, 被公认为纤维化发生的关键因素, 而通过诱导其凋亡的方式来消除纤维化, 已成为治疗纤维化的靶点之一。目前现代医学对肝纤维化的治疗尚缺少有效药物, 而中医药的良好疗效已为人所共识, 本文就是以HSC和肝细胞凋亡为对象, 来研究中药在防止酒精性肝病的相关作用机制。

王磊, 柳涛, 邢练军, 季光, 上海中医药大学附属龙华医院脂肪肝研究室 上海市 200032

郑培永, 上海中医药大学附属龙华医院临床评价中心 上海市 200032

王磊, 上海中医药大学硕士, 主要从事中医药防治肝脏疾病的研究。

上海市科委启明星跟踪计划项目, No. 03QMH1410

通讯作者: 季光, 200032, 上海市宛平南路725号, 上海中医药大学附属龙华医院脂肪肝研究室. jiliver@vip.sina.com

收稿日期: 2006-06-21 接受日期: 2006-07-31

Effect of Qinggan Huoxue recipe on apoptosis of hepatic stellate cells and hepatocytes in rats with alcoholic liver fibrosis

Lei Wang, Tao Liu, Pei-Yong Zheng, Lian-Jun Xing, Guang Ji

Lei Wang, Tao Liu, Lian-Jun Xing, Guang Ji, Laboratory of Liver Steatosis, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China
Pei-Yong Zheng, Clinic Evaluation Center, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

Supported by the Rising-Star Program of Shanghai Science Committee, No. 03QMH1410

Correspondence to: Dr. Guang Ji, Laboratory of Liver Steatosis, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China. jiliver@vip.sina.com

Received: 2006-06-21 Accepted: 2006-07-31

Abstract

AIM: To evaluate the influences of Qinggan Huoxue recipe (QHR) on the apoptosis of hepatic stellate cells (HSC) and hepatocytes in alcoholic liver fibrosis rats.

METHODS: Rat model of alcoholic liver fibrosis were established mainly through alcohol, and then the rats were divided into 6 groups: QHR groups [low dose: 4.75 g/(kg·d), moderate dose: 14.25 g/(kg·d), high dose: 28.5 g/(kg·d)] and control groups (normal, model, and Essentiale control). Colorimetry was used to detect the serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate transaminase (AST) and gamma-

glutamyltranspeptidase (γ -GT). The degrees of inflammation and fibrosis were evaluated by HE and Masson stainings. TUNEL and TUNEL- α -SMA methods were used to detect the apoptosis of HSC and hepatocytes, respectively.

RESULTS: As compared with those in model control group, the serum levels of ALT (1213 ± 245 , 1432 ± 253 nkat/L vs 2140 ± 428 nkat/L, both $P < 0.05$), AST (1671 ± 400 , 2123 ± 413 nkat/L vs 4454 ± 850 nkat/L, both $P < 0.05$), and γ -GT (4539 ± 1847 , 5509 ± 2430 nkat/L vs 8271 ± 3304 nkat/L, both $P < 0.05$) were significantly decreased in QHR (high dose) group and Essentiale control group; the apoptosis rates of hepatocytes were reduced ($0.43\% \pm 0.11\%$, $0.60\% \pm 0.16\%$ vs $1.77\% \pm 0.49\%$, both $P < 0.05$) and the apoptosis rates of HSC were increased ($5.25\% \pm 2.48\%$, $3.63\% \pm 2.04\%$ vs $2.30\% \pm 1.24\%$, both $P < 0.05$); the degrees of inflammation and fibrosis were relieved too (5.5 ± 2.50 , 6.30 ± 3.16 vs 9.00 ± 2.27 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: Chinese medicine QHR can relieve alcohol-induced fibrosis, decrease apoptosis of hepatocytes and increase apoptosis of HSC.

Key Words: Qinggan Huoxue recipe; Alcoholic liver fibrosis; Hepatic stellate cell; Apoptosis

Wang L, Liu T, Zheng PY, Xing LJ, Ji G. Effect of Qinggan Huoxue recipe on apoptosis of hepatic stellate cells and hepatocytes in rats with alcoholic liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(26):2590-2595

摘要

目的: 观察酒精性肝纤维化大鼠Hsc和肝细胞的凋亡及中药清肝活血方对细胞凋亡的影响。

方法: 以乙醇为主制备酒精性肝纤维化大鼠模型, 将造模大鼠分为清肝活血方低(4.75 g/kg)、中(14.25 g/kg)和高剂量组(28.5 g/kg), 每日进行ig药物干预2 wk, 并设空白对照组、模型对照组及易善复对照组。比色法检测血清

ALT, AST, γ -GT; HE和Masson染色观察肝组织炎症和纤维化程度. TUNEL检测肝细胞凋亡, TUNEL- α -SMA双标记检测HSC凋亡.

结果: 清肝活血方用药组及易善复组能降低大鼠血清ALT(1213 ± 245 , 1432 ± 253 nkat/L vs 2140 ± 428 nkat/L, P 均 <0.05), AST(1671 ± 400 , 2123 ± 413 vs 4454 ± 850 nkat/L, P 均 <0.05), γ -GT水平(4539 ± 1847 , 5509 ± 2430 vs 8271 ± 3304 nkat/L, P 均 <0.05), 减轻纤维化程度(5.5 ± 2.50 , 6.30 ± 3.16 vs 9.00 ± 2.27 , $P<0.05$); 诱导活化的HSC凋亡($5.25\% \pm 2.48\%$, $3.63\% \pm 2.04\%$ vs $2.30\% \pm 1.24\%$, $P<0.05$), 减少肝细胞凋亡($0.43\% \pm 0.11\%$, $0.60\% \pm 0.16\%$ vs $1.77\% \pm 0.49\%$, $P<0.05$).

结论: 清肝活血方能有效减轻大鼠肝纤维化程度, 并减少乙醇引起的肝细胞凋亡, 诱导活化的HSC凋亡.

关键词: 清肝活血方; 酒精性肝纤维化; 肝星状细胞; 凋亡

王磊, 柳涛, 郑培永, 刑练军, 季光. 清肝活血方对酒精性肝纤维化大鼠肝星形细胞及肝细胞凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(26):2590-2595
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2590.asp>

0 引言

肝星状细胞(HSC)的活化增殖在酒精性肝纤维化的发生过程中发挥着重要作用, 近年来随着对细胞凋亡研究的深入, 人们发现通过诱导活化HSC凋亡可逆转肝纤维化的发生. 因此, 在前期良好的临床及药效学研究基础上, 从细胞凋亡的角度探讨中药清肝活血方治疗酒精性肝纤维化的作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 δ Wistar大鼠72只, SPF级, 体质量 140 ± 30 g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 饲养于上海中医药大学附属龙华医院实验中心动物房. CCl_4 分析纯、橄榄油化学纯、多聚甲醛化学纯(国药集团化学试剂有限公司); 吡唑(Fluca公司); 玉米油(营口渤海油脂工业有限公司); 盐酸氯胺酮注射液(江苏恒瑞医药股份有限公司); ALT, AST, γ -GT检测试剂盒(南京建成生物公司); HE, Masson染液(上海虹桥乐翔医用试剂有限公司); Cell death detection Kit (Roche Diagnostics Ltd); α -SMA一抗BM0002, SABC试

剂盒SA1021, DAB显色液AR1022(博士德生物有限公司货号); 易善复(北京安万特制药有限公司); 清肝活血方(柴胡9 g, 黄芩9 g, 丹参15 g, 鳖甲9 g, 葛根15 g)由上海中医药大学附属龙华医院制剂室制备.

1.2 方法 模型制备采用60度二锅头酒(10 mL/kg)、玉米油(2 mL/kg)、吡唑(25 mg/kg)混合物每日早晚灌胃10 mL/kg. 第二周开始 CCl_4 橄榄油溶液(CCl_4 : 橄榄油 = 1:3) 0.3 mL/kg ip 2次/周, 空白组以等量生理盐水代替, 共10 wk^[1]. 第11周将造模组大鼠分为清肝活血方低(4.75 g)、中(14.25 g)和高剂量组(28.5 g/kg)及易善复对照组(66.5 mg/kg), 每日灌胃, 空白对照组和模型对照组以等量生理盐水代替, 给药2 wk. 血清ALT, AST, γ -GT检测采用尤尼克UV-2102C分光光度计严格按说明书步骤检测. 肝组织HE染色观察炎症坏死, Masson染色观察纤维化程度. 炎症、纤维化分级、评分标准参照文献[2-3].

1.2.1 肝细胞凋亡TUNEL检测 石蜡切片常规脱蜡至水; 双蒸水浸泡5 min, 滴加蛋白酶K(20 mg/L) 37°C, 30 min, PBS洗; 将enzyme solution I 5 μ L与II 45 μ L混合, 每片加此混合物50 μ L, 湿盒内孵育60 min, PBS洗; 滴加TUNEL reaction mixture 50 μ L 37°C, 1 h, PBS洗; DAB显色; 苏木素轻度复染封片. 阳性结果判定: 每组随机选片5张, 由第3人读片, 以肝细胞为计数对象不考虑其他间质细胞, 其中胞质黄染、胞核固缩变形为阳性细胞, 每片随机取中央及四周5个不同高倍镜视野(400倍)观察, 以平均每100个肝细胞核中含凋亡肝细胞个数作为肝细胞凋亡指数.

1.2.2 HSC凋亡TUNEL- α -SMA双标记检测^[4] 石蜡切片常规脱蜡至水; 0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液微波修复3 min冷却后PBS洗; 30 mL/L H_2O_2 室温孵育5-10 min, 蒸馏水冲洗, PBS浸泡5 min; 将enzyme solution I 5 μ L与II 45 μ L混合, 每片加此混合物50 μ L, 湿盒内孵育60 min, PBS洗, 5 min \times 3次; 滴加TUNEL reaction mixture 50 μ L 37°C, 1 h, PBS洗; DAB显色. PBS洗, 5 min \times 3次, 50 g/L BSA封闭液室温孵育30 min; 倾去血清; 滴加稀释的一抗(1:150), 37°C 1.5 h, PBS冲洗; 滴二抗, 37°C孵育30 min, PBS洗; 滴加试剂SABC, 37°C, 30 min, PBS洗; DAB显色, 苏木素轻度复染封片. 阳性结果判定: 每组随机选片5张, 由第3人读片, 以 α -SMA表达阳性细胞为计数对象, 其中胞质黄染, 胞核棕黑色固缩、变形, 为凋亡的HSC, 每片随机取5个不同高倍镜视野

■创新盘点

本文通过双染技术对星状细胞的凋亡进行体内研究, 比体外培养更客观更真实的说明了中医中药作用靶点.

■同行评价

本文在整体实验的基础上,研究清肝活血方对酒精性肝纤维化大鼠肝HSC的凋亡的影响。研究内容新颖重要,实验设计科学合理,指标先进,统计方法恰当。

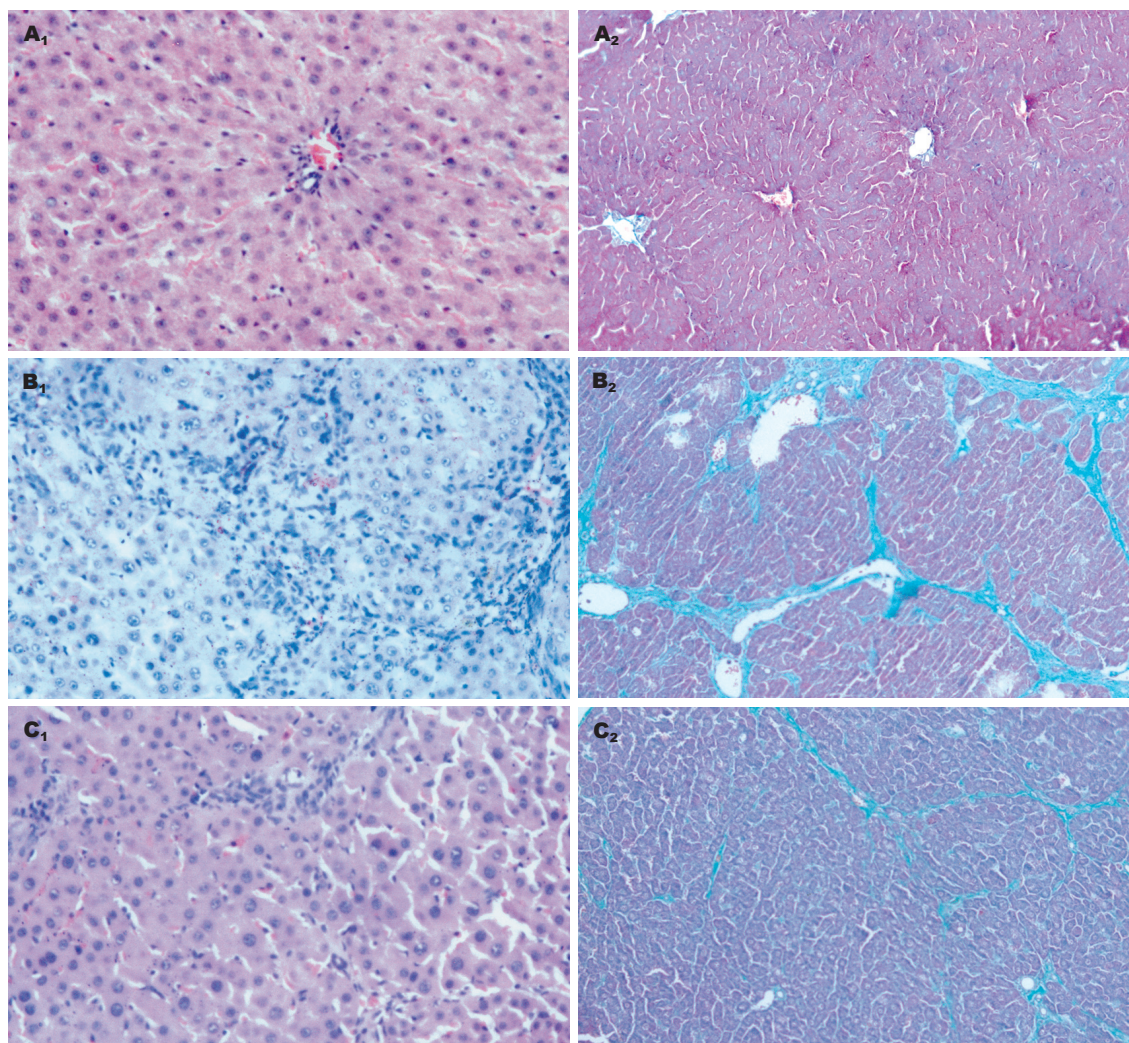


图1 乙醇引起的大鼠肝组织. A: 空白组; B: 模型组; C: 治疗组(A₁-C₁: HE × 400; A₂-C₂: Masson × 200).

(400倍)观察,以平均每100个HSC中含凋亡细胞个数作为星状细胞凋亡指数(AI).

统计学处理 各组计量资料以mean±SD表示,组间差异比较采用ANOVA and post hoc test.全部数据采用SPSS 11.5软件进行分析, $P<0.05$ 为差异显著。

2 结果

空白组大鼠毛发光泽,体质量增加,体态活泼,食量及大便正常。模型组大鼠饮食逐渐减少,体质量下降,大便干燥,小便黄,皮毛疏松无光泽,精神不振。易善复对照及中药各剂量组大鼠上述症状有不同程度减轻,特别是中药各组能明显改善大便干燥,小便黄的情况。与模型组相比,各用药组可明显改善乙醇引起的肝损伤,清肝活血方各剂量组及易善复组均能显著降低大鼠血清ALT,AST水平($P<0.05$),在改善AST方面清肝活血方优于易善复;清肝活血方高剂量及易

善复能降低血清 γ -GT($P<0.05$,表1)。

2.1 乙醇引起的肝损伤大鼠病理变化 空白组大鼠HE染色显示,大鼠肝小叶结构清晰,肝细胞索排列整齐,呈放射状,肝窦正常,胞核结构清晰;Masson染色显示仅有少量胶原表达于中央静脉壁。模型组大鼠肝索排列紊乱,炎细胞浸润和组织坏死明显,可见桥接坏死,成纤维细胞大量增生,肝小叶结构不完整;Masson染色显示肝细胞周围纤维沉积增加,中央静脉周围、汇管区胶原纤维增粗并向小叶内延伸。各治疗组炎细胞浸润及组织坏死减轻,成纤维细胞增生减少,部分肝小叶结构有所恢复;Masson染色显示肝脏胶原沉积均有不同程度减少,纤维间隔缩短变窄,纤维化分期下降;且炎症纤维化程度随用药剂量的加大而减轻呈一定量效关系,但中药与西药对照组间无明显差异(图1,表2)。

2.2 TUNEL及TUNEL- α -SMA双标记检测 TUNEL肝细胞凋亡染色显示,空白组偶见肝细胞

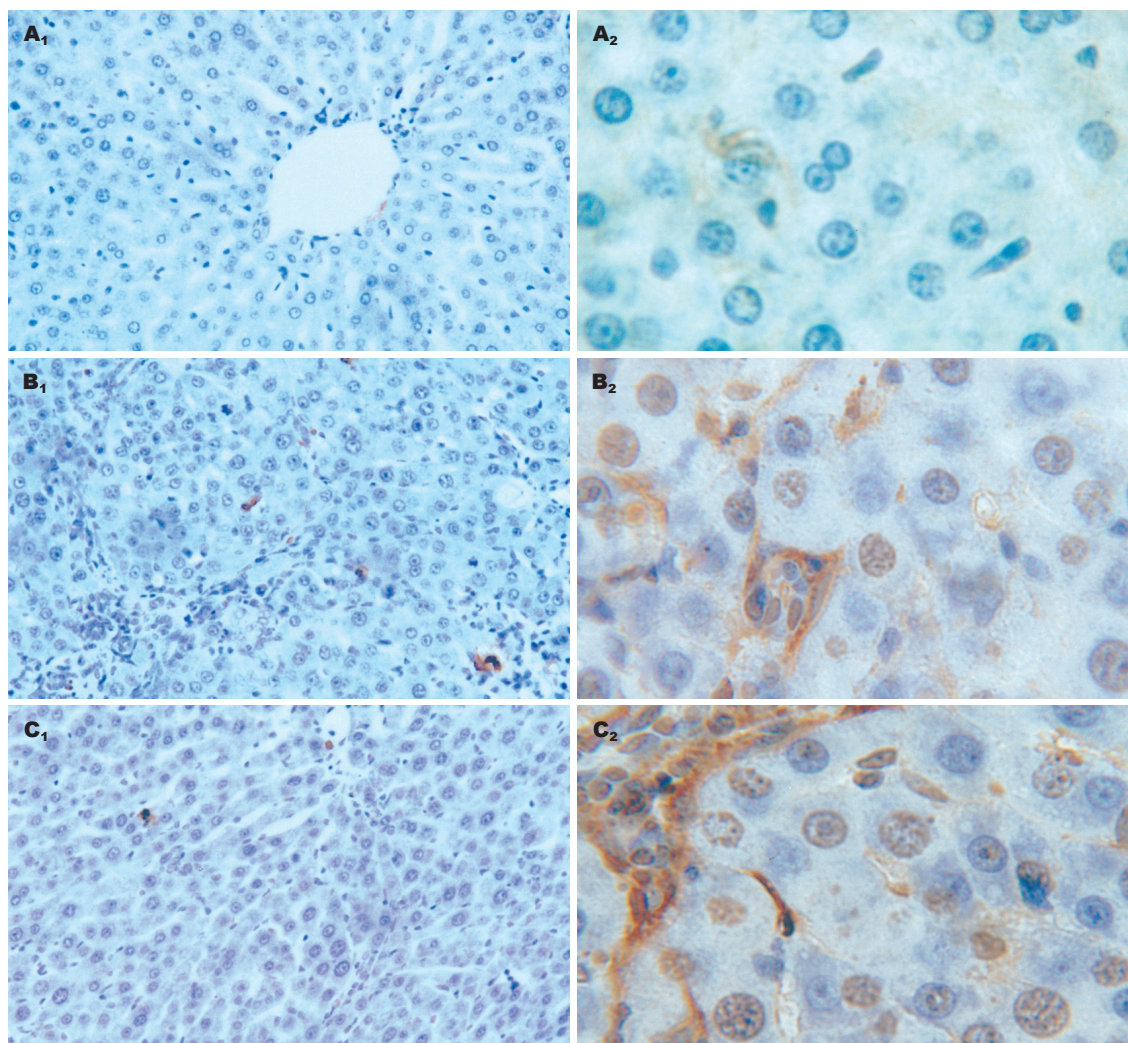


图 2 肝细胞和HSC凋亡的检测结果. A: 空白组; B: 模型组; C: 治疗组(A₁-C₁: 肝细胞TUNEL×400; A₂-C₂: HSC TUNEL-α-SMA×800).

表 1 清肝活血方治疗乙醇引起的肝损伤及大鼠肝功能的变化 (mean ± SD)

分组	<i>n</i>	ALT (nkat/L)	AST (nkat/L)	γ-GT (nkat/L)
空白组	12	375 ± 233 ^{ac}	526 ± 119 ^{ac}	1413 ± 316 ^{ac}
模型组	8	2140 ± 428 ^c	4454 ± 850 ^c	8271 ± 3304 ^c
易善复组	9	1432 ± 253 ^a	2123 ± 413 ^a	5509 ± 2430 ^a
清肝活血方高剂量	12	1213 ± 245 ^a	1671 ± 400 ^{ac}	4539 ± 1847 ^a
清肝活血方中剂量	11	1414 ± 211 ^a	1692 ± 283 ^{ac}	6093 ± 2684
清肝活血方低剂量	10	1481 ± 180 ^a	1633 ± 264 ^{ac}	6043 ± 1305

^a*P*<0.05 vs 模型组, ^c*P*<0.05 vs 易善复组.

凋亡, 模型组凋亡的肝细胞散在于小叶内, 经药物治疗后各给药组可明显较少肝细胞凋亡 (*P*<0.05), 各用药组间比较发现中药高剂量优于其他药物组, 且呈一定量效关系; TUNEL-α-SMA双标记HSC凋亡显示空白组未见凋亡的HSC, 模型组存在肝窦、胶原沉积处可见大量活化HSC, 药物处理后HSC凋亡指数明显增加

(*P*<0.05), 中药组间存在一定量效关系. 高剂量组优于其他药物组(图2, 表2).

3 讨论

现代医学认为, 饮酒超过5 a, 折合乙醇量男性≥40 g/d, 女性≥20 g/d将导致酒精性肝病^[5]. 乙醇对肝脏的影响表现为, 乙醇对组织和细胞的

表 2 乙醇引起的肝损伤大鼠肝细胞凋亡指数比较(mean \pm SD, $n = 5$)

分组	炎症	纤维化	肝细胞凋亡指数 (%)	HSC凋亡指数 (%)
空白	0	0	0.05 \pm 0.12 ^{ac}	0 ^{ac}
模型	9.75 \pm 2.12	9.00 \pm 2.27	1.77 \pm 0.49 ^c	2.30 \pm 1.24 ^c
易善复组	6.30 \pm 3.16 ^a	6.30 \pm 3.16 ^a	0.60 \pm 0.16 ^a	3.63 \pm 2.04 ^a
清肝活血方高剂量	4.7 \pm 2.70 ^a	5.5 \pm 2.50 ^a	0.43 \pm 0.11 ^{ac}	5.25 \pm 2.48 ^{ac}
清肝活血方中剂量	6.55 \pm 2.94 ^a	6.00 \pm 3.00 ^a	0.64 \pm 0.13 ^a	3.81 \pm 1.98 ^a
清肝活血方低剂量	6.60 \pm 2.76 ^a	7.20 \pm 2.53	0.65 \pm 0.15 ^a	3.55 \pm 1.93 ^a

^a $P < 0.05$ vs 模型组, ^c $P < 0.05$ vs 易善复组.

直接损伤作用;乙醇在肝脏代谢过程,可使2分子的氧化型辅酶 I (NAD)转变为还原型辅酶 I (NADH), NADH/NAD的比值明显增高,使细胞的氧化还原状态改变,对葡萄糖合成、脂质代谢及蛋白质的分泌有广泛的影响.乙醇对肝脏的毒性作用更大,主要表现在:(1)降低肝脏对脂肪酸的氧化;(2)损伤线粒体、抑制三羧酸循环;(3)影响肝脏的微管系统,使微粒蛋白分泌减少,造成脂质和蛋白质在肝脏细胞中沉积;(4)与细胞膜结合,改变其通透性及流动性,从而导致肝细胞的损伤;(5)抑制DNA的修复和DNA中胞嘧啶的甲基化,从而抑制细胞的分化及损伤组织的再生、修复;(6)乙醇能增加胶原的合成及mRNA的合成,促进肝纤维化的形成.另外,乙醇蛋白加合物可作为半抗原引起免疫反应,并可刺激肝脏胶原合成直接导致ALF.祖国医学对于过度饮酒而引起的损害已有了较全面的认识,传统中医虽然没有酒精性肝病的病名,但将其归属于伤酒、酒风、酒疸、酒积、酒癖、酒癥的范畴之内,其中酒精性肝纤维化当属于酒癖的范畴^[6-7].本方是在临床流行病学调查发现“湿热”与“瘀血”为酒精性肝病主要病理因素的基础上,拟定了以清肝利湿、活血散瘀为主要功效的“清肝活血方”.方用柴胡、黄芩为君,疏肝解郁,和解少阳;黄芩清热燥湿,泻火解毒.丹参、鳖甲为臣,丹参凉血清热、养血和血、祛瘀生新;鳖甲软坚散结.配以葛根为佐,生津止渴、升发清阳.全方清肝、活血并用,切中酒精性肝病机特点.实验血清酶学及病理学结果显示,清肝活血方能显著降低酒精性肝纤维化大鼠血清ALT, AST, γ -GT水平,减轻炎症纤维化程度($P < 0.05$),并且清肝活血方低剂量、中剂量、高剂量间有一定量效关系,而在血清AST上清肝活血方优于西药对照组.

目前认为,肝纤维化发生的核心是HSC的活

化增殖,乙醇引起的肝纤维化也不例外,活化的HSC转分化为MFb样细胞表型,能合成除V型胶原外的几乎所有细胞外基质(ECM)成分,同时活化的HSC表达TIMP-1, TIMP-2以及TGF- β 等阻碍ECM的降解,加重肝纤维化的程度^[8].有实验显示,在HSC激活的过程中可以观察到HSC的凋亡现象,且随着激活过程的进展,凋亡数目所占的比例也逐渐增加而静止期没有凋亡现象^[9-10].因此消除炎症刺激、减少促纤维化因子释放、促进ECM的降解、减少HSC的活化及促使过量的HSC凋亡成为治疗的靶点,通过细胞凋亡使HSC减少对肝纤维化进行治疗也是一种新的探索.TUNEL及TUNEL- α -SMA双标记检测结果显示,与模型组相比清肝活血方各剂量组能够显著减少乙醇引起的肝细胞凋亡,并能增加过度增殖活化HSC凋亡($P < 0.05$),并且清肝活血方高剂量组优于西药对照组,提示清肝活血方抗纤维化作用可能是通过诱导星状细胞凋亡实现的,抑制肝细胞凋亡在改善肝功能方面有一定作用.近年来,随着对中医药研究的深入,中医药防治酒精性肝病的良好疗效逐渐被人们所认识,但由于中药成分复杂,作用环节多,因此对其作用机制的研究还需进一步深入.

4 参考文献

- 1 Wang L, Ji G, Zheng PY, Long AH. Establishment of a rat model of alcoholic liver fibrosis induced by complex factors. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 2006; 4: 281-284
- 2 王泰龄. 酒精性肝病的病理诊断标准分级、分期与分类. *中华肝脏病杂志* 2001; 9: 312-313
- 3 房龙, 马安林, 李靖涛, 王远新, 王泰龄, 赵洪川. 茵三硫对大鼠酒精及四氯化碳致肝纤维化的防治作用. *胃肠病学和肝病学杂志* 2003; 12: 429-432
- 4 Issa R, Williams E, Trim N, Kendall T, Arthur MJ, Reichen J, Benyon RC, Iredale JP. Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors. *Gut* 2001; 48: 548-557
- 5 厉有名. 酒精性肝病的诊断. *临床内科杂志* 2004; 21:

- 75-76
- 6 季光, 曹承楼. 酒精性肝病的中医研究. 辽宁中医杂志 2001; 28: 198-199
- 7 丁霞, 田德禄, 姚雪彪. 中医学对酒精性肝纤维化的认识. 中华中医药杂志 2006; 21: 50-53
- 8 Breilkopf K, Lahme B, Tag CG, Gressner AM. Expression and matrix deposition of latent transforming growth factor beta binding proteins in normal and fibrotic rat liver and transdifferentiating hepatic stellate cells in culture. *Hepatology* 2001; 33: 387-396
- 9 Saile B, Knittel T, Matthes N, Schott P, Ramadori G. CD95/CD95L-mediated apoptosis of the hepatic stellate cell. A mechanism terminating uncontrolled hepatic stellate cell proliferation during hepatic tissue repair. *Am J Pathol* 1997; 151: 1265-1272
- 10 Ji G, Wang L, Zhang SH, Liu JW, Zheng PY, Liu T. Effect of Chinese medicine Qinggan Huoxuefang on inducing HSC apoptosis in alcoholic liver fibrosis rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2047-2052

电编 张敏 编辑 潘伯荣

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

• 消息 •

《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, 国内外公开发行的大型综合性消化病学类学术期刊. 2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001071号. 《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊和中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊. 《世界华人消化杂志》发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》, 俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录. 《世界华人消化杂志》综合介绍消化病学前沿基础与临床研究的发现, 覆盖消化病学领域中经临床实验证明的技术进展. 从1993-2005《世界华人消化杂志》发表的文章可以在线<http://www.wjgnet.com>免费阅读全文. 《世界华人消化杂志》综合介绍以下领域的内容: 消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化护理、消化医学影像、消化病理、消化预防医学、消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊. 《世界华人消化杂志》开通了<http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>在线办公系统, 实现了在线投稿和审稿等功能.

氧应激对大鼠肝星状细胞增殖的影响及还原型谷胱甘肽的抗氧化作用

刘梅, 陆伦根, 陈尉华, 窦爱霞, 房静远, 曾民德, 郑瑞丹

■背景资料

肝星状细胞(HSC)在肝纤维化的形成过程中起重要作用。“二次打击”学说认为, 氧应激和脂质过氧化是脂肪肝和肝纤维化发病的重要机制之一, 可通过不同途径激活HSC. 还原型谷胱甘肽是一种生理活性物质, 可通过巯基与体内的自由基相结合, 起到清除自由基的作用。

刘梅, 陆伦根, 陈尉华, 窦爱霞, 房静远, 曾民德, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化内科 上海市消化疾病研究所 上海市 200001
郑瑞丹, 解放军第175医院肝病治疗中心 福建省漳州市 363000
上海市重点学科建设项目, No. Y0205
上海市科学技术委员会基金, No. 054009618
通讯作者: 陆伦根, 200001, 上海市, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化内科, 上海市消化疾病研究所. lungenu1965@yahoo.com
电话: 021-63364118 传真: 021-63112874
收稿日期: 2006-07-14 接受日期: 2006-07-31

Effects of oxidative stress on proliferation of rat hepatic stellate cells and antioxidation of reduced glutathione

Mei Liu, Lun-Gen Lu, Wei-Hua Chen, Ai-Xia Dou, Jing-Yuan Fang, Min-De Zeng, Rui-Dan Zheng

Mei Liu, Lun-Gen Lu, Wei-Hua Chen, Ai-Xia Dou, Jing-Yuan Fang, Min-De Zeng, Department of Gastroenterology, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; Shanghai Institute for Digestive Diseases, Shanghai 200001, China
Rui-Dan Zheng, Treatment Center for Liver Disease, Chinese PLA 175 Hospital, Zhangzhou 363000, Fujian Province, China
Support by Shanghai Leading Academic Discipline Project, No. Y0205, and the Grant from Shanghai Science and Technology Committee, No. 054009618
Correspondence to: Lun-Gen Lu, Department of Gastroenterology, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; Shanghai Institute for Digestive Diseases, Shanghai 200001, China. lungenu1965@yahoo.com
Received: 2006-07-14 Accepted: 2006-07-31

Abstract

AIM: To explore the effects of oxidative stress on the proliferation of rat hepatic stellate cells and the antioxidation of reduced glutathione.

METHODS: Rat hepatic stellate cells were incubated with different concentrations of ferric nitrilotriacetic acid (Fe-NTa). With 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenylterazolium bromide (MTT) colorimetric assay, the effects of Fe-NTa on the proliferation of hepatic stellate cells at 6, 12, 24 and 48 h was detected, and malondialde-

hyde (MDA) contents and superoxide dismutase (SOD) activity were also detected. At the same time, hepatic stellate cells were incubated with different concentrations of reduced glutathione (0.5, 2.5, 10 mmol/L), and MTT assay was used to SOD activity again.

RESULTS: In comparison with that in the blank control group at 12 h, the proliferation of hepatic stellate cells was significantly increased when the ferric nitrilotriacetic acid concentrations were 500 and 1000 $\mu\text{mol/L}$, respectively (*A* value: 0.369 ± 0.124 , 0.485 ± 0.101 vs 0.285 ± 0.044 , both $P < 0.01$); the proliferation of cells incubated with different concentrations of Fe-NTa was also markedly increased at 24 and 48 h ($P < 0.01$). The proliferation of hepatic stellate cells without Fe-NTa interference at 12, 24 and 48 h was also increased as compared with that at 6 h (*A* value: 0.285 ± 0.044 , 0.253 ± 0.033 , 0.278 ± 0.037 vs 0.111 ± 0.005 , all $P < 0.01$), while with the elevation of Fe-NTa concentration, the proliferation of hepatic stellate cells at 12, 24 and 48 h was markedly increased as compared with that at 6 h ($P < 0.01$). In comparison with those in the control group, SOD activity significantly reduced (156.95 ± 21.17 , 100.92 ± 10.02 $\mu\text{kat/L}$ vs 197.74 ± 17.59 $\mu\text{kat/L}$, all $P < 0.01$) and MDA contents significantly increased (1123 ± 217 , 1549 ± 182 mmol/L vs 580 ± 332 mmol/L, all $P < 0.01$) when the concentrations of Fe-NTa were 200 and 500 $\mu\text{mol/L}$. As compared with the model group (200 $\mu\text{mol/L}$ Fe-NTa), the SOD activities in the cells preincubated with reduced glutathione were significantly increased (5.42 ± 0.58 , 6.67 ± 0.18 , 8.75 ± 0.58 $\mu\text{kat/L}$ vs 2.25 ± 0.35 $\mu\text{kat/L}$, all $P < 0.01$).

CONCLUSION: Oxidative stress can significantly promote the proliferation of rat hepatic stellate cells in time- and concentration-dependent manners. Oxidative stress can also lead to lipid peroxidation, while reduced glutathione may play an anti-oxidative role.

Key Words: Oxidative stress; Hepatic stellate cell; Proliferation; Reduced glutathione; Rats

Liu M, Lu LG, Chen WH, Dou AX, Fang JY, Zeng MD, Zheng RD. Effects of oxidative stress on proliferation of rat hepatic stellate cells and antioxidation of reduced glutathione. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(26):2596-2600

摘要

目的: 探讨氧应激对肝星状细胞增殖的影响及还原型谷胱甘肽的抗氧化作用。

方法: 分别用不同浓度的次氨基三乙酸铁(Fe-NTa)培养大鼠肝星状细胞, 在6, 12, 24和48 h用四甲基偶氮唑盐法(MTT法)检测氧应激对肝星状细胞增殖的影响, 检测丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性; 并用不同浓度的还原型谷胱甘肽与Fe-NTa共同培养细胞, 再检测SOD活性。

结果: Fe-NTa作用12 h与同一时间点的空白对照组比较, 500和1000 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞增殖明显增多($A: 0.369 \pm 0.124, 0.485 \pm 0.101$ vs $0.285 \pm 0.044, P < 0.01$), 作用24和48 h各浓度组与同一时间点的空白对照组比较差异显著($P < 0.01$)。无Fe-NTa干预的空白对照组12, 24和48 h与同样处理的6 h组比较, 细胞增殖明显增多($A: 0.285 \pm 0.044, 0.253 \pm 0.033, 0.278 \pm 0.037$ vs $0.111 \pm 0.005, P < 0.01$), 随着Fe-NTa剂量的增加, 作用12, 24和48 h与同样处理的6 h组比较, 细胞增殖亦明显增多($P < 0.01$)。200和500 $\mu\text{mol/L}$ Fe-NTa组与对照组比较, SOD活力明显降低($156.95 \pm 21.17, 100.92 \pm 10.02$ $\mu\text{kat/L}$ vs 197.74 ± 17.59 $\mu\text{kat/L}, P < 0.01$); MDA含量明显升高($1123 \pm 217, 1549 \pm 182$ mmol/L vs 580 ± 332 $\text{mmol/L}, P < 0.01$)。预先加入GSH的各组与模型组(200 $\mu\text{mol/L}$ Fe-NTa)比较, SOD活力明显升高($5.42 \pm 0.58, 6.67 \pm 0.18, 8.75 \pm 0.58$ $\mu\text{kat/L}$ vs 2.25 ± 0.35 $\mu\text{kat/L}, P < 0.01$)。

结论: 氧应激促进HSC增殖有剂量和时间依赖性; 且可导致脂质过氧化损伤, 还原型谷胱甘肽有抗氧化作用, 可对抗脂质过氧化损伤。

关键词: 氧应激; 肝星状细胞; 增殖; 还原型谷胱甘肽; 大鼠

刘梅, 陆伦根, 陈尉华, 窦爱霞, 房静远, 曾民德, 郑瑞丹. 氧应激对大鼠肝星状细胞增殖的影响及还原型谷胱甘肽的抗氧化作用. *世界华人消化杂志* 2006;14(26):2596-2600
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2596.asp>

0 引言

大量研究表明, 肝星状细胞(HSC)在肝纤维化的

形成过程中起重要作用。在正常肝脏HSC是机体贮存维生素A的主要场所。肝损伤时HSC被激活, 细胞内的维生素A含量逐渐减少, 细胞增殖逐渐明显, 其表型转化为肌成纤维细胞, 产生大量的细胞外基质(ECM)^[1-3]。脂肪肝发病机制的“二次打击”学说认为氧应激和脂质过氧化是脂肪肝及肝纤维化发生的基础机制^[4-6]。氧应激尤其是脂质过氧化产物例如丙二醛(MDA)等在HSC激活早期具有重要意义^[7-9]。MDA可促进I型胶原mRNA的表达, 提示氧应激与肝纤维化之间存在可能的联系^[10]。但是氧应激和脂质过氧化的强度及作用时间对HSC增殖的影响鲜见报道。还原型谷胱甘肽(GSH)是一种广泛存在于正常细胞中的生理活性物质, 含有巯基, 可通过巯基与体内的自由基相结合。我们以肝星状细胞株cFSC为研究对象, 研究氧应激不同强度及作用时间对HSC增殖的影响及GSH的抗氧化作用, 进一步完善脂肪肝发病机制的“二次打击”学说, 并为GSH在脂肪肝和肝纤维化中的应用提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 大鼠肝星状细胞株cFSC由上海长征医院实验诊断科惠赠, 其表型为活化的HSC; 高糖DMEM培养基为美国Gibco公司产品; 胎牛血清为北京鼎国生物技术有限公司产品; 胰蛋白酶、MTT和二甲亚砜(DMSO)为美国Sigma公司产品; 细胞上清液SOD, MDA检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 细胞裂解液SOD检测试剂盒-WST购自日本株式会社同仁化学研究所; 次氨基三乙酸铁(Fe-NTa)由0.1 mol/L的FeNO₃ (Sigma公司)和Na₂NAC (Fluka公司)两种母液混合配制而成, NaHCO₃调节pH至7.4, 0.22 $\mu\text{mol/L}$ 的微孔滤器过滤, 现配现用; GSH粉剂(商品名为阿莫拓兰)由重庆药友制药有限责任公司提供, 用含2 mL/L胎牛血清的DMEM培养液溶解, 配制成浓度为10 mmol/L的母液, 0.22 $\mu\text{mol/L}$ 微孔滤器过滤后, 加药前用培养液稀释为各所需浓度, 现用现配, 配好的药物保存不超过6 h。

1.2 方法

1.2.1 MTT增殖实验 取对数生长期的cFSC, 2.5 g/L胰酶消化后, 用含100 mL/L胎牛血清的DMEM配成细胞悬液, 接种于96孔培养板, 密度为 $5 \times 10^7/\text{L}$, 每孔加入DMEM培养液100 μL , 置于37℃, 50 mL/L CO₂培养箱中培养过夜。24 h

■ 研发前沿

氧应激和脂质过氧化激活肝星状细胞的途径和机制是肝纤维化研究领域中的热点。

■应用要点

本研究证明还原型谷胱甘肽对抗氧化应激导致的自由基损伤,有抗氧化作用,为还原型谷胱甘肽在临床上应用于脂肪肝和肝纤维化的治疗提供了理论和实验依据,也为继续研究其抗纤维化作用打下了理论基础。

表 1 不同浓度和不同时间Fe-NTa对HSC增殖的影响 (mean ± SD)

Fe-NTa浓度 (μmol/L)	6 h	12 h	24 h	48 h
0	0.111 ± 0.005	0.285 ± 0.044 ^d	0.253 ± 0.033 ^d	0.278 ± 0.037 ^d
50	0.119 ± 0.006	0.298 ± 0.097 ^d	0.567 ± 0.133 ^{bd}	0.743 ± 0.066 ^{bd}
100	0.119 ± 0.006	0.297 ± 0.089 ^d	0.549 ± 0.187 ^{bd}	0.734 ± 0.103 ^{bd}
200	0.125 ± 0.008	0.331 ± 0.126 ^d	0.469 ± 0.167 ^{bd}	0.873 ± 0.197 ^{bd}
500	0.112 ± 0.007	0.369 ± 0.124 ^{bd}	0.452 ± 0.084 ^{bd}	1.049 ± 0.222 ^{bd}
1000	0.106 ± 0.012	0.485 ± 0.101 ^{bd}	0.526 ± 0.150 ^{bd}	1.546 ± 0.238 ^{bd}

^b $P < 0.01$ vs 空白对照组; ^d $P < 0.01$ vs 6 h.

后细胞贴壁良好,换用含2 mL/L胎牛血清的DMEM培养,使其生长同步化。再培养24 h后加入不同浓度的Fe-NTa产生氧化应激,设50, 100, 200, 500, 1000 μmol/L 5个浓度梯度,每个浓度设10复孔,同时设空白对照组。分别于继续培养6, 12, 24, 48 h后每孔加入MTT 20 mL,置37℃, 50 mL/L CO₂培养箱培养4 h后,弃培养上清液,每孔加入DMSO 100 μL,振荡器振荡10 min酶联免疫检测仪上570 nm测A值,实验重复2次。

1.2.2 检测细胞上清液中SOD活性和MDA含量 取对数生长期的cFSC, 2.5 g/L的胰酶消化后,用含100 mL/L胎牛血清的DMEM配成细胞悬液,以 5×10^7 /L接种于24孔培养板,每孔培养液为1 mL。置于37℃, 50 mL/L CO₂培养箱中培养24 h后更换培养液并加入不同浓度的Fe-NTa (0, 100, 200和500 μmol/L),每个浓度设6复孔。24 h后检测细胞上清液中的SOD活性和MDA含量,步骤按试剂盒要求进行,本实验重复2次。

1.2.3 检测细胞裂解液中SOD活性 取对数生长期的cFSC以 5×10^8 /L接种于25 cm²的细胞培养瓶,每瓶5 mL培养液。待细胞贴壁良好并同步化后,更换培养液并加入不同浓度的GSH,培养2 h后加入不同浓度的Fe-NTa。分别设空白对照组、模型组和药物干预组,空白对照组不加任何药物,模型组分别加入100, 200, 500 μmol/L的Fe-NTa,药物干预组分为200 μmol/L Fe-NTa+0.5 mmol/L GSH, 200 μmol/L Fe-NTa+2.5 mmol/L GSH和200 μmol/L Fe-NTa+10 mmol/L GSH。培养24 h后用刮刀刮下细胞,4℃, 2000 g离心10 min,弃上清。1 mL冰PBS溶液洗净细胞,随后4℃, 1000 g离心10 min,弃上清。重复该步骤1次。在-20℃下放置20 min,再在37℃温浴10 min。重复该步骤2遍,破碎细胞膜。加入新的PBS 1 mL,在4℃, 10 000 g下离心15 min。取上清液用PBS稀释,制成样品溶液。用

试剂盒检测细胞裂解液中的SOD活性,步骤按试剂盒说明书进行,本实验重复2次。

统计学处理 计量资料以mean±SD表示,用SAS 6.12统计软件进行单因素变量的方差分析。

2 结果

2.1 MTT增殖实验 Fe-NTa作用6 h对HSC的增殖无明显影响,在12 h其促进HSC增殖作用逐渐明显,500和1000 μmol/L组与空白对照组比较有显著差异($P < 0.01$)。随着时间的延长,Fe-NTa作用24 h和48 h各浓度组与空白对照组比较均有显著差异($P < 0.01$)。无Fe-NTa干预的空白对照组12, 24和48 h之间无明显差异,但与6 h组比较均有显著差异($P < 0.01$)。随着药物剂量的增加,其他各浓度组的差异越来越显著(表1)。

2.2 细胞上清液中SOD活性和MDA含量 不同浓度Fe-NTa对HSC培养上清液中的SOD活性的影响各不相同。100 μmol/L组与对照组比较无明显差异。200和500 μmol/L组有明显的降低SOD活性的作用,与对照组或100 μmol/L组比较均有明显差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。200与500 μmol/L比较也有显著差异($P < 0.01$)。各浓度组均有升高HSC培养上清液中MDA的作用,与对照组比较有显著差异($P < 0.01$)。而且500 μmol/L组与较低剂量组(100和200 μmol/L)比较有显著差异($P < 0.01$,表2)。

2.3 细胞裂解液中SOD活性及GSH对SOD的影响 不同浓度Fe-NTa均可明显的降低HSC裂解液中SOD活性($P < 0.01$,表2)。而预先加入GSH的各剂量组均可升高SOD的活力,与模型组比较有显著差异(200 μmol/L Fe-NTa+0.5 mmol/L GSH时, SOD活力为 5.42 ± 0.58 μkat/L; 200 μmol/L Fe-NTa+2.5 mmol/L GSH时, SOD活力为 6.67 ± 0.18 μkat/L; 200 μmol/L Fe-NTa+10 mmol/L GSH时, SOD活力为 8.75 ± 0.58 μkat/L, $P < 0.01$)。

3 讨论

大量基础和临床研究都显示反应性氧(ROS)和细胞膜的脂质过氧化与肝纤维化发生有关, 这表明氧应激是不同病因慢性肝病共同的发病因素^[10-13]. 有研究从基因水平证实脂质过氧化可刺激HSC合成I型胶原^[14], 而且细胞色素P450 2E1来源的氧化物可促进HSC的增殖和胶原的合成^[15-16]. 最近有研究表明, 黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶系统产生的ROS能促进HSC的增殖, 此促进作用与基质金属蛋白酶-2 (MMP-2)的激活和表达有关^[17-18], 而且在大鼠肺和皮肤成纤维细胞以及心肌成纤维细胞中也发现氧应激可调节MMP-2的表达^[19-21]. 由此认为, 氧应激和脂质过氧化可通过不同的机制促进HSC的增殖, 胶原合成增加是HSC增殖的结果. 我们采用Fe-NTa与HSC在体外共同培养, 引起铁超载, 是较为理想的细胞氧应激模型^[22]. 用不同浓度的Fe-NTa处理细胞, 在不同的时间点用MTT法检测细胞增殖活力, 结果发现, 随着药物浓度和时间的增加, 细胞增殖越来越明显. 这表明Fe-NTa导致的氧应激有促进HSC增殖的作用, 且随药物剂量的增加和作用时间的延长, 其促进增殖作用越来越明显, 呈现出一定的剂量和时间依从关系, 从铁超载这个不同的侧面再次验证了氧应激和脂质过氧化有促进HSC增殖的作用.

MDA是脂质过氧化的重要终产物之一, 反映了机体细胞受自由基攻击的严重程度, 可促进I型胶原mRNA的表达, 与HSC增殖和胶原合成密切相关^[23-25]; SOD是机体抗氧化损伤防御体系中最重要抗氧化酶之一, 反映了机体清除氧自由基的能力^[26-28], 所以MDA和SOD是一对相互影响的因素. 我们发现, 氧应激可明显升高MDA含量, 而细胞上清液和细胞裂解液中SOD活力都明显降低, 且呈现出一定的剂量依从关系. 这表明铁超载可产生大量的自由基和脂质过氧化物, 消耗了大量的SOD, 导致机体抗氧化损伤的防御机制受损, 不能清除过多的自由基和MDA等脂质过氧化产物^[29]. 而HSC内MDA累积, 通过不同的途径激活HSC, 促进其增殖和合成胶原, 导致肝纤维化的发生. 于洪波 *et al* 用高脂饮食喂饲大鼠也得出了类似的结果^[30]. GSH含有巯基, 是体内最重要的抗氧化物之一, 是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸组成的一种三肽. 他在酶的催化下能与过氧化物和自由基相结合, 对抗氧化物的破坏作用. 我们用Fe-NTa造成氧应激模型, 然后用不同浓度的GSH共同培养

表 2 Fe-NTa对HSC培养上清液中SOD和MDA及HSC裂解液中SOD的影响 (mean ± SD)

Fe-NTa浓度(μmol/L)	培养上清液		HSC裂解液
	SOD活力(μkat/L)	MDA(mmol/L)	SOD活力(μkat/L)
0	197.74 ± 17.59	580 ± 332	15.84 ± 1.17
100	186.20 ± 20.44	1111 ± 227 ^b	3.17 ± 0.47 ^b
200	156.95 ± 21.17 ^{bc}	1123 ± 217 ^b	2.25 ± 0.35 ^b
500	100.92 ± 10.02 ^{bdf}	1549 ± 182 ^{bdf}	1.50 ± 0.23 ^b

^b*P*<0.01 vs 对照组; ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs 100 μmol/L; ^f*P*<0.01 vs 200 μmol/L.

细胞, 检测细胞裂解液中SOD的活力, 结果发现GSH可使SOD活力明显升高, 且有一定的剂量依从性. 这表明GSH可对抗氧应激, 保护细胞免受自由基损伤, 有抗氧化作用, 这为GSH在临床上用于脂肪肝和肝纤维化的治疗提供了理论和实验依据, 也为继续研究其抗纤维化作用打下了理论基础.

4 参考文献

- Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 311-335
- Schuppan D, Porov Y. Hepatic fibrosis: From bench to bedside. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17 Suppl 3: S300-S305
- Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275: 2247-2250
- 曾民德. 脂肪肝发病机制“二次打击”的假设. *肝脏* 2001; 6: 145
- Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845
- Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; 16: 663-678
- Anania FA, Womack L, Jiang M, Saxena NK. Aldehydes potentiate alpha(2)(I) collagen gene activity by JNK in hepatic stellate cells. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 846-857
- Kharbanda KK, Todero SL, Shubert KA, Sorrell MF, Tuma DJ. Malondialdehyde-acetaldehyde-protein adducts increase secretion of chemokines by rat hepatic stellate cells. *Alcohol* 2001; 25: 123-128
- Thiele GM, Freeman TL, Klassen LW. Immunologic mechanisms of alcoholic liver injury. *Semin Liver Dis* 2004; 24: 273-287
- Bedossa P, Houghlum K, Trautwein C, Holstege A, Chojkier M. Stimulation of collagen alpha 1(I) gene expression is associated with lipid peroxidation in hepatocellular injury: a link to tissue fibrosis? *Hepatology* 1994; 19: 1262-1271
- Parola M, Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol* 2001; 35: 297-306
- Gasso M, Rubio M, Varela G, Cabre M, Caballeria J, Alonso E, Deulofem R, Camps J, Gimenez A,

■名词解释

“二次打击”学说: 初次打击使脂肪肝发生, 各种不同病因通过增加氧应激作为发病的基础机制, 促使来自分子氧的游离基或反应性氧化物(ROS)形成增多和脂肪酸氧化障碍, 导致肝细胞脂肪堆积; 第二次打击经脂质过氧化这一生化结构和破坏性反应的打击导致脂肪肝发生炎症、坏死和纤维化.

■同行评价

本文分别用不同浓度的Fe-NTa培养大鼠肝星状细胞,在不同时间点检测氧应激对肝星状细胞增殖的影响,检测MDA和SOD活性,分析氧应激对大鼠肝星状细胞增殖的影响及还原型谷胱甘肽抗氧化作用,研究方法可行,结论可靠,有临床应用价值。

- Pajares M, Pares A, Mato JM, Rodes J. Effects of S-adenosylmethionine on lipid peroxidation and liver fibrogenesis in carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *J Hepatol* 1996; 25: 200-205
- 13 Houglum K, Venkataramani A, Lyche K, Chojkier M. A pilot study of the effects of d-alpha-tocopherol on hepatic stellate cell activation in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1997; 113: 1069-1073
- 14 Casini A, Ceni E, Salzano R, Biondi P, Parola M, Galli A, Foschi M, Caligiuri A, Pinzani M, Surrenti C. Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide. *Hepatology* 1997; 25: 361-367
- 15 Nieto N, Friedman SL, Cederbaum AI. Cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species mediate paracrine stimulation of collagen I protein synthesis by hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 9853-9864
- 16 Nieto N, Greenwel P, Friedman SL, Zhang F, Dannenberg AJ, Cederbaum AI. Ethanol and arachidonic acid increase alpha 2(I) collagen expression in rat hepatic stellate cells overexpressing cytochrome P450 2E1. Role of H₂O₂ and cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 2000; 275: 20136-20145
- 17 Galli A, Svegliati-Baroni G, Ceni E, Milani S, Ridolfi F, Salzano R, Tarocchi M, Grappone C, Pellegrini G, Benedetti A, Surrenti C, Casini A. Oxidative stress stimulates proliferation and invasiveness of hepatic stellate cells via a MMP2-mediated mechanism. *Hepatology* 2005; 41: 1074-1084
- 18 Olaso E, Ikeda K, Eng FJ, Xu L, Wang LH, Lin HC, Friedman SL. DDR2 receptor promotes MMP-2-mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells. *J Clin Invest* 2001; 108: 1369-1378
- 19 Pardo A, Barrios R, Maldonado V, Melendez J, Perez J, Ruiz V, Segura-Valdez L, Sznajder JI, Selman M. Gelatinases A and B are up-regulated in rat lungs by subacute hyperoxia: pathogenetic implications. *Am J Pathol* 1998; 153: 833-844
- 20 Kawaguchi Y, Tanaka H, Okada T, Konishi H, Takahashi M, Ito M, Asai J. The effects of ultraviolet A and reactive oxygen species on the mRNA expression of 72-kDa type IV collagenase and its tissue inhibitor in cultured human dermal fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 1996; 288: 39-44
- 21 Dissing S, Hoffman R, Murnane MJ, Hoffman JF. Chloride transport properties of human leukemic cell lines K562 and HL60. *Am J Physiol* 1984; 247: C53-60
- 22 Svegliati Baroni G, D'Ambrosio L, Ferretti G, Casini A, Di Sario A, Salzano R, Ridolfi F, Saccomanno S, Jezequel AM, Benedetti A. Fibrogenic effect of oxidative stress on rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1998; 27: 720-726
- 23 Svegliati-Baroni G, Di Sario A, Casini A, Ferretti G, D'Ambrosio L, Ridolfi F, Bolognini L, Salzano R, Orlandi F, Benedetti A. The Na⁺/H⁺ exchanger modulates the fibrogenic effect of oxidative stress in rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 1999; 30: 868-875
- 24 Apte M. Oxidative stress: does it 'initiate' hepatic stellate cell activation or only 'perpetuate' the process? *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 1045-1048
- 25 Maher JJ, Tzagarakis C, Gimenez A. Malondialdehyde stimulates collagen production by hepatic lipocytes only upon activation in primary culture. *Alcohol Alcohol* 1994; 29: 605-610
- 26 Tatamoto H, Muto N, Sunagawa I, Shinjo A, Nakada T. Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during *in vitro* maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. *Biol Reprod* 2004; 71: 1150-1157
- 27 Yamamoto T, Lewis J, Wataha J, Dickinson D, Singh B, Bollag WB, Ueta E, Osaki T, Athar M, Schuster G, Hsu S. Roles of catalase and hydrogen peroxide in green tea polyphenol-induced chemopreventive effects. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 308: 317-323
- 28 Salvemini D, Riley DP, Cuzzocrea S. SOD mimetics are coming of age. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1: 367-374
- 29 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
- 30 于洪波, 戴林, 彭海英, 牟新春, 左中. 复方中药对大鼠高脂饮食所致脂肪性肝炎肝组织氧化和抗氧化系统的影响. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2842-2847

电编 张敏 编辑 潘伯荣

大鼠重症急性胰腺炎并发腹内压升高导致肺损伤

崔云甫, 黄睿, 郑宏群

崔云甫, 黄睿, 郑宏群, 哈尔滨医科大学附属第二医院肝胆胰腹腔镜外科 黑龙江省哈尔滨市 150086

崔云甫, 主任医师、教授、博士生导师, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外一科副主任, 主要从事肝胆胰腺疾病的临床基础研究。

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

电话: 0451-86605356

收稿日期: 2006-06-13 接受日期: 2006-07-19

Experimental study on severe acute pancreatitis-induced intra-abdominal hypertension complicated with acute lung injury

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

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

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

Received: 2006-06-13 Accepted: 2006-07-19

Abstract

AIM: To study the pathological changes in acute lung injury induced by severe acute pancreatitis (SAP) complicated with intra-abdominal hypertension (IAH).

METHODS: Ninety-one healthy Wistar rats were divided into sham operation group ($n = 7$), SAP model group ($n = 21$), and SAP+IAH group ($n = 63$). Based on SAP modeling at different time (1, 2, 4 h), the rats were given IAH of 2, 4, 10 cmH₂O. Then lung function was evaluated and the pathological changes of rat lungs were observed under light and electron microscope.

RESULTS: With the increase of IAP and prolonging of action time, the partial pressure of oxygen was obviously decreased, while the partial pressure of carbon dioxide was markedly elevated; the lung water content was dramatically

increased. Light microscopy showed that inflammatory cell, edema, intra-alveolar hemorrhage, desquamate and disintegration appeared in the lung tissues. Electron microscopy demonstrated type II alveolar epithelial cell karyopyknosis, laminated body becoming vacuole-like, swelling of crista mitochondria, and emergence of cell apoptosis.

CONCLUSION: SAP complicated with IAH can lead to lung injury in rats.

Key Words: Severe acute pancreatitis; Intra-abdominal pressure; Lung injury; Model

Cui YF, Huang R, Zheng HQ. Experimental study on severe acute pancreatitis-induced intra-abdominal hypertension complicated with acute lung injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(26):2601-2604

摘要

目的: 探讨大鼠重型急性胰腺炎(SAP)并发腹内压(IAP)增高(IAH)对肺脏的病理损害。

方法: 健康Wistar大鼠91只, 分为假手术组、SAP模型组及SAP+IAH组。在不同时间(1, 2, 4 h) SAP模型的基础上, 给大鼠不同IAP (2, 4, 10 cmH₂O), 观察肺脏的功能及组织结构变化。

结果: 随着腹内压的升高及作用时间的延长, 氧分压(PaO₂)明显下降、二氧化碳分压(PaCO₂)升高, 肺组织含水量增加。光镜下可以观察到肺脏间质及肺泡炎性细胞浸润、水肿、出血, 肺泡细胞出现空泡化、脱落及衰变等病理改变。电镜下观察到Ⅱ型肺泡上皮细胞核固缩, 板层体呈空泡样, 线粒体嵴肿胀, 形成凋亡细胞等病理改变。

结论: SAP并发IAP增高可导致大鼠肺损伤。

关键词: 重型急性胰腺炎; 腹内压; 肺损伤; 模型

崔云甫, 黄睿, 郑宏群. 大鼠重症急性胰腺炎并发腹内压升高导致肺损伤. *世界华人消化杂志* 2006;14(26):2601-2604
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2601.asp>

■背景资料

重症急性胰腺炎(SAP)是外科常见的急腹症, 来势较凶险, 早期可表现为休克、多器官功能不全(MODS), 严重者引起多器官衰竭(MOF)。SAP时胰外器官损伤中呼吸功能障碍最早发生, 其发生率达20%-70%。SAP可引起腹内压力升高(IAH), IAH在SAP引起MOF中所起的作用已被多数学者肯定并接受。

■相关报道

程君涛 *et al*报道的改良腹内高压动物模型的方法, 操作简单易行, 为进行腹内高压的研究提供了一种新方法。

■创新盘点

重症急性胰腺炎并发肺损伤已有定论,许多发病机制已阐明。但目前重症急性胰腺炎并发腹内压升高导致肺损伤的研究尚少,这是本研究立题独到之处。

■应用要点

本文紧密结合临床,建立了重症急性胰腺炎并发腹内压升高导致肺损伤的动物模型,为进一步探讨重症急性胰腺炎并发腹腔室隔综合征导致肺损伤的机制以及防治对策提供了一种较为理想的实验模型。

0 引言

重症急性胰腺炎(SAP)是外科常见的急腹症,来势较凶险,早期可表现为休克、多器官功能不全(MODS),严重者引起多器官衰竭(MOF)。SAP时胰外器官损伤中呼吸功能障碍最早发生,其发生率高达20%-70%。SAP可引起腹内压力升高(IAH),IAH在SAP引起MOF中所起的作用已被多数学者肯定并接受,但IAH对呼吸功能的影响及其是否是呼吸衰竭发病机制之一尚无相关报道。我们建立了SAP并发IAH导致大鼠肺损伤的模型,与临床SAP并发腹腔室隔综合征(ACS)致肺损伤的病理过程相似,为进一步研究腹内高压对机体的病理生理影响奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 从一次性输液器剪下40 cm左右长度输液管,保留有过滤器一端并与三通管相连;将输液管另一端连接至压力计。成年健康清洁级Wistar大鼠91只(哈医大实验动物中心提供),雌雄不限,体质量 200 ± 20 g(周龄8-10 wk)。

1.2 方法 Wistar大鼠91只随机分成3组:第1组7只为假手术组;第2组21只为SAP组,分1, 2, 4 h组,分别于3个时间点取病理;第3组63只为SAP并发IAP增高组,按腹内压大小随机分为2, 4, 10 cmH₂O组,再按作用时间分为1, 2, 4 h组,分别于3个时间点取病理,检测有关指标。参照Milani *et al*报道的模型稍加改进制作SAP大鼠模型。即大鼠术前12 h禁食,不禁水。10 g/L戊巴比妥钠5 mL/kg ip麻醉动物后,正中切口入腹,于十二指肠韧带肝门侧用小动脉夹暂时阻断胆管,由十二指肠前壁进针,经乳头部插入胆胰管内,夹闭胆胰管出口,以0.1 mL/min匀速注入50 g/L牛磺胆酸钠(0.1 mL/kg, Sigma),10 min后去除动脉夹,关腹。SAP模型制成后仰卧位固定后常规消毒,于剑突下两横指处以16号留置套管针穿刺至腹腔并固定,通过三通管分别连接压力计及氮气储气袋,缓慢增加入腹气体量,至相应压力后将三通管转向压力计,持续测压,并维持压力恒定,以建立SAP+IAP增高模型。假手术组除胆管内不注入50 g/L牛磺胆酸钠外,余同SAP组。制模成功后观察动物死亡率。于动物活杀时抽取腹主动脉血,立即用AVL-900自动分析仪进行血气测定。动物活杀后,取左肺组织用分析天平称湿质量,置90℃电热干燥箱内烘烤72 h,称干质量,结果以肺组织湿/干比质量表示肺含水量。按时间点活杀动物,取胰腺组织常规行病

表 1 SAP+IAH大鼠动脉血气 (mean \pm SD, $n = 7$, mmHg)

分组	PaO ₂	PaCO ₂
Control	98.8 \pm 4.2	39.2 \pm 2.4
SAP 1 h	95.8 \pm 3.2	39.3 \pm 2.1
2 h	90.1 \pm 2.3	42.2 \pm 1.3
4 h	80.7 \pm 1.7 ^a	45.5 \pm 2.0
SAP+IAH 2 cmH ₂ O 1 h	89.0 \pm 4.2 ^{ac}	39.0 \pm 3.7
2 h	84.8 \pm 2.9 ^{ac}	42.6 \pm 1.0
4 h	78.2 \pm 2.4 ^{ac}	47.1 \pm 2.2
SAP+IAH 4 cmH ₂ O 1 h	74.5 \pm 5.3 ^{ac}	49.3 \pm 3.1 ^{ac}
2 h	69.0 \pm 4.0 ^{ac}	52.9 \pm 5.5 ^{ac}
4 h	65.9 \pm 3.2 ^{bc}	55.0 \pm 4.4 ^{ac}
SAP+IAH 10 cmH ₂ O 1 h	59.3 \pm 1.7 ^{bd}	65.4 \pm 8.3 ^{bd}
2 h	53.5 \pm 5.0 ^{bd}	69.7 \pm 7.8 ^{bd}
4 h	50.3 \pm 4.0 ^{bd}	72.3 \pm 7.1 ^{bd}

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs SAP组相应时间点。

理切片光镜观察,肺组织分别行光、电镜观察。

统计学处理 所有数据以mean \pm SD表示,采用SPSS 11.0行统计学分析。组内数据应用配对 t 检验,组间比较采用方差分析。

2 结果

假手术组大鼠一般状态良好,无一例死亡。SAP组随着时间的延长死亡率逐渐增加,4 h组死亡率可达25%。SAP+IAH各组随压力梯度及时间的延长死亡率明显增加,4 h组死亡率可达50%。

2.1 动物血气分析 SAP组模型制成后PaO₂呈进行性下降,术后1, 2, 4 h与假手术组相比差异显著($P < 0.05$); PaCO₂术后1, 2, 4 h SAP组呈升高趋势与假手术组相比差异显著($P < 0.05$)。SAP+IAH 2 cmH₂O作用1 h PaO₂即明显降低, PaCO₂显著升高; SAP+IAH 4 cmH₂O 1, 2, 4 h, PaO₂与正常对照组相比显著降低($P < 0.01$), PaCO₂在1, 2, 4 h明显增高,出现明显的低氧血症高碳酸血症。IAH 10 cmH₂O作用1, 2, 4 h, PaO₂与正常对照组相比显著降低($P < 0.01$), PaCO₂显著增高(表1)。

2.2 肺组织含水量变化 肺湿质量/干质量比值在SAP组与假手术组比差异显著($P < 0.05$); SAP+IAH 2 cmH₂O, 4 cmH₂O, 10 cmH₂O 1, 2, 4 h与假手术组相比显著降低($P < 0.01$)(表2)。

2.3 胰腺组织学变化 大体观察SAP组成模后20 min后即出现胰腺充血、水肿,时间延长到4 h,胰腺局部出现紫红色坏死灶,中等量血性腹水。SAP并发IAP增高组,胰腺坏死程度进一

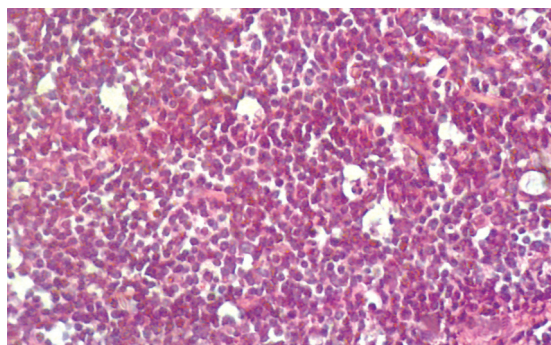


图 1 SAP并发IAH组织学变化(HE × 200).

表 2 SAP+IAH肺组织湿质量/干质量比值 (mean ± SD, n = 7)

分组	1 h	2 h	4 h
Control	4.1 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.4 ± 0.2
SAP	4.9 ± 0.6 ^a	5.0 ± 0.4 ^a	5.8 ± 0.2 ^a
SAP+IAH 2 cmH ₂ O	5.1 ± 0.3 ^b	5.4 ± 0.5 ^b	6.1 ± 0.8 ^b
SAP+IAH 4 cmH ₂ O	5.5 ± 0.4 ^{bc}	5.8 ± 0.7 ^{bd}	6.5 ± 0.3 ^{bd}
SAP+IAH 10 cmH ₂ O	6.2 ± 0.1 ^{bd}	6.8 ± 0.1 ^{bd}	6.9 ± 0.1 ^{bd}

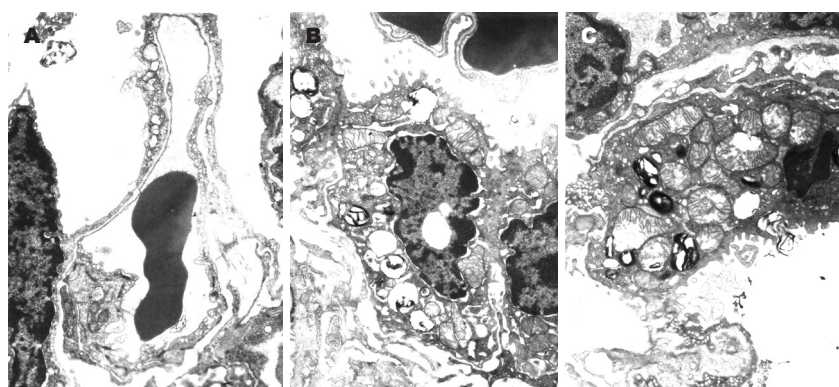
^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 对照组; ^cP<0.05, ^dP<0.01 vs SAP组.

图 2 SAP+IAH大鼠肺组织超微结构变化(TEM × 12 000). A: 毛细血管管腔狭窄; B: 线粒体嵴肿胀; C: 形成凋亡细胞.

步加重, 并伴大量血性腹水. 假手术组无明显变化. 光镜观察SAP组随时间点的延长, 胰腺出血坏死、间质水肿、炎细胞浸润、红细胞渗出的SAP病理变化渐加重. SAP并发IAH增高组在成模后1 h及2 h时间点内, 胰腺的病理改变与SAP组无明显差别. 但随作用时间延长到4 h胰腺出血坏死、间质水肿、炎细胞浸润、红细胞渗出等典型的SAP病理变化进一步加重.

2.4 肺组织学变化 光镜观察假手术组大鼠肺组织, 间质及肺泡腔无出血、水肿及中性粒细胞浸润. SAP组光镜下肺病理改变逐渐加重, 间质及部分肺泡腔有较多中性粒细胞, 毛细血管瘀血, 肺泡腔出血水肿范围较假手术组增高组明显. SAP并发IAH增高组, 光镜下大部分肺泡和间质有中性粒细胞聚积成团, 间质明显增宽, 肺泡腔出血水肿范围50%-75%(图1). 电镜观察SAP组II型肺泡上皮细胞数量增多, 毛细血管管腔狭窄, 血管内皮细胞的胞质内可见丰富的胞内饮泡, 基膜厚薄不均(图2A), II型上皮细胞的核呈固缩状态, 核周隙明显增宽, 板层体呈空泡样, 线粒体嵴肿胀, 细胞表面微绒毛脱失(图2B). SAP并发IAH增高组, II型肺泡上皮细胞核固缩, 细胞内膜结构消失, 形成凋亡细胞, 板层体减少, 脱落(图2C).

3 讨论

IAP的临床病情与腹内压的变化密切相关, 因为IAP的许多病理生理变化能直接或间接导致IAH; 而IAH特别是腹腔间隙综合征对SAP的许多胰外临床表现都具有重要影响作用. IAP导致腹内压增高的因素有: 胰腺体积的增大、胰周积液、后腹膜及周围组织水肿、胃肠道的麻痹扩张、腹腔积液、全身炎症反应综合征(SIRS)引起的多个脏器水肿等. 已有研究表明^[1], ACS是引发多器官功能衰竭的潜在继发因素, 但其发病机制尚不十分清楚. 而ACS造成肺损害的病理改变更是鲜有报道. 特重型AP(也称暴发性胰腺炎)常伴发ACS, 进而带来极高的病死率. 有报道SAP发病凶险, 病死率高达50%, 在发病1 wk内死亡者, 多由于急性肺损伤所致. 可见急性肺损伤与SAP密切相关. 但SAP导致肺损伤的机制尚不清楚. 因此我们通过建立SAP基础上IAH模型, 从病理形态学方面阐明肺损伤的特点, 探讨SAP导致肺损伤的机制. 发现急性肺损伤改变, 如镜下出现肺间质及肺炎性细胞浸润、水肿、出血, 肺泡细胞出现空泡化. 肺泡间隔大量中性粒细胞浸润, 超微结构显示大量中性粒细胞, 单核细胞贴壁并游出血管外, 提示活化的中性粒细胞或单核细胞可能参与了SAP肺损伤.

■名词解释

1 腹内压(Intra-abdominal pressure, IAP) 主要是由腹腔内脏器的静水压产生, 正常情况下IAP平均为0 kPa (1 kPa = 7.5 mmHg), 和大气压相近.

2 腹腔室隔综合征(abdominal compartment syndrome, ACS): 是由于IAP非生理性急剧升高到影响内脏血流及器官组织功能, 并进一步引起一系列不利的病理生理改变所形成的一种临床综合征. 主要临床表现有呼吸道阻力增加、肺顺应性下降甚至进行性缺氧、心输出量减少、周围循环阻力增加、少尿甚至无尿.

■同行评价

SAP可引起IAH, 致膈肌抬高, 胸腔压力随之增高, 肺通气量下降, 肺毛细血管嵌压, 平均毛细血管压升高, 因此, 研究IAH对呼吸发病影响有一定价值. 本实验建立了SAP并发IAH导致大鼠肺损伤的模型, 观察肺脏的功能及组织结构变化, 探讨了SAP并发IAP增高对肺脏的病理损害, 有一定价值. 建议进一步深入进行其缺血再灌注损伤、血管活性物质的释放以及氧自由基等机制研究.

但是, SAP基础上IAH引起的肺损害程度要重于SAP组, 这说明IAP增高帮助加重了肺损害的程度, 是造成呼吸衰竭的机制之一.

过去关于SAP并发急性呼吸衰竭的研究中, 重点多放在由胰源性毒素、炎性介质^[2]、微循环障碍等因素所导致的急性呼吸窘迫综合征方面, 而对SAP并发IAH形成ACS导致肺损伤的机制鲜有研究. 最近也有学者提出, SAP所并发的急性呼吸衰竭, 不单纯是急性呼吸窘迫综合征所造成的, ACS也起到重要作用. ACS发生肺损害的机制目前认为主要与血管渗漏^[3]、缺血再灌注损伤、血管活性物质的释放以及氧自由基等综合作用相关. 我们建立SAP基础上并发IAH的肺损伤模型, 由于动物死亡的原因只观察了4 h, 而SAP基础上并发IAH后远期肺损害的发生机制, 除了胰蛋白酶、中性粒细胞、磷脂酶A₂、蛋白酶/抗蛋白酶系统失衡、游离脂肪酶等介导性损伤外, 可能与SAP后脏器缺血/再灌注

损伤、弹性蛋白酶、血小板活化因子、内源性细菌/内毒素移位等介导性损伤的关系更为密切, 尚有待于进一步探讨和研究. 我们通过建立SAP并发ACS导致肺损伤的动物模型, 为进一步探讨SAP并发ACS导致肺损害的机制以及防治对策提供了一种较为理想的实验手段.

4 参考文献

- 1 Hobson KG, Young KM, Ciraulo A, Palmieri TL, Greenhalgh DG. Release of abdominal compartment syndrome improves survival in patients with burn injury. *J Trauma* 2002; 53: 1129-1133; discussion 1133-1134
- 2 Gross V, Leser HG, Heinisch A, Scholmerich J. Inflammatory mediators and cytokines--new aspects of the pathophysiology and assessment of severity of acute pancreatitis? *Hepatogastroenterology* 1993; 40: 522-530
- 3 Marx G, Vangerow B, Burczyk C, Gratz KF, Maassen N, Cobas Meyer M, Leuwer M, Kuse E, Rueckholdt H. Evaluation of noninvasive determinants for capillary leakage syndrome in septic shock patients. *Intensive Care Med* 2000; 26: 1252-1258

电编 张敏 编辑 潘伯荣

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

• 消息 •

欢迎订阅 2006 年《世界华人消化杂志》

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

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

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

幽门螺杆菌5种候选疫苗抗原基因的克隆、表达及抗原性的鉴定

宁云山, 李妍, 龙敏, 董文其, 李明

宁云山, 李妍, 龙敏, 董文其, 李明, 南方医科大学生物技术学院 广东省广州市 510515

宁云山, 2001年第一军医大学博士, 副教授, 主要从事蛋白质与抗体工程研究。

通讯作者: 李明, 510515, 广东省广州市同和, 南方医科大学生物技术学院. mingli@fimmu.com

电话: 020-61648550 传真: 020-61648550

收稿日期: 2006-03-08 接受日期: 2006-05-24

Cloning, expression and antigenicity identification of five candidate vaccine antigen genes of human *Helicobacter pylori*

Yun-Shan Ning, Yan Li, Min Long, Wen-Qi Dong, Ming Li

Yun-Shan Ning, Yan Li, Min Long, Wen-Qi Dong, Ming Li, School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Correspondence to: Dr. Ming li, School of Biotechnology, Southern Medical University, Tonghe, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. mingli@fimmu.com

Received: 2006-03-08 Accepted: 2006-05-24

Abstract

AIM: To construct a recombinant plasmid containing genes encoding Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, UreaseB from *H pylori*, express it in *E.coli* and explore the antigenicity.

METHODS: The genes, encoding Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, and UreaseB, were amplified from *H pylori* chromosomal DNA by polymerase chain reaction (PCR), and then T-A was cloned and sequenced. The target genes cloned into pGEX-4T-1 fusion expression vector were expressed in *E.coli* and purified by GST-affinity chromatography. The purified products were used to identify 29 strains of mouse monoclonal antibodies (mAbs) against *H pylori*, and the antigenicity of the products was analyzed by Western blot with serum of *H pylori*-infected patients.

RESULTS: Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, and UreaseB fragments were 528 bp, 351 bp, 675 bp, 855 bp, and 1704 bp in length, respectively (Gen-

Bank submission No. DQ106902, DQ141574, DQ141577, DQ141575, and DQ141576, respectively), and the nucleotide homology was 95%-99% with other *H pylori* strains. Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, and UreaseB fusion protein were expressed with molecular weights of 48 000, 41 000, 52 000, 6 0000, and 91 000 Da in *E.coli* respectively. Of 29 anti-*H pylori* mouse mAbs, there were 4, 5, 5, 1, and 6 strains against Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, and UreaseB. Western blot proved that five recombinant proteins were specifically recognized by the serum of *H pylori*-infected patients.

CONCLUSION: Five recombinant proteins, Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, and UreaseB, preserve original antigenicity.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Candidate vaccine antigen; Cloning; Gene expression; Antigenicity

Ning YS, Li Y, Long M, Dong WQ, Li M. Cloning, expression and antigenicity identification of five candidate vaccine antigen genes of human *Helicobacter pylori*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(26):2605-2609

摘要

目的: 构建含人 *H pylori* 5种候选疫苗抗原 Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, UreaseB 的编码基因的重组质粒并研究其抗原性。

方法: 应用PCR技术从 *H pylori* 染色体中扩增编码Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, UreaseB的基因片段, 将其T-A克隆和测序, 并与GenBank公布的其他 *H pylori* 菌株基因序列比较, 再将目的基因克隆至融合表达载体pGEX-4T-1上中进行表达, 用GST亲和层析对其进行纯化, 纯化产物用于对29株小鼠抗 *H pylori*-全菌单克隆抗体(mAb)的鉴定及与 *H pylori* 感染患者血清进行Western blot分析。

结果: 扩增的Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, UreaseB基因全长分别为528 bp, 351 bp, 675 bp, 855 bp, 1704 bp (GenBank登录号

■背景资料

人自然感染 *H pylori* 后, 宿主的免疫反应不能有效清除病原菌, 目前临床上常采用联合应用质子泵抑制剂和抗生素的“三联”疗法来控制 *H pylori* 的感染。然而, 药物治疗有很大的局限性。随着 *H pylori* 全基因序列及功能蛋白的揭示, 用免疫方法来防治 *H pylori* 的感染成为可能, 疫苗的研制逐渐成为研究热点。

■研发前沿

Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, Urease B等主要保护性抗原都可作为单独抗原使用,在动物实验中均表现出一定的免疫保护作用,但其保护性具有一定的局限性,因此发展含有两种或两种以上主要保护性抗原组成的多价重组疫苗已成为*H pylori*疫苗研制的方向。

分别为DQ106902, DQ141574, DQ141577, DQ141575, DQ141576),与GenBank公布的其他菌株的核酸序列的同源性在95%-99%,表达Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, UreaseB融合蛋白的相对分子质量分别约为48 000, 41 000, 52 000, 60 000, 91 000 Da, 29株小鼠抗*H pylori*全菌mAb中针对Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, UreaseB抗原的分别为4, 5, 5, 1, 6株, 5种抗原的纯化产物均可被*H pylori*感染患者血清特异性识别。

结论: 重组表达的Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, UreaseB均具有较好的抗原性。

关键词: 幽门螺杆菌; 候选疫苗抗原; 克隆; 基因表达; 抗原性

宁云山, 李妍, 龙敏, 董文其, 李明. 幽门螺杆菌5种候选疫苗抗原基因的克隆、表达及抗原性的鉴定. 世界华人消化杂志 2006;14(26):2605-2609

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2605.asp>

0 引言

1982年澳大利亚罗宾·沃伦和巴里·马歇尔发现一种长期定植于人体胃黏膜的致病菌——幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*), 并因此获得了2005年诺贝尔医学奖。大量研究证实, 自然感染*H pylori*后机体的免疫反应不能清除细菌, *H pylori*的长期感染是慢性消化道疾病如B型(胃窦)胃炎、消化性溃疡、胃黏膜相关淋巴组织(MALT)胃癌等发生、发展的重要原因^[1]。目前在一些发达国家, *H pylori*的感染率虽然有所下降, 但仍存在大量感染者; 而在发展中国家, *H pylori*的感染状况则更为严重。目前临床上常采用抗生素治疗*H pylori*的感染, 虽可在一定程度上治愈感染, 但存在患者的依从性差、耐药菌株产生和反复感染等问题。大量的实验证明, 免疫接种可预防甚至治疗*H pylori*的感染, 所以*H pylori*疫苗的研究具有深远的发展前景。 *H pylori*的抗原成分很多, 目前已发现*H pylori*单一抗原的保护率几乎均低于80%, 2种或2种以上*H pylori*抗原组合的疫苗有理想的保护效果^[2]。我们选取尿素酶A和B (UreaseA, B)、热休克蛋白A (heat shock protein, HspA)、脂蛋白(lipoprotein, Lpp20)、细胞毒素相关基因蛋白(cytotoxin-associated gene A, CagA)等作为研究对象, 利用基因工程技术构建了这5种基因的重组质粒, 并进行了测序和表达, 为*H pylori*疫苗和诊断抗原

的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 *H pylori*感染患者血清(尿素酶实验阳性)和健康正常人血清(尿素酶实验阴性)均来自南方医科大学附属南方医院消化科。 *H pylori*标准株NCTC11639由本校微生物实验室保存; 菌株*E.coli* DH5 α , TOP10和表达载体pGEX-4T-1由本室保存。Taq DNA聚合酶、pMD18-T载体、限制性内切酶、T4连接酶、DNA Marker及蛋白Marker均为TaKaRa公司产品。引物设计参考GenBank收录的*H pylori*国际标准株26695的基因序列, 应用Primer 5.0设计目的基因的PCR引物如下: Lpp20:

P1 5'-GAATTCATGAAAAATCAAGTTAAAAA-3'(EcoR I) P2 5'-GTCGACCTACTTTTAAACCATGCC-3'(Sal I); HspA: P3 5'-GGATCCAAGTTTCAACCATTA GGA-3'(BamH I) P4 5'-GAATTCCTTAGTGTTTTTTGTGATC-3'(EcoR I); UreaseA: P5 5'-GGATCCAAGTTTCAACCATTA AGGA-3'(BamH I) P6 5'-GAATTCCTTAGTGTTTTTTGTGATC-3'(EcoR I); CagA: P7 5'-GGATCCGGAGAAACAATGA CTAAC-3'(BamH I) P8 5'-GTCGACTTCCATATCGCCAAGA-3'(Sal I); UreaseB: P9 5'-GAATTCAAA AAGATTAGCAG -3'(EcoR I) P10 5'-GTCGACGAAAATGCTAAAGA-3'(Sal I), 在每对引物的上、下游引进合适的酶切位点(划线处), 引物由上海博亚和大连TaKaRa公司合成。细菌基因组DNA提取试剂盒、质粒提取试剂盒及切胶回收试剂盒均为TaKaRa公司产品。PVDF电转印膜为Bio-Rad公司产品。HRP-标记的羊抗鼠或羊抗人IgG及链亲霉素标记的二抗为Gibco BRL公司产品。29株小鼠抗*H pylori*全菌mAb由本室制备^[3]。

1.2 方法

1.2.1 重组表达质粒的构建和鉴定 从固体培养基上刮取适量生长状态良好的*H pylori*菌落, 置于PBS缓冲液中, DNA的提取参照细菌基因组DNA提取试剂盒说明进行。用Taq DNA聚合酶, 以提取的*H pylori*染色体DNA为模板, 按照常规PCR条件进行扩增, 60 μ L反应体积。反应条件如下: 预变性95 $^{\circ}$ C 5 min, 变性95 $^{\circ}$ C 60 s, 退火温度Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, UreaseB分别为58 $^{\circ}$ C, 50 $^{\circ}$ C, 50 $^{\circ}$ C, 54 $^{\circ}$ C, 52 $^{\circ}$ C, 时间50 s, 延伸72 $^{\circ}$ C 60 s, 共进行35个循环, 最后一个循环结束后72 $^{\circ}$ C再延伸6 min, 反应产物于10 g/L琼脂糖

■相关报道

第三军医大学邹全明教授成功研制的国家I类新药——口服重组*H pylori*疫苗, 就是分离、克隆*H pylori*保护性抗原亚单位UreB及HspA基因, 将其融合构建成为LTB为分子内黏膜佐剂的基因工程疫苗候选株, 已进入I、II期临床实验, 这与本文的研究宗旨相符。

凝胶电泳进行分析. 将目的基因与pMD18-T载体进行连接, 以连接产物转化到*E.coli* DH5 α 感受态中. 挑取单个菌落, 37℃, 220 r/min摇过夜, 提取质粒, 进行双酶切鉴定, 将鉴定正确的重组质粒送上海博亚公司进行测序. 重组目的基因/pMD18-T进行双酶切, 表达载体pGEX-4T-1也用相同的酶进行双酶切. 将切胶纯化的目的基因和表达载体按4:1(摩尔数)用T4 DNA连接酶进行连接, 反应体积10 μ L, 于16℃连接过夜. 将连接产物转化到*E.coli* TOP10感受态中, 涂于含氨苄青霉素(100 mg/L)LB固体培养基平板中. 挑取单个菌落, 37℃, 220 r/min摇过夜, 提取质粒, 进行双酶切鉴定.

1.2.2 目的基因的表达及产物的纯化 将鉴定正确的阳性克隆工程菌接种到含氨苄青霉素(100 mg/L)的LB液体培养基中, 37℃, 220 r/min摇过夜菌. 次日, 按1%接种到含氨苄青霉素(100 mg/L)的LB液体培养基中, 当 $A_{600} = 0.7$ 时, 加入1 mol/L的IPTG至终浓度为1 mmol/L, 诱导4 h后收菌, 进行100 g/L SDS-PAGE分析. 表达产物超声破菌后, 在上清和沉淀中都存在目的蛋白, 取上清进行实验. 装Glutathione Sepharose 4B亲和层析柱(1.0 cm \times 20 cm), 用1 \times PBS (pH 7.2-7.4)平衡后, 上样超声破菌后的上清, 流速为1 mL/min, 再以PBS平衡至基线, 用10 mmol/L谷胱甘肽洗脱, 收集各蛋白峰进行SDS-PAGE分析.

1.2.3 ELISA法鉴定抗*H. pylori*鼠mAb 将纯化后的5种蛋白分别包被酶标板(5 mg/L), 依次加入本室制备的29株抗*H. pylori*鼠mAb及HRP-标记的羊抗鼠IgG, TMB底物显色, 用酶标仪于波长450 nm测定吸光度(A)值.

1.2.4 重组抗原的Western blot分析 将纯化后的5种蛋白进行SDS-PAGE, 然后将凝胶上的蛋白转移至NC膜上, 依次滴加健康正常人血清、*H. pylori*感染患者血清进行反应, 二抗为HRP-标记的羊抗人IgG, 每步均经温育和洗涤. 暗室内将杂交后NC膜放入显色盒内, 加上混合好的显色液2 mL, 约1 min, 出现明显的蛋白带者为阳性.

2 结果

2.1 重组表达质粒的构建和鉴定 琼脂糖凝胶电泳分析, PCR扩增目的基因DNA片段的大小同预计的结果相符(图1). 重组目的基因/pMD18-T质粒用双脱氧核苷酸法测序后分析, Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, UreaseB基因全长分别528, 351, 675, 855, 1704 bp, 与GenBank上公布

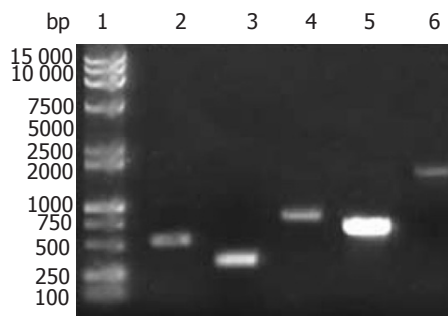


图1 琼脂糖凝胶电泳分析PCR扩增的目的基因. 1: DNA Marker; 2: Lpp20; 3: HspA; 4: CagA; 5: UreaseA; 6: UreaseB.

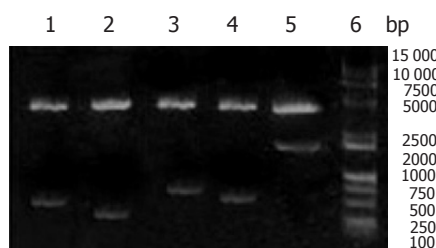


图2 重组表达质粒的双酶切鉴定. 1: Lpp20/pGEX-4T-1 (*EcoR* I 和 *Sal* I); 2: HspA/pGEX-4T-1 (*Bam* H I 和 *EcoR* I); 3: CagA/pGEX-4T-1 (*Bam* H I 和 *Sal* I); 4: UreaseA/pGEX-4T-1 (*Bam* H I 和 *EcoR* I); 5: UreaseB/pGEX-4T-1 (*EcoR* I 和 *Sal* I); 6: DNA Marker.

的其他菌株核酸序列相比, 同源性为95%-99%, 在GenBank上登录这些序列, 登录号分别为DQ106902, DQ141574, DQ141577, DQ141575, DQ141576. 将重组表达质粒用相应的双酶切进行鉴定, 切出大约5000 bp表达载体和目的基因片段, 同预期的结果相符(图2).

2.2 目的基因的表达及产物的纯化 将含目的基因/pGEX-4T-1的工程菌在IPTG的诱导下在大肠杆菌中表达, 表达产物经SDS-PAGE分析, Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, UreaseB分别表达分子质量约为48 000, 41 000, 52 000, 60 000, 91 000 kDa的融合蛋白(图3). 将表达产物超声破菌后, 上清和沉淀中都有目的蛋白的存在, 取上清进行亲和层析纯化. 纯化后的目的蛋白进行SDS-PAGE分析, 纯度均达到90%以上(图4).

2.3 ELISA鉴定抗*H. pylori*鼠mAb 应用ELISA法鉴定29株小鼠抗*H. pylori*全菌mAb, 针对Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, UreaseB抗原的mAb分别为4, 5, 5, 1, 6株, 说明重组目的抗原具有很好的抗原性.

2.4 重组目的抗原与*H. pylori*感染者血清的反应性 Western blot结果显示, 5种抗原均与*H. pylori*感染患者血清有特异性反应, 反应条带与预期大小一致(图5), 而与健康正常人血清没有反应.

■创新盘点

本文从*H. pylori*标准株NCTC11639中获取Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, UreaseB基因, 登录到GenBank上, 这是关于NCTC11639菌株这些基因在GenBank上的首次登录, 与GenBank上公布的其他*H. pylori*菌株(如26695, J99)相应的核酸序列相比具有高度的同源性.

■名词解释

亲和层析(affinity chromatography): 利用共价连接有特异配体的层析介质分离蛋白质混合物中能特异结合配体的目的蛋白或其他分子的层析技术。

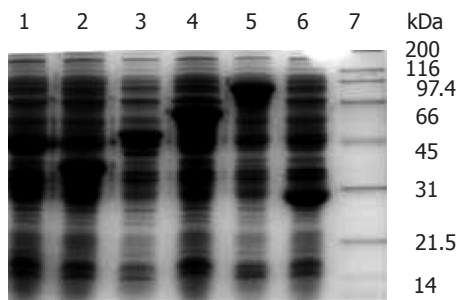


图 3 SDS-PAGE分析目的基因在大肠杆菌中的表达产物。1: Lpp20/pGEX-4T-1; 2: HspA/pGEX-4T-1; 3: UreaseA/pGEX-4T-1; 4: CagA/pGEX-4T-1; 5: UreaseB/pGEX-4T-1; 6: GEX-4T-1; 7: protein Marker。

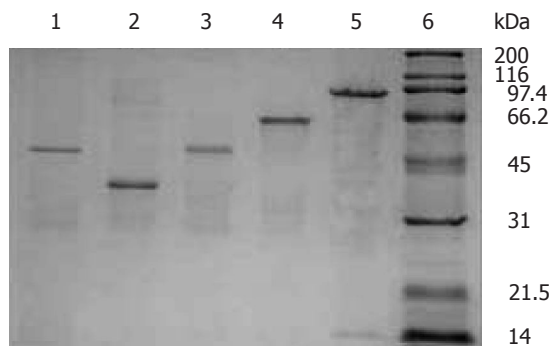


图 4 SDS-PAGE分析纯化后的蛋白。1: Lpp20; 2: HspA; 3: UreaseA; 4: CagA; 5: UreaseB; 6: protein Marker。

3 讨论

从幽门螺杆菌疫苗的研究进展上看,理想的疫苗候选抗原应该具有特异性、保守性、低毒性、能够定位于病原的表面等特征。Lpp20蛋白是定位于*H pylori*外膜上的一种高度保守的脂蛋白,将经*H pylori*全菌蛋白免疫家兔制备的抗血清,用于与细菌的蛋白组分进行反应时,发现Lpp20蛋白是抗体识别的主要抗原组分^[4]。将Lpp20经口免疫小鼠,能诱导出特异性的IgG抗体的产生。将这种抗体的杂交瘤细胞回输到小鼠体内后,能显著减少细菌的感染量,表明Lpp20是一种理想的疫苗候选抗原^[5]。HspA是*H pylori*共有的抗原成分,在不同的*H pylori*菌株间氨基酸序列高度保守,且HspA位于细菌表面,易被宿主识别,与*H pylori*诱导的胃黏膜炎症密切相关^[7],HspA诱发机体产生保护性免疫反应也已得到证实^[6]。CagA基因和CagA蛋白是*H pylori*毒力菌株的基因型和表型的标志。I型(高毒株)分泌的CagA蛋白与消化性溃疡、萎缩性胃炎及胃癌的发生密切相关^[7]。另外,CagA还具有良好的免疫保护性,在小鼠体内已证实可以预防和根治*H pylori*的感染,因此可作为研制

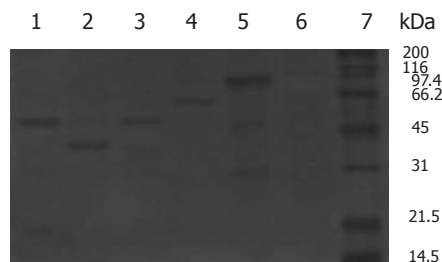


图 5 免疫印迹分析。1: Lpp20; 2: HspA; 3: UreaseA; 4: CagA; 5: UreaseB; 6: health serum; 7: protein Marker。

*H pylori*疫苗的候选抗原^[8]。Urease是*H pylori*最为保守和最为确定的一种保护性抗原成分,他由A, B 2个亚单位组成,以B亚单位的免疫反应性最强,能引起*H pylori*感染患者血清中抗该菌的IgG和IgA显著升高^[9]。应用细菌的超声粉碎抗原、纯化UreaseB作为抗原免疫动物取得了较好的免疫预防和治疗效果^[10]。从*H pylori*菌体中分离各种抗原十分困难,我们采用PCR方法从*H pylori*标准株NCTC11639中获取Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, UreaseB基因,登录到GenBank上(登录号为DQ106902, DQ141574, DQ141577, DQ141575, DQ141576),与GenBank上公布的其他*H pylori*菌株相应的核酸序列相比具有高度的同源性。我们首先将基因进行T-A克隆,可克服直接酶切PCR产物效率不高的弊端。在此基础上,再将基因克隆入pGEX-4T-1融合表达的载体中,由于pGEX-4T-1含有GST的融合表达标签,所以融合表达的各种蛋白可用GST亲和层析进行纯化。纯化后的各种蛋白用于对29株小鼠抗*H pylori*全菌mAb筛选,筛选出针对Lpp20, HspA, UreaseA, CagA, UreaseB抗原的抗体分别为4, 5, 5, 1, 6株,Western blot分析重组表达的各种蛋白可与*H pylori*感染的患者血清发生特异性反应,可见重组蛋白具有很好的抗原性。

4 参考文献

- 1 Losonsky GA, Kotloff KL, Walker RI. B cell responses in gastric antrum and duodenum following oral inactivated *Helicobacter pylori* whole cell (HWC) vaccine and LT(R192G) in *H pylori* seronegative individuals. *Vaccine* 2003; 21: 562-550
- 2 Bumann D, Jungblut PR, Meyer TF. *Helicobacter pylori* vaccine development based on combined subproteome analysis. *Proteomics* 2004; 4: 2843-2848
- 3 李妍, 宁云山, 洪燕华, 刘宜楚, 罗军, 龙敏, 董文其, 李明. 抗幽门螺杆菌单克隆抗体的制备与鉴定. *南方医科大学学报* 2006; 26: 425-427
- 4 Kostrzynska M, O'Toole PW, Taylor DE, Trust TJ. Molecular characterization of a conserved 20-kilodalton membrane-associated lipoprotein

- antigen of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 1994; 176: 5938-5948
- 5 Keenan J, Oliaro J, Domigan N, Potter H, Aitken G, Allardyce R, Roake J. Immune response to an 18-kilodalton outer membrane antigen identifies lipoprotein 20 as a *Helicobacter pylori* vaccine candidate. *Infect Immun* 2000; 68: 3337-3343
- 6 Marchetti M, Arico B, Burrioni D, Figura N, Rappuoli R, Ghiara P. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science* 1995; 267: 1655-1658
- 7 Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN, Nomura A. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1995; 55: 2111-2115
- 8 Webb PM, Crabtree JE, Forman D. Gastric cancer, cytotoxin-associated gene A-positive *Helicobacter pylori*, and serum pepsinogens: an international study. The Eurogst Study Group. *Gastroenterology* 1999; 116: 269-276
- 9 Perez-Perez GI, Cutler AF, Blaser MJ. Value of serology as a noninvasive method for evaluating the efficacy of treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 1038-1043
- 10 Gomez-Duarte OG, Lucas B, Yan ZX, Panthel K, Haas R, Meyer TF. Protection of mice against gastric colonization by *Helicobacter pylori* by single oral dose immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* producing urease subunits A and B. *Vaccine* 1998; 16: 460-471

■同行评价

幽门螺杆菌与消化性溃疡、胃癌等疾病的发病关系密切, 如何有效的杀灭体内 *H. pylori*, 是研究的热点. 本研究构建了5种 *H. pylori* 候选疫苗抗原, 并检测了这些疫苗的抗原性, 为今后 *H. pylori* 检测试剂和疫苗的研究奠定基础. 该研究选题新颖, 设计合理, 结果可靠.

电编 张敏 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 •

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.

饮酒对慢性乙型病毒性肝炎患者肝脏炎症和纤维化的病理影响

牛凤丽, 洪尚游, 万谟彬

■背景资料

肝炎病毒感染与酒精对肝损害可能存在协同作用。国外的研究多集中于酒精性肝病合并丙型肝炎病毒感染。我国多集中于酒精性肝病中合并乙型肝炎的临床流行病学研究, 对酒精和乙型肝炎相互影响的深入研究却未见报道。目前尚无全面而统一的肝炎病毒感染合并酒精性肝病的病理评价标准。

■研发前沿

酒精性肝病与慢性病毒性肝炎存在明显相关性, 目前该领域主要集中于酒精和HBV对肝细胞和肝炎症动物模型的机制探讨, 缺乏对临床资料的系统性研究, 酒精和HBV两者对患者肝损害的影响和相互作用更是有待深入研究。如何以量化指标客观评价肝脏损害程度一直是肝脏病学者探讨的课题。

牛凤丽, 同济大学附属东方医院急诊创伤医学部 上海市 200120

洪尚游, 万谟彬, 长海医院慢性肝病病房 上海市 200433

牛凤丽, 2002年上海第二医科大学硕士研究生, 主治医师, 主要从事消化系统疾病研究。

通讯作者: 牛凤丽, 200120, 上海市即墨路150号, 同济大学附属东方医院急诊创伤医学部. niufengli@yahoo.com.cn

电话: 021-38804518-6176

收稿日期: 2006-07-11 接受日期: 2006-07-31

Impact of alcohol intake on liver inflammation and fibrosis in patients with chronic hepatitis B

Feng-Li Niu, Shang-You Hong, Mo-Bin Wan

Feng-Li Niu, Emergency Trauma Medical Board, Oriental Hospital Affiliated to the University of Tongji, Shanghai 200120, China

Shang-You Hong, Mo-Bin Wan, Hepatopathy Ward, Changhai Hospital, Shanghai 200433, China

Correspondence to: Feng-Li Niu, Emergency Trauma Medical Board, Oriental Hospital Affiliated to the University of Tongji, Shanghai 200120, China. niufengli@yahoo.com.cn

Received: 2006-07-11 Accepted: 2006-07-31

Abstract

AIM: To pathologically investigate the roles of alcohol in hepatic injuries in patients with chronic hepatitis B.

METHODS: A total of 84 patients were divided into 3 groups (alcohol intake, simple chronic hepatitis B, and chronic hepatitis B plus alcohol intake, named group A, B and C, respectively), which enrolled 21, 30 and 33 cases, respectively. Pathological changes including inflammatory activity, fibrosis and fatty degeneration in sections of liver biopsy from the patients were analyzed retrospectively by semi-quantitative evaluation.

RESULTS: The inflammatory activity (8.73 ± 6.93 vs 5.20 ± 3.41 , $P < 0.05$) and fibrosis index (7.67 ± 5.34 vs 5.40 ± 3.94 , $P < 0.05$) were significantly increased in group C than those in group B. The degrees of fatty degeneration in both group A (38.57 ± 22.77) and C (43.58 ± 21.80) were more

severe than those group B (6.83 ± 12.81)(all $P < 0.05$). Multiple stepwise linear regression analysis showed that the daily alcohol intake had significant correlation with the severity of hepatic inflammation and fibrosis ($R^2 = 0.673$, $P = 0.000$; $R^2 = 0.559$, $P = 0.000$), and the pathological severity of hepatic fibrosis was correlated with the daily and accumulated alcohol intake ($R^2 = 0.650$, $P = 0.000$).

CONCLUSION: Alcohol intake, especially daily intake, is correlated with the degrees of hepatocellular injury, resulting in the deterioration of chronic hepatitis B.

Key Words: Alcohol intake; Alcoholic liver disease; Hepatitis B virus; hepatitis B; Liver pathology

Niu FL, Hong SY, Wan MB. Impact of alcohol intake on liver inflammation and fibrosis in patients with chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(26):2610-2612

摘要

目的: 从病理角度研究饮酒对慢性乙型病毒性肝炎(CHB)患者肝脏炎症和纤维化的影响。

方法: 回顾性分析84例有肝活检的患者, 分为单纯饮酒组、单纯CHB组、CHB合并饮酒组。以半定量的方法分析并评价肝穿活检病理的炎症活动度、纤维化程度及脂肪变性程度。

结果: 在饮酒的CHB患者的病理下炎症活动度、纤维化程度及脂肪变性程度(8.73 ± 6.93 , 7.67 ± 5.34 , 43.58 ± 21.80)均显著高于单纯CHB组(5.20 ± 3.41 , 5.40 ± 3.94 , 6.83 ± 12.81 , P 均 <0.05)。多元线性逐步回归分析显示, 每日饮酒量分别与病理下炎症活动度及脂肪变性程度的加重相关($R^2 = 0.673$, $P = 0.000$; $R^2 = 0.559$, $P = 0.000$), 每日饮酒量和累积饮酒量与病理下纤维化程度的加重相关($R^2 = 0.650$, $P = 0.000$)。

结论: 饮酒、尤其每日饮酒量与肝细胞损害

程度有关,可明显加重CHB的病情。

关键词: 饮酒; 酒精性肝病; 乙型肝炎病毒; 乙型病毒性肝炎; 肝脏病理

牛凤丽, 洪尚游, 万漠彬. 饮酒对慢性乙型病毒性肝炎患者肝脏炎症和纤维化的病理影响. 世界华人消化杂志 2006;14(26):2610-2612

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2610.asp>

0 引言

饮酒和乙型肝炎病毒(HBV)感染是我国公认的慢性肝病之两大主要原因^[1],而饮酒对慢性乙型病毒性肝炎(CHB)患者肝脏影响的病理研究报道较少.我们将对我院有完整肝活检病理资料的住院患者的病理资料进行回顾性半定量分析,分析评价肝活检标本的病理改变,旨在深入探讨饮酒对CHB肝损害的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 1998-01/1999-12住院并有肝活检完整病理资料的患者.肝活检使用14G的活检枪进行,活检组织长度均 ≥ 1 cm. CHB符合2000-09西安联合修订的病毒性肝炎的诊断标准^[2],并且CHB病史不少于5 a.酒精性肝病符合2002-10南京会议制定的酒精性肝病诊断标准^[3]. CHB合并饮酒: CHB病史时间长于饮酒时间;饮酒的情况和酒精性肝病诊断标准中的饮酒标准一致.累积饮酒量 = 平均饮酒量(g/d) \times 365 \times 饮酒期间(a).依标准入选CHB合并饮酒的患者33例(简称乙肝并饮酒组),平均年龄35.6岁.从同期病例中取曾做肝活检的酒精性肝病患者21例(简称单纯饮酒组)作为饮酒对照组,平均年龄36.4岁;从同期曾做肝活检的单纯CHB病例中(简称单纯乙肝组)随机抽取30例作为肝炎对照,平均年龄33.8岁,均为男性,各组间性别、年龄均无明显差别,研究具有可比性。

1.2 方法 每例均有连续切片,作HE染色和Masson网织染色.将所有切片依随机表重新随机编号,依据王泰龄 *et al*^[4-5]的标准,观察和评价的内容包括炎症活动积分、纤维化程度积分和脂肪变性程度.炎症活动度计分分为汇管区、小叶内、碎屑坏死及桥接坏死4项.纤维化计分分中静脉周和窦周汇管区及纤维隔3项.脂肪变性程度以脂肪变性细胞数占肝细胞总数的百分比直接表示.由两名病理医生完成.评价结果存在差异时,由两人同时再次阅片取得一致结果。

表 1 CHB患者肝脏炎症、纤维化和脂肪变性积分结果 (mean \pm SD)

分组	炎症 (计分)	纤维化 (计分)	脂肪变性 (%)
单纯饮酒	2.43 \pm 1.78 ^b	3.57 \pm 3.22 ^b	38.6 \pm 22.8
乙肝并饮酒	8.73 \pm 6.93	7.67 \pm 5.34	43.6 \pm 21.8
单纯乙肝	5.20 \pm 3.41 ^b	5.40 \pm 3.94 ^a	6.8 \pm 12.8 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 乙肝并饮酒组。

统计学处理 计量资料以mean \pm SD表示,两样本均数比较用 t 检验,相关因素采用多元线性回归及逐步回归法, $\alpha_{\text{入}} = 0.10$, $\alpha_{\text{出}} = 0.15$. 统计过程由SPSS 11.0完成。

2 结果

2.1 肝脏炎症、纤维化和脂肪变性 各组患者肝脏炎症、纤维化和脂肪变性积分结果中,乙肝并饮酒组的肝脏炎症积分显著高于单纯乙肝组($P = 0.001$),又明显高于单纯饮酒组($P = 0.000$).单纯乙肝组的炎症,明显重于单纯饮酒组($P = 0.002$,表1).乙肝并饮酒组的肝脏纤维化积分显著高于单纯乙肝组($P = 0.044$),同时也显著高于单纯饮酒组($P = 0.001$);单纯乙肝组的肝脏纤维化积分与单纯饮酒组无差别($P = 0.148$,表1).乙肝并饮酒组的脂肪变性程度显著重于单纯乙肝组($P = 0.000$);而乙肝并饮酒组和单纯饮酒组之间无差别($P = 0.357$).

2.2 肝脏病变与饮酒的关系 肝脏炎症(Y_1)与饮酒量(X_1)、饮酒时间(X_2)和累计饮酒量(X_3)的关系,逐步回归分析显示,仅 X_1 进入回归方程[回归系数为0.006 943(常数项: 1.972);回归系数标准误为0.009(常数项: 0.805);标准回归系数0.820; $t = 7.991$ (常数项: 2.448); $P = 0.000$ (常数项: 0.020).方程的决定系数 $R^2 = 0.673$, $F = 63.850$, $P = 0.000$].说明每日饮酒量与肝脏炎症密切相关,而饮酒时间和累计饮酒量与肝脏炎症不相关.肝脏纤维化(Y_2)与 X_1 , X_2 和 X_3 的关系,逐步回归分析显示,仅 X_1 , X_3 进入回归方程[回归系数 X_1 : 0.007 60, X_3 : 0.003 115(常数项: -1.670);回归系数标准误分别为0.019, 0.001(常数项: 1.381);标准回归系数分别为0.561, 0.322; t 值分别为3.984, 2.292(常数项: -1.209); P 值分别为0.000, 0.029(常数项: 0.236).方程的决定系数 $R^2 = 0.650$, $F = 27.843$, $P = 0.000$].说明饮酒量和累计饮酒量与肝脏纤维化密切相关;饮酒量与肝脏纤维化相关性为0.561,累计饮酒量相关性为0.322;每日

■ 相关报道

王泰龄 *et al*建立了慢性肝炎炎症活动度及纤维化的半定量计分新标准.目前,关于肝脏细胞脂肪变性尚未有半定量计分标准,王泰龄结合我国慢性肝炎的分级、分期标准,建立了反映肝脏脂肪变性的分级标准。

■ 创新盘点

本研究采用炎症活动度及纤维化的半定量积分方法,结合文献中能反映肝脏脂肪变性的分级标准,对曾经行肝活组织检查的慢性肝炎患者的病理标本进行分析,对酒精和乙型肝炎病毒的相互影响进行深入探讨。

■应用要点

本研究的结果加深了酒精与乙型肝炎病毒对肝损害作用结果的认识,对临床诊疗和患者生活方式的指导均具有重要意义,并为深入研究酒精对乙型肝炎病毒的相互作用机制提供了充分的理论依据。

饮酒量大于累计饮酒量与肝脏纤维化的相关性;而饮酒时间与肝脏脂肪变性(Y_3)与 X_1 , X_2 和 X_3 的关系,逐步回归分析显示,仅 X_1 进入回归方程[回归系数为0.438 (常数项: 7.729); 回归系数标准误为0.070(常数项: 6.467); 标准回归系数为0.748; $t = 6.274$ (常数项: 1.226); $P = 0.000$ (常数项: 0.229). 方程的决定系数 $R^2 = 0.559$, $F = 39.368$, $P = 0.000$]. 说明每日饮酒量与肝脏脂肪变性密切相关,而饮酒时间和累计饮酒量与肝脏脂肪变性无关。

3 讨论

临床流行病学研究发现,目前相当数量的CHB患者有饮酒嗜好^[6]. 饮酒是造成肝损害的因素之一. 多数静止期CHB患者往往继续饮酒,造成肝病恶化. 因此,探讨饮酒对CHB的影响的病理学证据具有重要意义. 肝脏活组织检查对肝脏疾病的诊疗占有重要的位置^[7]. 慢性乙型肝炎病毒感染时,对病毒的免疫应答,主要是CD8+杀伤性T淋巴细胞(CD8+CTL). 酒精的代谢产物可直接引起肝损害,也可以引起免疫损伤,其炎症浸润主要是多形核细胞. 本研究结果表明,单纯饮酒对肝损害的影响主要是脂肪变. 炎症和纤维化较轻. 但所有饮酒的肝炎患者比不饮酒的肝炎患者炎症重,表明饮酒可能协同加重病毒性肝炎的肝损害,乙肝并饮酒组的纤维化积分明显高于单纯乙肝组和单纯饮酒组,表明乙型肝炎病毒与摄入的酒精在肝脏纤维化形成和发展方面可能存在协同作用^[8]. 单纯乙肝组患者的脂肪变性程度很轻,表明乙型肝炎病毒对肝脏脂肪变性的作用不明显;乙肝饮酒组和单纯饮酒组之间脂肪变性无差别,但显著重于单纯乙肝组,表明酒精本身可导致脂肪变性^[9]. 患者的肝脏损害,可因饮酒而加重;而饮酒作为肝脏损害因素可更详细地从每日饮酒量、饮酒时间和累积饮酒量等方面进行深入的探讨. 以每日饮酒量、饮酒时间和累积饮酒量为自变量,分别以肝脏

炎症程度、纤维化的程度和脂肪变性程度为应变量,用逐步回归法进行多元线性回归分析. 分析结果表明,肝脏炎症程度和脂肪变性程度的加重,主要与每日饮酒量相关. 从作用大小上讲,每日饮酒量对加重肝脏炎症程度和脂肪变性程度分别起到67.3%和55.9%的作用,也就是说,每日饮酒量对加重肝脏炎症程度和脂肪变性程度均分别起主要作用,而饮酒时间(a)和累积饮酒量的作用不大. 分析结果还表明,肝脏纤维化程度的加重,与每日饮酒量和累积饮酒量相关,后两者起到的作用占65%. 从方程的标准化系数可以看出,在加重肝脏纤维化程度方面,每日饮酒量的作用大于累积饮酒量的作用.

总之,饮酒与乙型肝炎病毒对肝脏组织的损害可能存在协同作用;每日饮酒量与肝脏炎症程度和脂肪变性程度的加重相关,而纤维化程度的加重,与每日饮酒量和累积饮酒量相关,这对指导临床诊疗有重要意义.

4 参考文献

- 1 汪正辉,王泰龄. 酒精性肝病. 北京:中国医药科技出版社,2001:3-11
- 2 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎的诊断标准. 中西医结合肝病杂志 2001; 11: 56-60
- 3 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 酒精性肝病诊断标准(草案). 中华肝病杂志 2001; 9: 264
- 4 王泰龄,刘霞,周元平,何静雯,张晶,李宁章,段钟平,王宝恩. 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; 6: 195-197
- 5 王泰龄. 酒精性肝病的病理诊断标准分级、分期与分类. 中华肝病杂志 2001; 9: 312-313
- 6 刘厚钰. 我国酒精性肝病研究现状与展望. 中华消化杂志 2002; 22: 389-390
- 7 Arie J, Zuckerman, Howard C, Thomas. Viral Hepatitis. Second edition. Beijing: Science Press, 2001: 613-625
- 8 Wang BY, Liu DP, Fu BY, Cao YX. Relationship between establishment of experimental alcoholic liver fibrosis model and serum fibrosis marks. *J Gastro Hepat* 2000; 15: 1218
- 9 Bode C, Bode JC. Effect of alcohol consumption on the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 17: 575-592

电编 张敏 编辑 潘伯荣

■同行评价

本研究立题依据充分,虽然是回顾性研究,但病例收集合理,病理组织学观察和评价规范,统计学处理科学、可靠、有一定难度,文章简洁,论点明确,结果可信,有较好的先进性和科学性。

细胞间黏附分子与胃癌侵袭、转移关系的研究进展

陈天池, 魏品康

陈天池, 魏品康, 上海市长征医院中医科 上海市 200003
通讯作者: 陈天池, 200003, 上海市凤阳路415号, 上海长征医院
中医科, phoenixctc@yahoo.com.cn
电话: 021-63610109-73188
收稿日期: 2006-06-16 接受日期: 2006-08-10

摘要

细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)是体内重要的细胞活性分子, 不仅参与了机体免疫过程及炎症反应, 而且还通过与其相应配体的结合, 介导癌细胞与不同细胞、基质的黏附, 最终使癌细胞逃避免疫监视, 利于侵袭转移。近年来, 对ICAM-1与恶性肿瘤侵袭转移关系的研究已成为研究热点, 其在肿瘤侵袭转移中的作用日益受到众多学者的重视。现就其近年的文献从ICAM-1的结构、生物学特征、在胃癌组织中的表达及作用机制等几个方面作一综述。

关键词: 胃癌; 侵袭; 转移; 细胞间黏附分子-1

陈天池, 魏品康. 细胞间黏附分子与胃癌侵袭、转移关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(26):2613-2616
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2613.asp>

0 引言

胃癌是消化道常见的恶性肿瘤, 易发生淋巴转移和血道转移。由于胃癌手术时多已存在微转移灶, 故胃癌患者行根治术后, 仍有25%-30%的患者术后出现复发转移。胃癌远处转移是胃癌患者的主要死亡原因。细胞黏附是肿瘤侵袭转移过程中的重要环节, 其中研究较多的是细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)。ICAM-1是体内重要的细胞活性分子, 不仅参与了机体免疫过程及炎症反应, 而且还通过与其相应配体的结合, 介导肿瘤细胞与不同细胞、基质的黏附, 最终使癌细胞逃避免疫监视, 利于侵袭转移。

1 ICAM-1的结构及生物学特性

ICAM-1又称CD54, 属黏附分子免疫球蛋白超家族(IgSF)成员之一。ICAM-1存在于多种细胞

表面, 是介导细胞间黏附的单链糖蛋白, 相对分子质量为80-110 kDa, 随分布细胞种类的不同而有差异。这种差异主要是由于该分子的糖基化程度的不同造成。ICAM-1由胞外片段、穿膜片段、胞质尾部片段组成。其中胞外片段含有5个Ig样的结构域。目前有关ICAM-1的空间位置研究较为明确, 在ICAM-1胞外的5个功能区中(D1-D5), 前2个功能区是与配体结合的主要部位。靠近D1底部的一个酸性氨基酸残基, 在与配体的结合中起关键作用。D1含有金属离子依赖性的黏附部位, 与配体的结合需要二价阳离子 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的参与^[1]。ICAM-1在体内有两种存在形式: 一种为膜型ICAM-1, 其配体为表达于白细胞表面 β_2 整合素的3种分子: 淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1, CD11a/CD18), 巨噬细胞相关复合体(Mac-1, CD11b/CD18)和P150/P95。3种配体均能与血管内皮表面的ICAM-1分子结合, 介导白细胞黏附并穿越内皮。其中ICAM-1/LFA-1的黏附作用最重要, 他与体内抗原递呈细胞功能的调节、T、B淋巴细胞的激活及淋巴细胞与内皮细胞的黏附等免疫反应过程有关。正常情况下, ICAM-1广泛低水平的表达于多种细胞的表面, 如非活化的血管内皮细胞、淋巴细胞、胸腺上皮细胞、成纤维细胞及造血器官中的巨噬细胞、有丝分裂的T淋巴母细胞、扁桃体及Peyer's patches中的树突状细胞。炎症因子、细胞应激、感染等能通过激活ICAM-1基因的转录, 增加ICAM-1的表达。编码人类ICAM-1的基因定位于19号染色体上, 包括7个外显子和6个内含子, 其中ICAM-1的5个Ig样的结构域各被一个独立的外显子编码。在ICAM-1的诱导表达中, 位于ICAM-1基因翻译起始位点上游约200 bp处的NF- κ B结合位点非常重要。用蛋白酶抑制剂阻断F- κ B, 可抑制TNF- α 诱导的ICAM-1的表达^[2]。另一种为可溶型ICAM-1(soluble intercellular adhesion molecule-1, sICAM-1)是存在于机体血清中及其他体液中的可溶性的细胞间黏附分子。其可由外周血中的单个核细胞释放, 体外培养的内皮细胞及多种肿瘤细胞均

■背景资料

近年来, 对ICAM-1与恶性肿瘤侵袭转移关系的研究已成为研究热点。其在肿瘤侵袭转移中的作用日益受到众多学者的重视。研究ICAM-1在胃癌侵袭转移的不同阶段相应的表达水平及与其他细胞因子间的相互作用, 对于进一步明确其在胃癌的发生、发展及转移过程中的作用机制具有重要的意义。

■创新盘点

本文从ICAM-1的结构、生物学特征、在胃癌组织中的表达及作用机制等几个方面作一综述,并提出了研究ICAM-1的重点应放在其与其他细胞因子的相互作用关系的观点。

可释放sICAM-1. 他的来源有两种方式: 一是膜型ICAM-1的胞外片段被特异性蛋白酶水解后脱落形成^[3]; 二是mRNA翻译后不表达于细胞表面, 而是直接分泌入血. sICAM-1与ICAM-1相比, 缺少跨膜区和胞质段, 包含了组成ICAM-1胞外段的D1, D2, D4及D5的全部或大部分片段. sICAM-1保留了ICAM-1的生物学特性, 能与ICAM-1竞争性结合白细胞表面的LEA-1及Mac-1, 从而抑制了ICAM-1/LFA-1依赖性的非MHC限制性淋巴细胞的杀伤作用. 故被认为是膜型ICAM-1的竞争抑制剂^[4].

2 ICAM-1在胃癌中的表达及其机制

许多研究发现, 胃癌组织中ICAM-1的表达较正常对照明显增加, 并与胃癌的淋巴转移有显著相关性. Nasu *et al*^[5]研究了胃癌、胃腺瘤及正常胃组织ICAM-1的表达, 免疫组化显示28例胃癌中12例表达ICAM-1, 11例胃腺瘤中有3例表达, 而正常胃组织中无1例表达, 且ICAM-1的表达在肠型显著高于弥漫型. Koyama *et al*^[6]使用双色流式细胞仪检测胃癌及正常胃黏膜细胞ICAM-1的表达, 结果正常胃黏膜细胞未能测出ICAM-1的表达, 但所有已经转移的胃癌细胞则出现了高水平的表达, 显示了ICAM-1的表达与胃癌的转移存在相关性. 林秋雄 *et al*^[7]通过对幽门螺杆菌(*H pylori*)感染相关的胃癌与ICAM-1的表达关系的研究发现, ICAM-1的表达与*H pylori*感染胃炎及胃癌之间呈正相关. 认为ICAM-1表达情况可提示胃癌发生、发展的潜在危险性. 也有研究发现, ICAM-1在胃癌组织中表达降低, 并与转移、预后呈负相关. Sunami *et al*^[8]报道了胃癌组织中ICAM-1的表达下降, 下降程度与转移淋巴结的数目、大小相关. 为进一步验证结果, 他们将ICAM-1基因转染入2MLN胃癌细胞株, 并在体内外分析其对于淋巴结转移效应. 结果发现大量外周血单核细胞与其黏附, 数量明显超过了2MLN/空质粒细胞, 且2MLN/ICAM-1胃癌细胞的生长速度显著下降, 淋巴结转移数目减少, 形状更小. 组织学显示, 2MLN/ICAM-1胃癌细胞及其转移灶周围有大量白细胞浸润. 认为胃癌细胞过表达ICAM-1时, 淋巴细胞可经ICAM-1/LFA-1途径聚集于癌细胞周围, 发挥细胞毒效应并抑制其转移. 进而提出, 使用ICAM-1基因转染技术对胃癌的淋巴结转移可能是一种有效的基因疗法. Fujihara *et al*^[9]将转移淋巴结原位移植入低转移力的OCUM-2M人胃癌细胞

株内, 建立OCUM-2M LN转移模型, 经流式细胞仪发现OCUM-2M LN细胞株对ICAM-1的表达明显弱于OCUM-2M, 同时观察到在后者细胞株周围, 单核细胞的黏附及细胞毒作用增强. 当加入抗ICAM-1的单抗时, 单核细胞的这两个作用则显著减弱. 这些结果提示, 具有淋巴结高转移力的胃癌细胞株可能是通过低表达ICAM-1, 减弱了LFA-1介导的效应细胞的黏附, 从而逃避免疫监视, 利于转移. 上述关于ICAM-1表达状态的差异, 引起了许多学者的兴趣. Yasuda *et al*^[10]研究发现, 开始阶段癌细胞同时高表达ICAM-1及 β_1 整合素, 当后者与相应细胞外基质或特异性抗体结合后, 癌细胞对ICAM-1的表达显著下调, 而培养基中sICAM-1的浓度明显升高. 进一步实验发现, 这一改变是因为 β_1 整合素在完成与基质如纤维连结蛋白、层连蛋白、I型胶原结合后, 通过酪氨酸激酶信号传导途径的介导阻止了癌细胞对ICAM-1进一步表达, 该种酪氨酸激酶位于细胞质中, 被称为非受体型局部黏附激酶(focal adhesion kinase, FAK), FAK在整合素参与下可自身磷酸化, 所产生的磷酸化位点能与含SH2结构域的胞内蛋白结合, 从而将由整合素促发的多种信号连接起来, 在细胞黏附运动中发挥作用. 由于肿瘤细胞表面ICAM-1表达的下降, 从而逃避了淋巴细胞的黏附、杀伤. 近来又发现了两个与FAK作用相似但氨基酸序列不同的酪氨酸激酶, 黏着斑激酶B(Focal adhesion kinase B, FAK-B)和相关黏着斑酪氨酸激酶(Related adhesion focal tyrosine kinase, RAFTK), 可见FAK是发挥酪氨酸磷酸化作用的酶家族中的一个成员. 关于胃癌患者中sICAM-1的水平, 近年来研究较多. Sonnet *et al*^[11]研究结果显示, 在胃癌患者的外周血中sICAM-1的浓度不同程度高于非胃癌组, 与临床病理特征之间存在正相关, 并可能影响预后. 其主要来源: (1)胃癌细胞合成释放, 可能是丧失跨膜和胞质决定簇的ICAM-1 mRNA片段拼接的结果, 拼接后的mRNA只表达ICAM-1的膜外部分; (2)膜型ICAM-1裂解脱落; (3)细胞死亡碎裂溶解释放. Nakata *et al*^[12]使用ELISA法测定224例胃癌患者及44名正常志愿者的血清sICAM-1滴度, 结果显示, 前者的平均滴度与后者差异无显著性, 但在IV期及复发胃癌患者sICAM-1滴度明显高于无血行转移组, 且高滴度者显示了更差的预后. 认为sICAM-1不能用作胃癌早期诊断的肿瘤标志, 但作为监测血

源性转移的手段很有价值. Kaihara *et al*^[13] 认为, 在早期及进展期胃癌, 血清sICAM-1水平均显著高于健康对照组, 实验还发现, sICAM-1及抗ICAM-1的单抗能使NK细胞的活性明显下降, 提示阻断ICAM-1/LFA-1系统能发挥免疫抑制效应. Yoo *et al*^[14] 同时测定了142例胃癌患者血清sICAM-1浓度, 结果肝转移组患者两指标均明显高于未发生肝转移组($P<0.05$), 认为两指标同步升高可以作为胃癌患者的一个独立危险因素, 对监测胃癌进展及其预后有价值. 国内毛振彪 *et al*^[15] 运用ELISA法定量检测胃癌患者(术前60例、术后15例)及15例对照组血清中sICAM-1的含量. 发现胃癌组血清sICAM-1表达水平明显高于对照组($P<0.01$). 根治术后1 wk血清sICAM-1水平显著下降($P<0.01$); 伴淋巴结转移组血清sICAM-1水平高于不伴有淋巴结转移组($P<0.01$); 胃癌组术前血清sICAM-1与肿瘤浸润度及TNM分期有关, 有浆膜侵及者高于未侵及者($P<0.05$). 结果提示, 血清sICAM-1参与胃癌发生、发展和浸润转移过程的调控, 血清sICAM-1检测对评估胃癌侵袭程序、淋巴结转移和术后残留癌组织有一定价值. 马波 *et al*^[16] 通过采用流式细胞仪对胃癌患者外周血中sICAM-1的水平进行定量测定. 结果sICAM-1在胃癌患者血清中的水平明显高于正常对照组($P<0.01$), 有肝脏转移癌组明显高于无转移癌组($P<0.01$). sICAM-1做为免疫抑制因子阻断了ICAM-1/LFA-1系统功能, 削弱了机体免疫监视能力和对肿瘤细胞的破坏作用, 导致肿瘤细胞不断生长和发生远处转移. 由以上我们可以推测, 同一瘤细胞在迁移黏附的不同阶段, 在周围组织不同细胞、基质接触刺激下表达不同黏附分子, 并相互调节, 各司其职. 在某一阶段, 肿瘤细胞高表达ICAM-1, 通过ICAM-1/LFA-1与浸润淋巴细胞结合, 从而随着淋巴细胞的迁移脱离母瘤进入血循环, 并在穿越血管时免受伤害, 易于在毛细血管内或淋巴窦滞留和坐床, 形成转移灶. 当肿瘤细胞受到细胞外基质刺激时, 又通过表达 β_1 整合素等黏附分子与相应基质结合, 激活酪氨酸激酶通路, 进而改变基因的表达及其相应产物的修饰, 使膜型ICAM-1的表达下降, 而sICAM-1的分泌增加, 并竞争性地与LFA-1淋巴细胞结合, 使瘤细胞再次免遭杀伤. sICAM-1可增强肿瘤细胞与细胞外基质的黏附作用, 具有抑制自然杀伤细胞及细胞毒T细胞的细胞杀伤作用, 使肿瘤细胞得以逃避机体的免疫监视, 抗肿瘤作用减弱.

3 问题与展望

胃癌的侵袭转移是一个长期、复杂的过程, 涉及到众多的细胞因子, 各种细胞因子之间又存在着相互促进或抑制的关系. 这就要求研究者不能单纯从胃癌患者的血清、癌组织中检测ICAM-1/sICAM-1的表达来说明其与胃癌侵袭转移的关系及作用机制, 更应该通过深入研究ICAM-1/sICAM-1与其他细胞因子的相互作用, 进一步明确其在胃癌的发生、发展及转移过程中的作用机制, 从而为开辟胃癌诊断治疗的新途径提供可靠的理论依据.

总之, ICAM-1/sICAM-1是IgSF中的一员, 在胃癌侵袭转移的不同阶段, 癌细胞各有其相应的表达水平. 目的在于介导与不同细胞、基质的黏附, 最终使癌细胞逃避免疫监视, 完成侵袭转移.

4 参考文献

- 1 Wang J, Springer TA. Structural specializations of immunoglobulin superfamily members for adhesion to integrins and viruses. *Immunol Rev* 1998; 163: 197-215
- 2 Kalogeris TJ, Laroux FS, Cockrell A, Ichikawa H, Okayama N, Phifer TJ, Alexander JS, Grisham MB. Effect of selective proteasome inhibitors on TNF-induced activation of primary and transformed endothelial cells. *Am J Physiol* 1999; 276: C856-864
- 3 Lyons PD, Benveniste EN. Cleavage of membrane-associated ICAM-1 from astrocytes: involvement of a metalloprotease. *Glia* 1998; 22: 103-112
- 4 Wakatsuki T, Kimura K, Kimura F, Shinomiya N, Ohtsubo M, Ishizawa M, Yamamoto M. A distinct mRNA encoding a soluble form of ICAM-1 molecule expressed in human tissues. *Cell Adhes Commun* 1995; 3: 283-292
- 5 Nasu R, Mizuno M, Kiso T, Shimo K, Uesu T, Nasu J, Tomoda J, Okada H, Tsuji T. Immunohistochemical analysis of intercellular adhesion molecule-1 expression in human gastric adenoma and adenocarcinoma. *Virchows Arch* 1997; 430: 279-283
- 6 Koyama S, Ebihara T, Fukao K. Expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) during the development of invasion and/or metastasis of gastric carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1992; 118: 609-614
- 7 林秋雄, 李子俊, 骆新兰, 林华欢, 刘婉薇. 幽门螺杆菌感染相关的胃癌与细胞间黏附分子-1的表达关系. *世界医学杂志* 2001; 5: 43-44
- 8 Sunami T, Yashiro M, Chung KH. ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) gene transfection inhibits lymph node metastasis by human gastric cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91: 925-933
- 9 Fujihara T, Sawada T, Hirakawa K, Chung YS, Yashiro M, Inoue T, Sowa M. Establishment of lymph node metastatic model for human gastric cancer in nude mice and analysis of factors associated with metastasis. *Clin Exp Metastasis* 1998; 16: 389-398
- 10 Yasuda M, Tanaka Y, Tamura M, Fujii K, Sugaya M, So T, Takenoyama M, Yasumoto K. Stimulation of

■应用要点

本文提出研究者不能单纯从胃癌患者的血清、癌组织中检测ICAM-1/sICAM-1的表达来说明其与胃癌侵袭转移的关系及作用机制, 更应该通过深入研究ICAM-1/sICAM-1与其他细胞因子的相互作用, 进一步明确其在胃癌的发生、发展及转移过程中的作用机制, 从而为开辟胃癌诊断治疗的新途径提供可靠的理论依据.

■同行评价

本文对近年来国内外对ICAM-1与胃癌侵袭、转移关系的文献进行综述,比较系统、深入,体现了此课题当前研究的最高水平,对相关课题研究有借鉴意义。

- beta1 integrin down-regulates ICAM-1 expression and ICAM-1-dependent adhesion of lung cancer cells through focal adhesion kinase. *Cancer Res* 2001; 61: 2022-2030
- 11 Sonnet E, Massart C, Gibassier J, Allannic H, Maugendre D. Longitudinal study of soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in sera of patients with Graves' disease. *J Endocrinol Invest* 1999; 22: 430-435
- 12 Nakata B, Hori T, Sunami T, Ogawa Y, Yashiro M, Maeda K, Sawada T, Kato Y, Ishikawa T, Hirakawa K. Clinical significance of serum soluble intercellular adhesion molecule 1 in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1175-1179
- 13 Kaihara A, Iwagaki H, Gouchi A, Hizuta A, Isozaki H, Takakura N, Tanaka N. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and natural killer cell activity in gastric cancer patients. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1998; 100: 283-300
- 14 Yoo NC, Chung HC, Chung HC, Park JO, Rha SY, Kim JH, Roh JK, Min JS, Kim BS, Noh SH. Synchronous elevation of soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) correlates with gastric cancer progression. *Yonsei Med J* 1998; 39: 27-36
- 15 毛振彪, 黄介飞, 倪润洲, 倪海兵, 肖明兵, 魏群, 张弘. 可溶性细胞间黏附分子-1在胃癌患者血清中表达的临床意义. *临床内科杂志* 2003; 20: 439-440
- 16 马波, 赵吉生. 可溶性细胞间黏附分子-1与胃癌侵袭关系的研究. *中国实验诊断学* 2001; 5: 61-62

电编 张敏 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。

低氧诱导因子-1与消化道肿瘤的研究进展

周炜, 姜政

■背景资料

HIF-1首先在1992年作为低氧诱导的、连接在EPO基因低氧反应元件上的一个核因子被发现, 涉及细胞能量代谢、离子代谢、儿茶酚胺代谢及血管的发生等。HIF-1作为转录因子, 被激活后可以调控60多种下游基因。具体涉及到VEGF, EPO, iNOS和糖酵解酶等, 从而使肿瘤细胞适应低氧的微环境, 促进肿瘤血管的再生和细胞能量代谢的加强。

周炜, 姜政, 重庆医科大学附属第一医院消化科 重庆市400016

通讯作者: 姜政, 400016, 重庆市, 重庆医科大学附属第一医院消化科. jianggooddoctor@mail.china.com
电话: 023-68891218

收稿日期: 2006-06-05 接受日期: 2006-08-10

摘要

当实体肿瘤处在低氧环境时, 低氧诱导因子(hypoxia inducible factor 1, HIF-1)活性显著增高, 涉及改善低氧条件的基因如VEGF、促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)、iNOS、运铁蛋白、酪氨酸羟化酶、糖酵解酶等大量表达, 从而促进肿瘤血管再生和细胞能量代谢加强。这正是肿瘤细胞通过提高糖酵解速率和多血管体系形成对低氧环境的适应, 使得肿瘤得以生长和转移。由于HIF-1基因在肿瘤细胞中特异性表达和介导肿瘤细胞生长特性, 已成为肿瘤基因治疗的新靶点。所有HIF-1调控的基因, 其启动子或增强子中包含<100 bp的HRE, 其核心序列为5-TACGTGCT-3, 其中有一个或一个以上HIF-1结合位点。HIF-1不仅是肿瘤细胞对低氧反应的主要调控者, 而且与许多肿瘤位点的基因治疗密切相关, 针对常规的化学或药物治疗无效的顽固性恶性肿瘤, 可以利用沉寂HIF-1 mRNA, 达到治疗肿瘤的目的, 因此HIF-1在治疗肿瘤方面具有巨大的潜在优势和广阔的应用前景。

关键词: 低氧诱导因子; RNAi; 肿瘤; 基因治疗

周炜, 姜政. 低氧诱导因子-1与消化道肿瘤的研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(26):2620-2625

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2620.asp>

0 引言

近半个世纪以来, 肿瘤已成为严重威胁人类健康的常见疾病。据世界卫生组织和美国临床肿瘤学会估计, 全世界每年新发生的癌症患者为1000万, 死于癌症的在600-700万人之间, 占死亡人数的12%。几十年来采用外科手术、放射治疗和化疗进行抗癌的力度不断加强, 但其结果至今进展缓慢, 因此人们不断探索肿瘤治疗的新方法。随着分子生物学的飞速发展, 细胞生

长、分化、凋亡的机制逐渐被认识, 一种新的治疗方法——基因治疗正成为研究的热点。基因治疗为肿瘤患者带来了曙光, 可望成为继手术、放疗、化疗和免疫治疗后治疗恶性肿瘤的第五条有效途径。研究表明, 肿瘤细胞最根本的特征是具有无限繁殖的能力, 而肿瘤的生长、侵入和转移却依赖于肿瘤新生血管的形成, 当实体肿瘤处在低氧环境时, HIF-1活性显著增高, 涉及改善低氧条件的基因VEGF、EPO、葡萄糖转运蛋白1和3、血红素氧化酶1、iNOS、运铁蛋白、酪氨酸羟化酶和糖酵解酶等大量的表达, 从而促进肿瘤血管的再生和细胞能量代谢的加强, 导致肿瘤细胞的生物学特性的变化^[1-4], 这正是肿瘤细胞的一种自我保护机制的体现。据研究多数实体肿瘤存在低氧的微环境, 这就预示着肿瘤的治疗、预后不甚满意, 而且这是产生耐药的主要原因之一。由于HIF-1基因在肿瘤细胞中的特异性表达和介导肿瘤细胞生长的特性, 已成为肿瘤基因治疗的新靶点^[5]。近年来以HIF-1为主导的肿瘤靶向治疗在肿瘤的治疗和预防方面提供了一个全新的模式。

1 HIF-1的分子结构特征与分布

1.1 分子结构特征 HIF-1首先在1992年作为低氧诱导的、连接在EPO基因低氧反应元件上的一个核因子被发现的, 涉及细胞能量代谢、离子代谢、儿茶酚胺代谢及血管的发生等。人的HIF-1 α 基因位于14号染色体(14q21-24), 其cDNA全长3720 bp, 开放阅读框2478 bp, 编码826 aa, 5'和3'非翻译区分别有28 bp和1211 bp, 而HIF-1 β 基因位于1号染色体(1q21), 其cDNA全长为2604 bp, 开放阅读框2367 bp, 编码789 aa, 5'和3'非翻译区分别有56 bp和188 bp, HIF-1 β cDNA序列和已知的芳香烃受体核转位蛋白(ARNT)相同, 与HIF-1在核内的稳定性的维持、二聚体形成后构象变化以及DNA结合有关。2个亚单位均为转录因子的碱性螺旋-环-螺旋(basic-helic-loop-helic, bHLH)/PAS(Per-ARNT-Sim)家族成员, 均包含bHLH结构域、PAS结构域以及

羧基末端的反式活化结构域, HLH和PAS结构域共同提供了亚单位之间蛋白二聚化的功能界面. bHLH中的碱性区域(b)介导DNA结合, 特异性识别靶基因中包含5'-RCGTG-3'核心序列的DNA结合位点, 激活靶基因转录. PAS结构域又包括A和B重复序列, 每个重复序列包含一个不变的HXXD结构. HIF-1 α 全长826 aa, 1-390 aa为最适DNA结合所必需, 其中1-166介导其与HIF-1 β 的异二聚化. 羧基端(391-826 aa)包含2个反式活化结构域, N端反式活化结构域(N-TAD)位于531-575 aa, C端反式活化结构域(C-TAD)位于786-826 aa, 二者被抑制结构域隔开. HIF-1主要以异源二聚体形式存在, 以反式活化结构域起作用. 在低氧条件下产生蛋白性调节因子, 与靶基因结合, 促进其下游靶基因VEGF, EPO, iNOS和糖酵解酶等表达, 从而影响血管发生和细胞能量代谢. 所有HIF-1调控的基因, 其启动子或增强子中包含<100 bp的目的基因缺氧应答反应元件(hypoxia response elements, HRE), 其核心序列为5'-TACGTGCT-3', 其中有1个或1个以上的HIF-1结合位点. 当实体肿瘤处在低氧环境时, HIF-1 α 大量表达且活性显著增高, 使其调控的一些涉及改善低氧条件的基因如EPO, VEGF大量表达, 这是肿瘤细胞的一种自我保护机制, 使肿瘤得以生长、转移.

HIF-1作为转录因子, 被激活后可以调节多种下游基因. 目前已发现的HIF-1的目的基因60余种, 其中有4类目的基因蛋白产物与肿瘤关系密切, 包括与血管生成相关的因子、葡萄糖转运与糖酵解酶、与肿瘤侵袭和转移相关的因子及与肿瘤增殖和凋亡相关的蛋白, 具体涉及到VEGF, EPO, iNOS和糖酵解酶等, 从而使肿瘤细胞适应低氧的微环境, 促进肿瘤血管的再生和细胞能量代谢的加强, 导致肿瘤细胞的生物学特性的变化.

1.2 分布 HIF是一类由异源二聚体组成的转录因子, 根据亚单位结构与分布不同, HIF存在3种亚型, HIF-1, HIF-2和HIF-3, 其中HIF-1, HIF-2与肿瘤血管生成较为密切, 尤其HIF-1. 在正常情况下, HIF-1 α 与HIF-2 α 存在高度同源性, 主要分布于胚胎时期的内皮细胞及成人血管丰富的组织, 在生物学行为上两者有一定的相似性, HIF-2 α 与ARNT形成的异源二聚体被称为HIF-2, 研究已证实HIF-2的作用靶基因包括内皮细胞特异性受体Tie与VEGF. HIF-3 α 的aa序列与HIF-1 α 和HIF-2 α 极为相似, 主要分布在成人的心、肺和

肾脏等组织, 与ARNT形成的异源二聚体可能参与介导机体对低氧的反应, 但由于HIF-3 α 分子内未发现转录活性区, 故有学者推测可能是一种反向调节因子. 常氧诱导的HIF-1 α 集中在胞核, 与DNA结合, 转录报告基因和内源性靶基因, P53的表达水平不受影响. 过度表达的HIF-1 α 全集中在细胞核, 但显示只有部分与DNA结合和具有转录活性, MAP激酶抑制剂PD98059减弱HIF-1 α 蛋白的修饰和转录能力, 但不减弱蛋白的稳定以及与DNA结合的能力^[6].

在HIF-1的两个亚单位中, HIF-1 α 对氧的依赖性较强, 起到主要的缺氧调节作用. 影响HIF-1 α 表达及活性的因素主要有以下几类: (1)氧浓度: 在常氧状态下, HIF-1 α 降解发生在转录后水平, 即氧依赖降解区域(oxygen degradation domain, ODD)多肽序列内保守性的脯氨酸残基被羟化, 而后VHL (von Hippel Lindau)抑制蛋白pVHL识别羟化的脯氨酸残基, 并对HIF-1 α 进行识别和降解^[7-8]; 在缺氧状态下, HIF-1 α 的活化是通过对转录激活区内保守性天冬酰胺羟化过程的抑制来实现, 丝裂原活化蛋白酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通过作用于P300-CBP复合物来激活HIF-1 α , 诱导低氧转录^[9]. Fath *et al*^[10]研究表明乙酰化作用于HIF-1 α /p300复合物而调控HIF-1的功能, 而不是直接使HIF-1 α 乙酰化; (2)抑癌基因: p53基因可抑制HIF-1 α 转录激活, 与HIF-1 α 结合并引导HIF-1 α 受MDM₂蛋白酶解系统所降解; PTEN基因通过PI3K-AKT途径调节HIF-1 α 蛋白表达; VHL基因蛋白产物pVHL与elonginB, elonginC, Cul2和bx1结合形成VCBCR复合体, VCBCR属于泛素-蛋白酶家族, 与HIF-1 α 结合, 使HIF-1 α 经泛素-蛋白酶介导的途径水解等, 从而调节HIF-1 α 的活性^[11]; (3)癌基因^[12]: 持续表达pp^{c-src}(src)的细胞在常氧状态下可以表达HIF-1 α 并激活多个HIF-1 α 靶基因; h-ras基因在常氧下诱导HIF-1 α 高表达; c-myc基因直接与HIF-1 α 特异结合的效应元件如乳酸脱氢酶A相互作用, 产生HIF-1 α 样激活作用, 影响HIF-1 α 的下游通路; (4)MSF-A: Amir *et al*^[12]发现哺乳动物septin基因家族成员(MSF-A)和HIF-1系统之间有一种相互作用. MSF-A是一种核内蛋白, 与HIF-1 α 蛋白相互作用以阻止HIF-1的遍在蛋白化和降解, 从而激活HIF-1的转录; (5)一氧化氮和金属化合物: 在常氧状态下, 一氧化氮通过抑制脯氨酸羟化酶减少HIF-1 α 的降解, 而在缺氧状态下通过PI3K和MAPK信号

■ 研发前沿

以肿瘤基因治疗为靶向治疗之所以成为近年来肿瘤治疗学研究热点, 很重要的原因就在于从根本上克服和弥补了传统治疗方法的缺陷与不足, 而成为继手术、放疗、化疗后发展起来的肿瘤治疗的第五大疗法. 由于HIF-1基因在肿瘤细胞中的特异性表达和介导肿瘤细胞生长的特性, 不仅是肿瘤细胞对低氧反应的主要调控者, 而且与许多肿瘤位点的基因治疗密切相关, 针对常规的化学或药物治疗无效的顽固性恶性肿瘤, 可以利用沉默HIF-1 mRNA, 达到治疗肿瘤的目的, 已成为肿瘤基因治疗的新靶点.

■创新盘点

本文系统的介绍了HIF-1结构特征与分布,对其活性的影响因素和作用机制也进行了详细的阐述,并且着重突出了HIF-1在消化道肿瘤中的表达及其应用,明确提出了HIF-1不仅是肿瘤细胞对低氧反应的主要调控者,而且与许多肿瘤位点基因治疗密切相关,在提高消化系统恶性肿瘤的治疗效果、延长生存时间、降低放疗和化疗的副作用方面将发挥重要作用。

通路来实现对HIF-1 α 的降解,而铁、钴、锰和镍金属化合物以及离子螯合物可以促进HIF-1 α 的激活^[13-15],镉则降解HIF-1 α ; (6)其他: Sheta *et al*^[16] 研究表明,与细胞外周低氧有关的旁分泌细胞间相互作用能诱导HIF-1 α 蛋白核定位。最近研究发现,乳腺癌易感基因-1 (BRCA1)在低氧条件下阻断蛋白酶体介导的对HIF-1 α 的降解,至于BRCA1在调控HIF-1 α 作用机制尚需进一步研究^[17],另据研究硫氧还蛋白可稳定HIF-1 α ,并且增强其活性^[18]。

2 HIF-1在恶性肿瘤发生与发展中的作用

研究表明,肿瘤细胞最根本的特征是具有无限繁殖的能力,而肿瘤的生长、侵入和转移却依赖于肿瘤新生血管的形成,没有血管的形成,大多数实体肿瘤长不到2-3 mm以上,既无侵袭性,也不会转移;在已知的促血管生成因子中, VEGF、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和EPO是最强的血管生成刺激物,而且抑制或减少VEGF生物学作用可减少其他促血管物质如bFGF和TGF- β 血管生成能力;研究还提示,这些物质的部分作用是经VEGF的介导。在实体肿瘤患者中, VEGF、EPO、葡萄糖转运蛋白1和3、血红素氧化酶1、iNOS、运铁蛋白、酪氨酸羟化酶、糖酵解酶等水平比健康志愿者高,高血管密度和VEGF等基因的高表达与预后不良呈正相关关系,因此上述基因的表达在肿瘤的发生、发展中起着重要的作用。据研究HIF-1正是介导上述基因转录的启动因子,当实体肿瘤处在低氧环境时, HIF-1活性显著增高,涉及改善低氧条件的基因如EPO, VEGF等的表达会有所增加,这正是肿瘤细胞的一种自我保护机制,使得肿瘤得以生长和转移^[19-20]。据研究多数实体肿瘤存在低氧的微环境,这就预示着肿瘤的治疗、预后不甚满意,而且这是肿瘤产生耐药的主要原因之一。

HIF-1是调控涉及代谢、血管发生、增殖和凋亡基因的转录因子,同时也是血管生成级联中的一个关键性的调控因子。肿瘤新生血管的形成在肿瘤的生长和蔓延中起着重要的作用,新生血管是不成熟的,不同于正常毛细血管,他们扭曲而不规则,同时不依赖于调控毛细血管血流的正常机制,而且肿瘤的微循环是异质的。进展期的肿瘤常常缺氧,在这种情况下,肿瘤细胞表达HIF-1,除了介导上述基因VEGF、EPO、

iNOS和酪氨酸羟化酶、糖酵解酶等转录外,还能诱导释放转化生长因子和表皮生长因子受体(EGFR)。转化因子能招募、激活刺激内皮细胞促使形成新的毛细血管。激活的内皮细胞分泌基质金属蛋白酶,降解基膜、细胞外基质、黏着受体,使内皮细胞在基质中能朝着肿瘤细胞迁移。EGFR能促使肿瘤细胞的增殖以及血管的发生,同时抑制肿瘤细胞的凋亡;他的表达在肿瘤发生中以阶梯式的方式增加,在50%以上的NSCLC肿瘤中过度表达,低氧诱导EGFR及其配位体过度表达,反过来EGFR可能增加HIF-1 α 的表达而提高细胞对低氧的反应,起着缺氧肿瘤细胞存活因子的作用。Dang *et al*^[21]研究发现, HIF-1 α 的丧失明显减少了在活体外和活体内非低氧介导的肿瘤细胞增殖。近期研究发现人肾上腺髓质激素基因也存在与HIF-1 α 结合序列的HRE,并证实HIF-1 α 可介导肾上腺髓质激素的高表达,促进新生血管的形成、细胞有丝分裂和抗细胞凋亡^[22]。另外HIF-1 α 能够诱导COX-2的表达,而COX-2及其合成的前列腺素等均可通过除VEGF以外的bFGF、血小板源生长因子、表皮生长因子、胰岛素样生长因子及TGF- β 等多种途径调节血管的生成,从而肿瘤细胞得以生长及转移^[23]。

3 HIF-1在消化道肿瘤治疗中的应用

3.1 HIF-1在消化道肿瘤中的表达 Zhong *et al*应用免疫组化技术,在19种人类常见恶性肿瘤组织中检测出13种出现HIF-1 α 的过度表达,而且表达的程度与组织缺氧的程度明显相关,而在正常组织和良性肿瘤中均无表达。Wang *et al*^[24] 研究结果显示,低氧增强胃癌细胞中COX-2和低氧诱导血管生成素-2的表达。Stoeltzing *et al*^[25]证实当HIF-1 α 的活性被抑制时,胃癌组织附近新生血管生成受到抑制,限制了肿瘤组织的营养,从而抑制胃癌生长。Urano *et al*^[26]研究结果显示,胃癌患者HIF-1 α 的表达除了受癌基因和抑癌基因如p53, VHL, PTEN的调控外,低氧的诱导作用也是HIF-1 α 过度表达的一个关键因素,同时发现HIF-1的表达与肿瘤的恶性潜能、预后和化疗效果等密切相关。据研究在食管癌中, HIF-1 α 与肿瘤分期、肿瘤浸润程度和淋巴结转移均有相关性,高度或中度表达HIF-1 α 的患者要比低表达或无表达者预后差。

Lu *et al*在研究HIF-1 α 与VEGF、临床病

理学特征之间的关系, 评价HIF-1 α 表达在直肠癌患者中的作用时发现, HIF-1 α 表达增强与VEGF阳性率、Dukes分期和淋巴结转移显著相关。卡普兰-迈耶生存率曲线显示, 具有HIF-1 α 高表达的患者总生存率明显缩短。研究发现, 胃肠间质瘤中HIF-1 α 的表达与肿瘤大小、肝转移与否以及肿瘤微血管密度密切相关, 同时发现HIF-1 α 高表达的病例比低表达的病例复发率、远处转移率明显增高。上述结果显示, HIF-1 α 可作为一个评价肿瘤的侵袭性和作为抗血管再生治疗反应的一个预测指标^[27-30]。

3.2 HIF-1在消化道肿瘤治疗中的应用 HIF-1与肿瘤的发生、发展和预后密切相关, 临床研究表明对HIF-1抑制可作为一个主要的抗肿瘤药研发的分子目标^[31], 并发现抑制HIF-1的大多数化合物是自然产物(植物、微生物、动物产生的低分子量有机化合物)或以自然产物前导物为基础结构的合成化合物^[32]。由于热休克蛋白90 (HSP90)在稳定HIF-1 α 亚基中起了关键性的作用, 抑制HSP90与HIF-1 α 的结合, 从而降低HIF-1 α 的稳定性, 因此HSP90的抑制因子正在应用于抗肿瘤治疗的临床试验 I 阶段。低剂量(5-30 nmol/L)的3种不同HSP90抑制因子(17-AAG, 17DMAG, 格尔德霉素)处理HeLa细胞, 依赖HIF-1的报告基因活性增加, 然而, 较高剂量(1-3 mmol/L)导致低氧诱导的HIF-1活性降低, 因此用HSP90抑制因子治疗肿瘤患者时, 其剂量将是一个关键因素^[33]。硫氧还蛋白(thioredoxin, TRX)可以抑制HIF-1 α 及其靶基因VEGF, 因此目前已开发出TRX1强抑制剂pleurotin和PX-12, 在实验小鼠中已显示出抗癌效果, 开始进入临床试验^[34]。虽然信号传导通路对于HIF-1 α 或其下游靶基因表达的作用机制还不完全明了, 但可以作为治疗靶点来抑制HIF-1 α , HIF-1 α 的激活主要通过两条信号传导通路PI3K-AKT和MAPK通路, 针对上述两条信号通路开发出rapamycin和rapamycin类似物CCI779, 目前证实上述药物对HIF-1 α 具有很强的抑制作用, 同时降低HIF-1 α 的稳定性和转录活性^[35]。YC-1[3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazole]是一种具有抗血小板集聚、血管收缩的心血管药物, 在体外抑制HIF-1 α 活性。在建立胃癌异种移植的裸鼠动物模型中, 每天腹腔里注射YC-1, 结果显示YC-1处理的裸鼠肿瘤体积缩小, HIF-1 α 的表达水平较低, 血管形成较

少, 提示YC-1阻滞血管发生、抑制肿瘤生长与HIF-1表达水平下调有关, YC-1有可能成为第一个靶向HIF-1 α 的抗血管生成的药^[36]。2-ME2(2-methoxyoestradiol)来源于雌二醇, 具有抗血管生成活性, 在转录后水平抑制HIF-1 α , 阻止肿瘤细胞HIF-1 α 靶基因的表达。另外一些化疗药物如紫杉醇和长春新碱等改变微管的稳定性并且抑制HIF-1 α , 提示这些药物的抗癌作用可能部分是由于对HIF-1 α 的抑制^[37]。

3.3 HIF-1在肿瘤治疗中应用前景 HIF-1 α 的表达与许多肿瘤位点的治疗反应有关, 因此HIF-1 α 的基因靶向治疗将成为胃癌治疗和防治的重要手段之一^[38]。RNA干扰(RNA interfering, RNAi)技术是近年来发展起来的一种基因沉默新技术, 已成为分子生物学研究中最活跃的热点之一, 主要利用双链RNA (dsRNA)在细胞内Dicer内切酶的识别、结合、酶切下, 产生有活性的长度为21-23 nt干扰性RNA (short in terfering RNA, siRNA), 与互补的目的基因mRNA结合并使之降解, 从而抑制目的基因的表达。近年来已有许多科学家成功构建了应用DNA片段进行体内转录的载体, 同时应用合成的19-21 nt反向重复序列, 中间碱基与目的基因不互补, 退火后和转录载体相连, 建立含与目的基因mRNA互补的载体, 转染宿主后, 在U6或HI等转录启动子的作用下, 转录成mRNA而自身形成茎环结构, 与宿主内的Dicer结合, 发挥抑制目的mRNA翻译的作用。研究表明, RNAi有很强的抑制目的基因的作用, 因此通过设计、构建HIF-1编码基因的siRNA, 转染肿瘤细胞系, 抑制HIF-1基因mRNA转录和蛋白表达作用, 从而介导肿瘤细胞凋亡, 为肿瘤基因治疗提供新的技术方案^[39]。总之, HIF-1涉及到肿瘤的发展、侵袭和转移, 不仅是细胞对低氧反应的主要调控者, 而且与许多肿瘤位点的基因治疗密切相关, 针对常规的化学或药物治疗无效的顽固性恶性肿瘤, 可以利用沉默HIF-1 mRNA, 达到治疗肿瘤的目的, 因此HIF-1在抗肿瘤方面具有巨大的潜在优势和广阔的应用前景。

4 参考文献

- 1 Dang DT, Chen F, Gardner LB, Cummins JM, Rago C, Bunz F, Kantsevov SV, Dang LH. Hypoxia-inducible factor-1 α promotes nonhypoxia-mediated proliferation in colon cancer cells and xenografts. *Cancer Res* 2006; 66: 1684-1936
- 2 Amir S, Wang R, Matzkin H, Simons JW, Mabeesh

■应用要点

由于HIF-1作为转录因子, 被激活后可以调节多种下游基因, 目前已发现HIF-1的目的基因60余种, 其中有4类目的基因蛋白产物与肿瘤关系密切, 包括与血管生成相关的因子、葡萄糖转运与糖酵解酶、与肿瘤侵袭和转移相关的因子及与肿瘤增殖和凋亡相关的蛋白, 具体涉及到VEGF, EPO, iNOS和糖酵解酶等, 从而使肿瘤细胞适应低氧的微环境, 促进肿瘤血管的再生和细胞能量代谢的加强。因此以HIF-1 α 基因靶向治疗将成为消化道肿瘤治疗和防治的重要手段之一。

■名词解释

缺氧应答反应元件(hypoxia response elements, HRE): 是指所有HIF-1调控的基因, 其启动子或增强子中包含<100 bp的目的基因, 其核心序列为5-TACGTGCT-3, 其中有1个或1个以上的HIF-1结合位点。

- NJ. MSF-A interacts with hypoxia-inducible factor-1alpha and augments hypoxia-inducible factor transcriptional activation to affect tumorigenicity and angiogenesis. *Cancer Res* 2006; 66: 856-866
- 3 Fischer I, Gagner JP, Law M, Newcomb EW, Zagzag D. Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology. *Brain Pathol* 2005; 15: 297-310
- 4 Jewell UR, Gassmann M. Mammalian gene expression in hypoxic conditions. *Zoology (Jena)* 2001; 104: 192-197
- 5 Griffiths EA, Pritchard SA, Welch IM, Price PM, West CM. Is the hypoxia-inducible factor pathway important in gastric cancer? *Eur J Cancer* 2005; 41: 2792-2805
- 6 Hofer T, Desbaillets I, Hopfl G, Gassmann M, Wenger RH. Dissecting hypoxia-dependent and hypoxia-independent steps in the HIF-1alpha activation cascade: implications for HIF-1alpha gene therapy. *FASEB J* 2001; 15: 2715-2717
- 7 Vleugel MM, Greijer AE, van der Wall E, van Diest PJ. Mutation analysis of the HIF-1alpha oxygen-dependent degradation domain in invasive breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 163: 168-172
- 8 Kim WJ, Cho H, Lee SW, Kim YJ, Kim KW. Antisense-thioredoxin inhibits angiogenesis via pVHL-mediated hypoxia-inducible factor-1alpha degradation. *Int J Oncol* 2005; 26: 1049-1052
- 9 Kasper LH, Boussouar F, Boyd K, Xu W, Biesen M, Rehig J, Baudino TA, Cleveland JL, Brindle PK. Two transactivation mechanisms cooperate for the bulk of HIF-1-responsive gene expression. *EMBO J* 2005; 24: 3846-3858
- 10 Fath DM, Kong X, Liang D, Lin Z, Chou A, Jiang Y, Fang J, Caro J, Sang N. Histone deacetylase inhibitors repress the transactivation potential of hypoxia-inducible factors independently of direct acetylation of HIF-alpha. *J Biol Chem* 2006; 281: 13612-13619
- 11 Chung J, Roberts AM, Chow J, Coady-Osberg N, Ohh M. Homotypic association between tumour-associated VHL proteins leads to the restoration of HIF pathway. *Oncogene* 2006; 25: 3079-3083
- 12 Gray MJ, Zhang J, Ellis LM, Semenza GL, Evans DB, Watowich SS, Gallick GE. HIF-1alpha, STAT3, CBP/p300 and Ref-1/APE are components of a transcriptional complex that regulates Src-dependent hypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas. *Oncogene* 2005; 24: 3110-3120
- 13 Karaczyn A, Ivanov S, Reynolds M, Zhitkovich A, Kasprzak KS, Salnikow K. Ascorbate depletion mediates up-regulation of hypoxia-associated proteins by cell density and nickel. *J Cell Biochem* 2006; 97: 1025-1035
- 14 Natarajan R, Jones DG, Fisher BJ, Wallace TJ, Ghosh S, Fowler AA 3rd. Hypoxia inducible factor-1: regulation by nitric oxide in posthypoxic microvascular endothelium. *Biochem Cell Biol* 2005; 83: 597-607
- 15 Martin F, Linden T, Katschinski DM, Oehme F, Flamme I, Mukhopadhyay CK, Eckhardt K, Troger J, Barth S, Camenisch G, Wenger RH. Copper-dependent activation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1: implications for ceruloplasmin regulation. *Blood* 2005; 105: 4613-4619
- 16 Sheta EA, Trout H, Gildea JJ, Harding MA, Theodorescu D. Cell density mediated pericellular hypoxia leads to induction of HIF-1alpha via nitric oxide and Ras/MAP kinase mediated signaling pathways. *Oncogene* 2001; 20: 7624-7634
- 17 Kang HJ, Kim HJ, Rih JK, Mattson TL, Kim KW, Cho CH, Isaacs JS, Bae I. BRCA1 plays a role in the hypoxic response by regulating HIF-1alpha stability and by modulating vascular endothelial growth factor expression. *J Biol Chem* 2006; 281: 13047-13056
- 18 Csiki I, Yanagisawa K, Haruki N, Nadaf S, Morrow JD, Johnson DH, Carbone DP. Thioredoxin-1 modulates transcription of cyclooxygenase-2 via hypoxia-inducible factor-1alpha in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 143-150
- 19 Park JE, Lee DH, Lee JA, Park SG, Kim NS, Park BC, Cho S. Annexin A3 is a potential angiogenic mediator. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 337: 1283-1287
- 20 Chau NM, Rogers P, Aherne W, Carroll V, Collins I, McDonald E, Workman P, Ashcroft M. Identification of novel small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor-1 that differentially block hypoxia-inducible factor-1 activity and hypoxia-inducible factor-1alpha induction in response to hypoxic stress and growth factors. *Cancer Res* 2005; 65: 4918-4928
- 21 Dang DT, Chen F, Gardner LB, Cummins JM, Rago C, Bunz F, Kantsevov SV, Dang LH. Hypoxia-inducible factor-1alpha promotes nonhypoxia-mediated proliferation in colon cancer cells and xenografts. *Cancer Res* 2006; 66: 1684-1936
- 22 Frede S, Freitag P, Otto T, Heilmaier C, Fandrey J. The proinflammatory cytokine interleukin 1beta and hypoxia cooperatively induce the expression of adrenomedullin in ovarian carcinoma cells through hypoxia inducible factor 1 activation. *Cancer Res* 2005; 65: 4690-4697
- 23 Huang SP, Wu MS, Shun CT, Wang HP, Hsieh CY, Kuo ML, Lin JT. Cyclooxygenase-2 increases hypoxia-inducible factor-1 and vascular endothelial growth factor to promote angiogenesis in gastric carcinoma. *J Biomed Sci* 2005; 12: 229-241
- 24 Wang J, Wu K, Bai F, Zhai H, Xie H, Du Y, Liang J, Han S, Chen Y, Lin T, Fan D. Celecoxib could reverse the hypoxia-induced Angiopoietin-2 upregulation in gastric cancer. *Cancer Lett* 2005
- 25 Stoeltzing O, McCarty MF, Wey JS, Fan F, Liu W, Belcheva A, Bucana CD, Semenza GL, Ellis LM. Role of hypoxia-inducible factor 1alpha in gastric cancer cell growth, angiogenesis, and vessel maturation. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 946-956
- 26 Urano N, Fujiwara Y, Doki Y, Tsujie M, Yamamoto H, Miyata H, Takiguchi S, Yasuda T, Yano M, Monden M. Overexpression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in gastric adenocarcinoma. *Gastric Cancer* 2006; 9: 44-49
- 27 Lu XG, Xing CG, Feng YZ, Chen J, Deng C. Clinical significance of immunohistochemical expression of hypoxia-inducible factor-1alpha as a prognostic marker in rectal adenocarcinoma. *Clin Colorectal Cancer* 2006; 5: 350-353
- 28 Takahashi R, Tanaka S, Hiyama T, Ito M, Kitadai Y, Sumii M, Haruma K, Chayama K. Hypoxia-inducible factor-1alpha expression and angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor of the stomach. *Oncol Rep* 2003; 10: 797-802
- 29 Chen WT, Huang CJ, Wu MT, Yang SF, Su YC, Chai CY. Hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with risk of aggressive behavior and tumor

- angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor. *Jpn J Clin Oncol* 2005; 35: 207-213
- 30 Dales JP, Garcia S, Meunier-Carpentier S, Andrac-Meyer L, Haddad O, Lavaut MN, Allasia C, Bonnier P, Charpin C. Overexpression of hypoxia-inducible factor HIF-1alpha predicts early relapse in breast cancer: retrospective study in a series of 745 patients. *Int J Cancer* 2005; 116: 734-739
- 31 Zhang Q, Tang X, Lu QY, Zhang ZF, Brown J, Le AD. Resveratrol inhibits hypoxia-induced accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha and VEGF expression in human tongue squamous cell carcinoma and hepatoma cells. *Mol Cancer Ther* 2005; 4: 1465-1474
- 32 Nagle DG, Zhou YD. Natural product-based inhibitors of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Curr Drug Targets* 2006; 7: 355-369
- 33 Ibrahim NO, Hahn T, Franke C, Stiehl DP, Wirthner R, Wenger RH, Katschinski DM. Induction of the hypoxia-inducible factor system by low levels of heat shock protein 90 inhibitors. *Cancer Res* 2005; 65: 11094-11100
- 34 Biaglow JE, Miller RA. The thioredoxin reductase/thioredoxin system: novel redox targets for cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 6-13
- 35 Liu M, Howes A, Lesperance J, Stallcup WB, Hauser CA, Kadoya K, Oshima RG, Abraham RT. Antitumor activity of rapamycin in a transgenic mouse model of ErbB2-dependent human breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 5325-5336
- 36 Yeo EJ, Chun YS, Cho YS, Kim J, Lee JC, Kim MS, Park JW. YC-1: a potential anticancer drug targeting hypoxia-inducible factor 1. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 516-525
- 37 Ricker JL, Chen Z, Yang XP, Pribluda VS, Swartz GM, Van Waes C. 2-methoxyestradiol inhibits hypoxia-inducible factor 1alpha, tumor growth, and angiogenesis and augments paclitaxel efficacy in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8665-8673
- 38 Brown LM, Cowen RL, Debray C, Eustace A, Erler JT, Sheppard FC, Parker CA, Stratford IJ, Williams KJ. Reversing hypoxic cell chemoresistance in vitro using genetic and small molecule approaches targeting hypoxia inducible factor-1. *Mol Pharmacol* 2006; 69: 411-418
- 39 Wu Q, Yang SH, Ye SN, Wang RY. Therapeutic effects of RNA interference targeting HIF-1 alpha gene on human osteosarcoma. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2005; 85: 409-413

■同行评价

随着分子生物学技术的进展,以各个功能基因及其表达物为靶点的研究成为肿瘤学研究领域内的一个热点,低氧诱导因子-1与肿瘤的关系受到学者的关注。本文所关注内容较新颖,具有临床意义。

电编 张敏 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 •

世界华人消化杂志关于作者署名的声明

本刊讯 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。(世界胃肠病学杂志社2006-09-18)

功能性胃肠病的根源——脑肠轴神经系统记忆假说

吴立平, 史维

吴立平, 史维, 成都市第三人民医院消化科 四川省成都市 610031

通讯作者: 吴立平, 610031, 四川省成都市, 成都市第三人民医院消化科. wulping@haoyisheng.com.cn

电话: 028-86649831-70281 传真: 028-86635593

收稿日期: 2006-07-25 接受日期: 2006-08-10

摘要

功能性胃肠病(functional gastrointestinal disorders, FGID)以消化道动力与内脏感觉异常为主要病理生理特征并有多种症状重叠、多变或相互转换以及反复发作、较难治愈等特点; 其病因和发病机制目前仍未完全清楚。本文将大脑记忆外延提出FGID的根源是脑肠轴神经系统记忆的假说, 并用这个假说解释说明FGID的各种特点, 以及治疗FGID的思路和方法。

关键词: 功能性胃肠病; 脑肠轴; 记忆假说

吴立平, 史维. 功能性胃肠病的根源——脑肠轴神经系统记忆假说. 世界华人消化杂志 2006;14(26):2617-2619

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2617.asp>

0 引言

功能性胃肠病(functional gastrointestinal disorders, FGID)是消化系统最常见的一组疾病, 患者主要以自觉症状和胃肠道功能异常为主, 客观检查不能发现消化道有明显的器质性病变和生化的异常, 但可发现消化道有功能的障碍和内脏敏感性增高或感觉改变^[1-2]。目前FGID涵盖的消化道疾病种类繁多, 主要有胃食管反流病(GERD)、功能性消化不良(FD)、肠易激综合征(IRS)、慢性便秘(CC), 并可表现为多种症状的重叠^[3-4]或相互转换。此外FGID还有以下特点: (1)发病率高, 年龄范围广, 症状轻重不一, 多变^[5]; (2)病程迁延, 时轻时重, 反复发作, 较难治愈^[6]; (3)中青年发病率高, 症状重, 以后随年龄的增长, 发病率逐渐下降^[7-8], 症状可逐渐减轻好转; (4)愈后较好, 无致命危险。由于FGID严重影响人们的生活质量^[9-11], 给社会和个人造成巨大的经济压力^[12], 各国医学界投入大量人力物力进行了广泛的研究, 但发病机制仍不完全清楚, 因此

有必要从另一角度进行探讨并指导治疗。

1 脑肠轴神经系统的记忆假说

FGID的上述特点用目前胃肠病的理论还不能完全解释, 但如果把脑肠轴神经系统看作和高级神经系统一样存在记忆功能, 用记忆假说似乎能更好的解释FGID的各种特点。记忆假说是指脑肠轴神经系统同高级神经系统一样存在记忆, 这种记忆可由外界有害因素的刺激产生, 加强, 唤醒, 也可被遗忘, 并可随年龄的增长而减退, 但这种记忆不受高级神经系统的意识控制和支配。

2 脑肠轴神经系统的记忆与FGID

脑肠轴神经系统的记忆与FGID产生的关系是否可用下述过程来描述: 外界有害因素(物理、化学、生物、精神和心理、全身性或局部)刺激脑肠轴神经系统, 产生胃肠道的异常感觉如腹痛、腹胀、早饱、恶心、烧心、胸骨后痛等和功能的异常(如打嗝、嗝气、呕吐、腹泻、便秘、反流、舒缩功能障碍等), 这是一种保护性反应(或保护性反射), 使人体意识到遭到外界有害的刺激, 采取相应的措施去除刺激因素, 但由于脑肠轴神经系统存在记忆(或存在惯性), 在外界有害刺激去除后, 胃肠道感觉和功能的异常(如同高级神经受到各种刺激产生的情感)却保留下来, 并持续一段时间, 使人体继续存在胃肠道感觉和功能的异常, 即FGID。这些异常持续时间的长短、强度因有害刺激(伤害)的大小和个体敏感性不同而不同, 并且如同高级神经系统记忆一样, 随时可被轻微的、相同的刺激所唤起(致敏后的过敏), 或反复刺激后被强化并行成恶性循环。动物模型实验已证实持续增加的内脏伤害性刺激可使脑扣带前回(ACC)电活动增强(致敏)^[13]。这可以解释为什么FGID会长期存在, 时轻时重, 反复复发, 甚至贯穿人的一生。由于这种记忆是神经系统的功能, 因此他如同人的高级神经系统记忆一样可以随着年龄的增长变化可由弱变强, 又由强变弱, 这可以解释为什

■背景资料

功能性胃肠病(FGID)是消化系统最常见的一组疾病, 涵盖病种类繁多, 症状的重叠或相互转换, 学术界对此进行了广泛的研究, 发病机制仍不完全清楚, 因此有必要从不同角度探讨其发病机制, 以指导临床治疗。

■研究前沿

目前研究证实动力和感觉的异常是FGID病理生理学的主要特征, 这种异常由胃肠神经、自主神经、中枢神经多个层面经多种神经介子介导产生, 并可有神经-内分泌-免疫网络参与, 故提出脑肠轴概念, 初步揭示了脑肠之间的相互关系。

■应用要点

如果FGID的根源是脑肠轴神经系统的记忆,就应该对其产生记忆的原因和利用记忆的特性进行治疗,即去除和避免刺激因素,用各种有效方法去除有害记忆或促使其产生有益记忆,并避免有害记忆的再唤醒。

么有些FGID(如IBS)中青年发病率高、症状重,随着年龄的增长,发病率逐渐下降、症状好转。FGID的症状重叠也许并非是重叠,可能是某次有害刺激引起的一组症状被记忆或多次有害刺激产生的多种症状被记忆,而这些症状被我们人为的分开并命名,新的有害刺激也可造成原有记忆暂时消失或减弱,使以前的FGID症状减轻或消失而出现新的症状,这可以解释为什么FGID症状多变或互相转换。

3 脑肠轴神经系统记忆的产生

现已有较多研究从不同方面证实肠神经、脊前神经节、中枢神经多个层面以及神经内分泌、神经免疫系统均参与IBS的发病^[14]。因此可以推测脑肠轴神经系统的记忆可能由多种神经介质介导的胃肠神经、自主神经、中枢神经多个层面和神经-内分泌-免疫网络共同参与产生。目前的神经胃肠病学和神经-免疫的研究已有了很多新的进展,并据此开发出治疗FGID的新药,同时为临床新药的进一步研发提供了方向^[15]。

4 脑肠轴神经系统记忆假说对FGID治疗的指导

有记忆就有遗忘,充分利用神经系统的遗忘特点也许是彻底治愈FGID的最好办法。使脑肠轴神经系统对以往的有害刺激记忆产生遗忘,应从以下三方面着手: (1)首先去除或避免对脑肠轴神经系统的有害刺激,这些刺激包括物理的、化学的、生物的、精神的和心理的、全身性的或局部的,有时可能是多种刺激同时存在,如果这些刺激不能去除,或反复出现,神经的记忆就不会消失,甚至会增强,消化道症状和功能异常就不会消失,长期的功能异常也会造成器质性病变(如反流性食道炎,胆汁反流性胃炎,乳头肌功能异常引起的胆管扩张、胰腺炎等)。医生首先要帮助患者找出其刺激因素,并帮助避免和去除,即去除引起胃肠道感觉和功能异常的病因。(2)有些人脑肠轴神经系统受到有害刺激后往往会反应剧烈,甚至一蹶不振(如同有些人高级神经受到刺激会产生精神病、抑郁症一样)造成FGID长期存在,这时就需要用相应的治疗药物和措施,纠正脑肠轴神经系统出现的偏差,使胃肠道感觉、功能恢复正常,目前已有多种有效的治疗药物和治疗方法,如多种中、西药物、针灸、理疗、认知、催眠疗法等。治疗的时间应以脑肠轴神经对以前的刺激产生遗忘为止,因个体、病情轻重、症状不同,因此治疗

药物、方法和时间也不能完全相同,治疗应遵循个体化原则并以直至治疗停止后症状不再出现(产生遗忘)为止。(3)尽可能使患者避免再次接触刺激因素以避免唤醒脑肠轴神经系统的有害记忆,或在遇到这种刺激后及时去除并采取措施防止记忆的恢复,即及时用调整胃肠道感觉和功能的药物使之恢复正常,临床上对因治疗的同时及时对症治疗往往能起到较好的效果不留后遗症,可能原因就在于此。在上述3项中找出和避免接触刺激因素最为重要,但由于刺激因素往往不清楚或不可避免,不再接触刺激因素很难做到,因此FGID往往反复复发,时轻时重,很难治愈,但由于FGID是由脑肠轴神经系统的记忆引起,因此如果无器质性病变,在去除刺激因素的情况下,随着时间的流逝,年龄的增长,神经感觉和记忆功能的减退,FGID症状逐渐减轻甚至消失。因此时间是FGID最有效的治疗剂。

以上是用脑肠轴神经记忆假说解释FGID,并根据这个假说阐述对FGID应采取的治疗方式,脑肠轴神经系统记忆是否为客观存在还有待科学实验证实,利用这个假说对FGID采取合适的治疗方案是否有效,还需临床实践检验。

5 参考文献

- 1 Lembo T, Munakata J, Mertz H, Niazi N, Kodner A, Nikas V, Mayer EA. Evidence for the hypersensitivity of lumbar splanchnic afferents in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 1994; 107: 1686-1696
- 2 Mertz H, Fullerton S, Naliboff B, Mayer EA. Symptoms and visceral perception in severe functional and organic dyspepsia. *Gut* 1998; 42: 814-822
- 3 Talley NJ, Dennis EH, Schettler-Duncan VA, Lacy BE, Olden KW, Crowell MD. Overlapping upper and lower gastrointestinal symptoms in irritable bowel syndrome patients with constipation or diarrhea. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2454-2459
- 4 Corazziari E. Definition and epidemiology of functional gastrointestinal disorders. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18: 613-631
- 5 Camilleri M, Heading RC, Thompson WG. Clinical perspectives, mechanisms, diagnosis and management of irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 1407-1430
- 6 Lacy BE, Lee RD. Irritable bowel syndrome: a syndrome in evolution. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: S230-242
- 7 Talley NJ, Zinsmeister AR, Melton LJ 3rd. Irritable bowel syndrome in a community: symptom subgroups, risk factors, and health care utilization. *Am J Epidemiol* 1995; 142: 76-83
- 8 廖常奎, 王佩秋. 精神、心理行为障碍对女性肠易激综合征与重叠功能性消化不良的影响. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1927-1930
- 9 Frank L, Kleinman L, Rentz A, Ciesla G, Kim JJ, Zacker C. Health-related quality of life associated

■名词解释

脑肠轴神经系统记忆:指胃肠神经、自主神经、中枢神经多个层面和神经-内分泌-免疫网络系统对外界刺激因素产生反应的一种惯性,外界刺激因素消除后,这种反应依然存在并持续一段时间,也可被相同的刺激再唤醒和加强。

- with irritable bowel syndrome: comparison with other chronic diseases. *Clin Ther* 2002; 24: 675-689; discussion 674
- 10 Gralnek IM, Hays RD, Kilbourne A, Naliboff B, Mayer EA. The impact of irritable bowel syndrome on health-related quality of life. *Gastroenterology* 2000; 119: 654-660
- 11 Spiegel BM, Gralnek IM, Bolus R, Chang L, Dulai GS, Mayer EA, Naliboff B. Clinical determinants of health-related quality of life in patients with irritable bowel syndrome. *Arch Intern Med* 2004; 164: 1773-1780
- 12 Talley NJ, Gabriel SE, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Evans RW. Medical costs in community subjects with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 1995; 109: 1736-1741
- 13 Gao J, Wu X, Owyang C, Li Y. Enhanced responses of the anterior cingulate cortex neurones to colonic distension in viscerally hypersensitive rats. *J Physiol* 2006; 570: 169-183
- 14 胡品津. 从脑-肠互动的高度认识肠易激综合征. *中华消化杂志* 2003; 23: 261-262
- 15 欧阳钦, 易智慧. 功能性肠病研究进展. *国外医学: 消化系疾病分册* 2005; 25: 67-69

■同行评价

本文根据FGID的特点, 将大脑记忆概念外延提出脑肠轴神经系统存在记忆假说, 并以此解释FGID的产生原因、特点, 同时据此提出治疗方法。选题实用, 主题明确, 层次分明, 有参考价值。

电编 张敏 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●

第十九届全国中西医结合消化会议征文通知

本刊讯 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会决定于2007-08下旬在石家庄市召开第十九届全国中西医结合消化学术交流会, 并同时举办全国中西医结合消化疾病诊治新进展学习班。

1 征文内容和要求

征文内容: (1)有关消化系统疾病包括食管、胃、肝、胰等诊疗、实验研究进展; (2)中西医结合对慢性肝炎(病)、肝纤维化临床诊治以及基础、实验研究; (3)中西医结合对消化系统肿瘤诊治经验与实验研究; (4)中西医结合对“淤血症”以及脾胃学说与脾虚证研究进展。征文要求: 来稿请附800字论文摘要, 并附软盘或发电子邮件至211zyke@163.com或czs.xiaohua@163.com(尽量以电子邮件发送)。征文请于2007-06-30前邮寄。

2 学习班招收对象

学习班招收对象: 从事中西医结合、中医或西医消化专业医师以上人员。参加学习班者授予国家继续教育学分12分; 在大会论文报告者另授继续教育学分6分。

3 联系方式

(1) 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路45号 解放军第211医院中医科(中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会), 邮编: 150080, 联系人: 李春雷, 贾云, 联系电话: 0451-57752440或86632450, 传真: 0451-86603878或0451-57752440; (2) 河北省石家庄和平西路215号河北医科大学附属第二医院, 邮编: 050000, 联系人: 姚希贤, 冯志杰, 联系电话: 0311-87222301或13333015658。

凋亡抑制基因XIAP在肿瘤治疗中的研究进展

张曙光, 刘芝华, 张林

■背景资料

肿瘤是威胁人类生命的重大疾病之一,但目前对肿瘤机制和治疗的研究仍处于探索之中,肿瘤的一个重要特征就是凋亡的减少,新近发现的细胞凋亡抑制蛋白家族(IAPs)在肿瘤的生长中起着很大作用,其成员X染色体连锁的凋亡抑制蛋白(XIAP)能同时抑制凋亡通路中的caspases-3, -7和-9,并能通过其他的途径抑制细胞的凋亡,现有的研究发现,其可能为肿瘤治疗的一个重要靶点。

张曙光, 张林, 中国医科大学附属第一医院胸外科 辽宁省沈阳市 110001

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

通讯作者: 张林, 110001, 辽宁省沈阳市南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院胸外科. ZhangShuguang@vip.sohu.com
电话: 024-83283500

收稿日期: 2006-06-13 接受日期: 2006-08-14

摘要

X染色体连锁的凋亡抑制基因(X-linked inhibitor of apoptosis protein gene, XIAP)是凋亡抑制基因家族中重要的成员之一,其编码的蛋白XIAP通过选择性的抑制caspase-3, -7和-9,并参与其他途径来抑制细胞的凋亡,与肿瘤的发生、发展和预后有着密切关系,针对XIAP的反义核酸和XIAP小分子抑制剂已经进入临床和临床前实验阶段,同时人们正尝试通过XIAP特异的siRNA (small interfering RNA)等其他手段来治疗肿瘤。我们就XIAP的生物学特性及其在肿瘤治疗中的研究进展作一综述。

关键词: 凋亡抑制蛋白; X染色体连锁的凋亡抑制基因; 肿瘤; 凋亡

张曙光, 刘芝华, 张林. 凋亡抑制基因XIAP在肿瘤治疗中的研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(26):2626-2631
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2626.asp>

0 引言

细胞凋亡的紊乱与肿瘤的发生、发展有着密切的关系。凋亡抑制基因家族是近年来发现的高度保守的内源性抑制细胞凋亡的基因家族,目前的研究发现,在人类凋亡抑制基因家族中共有8个成员: BIRC1-BIRC8, 他们编码的蛋白构成凋亡抑制蛋白IAPs (inhibitor of apoptosis proteins)家族^[1]。在人类凋亡抑制基因家族的8个成员中, BIRC4(X染色体连锁的凋亡抑制基因, XIAP)和BIRC5(存活素, survivin)备受关注,被认为是最有潜力的治疗靶点。由于survivin与肿瘤的耐药有关,并且其在肿瘤组织中远远超过在正常组织中表达,已经被作为一个治疗靶点处于研究之中;但是因为目前survivin抗凋亡和抗

细胞增殖的机制并不明确,以survivin作为治疗靶点是否合适仍在讨论之中^[2]。而这一基因家族中的BIRC3 (cIAP2)也被认为是有潜力的治疗靶点,但是对于他的研究仍处于起始阶段^[3]。XIAP的结构和生物学机制最为明确,它能够选择性抑制caspase-3, caspase-7和caspase-9,通过抑制效应性的caspase-3和caspase-7, IAPs能够抑制caspase凋亡通路的下游途径,从而使细胞免于各种刺激所导致的凋亡^[4]。因此,在caspase凋亡通路中, XIAP是唯一能够同时抑制起始阶段和效应阶段的IAP。由于其凋亡抑制作用,过度表达的XIAP使多种肿瘤细胞产生对化疗的耐药; XIAP不仅在许多恶性肿瘤细胞系中过表达,同时也在许多类肿瘤患者的肿瘤组织中存在过表达并伴随着较差的预后。目前研究认为, XIAP是IAPs家族中最有研究价值的肿瘤治疗靶点。

1 XIAP的结构特点和生物学功能

XIAP, 又称BIRC4 (baculoviral IAP repeat-containing 4), 定位于Xq25, mRNA全长8413 bp, 编码区位于129 bp-1622 bp之间, 其编码的蛋白XIAP相对分子量约为57 kDa, 主要由3个杆状病毒IAP重复序列BIR1-BIR3 (baculoviral inhibitor of apoptosis repeat)和一个RING锌指结构域 (really new gene Zinc finger domain)组成(图1)。下面通过对其结构和相应功能进行分析, 找出其能作为肿瘤治疗靶点的结构基础。BIR3结构域: BIR3结构域能够结合并抑制caspase-9的活性, 而caspase-9是线粒体介导的caspase激活凋亡途径中的始动caspase。研究发现, 过表达的BIR3结构域cDNA能够抑制Bax等所引起的线粒体凋亡途径中caspase的激活, 但是并不能对肿瘤坏死因子(TNF)凋亡途径起作用。同样研究发现, 影响BIR3结构域的点突变降低了XIAP凋亡抑制作用, 但是这种XIAP凋亡抑制作用的减弱仅仅可被Bax所诱导^[5]。通过对BIR3结构域与caspase-9结合的结构进行分析, 发现BIR3与caspase-9单体形成异源二聚体, 使caspase-9保持单体结构, 丧失催化活性^[6], BIR3结构域上的

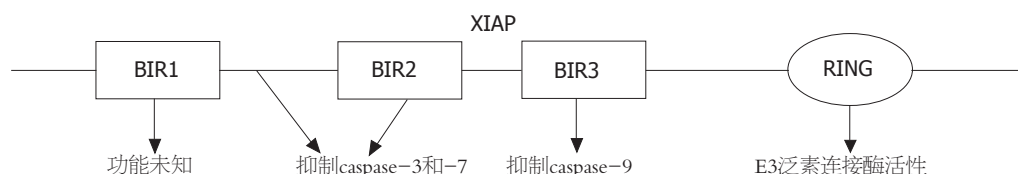


图 1 XIAP结构和功能示意图.

caspase-9结合区域正是蛋白抑制剂的设计靶点.

BIR2结构域: 与BIR3结构域不同的是, BIR2结构域能结合并抑制活化的caspase-3和caspase-7, caspase-3和caspase-7是效应酶, 尤其是caspase-3是细胞膜、线粒体和内质网3条凋亡途径的共同最终效应酶, 抑制了他的活性, 也就抑制了细胞的凋亡. 研究发现, 过表达的BIR2结构域cDNA能够同时抑制死亡因子受体途径和线粒体途径刺激因素所致的凋亡; 同样, 影响BIR2结构域N端的点突变使XIAP无法在FasI或Bax所诱导的凋亡中发挥抗凋亡作用^[5]. 研究发现, BIR2结构域能够直接结合并抑制caspase-7, 而对caspase-3的抑制则需要BIR2结构域的N端linker和BIR2结构域共同参与, 通过“hook-line-sinker”模式对caspase-3进行抑制^[7-11]. 这表明, 在设计以BIR2结构域为靶点的蛋白抑制剂时应同时考虑其N端的linker. **BIR1结构域:** 关于BIR1结构域的具体功能目前还不明确, 现在的研究发现, 在caspase抑制中, 他协助BIR2结构域完成对caspase-3和caspase-7的抑制, 为BIR2的N端linker提供一个“bulk”. 研究发现, 当BIR1结构域的linker区出现点突变后, BIR2不能对caspase进行抑制, 说明BIR1对BIR2起到协同作用^[12]. 还有人发现, BIR1结构域可能与细胞周期和有丝分裂有关, 但是具体机制仍不明确. **RING锌指样结构域:** XIAP的RING结构域具有E3泛素连接酶活性, 能够使蛋白泛素化进而加速蛋白质的降解. 早期的研究认为, XIAP的E3连接酶能够使XIAP自身泛素化并最终使自身降解^[13]. 但是最近的研究发现, XIAP的这种自身泛素化并没有太大意义, 因为他并不会促进自身的降解. 相反, XIAP的E3连接酶不仅不促进自身的降解, 反而通过促进降解caspase-9和caspase-3以及内源性的XIAP抑制剂SMAC, 进而增强XIAP的抗凋亡作用^[14]. 但是, RING结构域的突变并不会降低XIAP的抗凋亡活性^[15]. 所以, 针对XIAP的E3连接酶的抑制, 虽然不能抑制XIAP活性, 但是可以配合其他XIAP抑制剂, 可能会发挥更好的XIAP抑制作用. XIAP可以通过其他方式抑制

凋亡: XIAP可以参与细胞信号的调节, 核转录因子(NF- κ B)除了能保护细胞免受TNF家族介导的凋亡外, 同时与肿瘤的侵袭和转移密切相关, XIAP能够通过多种方式激活NF- κ B, 而NF- κ B反过来又能上调XIAP; XIAP首先能与转化生长因子 β 激活性激酶(TAK1)和TAK1结合蛋白因子(TAB1)形成复合体, 该复合体可以激活c-Jun氨基末端激酶(JNK1), JNK1最终可以激活NF- κ B^[16-17]; NF- κ B亚单位p65转移至细胞核是NF- κ B激活的前提, XIAP恰可以促进这一过程^[16]; XIAP还可以促进NF- κ B抑制剂I κ B的降解, 使NF- κ B的活性不被抑制^[18]. 研究发现, XIAP对JNK和NF- κ B的激活是通过E3泛素连接酶实现的, 所以针对RING结构域的抑制可以通过阻止NF- κ B所致的凋亡抑制, 达到诱导细胞凋亡^[18]. 还有的报道提出, XIAP能够提高细胞内铜的水平, 进而使铜依赖的抗凋亡酶类活性增强, 达到凋亡抑制的作用^[19]. XIAP还可以参与细胞周期的调节: 在血管内皮细胞的研究中发现, 过度表达的XIAP能使细胞停留在G₀-G₁期, 同时伴随着细胞周期素D₁的下调, 而当XIAP降解后, 细胞进入凋亡; 故XIAP通过细胞周期的调节, 使细胞处于休眠状态, 逃避凋亡^[18]. 但是, 其在凋亡抑制中的意义和具体机制仍然不清楚, 并且在肿瘤研究中还没发现有相似的作用.

2 XIAP作为肿瘤治疗靶点可行性分析

体外实验发现, 许多恶性肿瘤细胞系中存在着XIAP的过表达, 并且XIAP的过表达与肿瘤的耐药密切相关, 通过反义寡核苷酸和siRNA (small interfering RNA)方法降解XIAP的mRNA, 进而消除XIAP的表达, 使得许多肿瘤细胞恢复了化疗的敏感性^[20-21]; 而这种对XIAP的缺失对正常细胞系没有任何影响. 体内实验发现, XIAP缺失的肿瘤细胞成瘤性明显降低, 并且通过体内应用XIAP抑制剂能够延缓荷瘤小鼠的肿瘤生长^[22]. 临床研究发现, 肿瘤患者肿瘤组织中的XIAP表达水平与肿瘤的预后密切相关, 但是研究发现, 在不同的肿瘤中其预后意义并不相同. 在成人

■研究前沿

目前, 针对XIAP的反义寡核苷酸类抑制剂已经进入临床实验阶段, 针对其蛋白的小分子抑制剂也已经进入临床前研究阶段, RNA干扰技术也进入到这一领域研究中来, 并有望成为一种有效的治疗方法.

■应用要点

虽然国外对以XIAP为靶点的肿瘤治疗研究已经进入临床实验阶段,但是国内对此的研究较少,本文希望通过对该领域的研究进展情况作一介绍,能够为国内的肿瘤研究提供新的思路。

和儿童的新生急性髓细胞样白血病(AML)患者中, XIAP低表达的患者的生存率明显高于XIAP高表达的患者^[23-24]; 同样, 在肾透明细胞癌患者中, XIAP高表达的患者其肿瘤的分化程度低而且预后差^[25]。而有的研究表明, XIAP的表达与预后没有关系^[26-27]。还有的研究发现, XIAP的高表达提示好的预后, 在行肺癌根治手术后的非小细胞肺癌患者中, 患者肺癌组织中XIAP高表达者较低表达着的生存期明显延长^[28]; 但是从其XIAP本身的生物学特性而言, 人们至今仍无法理解XIAP的高表达预示着好的预后, 而且并没有相似的研究报道。目前人们对此的解释是: XIAP仅仅是IAPs家族中的一员, 单单考虑XIAP这一个因素还不能说明IAPs对肿瘤预后的影响; 另外, XIAP的翻译后调节可能会影响其功能, 但是并不影响其表达水平; 还有可能就是XIAP的高表达可能是肿瘤凋亡诱导因素之一; 再者就是XIAP可能有些功能还不为我们所知。总之, XIAP与肿瘤的发生、发展、对放化疗的抵抗以及与肿瘤的预后密切相关, XIAP可以作为肿瘤治疗的一个靶点。

3 XIAP在肿瘤治疗研究中的进展

以XIAP为肿瘤治疗靶点的研究主要从3个方面进行: (1)针对XIAP mRNA的反义寡核苷酸类抑制剂, 现已经进入临床实验阶段; (2)针对XIAP蛋白的小分子抑制剂, 包括内源性的XIAP抑制剂, 有的已处于临床前研究阶段; (3)随着RNA干扰(RNA interfering, RNAi)这种新的技术的出现, 针对XIAP mRNA的siRNA也正逐渐进入到XIAP的肿瘤研究中来, 目前这种方法正处于实验室研究阶段。

3.1 针对XIAP mRNA的反义寡核苷酸 用于治疗实体肿瘤和血液系统恶性肿瘤的XIAP mRNA反义寡核苷酸已有制药公司进行生产, 并已进入了临床实验阶段。目前用于临床实验的XIAP反义寡核苷酸是19 nt的第二代产品, 能与靶向mRNA互补形成双链结构, 这段双链结构能够诱使mRNA被酶切, 而相应的反义寡核苷酸仍能维持原来的结构, 并继续同mRNA结合并诱导mRNA的酶切^[29]。体外实验研究发现, 对XIAP mRNA的降解出现在转染6-9 h后, 相应蛋白降低出现在转染12-18 h后, 并且对XIAP mRNA的降解可达到70%。应用反义寡核苷酸使XIAP mRNA的降解并最终使XIAP表达降低, 发现其能直接诱导凋亡并增加细胞对化疗的敏感性。

例如, 在人类肺癌细胞系H460中, 应用反义寡核苷酸处理肿瘤后, 能直接诱导H460的凋亡, 并且使其对泰素、长春新碱和依托泊苷的化疗的敏感性增强; 荷瘤小鼠研究表明, 将反义寡核苷酸注入肿瘤后, 能够降低肿瘤内XIAP的表达, 并且肿瘤的生长缓慢, 当同时应用依托泊苷后, 肿瘤的生长抑制作用更加明显^[30]。目前在英国, Aegera公司(<http://www.aegera.com>)已经将反义寡核苷酸投入到一期临床实验阶段, 在现阶段的研究中, 除了检测其安全性和效率外, 着重检测其药代动力学, 并通过检测受试患者的肿瘤活检标本, 看是否能达到mRNA的降解作用和降低XIAP的表达^[29]。

3.2 内源性XIAP抑制剂 人类的内源性的XIAP抑制剂SMAC和HTRA2是线粒体蛋白, 当线粒体破裂, 他们能随着细胞色素C进入胞质内, 在胞质内, 活化的或片段形式的SMAC和HTRA2能够结合并抑制包括XIAP在内的IAPs^[31-32]。目前, 对于HTRA2的研究还不是很明确, 大部分的研究集中在SMAC上。研究发现, 应用和SMAC的N端序列相同的人工合成多肽能够达到抑制XIAP的作用; 将该种多肽导入肿瘤细胞中, 发现其有化疗增敏作用, 当把他和顺铂合用时能够抑制肺癌细胞的生长, 当与TNF相关凋亡诱导配体(TRAIL)合用时能够抑制荷瘤小鼠的神经胶质瘤生长^[33-34]。通过结构上的研究发现, SMAC能够同时和XIAP的BIR2和BIR3结构域结合, 并且活化的SMAC其N端的4-7个氨基酸是功能必需的且足以结合并抑制BIR3结构域与caspase-9结合, 相应位置的突变则失去了这种作用; SMAC同样可以和BIR2结构域结合, 并抑制其功能, 但是具体的机制不详^[35-36]。因此, 模仿内源性XIAP抑制剂的作用, 我们可以设计出相应的XIAP抑制剂, 进而发挥抗肿瘤作用, 现在的许多研究正是在试图设计出相应的类似物, 但是效果还有待于深入研究。

3.3 人工合成的XIAP抑制剂 随着对XIAP结构和功能的逐步明确, 人们正在针对相应的功能性结构域设计抑制剂。BIR3结构域抑制剂: 通过对BIR3与caspase-9的结构和相互作用的分析, 提示人们可以模仿SMAC的作用方式设计出小分子抑制剂, 抑制BIR3与caspase-9的结合。随着生物学的发展, 人们正尝试包括荧光偏振、核磁共振和计算机模型设计等不同的方法来设计和寻找BIR3抑制剂。目前, 科研人员已经设计并构建出了有效的三肽类BIR3抑制剂, 这些抑制剂

含有人造的氨基酸残基, 体外研究发现, 这些抑制剂能够直接诱导一系列恶性肿瘤的凋亡^[37]. 同样科研人员从中药矮地茶中提取信筒子素, 已有的实验证实, 其具有SMAC同样的黏性, 并能与BIR3结构域结合, 继而阻止其与caspase-9结合; 在前列腺癌细胞系中研究发现, 在微克级信筒子素的作用下, 可以直接诱导前列腺癌细胞凋亡^[38-39]; 在动物研究中发现, 信筒子素是安全的, 仅会引起可逆性的雄激素降低和暂时性的生育障碍, 目前, 信筒子素是最有望进入临床实验的BIR3抑制剂^[40]. 科研人员同时还发现了其他的抑制剂, 但是同种抑制剂在不同的细胞系, 有的能够直接引起细胞凋亡, 有的仅会增强放疗的敏感性, 虽然目前的研究结果令人鼓舞, 但是在近期内尚无法进入临床实验阶段. BIR2结构域抑制剂: Wu *et al*^[41]首先通过高通量酶阻遏试剂盒筛选的方法, 发现了包括TWX006和TWX024在内的XIAP抑制剂, 他们能够结合XIAP的BIR2的linker区域, 并且其能够比SMAC更有效的阻止XIAP与caspase-3结合, 并且能够促使caspase-3恢复活性. 应用相似的筛选方法, 人们又发现了多聚苯脲类的BIR2结构域抑制剂, 体外研究发现, 其对肿瘤细胞的毒性远远超过对正常细胞的毒性作用; 紧接着的动物实验证明, 其有延缓前列腺癌、乳腺癌和结肠癌生长的作用, 并且对裸鼠无毒性^[42-43]. 目前, 第2代多聚苯脲类的BIR2结构域抑制剂亦已被合成并处于临床前研究阶段^[29]. E3泛素连接酶抑制剂: E3泛素连接酶在肿瘤治疗中是一个很吸引人的治疗靶点, 目前针对MDM2的E3泛素连接酶小分子抑制剂nutlins已经用于治疗中^[44]. 而能够选择性的抑制XIAP中的E3泛素连接酶可以阻止XIAP对caspase-3和caspase-9的泛素化作用, 并能够阻止XIAP激活NF- κ B, 但是如前所述, 单纯抑制XIAP中的E3泛素连接酶只能部分缓解而不能完全阻滞其凋亡抑制作用, 必须同其他结构域的抑制剂联合应用才能发挥更大的作用, 所以选择性的XIAP E3泛素连接酶抑制剂可能成肿瘤治疗的辅助剂.

3.4 特异性干扰XIAP基因的siRNA RNAi是新近发现的技术, 是近年来最重要的科技发现之一, 其较比单纯的反义技术有更高的效率; 其机制简单概括为siRNA结合一个核酶复合物形成所谓的RNA诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC), 活化以后的RISC定位到与siRNA反义链互补的靶mRNA上, 并在距离

siRNA 3'端12个碱基的位置切割mRNA, 从而使mRNA降解. Chawla-Sarkar *et al*^[45]猜测黑色素瘤的耐药可能与XIAP有关, 他们将化学合成的靶向特异性的XIAP-siRNA转染到黑色素瘤细胞, 紧接着应用Apo2l/Trail处理细胞, 发现细胞的凋亡明显增加, 然后他们又进行了肾癌的实验得到了同样的结果. 同样的报道, 通过XIAP-siRNA可以使神经胶质瘤、乳腺癌、胰腺癌等对化疗的敏感性增强^[21,46-47]. 体内研究发现, 将XIAP-siRNA的质粒表达载体转染到乳腺癌细胞后, 其在裸鼠的成瘤能力明显降低, 并且肿瘤的生长明显变缓^[22]. siRNA较反义寡核苷酸的有特异性和高效性的特点, 虽然siRNA技术还不成熟, 现在进行的研究较少, 但是从长远来看, 其比反义寡核苷酸更有发展潜力.

4 存在的问题

仍然有许多问题困扰着以XIAP作为肿瘤治疗靶点的研究者. 如前所述, 凋亡抑制基因家族有8个成员, 如果其他的成员有着比XIAP更强的凋亡抑制作用, 那样仅以XIAP作为靶点就没有将整个凋亡抑制基因家族作为靶点所起的作用大. 反义RNA和siRNA属于基因治疗的范畴, 其转染效率以及安全性问题仍未能很好解决. 而对于XIAP的小分子抑制剂, 研究者还没有获得其完整的活性谱, 而且在不同的研究中XIAP小分子抑制剂起作用的方式不同, 一些研究中XIAP小分子抑制剂对肿瘤细胞有直接毒性作用, 而在其他的研究中发现, XIAP小分子抑制剂仅有化疗增敏作用, 为什么会出现这种不同仍然需要进一步的研究; 另外, 肿瘤对XIAP小分子抑制剂的耐药也是必须要考虑的问题, 因为我们不知道在我们应用XIAP小分子抑制剂后, 肿瘤细胞的XIAP会不会发生相应的突变, 从而产生耐药.

总之, XIAP基因发现到现在仅仅10余年的时间, 以其作为肿瘤治疗靶点的研究已经从实验室进入了临床研究阶段, 随着对这一基因家族研究的不断深入, 我们相信会给肿瘤的治疗带来新的希望.

5 参考文献

- 1 Nachmias B, Ashhab Y, Ben-Yehuda D. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. *Semin Cancer Biol* 2004; 14: 231-243
- 2 Zaffaroni N, Pennati M, Daidone MG. Survivin as a target for new anticancer interventions. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 360-372
- 3 McEleny K, Coffey R, Morrissey C, Williamson K,

■名词解释

XIAP: X染色体连锁的凋亡抑制基因(X-linked inhibitor of apoptosis protein gene), 是人类凋亡抑制基因家族中的8个成员之一, 在人类凋亡抑制基因家族中共有8个成员: BIRC1-BIRC8, 其中BIRC4即XIAP, BIRC5是存活素survivin, 他们编码的蛋白能通过多种途径抑制细胞的凋亡.

- Zangemeister-Wittke U, Fitzpatrick JM, Watson RW. An antisense oligonucleotide to cIAP-1 sensitizes prostate cancer cells to fas and TNF α mediated apoptosis. *Prostate* 2004; 59: 419-425
- 4 Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 1997; 388: 300-304
- 5 Bratton SB, Lewis J, Butterworth M, Duckett CS, Cohen GM. XIAP inhibition of caspase-3 preserves its association with the Apaf-1 apoptosome and prevents CD95- and Bax-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2002; 9: 881-892
- 6 Shiozaki EN, Chai J, Rigotti DJ, Riedl SJ, Li P, Srinivasula SM, Alnemri ES, Fairman R, Shi Y. Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell* 2003; 11: 519-527
- 7 Sun C, Cai M, Meadows RP, Xu N, Gunasekera AH, Herrmann J, Wu JC, Fesik SW. NMR structure and mutagenesis of the third Bir domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP. *J Biol Chem* 2000; 275: 33777-33781
- 8 Riedl SJ, Renatus M, Schwarzenbacher R, Zhou Q, Sun C, Fesik SW, Liddington RC, Salvesen GS. Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* 2001; 104: 791-800
- 9 Huang Y, Park YC, Rich RL, Segal D, Myszkowski DG, Wu H. Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell* 2001; 104: 781-790
- 10 Chai J, Shiozaki E, Srinivasula SM, Wu Q, Datta P, Alnemri ES, Shi Y. Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* 2001; 104: 769-780
- 11 Scott FL, Denault JB, Riedl SJ, Shin H, Renatus M, Salvesen GS. XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs. *EMBO J* 2005; 24: 645-655
- 12 Suzuki Y, Nakabayashi Y, Nakata K, Reed JC, Takahashi R. X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes. *J Biol Chem* 2001; 276: 27058-27063
- 13 Yang Y, Fang S, Jensen JP, Weissman AM, Ashwell JD. Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* 2000; 288: 874-877
- 14 Morizane Y, Honda R, Fukami K, Yasuda H. X-linked inhibitor of apoptosis functions as ubiquitin ligase toward mature caspase-9 and cytosolic Smac/DIABLO. *J Biochem (Tokyo)* 2005; 137: 125-132
- 15 Suzuki Y, Nakabayashi Y, Takahashi R. Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 8662-8667
- 16 Hofer-Warbinek R, Schmid JA, Stehlik C, Binder BR, Lipp J, de Martin R. Activation of NF- κ B by XIAP, the X chromosome-linked inhibitor of apoptosis, in endothelial cells involves TAK1. *J Biol Chem* 2000; 275: 22064-22068
- 17 Sanna MG, da Silva Correia J, Ducrey O, Lee J, Nomoto K, Schrantz N, Deveraux QL, Ulevitch RJ. IAP suppression of apoptosis involves distinct mechanisms: the TAK1/JNK1 signaling cascade and caspase inhibition. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 1754-1766
- 18 Levkau B, Garton KJ, Ferri N, Kloke K, Nofer JR, Baba HA, Raines EW, Breithardt G. XIAP induces cell-cycle arrest and activates nuclear factor- κ B: new survival pathways disabled by caspase-mediated cleavage during apoptosis of human endothelial cells. *Circ Res* 2001; 88: 282-290
- 19 Burstein E, Ganesh L, Dick RD, van De Sluis B, Wilkinson JC, Klomp LW, Wijmenga C, Brewer GJ, Nabel GJ, Duckett CS. A novel role for XIAP in copper homeostasis through regulation of MURR1. *EMBO J* 2004; 23: 244-254
- 20 Sasaki H, Sheng Y, Kotsuji F, Tsang BK. Down-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein induces apoptosis in chemoresistant human ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2000; 60: 5659-5666
- 21 Lima RT, Martins LM, Guimaraes JE, Sambade C, Vasconcelos MH. Specific downregulation of bcl-2 and XIAP by RNAi enhances the effects of chemotherapeutic agents in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Gene Ther* 2004; 11: 309-316
- 22 Zhang Y, Wang Y, Gao W, Zhang R, Han X, Jia M, Guan W. Transfer of siRNA against XIAP induces apoptosis and reduces tumor cells growth potential in human breast cancer *in vitro* and *in vivo*. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 96: 267-277
- 23 Tamm I, Richter S, Oltersdorf D, Creutzig U, Harbott J, Scholz F, Karawajew L, Ludwig WD, Wuchter C. High expression levels of x-linked inhibitor of apoptosis protein and survivin correlate with poor overall survival in childhood de novo acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3737-3744
- 24 Tamm I, Richter S, Scholz F, Schmelz K, Oltersdorf D, Karawajew L, Schoch C, Haeflrich T, Ludwig WD, Wuchter C. XIAP expression correlates with monocytic differentiation in adult de novo AML: impact on prognosis. *Hematol J* 2004; 5: 489-495
- 25 Yan Y, Mahotka C, Heikaus S, Shibata T, Wethkamp N, Liebmann J, Suschek CV, Guo Y, Gabbert HE, Gerharz CD, Ramp U. Disturbed balance of expression between XIAP and Smac/DIABLO during tumour progression in renal cell carcinomas. *Br J Cancer* 2004; 91: 1349-1357
- 26 Carter BZ, Kornblau SM, Tsao T, Wang RY, Schober WD, Milella M, Sung HG, Reed JC, Andreeff M. Caspase-independent cell death in AML: caspase inhibition *in vitro* with pan-caspase inhibitors or *in vivo* by XIAP or Survivin does not affect cell survival or prognosis. *Blood* 2003; 102: 4179-4186
- 27 Liu SS, Tsang BK, Cheung AN, Xue WC, Cheng DK, Ng TY, Wong LC, Ngan HY. Anti-apoptotic proteins, apoptotic and proliferative parameters and their prognostic significance in cervical carcinoma. *Eur J Cancer* 2001; 37: 1104-1110
- 28 Ferreira CG, van der Valk P, Span SW, Ludwig I, Smit EF, Kruijff FA, Pinedo HM, van Tinteren H, Giaccone G. Expression of X-linked inhibitor of apoptosis as a novel prognostic marker in radically resected non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2468-2474
- 29 Schimmer AD, Dalili S, Batey RA, Riedl SJ. Targeting XIAP for the treatment of malignancy. *Cell Death Differ* 2006; 13: 179-188
- 30 Hu Y, Cherton-Horvat G, Dragowska V, Baird S, Korneluk RG, Durkin JP, Mayer LD, LaCasse EC. Antisense oligonucleotides targeting XIAP induce apoptosis and enhance chemotherapeutic activity against human lung cancer cells *in vitro* and *in vivo*.

同行评价

本文对凋亡抑制基因XIAP在肿瘤治疗中的研究进展进行了较系统的综述,有参考价值。

- Clin Cancer Res* 2003; 9: 2826-2836
- 31 Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000; 102: 33-42
- 32 Verhagen AM, Silke J, Ekert PG, Pakusch M, Kaufmann H, Connolly LM, Day CL, Tikoo A, Burke R, Wrobel C, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* 2002; 277: 445-454
- 33 Yang L, Mashima T, Sato S, Mochizuki M, Sakamoto H, Yamori T, Oh-Hara T, Tsuruo T. Predominant suppression of apoptosome by inhibitor of apoptosis protein in non-small cell lung cancer H460 cells: therapeutic effect of a novel polyarginine-conjugated Smac peptide. *Cancer Res* 2003; 63: 831-837
- 34 Fulda S, Wick W, Weller M, Debatin KM. Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma *in vivo*. *Nat Med* 2002; 8: 808-815
- 35 Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, Lee RA, Robbins PD, Fernandes-Alnemri T, Shi Y, Alnemri ES. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 2001; 410: 112-116
- 36 Wu G, Chai J, Suber TL, Wu JW, Du C, Wang X, Shi Y. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* 2000; 408: 1008-1012
- 37 Oost TK, Sun C, Armstrong RC, Al-Assaad AS, Betz SF, Deckwerth TL, Ding H, Elmore SW, Meadows RP, Olejniczak ET, Oleksijew A, Oltersdorf T, Rosenberg SH, Shoemaker AR, Tomaselli KJ, Zou H, Fesik SW. Discovery of potent antagonists of the antiapoptotic protein XIAP for the treatment of cancer. *J Med Chem* 2004; 47: 4417-4426
- 38 Nikolovska-Coleska Z, Xu L, Hu Z, Tomita Y, Li P, Roller PP, Wang R, Fang X, Guo R, Zhang M, Lippman ME, Yang D, Wang S. Discovery of embelin as a cell-permeable, small-molecular weight inhibitor of XIAP through structure-based computational screening of a traditional herbal medicine three-dimensional structure database. *J Med Chem* 2004; 47: 2430-2440
- 39 Chitra M, Sukumar E, Suja V, Devi CS. Antitumor, anti-inflammatory and analgesic property of embelin, a plant product. *Chemotherapy* 1994; 40: 109-113
- 40 Johri RK, Dhar SK, Pahwa GS, Sharma SC, Kaul JL, Zutshi U. Toxicity studies with potassium embelate, a new analgesic compound. *Indian J Exp Biol* 1990; 28: 213-217
- 41 Wu TY, Wagner KW, Bursulaya B, Schultz PG, Deveraux QL. Development and characterization of nonpeptidic small molecule inhibitors of the XIAP/caspase-3 interaction. *Chem Biol* 2003; 10: 759-767
- 42 Berezovskaya O, Schimmer AD, Glinskii AB, Pinilla C, Hoffman RM, Reed JC, Glinsky GV. Increased expression of apoptosis inhibitor protein XIAP contributes to anoikis resistance of circulating human prostate cancer metastasis precursor cells. *Cancer Res* 2005; 65: 2378-2386
- 43 Schimmer AD, Welsh K, Pinilla C, Wang Z, Krajewska M, Bonneau MJ, Pedersen IM, Kitada S, Scott FL, Bailly-Maitre B, Glinsky G, Scudiero D, Sausville E, Salvesen G, Nefzi A, Ostresh JM, Houghten RA, Reed JC. Small-molecule antagonists of apoptosis suppressor XIAP exhibit broad antitumor activity. *Cancer Cell* 2004; 5: 25-35
- 44 Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N, Liu EA. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 2004; 303: 844-848
- 45 Chawla-Sarkar M, Bae SI, Reu FJ, Jacobs BS, Lindner DJ, Borden EC. Downregulation of Bcl-2, FLIP or IAPs (XIAP and survivin) by siRNAs sensitizes resistant melanoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2004; 11: 915-923
- 46 Li Y, Jian Z, Xia K, Li X, Lv X, Pei H, Chen Z, Li J. XIAP is related to the chemoresistance and inhibited its expression by RNA interference sensitize pancreatic carcinoma cells to chemotherapeutics. *Pancreas* 2006; 32: 288-296
- 47 Hatano M, Mizuno M, Yoshida J. Enhancement of C2-ceramide antitumor activity by small interfering RNA on X chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein in resistant human glioma cells. *J Neurosurg* 2004; 101: 119-127

电编 张敏 编辑 王晓瑜

胃癌组织中幽门螺杆菌*cagA*和*vacA*的表达及与其感染的相关性

佟书娟, 陈军, 詹臻, 杨丹丹, 刘亚平

■背景资料

胃癌的发生是一个多因素、多阶段和多基因的演变过程, 微生物、寄生虫等生物致病因子是导致胃癌形成的重要病因, 研究发现, 生物致病因子幽门螺杆菌(*H pylori*)感染与胃癌的发生密切相关。

佟书娟, 詹臻, 杨丹丹, 南京中医药大学基础医学院 江苏省南京市 210029
陈军, 中国人民解放军宁夏军区政治部 宁夏回族自治区银川市 750021
刘亚平, 中国人民解放军第5医院病理科 宁夏回族自治区银川市 750004
宁夏教育厅科研基金资助项目, No. JY2002125
通讯作者: 佟书娟, 210029, 江苏省南京市, 南京中医药大学基础医学院. tongshujuan6@sina.com
电话: 025-85811925
收稿日期: 2006-05-23 接受日期: 2006-08-10

Expression of *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* and their correlations with *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer

Shu-Juan Tong, Jun Chen, Zhen Zhan, Dan-Dan Yang, Ya-Ping Liu

Shu-Juan Tong, Zhen Zhan, Dan-Dan Yang, Basic Medical College, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Jun Chen, Department of Politics, Ningxia Military Command of Chinese PLA, Yinchuan 750021, Ningxia Hui Autonomous Region, China
Ya-Ping Liu, Department of Pathology, the Fifth Hospital of Chinese PLA, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

Supported by the Science Research Foundation from Department of Education of Ningxia Hui Autonomous Region, No. JY2002125

Correspondence to: Shu-Juan Tong, Basic Medical College, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. tongshujuan6@sina.com

Received: 2006-05-23 Accepted: 2006-08-10

Abstract

AIM: To explore the expression of *H pylori cagA* and *vacA* in gastric cancer and their correlations with *H pylori* infection.

METHODS: *H pylori* infection was determined by Warthin-Starry silver staining in gastric cancer ($n = 39$), gastric mucosal atypical hyperplasia ($n = 24$) and chronic gastritis ($n = 33$). Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the expression of *H pylori cagA* and *vacA*.

RESULTS: The infection rates of *H pylori*, *cagA*⁺ *H pylori* and *vacA*⁺ *H pylori* in gastric cancer tissues were significantly higher than those chronic gastritis tissue ($\chi^2 = 7.00, P < 0.05$; $\chi^2 = 15.20, P < 0.05$; $\chi^2 = 12.43, P < 0.05$); the infection rates of *H pylori*, *cagA*⁺ *H pylori* and *vacA*⁺ *H pylori* in gastric mucosal atypical hyperplasia were markedly higher than those in chronic gastritis ($\chi^2 = 6.25, P < 0.05$; $\chi^2 = 11.04, P < 0.05$; $\chi^2 = 11.61, P < 0.05$). The infection rates of *H pylori*, *cagA*⁺ *H pylori* and *vacA*⁺ *H pylori* were significantly higher in poorly-differentiated gastric cancer in comparison with those in moderately- and well-differentiated one ($\chi^2 = 8.19, P < 0.05$; $\chi^2 = 13.14, P < 0.05$; $\chi^2 = 6.62, P < 0.05$). *H pylori* infection was positively related to *H pylori cagA* and *vacA* expression in chronic gastritis, gastric mucosal atypical hyperplasia and gastric cancer (chronic gastritis: $r = 0.56, P < 0.01$; $r = 0.64, P < 0.01$; atypical hyperplasia: $r = 0.64, P < 0.01$; $r = 0.92, P < 0.01$; gastric cancer: $r = 0.90, P < 0.01$; $r = 0.95, P < 0.01$).

CONCLUSION: *H pylori* infection is an important promoter in the development of chronic gastritis into atypical hyperplasia and gastric cancer, and it may accelerate the proliferation and injury of gastric mucosa epithelial cells by inducing *cagA* and *vacA* expression, respectively. Their synergistic effects may play important roles in the pathogenesis of gastric cancer.

Key Words: Gastric cancer; *Helicobacter pylori*; Cytotoxin associated gene A; Vacuolating cytotoxin gene A

Tong SJ, Chen J, Zhan Z, Yang DD, Liu YP. Expression of *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* and their correlations with *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(26):2632-2635

摘要

目的: 研究*H pylori cagA*和*H pylori vacA*在胃癌、胃黏膜不典型增生和胃炎组织中的表达及与*H pylori*感染的相关性。

方法: 采用Warthin-Starry嗜银染色法检测胃癌组织39例, 胃黏膜不典型增生组织24例和慢性胃炎组织33例中*H pylori*感染情况; PCR法检测上述标本中*H pylori cagA*和*H pylori vacA*的表达。

结果: 胃癌组织中*H pylori*, *H pylori cagA*⁺株和*H pylori vacA*⁺株感染率显著高于慢性胃炎组织($\chi^2 = 7.00, P < 0.05$; $\chi^2 = 15.20, P < 0.05$; $\chi^2 = 12.43, P < 0.05$); 胃黏膜不典型增生组织中*H pylori*, *H pylori cagA*⁺株和*H pylori vacA*⁺株感染率显著高于慢性胃炎组织($\chi^2 = 6.25, P < 0.05$; $\chi^2 = 11.04, P < 0.05$; $\chi^2 = 11.61, P < 0.05$); 低分化胃癌组织中*H pylori*, *H pylori cagA*⁺和*H pylori vacA*⁺株感染率显著高于高中分化胃癌组织($\chi^2 = 8.19, P < 0.05$; $\chi^2 = 13.14, P < 0.05$; $\chi^2 = 6.62, P < 0.05$)。慢性胃炎、不典型增生和胃癌组织中*H pylori*与*H pylori cagA*和*H pylori vacA*表达均呈正相关(慢性胃炎: $r = 0.56, P < 0.01$; $r = 0.64, P < 0.01$; 不典型增生组织: $r = 0.64, P < 0.01$; $r = 0.92, P < 0.01$; 胃癌: $r = 0.90, P < 0.01$; $r = 0.95, P < 0.01$)。

结论: *H pylori*感染是慢性胃炎向胃黏膜不典型增生及胃癌发展的重要启动因子, *H pylori*感染可能通过诱导*cagA*表达促使胃黏膜上皮细胞增殖加快, 诱导*vacA*表达促使胃黏膜上皮细胞损伤; 他们的协同作用可能在胃癌发生、发展过程中发挥了重要作用。

关键词: 胃癌; 幽门螺杆菌; 细胞毒素相关基因A; 空泡细胞毒素基因A

佟书娟, 陈军, 詹臻, 杨丹丹, 刘亚平. 胃癌组织中幽门螺杆菌*cagA*和*vacA*的表达及与其感染的相关性. 世界华人消化杂志 2006;14(26):2632-2635
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2632.asp

0 引言

胃癌发病率居全世界恶性肿瘤的第二位, 居消化道恶性肿瘤的第一位, 我国是胃癌的高发区。在我国, 胃癌的病死率居各种癌症之首位。现研究发现, 生物致病因子幽门螺杆菌(*H pylori*)感染^[1-2]可能是慢性胃炎向胃黏膜不典型增生及胃癌发展的重要启动因子。1994年世界卫生组织已把*H pylori*列为第一级致癌物质, 但关于*H pylori*感染在胃癌发生过程中的确切机制并未完全阐明。我们采用Warthin-Starry嗜银染色(W-S染色)法检测胃癌组织39例, 胃黏膜不典型增生组织24例和慢性胃炎组织33例中的*H pylori*感染

情况; 采用PCR法检测上述标本中细胞毒素相关基因A和空泡细胞毒素基因A的表达, 探讨*H pylori*感染、细胞毒素相关基因A和空泡细胞毒素基因A表达与胃癌发生的相关性及意义。

1 材料和方法

1.1 材料 解放军第5医院2002-01/2003-12纤维内镜活检存档蜡块标本96例, 胃癌39例, 男32例, 女7例, 平均年龄63.4 (34-87)岁; 胃黏膜不典型增生24例, 男17例, 女7例, 平均年龄59.9 (47-79)岁; 慢性胃炎33例, 男14例, 女19例, 平均年龄46.8 (19-92)岁。

1.2 方法 标本40 g/L甲醛固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 4 μ m厚连续切片。 *H pylori*感染采用W-S染色, *H pylori*呈棕黑色, 弯曲成弧形、S形或海鸥状, 多位于胃黏膜表面和/或胃小凹及胃癌旁黏膜腺窝内。细胞毒素相关基因A (cytotoxin associated gene A, *cagA*)和空泡细胞毒素基因A (vacuolating cytotoxin gene A, *vacA*)的检测采用PCR法。 *cagA*引物序列: 引物1: 5'GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG3', 引物2: 5'CTGCAA AAGATTGTTTGCGAGA3'; *vacA*引物序列: 引物1: 5'GTCAGCATCACACCGCAAC3', 引物2: 5'CTGCTTGAATGCGCCAAAC3', 由上海生物工程技术有限公司合成; Taq DNA酶、PCR染液购自北京赛百圣基因技术有限公司; dNTP购自南京生兴生物技术有限公司。取石蜡块切片3片(厚12 μ m), 经二甲苯脱蜡后, 消化液(500 mg/L蛋白酶K, 10 mmol Tris-HCl pH 8.0, 10 mmol NaCl, 1 mmol EDTA, 100 g/L SDS)消化, 酚-氯仿抽提DNA, -20℃备用。 *cagA* PCR反应体系为50 μ L, 包括DNA模板2 μ L, *cagA*引物1和引物2各0.75 μ L, Taq DNA酶0.5 μ L, 10×Taq缓冲液5 μ L, PCR染液5 μ L, dNTP 1 μ L, ddH₂O 35 μ L。 *vacA* PCR反应体系为50 μ L, 包括DNA模板2 μ L, *vacA*引物1和引物2各1 μ L, Taq DNA酶0.5 μ L, 10×Taq缓冲液5 μ L, PCR染液5 μ L, dNTP 1 μ L, ddH₂O 34.5 μ L。 *cagA* PCR反应条件: 95℃预变性4 min后, 95℃变性60 s, 50℃退火60 s, 72℃延伸60 s, 共30个循环, 循环结束后72℃延伸7 min。 *vacA* PCR反应条件: 94℃预变性4 min后, 94℃变性60 s, 52℃退火60 s, 72℃延伸60 s, 共30个循环, 循环结束后72℃延伸7 min。反应结束后取13 μ L扩增水相用15 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定, *cagA*在349 bp出现电泳带为阳性, *vacA*在190 bp出现电泳带为阳性, 否则为阴性。

■研发前沿

目前, *H pylori*研究的热点为*H pylori*的毒力因子*cagA*和*vacA*与胃癌发生的关系及对致癌物形成的影响, 胃黏膜*H pylori*感染与上皮细胞增殖、细胞凋亡的关系, *H pylori*感染对胃黏膜线粒体DNA稳定性的影响, 胃癌基因和免疫治疗的策略。

■相关报道

目前, *H pylori*的研究主要集中于其致胃癌作用机制的研究, *H pylori*的耐药性, *HpcagA*和*vacA*基因片段克隆、表达及序列测定, *H pylori* L型感染的诊断和治疗等。

■创新亮点

本研究证实, *H pylori* 感染是慢性胃炎向胃黏膜不典型增生及胃癌发展的重要启动因子, *H pylori cagA* 和 *H pylori vacA* 基因的过度表达可能在胃癌发生、发展过程中发挥了重要作用。

统计学处理 采用计算机统计分析软件SPSS

12.0进行数据处理, 胃黏膜组织*H pylori*, *H pylori cagA*⁺株和*H pylori vacA*⁺株表达情况, 高、中、低分化胃癌组织中*H pylori*, *H pylori cagA*和*H pylori vacA*的表达情况采用 χ^2 检验, 慢性胃炎、不典型增生和胃癌组织中*H pylori*与*H pylori cagA*和*H pylori vacA*的相关性采用spearman等级相关分析。

2 结果

2.1 胃黏膜组织*H pylori*, *H pylori cagA*⁺株和*H pylori vacA*⁺株感染率(表1) 胃癌组织中*H pylori*感染率(61.5%)高于慢性胃炎组织(30.3%), 有显著性差异($P<0.05$, $\chi^2=7.00$); 胃黏膜不典型增生和胃癌组织中*H pylori*感染率(57.1%)高于慢性胃炎组织(30.3%), 有显著性差异($P<0.05$, $\chi^2=6.25$); 胃癌组织中*H pylori cagA*⁺株感染率(56.4%)高于慢性胃炎组织(12.1%), 有显著性差异($P<0.05$, $\chi^2=15.20$); 胃黏膜不典型增生和胃癌组织中*H pylori cagA*⁺株感染率(46.0%)高于慢性胃炎组织(12.1%), 有显著性差异($P<0.05$, $\chi^2=11.04$); 胃癌组织中*H pylori vacA*⁺株感染率(58.6%)高于慢性胃炎组织(15.2%), 有显著性差异($P<0.05$, $\chi^2=12.43$); 胃黏膜不典型增生和胃癌组织中*H pylori vacA*⁺株感染率(50.8%)高于慢性胃炎组织(15.2%), 有显著性差异($P<0.05$, $\chi^2=11.61$); 低分化胃癌组织中*H pylori*感染率(79.2%)高于高中分化胃癌组织(33.3%), 有显著性差异($P<0.05$, $\chi^2=8.19$); 低分化胃癌组织中*H pylori cagA*⁺株感染率(79.2%)高于高、中分化胃癌组织(20.0%), 有显著性差异($P<0.05$, $\chi^2=13.14$); 低分化胃癌组织中*H pylori vacA*⁺株感染率(75.0%)高于高、中分化胃癌组织(33.3%), 有显著性差异($P<0.05$, $\chi^2=6.62$).

2.2 胃黏膜组织*H pylori*与*H pylori cagA*和*H pylori vacA*表达的相关性(表2) 慢性胃炎组织中*H pylori*与*H pylori cagA*和*H pylori vacA*表达均呈正相关($P<0.01$, $r=0.56$; $P<0.01$, $r=0.64$); 不典型增生组织中*H pylori*与*H pylori cagA*和*H pylori vacA*表达均呈正相关($P<0.01$, $r=0.64$; $P<0.01$, $r=0.92$); 胃癌组织中*H pylori*与*H pylori cagA*和*H pylori vacA*表达均呈正相关($P<0.01$, $r=0.90$; $P<0.01$, $r=0.95$).

3 讨论

1983年澳大利亚学者Warren和Marshall首次报道

表1 胃黏膜组织*H pylori*, *cagA*⁺株和*vacA*⁺株感染率及在不同分化程度的胃癌组织中的表达 (n/%)

分组	n	<i>H pylori</i>	<i>cagA</i> ⁺	<i>vacA</i> ⁺
慢性胃炎	33	10(30.3)	4(12.1)	5(15.2)
不典型增生	24	12(50.0)	7(29.2)	9(37.5)
胃癌	39	24(61.5) ^a	22(56.4) ^a	23(58.6) ^a
高、中分化	15	5(33.3)	3(20.0)	5(33.3)
低分化	24	19(79.2) ^b	19(79.2) ^b	18(75.0) ^b

^a $P<0.05$ vs 慢性胃炎; ^b $P<0.01$ vs 高中分化。

表2 *H pylori*与*cagA*和*vacA*表达的相关性 (r)

项目	慢性胃炎		不典型增生		胃癌	
	<i>cagA</i>	<i>vacA</i>	<i>cagA</i>	<i>vacA</i>	<i>cagA</i>	<i>vacA</i>
<i>H pylori</i>	0.56	0.64	0.64	0.92	0.90	0.95
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

从人胃黏膜中培养出*H pylori*, 经过20余年的研究, 已经证实*H pylori*感染是慢性胃炎、消化性溃疡、胃黏膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤的主要病因, 与胃癌的发生亦有密切关系^[1-5]。以往研究发现, 有60%-70%的胃癌患者感染了*H pylori*。一般认为, *H pylori*定居于胃黏膜上皮细胞后激活免疫炎症反应, 大量炎症细胞侵入黏膜下层, 释放一系列细胞因子, 如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α), 白细胞介素-1 (interleukin-1, IL-1), 白细胞介素-6 (IL-6), 白细胞介素-8 (IL-8)等, 同时也易致胃黏膜细胞DNA的损伤及增加出现非整倍体的危险性, 进一步形成多种致癌或致突变物质, 因此认为, *H pylori*感染是慢性胃炎向萎缩性胃炎、肠上皮化生、不典型增生及胃癌发展的主要启动因子^[6-7]。对*H pylori*致病作用的研究已表明, 他的可能致病物质包括细菌的鞭毛、黏附素、尿素酶、蛋白酶、内毒素、细胞毒素等, *cagA*和*vacA*表达的CagA蛋白和VacA蛋白是*H pylori*产生的两种主要细胞毒素。Odenbreit *et al*^[8]研究发现, *H pylori*定居于胃黏膜上皮细胞后产生CagA蛋白, 在上皮细胞内, CagA蛋白的酪氨酸残基被磷酸化, 并与真核生物的信号传递系统和细胞重塑相连而引起细胞的增殖。体外实验表明, *vacA*基因编码的VacA蛋白能使多种哺乳动物细胞发生广泛的空泡样变性, 最终导致细胞死亡^[9]。由于VacA蛋白对上皮细胞具有损伤作用, 因而被认为是*H pylori*的一种重要致病因子, 也是*H pylori*毒力分

■应用要点

本文通过对慢性胃炎、胃黏膜不典型增生和胃癌组织中*H pylori*, *H pylori cagA*⁺株和*H pylori vacA*⁺株感染率的检测, 进一步深化了*H pylori*致胃癌的可能机制, 同时对胃癌的基因治疗、疗效和预后的判定提供了帮助。

型的标志, 与 $H. pylori$ 感染者的临床发病有密切关系. 本结果显示, 胃黏膜不典型增生和胃癌组织中 $H. pylori$, $H. pylori$ $cagA^+$ 株和 $H. pylori$ $vacA^+$ 株感染率显著高于慢性胃炎组织, 证实 $H. pylori$ 感染是慢性胃炎向胃黏膜不典型增生及胃癌发展的重要启动因子, $H. pylori$ $cagA$ 和 $vacA$ 的过度表达与胃癌的发生、发展密切相关. 本研究发现, $H. pylori$, $H. pylori$ $cagA$ 和 $vacA$ 在低分化程度的胃癌组织中的表达明显高于分化程度较高的胃癌组织中的表达, 提示 $H. pylori$, $H. pylori$ $cagA$ 和 $vacA$ 的高表达, 使胃癌细胞具有更大的侵袭力, 可能与胃癌的恶性程度、预后、进展有关. 慢性胃炎、胃黏膜不典型增生及胃癌组织中 $H. pylori$ 与 $H. pylori$ $cagA$ 和 $vacA$ 的表达呈正相关, 说明 $cagA$ 和 $vacA$ 编码的CagA蛋白和VacA蛋白是 $H. pylori$ 产生两种主要毒力因子; $H. pylori$ 感染可能通过诱导 $cagA$ 基因表达促使胃黏膜上皮细胞增殖加快, 诱导 $vacA$ 基因表达促使胃黏膜上皮细胞损伤; 他们的协同作用可能在胃癌发生、发展过程中发挥了重要作用.

4 参考文献

- 1 佟书娟, 刘亚平, 尹清云. 幽门螺杆菌感染与胃癌中VEGF的表达及肿瘤血管形成的关系. 实用肿瘤学杂志 2005; 19: 161-163
- 2 佟书娟, 刘亚平, 杨丹丹. 幽门螺杆菌在胃癌发生过程中的作用机制. 第四军医大学学报 2005; 26: 2219-2222
- 3 Vandenplas Y. *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 20-31
- 4 Takeuchi K, Ohno Y, Tsuzuki Y, Ando T, Sekihara M, Hara T, Kuwano H. *Helicobacter pylori* infection and early gastric cancer. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36: 321-324
- 5 姚永莉, 张万岱. 幽门螺杆菌致病因子研究进展. 世界华人消化杂志 2002; 10: 455-458
- 6 Wagner S, Beil W, Westermann J, Logan RP, Bock CT, Trautwein C, Bleck JS, Manns MP. Regulation of gastric epithelial cell growth by *Helicobacter pylori*: offence for a major role of apoptosis. *Gastroenterology* 1997; 113: 1836-1847
- 7 van Doorn LJ, Glupczynski Y, Kusters JG, Megraud F, Midolo P, Maggi-Solca N, Queiroz DM, Nouhan N, Stet E, Quint WG. Accurate prediction of macrolide resistance in *Helicobacter pylori* by a PCR line probe assay for detection of mutations in the 23S rRNA gene: multicenter validation study. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1500-1504
- 8 Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 2000; 287: 1497-1500
- 9 Tombola F, Oregna F, Brutsche S, Szabo I, Del Giudice G, Rappuoli R, Montecucco C, Papini E, Zoratti M. Inhibition of the vacuolating and anion channel activities of the VacA toxin of *Helicobacter pylori*. *FEBS Lett* 1999; 460: 221-225

■同行评价

本研究探讨了 $H. pylori$ 致胃癌的可能机制, 选题较新, 实验设计合理, 有科学性. 论文书写流畅, 数据可信, 参考文献较新, 有临床参考意义.

电编 张敏 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 ●

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

加味柴芍承气汤对重症急性胰腺炎肺损伤的作用

王国品, 滕晓琨, 杨莉, 徐肇敏, 黄晓丽, 王平, 曾皓明

■背景资料

肺是SAP时最常受累的肺外器官, 肺损伤亦是SAP最严重的并发症之一。SAP并发肺损伤高达40%-70%, SAP发病1 wk内死亡者, 约50%系并发肺损伤所致。

王国品, 滕晓琨, 杨莉, 黄晓丽, 王平, 曾皓明, 东南大学附属南京江北人民医院消化科 江苏省南京市 210048
徐肇敏, 南京大学医学院附属鼓楼医院消化科 江苏省南京市 210008
南京市医学科技发展重点项目, No. ZKX0325
通讯作者: 王国品, 210048, 江苏省南京市大厂葛关路552号, 东南大学附属南京江北人民医院消化科, yywgp@263.net
电话: 025-86086708
收稿日期: 2006-06-30 接受日期: 2006-07-31

Effects of *Chaishao Chengqi* decoction with ginkgo biloba leaf on lung injury induced by severe acute pancreatitis

Guo-Pin Wang, Xiao-Kun Teng, Li Yang, Zhao-Min Xu, Xiao-Li Huang, Ping Wang, Hao-Ming Zeng

Guo-Pin Wang, Xiao-Kun Teng, Li Yang, Xiao-Li Huang, Ping Wang, Hao-Ming Zeng, Department of Gastroenterology, Nanjing Jiangbei People's Hospital, Nanjing 210048, Jiangsu Province, China

Zhao-Min Xu, Department of Gastroenterology, Nanjing Gulou Hospital, Nanjing 210048, Jiangsu Province, China
Supported by Nanjing Science and Technology Development Keystone Program, No. ZKX0325

Correspondence to: Guo-Pin Wang, Department of Gastroenterology, Nanjing Jiangbei People's Hospital, Nanjing 210048, Jiangsu Province, China. yywgp@263.net
Received: 2006-06-30 Accepted: 2006-07-31

Abstract

AIM: To explore the preventive and therapeutic effects of *Chaishao Chengqi* decoction (CCD) with ginkgo biloba leaf (GBL) on the lung injury induced by severe acute pancreatitis (SAP).

METHODS: A total of 65 SAP patients were divided into group A ($n = 35$) and B ($n = 30$). Besides internal treatment, the patients in group A also received CCD plus GBL. The occurrence of hypoxemia, duration of abdominal pain-relief, recovering time of borborygmus, local complications, and mortality rate as well as the level changes of serum platelet-activating factor (PAF), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interleukin-1 (IL-1) 72 h after treatment were observed, respectively. Upper abdominal spiral CT scanning was used to evaluate the degrees of severe acute pancreatitis.

RESULTS: The incidence rates of hypoxemia and acute respiratory distress syndrome were significantly lower group A than those in group B (45.71% vs 73.33%, $P < 0.05$; 8.57% vs 30%, $P < 0.05$). The serum levels of inflammatory factors dropped markedly in group A 72 h after treatment (PAF: $4.45 \pm 1.25 \rightarrow 2.83 \pm 1.64$ mg/L, $P < 0.01$; TNF- α : $32.96 \pm 4.33 \rightarrow 27.82 \pm 5.26$ ng/L, $P < 0.01$; IL-1: $3.46 \pm 1.07 \rightarrow 2.51 \pm 0.52$ ng/L, $P < 0.01$), but they had no changes in group B. The duration of abdominal pain-relief, recovering time of borborygmus and progressive proportion of pancreatic inflammation were decreased in group A as compared with those in group B ($P < 0.05$). The rates mortality and local complications were 0 and 2.86% in group A, and 10% and 13.33% in group B, respectively.

CONCLUSION: CCD plus GBL has preventive and therapeutic action on the SAP-induced lung injury, and the mechanism is probably related to its inhibition on the secretion of inflammatory mediators.

Key Words: Severe acute pancreatitis; Lung injury; *Chaishao Chengqi* Decoction; Ginkgo biloba leaf; Inflammatory mediators

Wang GP, Teng XK, Yang L, Xu ZM, Huang XL, Wang P, Zeng HM. Effects of *Chaishao Chengqi* decoction with ginkgo biloba leaf on lung injury induced by severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(26):2636-2639

摘要

目的: 探讨柴芍承气汤加味银杏叶对重症急性胰腺炎(SAP)肺损伤的防治作用及其机制。

方法: SAP患者65例分为中药组($n = 35$)和对照组($n = 30$)。分别观察2组患者低氧血症发生情况, 腹痛缓解时间、肠鸣恢复时间、局部并发症及病死率, 治疗72 h后血中炎症介质血小板活化因子(PAF)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、白介素-1(IL-1)的水平变化, 并再次行上腹部螺旋CT扫描评估胰腺炎症进展情况。

结果: 中药组与对照组低氧血症的发生率分

别为45.71%, 73.33% ($P<0.05$); ARDS分别为8.57%, 30% ($P<0.05$); 治疗72 h后中药组血中PAF (4.45 ± 1.25 vs 2.83 ± 1.64 mg/L, $P<0.01$), TNF- α (32.96 ± 4.33 vs 27.82 ± 5.26 ng/L, $P<0.01$), IL-1 (3.46 ± 1.07 vs 2.51 ± 0.52 ng/L, $P<0.01$)水平明显下降, 而对照组血中PAF, TNF- α , IL-1水平无变化; 中药组腹痛缓解时间、肠鸣恢复时间、CT扫描显示胰腺炎程度进展的比例明显低于对照组($P<0.05$); 2组局部并发症的发生率分别为2.86%, 13.33%, 病死率分别为0, 10%。

结论: 柴芍承气汤加味银杏叶对SAP肺损伤有防治作用, 抑制PAF, TNF- α , IL-1等炎症介质可能是该汤剂防治肺损伤的重要机制。

关键词: 胰腺炎; 肺损伤; 柴芍承气汤; 银杏叶; 炎症介质

王治国, 滕晓琨, 杨莉, 徐肇敏, 黄晓丽, 王平, 曾皓明. 加味柴芍承气汤对重症急性胰腺炎肺损伤的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(26):2636-2639

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2636.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(SAP)是一种预后凶险的危重症, 其病死率为20%-30%^[1], 如果并发器官功能不全则病死率增加到50%以上。肺是SAP时最常受累的胰外器官, 肺损伤亦是SAP最严重的并发症之一。SAP并发肺损伤高达40%-70%, SAP发病1 wk内死亡者, 约50%系并发肺损伤所致^[2]。我科自2003-06以来, 在柴芍承气汤中添加银杏叶组成(加味)柴芍承气汤, 用以治疗SAP, 显示该汤剂对SAP肺损伤有较好的防治作用。

1 材料和方法

1.1 材料 2003-06以来用柴芍承气汤加味银杏叶治疗SAP 35例, 男19例, 女16例。年龄24-91(平均60)岁; 将2003-06以前按顺序排列的30例未用中药治疗的SAP患者列为对照组, 男16例, 女14例。年龄21-79(平均57)岁。SAP诊断^[3]: 患者符合急性胰腺炎(AP)的临床诊断, 同时具备: Ranson标准 ≥ 3 项, Balthazar CT分级D, E级。2组患者在年龄、性别、Ranson评分及CT分级等方面均无显著差异。急性肺损伤的临床诊断: SAP患者出现胸闷、呼吸频率增快(>28 次/min); 血气分析出现低氧血症: 动脉氧分压(PaO_2) <80 mmHg, $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$ 。当 $\text{PaO}_2 < 60$ mmHg, $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$ 时, 临床诊断ARDS。其中, 吸入氧浓度(FiO_2)

表 1 两组肺损伤情况比较 (n/%)

分组	n	低氧血症	ARDS
中药组	35	16 (45.71%) ^a	3 (8.57%) ^a
对照组	30	22 (73.33%)	9 (30.00%)

^a $P<0.05$ vs 对照组。

= 21%+氧流量 \times 4%。

1.2 方法 所有患者的内科基本治疗相同, 包括密切的临床监护、补充水及电解质、抗生素、抑制胰酶活性药物、生长抑素等。中药组一旦确诊即予柴芍承气汤加味银杏叶。组方: 银杏叶15 g, 柴胡10 g, 白芍10 g, 黄芩10 g, 厚朴10 g, 枳实10 g, 木香10 g(后下), 生大黄15 g(后下), 玄明粉10 g(冲入煎好的药液中)。每剂煎成100-150 mL, 自鼻胃管内注入或口服, 每日2-3次, 直至患者腹痛缓解、腹胀基本消失、肠鸣恢复为止。密切观察患者的临床表现, 有无呼吸频率增快、胸闷、紫绀等, 分别监测与记录2组患者的 PaO_2 , SaO_2 , 局部并发症情况(胰周液体积聚、胰腺坏死、假性囊肿或脓肿)及病死率。入院72 h均再次行上腹部螺旋CT扫描评估胰腺炎症进展情况(按Balthazar CT分级系统^[4])。确诊后予中药治疗72 h后, 分别检测2组患者血中血小板活化因子(PAF)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、白介素-1(IL-1)水平。PAF检测试剂盒由美国TPI公司提供, TNF- α , IL-1检测试剂盒购自Bender MedSystems公司。采用ELISA法检测, 空白吸光度分别为0.018, 0.059, 0.06, 测定波长450 nm。

统计学处理 使用SPSS 11.5软件包, 计量资料用mean \pm SD表示, 组间比较用 t 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 急性肺损伤情况 对照组30例中22例(73.33%)出现低氧血症, 其中 $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$, $\text{PaO}_2 < 60$ mmHg临床诊断为ARDS 9例(30.00%); 中药组35例中16例(45.71%)出现低氧血症, 其中 $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$, $\text{PaO}_2 < 60$ mmHg 3例(8.57%) (表1)。

2.2 血循环中炎症介质水平的变化 中药组治疗72 h后血清中PAF, TNF- α , IL-1水平明显下降, 而对照组变化不明显(表2)。

2.3 临床疗效与转归 中药组与对照组比较, 腹痛缓解时间分别为 5.8 ± 3.7 , 9.1 ± 3.8 d ($P<0.05$);

■创新盘点

国内有柴芍承气汤治疗SAP的临床报道, 本研究则重点探讨了柴芍承气汤加味银杏叶对SAP肺损伤的防治作用及其作用机制, 提出防止毒素及细菌移位、抑制炎症介质是该汤剂防治肺损伤的主要机制。

■应用要点

本文结果显示,该汤剂对SAP及其肺损伤有较好的防治作用。SAP患者如 $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$,出现肠麻痹,或有较高的Ranson评分,应尽早加用该汤剂治疗。

表 2 两组治疗72 h后血清中PAF, $\text{TNF-}\alpha$, IL-1水平变化 (mean \pm SD, ng/L)

分组	n	PAF		$\text{TNF-}\alpha$		IL-1	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
中药组	35	4.45 \pm 1.25	2.83 \pm 1.64 ^{bd}	32.96 \pm 4.33	27.82 \pm 5.26 ^{bd}	3.46 \pm 1.07	2.51 \pm 0.52 ^{bd}
对照组	30	4.32 \pm 1.06	3.95 \pm 1.20 ^c	34.04 \pm 5.75	32.10 \pm 3.94 ^c	3.56 \pm 0.90	3.39 \pm 1.10 ^c

^b $P < 0.01$ vs 对照组治疗后; ^c $P > 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 同组治疗前。

肠鸣恢复时间分别为 2.2 ± 1.1 , 5.6 ± 2.8 d ($P < 0.05$); 治疗72 h后CT扫描显示胰腺炎症进展分别为60%, 83.33% ($P < 0.05$); 局部并发症发生率分别为2.86%, 13.33%; 病死率分别为0, 10%。

3 讨论

近年来的研究表明, SAP时大量炎症介质和细胞因子介导的全身性炎症反应综合征(SIRS)以及微循环障碍是引起胰外器官损伤的关键环节。甚至导致多器官功能障碍(MOD)和死亡^[5]。在肺损伤尤其是ARDS的发病中, 炎症介质起着关键作用^[6]。目前已知, PAF在介导SIRS和导致MOD中起重要作用^[7], 在SAP模型中发现, 局部肺组织中PAF积聚几乎与肺损伤同时出现, 引起肺血管通透性增加和组织水肿^[8]。而PAF拮抗剂能使SAP患者的器官衰竭减轻, 死亡率显著降低^[8-9]。这些都说明PAF与SAP肺损伤密切相关; IL-1, IL-6, IL-8等能刺激细胞间黏附分子(ICAM-1)在肺的表达增加, 引起血管内皮通透性增高和刺激多形核白细胞弹性蛋白酶释放, 是引起组织损伤的重要原因之一^[10]; IL-6水平与AP的严重程度和并发症的发生率呈正相关^[11-12]; IL-8不但介导组织损伤, 尚能破坏血管内皮的完整性, 增加其通透性。用抗IL-8 mAb治疗后, SAP模型血清IL-8水平下调, 肺组织中性粒细胞的渗出明显减少, 肺损伤减轻^[13]。在SAP早期不仅血中, 且肺组织中 $\text{TNF-}\alpha$ 的表达也明显升高^[14], 肺组织中 $\text{TNF-}\alpha$ 的基因表达增加与肺损伤的逐渐加重是平行的^[15]。

临床观察已表明以柴胡、白芍、生大黄、厚朴、枳实等组方的柴芍承气汤对SAP及其并发症有较好的治疗作用^[16]。本结果显示, 中药组治疗72 h再次CT扫描显示胰腺炎严重程度进展的比例明显少于对照组, 低氧血症的发生率以及发生ARDS的比例明显低于对照组, 表明该汤剂对SAP肺损伤有较好地防治作用。分析其机制可能与下列作用有关: (1)促进毒素排出, 防止毒素及细菌移位: 柴胡、枳实、厚朴、玄明粉等

能促进小肠蠕动, 生大黄能有效促进结肠蠕动与收缩排空^[17]。本结果中药组腹痛、腹胀等症状缓解时间明显短于对照组; (2)抗菌作用: 大黄的有效成分及柴胡均有抗菌作用, 从而减少肠菌移位; (3)生大黄能抑制胰酶分泌与活性, 降低血浆PLA2水平, 以及抑制血管通透性, 保护肠黏膜作用; (4)减轻内毒素血症: 该汤剂一方面通过促进肠道排泄减少内毒素吸收, 另一方面, 中药大黄能明显降低SAP器官功能不全患者血中内毒素含量^[18], 内毒素是内皮素(ET)最强烈的刺激物, 而ET是迄今发现的最强烈的血管收缩因子。我们最近的研究表明ET与SAP肺损伤密切相关^[19], 因此, 大黄既然能显著降低SAP时血浆内毒素水平, 就应该对并发的肺损伤有保护作用; (4)抑制炎症介质: 大黄能明显降低血中 $\text{TNF-}\alpha$, IL-1水平, 对SAP并发ARDS有效^[18]。银杏叶内所含银杏内酯, 具有拮抗PAF作用^[20]。本研究中, 中药治疗72 h后, 血液中PAF, $\text{TNF-}\alpha$, IL-1水平显著降低, 而对照组则无明显变化。因此, 我们认为, 抑制炎症介质可能是该汤剂防治SAP肺损伤的重要机制。

4 参考文献

- Toouli J, Brooke-Smith M, Bassi C, Carr-Locke D, Telford J, Freeny P, Imrie C, Tandon R. Guidelines for the management of acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17 Suppl: S15-39
- Steer ML. Relationship between pancreatitis and lung diseases. *Respir Physiol* 2001; 128: 13-16
- 王国品. 急性胰腺炎严重程度的评估方法. *中国实用内科杂志* 2000; 20: 374-376
- Balthazar EJ. Acute pancreatitis: assessment of severity with clinical and CT evaluation. *Radiology* 2002; 223: 603-613
- McKay C, Imrie CW, Baxter JN. Mononuclear phagocyte activation and acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1996; 219: 32-36
- Bhatia M, Mochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol* 2004; 202: 145-156
- Johnson CD. Platelet-activating factor and platelet-activating factor antagonists in acute pancreatitis. *Dig Surg* 1999; 16: 93-101
- Johnson CD, Kingsnorth AN, Imrie CW, McMahon MJ, Neoptolemos JP, McKay C, Toh SK, Skaife P,

- Leeder PC, Wilson P, Larvin M, Curtis LD. Double blind, randomised, placebo controlled study of a platelet activating factor antagonist, lexipafant, in the treatment and prevention of organ failure in predicted severe acute pancreatitis. *Gut* 2001; 48: 62-69
- 9 Lane JS, Todd KE, Gloor B, Chandler CF, Kau AW, Ashley SW, Reber HA, McFadden DW. Platelet activating factor antagonism reduces the systemic inflammatory response in a murine model of acute pancreatitis. *J Surg Res* 2001; 99: 365-370
- 10 Barnett CC, Moore EE, Moore FA, Biffl WL, Partrick DA. Soluble intercellular adhesion molecule-1 provokes polymorphonuclear leukocyte elastase release by CD18. *Surgery* 1996; 120: 395-401; discussion 401-402
- 11 Norman JG, Fink G, Franz M, Guffey J, Carter G, Davison B, Sexton C, Glaccum M. Active interleukin-1 receptor required for maximal progression of acute pancreatitis. *Ann Surg* 1996; 223: 163-169
- 12 Stimac D, Fisic E, Milic S, Bilic-Zulle L, Peric R. Prognostic values of IL-6, IL-8, and IL-10 in acute pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 209-212
- 13 Osman MO, Kristensen JU, Jacobsen NO, Lausten SB, Deleuran B, Deleuran M, Gesser B, Matsushima K, Larsen CG, Jensen SL. A monoclonal anti-interleukin 8 antibody (WS-4) inhibits cytokine response and acute lung injury in experimental severe acute necrotising pancreatitis in rabbits. *Gut* 1998; 43: 232-239
- 14 张妞, 倪泉兴, 张群华, 向阳, 张延龄. 炎症介质与急性坏死性胰腺炎大鼠的肺损伤. *中华普通外科杂志* 2001; 16: 172-173
- 15 Liu XM, Xu J, Wang ZF. Pathogenesis of acute lung injury in rats with severe acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 614-617
- 16 刘文, 刘遂娥, 刘未雄. 中西医结合治疗重症急性胰腺炎的疗效观察. *胃肠病学* 2002; 7: 244-245
- 17 彭燕, 王忠群, 李云, 李昌平, 邹义君. 柴芍承气汤对重症急性胰腺炎并发肠麻痹的治疗作用. *四川医学* 2003; 24: 571-572
- 18 严鸣, 杨兴易, 陈德昌, 许永华, 郭昌星. 大黄对重症急性胰腺炎并发呼吸窘迫综合征的治疗作用. *胃肠病学* 2001; 6: 94-96
- 19 黄晓丽, 刘顺英, 王国品, 曾皓明, 杨丽, 王智. 重症急性胰腺炎肺损伤内皮素的变化及丹参的治疗作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 853-857
- 20 姚新生, 孙万邦, 谢政军. 应激性溃疡中血小板活化因子的变化及银杏叶提取物的防治作用的实验研究. *中华消化杂志* 2002; 22: 319-320

■同行评价

本文研究了柴芍承气汤对重症急性胰腺炎的治疗作用, 具有一定的科学性和创新性, 对发展我国中医中药, 中西医结合治疗内科危重症具有一定的临床指导意义。

电编 张敏 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 •

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, xinxingege75@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。

缓释渗透增敏化疗加放疗综合治疗食管癌50例

王志蕙, 侯海燕, 范士怀, 彭京凤

■背景资料

为了克服食管癌局部放疗及全身化疗的失败及未控, 防止近期复发, 故设计采用局部直接渗透化疗及增敏治疗, 配合根治性放疗, 以期提高CR及生存质量。

王志蕙, 彭京凤, 山东省临沂市肿瘤医院 山东省临沂市 276001

侯海燕, 山东省立医院 山东省济南市 250000

范士怀, 山东省临沂市中医医院肿瘤中心 山东省临沂市 276002

通讯作者: 王志蕙, 276001, 山东省临沂市, 山东省临沂市肿瘤医院. monica_ok_6@163.com

电话: 0539-3690518

收稿日期: 2006-05-20 接受日期: 2006-07-19

Radiosensitizing effect of extended-release chemotherapy combined with radiotherapy in treatment of esophageal cancer: an analysis of 50 cases

Zhi-Hui Wang, Hai-Yan Hou, Shi-Huai Fan, Jing-Feng Peng

Zhi-Hui Wang, Jing-Feng Peng, Linyi Tumor Hospital, Linyi 276001, Shandong Province, China

Hai-Yan Hou, Shandong Provincial Hospital, Ji'nan 250000, Shandong Province, China

Shi-Huai Fan, Research Center of Oncology, Linyi Hospital of Traditional Chinese Medicine, Linyi 276002, Shandong Province, China

Correspondence to: Zhi-Hui Wang, Linyi Tumor Hospital, Linyi 276001, Shandong Province, China. monica_ok_6@163.com

Received: 2006-05-20 Accepted: 2006-07-19

Abstract

AIM: To evaluate the effect of extended-release chemotherapy combined with conventional fractionation radiotherapy in treatment of esophageal cancer.

METHODS: A total of 100 patients with esophageal carcinoma were randomly divided into experiment group ($n = 50$) and control group ($n = 50$). The experiment group received extended-release chemotherapy combined with conventional fractionation radiotherapy (X-ray external irradiation), while the control group was treated only with conventional fractionation radiotherapy. The recent efficacy as well as the 1-, 3-, and 5-year survival rates was observed.

RESULTS: The rates for complete remission

(CR), partial remission (PR), CR plus PR, non-changes (NC), and disease progression were 55.1%, 40.8%, 95.92%, 0, and 4.08% in the experiment group and 10%, 60%, 70%, 20%, and 10% in the control group, respectively; CR, CR+PR, and PR were significantly different between the two groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The 1-, 3-, and 5-year survival rates were 73.46%, 40.8% and 16.3% in the experiment group and 52%, 28% and 0 in the control group; the 1- and 5-year survival rates were markedly different between the two groups ($P < 0.05$, $P < 0.005$).

CONCLUSION: The recent efficacy and survival rates of extended-release chemotherapy combined with conventional fractionation radiotherapy are superior to conventional fractionation radiotherapy alone in the treatment of esophageal cancer.

Key Words: Extended-release apparatus; Esophageal cancer; Conventional fractionation radiotherapy; Chemotherapy; Radiosensitization

Wang ZH, Hou HY, Fan SH, Peng JF. Radiosensitizing effect of extended-release chemotherapy combined with radiotherapy in treatment of esophageal cancer: an analysis of 50 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(26):2640-2644

摘要

目的: 探讨缓释渗透增敏化疗加放疗综合治疗食管癌的疗效。

方法: 采取食管缓释渗疗器局部缓释渗疗同时配合X线常规放疗50例食管癌, 另50例行单纯常规分割X线外照射作为同期对照研究; 观察近期疗效及1, 3, 5 a生存率。

结果: 缓释渗透治疗组与单纯放疗组的完全缓解(CR), 部分缓解(PR), CR+PR, 无变化(NC), 肿瘤进展(PD)分别为: 55.1%, 10%; 40.8%, 60%; 95.9%, 70%; 0, 20%; 4.8%, 10%。缓释渗透治疗组的CR, CR+PR, PR与单纯放疗组相比有显著性差异($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。生存情况: 缓释渗透治疗组与单纯放疗组1 a生存率为73.46%, 52% ($P < 0.05$); 3 a生存率为

40.8%, 28% ($P>0.05$); 5 a生存率为16.3%, 0 ($P<0.005$).

结论: 食管缓释渗疗器局部缓释渗疗配合常规分割放疗综合治疗食管癌, 有显著的近期疗效; 同时改善了患者的生存率.

关键词: 缓释渗疗器; 食管癌; 常规分割放疗; 化疗; 增敏

王志蕙, 侯海燕, 范士怀, 彭京凤. 缓释渗透增敏化疗加放疗综合治疗食管癌50例. 世界华人消化杂志 2006;14(26):2640-2644
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2640.asp>

0 引言

近30 a来, 食管癌放疗后5 a生存率无明显提高, 主要原因是局部肿瘤未控或复发, 失败率高达80%^[1]. 自发现5-Fu, PYM等化疗药物有放疗增敏作用以来, 很多学者将这些药物作为放疗增敏与放疗联合应用治疗食管癌, 以期提高局控率, 延长生存时间, 均限于全身用药配合放疗, 有一定副反应^[1]. 为了探讨一种更有效的局部直接缓释渗透增敏化疗加放疗综合治疗中晚期食管癌的方法, 我们1999-04/2000-06采用食管缓释渗透器局部缓释渗透增敏化疗同时配合Varian 2300C/D医用直线加速器10 MV-X射线常规外照射放疗食管癌进行临床研究, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 全组共100例II-IV期病理/细胞学确诊食管癌患者; 无严重心肺、高血压疾病及出血倾向, 无远处转移, KPS>70分. 用信封抽签法随机分缓释渗透组、单纯放疗组各50例. 临床分期按1976年山西阳泉全国食管癌会议分期标准, 临床资料见表1. 食管缓释渗疗器是在刘津修^[2]渗疗器基础上根据需要进一步改制后由江苏无锡乳胶厂生产, 由营养腔(管)、注药腔(管)、测压腔(管)、缓释渗透囊(半透膜囊)及显影装置、导丝(芯)组成; 只有营养腔与其他腔不通, 可单独使用.

1.2 方法 参照X光片的肿瘤大小与位置, 组装好缓释渗疗器, 做缓释渗透囊耐压实验, 囊内压力加至12 kPa无漏气, 各管道通畅, 导芯置入营养管后可进出自如; 组装完毕置于750 mL/L酒精中存放. 患者取仰卧位, 肩部适当垫高, 头后仰, 用10 g/L地卡因鼻腔及咽部黏膜局麻; 将准备好的缓释渗疗器用蒸馏水冲洗2-3次, 经鼻腔缓慢置入食管后, 在模拟定位机下以显影装置为中

心确诊缓释渗疗器囊已覆盖肿瘤, 即可开始注药行缓释渗透增敏化疗.

缓释渗透组: 缓释渗透器内注入25 g/L 5-Fu 500 mg+PYM 8 mg+甲硝唑330 mg混合溶液50 mL(浓度达16.82 g/L). 当压力达12 kPa时停止药物注入, 此时缓释渗透囊药物持续不断的开始缓释外渗到肿瘤组织中去. 当缓释渗透4 h后, 药物浓度、压力逐渐下降, 继之再注入1次, 即4 h/次, 如此持续缓释渗透12 h为1疗程; 之后抽出残留液体, 休息12 h, 仍保留置入缓释渗透器, 间隔12 h后重复第2疗程, 即1疗程/24 h. 每疗程注入药囊的药物总量: 5-FU 1000-1250 mg, PYM 8-10 mg, 甲硝唑625-1250 mg. 每例患者先行8-9个疗程(8-9 d)为第1总疗程, 药物总量: 5-FU 8-10 g; PYM 60-80 mg, 甲硝唑5-10 g. 缓释渗透组行药物缓释渗疗同时, 行Varian 2300C/D医用直线加速器10 MV-X线SAD技术常规三野(前一后二)外照射, DT1200-1400 cGy/8-9 d/第1个缓释渗透总疗程. 缓释渗透期间, 由营养腔注入高蛋白、高维生素饮食, 共治疗50例; 除1例置管后患者即呕吐脱管, 拒绝2次插管, 其余49例均完成第1总渗透疗程. 放疗DT40-50 Gy时, 行第2渗透疗程缓释增敏腔内化疗, 方法、药物、剂量同第1总疗程, 直至放疗结束; 49例均完成第2总疗程, 放疗DT总60-65 Gy, DT总平均放疗剂量是6016 Gy. 两个总缓释渗透化疗疗程间隔2-3 wk. 单纯放疗组: 50例食管癌患者, 均予Varian 2300C/D医用直线加速器10 MV-X线三野SAD技术(前一后二)常规外照射, DT总60-65 Gy/6-7 wk, DT总平均剂量6200 Gy. 放疗期间常规静脉高营养及对症抗炎处理. 行DT1200-1400 cGy及DT60-65 Gy时分别行X-线检查及食管镜检查, 取病理送检.

第1缓释渗透化疗总疗程结束时, 即DT1200-1400 cGy时, 行X-线钡透及拍片、食管镜及取病理活检检查, 评价梗阻症状缓解情况、食管腔狭窄改善情况, 观察局部病变组织病理变化情况; 第2总疗程渗疗结束时, 即放疗全部结束时, 行第2次食管镜检查, 进一步观察局部病变组织病理学改变, 行X-线检查评价近期疗效. 两组放疗结束后, 定期随访, 按WHO标准评价近期疗效及统计1, 3, 5 a生存率. 按RTOG标准诊断放射性食管炎发生情况.

2 结果

100例II-IV期食管癌患者, 在1-5 a内主管医生

■研发前沿

在以放疗为主的根治过程中晚期食管癌中, 局部高浓度的化疗及增敏治疗是提高CR的研究重点. 但如何配合及采用更有效的化疗及增敏药物, 是亟待研究的深层次课题.

■相关报道

国内刘津修 *et al* 研发的食管渗疗器,主要是探讨发明的渗疗器及其在食管局部单纯化疗、抗炎、消肿中的应用,未就如何配合放疗来局部增敏及提高食管癌CR等做拓展研究。

采取登门拜访的形式进行动态观察,均完成随访,无1例失访,随访率100%。

2.1 两组患者的近期疗效 缓释渗透治疗组, (1)饮食的改变: 49例患者中, 第1次缓释渗疗总疗程结束时, 35例流质饮食患者有22例可进普食, 12例进半流质饮食, 1例改善不明显; 12例进半流质饮食者, 全部改进普食; 3例部分梗阻者, 2例改进半流质饮食, 进普食1例; 3例食管瘘者, 改进半流质饮食2例, 进流质饮食1例, 行积极抗炎后无1例进饮食后继续呛咳。第2次缓释渗疗总疗程结束时, 无1例吞咽困难加重, 均可进普食, 无1例放射性食管炎发生。 (2)X-线吞钡情况: 第1次缓释渗疗总疗程结束时, 病变长度由治疗前的7.17 cm缩小至4.5 cm(平均); 管腔狭窄程度, 47例狭窄及食管吞钡蠕动明显改善, 2例改善不明显, 32例钡过顺利, 16例钡过略迟缓, 1例轻度梗阻; 第2次缓释渗疗总疗程结束时, 吞咽困难全部消失, 合并龛影的改变, 12例合并龛影者, 11例龛影消失, 余1例由原来的8 cm×4 cm缩小至2 cm×3 cm, 有明显改善, 合并食管瘘的3例患者, 瘘口全部愈合(食管镜进一步证实), 可进半流质饮食, 无呛咳及发烧胸痛等感染症状, 偶可进普食。 (3)病变局部病理组织学变化情况: 第1总缓释渗疗总疗程结束时, 食管镜下可见局部组织水肿明显, 癌性溃疡组织梗阻明显改善, 显微镜下可见少量变性、坏死的癌组织; 第2缓释渗透化疗总疗程结束时, 食管镜下局部组织水肿不明显, 梗阻消失, 病变部位多点组织活检, 显微镜下见呈不同程度退行性变, 角化增多、坏死和裂解、变性的癌细胞体积增大, 胞质内出现大小不等的空泡, 核变大、深染、裂解, 染色质颗粒轮廓不变, 绝大部分癌细胞消失, 仅存片状的角化物质, 其周围常存在吞食角化物质的多核巨细胞及吞噬细胞, 有的角化物质中有程度不等、范围不一的钙化区。 (4)缓释渗透增敏化疗时病变周边组织药物浓度测定结果: 应用日立公司的635A型高效液相色谱仪测定: 5-FU 12 h渗出量为915 mg作用于肿瘤组织, 而5-FU静脉给药后作用于肿瘤组织药物浓度为3.225 mg (0.75/60×0.25, 静脉常用量为每天0.75 g, 假设患者体质量为60 kg, 肿瘤质量为0.25 kg)是全身用药的292.8倍。同理, PYM、甲硝唑局部缓释渗疗的浓度达全身用药的292倍。 (5)缓释渗透增敏化疗组副作用: 10例咽痛, 4例恶心、呕吐, 1例上腹不适, 停用缓释渗疗后均消失, 考虑与置入缓释渗疗器时刺激和鼻饲流

表 1 缓释渗透治疗组与单纯放疗组临床资料

项目	缓释渗透 治疗组	单纯 放疗组
性别		
男(n)	39	40
女(n)	11	10
年龄(a)		
43-76		43-83
平均(a)	61.7	64
饮食		
流质(n)	35	30
半流质(n)	12	15
部分梗阻(进食 呕吐者)(n)	3	5
分段		
上段(n)	3	4
中段(n)	37	31
下段(n)	10	15
长度(cm)		
3-11		3-10
平均(cm)	7.17	6.17
病理		
鳞癌(n)	42	44
腺癌(n)	8	6
X线分型		
溃疡型(n)	21	24
髓质型(n)	10	11
缩窄型(n)	5	8
蕈伞型(n)	2	5
腔内型(n)	12	2
合并龛影者(n)	12	8
合并瘘者(n)	3	5
临床分型		
Ⅱ (n)	10	11
Ⅲ (n)	20	18
Ⅳ (n)	20	21
DT(平均, cGy)	6016	6200

质饮食量、温度等因素有关; 8例发热, 38-39℃, 对症处理可缓解, 无1例骨髓抑制及恶液质病例。

单纯放疗组: (1)饮食的改变: DT1200-1400 cGy时30例进流质饮食者症状无改善, 且20例吞咽困难及胸骨后痛较前加重, 15例半流质饮食者无改善, 5例部分梗阻者仅1例改进流质饮食, 5例食管瘘者无1例瘘口改善, 仍需保持鼻饲及抗炎、静脉高营养治疗; DT60-65 Gy时, 放射性Ⅱ-Ⅳ级食管炎(RTOG)为20% (10/50)。 (2)X线吞钡检查情况: DT1200-1400 cGy时, 50例病变长度缩小均不明显, 40例仍明显钡过迟缓加重, 管腔狭窄及蠕动改善不显著; DT60-65 Gy时, 8例合并龛影者, 仅2例龛影消失, 1例龛影明显改善, 余变化不显著, 5例瘘者均未完全愈合瘘口。 (3)病变局部组织变化: DT1200-1400 cGy时, 食管镜下见食管黏膜水肿明显, 癌灶溃疡分泌物多, 可见有似脓性分泌物覆盖; 显微镜下见极少量癌细胞肿胀、变性; DT60-65 Gy时, 食管镜下仍

见黏膜不同程度水肿, 大量分泌物; 显微镜(病变部位多组织活检)见部分变性、坏死的癌细胞, 大量炎性细胞浸润. (4)放疗副反应: 3例合并食管瘘者出现严重恶液质而中断放疗; 胸痛加重者12例; 合并炎症者11例; 亦无1例骨髓抑制者.

2.2 两组患者的1, 3, 5 a生存率 缓释渗疗组的3例食管瘘者, 全部存活13 mo; 1例存活24 mo死亡, 1例存活14 mo死亡, 1例存活13 mo死亡. 12例合并龛影者, 11例存活1 a, 8例存活2 a, 2.5 a后全部死亡. 单纯放疗组的5例食管瘘者, 3例生存7 mo死亡, 1例生存9 mo, 1例生存11 mo; 8例合并龛影者, 4例存活1 a, 4例1.5 a后死亡(表2).

3 讨论

食管癌确诊时只有20%的病例可作根治性切除, 80%的病例已是中晚期(II-IV期), 主要依靠放疗和全身化疗与其他学科的综合治疗; 食管癌根治性切除的5 a生存率为20%-25%, 单纯放疗的5 a生存率为10%-15%左右, 40 a来其疗效均无明显提高, 提高放疗疗效和多学科综合治疗将成为今后食管癌研究的重点^[3]. 本研究在上述观点的指导下, 对失去手术指征或/和拒绝手术的II-IV期食管癌, 采用食管腔内置入缓释渗疗器进行缓释渗透增敏化疗及配合体外常规X线放疗, 共治疗49例, 1, 3, 5 a生存率分别为73.46% (36/49), 40.8% (20/49), 16.3% (8/49); 单纯放疗50例, 1, 3, 5 a生存率分别为52% (26/50), 28% (14/50), 0; 两组1, 5 a生存率比较有显著差异($P<0.005$); 3 a生存率比较, 无显著差异. 由此可见: 本疗法可提高1, 3, 5 a生存率, 1, 5 a统计学比较有显著性差异. 原因是: (1)提高了局控率, 研究组CR及CR+PR为: 55.1% (27/49), 95.92% (47/49), 与对照组的CR及CR+PR: 10% (5/50), 70% (35/50)比较, 均有显著差异($P<0.01$); (2)综合、独特的增敏作用: 缓释渗透药物, 有化疗作用、增敏作用及局部直接消炎3大作用于一体, 配合外照射, 可起到快速、有效消除肿瘤作用; (3)食管腔内缓慢持续的机械性扩张作用, 在解除梗阻的同时, 对肿瘤也有特殊的机械性缩小、压迫及可造成肿瘤细胞水肿、坏死作用; (4)研究组生存5 a者8例, 有4例为腔内型, 说明良好的X线分型(腔内型)也可能是疗效增加的原因之一.

缓释渗疗器主要应用生物医学工程材料具有特殊的物质交换功能的缓释半透膜囊来完成预计的治疗作用. 缓释作用的发挥, 依赖缓释渗

表 2 两组患者的近期疗效及1, 3, 5 a生存率

项目	缓释渗透治疗组	单纯放疗组
完全缓解CR	55.1% (27/49) ^b	10% (5/50)
部分缓解PR	40.8% (20/49) ^a	60% (30/50)
CR+PR	95.9% (47/49) ^b	70% (35/50)
无变化NC	0	20% (10/50)
肿瘤进展PD	4.8% (2/49)	10% (5/50)
生存率1 a	73.5% (36/49) ^a	52% (26/50)
3 a	40.8% (20/49)	28% (14/50)
5 a	16.3% (8/49) ^{b*}	0

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 单纯放疗组; *8例中, 4例腔内型食管癌.

透压差; 缓释渗透压差的产生与液体浓度的高低、压力的大小有关. 另外, 缓释半透膜两侧必须同时为液相, 物质交换才可实现. 在食管癌中, 肿瘤的细胞结构较松散, 细胞间隙裸露较明显^[4]; 选择的缓释渗透膜囊直径必须大于食管腔内径, 当充满所需溶液时缓释渗透膜与肿瘤的裸露细胞组织紧紧贴在一起. 当缓释渗透囊内压力达12 kPa, 药物浓度为168.2 g/L时, 已远远超出了癌组织间液的压力(3.06 kPa)和组织间液浓度, 同时又可人为的控制缓释渗透囊内药物浓度及压力, 保持始终大于食管组织间液的压力和浓度, 这就为囊内物质交换提供了条件, 从而使囊内药物持续不断的缓慢渗透到食管肿瘤组织. 12 h 5-FU渗出总量为915 mg通过缓释作用于肿瘤组织, 是全身静脉用药的292.8倍, PYM、甲硝唑也是全身静脉用药的292倍, 显著提高了肿瘤组织中的药物浓度. 另外, 缓释渗疗中囊内增高的压力, 可限制肿瘤血供, 延缓肿瘤生长并使局部静脉及淋巴管终端压力增高; 不但促进了静脉和淋巴回流, 而且也促进了抗癌药物的扩散, 使抗癌药物有可能沿转移途径最大限度的杀灭肿瘤细胞. 另外, 缓释渗疗器囊内的高浓度化疗药物通过物质交换缓释渗透到肿瘤组织的同时, 囊内的高压力对梗阻的食管肿瘤组织起到药物治疗和机械扩张的双重作用. 从本研究中可见: 缓释渗疗的35例患者进流质饮食, 缓释渗疗后改进普食者为22例, 改进半流质饮食者为12例, 无改善者为1例; 部分梗阻的3例患者缓释渗疗后改进半流质饮食2例, 普食1例. 而单纯放疗组, 30例进流质饮食中, 20例吞咽困难及胸痛加重, 发生率为67%; 进半流质饮食者无任何改善; 5例部分梗阻者仅1例改善可进流质饮食.

■名词解释

缓释渗疗器: 缓慢有计划的释放渗透药物达到治疗目的的适用设备. 可局部提高化疗、增敏、抗炎等药物浓度, 在食管癌中尤为适用.

■同行评价

本研究通过前瞻性临床实验探讨了缓释渗透增敏化疗加放疗综合治疗食管癌的疗效,方法可行,设计合理,具有一定临床意义。

晚期食管癌(穿孔),在临床较为常见,文献报告15%^[5],主要采用综合性姑息治疗,一般列为放疗禁忌症,约65%的患者于2-4 mo内死亡^[6]。本研究中3例食管癌,行局部缓释渗透治疗前提下(即瘘口堵塞后),加用放疗,X线吞钡复查食管瘘口全部消失,患者均可进半流质及普食,随访生存长达1余年;单纯放疗组中,5例食管癌放疗结束时均未发生愈合,3例因恶液质中断治疗,均在7-11 mo内死亡;这充分显示了缓释渗透疗法可很好的修复食管癌,同时也可使之能接受放疗,延长生存期。我们认为其作用机制可能是充盈的缓释渗透囊堵塞了瘘口,完全切断了瘘口与相邻脏器的通路,为组织修复起到了支架支撑和治疗作用,防止了食管分泌物及饮食进入纵隔或/和肺内导致混合性感染,阻止了病情进一步恶化,为放疗创造了条件;同时还可经营养腔(管)进行鼻饲,保证了患者的营养及水电平衡,促进了机体恢复及瘘口修复,创造了治疗机会。

缓释渗透增敏化疗,因显著的提高和保持了食管腔内肿瘤组织中的局部化疗、抗炎药物浓度,也提高了放疗增敏药物浓度,配合放疗外照射,最大极限的杀灭了癌细胞,消除了局部炎症及水肿;加上缓释渗透囊内的持续机械性扩张作用,均可使食管癌患者症状、体征改善较迅速显著,食管癌修复较满意;进而提高了肿瘤局控率,延长了患者的生存;值得临床推广应用。

4 参考文献

- 1 于金明,殷蔚伯,李宝生. 肿瘤精确放射治疗学. 第1版. 济南: 山东科学技术出版社, 2004: 719
- 2 刘津修,王洪贵,刁元浩. 食管渗疗器及其应用的研究. 中国肿瘤临床 1990; 17: 87
- 3 刘泰福. 现代放射肿瘤学. 第1版. 上海: 复旦大学出版社, 2001: 347
- 4 河南医学院. 食管癌. 北京: 人民卫生出版社, 1983: 108-109
- 5 Bladergroen MR, Lowe JE, Postlethwait RW. Diagnosis and recommended management of esophageal perforation and rupture. *Ann Thorac Surg* 1986; 42: 235-239
- 6 谷铎之,殷蔚伯,刘泰福. 肿瘤放射治疗学. 北京: 北京医科大学 中国协和医科大学联合出版社, 1993: 316

电编 张敏 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 ●

第六届西太平洋幽门螺旋杆菌会议通知

本刊讯 由泰国Chulalongkorn医院承办的第六届西太平洋幽门螺旋杆菌会议将于2006-11-12/14在泰国曼谷举行, 欢迎各国研究幽门螺旋杆菌的学者报名参加。

1 地址

General Secretariat, GI Unit, Department of Medicine, 1873 Prompun Building 1st Floor. Chulalongkorn Hospital, Rama 4 Road, Patumwan, Bangkok 10330 Thailand

2 联系方式

电话: +662-256-4265; 传真: +662-253-8272, +662-652-4219;

Email: wphc_2006@mail.com; 网址: www.6wphc2006.com; 联系人: Dr. Duangporn Thong-Ngam

高海拔地区无痛胃镜检查的临床观察

张晓华, 朱人敏, 白玛觉群

张晓华, 朱人敏, 南京军区南京总医院消化内科 江苏省南京市 210002

白玛觉群, 西藏自治区第二人民医院内二科 西藏自治区拉萨市 850001

通讯作者: 朱人敏, 210002, 江苏省南京市, 南京军区南京总医院消化内科. jszhxh@sina.com

电话: 025-80860048

收稿日期: 2006-08-09 接受日期: 2006-08-21

Clinical application and efficacy of analgesic gastroscopy in high-altitude region

Xiao-Hua Zhang, Ren-Min Zhu, Bai-Ma Jue-Qun

Xiao-Hua Zhang, Ren-Min Zhu, Department of Gastroenterology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China

Bai-Ma Jue-Qun, the Second Department of Internal Medicine, the Second People's Hospital, Lhasa 850001, Tibet Autonomous Region, China

Correspondence to: Ren-Min Zhu, Department of Gastroenterology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China. jszhxh@sina.com

Received: 2006-08-09 Accepted: 2006-08-21

Abstract

AIM: To evaluate the safety and the effect of analgesic gastroscopy through intravenous injection of propofol in high-altitude region in China.

METHODS: Intravenous propofol (1.0-1.5 mg/kg) sedation was used in 36 volunteers during gastroscopy. The indexes such as heart rate (HR), blood pressure (BP), respiratory rate (RR), and serum oxygen saturation (SpO₂), as well as waking-up time, memory deficit, and self-sensation were observed during the process of operation.

RESULTS: Analgesic gastroscopy was successfully performed in all the 36 cases without any adverse reaction. After operation, 36 cases (100%) felt satisfied, and 33 cases (91.67%) felt comfortable, which had significant differences from the results of routine gastroscopy ($P < 0.01$). HR,

BP and RR were significantly decreased within normal scope, and SpO₂ kept steady during analgesic gastroscopy as compared with the result of routine gastroscopy ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Analgesic gastroscopy with intravenous injection of propofol is a safe, comfortable and effective sedation method, worthy of extensive application in high-altitude region in China.

Key Words: High altitude; Propofol; Analgesia; Gastroscopy

Zhang XH, Zhu RM, Bai-Ma JQ. Clinical application and efficacy of analgesic gastroscopy in high-altitude region. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(26):2645-2648

摘要

目的: 探讨高海拔地区丙泊酚iv行无痛胃镜检查的安全性和镇静效果。

方法: 自愿接受者36例, 采用单纯丙泊酚(1.0-1.5 mg/kg)iv施行无痛胃镜检查。观察术中心率(HR)、血压(SBP, DBP)、呼吸(RR)、血氧饱和度(SpO₂)的变化及苏醒时间、术中不适、记忆缺失、自我感觉等情况。

结果: 无痛组患者均顺利完成检查, 无严重不良反应发生, 检查后患者感觉满意者36例(100%), 舒适者33例(91.67%), 无1例感觉难受, 与普通组比较差异有显著性意义($P < 0.01$)。无痛组在胃镜检查过程中HR, SBP, DBP, RR有不同程度的下降, 但大多数波动在正常范围; SpO₂在全程吸氧下能维持平稳, 与普通组相比, 其差异均具有显著意义($P < 0.01$)。

结论: 丙泊酚iv行无痛胃镜检查是一种安全、舒适、有效的方法, 在高海拔地区值得推广应用。

关键词: 高海拔; 丙泊酚; 无痛术; 胃镜检查

张晓华, 朱人敏, 白玛觉群. 高海拔地区无痛胃镜检查的临床观察. 世界华人消化杂志 2006;14(26):2645-2648

■背景资料

目前, 鲜有将无痛胃镜技术应用于高海拔地区的报道。高海拔地区是一个缺氧环境, 开展该项技术的安全性值得研究。

■应用要点

本文表明,该项技术是一种安全、舒适、有效的好方法,在高海拔地区同样值得推广应用,但要适当控制丙泊酚用量,加大给氧流量及监护,以确保安全。

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2645.asp>

0 引言

高海拔地区消化系统疾病是一种常见病、多发病,其诊断治疗多需要通过内镜检查完成。普通内镜检查为有创性,常引起患者恶心呕吐、咽部不适甚至出现躁动或不配合检查而延误疾病的诊断与治疗。无痛胃镜检查术是适当应用镇静剂,使患者在浅麻醉状态下完成检查,整个过程患者舒适、无痛苦。关于高海拔地区无痛胃镜检查的报道很少,我们于2005-07援藏工作期间在西藏自治区第二人民医院开展该项工作,对36例患者采用单纯丙泊酚(propofol)iv施行无痛胃镜检查,取得了满意的效果。现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 按自愿原则选择36例患者实施无痛胃镜检查(无痛组),其中男21例,女15例;年龄18-65(平均45.2)岁。普通胃镜检查(普通组)45例,男27例,女18例;年龄16-67(平均46.8)岁。两组的年龄、性别、体重比较差异无显著性。

1.2 方法 胃镜检查前,确认患者无胃镜检查与麻醉禁忌症,重点了解有无过敏史、有无服用特殊药物史,如安眠药、降压药、麻醉药及毒品等,有无怀孕及哺乳等相关问题。两组术前禁食8 h,禁水4 h。术前准备电子胃镜、氧气、心电监护仪、气管插管器械等。由技术熟练的胃镜医师及麻醉专业医师共同完成。无痛组用20 g/L利多卡因进行咽喉表面麻醉2-3次后,取左侧卧位,鼻导管给氧,流量2-3 L/min,建立静脉通道,将丙泊酚0.4 mL(4 mg)/s缓慢静推,剂量1.0-1.5 mg/kg,用药中密切观察药物起效时间、患者反应及监护情况,待患者睫毛反射迟钝或消失,自主呼吸正常后,开始插镜检查。术中根据检查时间长短及患者反应酌情追加丙泊酚剂量,同时监测心率(HR)、血压(SBP、DBP)、呼吸频率(RR)及血氧饱和度(SpO₂)。术后观察意识恢复时间并立即询问患者有无头昏、困倦、嗜睡、咽喉不适等症,术中知晓否及满意度,观察15-30 min,患者完全清醒能独立行走为止。普通组口含咽喉部黏膜麻醉润滑剂利多卡因胶浆10 mL(江苏齐川制药有限公司),除静脉不给药和不给氧外,其他同无痛组。

统计学处理 所得计数资料行 χ^2 检验;计量资料以均数±标准差(mean±SD)表示,通过

表 1 患者检查中和检查后的反应情况(n)

分组	n	检查中			检查后		
		恶心呕吐	呛咳	膈肌痉挛	难受	满意	舒适
普通组	45	35	4	1	39	6	0
无痛组	36	2	1	0	0	36	33

难受为恶心呕吐、呛咳等反应重;满意为插镜时咽喉部反射较重,术中反应较轻;舒适为无任何痛苦。两组比较,具有显著性差异($P<0.01$)。

SPSS 11.0统计软件,采用单因素方差分析进行显著性检验, $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 镇静效果 无痛组在给药后30-50 s,出现嗜睡、困倦,继之睫毛反射消失,渐渐入睡,观察30 s后开始检查。术后患者在1-5 min逐渐清醒,清醒后7例有头晕,10例感乏力、嗜睡,30 min内均完全恢复正常,术后患者无内镜检查及任何痛苦记忆。普通组口含利多卡因胶浆,舌麻木后开始检查,患者均有不同程度的痛苦。

2.2 检查中和检查后的反应 普通组45例,检查中恶心呕吐35例,呛咳4例,膈肌痉挛1例;检查后患者感觉难受者39例(86.67%),满意者6例(13.33%),无1例感觉舒适。无痛组36例,检查中恶心呕吐2例,呛咳1例;检查后患者感觉满意者36例(100%),舒适者33例(91.67%),无1例感觉难受。两组比较,患者检查中和检查后反应的差异具有显著性意义($P<0.01$,表1)。无痛组所有患者术后对检查过程无记忆,并且愿意接受再次检查和介绍病友检查。

2.3 操作时间及丙泊酚用量 无痛组36例,操作时间为4-12(平均7.6)min;丙泊酚用量60-130(平均约100)mg。普通组45例,操作时间为4-15(平均8.7)min。所有患者均顺利完成检查。

2.4 呼吸、循环指标的变化 无痛组在胃镜检查过程中HR, SBP, DBP, RR有不同程度的下降,但大多数波动在正常范围,与普通组相比,其差异均具有显著意义;无痛组SpO₂在全程吸氧下能维持平稳,达96%以上,显著高于非吸氧的普通组($P<0.01$,表2)。

2.5 不良反应 无痛组36例患者中,仅1例发生呛咳、气管痉挛,SpO₂急剧下降至78%,经立即拔出胃镜,经托下颌,高浓度给氧数秒钟后缓解,SpO₂迅速恢复正常,重新插镜检查成功。其余患者无明显呼吸、循环功能抑制,在iv丙泊酚后

表 2 患者检查前、中、后循环呼吸指标的变化 (mean ± SD)

分组		HR (次/min)	SBP (mmHg)	DBP (mmHg)	RR (次/min)	SpO ₂ (%)
普通组	检验前	70.2 ± 9.3	129.6 ± 14.4	82.4 ± 9.2	20.1 ± 2.6	92.0 ± 1.8
	检验中	82.2 ± 10.3 ^d	142.2 ± 12.5 ^c	92.6 ± 9.8 ^c	22.2 ± 2.7	90.1 ± 2.2 ^c
	检验后	73.0 ± 9.6	133.0 ± 12.9	86.2 ± 10.7	20.7 ± 2.3	91.2 ± 1.9
无痛组	检验前	71.4 ± 11.1	131.4 ± 14.9	82.8 ± 8.5	20.4 ± 3.1	97.1 ± 1.2 ^b
	检验中	69.0 ± 8.9 ^b	128.2 ± 10.0 ^a	77.8 ± 7.5 ^b	17.3 ± 1.9 ^{bd}	96.6 ± 0.9 ^b
	检验后	70.8 ± 8.2	130.0 ± 9.0	79.4 ± 7.3	18.3 ± 2.4	97.1 ± 1.1 ^b

^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01 vs 普通组; ^c*P* < 0.05, ^d*P* < 0.01 vs 同组检查前。

1-2 min, 10例患者血压下降, 心率减慢, 平均下降约15%, 但仍在正常范围, 检查结束后, 自行恢复至检查前水平。8例患者iv开始时自觉局部疼痛, 通过减慢注射速度后缓解。

3 讨论

普通胃镜检查术是一种侵入性操作, 仅在咽喉部表面麻醉下进行, 患者多有紧张、焦虑和恐惧感, 伴有咽喉不适、咳嗽、恶心、呕吐等不适反应, 给患者身心带来一定创伤, 因而使部分患者惧怕并拒绝检查或复查。而无痛胃镜检查是在操作时适当应用镇静麻醉剂, 使患者在清醒镇静或浅睡眠状态下完成检查或治疗, 整个过程中患者舒适、无痛苦、无记忆。丙泊酚是一种新型短效静脉麻醉药, 半衰期短(30-60 min), 起效快、清除快、苏醒快, 苏醒后不影响患者时空定向力, 无嗜睡现象, 麻醉安全可靠, 是目前在无痛胃镜中使用最多的药品之一^[1]。但他在麻醉期有轻度循环抑制作用, 可使HR减慢, 血压下降。丙泊酚麻醉存在一个阈血浆浓度(17-18 mg/L), 而在阈血浆浓度以下, 具有镇静作用, 并不抑制心血管和呼吸功能, 还可大大减少因患者镇静、镇痛不确切带来的咽部及胃黏膜损伤, 甚至出血。丙泊酚血药浓度和镇静水平易于调控并有良好和稳定的量效相关性。有研究提示丙泊酚具有特异抗恶心、呕吐作用, 其机制可能与丙泊酚作用于极后区催吐化学感受区非特异性5-HT₃有关^[2-3], 对门诊手术有益处, 所以较少出现恶心、呕吐。丙泊酚可降低脑血流量、颅内压和脑氧代谢率, 对脑有保护作用; 对心血管有轻度抑制作用, 降低心肌耗氧量, 也可降低血压, 高血压患者的平均降压幅度为20%, 适合高血压等相对禁忌者, 尤其适合儿童、精神分裂症等不能配合检查者, 扩大了胃镜检查治疗的适应证^[4-5]。患者在检查中

处于麻醉状态, 对消化道的刺激反应较弱, 便于术者能从容地对胃壁进行全面仔细的检查, 对胃底部、胃体上部后壁、胃角、贲门等活检困难部位能提高活检准确性, 可对病灶多方位取材、增加活检数量及进行挖掘式深部取材, 从而提高活检阳性率, 及时诊断, 为患者治疗争取宝贵的时间, 减少医疗费用。同时, 也不用担心患者在术中难受时不配合咬坏胃镜等。

高海拔地区是一个缺氧环境, 平均氧含量只有650 mL/L左右, 广泛开展无痛胃镜技术的安全性值得进一步研究。本文36例患者通过iv丙泊酚顺利完成无痛胃镜检查, 检查后患者100%感觉满意, 91.67%感觉舒适, 术后对检查过程无记忆, 并且愿意接受再次检查和介绍病友检查。检查过程中患者HR、血压、RR及SpO₂维持稳定在正常范围。1例发生呛咳、气管痉挛可能与患者镇静不彻底、胃镜插入过早有关, 立即拔出胃镜, 加大吸氧浓度、丙泊酚剂量后缓解, SpO₂迅速恢复正常, 重新插镜检查成功。因此, 我们认为, 在高海拔地区开展无痛胃镜诊治术是安全的。但由于本文报道例数有限, 统计不良反应发生率可能存在不足, 而且, 异丙静脉麻醉后毕竟对呼吸、循环系统有轻微抑制作用, 因此, 丙泊酚用量比普通地区用量要适当控制, 整个操作过程常规吸氧并备好心肺复苏设备及药品, 置入胃镜前加大氧流量, SpO₂都能保持在96%-99%之间。为确保患者安全, 麻醉科医师应在患者身边监护, 随时应急抢救, 常规监测血压、脉搏、SpO₂, 吸氧提供良好通气与氧合。因此, 无痛胃镜技术是一种安全、舒适、有效的好方法, 满足了患者和医生的共同要求, 在高海拔地区同样值得推广应用。

4 参考文献

- 1 Yusoff IF, Raymond G, Sahai AV. Endoscopist administered propofol for upper-GI EUS is safe

同行评价

本文以高海拔地区无痛胃镜检查的临床观察为题来阐述丙泊酚无痛胃镜检查的安全性和有效性, 较好的反应了研究主旨。尽管目前该文的相关文献较多, 但鲜有将此方法应用于高海拔地区者。从这个角度讲, 该文有一定的创新性。

- and effective: a prospective study in 500 patients. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 356-360
- 2 Borgeat A, Wilder-Smith OH, Saiah M, Rifat K. Subhypnotic doses of propofol possess direct antiemetic properties. *Anesth Analg* 1992; 74: 539-541
- 3 Barann M, Gothert M, Fink K, Bonisch H. Inhibition by anaesthetics of ^{14}C -guanidinium flux through the voltage-gated sodium channel and the cation channel of the 5-HT₃ receptor of N1E-115 neuroblastoma cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1993; 347: 125-132
- 4 Heuss LT, Schnieper P, Drewe J, Pflimlin E, Beglinger C. Safety of propofol for conscious sedation during endoscopic procedures in high-risk patients-a prospective, controlled study. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1751-1757
- 5 Wengrower D, Gozal D, Gozal Y, Meiri Ch, Golan I, Granot E, Goldin E. Complicated endoscopic pediatric procedures using deep sedation and general anesthesia are safe in the endoscopy suite. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 283-286

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). 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).

慢性萎缩性胃炎24 h胃内pH值监测及血清胃泌素含量的意义

袁华魏, 李雪雁, 徐鸽鸽, 张恩民

袁华魏, 徐鸽鸽, 张恩民, 大连市中心医院消化内科 辽宁省大连市 116033
李雪雁, 大连市第六人民医院 辽宁省大连市 116033
通讯作者: 袁华魏, 116033, 辽宁省大连市沙河口区西南路826号, 大连市中心医院消化内科. yhwxy0515@hotmail.com
电话: 0411-84412001-613
收稿日期: 2006-04-24 接受日期: 2006-06-30

Significance of 24-h intragastric pH monitoring and serum concentration of gastrin in chronic atrophic gastritis

Hua-Wei Yuan, Xue-Yan Li, Ling-Ge Xu, En-Min Zhang

Hua-Wei Yuan, Xue-Yan Li, Ling-Ge Xu, En-Min Zhang, Department of Gastroenterology, Dalian Municipal Central Hospital, Dalian 116033, Liaoning Province, China
Xue-Yan Li, Dalian Sixth People's Hospital, Dalian 116033, Liaoning Province, China
Correspondence to: Hua-Wei Yuan, Department of Gastroenterology, Dalian Municipal Central Hospital, 826 Southwest Road, Shahekou District, Dalian 116033, Liaoning Province, China. yhwxy0515@hotmail.com
Received: 2006-04-24 Accepted: 2006-06-30

Abstract

AIM: To evaluate the clinical significance of 24-h intragastric pH monitoring and the serum concentration of gastrin in patients with chronic atrophic gastritis (CAG).

METHODS: A total of 126 patients with chronic gastritis, confirmed by endoscopy combined with pathological examination, were recruited in this study. Based on histological results, the patients were divided into 4 groups: non-atrophic gastritis, mild, moderate and severe CAG group, respectively. The 24-h intragastric pH value was monitored using mobile pH measuring apparatus. The serum concentration of gastrin was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and *H pylori* infection was determined by rapid urease test and ^{14}C urea breath test.

RESULTS: *H pylori* infection was assured in 73 patients, of which 52 cases were diagnosed with CAG. The rates of *H pylori* infection showed no difference between the two groups. The intra-

gastric 24-h median pH value, mean pH value, and nightly median pH value were significant higher in patients with severe CAG than those in the others ($P < 0.05$). The content of gastrin was the highest in patients without CAG, significantly higher than that in the others (59.21 ± 17.36 , 54.67 ± 15.84 , 50.78 ± 13.13 vs 74.24 ± 19.52 nmol/L, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Besides endoscopy and biopsy, the combination of intragastric pH monitoring and serum gastrin detection is helpful in the improvement of CAG diagnosis, so as to guide clinical treatment.

Key Words: Atrophic gastritis; Gastric acid; Gastrin; pH value

Yuan HW, Li XY, Xu LG, Zhang EM. Significance of 24-h intragastric pH monitoring and serum concentration of gastrin in chronic atrophic gastritis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(26):2649-2651

摘要

目的: 探讨在慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)患者中应用24 h胃内pH值监测及血清胃泌素含量的临床意义。

方法: 126例经内镜联合病理诊断慢性胃炎患者, 根据病理结果分为非萎缩性胃炎组、轻度、中度和重度萎缩组, 应用便携式pH测定仪进行24 h胃内pH值测定、ELISA法检测血清胃泌素、快速尿素酶和 ^{14}C -尿素呼吸试验监测幽门螺杆菌(*H Pylori*)感染。

结果: *H Pylori*感染患者73例, 其中CAG患者阳性52例, 感染率在各组中无差异。重度CAG组患者在24 h中位pH值、平均pH值以及夜间中位pH值均高于其他各组, 具有显著性统计学差异($P < 0.05$); 萎缩性胃炎胃泌素含量较非萎缩组低(59.21 ± 17.36 , 54.67 ± 15.84 , 50.78 ± 13.13 nmol/L vs 74.24 ± 19.52 nmol/L, $P < 0.05$)。

结论: 诊断CAG除胃镜和病理外, 结合胃内pH值和胃泌素测定有助于进行诊断分级和提

■背景资料

2000-05全国慢性胃炎研讨会就慢性胃炎的治疗原则达成共识, 即消除或削弱攻击因子、增强胃黏膜防御和动力促进剂。目前对萎缩性胃炎是否应用抑酸剂治疗意见不一, 导致各种治疗效果尚不理想。在治疗CAG的问题上, 如何避免滥用药物, 坚持合理用药, 是目前迫切需要解决的问题。

■应用要点

目前认为, CAG患者胃内低酸或无酸, 通过24 h胃内pH值监测临床观察发现, 并非所有CAG患者胃内低酸或无酸, 该方法为临床治疗轻中度萎缩性胃炎的患者应用抑酸剂提供了理论依据。

高诊断准确率, 指导治疗。

关键词: 萎缩性胃炎; 胃酸; 胃泌素; pH值

袁华魏, 李雪雁, 徐鸽鸽, 张恩民. 慢性萎缩性胃炎24 h胃内pH值监测及血清胃泌素含量的意义. 世界华人消化杂志 2006;14(26):2649-2651

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2649.asp>

0 引言

慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)是以胃黏膜固有腺体萎缩常伴有肠上皮化生为特点的慢性炎症, 在老年人群中多发, 病因主要与幽门螺杆菌(*H. pylori*)感染有关, 是正常组织向胃癌过渡的中间状态, 是一种癌前病变^[1-2]. 因此积极治疗CAG十分重要. 目前临床上治疗CAG尚不规范, 如何避免滥用药物, 坚持合理用药, 是迫切需要解决的问题. 目前普遍认为, CAG患者胃内低酸或无酸, 治疗重点在于加强保护黏膜和促进胃肠动力. 然而临床观察发现, 许多萎缩性胃炎的患者也有上腹痛、反酸、烧心表现, 抑酸或抗酸治疗有效. 此现象是否表明部分CAG患者也可能存在高胃酸分泌. 我们通过对2003-3/2006-01期间经内镜联合病理诊断的慢性胃炎患者进行24 h胃内pH值测定, 结合血清胃泌素和*H. pylori*监测, 探讨CAG患者24 h胃内pH值及血清胃泌素含量在诊断CAG中的临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料 本组126例患者均经内镜检查联合胃黏膜病理诊断证实, 男72例, 女54例, 年龄36-72(中位53.2±10.2)岁. 其中慢性非萎缩性患者45例, 男23例, 女22例; 萎缩性胃炎81例, 男47例, 女34例. 排除标准: 未做完整胃镜检查的患者; 上消化道出血的患者以及胃镜检查发现反流性食管炎的患者; 近1 wk内服用过影响监测结果的药物(包括抑酸剂、非甾体消炎药、促动力药和黏膜保护剂等); 肝肾功能异常者; 有胃部手术史和其他恶性疾病史。

1.2 方法 24 h胃内pH值测定采用瑞典产携带式Digitrapper MKIII pH值监测仪, 监测电极先经pH1.07, 7.01缓冲液进行校正. 行食管压力测定后, pH测定电极经鼻腔插至食管下括约肌下缘5-7 cm处的胃体部, 经X线透视确定胃内pH电极位置. 按习惯进食3餐, 准确记录进食、体位变化的时间, 经计算机分析获得下列数值: 24 h的中位pH值、算术均数pH值、夜间中位pH值(21时-次日7时); 组织标本采集和监测按照最新悉

表 1 各组*H. pylori*感染情况 (n/%)

分组	n	阳性	阴性
非萎缩性胃炎组	45	21 (46.7)	24 (53.3)
轻度CAG组	33	20 (60.6)	13 (39.4)
中度CAG组	32	23 (71.2)	9 (28.8)
重度CAG组	16	9 (56.2)	7 (43.8)

尼系统标准诊断^[3], 分别在胃窦和胃体取至少2块组织. 根据病理学结果, 将患者分为4组: (1)非萎缩性胃炎组: 黏膜无萎缩及肠化, 共45例; (2)轻度CAG组: 肠化不明显, 黏膜轻度萎缩, 共33例; (3)中度CAG组: 无肠化和异型增生, 黏膜中度萎缩, 共32例; (4)重度CAG组: 黏膜重度萎缩, 有或无肠化和异型增生, 共16例. 血清标本采集在患者胃镜检查结束至少12 h后进行, 采集前晚禁食、忌烟和咖啡, 送检验科行ELISA法监测血清胃泌素; 所有患者于胃内pH值监测前进行¹⁴C-尿素呼吸试验, 并且经胃镜检查时取胃窦处活检黏膜1块进行快速尿素酶监测, 二者均阳性为*H. pylori*感染阳性患者。

统计学处理 所有计数资料用均数±标准差(mean±SD)表示, 差异显著性检验采用SPSS 10.0软件分析。

2 结果

126例患者中*H. pylori*感染者73例, 感染阳性率60.3%, 中度CAG组的感染率略高于其他各组, 统计学无显著性差异(表1); 受检者24 h胃内pH值多呈右侧单峰曲线, 空腹状态下pH<2, 进食或餐后升高, 各组受检者各项pH值指标见表2, 重度CAG组患者的24 h中位pH值、平均pH值以及夜间中位pH值等各项指标均要高于其他各组, 具有显著性统计学差异($P<0.05$), 胃泌素的含量在各组之间以非萎缩胃炎组为最高($P<0.05$), 随着萎缩程度的加重, 其含量存在下降趋势, 无显著性统计学差异。

3 讨论

传统观念认为, 萎缩性胃炎时胃内一般低酸或无酸, 病变局限在胃窦时通常胃酸偏低, 低酸是由于泌酸细胞数量减少和氢离子向胃壁反弥散所致; 自身免疫性萎缩性胃炎时胃酸明显降低, 甚至无胃酸分泌, 胃液分泌量也减少. 目前诊断萎缩性胃炎主要依赖胃镜检查, 条件好的医院可以结合病理诊断, 这样一来诊断准确率明显提高. 但是临床经常发现经内镜及病理诊断的CAG患者存在胃内灼热感、烧心和泛酸等症状

表 2 各组24 h胃内PH值及胃泌素情况

分组	n	24 h中位pH值	24 h平均pH值	夜间中位pH值	胃泌素 (μg/L)
非萎缩性胃炎组	45	1.52 ± 0.38	1.63 ± 0.56	1.22 ± 0.36	74.24 ± 19.52 ^c
轻度CAG组	33	1.75 ± 0.53	1.82 ± 0.71	1.93 ± 0.45	59.21 ± 17.36
中度CAG组	32	1.82 ± 0.67	2.02 ± 0.58	1.82 ± 0.64	54.67 ± 15.84
重度CAG组	16	3.65 ± 1.32 ^a	3.84 ± 1.78 ^a	3.22 ± 1.07 ^a	50.78 ± 13.13

^a $P < 0.05$ vs 非萎缩性胃炎, 轻度CAG, 中度CAG组; ^c $P < 0.05$ vs 轻度, 中度, 重度CAG组。

(设立分组之前已将胃镜发现反流性食管炎的患者排除), 经抑酸治疗可以取得良好疗效。这是否意味着临床诊断的准确性降低或者CAG并非真正意义上的萎缩, 我们对此类患者进行胃内pH值和胃泌素监测, 探讨这一临床现象的机制。24 h胃内pH值测定是应用微电极进行监测, 电极电位决定于溶液中氢离子的活性, 故24 h胃内pH值实际反映了胃内氢离子的活性, 即反映了胃泌酸细胞的分泌功能。我们应用24 h pH值测定方法动态观察慢性胃炎胃内pH值, 发现非萎缩胃炎患者胃内pH值较低, 黏膜炎症可能与胃内高酸有关, 只有黏膜萎缩达到一定程度, 胃内pH值才会明显上升, 重度CAG组的胃内24 h的中位pH值、算术均数pH值、夜间中位pH值等指标, 与其他组相比具有显著性差异($P < 0.05$), 说明胃泌酸细胞存在萎缩, 分泌功能减退, 16例重度CAG患者中仅有1例胃内pH>6, 提示胃内基本无酸, 占6.1%。轻、中度CAG组中, 虽然病理证实存在黏膜萎缩, 但各项指标与非萎缩组无差异, 提示胃内并非低酸或无酸, 可能的解释是胃黏膜的灶性萎缩而非全胃萎缩, 即重度CAG患者胃体及胃窦可能均存在明显萎缩, 而轻中度CAG患者仅有局部萎缩-2000年全国慢性胃炎研讨会中有明确解释: 同一部位(胃窦或胃体, 胃角标本作胃窦计算)的2块或2块以上活检病理结果都有萎缩和/或肠化时可诊断为萎缩性胃炎。鉴于高胃酸的存在, 也为萎缩性胃炎采取抑酸治疗提供了依据。在病理诊断中肠化是指示萎缩存在的一个有价值的标志, 胃窦部广泛萎缩常常伴有肠化, 但是肠化和萎缩是可以独立存在的, 有些病理检查发现肠化, 所以诊断为萎缩性胃炎, 但实际腺体萎缩可能并不明显, 这也可能为萎缩性胃炎胃内高酸提供了一种解释。所以针对萎缩性胃炎进行胃内pH值监测, 可能对预测诊断分级以及优化治疗提供了理论依据。

胃泌素是由胃窦的G细胞分泌的胃肠激素, 其分泌受多种因素影响, 如迷走神经紧张、胃窦的牵拉、高蛋白饮食以及胃内低的pH值等,

在一定程度上可以反映胃黏膜萎缩的情况。观察显示, 非萎缩胃炎组在胃泌素的含量上高于其他各组具有统计学差异, 而萎缩性胃炎各组中无差异。近年来研究发现^[4], 从慢性非萎缩性胃炎→萎缩性胃炎→肠化→异型增生, 胃泌素蛋白表达呈递减趋势, 提示胃癌前状态存在低胃泌素血症, 当患者患有CAG时, 胃窦黏膜萎缩, G细胞数量减少, 胃泌素分泌下降, 其他刺激也不会使胃泌素分泌增加或稍有增加, 胃泌素的分泌可以反映胃黏膜萎缩的情况^[5-7]。本研究发现, 萎缩性胃炎组血清胃泌素含量低于慢性非萎缩性胃炎, 其机制和胃窦G细胞发生萎缩胃泌素分泌不足有关。

目前我们样本量较少, 今后将进一步从CAG患者胃酸分泌情况及其与*H. Pylori*感染及血清胃泌素变化的关系等方面全方位、多角度的进行大样本更全面系统的研究, 从而为CAG发病机制及治疗方案的研究提供靶向。

4 参考文献

- Kapadia CR. Gastric atrophy, metaplasia, and dysplasia: a clinical perspective. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36: S29-S36; discussion S61-S62
- Xia HH, Kalantar JS, Talley NJ, Wyatt JM, Adams S, Chueng K, Mitchell HM. Antral-type mucosa in the gastric incisura, body, and fundus (antralization): a link between *Helicobacter pylori* infection and intestinal metaplasia? *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 114-121
- Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 1161-1181
- 唐卓斌, 刘为纹. 胃黏膜癌变过程中胃泌素生长抑素蛋白表达及其意义. *中华消化杂志* 2001; 11: 393-394
- Broutet N, Plebani M, Sakarovitch C, Sipponen P, Megraud F. Pepsinogen A, pepsinogen C, and gastrin as markers of atrophic chronic gastritis in European dyspeptics. *Br J Cancer* 2003; 88: 1239-1247
- Mardh E, Mardh S, Mardh B, Borch K. Diagnosis of gastritis by means of a combination of serological analyses. *Clin Chim Acta* 2002; 320: 17-27
- Korstanje A, den Hartog G, Biemond I, Lamers CB. The serological gastric biopsy: a non-endoscopic diagnostic approach in management of the dyspeptic patient: significance for primary care based on a survey of the literature. *Scand J Gastroenterol Suppl* 2002: 22-26

■同行评价

本文采用的方法为目前公认的反映胃酸分泌的24 h pH监测, 内容不是很新颖, 但有一定的临床价值。

直肠癌周围黏膜下注射微粒子碳在TME术中的应用

张日平, 田素礼, 张好刚

■背景资料

自1982年heald提出TME并广为应用于临床以来, 直肠癌的术后局部复发率大大的降低, 生存质量有了很大的提高(低位保肛、自主神经保留等), 其疗效是喜人的。

张日平, 田素礼, 张好刚, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外三科, 黑龙江省哈尔滨市 150086

通讯作者: 张日平, 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普外三科, tgbyhn221@126.com

电话: 0451-86605575

收稿日期: 2006-06-19 接受日期: 2006-08-10

Clinical application of submucosal injection of particulate carbon around the rectal cancer lesions in total mesorectal excision

Ri-Ping Zhang, Su-Li Tian, Hao-Gang Zhang

Ri-Ping Zhang, Su-Li Tian, Hao-Gang Zhang, the Third Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Ri-Ping Zhang, the Third Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 246 Xuefu Road, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. tgbyhn221@126.com

Received: 2006-06-19 Accepted: 2006-08-10

Abstract

AIM: To evaluate the application value of particulate carbon in total mesorectal excision..

METHODS: Particulate carbon was submucosally injected around the rectal cancer lesions under rectoscope in 45 patients 3 d before total mesorectal excision. The expression of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) mRNA was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) to ascertain the lymph node metastasis.

RESULTS: The labelled lymph nodes were easily identified during the operation. The average numbers of eliminated lymph nodes and metastatic lymph nodes in the labelled group were larger than those in the controls (23.5 vs 16.1, $t = 7.3733$, $P < 0.05$; 9.0 vs 6.2, $t = 5.4235$, $P < 0.05$). In the labelled group, there were 680 labelled lymph nodes, of which 322 were metastatic ones. The numbers of labelled and metastatic lymph nodes were linearly correlated with each other ($r = 0.3468$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Submucosal injection of particulate carbon can help to clean metastatic lymph nodes in total mesorectal excision. The number of labelled lymph nodes is correlated with that of metastatic lymph nodes.

Key Words: Rectal cancer; Particulate carbon; Lymphatic metastasis

Zhang RP, Tian SL, Zhang HG. Clinical application of submucosal injection of particulate carbon around the rectal cancer lesions in total mesorectal excision. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(26):2652-2654

摘要

目的: 探讨微粒子碳在直肠癌全直肠系膜切除术(TME)中的应用价值。

方法: 对45例直肠癌患者术前3 d在直肠镜癌周黏膜下注射微粒子碳, 行全直肠系膜切除术。并与常规TME手术组进行比较。所有切除淋巴结行RT-PCR法检测MMP-7 mRNA的表达以确定此淋巴结有无转移。

结果: 实验组共清除淋巴结1056枚, 平均23.5枚。对照组清除淋巴结723枚, 平均16.1枚, 两组比较有统计学意义($t = 7.3733$, $P < 0.05$)。实验组清除转移淋巴结403枚, 平均9.0枚。对照组281枚, 平均6.2枚, 差别具有统计学意义($t = 5.4235$, $P < 0.05$)。实验组黑染淋巴结共680枚, 其中转移淋巴结322枚, 两者具有线性相关关系($r = 0.3468$, $P < 0.05$)。

结论: 黏膜下注射微粒子碳应用于直肠癌TME术可增加术中转移淋巴结的清除。直肠癌淋巴结墨染与转移有关。

关键词: 直肠癌; 微粒子碳; 淋巴结转移

张日平, 田素礼, 张好刚. 直肠癌周围黏膜下注射微粒子碳在TME术中的应用. *世界华人消化杂志* 2006;14(26):2652-2654
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2652.asp>

0 引言

直肠癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一, 尽管

近年来越来越多的患者在发病早期即刻进行准确的根治性手术治疗,但其预后无明显改善,仍然有30%的术后患者在5 a内死于复发,其原因多是对微小病灶的切除不彻底^[1]。外科医生在术中只能依靠经验来判断肿瘤灶,并以此指导实施手术。术后局部复发率高达20%-30%^[2],且局部复发的部位很少是吻合口内腔,而是吻合口旁周围或盆腔内复发。自从全直肠系膜切除术(total mesorectal excision, TME)或称直肠周围系膜全切除术(complete circumferential mesorectal excision, CCME)应用临床以来,直肠癌术后局部复发率可以降至10%以下^[3]。既往只能通过术后病理学方法判断其切除范围是否达到要求。术中只能凭借外科医生的个人经验来选择切除范围。因此我们需要一个更好的手段,在术中指导外科医生的术中操作。1983年获原 *et al*^[4]研制出微粒子活性碳,将其在肿瘤局部注射后,碳粒子可沿淋巴管走行,使所属淋巴结黑染,具有高度的淋巴趋向性。我们使用微粒子碳局部注射对直肠癌引流区域淋巴结进行染色,术中指导切除标本的边界及淋巴结清除,结果显示,此方法具有较高的临床使用价值。

1 材料和方法

1.1 材料 我科2003-04-01/2005-04-01收治的90例直肠癌病例,随机数字表法分为两组。实验组45例,男26例,女19例,年龄37-72(中位49)岁。对照组45例,男30例,女15例,年龄38-69(中位47)岁。所有患者均按照TME原则行直肠癌根治术。50 g/L三菱CH40(微颗粒直径157 nm)与稳定剂聚乙烯吡咯酮25 g/L混合的悬浮液由中国医科大学赠送。临用前将盛有2 mg丝裂霉素小瓶中注入2 mL生盐水将其溶解,再将50 g/L CH40悬浮液2 mL注入MMC溶液中与其混入制成4 mL MMC-CH40悬浮液。

1.2 方法 术前3 d直肠镜直视下于瘤体周缘直肠黏膜下注入MMC-CH40, 0.5-1.0 mL/点, 3-4点/例。两组均按照Heald *et al*^[5]介绍的方法进行,直视下在骶前间隙、盆筋膜脏层与壁层间锐性分离,保持包裹直肠后脂肪及淋巴血管的盆筋膜脏层完整无损,肿瘤远端直肠系膜切除 ≥ 5 cm,肠段切除 > 2 cm,实验组要切除全部黑染组织。术后将标本平铺,将所有淋巴结取出,按黑染和未黑染进行分类。分类后行 RT-PCR法检测MMP-7 mRNA的表达。

统计学处理 对实验结果及临床资料采用

表 1 实验组与对照组淋巴结清除情况

组别	n	淋巴结清除总数	平均值	淋巴结转移例数	转移淋巴结清除数	平均值
实验组	45	1056	24.6 ^a	45	403	9.0 ^c
对照组	45	723	15.1	45	281	6.2

^a $t = 7.3733$, ^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^c $t = 5.4235$, ^c $P < 0.05$ vs 对照组。

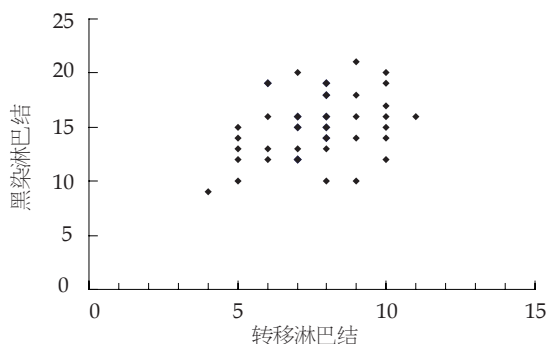


图 1 45例患者黑染淋巴结与微转移淋巴结的关系。

SPSS 10.0 统计软件包进行 t 检验, χ^2 检验以及直线相关分析。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 术中情况 术中可见被微粒碳黑染的淋巴结,尤以肠系膜,直肠上动脉及肠系膜下动脉周围及根部淋巴结更易被辨认。

2.2 淋巴结清除结果 实验组共清除淋巴结1056枚,平均24.6枚/例;对照组共清除淋巴结723枚,平均15.1枚/例,实验组明显高于对照组($P < 0.05$)。注墨组共清除转移淋巴结403枚,平均7.8枚/例,对照组共清除转移淋巴结281枚,平均6.2枚/例($P < 0.05$, 表1)。

2.3 微转移淋巴结与黑染淋巴结关系 实验组黑染淋巴结共680枚,其中转移淋巴结322枚,两者具有直线相关关系($r = 0.3468$, $P < 0.05$)。黑染淋巴结中转移淋巴结为47%,非黑染淋巴结中转移淋巴结为22%。两者差别有统计意义($\chi^2 = 68.348$, $P < 0.05$)。所有注射微粒子碳的患者均未出现任何异常反应(图1)。

3 讨论

直肠癌手术后约5%-25%的患者出现局部复发,并直接影响患者的预后,而淋巴结清除不彻底是其主要原因之一,目前尚缺乏快速、准确、有效的术中鉴定淋巴结转移的方法。因此,在

■ 相关报道

国外的Enker *et al*, 国内的顾晋 *et al* 学者,分别从各个方面进行了研究,包括临床、病理等几个方面,为TME提供了许多依据。

■同行评价

本研究探讨了微粒子碳在直肠癌全直肠系膜切除术中的应用价值,思路较新,实验设计合理,有科学性。论文书写流畅,数据可信,可供临床参考。

进行常规淋巴结清除时,多数外科医师仅凭经验,因而存在一定的盲目性,尤其是与血管、神经附着紧密的淋巴结更易被遗漏。近年来,一些学者开始采用TME及侧方淋巴结清除等手术,其目的是为了更彻底清除转移淋巴结,减少肿瘤残留,但其并发症的发生率却不容乐观,如吻合口瘘以及腹腔神经丛损伤导致的胃肠功能紊乱、排尿及性功能障碍等。国内外许多学者在直肠癌术中指导方面进行了大量的研究^[6-8]。如放射免疫介导手术就是其中的一种。虽然其具有特异性高的优点,但是因有潜在放射性污染的危险而使其应用受到限制。MMC-CH40这种吸附抗癌药的微粒子碳对淋巴系统具有极高的趋向性,发现黑染淋巴结是清除术的良好标记,碳粒在局部可滞留1 wk以上。我科自2003年起将其在直肠癌病例中进行临床应用,术前于肿瘤周围局部多点注射,实验组显示,术中淋巴结染色良好,与周围组织界限清楚,尤其可清晰辨认直肠上动脉至肠系膜下动脉根部区域内被黑染的淋巴结,使手术医师在清除第II、III站淋巴结时更具有针对性,因而可避免对周围血管、神经等的损伤。实验组淋巴结清除数明显高于对照组。尤其是在手术中不容易清除的淋巴结,注墨对直肠癌淋巴结清除的指导作用,我们将取出的淋巴结进行RT-PCR法MMP-7 mRNA检测,以确定其是否为转移淋巴结。直肠癌中MMP-7只在癌细胞和个别异型性上皮细胞中表达,在淋巴结中检测到MMP-7 mRNA是诊断淋巴结转移的依据^[9-11]。我们发现,注墨组转移淋巴结的切除数量高于对照组。常规手术组有可能有转移淋巴结的残留,为术后局部复发残留隐患。因此,在直肠癌TME手术中应用MMC-CH40有助于转移淋巴结的清除,减少局部复发率。

黑染淋巴结的转移率(47%)高于非黑染淋巴结(22%),具有统计意义。但是此点并不能说明MMC-CH40染色与转移淋巴结有关。因此,我们对黑染淋巴结和转移淋巴结的关系进行了线性相关分析。通过分析45例患者黑染淋巴结和转移淋巴结的关系,我们发现两者具有相关性。说明淋巴结黑染与淋巴结转移有关。这有可

能是因为在癌周黏膜下注射微粒子碳,距离癌组织近的淋巴结染色的机率大,而癌细胞的淋巴转移也是由近向远。

4 参考文献

- 1 Minton JP, Hoehn JL, Gerber DM, Horsley JS, Connolly DP, Salwan F, Fletcher WS, Cruz AB Jr, Gatchell FG, Oviedo M. Results of a 400-patient carcinoembryonic antigen second-look colorectal cancer study. *Cancer* 1985; 55: 1284-1290
- 2 Dixon AR, Maxwell WA, Holmes JT. Carcinoma of the rectum: a 10-year experience. *Br J Surg* 1991; 78: 308-311
- 3 Havenga K, Enker WE, Norstein J, Moriya Y, Heald RJ, van Houwelingen HC, van de Velde CJ. Improved survival and local control after total mesorectal excision or D3 lymphadenectomy in the treatment of primary rectal cancer: an international analysis of 1411 patients. *Eur J Surg Oncol* 1999; 25: 368-374
- 4 Sawai K, Takahashi T, Suzuki H. New trends in surgery for gastric cancer in Japan. *J Surg Oncol* 1994; 56: 221-226
- 5 Heald RJ. Total mesorectal excision (TME). *Acta Chir Lugosl* 2000; 47: 17-18
- 6 Roselli M, Buonomo O, Piazza A, Guadagni F, Vecchione A, Brunetti E, Cipriani C, Amadei G, Nieroda C, Greiner JW, Casciani CU. Novel clinical approaches in monoclonal antibody-based management in colorectal cancer patients: radioimmunoguided surgery and antigen augmentation. *Semin Surg Oncol* 1998; 15: 254-262
- 7 Hladik P, Vizda J, Bedrna J, Simkovic D, Strnad L, Smejkal K, Voboril Z. Immunoscintigraphy and intra-operative radioimmunodetection in the treatment of colorectal carcinoma. *Colorectal Dis* 2001; 3: 380-386
- 8 Gu J, Zhao J, Li Z, Yang Z, Zhang J, Gao Z, Wang Y, Xu G. Clinical application of radioimmunoguided surgery in colorectal cancer using 125I-labeled carcinoembryonic antigen-specific monoclonal antibody submucosally. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 1659-1666
- 9 万远廉, 潘义生, 刘玉村, 郭源, 魏群. RT-PCR方法诊断大肠癌淋巴结微转移. *中国实用外科杂志* 2000; 20: 47-48
- 10 Roeb E, Arndt M, Jansen B, Schumpelick V, Matern S. Simultaneous determination of matrix metalloproteinase (MMP)-7, MMP-1, -3, and -13 gene expression by multiplex PCR in colorectal carcinomas. *Int J Colorectal Dis* 2004; 19: 518-524
- 10 McDonnell S, Navre M, Coffey RJ Jr, Matrisian LM. Expression and localization of the matrix metalloproteinase pump-1 (MMP-7) in human gastric and colon carcinomas. *Mol Carcinog* 1991; 4: 527-533

电编 李琪 编辑 王晓瑜

世界华人消化杂志投稿须知

1 投稿总则

1.1 性质 世界华人消化杂志®, 国际标准刊号 ISSN 1009-3079, 国内统一刊号 CN 14-1260/R, 大16开, 旬刊, 每期160页, 定价24元, 全年864元, 邮发代号82-262, 由世界胃肠病学杂志社出版。世界华人消化杂志主要报道消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化病理、消化预防医学、消化护理、消化医学、影像消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化诊断指南、消化治疗指南、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊。世界华人消化杂志被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录。2005年版中国科技期刊引证报告:《世界华人消化杂志》的总被引频次为3 353, 位居1 608种中国科技论文统计源期刊的第8位, 内科医学类, 28种期刊的第2位。《世界华人消化杂志》的影响因子为1.769, 位居1 608种中国科技论文统计源期刊的第14位, 内科医学类, 28种期刊的第2位。《世界华人消化杂志》的即年指标0.211, 他引总引比0.30, 地区分布数28, 基金论文比0.43, 国际论文比0.01。世界华人消化杂志荣获2001、2003年度百种中国杰出学术期刊称号。

1.2 栏目 述评, 食管癌, 胃癌, 肝癌, 病毒性肝炎, 大肠癌, 幽门螺杆菌, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要。文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确。专家述评4 000字以内, 研究原著6 000字以内, 焦点论坛4 000字以内, 文献综

述6 000字以内, 研究快报4 000以内字, 临床经验1 800字以内, 病例报告800字以内。

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals). 见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47.

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用, 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD₅₀, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等。为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上。中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤)。通常应小写。

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标。

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊, 中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(国家科技部, 2003年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2004年版)收录的学术期刊。世界胃肠病学杂志社, 100023, 北京市2345信箱郎辛庄北路58号院怡寿园1066号, 电话: 010-85381901 Email: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com.

静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H. pylori*不能写成HP, $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或T_{1/2}, Vmax不能Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*n*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylacetanilide(*N*-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; *Ibid*, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), *S*(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, °C), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), *ρ*(密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), *φ*(体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), *T*_{max}, *C*_{max}, *V*_d, *T*_{1/2} *CI*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kDa改为*M_r* 30 000或30kDa(*M*大写斜体, *r*小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即*A_r*(*A*大写斜体, *r*小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-、±及-后列出. 如37.6±1.2°C, 45.6±24岁, 56.4±0.5 d. 3.56±0.27 pg/ml应为3.56±0.27 ng/L, 131.6±0.4 mmol/L, *t* =28.4±0.2°C. BP用kPa(mmHg), RBC数用×10¹²/L, WBC数用×10⁹/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. *M_r*明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1

N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm×6 cm×4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B₁₂用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 七年, 7 a; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU=16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把1×10⁻³ g与5×10⁻⁷ g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10年, 10 a; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1:1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm=45×10⁻⁶; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

2.5 统计学符号 (1)*t*检验用小写*t*; (2)*F*检验用英文大写*F*; (3)卡方检验用希文小写χ²; (4)样本的相关系数用英文小写*r*; (5)自由度用希文小写*ν*; (6)样本数用英文小写*n*; (7)概率用英文斜体大写*P*. 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 统计学显著性用^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01(*P*>0.05不注). 如同一表中另有一套*P*值, 则^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01; 第三套为^e*P*<0.05, ^f*P*<0.01等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍

体、四联球菌、五四运动、星期六等。统计学数字采用阿拉伯数字,如1 000-1 500 kg, 3.5 ± 0.5 mmol/L等。测量的数据不能超过其测量仪器的精密度,例如6 347意指6 000分之一的精密度。任何一个数字,只允许最后一位有误差,前面的位数不应有误差。在一组数字中的mean \pm SD应考虑到个体的变差,一般以SD的1/3来定位数,例如 $3\ 614.5 \pm 420.8$ g, SD的1/3达一百多g,平均数波动在百位数,故应写成 3.6 ± 0.4 kg,过多的位数并无意义。又如 8.4 ± 0.27 cm,其SD/3=0.09 cm,达小数点后第2位,故平均数也应补到小数点后第2位。有效位数以后的数字是无效的,应该舍。末尾数字,小于5则舍,大于5则进,如恰等于5,则前一位数逢奇则进,逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍。末尾时只可1次完成,不得多次完成。例如23.48,若不要小数点,则应成23,而不应该 $23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24$ 。年月日采用全数字表达法,请按国家标准GB/T 7408-94书写。如1985年4月12日,可写作1985-04-12;1985年4月,写作1985-04;从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止,写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00;从1985年4月12日起至1985年6月15日止,写作1985-04-12/06-16,上午8时写作08:00,下午4时半写作16:30。百分数的有效位数根据分母来定:分母 ≤ 100 ,百分数到个位; $101 \leq$ 分母 $\leq 1\ 000$,百分数到小数点后1位;余类推。小数点前后的阿拉伯数字,每3位间空1/4阿拉伯数字距离,如1 486 800.475 65。完整的阿位伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求,本刊论文中的句号都采用黑圆点;数字间的起止号采用“-”字线,并列的汉语词间用顿号分开,而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开,参考文献中作者间一律用逗号分开;表示终了的标点符号,如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半,通常不用于一行之首;而表示开头的标点符号,如括号及书名号的前一半,不宜用于一行之末。标点符号通常占一格,如顿号、逗号、分号、句号等;破折号应占两格;英文连字符只占一个英文字符的宽度,不宜过长,如5-FU。外文字符下划一横线表示用斜体,两横线表示用小写,三横线表示用大写,波纹线表示用黑体。

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容,鲜明而有特色,阿拉伯数字不宜开头,不用副题名,一般20个字左右,最好不超过26个字。避免用“的研究”或“的观察”等非特定词。

3.2 作者 论文署名作者不宜过多,一般不超过8人,主要应限于参加研究工作并能解答文章有关问题、能对文稿内容负责者,对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中。作者署名的次序按贡献大小排列,多作者时姓名间用逗号,如是单名,则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格)。世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献。第一方面是直接参与,包括:(1)酝酿和设计实验;(2)采集数据;(3)分析/解释数据。第二方面是文章撰写,包括:(1)起草文章;(2)对文章的知识性内容作批评性审阅。第三方面是工作支持,包括:(1)统计分析;(2)获取研究经费;(3)行政、技术或材料支持;(4)指导;(5)支持性贡献。每个人必须在第一至第三方面至少具备一条,才能成为文章的署名作者。世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者。

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码。格式如:张旭晨,梅立新,承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如:张旭晨,男,1966-02-26生,河北省定县人,汉族。1994年北京中医药大学硕士,讲师。主要从事消化系统疾病的病理研究。

3.5 基金资助项目 格式如:国家自然科学基金资助项目, No.30224801

3.6 通讯作者 格式如:通讯作者:马连生, 030001, 山西省太原市双塔西街77号, 太原消化病研治中心。wcjd@wjgnet.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 接受日期:

3.7 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅,方便检索,英文题名以不超过10个实词为宜,应与中文题名一致。

作者 署名一般不超过8人。作者姓名汉语拼音拼写法规定为:先名,后姓;首字母大写,双名之间用半字线“-”分开,多作者时姓名间加逗号。格式如:“潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”。

单位 先写作者,后写单位的全称及省市邮政编码。例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China
基金资助项目 格式如: Supported by National

World Journal of Gastroenterology
自2005-01-01起为周刊发行,每月7、14、21、28日出版。北京报刊发行局发行,邮发代号: 82-261。WJG出版的模式为开放存取+印刷版。免费通过<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>获取,即:阅读、下载、复制、打印和检索论文的全文。

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起为旬刊发行,每月8、18、28日出版。北京报刊发行局发行,邮发代号:82-262。《世界华人消化杂志》出版的模式为开放存取+印刷版。免费通过<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>获取,即:阅读、下载、复制、打印和检索论文的全文。

Natural Science Foundation of China, No.30224801
通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wjcd@wjgnet.com

收稿及接受日期 格式如: Received: Accepted:
摘要 包括目的、方法、结果、结论,书写要求与中文摘要一致。格式如下:

Abstract

AIM:

METHODS:

RESULTS:

CONCLUSION:

Zhang XC, Gao RF, Li BQ, Ma LS, Mei LX, Wu YZ, Liu FQ, Liao ZL. Effects of Weixibao nizhuanwan on gastric precancerous lesions 300 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006; 14:

3.8 中文摘要 必须在300字左右,内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的),方法(必须包括材料或对象。应描述课题的基本设计,双盲、单盲还是开放性,使用什么方法,如何进行分组和对照,数据的精确程度。研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则,对照组匹配的特征。如研究对象是患者,应阐明其临床表现,诊断标准。如何筛选分组,有多少例进行过随访,有多少例因出现不良反应而中途停止研究),结果(应列出主要结果,包括主要数据,有什么新发现,说明其价值和局限,叙述要真实、准确、具体,所列数据经用何种统计学方法处理;应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值;概率写 P ,后应写出相应显著性检验值),结论(全文总结,准确无误的观点及价值),中文摘要格式如下:

摘要

目的:

方法:

结果:

结论:

张旭晨,高瑞丰,李炳庆,马连生,梅立新,吴玉珍,刘凤芹,廖振林.胃细胞逆转丸治疗胃癌前期病变300例. *世界华人消化杂志* 2006;14:

3.9 正文标题层次为 0引言;1 材料和方法,1.1 材料,1.2 方法;2 结果;3 讨论;4 参考文献。序号一律左顶格写,后空1格写标题;2级标题后空1格接正文。正文内序号连排用(1), (2), (3)。

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相

关研究的关系。

1 材料和方法 应尽量简短,但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述,以前发表过的方法引用参考文献即可,有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示,在结果中应避免讨论。

3 讨论 要简明,应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述,也不应是大量文献的回顾。

图表 图表的数量要精选。表应有表序和表题,并有足够具有自明性的信息,使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头,表内非公知通用缩写应在表注中说明,表格一律使用三线表(不用竖线),在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注,以使其容易被读者理解,所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图,统一用一个注解分别叙述。如:图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: $^aP<0.05$, $^bP<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值,则 $^cP<0.05$, $^dP<0.01$; 第3套为 $^eP<0.05$, $^fP<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字,如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等,注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字,共同的计量单位符号应注在表的右上方,表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测,“-”代表阴性未发现,不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片,并考入磁盘内;彩色图请提供冲洗的彩色照片,请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$,必须使用双面胶条黏贴在正文内,不能使用浆糊黏贴。

致谢 致谢后加冒号,排在讨论后及参考文献前,左齐。

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名,则需在“Pang *et al*”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码号。如马连生^[1]报告……,潘伯荣 *et al*^[2-5]认为……;

PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年核心期刊为准,引用被PubMed收录的期刊文献用英文表达,请附引用文献网上摘要打印件,包括PMID编号(摘要的左下方)。按顺序编号装订,并考入磁盘内。在引用参考文献页码末尾注明PMID编号;无PMID编号的期刊请删除(重要文献必须保留者,请附首页复印件)。期刊: 序号, 作者(列出全体作者), 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。参考文献格式如下:

- 1 Ma LS, Pan BR. Strengthen international academic exchange and promote development of gas-troenterology. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 1 [PMID: 11819215]
- 2 马连生, 潘伯荣, 马景云. 世界胃肠病学杂志英文版的现状. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 855-863
- 3 Lam SK. Academic investigator's perspectives of medical treatment for peptic ulcer. In: Swabb EA, Azabo S, eds. *Ulcer disease: investigation and basis for therapy*. New York: Marcel Dekker, 1991: 431-450
- 4 尚克中, 陈九如. 胃肠道造影原理与诊断. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1995: 382-385

4 投稿须知

4.1 投稿信件 来稿包括所有作者签名的作者投稿函。内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)可建议熟悉该专业的审稿人或因利益冲突而不适宜审阅该稿的审稿人姓名; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部, 所有来稿均需接受同行审阅。

4.2 审稿过程 所有来稿均经2位同行专家的严格评审, 所有审稿人的姓名对作者通常是保密的。

投稿时, 作者可以提出要求回避的同行专家名单, 也可以推荐2位非本单位的审稿人, 尤其是本刊编委会成员。审稿过程大约需要1 mo。

4.3 录用 来稿经本刊编辑部初审、2位同行专家评审, 将评审后的稿件分为优先发表、可以发表、修改后发表、修改后再审、退稿等项处理。录用稿件作者需交纳发表费, 发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬)。

4.4 修改时间 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删节时, 本刊编辑部将把原稿寄回给作者自行修改。当原稿退还作者修改时, 作者必须于1 mo内将修改后的稿件及软盘寄回编辑部; 逾期寄回的, 作重新投稿处理。

4.5 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》、《中文生物医学期刊/会议文献数据库》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录。

4.6 投稿清单 (1)投稿函; (2)第1部分为题名及作者, 作者及单位, 第1作者简介, 基金资助项目, 通讯作者Email, 电话, 传真, 收稿日期, 接受日期; (3)第2部分英文摘要; (4)第3部分中文摘要; (5)第4部分为0引言, 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法, 统计学处理, 2 结果, 3 讨论, 致谢, 4 参考文献。

4.7 投稿地址 在线投稿: <http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>。邮局寄送(已在线提交的稿件不必再寄): 请将打印的稿件一式2份(附高质量的图)、存有全文(文字、图表)的磁盘和其他信息(全部文件的清单, 各文件的名称、格式和使用平台等)寄往: 100023, 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社。

世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市2345信箱
郎辛庄北路58号院怡寿园1066号
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

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!

白爱平 主治医师
中山大学附一医院消化内科

陈海龙 教授
大连医科大学附属第一医院普外科

陈贻胜 教授
福建省立医院消化内科

党双锁 副教授
西安交通大学医学院第二附属医院

戈之铮 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院消化内科

郭晓钟 教授
沈阳军区总医院消化内科

何超 教授
邵逸夫医院肛肠外科

何裕隆 教授
中山大学附属第一医院胃肠胰腺外科

蓝宇 教授
北京积水潭医院内科

李靖 副教授
第三军医大学新桥医院肝胆外科

李增山 副教授
第四军医大学病理教研室

刘彬彬 副研究员
复旦大学附属中山医院、肝癌研究所

刘铁夫 教授
哈尔滨医科大学附属第四医院消化科

牛建昭 教授
北京中医药大学

潘秀珍 教授
福建省立医院消化研究室

卿三华 教授
南方医科大学南方医院普通外科

石统东 副教授
重庆医科大学附属第二医院感染病科

汤展宏 副教授
广西医科大学第一附属医院外科ICU

唐文富 主治医师
四川省成都市四川大学华西医院中西医结合科

王健生 副教授
西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

王小众 教授
福建医科大学附属协和医院消化内科

王新月 教授
北京中医药大学东直门医院消化科

王正康 教授
北京中日友好医院普通外科

王志刚 副主任医师
上海交通大学附属上海市第六人民医院普通外科

杨希山 教授
广东省中医药局

阴赅宏 副研究员
首都医科大学附属北京友谊医院感染暨急救医学科

郑民华 教授
上海瑞金医院普外科

朱传武 副主任医师
苏州市第五人民医院传染科

朱人敏 教授
南京中山东路305号南京总医院消化内科