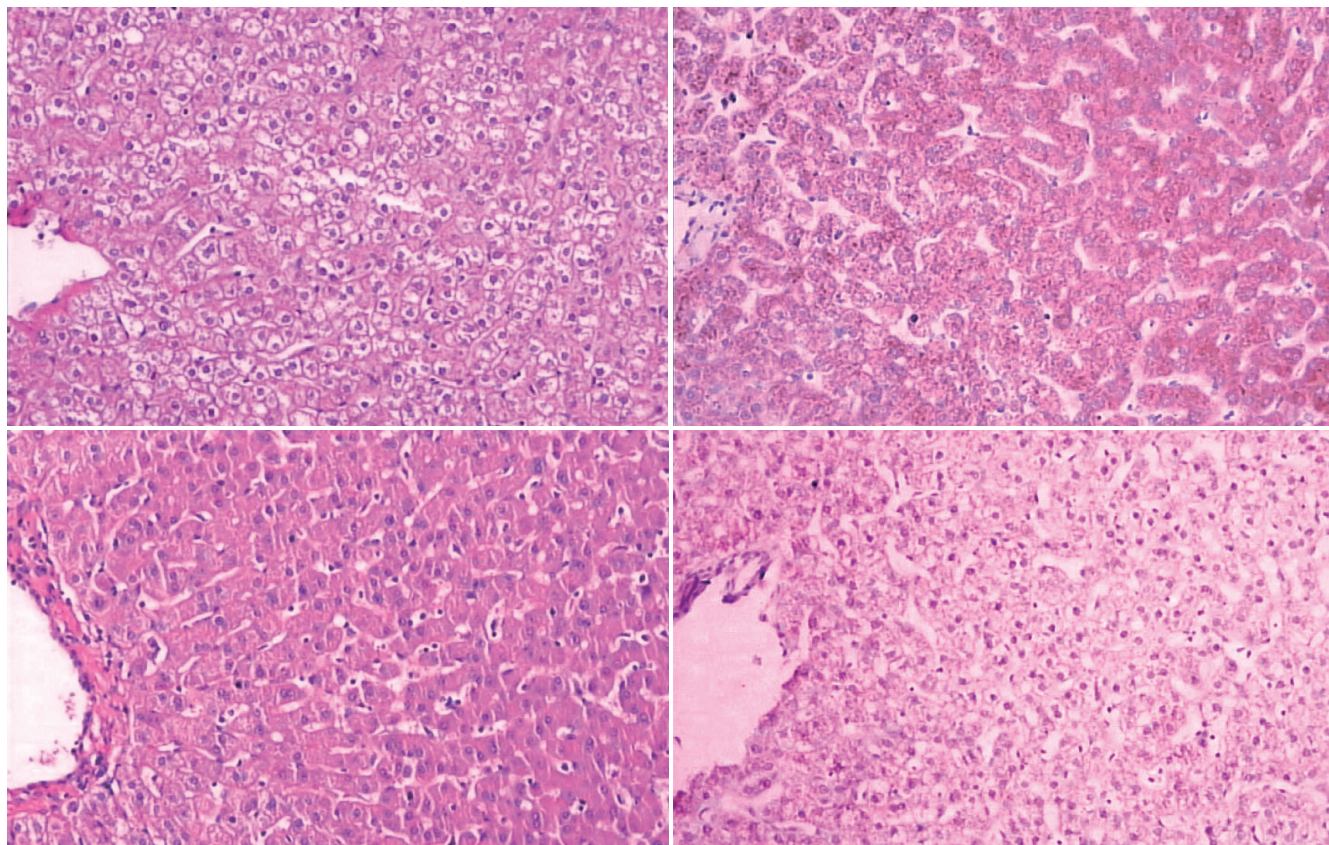


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2006 年 10 月 8 日 第 14 卷 第 28 期 (Volume 14 Number 28)



28 / 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	唐霓副研究员	重庆	杨冬华教授	广州
陆云飞教授	南宁	唐文富主治医师	成都	杨广顺教授	上海
禄韶英主治医师	西安	唐文皓副主任医师	上海	杨建勇教授	广州
吕明德教授	广州	唐旭东主任医师	北京	杨林副研究员	广州
吕宁主任医师	北京	汤展宏副教授	南宁	杨维良教授	哈尔滨
吕云福教授	海口	唐志鹏副研究员	上海	杨希山教授	广州
马大烈教授	上海	田素礼教授	哈尔滨	杨永生教授	北京
茅爱武主任医师	上海	屠红副研究员	上海	姚登福教授	南通
梅林教授	北京	万军教授	北京	姚树坤教授	石家庄
孟庆华教授	北京	汪波副主任医师	北京	伊力亚尔·夏合丁教授	乌鲁木齐
宁琴教授	武汉	汪思应教授	合肥	阴赅宏研究员	北京
牛建昭教授	北京	王承党副教授	福州	于红刚副教授	武汉
欧希龙副教授	南京	王春友教授	武汉	余宏宇教授	上海
潘林娜教授	哈尔滨	王广义教授	长春	于健春教授	北京
潘兴华副主任医师	昆明	王吉耀教授	上海	于颖彦教授	上海
潘秀珍教授	福州	王健生副教授	西安	郁宝铭教授	上海
彭波副教授	西安	王鲁副教授	上海	喻荣彬副教授	南京
彭吉润主任医师	北京	王效民教授	厦门	展玉涛副主任医师	北京
彭曦副研究员	重庆	王晓艳副教授	长沙	张柏和教授	上海
彭心宇教授	石河子	王新月教授	北京	张方信主任医师	兰州
彭志海教授	上海	王学美研究员	北京	张吉翔教授	南昌
秦波教授	重庆	王正康教授	北京	张锦生教授	上海
秦成勇教授	济南	王志刚副主任医师	上海	张军教授	西安
秦环龙教授	上海	王忠裕教授	大连	张青云研究员	北京
钱建民教授	上海	卫洪波教授	广州	张群华教授	上海
秦仁义教授	武汉	魏经国教授	西安	张水军教授	郑州
卿三华教授	广州	魏来教授	北京	张绪清副教授	重庆
邱双健副教授	上海	闻勤生教授	西安	张学教授	北京
邱伟华副主任医师	上海	吴德全教授	哈尔滨	张宗明教授	北京
任超世研究员	天津	吴建国教授	武汉	赵桂珍教授	沈阳
任建安教授	南京	吴君主任医师	贵阳	赵景民教授	北京
任建林教授	厦门	吴萍主任医师	徐州	赵连三教授	成都
邵成浩讲师	上海	吴志勇教授	上海	赵平副教授	上海
邵先玉教授	泰安	席启主任医师	大同	郑民华教授	上海
邵永孚教授	北京	夏建川研究员	广州	郑鹏远教授	郑州
沈洪教授	南京	向德兵讲师	重庆	智发朝教授	广州
沈琳副教授	北京	肖恩华教授	长沙	周伯平教授	深圳
沈薇教授	重庆	谢晓华副教授	广州	周丁华主任医师	北京
施诚仁教授	上海	徐爱民副教授	上海	周国雄主任医师	南通
施瑞华教授	南京	徐迎新研究员	北京	周士胜教授	大连
石统东副教授	重庆	许春舫主任医师	苏州	周霞秋教授	上海
宋世兵主任医师	北京	徐存拴教授	新乡	周晓东研究员	广州
宋振顺教授	西安	徐大华副主任医师	北京	庄林主任医师	昆明
孙诚谊教授	贵阳	徐德忠教授	西安	朱传武副主任医师	苏州
孙殿兴主任医师	石家庄	徐列明教授	上海	朱春兰主任医师	哈尔滨
孙家邦教授	北京	徐小元教授	北京	朱立元教授	深圳
孙秀发教授	武汉	许玲副教授	上海	朱人敏教授	南京
孙学英教授	哈尔滨	许文燮教授	上海	邹小明教授	哈尔滨
邵升副教授	哈尔滨	许亚平副教授	镇江	左国营副主任药师	昆明
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 10 月 8 日 第 14 卷 第 28 期 (总第180期)

述 评

2743 腹部大器官移植及移植后淋巴细胞增生性疾病 于颖彦

基 础 研 究

2747 阿司匹林和塞来昔布对幽门螺杆菌的体外影响

马慧霞, 王蔚虹, 胡伏莲, 李江

2753 肠毒素大肠杆菌攻毒小鼠模型的建立以及疫苗候选株保护效果的评价

王志斌, 姜普林, 曾年华, 李淑琴, 王令春, 李燕, 熊仕秋, 张兆山

临 床 研 究

2759 瘦素受体与核转录因子- κ B在结直肠腺癌组织中的表达及意义

熊枝繁, 晏泽辉

2765 大肠癌免疫组化表达与临床病理的关系

顾国利, 任力, 黄蓉蓉, 魏学明, 李德昌, 戴大江, 王石林

2771 结直肠癌中PTEN的缺失表达及临床意义

李季, 田素礼, 李巍, 李福蕴

文 献 综 述

2776 肝窦内皮细胞与免疫耐受

张云霞, 刘杞

2780 裸质粒流体力学注射法—基因治疗研究的利器

刘亮明, 罗杰, 张吉翔, 郭宏兴, 邓欢

2785 取样胶囊吸取胃液的模拟实验分析与研究

黄华, 邱颖, 朱文坚, 黄平

2789 TGF- β 家族在肝纤维化中的不同作用及对策

余姣, 徐可树

研 究 快 报

2793 高+Gx对猴肝细胞c-fos表达的影响

牛忠英, 张建中, 施生根, 吴斌, 李冬, 党平, 阚广捍

2796 一氧化氮在雷贝拉唑对大鼠胃黏膜损伤保护中的作用

乐桥良, 林克荣, 张志坚

临 床 经 验

2801 自身免疫性肝炎患者自身抗体的测定及意义

谭立明, 董叶, 曹莉萍, 李华, 蔡莉莉, 王园园

2806 白介素-8、白介素-15在结肠癌患者结肠黏膜的表达及意义

高伟, 吴瑜, 司雁菱

2810 胰腺导管腺癌组织中WT1, IGF-IR表达与细胞凋亡的关系

龚勇, 赵秋, 杨芳, 王渝, 马松林

2815 树突状细胞致敏的肿瘤疫苗对胰腺癌细胞的杀伤效应

陈鑫, 杨帆, 杨兴无, 张帆

附 录	2819 世界华人消化杂志投稿须知				
致 谢	2824 致谢世界华人消化杂志编委				
消 息	2746 世界华人消化杂志关于作者署名的声明 2758 中国学术期刊综合引证报告(2006) 2764 2007中华肝胆胰脾外科(国际)学术论坛征文通知 2770 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 2775 《世界华人消化杂志》简介 2784 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 2788 国际会议 2792 第三届亚洲大洋洲光生物学大会 2800 第十九届全国中西医结合消化会议征文通知 2814 第六届西太平洋幽门螺旋杆菌会议通知 2818 专家门诊				
封面故事	牛忠英, 张建中, 施生根, 吴斌, 李冬, 党平, 阙广捍. 高+Gx对猴肝细胞c-fos表达的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(28):2793-2795 http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2793.asp				
国际会议	<table border="0"> <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				

 <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2006-10-08 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生 编辑部主任 张海宁 英文编辑 张海宁 中文编辑 潘伯荣 张海宁 张焕兰 王晓瑜 电子编辑 张敏 李琪 本期审读 张海宁</p>	<p>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</p> <p>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</p>	<p>《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。</p> <p>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。</p> <p>2006年版权归世界胃肠病学杂志社所有</p>
--	---	--

ISSN 1009-3079	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

October 2006 Contents in Brief Volume 14 Number 28

EDITORIAL	2743 Post-transplant lymphoproliferative disease after abdominal organ transplantation <i>Yu YY</i>
BASIC RESEARCH	2747 Effect of aspirin and celecoxib on <i>Helicobacter pylori</i> in vitro <i>Ma HX, Wang WH, Hu FL, Li J</i> 2753 Establishment of mice models following intranasal challenge with enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> strains and evaluation of protective effect following intranasal immunization with vaccine candidates <i>Wang ZB, Jiang PL, Zeng NH, Li SQ, Wang LC, Li Y, Xiong SQ, Zhang ZS</i>
CLINICAL RESEARCH	2759 Expression of leptin receptor and nuclear factor kappa B and their significances in colorectal adenocarcinoma <i>Xiong ZF, Yan ZH</i> 2765 Immunohistochemical expression of carcinoembryonic antigen, P53, nm23, Ki-67, multidrug resistance-associated protein and their correlations with the clinicopathology in colorectal carcinoma <i>Gu GL, Ren L, Huang RR, Wei XM, Li DC, Dai DJ, Wang SL</i> 2771 Down-regulated expression of PTEN in colorectal cancer and its clinical significance <i>Li J, Tian SL, Li W, Li FY</i>
REVIEW	2776 Role of liver sinusoidal endothelial cells in immune tolerance <i>Zhang YX, Liu Q</i> 2780 Injection of naked plasmid using hydrodynamics-based procedure: an excellent approach in gene therapy research <i>Liu LM, Luo J, Zhang JX, Guo HX, Deng H</i> 2785 Simulative experimental analysis and research on sampling capsule in collecting gastric fluid <i>Huang H, Di Y, Zhu WJ, Huang P</i> 2789 Various roles of tumor growth factor- β family in liver cirrhosis and their corresponding counter measures <i>Yu J, Xu KS</i>
RAPID COMMUNICATION	2793 Effect of hypergravity on expression of c-fos gene in hepatocytes of Rhesus macaque <i>Niu ZY, Zhang JZ, Shi SG, Wu B, Li D, Dang P, Kan GH</i> 2796 Role of nitric oxide in the protective effect of rabeprazole on gastric mucosal lesions in rats <i>Le QL, Lin KR, Zhang ZJ</i>
CLINICAL PRACTICE	2801 Detection of autoantibodies for diagnosis of autoimmune hepatitis <i>Tan LM, Dong Y, Cao LP, Li H, Cai LL, Wang YY</i> 2806 Expression and significances of interleukin-8 and interleukin-15 in colonic mucosa of colon cancer patients <i>Gao W, Wu Y, Si YL</i> 2810 Relationship between expression of Wilms' tumor gene, insulin-like growth factor I receptor and cell apoptosis in human pancreatic duct adenocarcinoma <i>Gong Y, Zhao Q, Yang F, Wang Y, Ma SL</i>

	2815 Killing effect of tumor vaccine pulsed with dendritic cells on pancreatic carcinoma cells <i>Chen X, Yang F, Yang XW, Zhang F</i>
APPENDIX	2819 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology
ACKNOWLEDGMENT	2824 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<i>Niu ZY, Zhang JZ, Shi SG, Wu B, Li D, Dang P, Kan GH.</i> Effect of hypergravity on expression of c-fos gene in hepatocytes of Rhesus macaque. <i>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</i> 2006;14(28):2793-2795 http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2793.asp
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 October 08, 2006

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

Edited by Editorial Board of

World Chinese Journal of Digestology

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Overseas Distributor

China International Book Trading Corporation

PO Box 399, Beijing 100044, China

Code No.M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381901

Fax: +86-10-85381893

Email: wjcd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

Copyright © 2006 by The WJG Press

腹部大器官移植及移植后淋巴细胞增生性疾病

于颖彦

于颖彦, 上海交通大学医学院附属瑞金医院器官移植中心
上海消化外科研究所 上海市200025

于颖彦, 医学博士, 教授, 主任医师, 博士生导师. 1992年日本
国立冈山大学医学部医学博士, 2002年美国匹兹堡大学Starzl
移植中心访问学者, 主要从事消化外科病理学与器官移植病理
学研究.

通讯作者: 于颖彦, 200025, 上海市瑞金二路197号, 瑞金医院消
化外科研究所与器官移植中心. yingyan3y@yahoo.com.cn

电话: 021-64370045-611018 传真: 021-64373909

收稿日期: 2006-05-09 接受日期: 2006-06-24

摘要

腹部大器官移植主要指肝移植、胰腺移植、小肠移植以及多器官联合移植. 目前已成为拯救上述器官功能衰竭的有效治疗手段. 为了控制受体手术后对异体移植器官产生的排斥反应, 患者需要长期服用免疫抑制剂. 长期服用免疫抑制剂可产生一系列的并发症, 移植后淋巴细胞增生性疾病便是其中一种. 现就腹部大器官移植后淋巴细胞增生性疾病的发病情况、临床病理学特点、疾病的临床分期以及治疗措施等进行系统论述.

关键词: 器官移植; 肝脏; 胰腺; 小肠; 移植后淋巴细胞增生性疾病

于颖彦. 腹部大器官移植及移植后淋巴细胞增生性疾病. 世界华人消化杂志 2006;14(28):2743-2746

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2743.asp>

0 引言

腹部大器官移植主要指肝移植、胰腺移植、小肠移植以及多器官联合移植. 肝移植是治疗终末期肝病的唯一有效手段, 人类同种异体原位肝移植自1963年起步至今历时40余载, 目前, 在欧美大型器官移植中心已作为常规手术. 胰腺移植起始于1966年, 但真正获得发展是在最近10余年, 主要用于治疗胰岛素依赖型I型糖尿病尤其是合并糖尿病性肾病, 偶而用于治疗II型糖尿病或慢性胰腺炎所致的胰腺功能衰竭. 手术以胰肾联合移植多见, 也可是肾移植后胰腺移植或胰腺单独移植. 美国目前每年进行胰腺或胰肾联合移植超过1000例, 成功的胰腺移植可使血糖水平恢复正常, 不需要注射胰岛素;

可以明显改善慢性高血糖所致的全身血管性并发症. 1960年代以来国外便开始尝试临床小肠移植, 但多以失败告终, 移植受体的主要死亡原因是重度排异反应、感染等手术并发症. 近年来随着外科手术技术提高以及高效免疫抑制剂的引入, 临床小肠移植成功率正在不断提高, 小肠移植已被确立为不可逆性肠衰竭或短肠综合征的治疗手段^[1]. 进入21世纪以来我国器官移植事业发展迅速, 各大移植中心移植病例逐年递增, 由于手术技术的日趋完善与术后综合治疗水平的提高, 器官移植受体长期生存病例逐年增加, 一些术后不太常见的并发症逐渐显现, 其中包括移植后淋巴细胞增生性疾病(post-transplant lymphoproliferative disease, PTLD). PTLD的发生与长期使用免疫抑制剂或使用免疫抑制剂过量有关, 特别是使用抗淋巴细胞治疗后. 患者常常先有EB病毒再活化或感染, 之后出现B淋巴细胞的恶性转化, 发展为恶性淋巴瘤. PTLD是导致器官移植受体晚期移植未成功的原因之一^[2]. PTLD虽然发病率不高, 但若缺乏足够的认识致使临床处理不当却危及患者生命.

1 PTLD的临床病理分类与临床分期

PTLD的发病率及发病时间依移植器官的种类不同而有差异. 成人肝移植后PTLD的发病率在1%-3%不等, 儿童肝移植后发生PTLD的危险可能高于成人, 患儿常以扁桃体肿大为首发症状^[3]. 胰腺移植后PTLD的发病率为12%^[4-5], 小肠移植后PTLD的发病率在11%-15%左右^[6]. PTLD可以发生于异体移植体内, 也可以出现在移植体外或呈全身播散性. 一般而言, 移植体内PTLD发病早于移植体外PTLD发病. PTLD的临床处理恰当与否有赖于病理诊断的精确性. 以往病理学上将PTLD分为两类, 即多形性弥漫性B细胞增生与多形性弥漫性B细胞淋巴瘤. 2001年, 美国匹兹堡大学移植中心的Nalesnik *et al*^[7]提出了PTLD的临床病理学新分类(表1).

PTLD的组织学异质性较大, 包括良性的多克隆性淋巴细胞增生和明显的单克隆增生性

■背景资料

移植后淋巴细胞增生性疾病(PTLD)是长期存活器官移植患者可以见到的一种并发症. 随着我国器官移植事业的蓬勃发展, 移植后长期生存病例逐渐增多, PTLD开始出现, 但国内少见有关该病的文献报道. 由于PTLD的发生与长期高剂量服用免疫抑制剂有关, 但器官移植患者目前尚不能停止服用免疫抑制剂, 因此, PTLD便成为移植外科与内科医师面临的一个棘手问题.

■创新盘点

本文从发病机制、临床病理学诊断与分期以及临床应对措施等多方面对PTLD进行系统评述,有助于读者对该病的全面认识。

表 1 PTLT的临床病理分类

英文名称	对应中文名称
Hyperplastic PTLD (early lesions)	增生性PTLD (早期病变)
Reactive plasmacytic hyperplasia	反应性浆细胞增生
Infectious mononucleosis	感染性单核细胞增生症
Atypical lymphoid hyperplasia with architectural retention	保留结构的不典型淋巴细胞增生
Polymorphic PTLD	多型性PTLD
Lymphomatous PTLD (monomorphic PTLD)	淋巴瘤性PTLD(单型性PTLD)
B-cell lymphoma	B细胞淋巴瘤
Diffuse large B-cell lymphoma	弥漫性大B细胞淋巴瘤
(Immunoblastic, Centroblastic, Anaplastic)	(免疫母性、中心母性、间变性)
Burkitt/Burkitt-like lymphoma	Burkitt/Burkitt样淋巴瘤
MALToma	黏膜相关淋巴瘤
T-cell lymphoma	T细胞淋巴瘤
Peripheral T-cell lymphoma, unspecified	外周T细胞淋巴瘤, 非特化的
(usually large cell)	(通常为大型细胞)
Anaplastic large cell lymphoma (T or null cell)	间变性大细胞淋巴瘤(T或裸细胞)
Hepatosplenic gamma-delta T-cell lymphoma	肝脾gamma-delta T淋巴瘤
Other (e.g. T-NK)	其他(如T-NK细胞)
Other	其他
Plasmacytoma	浆细胞瘤
Myeloma	骨髓瘤
T-cell rich/Hodgkin's disease-like large B-cell lymphoma	富于T细胞的霍奇金病样大B淋巴瘤

表 2 恶性淋巴瘤的修订Ann Arbor分期标准

分期	描述
I	单个淋巴结区受累
I E	局限于单结外器官或部位
II	横膈同侧的2个或更多淋巴结区受累
II E	局限于单结外器官或部位及所属淋巴结, 有或无横膈同侧的其他淋巴结受累
III	横膈两侧的多组淋巴结区受累
III E	横膈两侧的多组淋巴结区受累伴结外器官受累
III S	横膈两侧的多组淋巴结区受累伴脾脏受累
III E+S	横膈两侧的多组淋巴结区受累, 同时伴结外器官与脾脏受累
IV	播散性(多灶性)结外器官及其所属淋巴结受累
IV E	结外器官受累并累及远处淋巴结(非所属区域)

恶性淋巴瘤^[8]。如Ziarkiewicz-Wroblewska *et al*^[5]报道过一例肝移植后4 mo, 因全身感染、黄疸、肝大、贫血与血小板减少而死亡。受体的尸体解剖发现, 该患者除检测到EB病毒感染外, 组织学检查发现患者淋巴结内有大量浆细胞增生, 故认为EB病毒感染是导致浆细胞增多的原因。移植肝感染EB病毒后可以表现为肝炎也可直接表现为PTLD。EB病毒性肝炎通常发生于肝移植后4-6 mo, 严重的EB病毒感染或PTLD累及的肝脏有时可出现大块性肝坏死。胰腺移植后出现PTLD可表现为移植胰腺的弥漫性肿大, 与急性胰腺炎或急性排斥反应很难区分, PTLD的发生时间一般在术后4-348(平均137)d。PTLD可以累及移植的胰腺, 也可以累及胰腺外其他组织如肾脏、肝脏、骨髓、淋巴结和胆囊等。病理学可以是多克隆性B淋巴细胞增生, 也可表现为B细胞性淋巴瘤等^[4]。小肠移植或腹部多器官联合

移植后往往免疫抑制剂用量较大, 术后EB病毒感染或PTLD的发生危险性增加。其组织学变化从淋巴浆细胞样增生到明显的恶性淋巴瘤, 出现时间以术后2-4 mo较为多见。EB病毒感染后由于肠系膜淋巴结肿大及肠道淋巴组织增生可引起肠套叠^[8-10]。

PTLD的临床分期取决于发病部位与病变扩散程度。目前仍参照恶性淋巴瘤的临床分期执行(表2)^[11]。

2 PTLT的临床诊断

EB病毒是一种广泛存在的疱疹病毒, 在人群B淋巴细胞中呈潜伏感染。儿童感染后一般无症状, 或出现感染性单核细胞增生症。EB病毒感染后机体可产生EB病毒核抗体IgG, (EBNA)并持续终生。在感染潜伏期, 循环血中每10⁵个B细胞可有一个感染。在正常人群由于体内有EB病毒特

■应用要点

规范的病理诊断与临床分期是个体化治疗的基础。临床应当根据患者具体病情选择合适的临床处理措施。

表 3 PTLD的临床治疗措施

治疗手段	不适合该治疗的情况
降低免疫抑制剂	有急慢性排斥反应者
抗病毒治疗	对潜伏性EB病毒感染或感染的B淋巴细胞已有增殖者
化疗	毒副反应大或粒细胞减少者
放疗	已有广泛播散者
外科切除	已有广泛播散或其他外科并发症者
自体EB病毒特异性CTL ¹ 输注	要求快速治疗者(因制备CTL ¹ 需要时间较长)
异基因HLA配型的CTL ¹ 输注	出现移植宿主疾病者
抗-CD20单克隆抗体	CD20-阴性肿瘤患者, 颅内 PTLD患者

¹: 细胞毒性T淋巴细胞.

异性细胞毒性T淋巴细胞监测, 可以防止EB病毒感染的B细胞过度增殖^[12]. 据报道, 半数以上的PTLD患者体内可以检测到EB病毒感染^[13], 还有报道称, 几乎所有的移植早期恶性淋巴瘤均可以检测到EB病毒^[14], 但目前国际上通用的PTLD临床病理分类标准中并未将EB病毒感染作为PTLD诊断的必备指标^[7]. 因此, 只要组织形态学符合, 不论EB病毒阳性与否均可以作出PTLD的诊断. 但不可否认, 如果检测到EB病毒感染可为确立PTLD的诊断增加佐证. 目前, 国外多采用原位杂交的方法在病变组织内检测EB病毒编码的RNA(EBER). 而临床上对患者循环血进行EBV-DNA定量检测也有助于诊断^[15]. 另外, 也可以应用免疫组织化学方法检测EB病毒特异性核抗原基因编码的核抗原(有6种, 从EBNA1到EBNA6)或潜伏性膜蛋白(LMP1), 但该法不如原位杂法敏感, 在mRNA阳性病例中仅有一半病例可以检测到EB病毒抗原^[13]. 典型的EB病毒阳性表现为在CD20阳性的B淋巴细胞中有EB病毒编码RNA或核抗原表达. 此外, PTLT患者的CD4阳性T细胞与CD8阳性T细胞的比值出现倒置^[13-14].

3 PTLD的治疗

目前为止, 针对PTLD尚无标准治疗方案. 其基本治疗原则是尽早降低免疫抑制剂用量. 但对器官移植患者而言并非易事, 因为随时有发生排斥反应的危险. 一般而言, 对于多形性的淋巴、浆细胞增殖通过降低免疫抑制剂等保守治疗常常可以缓解^[15]. 对于局限性恶性淋巴瘤, 可采用手术摘除移植物的方法. 如Meador *et al*^[14]报道的胰腺移植后8例PTLD有7例做了胰腺摘除, 其中2例还同时摘除了移植的肾脏. 对于多器官受累的PTLD, 以往采用联合化疗, 使用的药物包括环磷酰胺、阿霉素、长春新碱和强地松,

但副作用较大, 死亡率较高. 抗人单纯疱疹病毒的抗病毒治疗方案如阿昔洛韦和更昔洛韦可用于EB病毒的治疗, 但疗效尚无法肯定. 最近, 一种针对CD20阳性的B淋巴细胞鼠/人嵌合型mAb-CD20(美罗华, rituximab)已用于临床, 有些移植中心已将抗CD-20作为一线药物治疗PTLD. 有报道应用美罗华mAb, 剂量为每周静脉给药375 mg/m², 连续4 wk, 同时降低免疫抑制剂用量, 可获得明显疗效. 有些患者淋巴结明显缩小, 血清EB病毒抗体滴度下降^[9-10]. 美罗华mAb对PTLD的总体疗效仍然需要不断积累病例进行评估. 但对于其他治疗失败或肿瘤细胞CD20阴性患者仍考虑联合化疗^[14](表3)^[12]. 目前, 由于PTLD发病率不高, 其病变组织形态学异质性较大, 国内外对其诊断与治疗均缺乏足够的经验, 故PTLD的诊断与治疗无论是对移植病理学工作者还是临床一线医师均是很大的挑战.

4 参考文献

- 1 于颖彦. 腹部大器官移植的免疫病理学. 中华病理学杂志 2004; 33: 82-85
- 2 Wiesner RH, Menon KV. Late hepatic allograft dysfunction. *Liver Transpl* 2001; 7: S60-S73
- 3 Nalesnik MA. Posttransplant lymphoproliferative disorder and tonsillectomy in a pediatric liver transplant population. *Liver Transpl* 2001; 7: 466-468
- 4 Meador TL, Krebs TL, Cheong JJ, Daly B, Keay S, Bartlett S. Imaging features of posttransplantation lymphoproliferative disorder in pancreas transplant recipients. *AJR Am J Roentgenol* 2000; 174: 121-124
- 5 Ziarkiewicz-Wroblewska B, Gornicka B, Oldakowska U, Suleiman W, Pratnicki A, Szymanska-Giemza O, Ziolkowski J, Senatorski G, Pacholczyk M, Lagiewska B, Rowinski W, Paczek L, Wasutynski A. Plasmacytic hyperplasia--the early form of posttransplant lymphoproliferative disorder--with atypical morphology and clinical course in patient after liver transplantation: a case report. *Transplant Proc* 2003; 35: 2320-2322
- 6 Robert CD, Lacaille F, Canioni D, Quartier-dit-Maire P, Talbotec C, Goulet O. EBV-negative lymphoproliferative disease with hyper-IgA,

■同行评价

肝移植面临的缺血再灌注损害、免疫排斥反应等问题的基因治疗是目前研究的热点问题,而以重组病毒为载体的基因治疗因其独特的优势,尤其是AAV作为目前临床可以应用的病毒载体备受瞩目。作者以AAV在肝移植应用的优势及面临问题进行综述,具有一定的意义。

- in a child with combined liver and small bowel transplantation. *Pediatr Transplant* 2004; 8: 305-307
- 7 Nalesnik MA. The diverse pathology of post-transplant lymphoproliferative disorders: the importance of a standardized approach. *Transpl Infect Dis* 2001; 3: 88-96
- 8 Ruiz P, Soares MF, Garcia M, Nicolas M, Kato T, Mittal N, Nishida S, Levi D, Selvaggi G, Madariaga J, Tzakis A. Lymphoplasmacytic hyperplasia (possibly pre-PTLD) has varied expression and appearance in intestinal transplant recipients receiving Campath immunosuppression. *Transplant Proc* 2004; 36: 386-387
- 9 Codeluppi M, Cocchi S, Guaraldi G, Di Benedetto F, Bagni A, Pecorari M, Gennari W, Pinna AD, Gerunda GE, Esposito R. Rituximab as treatment of posttransplant lymphoproliferative disorder in patients who underwent small bowel/multivisceral transplantation: report of three cases. *Transplant Proc* 2005; 37: 2634-2635
- 10 Barshes NR, Lee TC, Karpen SJ, Bristow LJ, Quiros-Tejiera RE, Goss JA. Asymptomatic small bowel intussusception associated with post-transplant lymphoproliferative disease. *Pediatr Transplant* 2004; 8: 196-197
- 11 Ansell SM, Armitage J. Non-Hodgkin lymphoma: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 2005; 80: 1087-1097
- 12 Davis JE, Moss DJ. Treatment options for post-transplant lymphoproliferative disorder and other Epstein-Barr virus-associated malignancies. *Tissue Antigens* 2004; 63: 285-92
- 13 Yamamoto T, Nakamura Y, Kishimoto K, Takeuchi H, Shirakata M, Mitsuya T, Hirai K. Epstein-Barr virus (EBV)-infected cells were frequently but dispersely detected in T-cell lymphomas of various types by in situ hybridization with an RNA probe specific to EBV-specific nuclear antigen 1. *Virus Res* 1999; 65: 43-55
- 14 Bakker NA, van Imhoff GW, Verschuuren EA, van Son WJ, Homan van der Heide JJ, Veeger NJ, Kluin PM, Kluin-Nelemans HC. Early onset post-transplant lymphoproliferative disease is associated with allograft localization. *Clin Transplant* 2005; 19: 327-334

电编 李琪 编辑 潘伯荣

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

• 消息 •

世界华人消化杂志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2006-10-08)

阿司匹林和塞来昔布对幽门螺杆菌的体外影响

马慧霞, 王蔚虹, 胡伏莲, 李江

马慧霞, 王蔚虹, 胡伏莲, 李江, 北京大学第一医院消化内科
北京西城区西什库大街8号 北京市 100034
马慧霞, 北京大学第一医院消化内科博士生, 从事非甾体消炎药
对幽门螺杆菌作用的研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30470777
通讯作者: 王蔚虹, 100034, 北京市西城区西什库大街8号, 北京
大学第一医院消化内科. wh2581@sohu.com
电话: 010-66551122-2581 传真: 010-66518105
收稿日期: 2006-07-26 接受日期: 2006-08-23

Effect of aspirin and celecoxib on *Helicobacter pylori* in vitro

Hui-Xia Ma, Wei-Hong Wang, Fu-Lian Hu, Jiang Li

Hui-Xia Ma, Wei-Hong Wang, Fu-Lian Hu, Jiang Li,
Department of Gastroenterology, the First Hospital, Peking
University, Beijing 100034, China

Supported by the National Natural Science Foundation of
China, No. 30470777

Correspondence to: Dr. Wei-Hong Wang, Department of
Gastroenterology, the First Hospital, Peking University,
Beijing 100034, China. wh2581@sohu.com

Received: 2006-07-26 Accepted: 2006-08-23

Abstract

AIM: To investigate the possible effects of aspirin and celecoxib on the growth, virulence factors and outer membrane protein of *H pylori*.

METHODS: Two standard strains of *H pylori* were treated with a series concentration of aspirin or celecoxib (a specific inhibitor of cyclooxygenase 2) and were incubated in brucella broth under microaerobic condition for 24 and 48 h. The growth and urease activity were assessed by viable colony counting and spectrophotometry. After 48-hour treatment, the supernatants were incubated with Hela cells to estimate vacuolating cytotoxin activity. The outer membrane protein of *H pylori* was analyzed by SDS-PAGE.

RESULTS: Aspirin or celecoxib inhibited the growth of *H pylori* in a dose-dependent manner with the lowest inhibitory concentrations of 0.5 or 0.01 mmol/L, and the lethal concentrations of 2.0 and 0.04 mmol/L, respectively. Aspirin and celecoxib inhibited the urease activity and vacuolating cytotoxin activity of *H pylori*. The inhibi-

tory effect of celecoxib on *H pylori* was superior to that of aspirin. Both aspirin and celecoxib had some effects on the expression of the outer membrane protein.

CONCLUSION: Aspirin or celecoxib can inhibit the growth, urease activity and vacuolating cytotoxin activity of *H pylori* in vitro significantly. Both aspirin and celecoxib may have some effects on the outer membrane protein expression of *H pylori*.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Non-steroidal anti-inflammatory drug; Aspirin; Celecoxib

Ma HX, Wang WH, Hu FL, Li J. Effect of aspirin and celecoxib on *Helicobacter pylori* in vitro. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(28):2747-2752

摘要

目的: 探讨阿斯匹林和选择性COX-2抑制剂塞来昔布对体外培养的幽门螺杆菌(*H pylori*)生长、毒力因子及外膜蛋白的影响。

方法: 不同浓度的阿司匹林及塞来昔布与*H pylori*共同培养, 以活菌计数、分光光度计法检测*H pylori*的生长状态, 分光光度计检测 A_{560nm} 值判断尿素酶活性, Hela细胞空泡变性实验和中性红吸收试验检测空泡毒素的活性, 以SDS-PAGE电泳检测*H pylori*外膜蛋白的变化。

结果: 阿司匹林及塞来昔布可以抑制*H pylori*的生长, 此过程为剂量依赖性效应。阿司匹林0.5 mmol/L及塞来昔布0.01 mmol/L时与DMSO对照相比*H pylori* 24 h和48 h的菌落计数开始降低, 随着两药剂量的加大菌落计数降低得更加明显, 阿司匹林2.0 mmol/L和塞来昔布0.04 mmol/L时*H pylori*被完全杀灭。阿司匹林及塞来昔布可剂量依赖性的抑制*H pylori*的尿素酶活性及空泡毒素的活性。在对*H pylori*外膜蛋白的研究中发现, NSAIDs可能对*H pylori*的某种外膜蛋白表达有影响。

结论: 阿司匹林和塞来昔布可抑制*H pylori*的

■背景资料

幽门螺杆菌(*H pylori*)和非甾体类消炎药(NSAIDs)被认为是导致胃黏膜损伤及溃疡形成的两个主要因素,*H pylori*感染和NSAIDs同时存在时, 胃黏膜的损伤并不是两种损害因素的简单相加。NSAIDs和*H pylori*之间可能存在某种相互作用, 从而干扰对方在胃肠道的致病性。

■ 研发前沿

*H pylori*感染在世界范围内广泛存在,而NSAIDs是世界范围内应用最广泛的药物之一,二者同时存在而致病的情形并不少见。对二者共同致病及二者间相互作用的研究引起人们的重视。近年研究发现,NSAIDs可以提高*H pylori*对一些常用抗生素的敏感性,其具体作用机制及在临床上*H pylori*根治治疗中的作用还有待进一步的研究明确。

生长、毒力因子的活性,并可能改变*H pylori*外膜蛋白的表达。

关键词: 幽门螺杆菌; 非甾体类消炎药; 阿司匹林; 塞来昔布

马慧霞, 王蔚虹, 胡伏莲, 李江. 阿司匹林和塞来昔布对幽门螺杆菌的体外影响. 世界华人消化杂志 2006;14(28):2747-2752
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2747.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)和非甾体类消炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)被认为是导致胃黏膜损伤及溃疡形成的两个主要因素,两者同时存在而致病的情形并不少见。*H pylori*和NSAIDs作为两个独立的致病因素,在多数情况下具有相同或相似的胃黏膜损害作用,而在某些情况下的作用却是相反或拮抗的。NSAIDs抑制胃黏膜环氧化物酶(COX)的表达和前列腺素(PG)合成,而*H pylori*感染则可以上调COX-2 mRNA的表达,增加PG合成^[1-3]。Huang *et al*^[4]荟萃分析研究显示,*H pylori*感染和NSAIDs均可以增加消化性溃疡和出血的发生,二者同时存在时发生消化性溃疡和溃疡出血的风险进一步增加,提示二者有协同作用。然而有临床研究观察了NSAIDs服用者6 wk内胃肠道症状的发生率,结果显示,*H pylori*阳性者与阴性者相比无显著性差异^[5]。因此,*H pylori*感染和NSAIDs同时存在时,胃黏膜的损伤并不是两种损害因素的简单相加。我们推测在NSAIDs和*H pylori*之间可能存在某种相互作用,从而干扰对方在胃肠道的致病性。有研究发现,NSAIDs甚至可以提高*H pylori*对几种常用的抗生素如甲硝唑、克拉霉素等的敏感性^[6-7]。而革兰氏阴性细菌的外膜蛋白可能与细菌抗生素的敏感性密切相关^[8-9]。因此我们推测,NSAIDs可能通过影响*H pylori*的某些外膜蛋白的表达,使得*H pylori*的细胞膜对某些抗生素的通透性增加,从而提高*H pylori*对这些抗生素的敏感性。我们探讨了临床上广泛应用的阿司匹林和倍受人们关注的选择性COX-2抑制剂塞来昔布在体外培养条件下,对*H pylori*生长、尿素酶活性及空泡毒素活性的影响,为进一步解释*H pylori*和NSAIDs共同存在时对胃黏膜的致病性提供依据。通过SDS-PAGE电泳方法研究NSAIDs对*H pylori*外膜蛋白的影响,初步探讨NSAIDs提高*H pylori*对抗生素敏感性的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 两株毒素阳性的*H pylori*标准菌株:*H pylori* NCTC11637来自英国伦敦国家标准培养物收藏中心(National Collection of Type Culture),由北京大学第一医院消化实验室保存。*H pylori* 26695由北京疾病预防控制中心流行病研究所惠赠。Hela细胞由北京大学肿瘤医院试验中心提供。阿司匹林购自美国Sigma公司,塞来昔布由北京医药研究开发中心惠赠,二者分别溶于二甲基亚砜(DMSO)中备用。

1.2 方法

1.2.1 *H pylori*液体培养体系的建立及相关指标的检测 收集新鲜培养的*H pylori* NCTC11637或26695于100 mL/L的胎牛血清/布氏肉汤培养液中,调整菌液浓度(1×10^7 - 1×10^8)CFU/mL。20 mL菌液加入灭菌10 cm的培养皿中,分别加入阿司匹林或塞来昔布药液100 μ L,药物的终浓度为:阿司匹林0.5, 1.0, 1.5及2.0 mmol/L,塞来昔布0.01, 0.02, 0.03及0.04 mmol/L,对照组加入100 μ L DMSO。培养皿置微需氧条件下,空气摇床60 r/min, 37℃培养48 h后,6000 r/min, 4℃离心。上清以超滤离心管(30 k)浓缩20倍,浓缩上清0.22 μ m滤膜过滤后备用,保留细菌沉淀。于培养0, 24, 48 h分别取菌液2 mL。1 mL菌液用于分光光度计测量 A_{600nm} 值。100 μ L菌液加入1 mL尿素酶试剂20 min后,分光光度计测 A_{560nm} 值,未加入菌液的尿素酶试剂作为空白对照。计算每数量级活菌的尿素酶活性,以评价药物对*H pylori*尿素酶的抑制作用与其对*H pylori*生长抑制作用的关系,即 A_{560nm} 值/Log₁₀(活菌计数)。剩余菌液用培养液分别10倍比稀释,稀释后的菌液各取100 μ L接种于哥伦比亚琼脂平板培养基上,于37℃,微需氧环境下培养3 d后,选择菌落数量在30-300范围内的培养皿行菌落计数。

1.2.2 空泡变性实验^[10-11] 取对数生长期的Hela细胞 4×10^5 /孔接种于96孔细胞培养板中,培养24 h。加入不同稀释倍数的*H pylori*浓缩上清,共同孵育12 h,倒置显微镜观察细胞形成空泡的情况。每孔计数100个细胞,超过50%细胞形成空泡为空泡毒素活性阳性。

1.2.3 中性红吸收实验^[12] Hela细胞与*H pylori*浓缩上清液共同孵育后,加入0.5 g/L中性红/生理盐水液,室温下放置5 min。以2 g/L牛血清白蛋白/生理盐水液轻洗3次,加入盐酸酒精液裂解细胞。酶标仪上测定 A_{540nm} 值。以未接种*H pylori*的空白培养上清作为阴性对照,每种浓缩上清作3

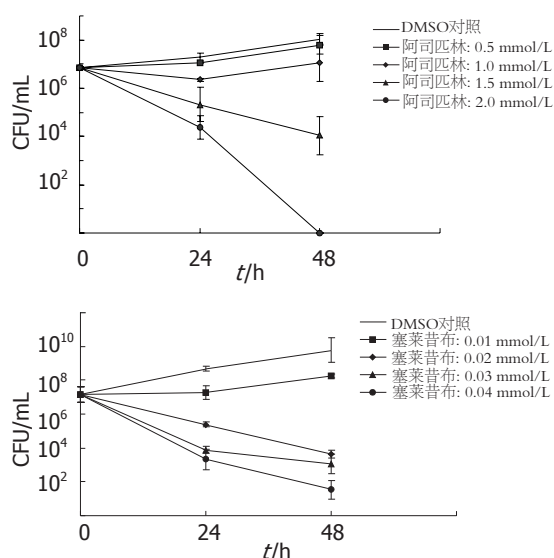


图 1 药物对 *H. pylori* 活菌菌落计数的影响 ($n = 4$).

孔, 取平均值作为最终结果.

1.2.4 外膜蛋白分析^[13] 收集培养 48 h 的 *H. pylori*, 悬于 20 mmol/L pH 7.5 的 Tris 液中, 超声破菌至镜下细颗粒状, 6000 r/min, 4℃ 离心, 保留上清. 离心 40 000 g, 4℃, 30 min, 保留沉淀. 重悬于 20 g/L 十二烷基肌氨酸钠(SLS)/20 mmol/L pH 7.5 的 Tris 液中, 室温孵育 30 min. 再以 40 000 g, 4℃, 30 min 离心, 保留沉淀即为外膜蛋白. 测定蛋白浓度. 取各组外膜蛋白 10 μg, 100 g/L 的 SDS-PAGE 凝胶电泳, 调整电压 120 伏(8 伏/cm)直至溴酚兰到达分离胶底部时停止电泳, 凝胶以考马斯亮兰染色.

统计学处理 实验结果取 mean ± SD, 并行 *t* 检验, 以 SPSS 软件进行处理.

2 结果

2.1 阿司匹林和塞莱昔布对 *H. pylori* 生长的影响 *H. pylori* 培养菌液 A_{600nm} 值和菌落计数结果显示, 阿司匹林和塞莱昔布对 *H. pylori* 生长有抑制作用, 这种作用是剂量依赖性的. 菌落计数结果(图1)显示, 阿司匹林 0.5 mmol/L 组与 DMSO 对照组相比差异无统计学意义, 阿司匹林其他剂量和塞莱昔布各剂量组与 DMSO 组相比在 24 h 和 48 h 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$).

2.2 阿司匹林和塞莱昔布对 *H. pylori* 尿素酶活性的影响 阿司匹林和塞莱昔布均能明显抑制 *H. pylori* 尿素酶活性, 且呈剂量依赖性. 24 h 和 48 h 阿司匹林和塞莱昔布各组 A_{560nm} 结果与 DMSO 对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$). 为评价药物对 *H. pylori* 尿素酶的抑制作用与其对 *H. pylori*

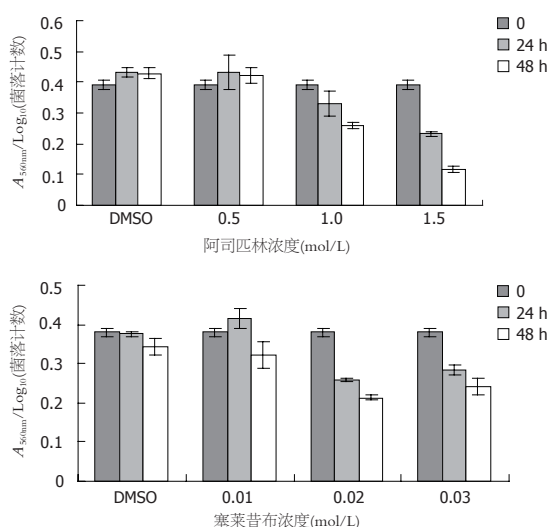


图 2 药物对每数量级活菌尿素酶的活性的影响 ($n = 4$).

生长抑制作用的关系, 计算每数量级活菌的尿素酶活性. 阿司匹林 0.5 mmol/L 与 DMSO 对照组每数量级活菌尿素酶的活性相比差异无统计学意义, 塞莱昔布 0.01 mmol/L 与 DMSO 对照组相比差异无统计学意义. 阿司匹林剂量大于 1.0 mmol/L 时和塞莱昔布剂量大于 0.02 mmol/L 时, *H. pylori* 每数量级活菌尿素酶的活性与 DMSO 对照组相比有降低, 且差异有统计学意义 (P 均 < 0.05). 且阿司匹林组随着药物剂量的增大每数量级活菌尿素酶活性的下降更为明显(图2).

2.3 阿司匹林和塞莱昔布对 *H. pylori* 毒素活性的影响 空泡变性实验结果显示, DMSO 对照组浓缩上清 1:16 倍稀释空泡毒素为阳性. 0.5 mmol/L 阿司匹林处理的 *H. pylori* 菌株浓缩上清 1:2 倍稀释时空泡毒素为阳性. 阿司匹林浓度为 1.0, 1.5, 2.0 mmol/L 时培养上清空泡毒素活性均为阴性. 塞莱昔布处理后的 *H. pylori* 浓缩上清空泡毒素活性均为阴性. 中性红吸收实验结果显示, 随着两种药物浓度的增加 A_{540nm} 值逐渐减低(图3). 以上结果均提示, 两种药物对 *H. pylori* 空泡毒素活性有抑制作用, 表现为剂量依赖性.

2.4 阿司匹林和塞莱昔布对 *H. pylori* 外膜蛋白的影响 *H. pylori* NCTC11637 外膜蛋白凝胶电泳中可见多个条带, 阿司匹林和塞莱昔布处理后的 *H. pylori* 外膜蛋白与对照组相比条带基本相同. 但在相对分子质量 80 kDa 附近有一条带, 药物处理后与对照组相比表达明显增加(图4-5, 箭头所示处), 这一变化似与药物剂量的改变关系不大.

3 讨论

H. pylori 感染和 NSAIDs 被认为是胃黏膜损伤

■ 相关报道

Wang *et al* 的研究发现阿司匹林可以剂量依赖性抑制 *H. pylori* 的生长. Wang *et al* 进一步研究发现在阿司匹林存在的条件下, 临床上最常用于 *H. pylori* 根除治疗的抗生素如甲硝唑、克拉霉素和羟氨苄青霉素对 *H. pylori* 的 MIC 值降低, 说明阿司匹林提高了细菌对这些抗生素的敏感性. Gu *et al* 的研究发现吡哆美辛及 COX 抑制剂 SC-236 不仅可以抑制 *H. pylori* 的生长, 还对 *H. pylori* 尿素酶活性有抑制作用, 吡哆美辛和选择性 COX-2 抑制剂 SC-236 也可以提高 *H. pylori* 对甲硝唑和克拉霉素的敏感性. Shirin *et al* 的研究显示布洛芬、吡哆美辛、选择性 COX-2 抑制剂 NS-398 和两种舒林酸亚砷的衍生物可以抑制 *H. pylori* 的生长.

■创新盘点

阿司匹林和塞来昔布可以抑制 *H. pylori* 生长、尿素酶活性和空泡毒素活性, 这可以部分解释 NSAIDs 和 *H. pylori* 共同存在时的致病性并不是两种因素的简单相加这一事实。本研究还发现, 阿司匹林和塞来昔布可能对 *H. pylori* 的外膜蛋白有影响, 提示 NSAIDs 可能通过对 *H. pylori* 外膜蛋白的作用来影响 *H. pylori* 对抗生素的敏感性。

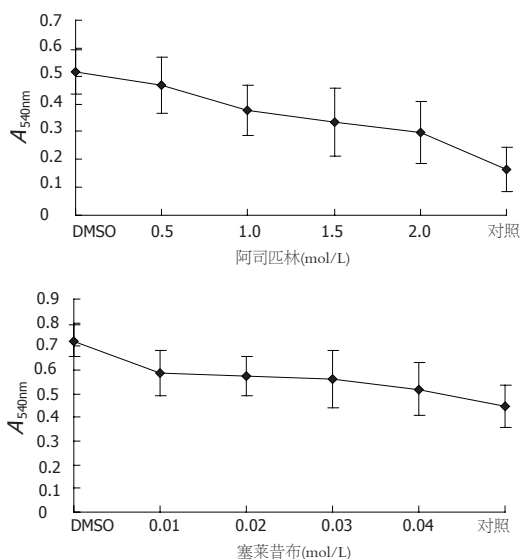


图3 药物对 *H. pylori* 空泡毒素的影响(中性红吸收试验)。

及溃疡形成的两个重要的独立危险因素, 由于 *H. pylori* 感染在世界范围内人群中的广泛存在以及 NSAIDs 越来越广泛的应用, 临床上二者合并存在的机会并不少见。由于两者致病的机制不同, 两个危险因素同时存在时, 其相互作用就比较复杂。我们的动物实验曾显示 *H. pylori* 与 NSAIDs 共同作用可以造成比 *H. pylori* 或 NSAIDs 单独作用更加严重的胃黏膜损伤^[14], 但这种损害程度并不是两个单因素的简单相加。有临床研究发现, 在 NSAIDs 服用者中, *H. pylori* 感染可以增加 NSAIDs 相关性溃疡的发生^[15], 并成倍的增加上消化道出血的危险^[16]。Huang *et al*^[4] 对有关 NSAIDs 和 *H. pylori* 对消化性溃疡危险性的研究进行了荟萃分析。单纯 *H. pylori* 感染和服用 NSAIDs 分别可以使消化性溃疡病的危险增加 18.1 倍和 19.4 倍, 二者同时存在时发生消化性溃疡病的危险增加了 61.1 倍。 *H. pylori* 感染和服用 NSAIDs 分别可以使溃疡出血的风险增加 1.79 倍和 4.85 倍, 而二者同时存在时溃疡出血的风险增加了 6.13 倍。提示在消化性溃疡和溃疡出血中, 二者之间存在协同作用。然而, 近期法国的一项研究对于 NSAIDs 服用者进行观察, 发现 6 wk 内胃肠道症状的发生率 *H. pylori* 阳性者与阴性者相比无显著性差异^[5]。有些研究发现, 对于 NSAIDs 相关性溃疡 *H. pylori* 阳性者治疗和预防复发的成功率较阴性者明显提高^[17-18], 根除 *H. pylori* 可以降低 NSAIDs 服用者消化性溃疡的发生, 但其作用似乎不如维持质子泵抑制剂治疗更为有效^[19]。导致上述研究结果不一致除了可能存在观察时间不同、病例选择有差异等原因, 推测可能在

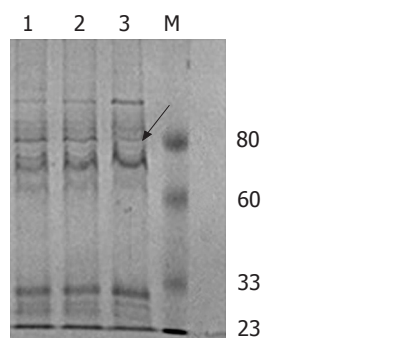


图4 阿司匹林对 *H. pylori* 11637 外膜蛋白的影响。1: 0.5 mmol/L; 2: 1.0 mmol/L; 3: DMSO; M: Marker。

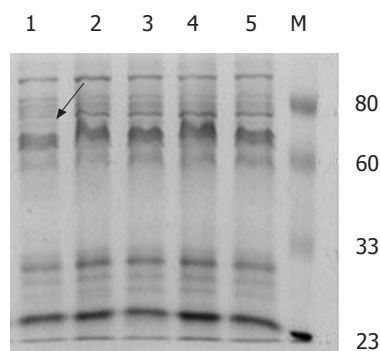


图5 塞来昔布对 *H. pylori* 11637 外膜蛋白的影响。1: DMSO; 2: 0.01 mmol/L; 3: 0.02 mmol/L; 4: 0.03 mmol/L; 5: 0.04 mmol/L; M: Marker。

H. pylori 感染和 NSAIDs 同时存在时, 胃黏膜的损伤不是两种损害因素的简单相加, 二者之间很可能存在某些相互作用, 从而互相干扰对方在胃肠道中的致病性。近期 Wang *et al*^[20] 的研究也发现, 阿司匹林可以剂量依赖性抑制 *H. pylori* 的生长。Gu *et al*^[6] 的研究发现, 吡罗昔芬及 COX 抑制剂 SC-236 不仅可以抑制 *H. pylori* 的生长, 还对 *H. pylori* 尿素酶活性有抑制作用。我们的研究显示, 阿司匹林和选择性 COX-2 抑制剂塞来昔布不仅可以剂量依赖性抑制 *H. pylori* 的生长, 还可以抑制 *H. pylori* 的尿素酶活性及空泡毒素的活性, 与上述的结果一致。新近 Shirin *et al*^[21] 的研究也显示布洛芬、吡罗昔芬、选择性 COX-2 抑制剂 NS-398 和两种舒林酸亚砷的衍生物可以抑制 *H. pylori* 的生长。尿素酶活性和空泡毒素均为与 *H. pylori* 致病有关的主要毒力因子, 尿素酶除了对 *H. pylori* 本身起保护作用外^[22], 还能造成胃黏膜屏障的损害^[23-24]。随着患者胃黏膜损伤程度的加重, 分离出的产毒 *H. pylori* 菌株的百分比也在增加^[25-26], babA2, cagA 和 vacA 阳性的菌株可以加重胃黏膜的损害并使发生肠化生的危险增加^[27], 提示细胞空泡毒素与临床疾病的严重

程度密切相关. 阿司匹林和塞来昔布不仅抑制 *H pylori* 生长, 更进一步抑制了尿素酶及空泡毒素的产生及其活性, 从而有可能减弱 *H pylori* 的致病性. 本研究显示, 阿司匹林 2.0 mmol/L 和塞来昔布 0.04 mmol/L 培养 48 h 可完全杀灭 *H pylori*. 阿司匹林用于解热、止痛和抗炎作用时, 其血浆浓度通常为 150-300 mg/L (0.8-1.6 mmol/L), 而口服后, 胃黏膜局部的浓度可以达到更高水平, 因此在体内完全有可能达到其抑菌浓度. 近期的一项随机对照临床研究^[28]显示, 应用标准奥美拉唑-阿莫西林-克拉霉素 (OAC) 三联疗法及 OAC 三连疗法+大剂量阿司匹林 (2000 mg, bid) 治疗 *H pylori* 阳性的消化性溃疡和慢性胃炎患者, *H pylori* 根治率分别为 80.3% (49/61) 及 86.7% (52/60). OAC+阿司匹林组对 *H pylori* 的根治率稍高于 OAC 组, 但两组在统计学上并无显著性差异. 两组中所有恶性事件包括消化道出血的发生率也无统计学差异. 在临床观察期间, 消化性溃疡及慢性胃炎患者均可以很好的耐受服用较大剂量阿司匹林. 然而阿司匹林特别是选择性的 COX-2 抑制剂是否可以用于临床上 *H pylori* 的根除治疗及其安全性还有待于更多的动物及临床研究证实. 阿司匹林和塞来昔布能够抑制 *H pylori* 尿素酶活性, 且药物处理后每数量级 *H pylori* 活菌的尿素酶活性较对照相比明显下降, 提示这两种药物对 *H pylori* 尿素酶的抑制可能不是完全由于其对生长的抑制造成的, 他们有可能直接抑制 *H pylori* 尿素酶的产生或其活性. 目前, NSAIDs 在人群中广泛应用, 基于尿素酶的 *H pylori* 感染检测方法如快速尿素酶实验, ¹³C 及 ¹⁴C 尿素呼气实验也广泛应用于临床. 由于 NSAIDs 可能对 *H pylori* 尿素酶有抑制作用, 对 NSAIDs 服用者采用基于尿素酶的实验来诊断 *H pylori* 感染, 其敏感性及其特异性是否受到影响应引起人们的关注. 对 NSAIDs 服用者以何种方式检测 *H pylori* 感染具有更好的准确性也需要更多的临床实验来证实. 不同的 *H pylori* 菌株致病性不同, 毒素阳性的菌株致病性较强. 阿司匹林和塞来昔布与 *H pylori* 共同培养可明显降低 *H pylori* 空泡毒素的活性, 表现为剂量依赖性. NSAIDs 对 *H pylori* 空泡毒素抑制作用的机制尚不清楚了, 有可能是通过药物的抑菌作用实现的. NSAIDs 是否同时抑制 *H pylori* 空泡毒素的活性尚有待研究. 近年有研究发现, 在阿司匹林存在的条件下, 临床上最常用于 *H pylori* 根除治疗的抗生素如甲硝唑、克拉霉素和羟氨苄青霉素

对 *H pylori* 的 MIC 值降低, 说明阿司匹林提高了细菌对这些抗生素的敏感性^[7]. 进一步的研究发现, 消炎痛和选择性 COX-2 抑制剂 SC-236 也可以提高 *H pylori* 对甲硝唑和克拉霉素的敏感性^[6]. 革兰氏阴性细菌的外膜蛋白具有选择性屏障作用, 小分子的亲水性物质凭借亲水性的微孔蛋白 (Porin) 构成的孔道穿透疏水性的外膜蛋白进入菌体. 目前发现了至少 5 种微孔蛋白, 命名为 HopA 至 HopE^[29-30], 并认为可能与 *H pylori* 的耐药性有关^[29], 进一步的研究证实 *H pylori* 对抗生素的耐药性与青霉素结合蛋白 (PBP) 的改变及膜通透性的减低有关^[31]. 在体外培养条件下, 阿司匹林和塞来昔布对 *H pylori* NCTC11637 外膜蛋白有影响, 两种药物均可以使分子量 80 kDa 左右的一个蛋白表达增多, 因此推测 NSAIDs 有可能通过改变 *H pylori* 的某些外膜蛋白, 使得 *H pylori* 的细胞膜对某些抗生素的通透性增加, 从而提高 *H pylori* 对抗生素的敏感性. 但具体受影响的外膜蛋白及作用机制还需进一步研究.

阿司匹林和塞来昔布可以抑制 *H pylori* 生长、尿素酶活性和空泡毒素活性, 这可以部分解释 NSAIDs 和 *H pylori* 共同存在时的致病性并不是两种因素的简单相加这一事实. 本研究还发现, 阿司匹林和塞来昔布可能对 *H pylori* 的外膜蛋白有影响, 提示 NSAIDs 可能通过对 *H pylori* 外膜蛋白的作用来影响 *H pylori* 对抗生素的敏感性. 然而, 由于 NSAIDs 对 *H pylori* 生长及尿素酶的抑制作用, 临床上对 NSAIDs 服用者采用基于尿素酶的实验诊断 *H pylori* 感染的敏感性和特异性是否受到影响, 以及 NSAIDs 在体内 *H pylori* 根除治疗中所起的作用, 还有待进一步的研究.

4 参考文献

- 1 Romano M, Ricci V, Memoli A, Tuccillo C, Di Popolo A, Sommi P, Acquaviva AM, Del Vecchio Blanco C, Bruni CB, Zarrilli R. *Helicobacter pylori* up-regulates cyclooxygenase-2 mRNA expression and prostaglandin E2 synthesis in MKN 28 gastric mucosal cells in vitro. *J Biol Chem* 1998; 273: 28560-28563
- 2 Kim JM, Kim JS, Jung HC, Song IS, Kim CY. Upregulated cyclooxygenase-2 inhibits apoptosis of human gastric epithelial cells infected with *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 2436-2443
- 3 Bhang CS, Lee HS, Kim SS, Song HJ, Sung YJ, Kim JI, Chung IS, Sun HS, Park DH, Lee YS. Effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitor and non-selective NSAIDs on *Helicobacter pylori*-induced gastritis in Mongolian gerbils. *Helicobacter* 2002; 7: 14-21
- 4 Huang JQ, Sridhar S, Hunt RH. Role of *Helicobacter pylori* infection and non-steroidal anti-inflammatory drugs in peptic-ulcer disease: a meta-analysis.

■应用要点

由于 NSAIDs 对 *H pylori* 生长及尿素酶的抑制作用, 提示目前在临床上广泛应用的基于尿素酶的诊断性实验对 NSAIDs 服用者的敏感性和特异性可能受到影响. NSAIDs 可能通过对 *H pylori* 外膜蛋白的作用来影响 *H pylori* 对抗生素的敏感性. 提示在体内 *H pylori* 根除治疗中 NSAIDs 可能存在积极作用.

■同行评价

本文探讨阿斯匹林和选择性COX-2抑制剂塞来昔布对体外培养的幽门螺杆菌(*H. pylori*)生长、毒力因子及外膜蛋白的影响, 论文选题准确, 研究方法科学性强, 结论可靠, 具有较高的理论水平及临床意义。

- 5 Schaefferbeke T, Broutet N, Zerbib F, Combe B, Bertin P, Lamouliatte H, Perie F, Joubert-Collin M, Megraud F. Should we eradicate *Helicobacter pylori* before prescribing an NSAID? Result of a placebo-controlled study. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2637-2643
- 6 Gu Q, Xia HH, Wang WH, Wang JD, Wong WM, Chan AO, Yuen MF, Lam SK, Cheung HK, Liu XG, Wong BC. Effect of cyclo-oxygenase inhibitors on *Helicobacter pylori* susceptibility to metronidazole and clarithromycin. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 675-681
- 7 Wang WH, Wong WM, Dailidienė D, Berg DE, Gu Q, Lai KC, Lam SK, Wong BC. Aspirin inhibits the growth of *Helicobacter pylori* and enhances its susceptibility to antimicrobial agents. *Gut* 2003; 52: 490-495
- 8 Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* 1994; 264: 382-388
- 9 Putman M, van Veen HW, Konings WN. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 672-693
- 10 Cover TL, Dooley CP, Blaser MJ. Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. *Infect Immun* 1990; 58: 603-610
- 11 胡伏莲, 郭飞, 贾博琦. 幽门螺杆菌毒素与胃癌发生的相关性研究. *中华内科杂志* 1998; 37: 620-621
- 12 Cover TL, Cao P, Murthy UK, Sipple MS, Blaser MJ. Serum neutralizing antibody response to the vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *J Clin Invest* 1992; 90: 913-918
- 13 Doig P, Trust TJ. Identification of surface-exposed outer membrane antigens of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1994; 62: 4526-4533
- 14 纪开宇, 胡伏莲, 李爱东, 李江. 幽门螺杆菌与胃黏膜损伤中的相互作用. *中华医学杂志* 2003; 83: 726-730
- 15 Grigoriadou S, Quraishi A, Saravanna J, Saravanan V, Heycock C, Kelly C. What effect does *Helicobacter pylori* infection have on the risk of peptic ulceration in patients receiving NSAIDs for rheumatoid arthritis? *Eur J Intern Med* 2002; 13: 269-273
- 16 Papatheodoridis GV, Papadelli D, Cholongitas E, Vassilopoulos D, Mentis A, Hadziyannis SJ. Effect of *Helicobacter pylori* infection on the risk of upper gastrointestinal bleeding in users of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 2004; 116: 601-605
- 17 Hawkey CJ, Karrasch JA, Szczepanski L, Walker DG, Barkun A, Swannell AJ, Yeomans ND. Omeprazole compared with misoprostol for ulcers associated with nonsteroidal antiinflammatory drugs. Omeprazole versus Misoprostol for NSAID-induced Ulcer Management (OMNIUM) Study Group. *N Engl J Med* 1998; 338: 727-734
- 18 Yeomans ND, Tulassay Z, Juhasz L, Racz I, Howard JM, van Rensburg CJ, Swannell AJ, Hawkey CJ. A comparison of omeprazole with ranitidine for ulcers associated with nonsteroidal antiinflammatory drugs. Acid Suppression Trial: Ranitidine versus Omeprazole for NSAID-associated Ulcer Treatment (ASTRONAUT) Study Group. *N Engl J Med* 1998; 338: 719-726
- 19 Vergara M, Catalan M, Gisbert JP, Calvet X. Meta-analysis: role of *Helicobacter pylori* eradication in the prevention of peptic ulcer in NSAID users. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21: 1411-1418
- 20 Wang WH, Hu FL, WONG BCY, BERG DE, LAM SK. Inhibitory effects of aspirin and indometacin on the growth of *Helicobacter pylori* in vitro. *Chinese J Dig Dis* 2002; 3: 172-177
- 21 Shirin H, Moss SF, Kancherla S, Kancherla K, Holt PR, Weinstein IB, Sordillo EM. Non-steroidal anti-inflammatory drugs have bacteriostatic and bactericidal activity against *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1388-1393
- 22 Windsor HM, O'Rourke J. Bacteriology and taxonomy of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am* 2000; 29: 633-648
- 23 Hazell SL, Lee A. Campylobacter pyloridis, urease, hydrogen ion back diffusion, and gastric ulcers. *Lancet* 1986; 2: 15-17
- 24 Marshall BJ. *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: S116-128
- 25 Tee W, Lambert JR, Dwyer B. Cytotoxin production by *Helicobacter pylori* from patients with upper gastrointestinal tract diseases. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1203-1205
- 26 Qiao W, Hu JL, Xiao B, Wu KC, Peng DR, Atherton JC, Xue H. cagA and vacA genotype of *Helicobacter pylori* associated with gastric diseases in Xi'an area. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1762-1766
- 27 Hocker M, Hohenberger P. *Helicobacter pylori* virulence factors-one part of a big picture. *Lancet* 2003; 362: 1231-1233
- 28 Park SH, Park DI, Kim SH, Kim HJ, Cho YK, Sung IK, Sohn CI, Jeon WK, Kim BI, Keum DK. Effect of high-dose aspirin on *Helicobacter pylori* eradication. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 626-629
- 29 Doig P, Exner MM, Hancock RE, Trust TJ. Isolation and characterization of a conserved porin protein from *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 1995; 177: 5447-5452
- 30 Exner MM, Doig P, Trust TJ, Hancock RE. Isolation and characterization of a family of porin proteins from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1995; 63: 1567-1572
- 31 Kwon DH, Dore MP, Kim JJ, Kato M, Lee M, Wu JY, Graham DY. High-level beta-lactam resistance associated with acquired multidrug resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2169-2178

电编 张敏 编辑 王晓瑜

肠毒素大肠杆菌攻毒小鼠模型的建立以及疫苗候选株保护效果的评价

王志斌, 姜普林, 曾年华, 李淑琴, 王令春, 李燕, 熊仕秋, 张兆山

张兆山, 李淑琴, 王令春, 北京生物工程研究所 北京市 100071
王志斌, 姜普林, 曾年华, 广州军区疾病预防控制中心 广东省广州市 510507
李燕, 熊仕秋, 中山大学基础医学院 广东省广州市 510089
王志斌, 1995年毕业于同济医科大学, 学位学士, 助理研究员, 主要从事流行病学研究。
国家高新技术研究发展计划资助项目(863计划), No. 2004AA215212
通讯作者: 张兆山, 100071, 北京市丰台区东大街20号, 北京生物工程研究所. zhangzs@nic.bmi.ac.cn
电话: 010-66948834 传真: 010-63833521
收稿日期: 2006-07-25 接受日期: 2006-08-10

Establishment of mice models following intranasal challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli* strains and evaluation of protective effect following intranasal immunization with vaccine candidates

Zhi-Bin Wang, Pu-Lin Jiang, Nian-Hua Zeng, Shu-Qin Li, Ling-Chun Wang, Yan Li, Shi-Qiu Xiong, Zhao-Shan Zhang

Zhao-Shan Zhang, Shu-Qin Li, Ling-Chun Wang, Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China
Zhi-Bin Wang, Pu-Lin Jiang, Nian-Hua Zeng, Center for Disease Prevention and Control, Guangzhou Military Command, Guangzhou 510507, Guangdong Province, China
Yan Li, Shi-Qiu Xiong, Pre-clinical College of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510089, Guangdong Province, China
Supported by the Hi-Tech Research and Development Program (863 Program) of China, No. 2004AA215212
Correspondence to: Zhao-Shan Zhang, Beijing Institute of Biotechnology, 20 Dongda Street, Beijing 100071, China. zhangzs@nic.bmi.ac.cn
Received: 2006-07-25 Accepted: 2006-08-10

Abstract

AIM: To establish the mice models following intranasal challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains E44813, E44815, E11881A, and evaluate the immune effect of vaccine candidates FE1, FE3, FE6 following intranasal immunization.

METHODS: The histopathological response in the lungs and the clearance of ETEC from the lungs was measured following intranasal challenge of BALB/c mice with LD₅₀-dose ETEC strains E44813, E44815 and E11881A. The protective effect of vaccine candidates FE1, FE3 and FE6 were evaluated using the established models.

RESULTS: A large quantity of lymphocytes, macrophages, neutrophils, and plasma cells were found in the lungs of mice. Multifocal bronchopneumonia was the main pathological feature under microscope following intranasal challenge with ETEC strains E44813, E44815, and E11881A. The bacteria were cleared from the lungs of the mice at a slow rate over 1-wk period and till the 7th day, bacteria at 10⁵ levels were still detected. After high titers of antibodies were detected in mice intranasally immunized with vaccine candidates FE1, FE3, and FE6, the mice were challenged by LD₅₀-dose E44813, E44815, and E11881A intranasally. No deaths occurred, and low numbers of lymphocytes were the main pathological feature. The bacteria were rapidly cleared from the lungs of the mice over 1-wk period, and no bacteria were detected at the 7th day. The numbers of the bacteria were significantly different between the experimental group and control group (0 CFU/g vs 6.2×10⁵, 5.4×10⁵, 2.3×10⁵ CFU/g, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Intranasal challenge of Balb/c mice with ETEC strains may provide a useful method to evaluate the vaccine. This study also demonstrates that the vaccine candidate FE1, FE3 and FE6 have good protective effect.

Key Words: Enterotoxigenic *Escherichia coli*; Challenge test; Mouse model; Vaccine candidate; Protective effect

Wang ZB, Jiang PL, Zeng NH, Li SQ, Wang LC, Li Y, Xiong SQ, Zhang ZS. Establishment of mice models following intranasal challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli* strains and evaluation of protective effect following intranasal immunization with

■背景资料

目前国内外尚未有适合于ETEC疫苗免疫保护评价的理想动物模型. 限制了ETEC疫苗的研究和评价. 鼻饲攻击小鼠作为研究病理和免疫反应的模型已经应用于其他肠道病原体.

■研究前沿

建立理想的攻毒动物模型,是疫苗研制中重要环节。研究ETEC攻毒试验小动物模型,为观察ETEC致病性和评价疫苗候选株的免疫效果提供了简便易行的新途径,对ETEC候选疫苗的研发有推动作用。

vaccine candidates. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(28):2753-2758

摘要

目的: 建立肠毒素大肠杆菌攻毒小鼠模型以及应用模型对疫苗候选株免疫效果进行评价。

方法: 通过鼻饲半数致死量(LD₅₀)肠毒素大肠杆菌E44813, E44815和E11881A观察小鼠肺病理学变化、肺部细菌清除情况变化,建立肠毒素大肠杆菌鼻饲小鼠模型;应用鼻饲小鼠模型观察疫苗候选株FE1, FE3, FE6保护效果。

结果: 鼻饲LD₅₀剂量肠毒素大肠杆菌小鼠的病理特征是肺组织存在大量的淋巴细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和浆细胞,为多病灶支气管炎,肺部细菌清除缓慢,至第7天仍能检测到10⁵数量级的细菌。应用疫苗候选株免疫后进行攻毒,小鼠没有发病和死亡,病理特征主要是淋巴细胞少量增多,肺部细菌清除迅速,至第7天已检测不到细菌,与对照有显著性差异(0 CFU/g vs 6.2×10⁵, 5.4×10⁵, 2.3×10⁵ CFU/g, *P*<0.05)。

结论: 肠毒素大肠杆菌鼻饲小鼠模型能够为疫苗筛选和评价提供了有效途径,同时也证实了疫苗候选株FE1, FE3, FE6具有良好的免疫保护效果。

关键词: 肠毒素大肠杆菌; 攻毒实验; 小鼠模型; 疫苗菌株; 保护效果

王志斌, 姜普林, 曾年华, 李淑琴, 王令春, 李燕, 熊仕秋, 张兆山. 肠毒素大肠杆菌攻毒小鼠模型的建立以及疫苗候选株保护效果的评价. *世界华人消化杂志* 2006;14(28):2753-2758
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2753.asp>

0 引言

肠毒素大肠杆菌(enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC)是引起儿童细菌性腹泻的最主要致病菌之一^[1], 常因食品或水源污染导致暴发或流行, 是迫切需要解决的公共卫生问题^[2]。尽管肠毒素大肠杆菌疫苗的研制, 被WHO列为优先开发的项目, 目前还没有肠毒素大肠杆菌疫苗应用于人群免疫。限制疫苗研制的瓶颈之一是缺乏理想的适于评价ETEC致病性和疫苗候选株的动物模型, 2003年Byrd *et al*^[3]利用野生型ETEC菌株H10407和B7A鼻饲攻击BALB/c小鼠, 在一定剂量范围内可以引起小鼠肺部细胞的病变甚至死亡, 认为可以作为动物模型评价疫苗候选株

的免疫效果。在本研究中, 通过鼻饲野生型肠毒素大肠杆菌E44813, E44815和E11881A攻击BALB/c♀小鼠, 检测小鼠肺中的肠毒素大肠杆菌的清除率, 观察肺组织的病理学变化, 建立肠毒素大肠杆菌攻毒小鼠模型, 确立野生型肠毒素大肠杆菌攻击的LD₅₀。在此基础上, 应用肠毒素大肠杆菌鼻饲小鼠模型评价肠毒素大肠杆菌疫苗候选株FE1, FE3, FE6的免疫保护效果。

1 材料和方法

1.1 材料 野生型肠毒素大肠杆菌E44813, E44815和E11881A, 疫苗候选株FE1, FE3和FE6(表1)。BALB/c♀小鼠(8-10 wk)均由中山医科大学动物中心提供。HRP-羊抗鼠IgG, IgA购自美国Zymed公司。实验中所有化学试剂均为分析纯。CFA培养基(水解酪蛋白10 g/L, 酵母粉1.5 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.05 g/L, MnCl₂ 0.005 g/L, 琼脂15 g/L, 调节pH至7.4); 麦康凯培养基(蛋白胨20 g/L, 乳糖10 g/L, 胆盐5 g/L, NaCl 5 g/L, 中性红 0.075 g/L, 琼脂15 g/L, pH7.4)。

1.2 方法 肠毒素大肠杆菌E44813, E44815和E11881A分别用CFA培养基和麦康凯培养基37℃培养18 h, 其中麦康凯培养基是用来鉴定所培养细菌是否纯的肠毒素大肠杆菌。将CFA培养基上的细菌刮落并用无菌的50 mmol/L PBS(pH7.2)悬浮, 室温下轻轻振摇30 min, 并用无菌PBS稀释至使用浓度, 供动物实验使用。

1.2.1 发病率和死亡率检测 198只BALB/c♀小鼠随机分成3组, 分别为肠毒素大肠杆菌E44813, E44815和E11881A组, 每组66只, 各组依据鼻饲浓度由低到高再分为6小组(分别是12, 12, 12, 12, 12和6只)。用乙醚轻度麻醉小鼠, 依次用0, 5×10⁹, 1×10¹⁰, 2×10¹⁰, 4×10¹⁰和8×10¹⁰菌密度鼻饲小鼠(对照用PBS), 每只小鼠鼻饲50 μL; 观察小鼠的发病情况和死亡情况, 连续观察7 d, 并计算出半数致死量(LD₅₀)。

1.2.2 肺部细菌清除检测 84只BALB/c♀小鼠随机分成4组, 分别为肠毒素大肠杆菌E44813, E44815, E11881A组和对照PBS组, 每组21只; 用乙醚轻度麻醉小鼠, 依次用各菌株的LD₅₀的菌密度鼻饲小鼠, 每只小鼠鼻饲50 μL; 每天从各组取3只小鼠进行麻醉处死, 无菌操作将小鼠的肺取出, 放入无菌的玻璃组织碾磨器中, 加入1 mL无菌PBS进行碾磨, 使细菌完全进入悬浮液中; 将悬浮液倍比稀释, 接种至CFA培养基和麦康凯培养基上37℃培养18 h, 计算细菌总数。

表 1 菌株的表型特征和来源

菌株名称	主要表型特征	来源
肠毒素大肠杆菌		
E44813(野生型)	CFA/1, LT, ST	卫生部中国药品生物制品检定所
E44815(野生型)	CS3, LT, ST	卫生部中国药品生物制品检定所
E11881A(野生型)	CS6, LT, ST	瑞典Svennerhom教授惠赠
载体及疫苗候选株		
志贺菌FWL01	(ipa--virg) ⁻ , Sm ^R , Asd ⁻ , ctxB	王恒樑 <i>et al</i> ^[4]
疫苗株FE1	FWL01(CFA/1, Asd ⁺)	本课题组构建 ^[5]
疫苗株FE3	FWL01(CS3, LTB/ST, Asd ⁺)	本课题组构建 ^[6]
疫苗株FE6	FWL01(CFA/1, Asd ⁺)	本课题组构建 ^[7]

表 2 肠毒素大肠杆菌E44813, E44815和E11881A鼻饲BALB/c小鼠的死亡数

菌株和剂量	攻毒后的天数							合计
	1	2	3	4	5	6	7	
E44813								
0	0	0	0	0	0	0	0	0/12
5 × 10 ⁹	0	0	0	0	0	0	0	0/12
1 × 10 ¹⁰	0	2	1	2	1	0	0	6/12
2 × 10 ¹⁰	0	4	3	2	0	1	0	10/12
4 × 10 ¹⁰	0	8	4					12/12
8 × 10 ¹⁰	0	6						6/6
E44815								
0	0	0	0	0	0	0	0	0/12
5 × 10 ⁹	0	0	0	0	0	0	0	0/12
1 × 10 ¹⁰	0	1	1	0	0	0	0	2/12
2 × 10 ¹⁰	0	3	2	1	1	0	0	7/12
4 × 10 ¹⁰	0	7	4	1	0	0	0	12/12
8 × 10 ¹⁰	0	5	1					6/6
E11881A								
0	0	0	0	0	0	0	0	0/12
5 × 10 ⁹	0	0	0	0	0	0	0	0/12
1 × 10 ¹⁰	0	0	0	1	0	0	0	1/12
2 × 10 ¹⁰	0	1	2	1	0	0	1	5/12
4 × 10 ¹⁰	0	6	2	2	1	1	0	12/12
8 × 10 ¹⁰	0	3	2	1				6/6

1.2.3 病理检测 28只BALB/c♀小鼠随机分成4组, 分别为肠毒素大肠杆菌E44813, E44815, E11881A组和对照PBS组, 每组7只; 用乙醚轻度麻醉小鼠, 依次用各菌株的LD50的菌密度鼻饲小鼠, 每只小鼠鼻饲50 μL, 连续观察7 d. 每天麻醉处死1只/组, 无菌操作将小鼠的肺取出, 用40 g/L甲醛浸泡, 后用石蜡包埋, 5 μm切片, 并用苏木精和伊红染色. 用显微镜观察炎症反应和肺部的病理改变.

1.2.4 抗体检测 每组24只小鼠, 直接用肠毒素大肠杆菌E44813, E44815和E11881A鼻饲攻击, 每7 d检测1次血清抗体IgG和粪便中的IgA^[8-9], 共检测4次.

1.2.5 候选疫苗保护实验 21只BALB/c♀小鼠用疫苗候选株FE3, 用50 μL 2 × 10⁹的菌密度鼻饲免疫BALB/c♀小鼠2-3次, 检测血清和粪便中的IgG

和IgA, 如抗体显著升高, 则改用肠毒素大肠杆菌E44815的50 μL LD50的菌密度鼻饲攻击小鼠, 观察小鼠的发病情况和病理变化; 依照病理检测方法, 每天处死3只小鼠, 无菌操作将小鼠的肺取出, 其中一部分肺组织用40 g/L甲醛浸泡, 作病理变化观察使用; 与此同时, 称取另一部分肺组织, 放入无菌的玻璃组织碾磨器中, 加入1 mL无菌PBS进行碾磨, 使细菌完全进入悬浮液中, 将悬浮液倍比稀释, 接种至CFA培养基和麦康凯培养基上37℃培养18 h, 计算细菌总数. 以同样PBS免疫的一组小鼠做平行对照. 同样方法, 用FE1, FE6免疫后, 用E44813和E11881A攻击, 观察保护效果.

2 结果

2.1 肠毒素大肠杆菌的致病性和免疫反应

■创新盘点
本研究首次建立了肠毒素大肠杆菌攻毒小鼠模型, 为其他细菌疫苗的研制评价提供了新思路.

■应用要点

建立的ETEC鼻饲小鼠模型,为进一步理解感染肠毒素大肠杆菌后的病理和免疫反应以及为评价疫苗的保护效果提供了有效途径,具有较强的临床指导意义。

2.1.1 发病率和LD₅₀ 给小鼠鼻饲各种剂量活肠毒素大肠杆菌E44813, E44815和E11881A, 检测他们的发病率和LD₅₀. E44813比E44815和E11881A毒性更大, LD₅₀分别是 1.02×10^{10} CFU/mL, 1.69×10^{10} CFU/mL, 2.0×10^{10} CFU/mL(表2). 鼻饲毒株后小鼠均有发病, 发病率为100%, 临床症状主要有嗜睡、呼吸缓慢、弓背、反应迟钝、皮毛蓬松、光泽度较差易脱落、食欲下降、摄食差、严重者双眼有分泌物. 鼻饲PBS后小鼠只是在第1天有皮毛蓬松和食欲下降, 第2天恢复正常, 皮毛光洁、反应灵敏、食欲好、摄食正常.

2.1.2 细菌清除率 在7 d的观察期间, 实验组小鼠肺部细菌都以一个比较稳定的速度下降, 至第7天后仍然能从感染小鼠肺部中检测到大量细菌, 鼻饲E44813, E44815和E11881A组第7天为 6.2×10^5 CFU/g, 5.4×10^5 CFU/g, 2.3×10^5 CFU/g, 3组之间比较无显著性差异($P > 0.05$); 而对照组未能检测到细菌.

2.1.3 病理变化 鼻饲肠毒素大肠杆菌E44813, E44815和E11881A后, 小鼠肺部发生了组织病理学改变, 通过显微镜观察多病灶支气管肺炎是主要的病理特征. 24 h以后观察, 肺组织有不同程度的炎症, 浸润的炎症细胞早期(1-4 d)以淋巴细胞为主(50%-90%), 巨噬细胞为辅(10%-50%), 伴有少量的中性粒细胞(10%); 后期(5-7 d)以中性粒细胞为主(50%-80%), 淋巴细胞为辅(20%-50%), 伴有少量的巨噬细胞(10%-20%); 个别肺组织存在少量浆细胞; 部分区域存在细胞变性, 以血管和支气管周围变性最为明显, 并伴有少量炎症细胞浸润; 部分肺组织血管高度扩张, 广泛淤血, 伴有出血、水肿. 用PBS鼻饲小鼠的肺没有发现任何病理改变.

2.1.4 抗体变化 鼻饲肠毒素大肠杆菌E44813, E44815和E11881A, 小鼠血清抗体IgG增长缓慢, 第28天分别为1:293, 1:267, 1:240.

2.2 疫苗候选株的免疫保护反应

2.2.1 发病率 应用疫苗候选株FE1, FE3, FE6免疫后, 产生保护性抗体后用相应毒株E44813, E44815和E11881A进行攻击, 3组小鼠没有出现死亡, 只是在攻击后的第1至2天小鼠出现了弓背、皮毛蓬松等现象, 而后恢复正常.

2.2.2 细菌清除率 鼻饲疫苗组小鼠先用疫苗候选株进行免疫, 产生保护性抗体后用相应毒株进行攻击, 对照组只用PBS进行免疫, 而后也用相应毒株进行攻击, 同时测定小鼠肺部细菌的

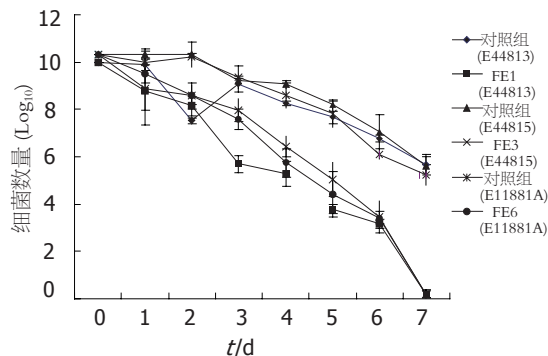


图1 免疫保护后攻毒的实验组和对照组肺部细菌清除情况.

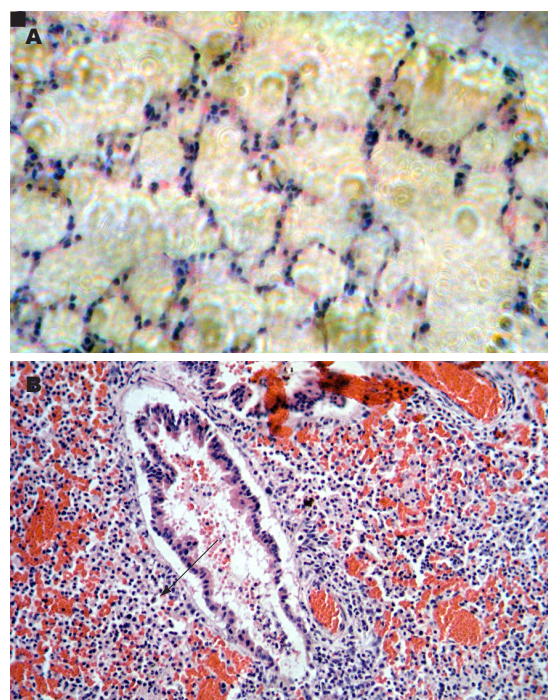


图2 小鼠肺组织病理切片($\times 80$). A: 疫苗免疫保护后攻毒的实验组; B: PBS免疫保护后攻毒的实验组.

清除率. 在7 d的观察期间, 免疫组和对照组肺部细菌都以一个比较稳定的速度下降, 至第6天后从实验小鼠肺部中已经不能检测到对应的攻毒细菌, 而对照组仍然能检测到大量攻毒细菌. 免疫组FE1, FE3, FE6第7天肺部细菌检测数量均为0 CFU/g, 而对照组E44813, E44815和E11881A组第7天分别为 6.2×10^5 CFU/g, 5.4×10^5 CFU/g, 2.3×10^5 CFU/g. 免疫组和对照组比较有显著性差异($P < 0.05$), 而两组组内比较无显著性差异($P > 0.05$)(图1).

2.2.3 病理变化 免疫保护后攻毒的实验组小鼠肺部在第1, 2天有轻微的炎症反应. 第3至第4天开始恢复正常. 通过显微镜观察肺组织, 早期(1-3 d)发现肺组织存在少量炎症细胞, 以淋巴

细胞为主(90%), 伴有少量的巨噬细胞(10%); 后期(4-7 d)没有发现炎症细胞, 一切正常. 对照组小鼠肺部发生了组织病理学改变, 通过显微镜观察多病灶支气管肺炎是主要的病理特征. 24 h以后观察, 肺组织有不同程度的炎症, 浸润的炎症细胞早期(1-4 d)以淋巴细胞为主(50%-90%), 巨噬细胞为辅(10%-50%), 伴有少量的中性粒细胞(10%); 后期(5-7 d)以中性粒细胞为主(50%-80%), 淋巴细胞为辅(20%-50%), 伴有少量的巨噬细胞(10%-20%); 个别肺组织存在少量浆细胞; 部分区域存在细胞变性, 以血管和支气管周围变性最为明显, 并伴有少量炎症细胞浸润; 部分肺组织血管高度扩张, 广泛淤血, 伴有出血、水肿(图2).

2.2.4 抗体变化 每组21只小鼠, 用疫苗候选株FE1, FE3和FE6进行免疫, 每7 d. 检测1次血清抗体IgG和粪便中的sIgA, 共检测4次. 血清抗体IgG增长迅速, 第28天分别为1:2080, 1:2347, 1:1440. 粪便中sIgA增长比较缓慢, 第28天分别为1:29, 1:28, 1:27.

3 讨论

目前世界上还没有一种完全适合于ETEC疫苗免疫保护评价的理想动物模型. 鼻饲攻击小鼠作为研究病理和免疫反应的模型已经应用于其他肠道病原体, 例如鼻饲志贺菌攻击小鼠已经应用于痢疾疫苗候选株的评价. 本研究应用野生型ETEC E44813, E44815和E11881A鼻饲攻击小鼠, 观察小鼠的病理和免疫反应, 旨在试图建立评价ETEC疫苗候选株的动物模型. 鼻饲ETEC菌株LD₅₀的确定是实验成功的关键. 本文针对3种不同血清型菌毛抗原的ETEC菌株进行了研究. 由于菌株的毒性强弱不同, 用相同剂量的肠毒素大肠杆菌E44813, E44815和E11881A攻击小鼠, E44813致小鼠死亡的时间最早, E44815其次; 死亡率也以E44813最高, E44815其次, E44813毒株产生的炎症反应比E44815, E11881A更为严重. 其LD₅₀由低到高依次是E44813, E44815, E11881A, 说明E44813毒性最强. 同样以LD₅₀攻击小鼠, 血清中产生抗体的滴度仍然以E44813最高, E44815其次. 从以往有关人体感染肠毒素大肠杆菌的实验结果分析, 发现他与本研究中感染小鼠研究的结果有许多相同之处^[10-11]. 国外Levine和Coworkers针对E44813和B7A进行人体实验, 发现E44813毒性更强, 相同剂量感染人体发病率更高, 血清免疫学指标也更高^[12]. 然而, 其

病变的基本特征是相同的. 鼻饲LD₅₀的E44813, E44815和E11881A都引发了小鼠肺部严重的炎症, 都能在24 h内诱导肺泡产生大量的淋巴细胞和巨噬细胞及少量的中性粒细胞, 后期以中性粒细胞为主, 淋巴细胞为辅, 伴有少量的巨噬细胞. 在细支气管也发现了白细胞, 但是数量没有肺泡处多, 另外还可产生淋巴增生. 主要的病理特征显示为多病灶支气管肺炎, 通过对其他组织的病理切片观察, 显示炎症没有扩散到其他组织. 在确定了ETEC鼻饲LD₅₀的基础上, 应用疫苗候选株FE1, FE3, FE6对小鼠进行免疫保护实验. 用疫苗候选株免疫动物后, 在短短的28 d内就能够使小鼠体内产生高效价的保护性抗体. 而后用毒株攻击, 所有小鼠都没有死亡, 只是有轻度的不适. 肺部组织只有轻度的病理改变, 第3天以后肺部组织病理改变恢复正常, 与未免疫的对照组小鼠的病变特征和程度有明显不同. 免疫小鼠肺部细菌以比较快的速度被迅速清除, 在攻击6 d后, 就不能从肺部组织检测到攻毒菌株, 与对照组形成显著性差异($P<0.05$).

实验结果表明, 通过鼻饲ETEC E44813, E44815和E11881A活菌, 可以在小鼠肺组织中观察到有一定规律的病理学反应以及血清中的抗体的变化, 作为研究ETEC致病性的动物模型是可行的. 在应用ETEC鼻饲小鼠模型评价疫苗候选株免疫保护效果的研究中, 通过对比, 发现疫苗候选株FE1, FE3, FE6能够为小鼠抵抗肠毒素大肠杆菌感染提供有效的免疫保护, 为进一步人体实验提供了实验基础. 本研究建立的ETEC鼻饲小鼠模型, 为进一步理解感染肠毒素大肠杆菌后的病理和免疫反应以及为评价疫苗的保护效果提供了有效途径.

4 参考文献

- 1 Levine MM. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* 1987; 155: 377-389
- 2 Black RE. Epidemiology of travelers' diarrhea and relative importance of various pathogens. *Rev Infect Dis* 1990; 12 Suppl 1: S73-S79
- 3 Byrd W, Mog SR, Cassels FJ. Pathogenicity and immune response measured in mice following intranasal challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli* strains H10407 and B7A. *Infect Immun* 2003; 71: 13-21
- 4 王恒樑, 冯尔玲, 林云, 廖翔, 苏国富. 弗氏志贺菌2aT32株asd基因缺失突变体的构建. 军事医学科学院院刊 2000; 24: 81-87
- 5 郑继平, 王令春, 王凡, 罗刚, 李淑琴, 段海清, 黄翠芬, 张兆山. 肠毒素大肠杆菌定居因子CFA/1和CS6在减毒福氏志贺菌中的共表达. 生物化学和生物物理学报, 2003; 35: 1005-1010

■同行评价

肠毒素大肠杆菌攻毒小鼠模型的建立具有较强的临床指导意义, 因为肠毒素的损害是急性炎症反应的重要因素, 所以本论文内容重要, 信息量适中, 可以增加一些临床生化指标的监测, 内容新颖, 符合伦理学要求. 不足之处是文中疫苗筛选实验对照组中缺少对疫苗安全性的监测.

- 6 刘陶陶, 李淑琴, 张兆山, 郑继平, 刘秀丽, 罗刚, 黄翠芬. 肠毒素大肠杆菌CS3定居因子抗原和融合肠毒素基因在减毒痢疾杆菌中的共表达. 生物化学和生物物理学报 2003; 35: 49-54
- 7 罗刚, 杨晓, 李淑琴, 张兆山. 肠毒素大肠杆菌定居因子CS6抗原基因在大肠杆菌中的表达. 军事医学科学院院刊 2004; 28: 232-234
- 8 王志斌, 曾年华, 姜普林, 李淑琴, 张兆山. 肠毒素大肠埃希菌载体活菌疫苗的安全性和免疫性研究. 中华流行病学杂志 2005; 26: 515-519
- 9 李淑琴, 张兆山, 陈添弥, 黄翠芬. 肠毒素大肠杆菌定居因子抗原I的酶联免疫吸附试验检测法. 解放军医学杂志 1988; 13: 271-273
- 10 Levine MM, Nalin DR, Hoover DL, Bergquist EJ, Hornick RB, Young CR. Immunity to enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1979; 23: 729-736
- 11 DuPont HL, Formal SB, Hornick RB, Snyder MJ, Libonati JP, Sheahan DG, LaBrec EH, Kalas JP. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. *N Engl J Med* 1971; 285: 1-9
- 12 Levine MM, Black RE, Brinton CC Jr, Clements ML, Fusco P, Hughes TP, O'Donnell S, Robins-Browne R, Wood S, Young CR. Reactogenicity, immunogenicity and efficacy studies of *Escherichia coli* type 1 somatic pili parenteral vaccine in man. *Scand J Infect Dis Suppl* 1982; 33: 83-95

电编 李琪 编辑 张焕兰

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

• 消息 •

中国学术期刊综合引证报告(2006)

本刊讯 由中国中西医结合学会主办, 根据《中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)》2005年6182种统计刊源析出的214万条中国期刊引文数据库及CNKI “中国期刊网”中心网站2005-01/12全文下载记录(1.5亿篇次)的大样本数据统计分析得到: 世界华人消化杂志[标准刊号: ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R; 类目名称: 医药科学\临床医学\呼吸及消化系统疾病(YK5.2.3)]总被引频次为2471, 影响因子为0.661, 5年影响因子为0.644, 即年指标为0.079, 他引总引比为0.73, 被引期刊数为491, 被引半衰期为4.6, 2005载文量为768, 基金论文比为0.44, Web即年下载率为0.6. [中国学术期刊(光盘版)电子杂志社; 中国科学文献计量评价研究中心].

瘦素受体与核转录因子- κ B在结直肠腺癌组织中的表达及意义

熊枝繁, 晏泽辉

熊枝繁, 晏泽辉, 华中科技大学同济医学院附属梨园医院消化内科 湖北省武汉市 430077

熊枝繁, 1999年武汉大学医学院硕士, 教授, 硕士生导师, 主要从事消化道肿瘤研究。

湖北省自然科学基金资助项目, No. 2006ABA136

通讯作者: 熊枝繁, 430077, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属梨园医院消化内科. xiongzhi@126.com
电话: 027-86777592

收稿日期: 2006-08-01 接受日期: 2006-08-23

Expression of leptin receptor and nuclear factor kappa B and their significances in colorectal adenocarcinoma

Zhi-Fan Xiong, Ze-Hui Yan

Zhi-Fan Xiong, Ze-Hui Yan, Department of Digestive Diseases, Liyuan Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 430077 Wuhan, Hubei Province, China

Supported by the Natural Science Foundation of Hubei Province, No. 2006ABA136

Correspondence to: Dr. Zhi-Fan Xiong, Department of Digestive Diseases, Liyuan Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 430077 Wuhan, Hubei Province, China. xiongzhi@126.com

Received: 2006-08-01 Accepted: 2006-08-23

Abstract

AIM: To investigate the expression of leptin receptor (Ob-R) in colorectal adenocarcinoma, and explore its role in the tumor angiogenesis and the possible mechanism.

METHODS: Immunohistochemical staining was performed to detect the expression of Ob-R, CD105, and nuclear factor-kappa B p65 (NF- κ Bp65) in colorectal adenocarcinoma ($n = 35$), colorectal adenoma ($n = 24$) and normal controls ($n = 35$). Image analysis software was used for semi-quantitative assessment.

RESULTS: The microvessel density (MVD) marked by CD105 was decreased progressively from cancer patients, adenoma patients and normal controls (23.63 ± 2.08 vs 10.83 ± 1.25 vs

1.97 ± 0.37 , $P < 0.05$). Ob-R and NF- κ Bp65 were expressed at the similar location. The integrated optical densities of Ob-R and NF- κ Bp65 in cancer patients were both higher than those in the normal controls (27.41 ± 2.21 vs 20.45 ± 1.63 , $P < 0.05$; 45.88 ± 5.46 vs 29.11 ± 3.89 , $P < 0.05$). A significant association was found between either two of MVD, the integrated optical densities of Ob-R and NF- κ Bp65 in cancer patients. The positive expression of Ob-R was found in 63.6% cases of cancer patients, and their mean MVD was higher than that in the negative ones (38.21 ± 2.78 vs 27.50 ± 2.95 , $t = 2.602$, $P < 0.05$). The positive expression of NF- κ Bp65 was observed on the nucleus of vascular endothelial cells in 68.6% cases of cancer patients, and their mean MVD was higher than that in the negative ones (37.53 ± 3.07 vs 28.42 ± 2.63 , $t = 2.146$, $P < 0.05$). The expression of Ob-R and NF- κ B had no marked correlations with the clinicopathological agents of colorectal adenocarcinoma.

CONCLUSION: The increased expression of Ob-R contributes to the angiogenesis in colorectal adenocarcinoma, probably through activation of NF- κ B pathways.

Key Words: Leptin receptor; Nuclear factor-kappa B; Colorectal adenocarcinoma

Xiong ZF, Yan ZH. Expression of leptin receptor and nuclear factor kappa B and their significances in colorectal adenocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(28):2759-2764

摘要

目的: 研究瘦素受体(Ob-R)在结直肠腺癌组织中的表达, 探讨Ob-R在肿瘤血管生成中的作用及其可能机制。

方法: 免疫组织化学方法检测35例结直肠腺癌组织、24例结直肠腺瘤组织和35例正常对照组织中Ob-R、CD105、核转录因子- κ Bp65(NF- κ Bp65)的表达, 以图像分析软件进行半定量测定。

■背景资料

多种恶性肿瘤的患病风险与肥胖相关, 据研究, 肥胖者(BMI ≥ 30)患结直肠癌的风险是非肥胖者的1.5-2.0倍。研究显示, 脂源性因子的异常表达可能在其中起作用。瘦素是1994年才发现的一种新的脂源性激素, 其与肿瘤的关系近年来越来越受到人们的重视, 并且其促癌作用得到了初步的验证。

■研究前沿

关于瘦素的研究主要集中在其在各种肿瘤中对细胞生长、凋亡、肿瘤侵袭性、血管生成等方面的作用及其机制。

结果:以CD105标记的微血管密度(MVD)在癌症组、腺瘤组、正常对照组间呈递减改变(23.63 ± 2.08 vs 10.83 ± 1.25 vs 1.97 ± 0.37 , $P < 0.05$)。Ob-R和NF- κ B(p65)的表达部位相似。癌症组中Ob-R和NF- κ B(p65)的积分光密度均比对照组高(27.41 ± 2.21 vs 20.45 ± 1.63 , 45.88 ± 5.46 vs 29.11 ± 3.89 , $P < 0.05$)。癌症组中Ob-R、NF- κ Bp65的积分光密度, MVD三者间呈两两正相关。癌症组63.6%的标本中可见Ob-R血管内皮细胞染色阳性, 其MVD较阴性者高(38.21 ± 2.78 vs 27.50 ± 2.95 , $t = 2.602$, $P < 0.05$); 68.6%的癌症标本中可见NF- κ Bp65血管内皮细胞核表达阳性, 其MVD较阴性者高(37.53 ± 3.07 vs 28.42 ± 2.63 , $t = 2.146$, $P < 0.05$)。Ob-R和NF- κ Bp65的表达与结直肠腺瘤临床病理因素间未见相关性。

结论:结直肠腺瘤组织中Ob-R表达增多对肿瘤血管生成起促进作用, 并且该作用可能是通过NF- κ B途径来实现的。

关键词:瘦素受体; 核转录因子- κ B; 结直肠腺瘤

熊枝繁, 晏泽辉. 瘦素受体与核转录因子- κ B在结直肠腺瘤组织中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2006;14(28):2759-2764
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2759.asp>

0 引言

多种恶性肿瘤包括结直肠癌在内的患病风险与肥胖相关, 研究显示脂源性因子的异常表达可能在其中起作用^[1-2]。瘦素(leptin)是一种新发现的脂源性激素, 与其受体结合后产生多种效应, 其促癌作用在体外和动物实验中得到证实, 但在人癌症组织中的研究报道较少。CD105是一种与增生有关的内皮细胞膜抗原, 在与肿瘤有关的新生血管内皮强烈表达。研究证实对于肿瘤新生微血管密度(MVD)的标记, CD105优于常用的泛血管标记物^[3]。核转录因子- κ B(NF- κ B)可通过多个环节促进肿瘤血管生成。本研究旨在通过应用免疫组织化学方法检测结直肠腺瘤、腺瘤及正常大肠组织中瘦素受体(Ob-R), CD105, NF- κ Bp65的表达, 探讨瘦素受体在结直肠癌组织中表达及其在血管生成中的作用和可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料 收集同济医院2005-09/2006-01手术切除的结直肠腺瘤组织标本24例, 结直肠腺瘤组织标本35例, 同时取其手术断端作为正常对照

组织。35例结直肠癌患者年龄为29-78(平均59.2)岁, 男21例, 女14例。24例结直肠腺瘤患者年龄为30-77(平均57.8)岁, 男11例, 女13例。两组间年龄差异无统计学意义。所有病例患者均无糖尿病、糖耐量异常病史, 术前均未作放疗和化疗。所有癌组织均经病理检验确诊, 并按国际癌症协会所定的标准行分化程度分级和Dukes分期, 所有断端组织均未发现癌细胞。标本均经40 g/L中性甲醛溶液固定后常规石蜡包埋, 4 μ m连续切片备用。羊抗人Ob-R多克隆抗体为美国Santa Cruz公司产品; 鼠抗人CD105单克隆抗体及兔抗人NF- κ Bp65多克隆抗体为北京中山生物技术公司产品。HMIAS-2000型全自动彩色图像分析系统为华中科技大学同济医学院千屏影像公司产品。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学方法检测Ob-R, NF- κ Bp65的表达 采用链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物法(SABC法)对Ob-R, NF- κ Bp65蛋白表达进行检测。对NF- κ Bp65检测时不进行苏木精复染。以PBS代替一抗作为阴性对照。

1.2.2 新生微血管染色及定量 以抗CD105单克隆抗体行免疫组化(SABC法)染色对新生微血管进行标记。参照Weidner *et al*^[4]报道的方法, 以与背景明显有别的任何一个棕黄色染色的内皮细胞或细胞丛作为一个血管, 只要结构不相连续, 分支结构也作为一个血管计数。先在低倍镜下观察切片全部视野, 找到肿瘤间质血管密度最高区域, 再转到高倍镜(20×10 , 0.739 mm^2 /每视野)下精确计数微血管数量。记录3个视野内的微血管数, 取其平均值作为该标本的MVD值。

统计学处理 使用HMIAS-2000型全自动彩色图像分析系统对本免疫组化染色结果进行图像分析。实验数据分别采用方差分析、成组 t 检验、Pearson相关分析, 应用SPSS 12.0统计软件进行统计学处理。

2 结果

2.1 Ob-R, NF- κ Bp65的表达和分布 Ob-R在绝大部分癌症组标本(33/35, 94.3%)中可见着色, 呈棕黄色定位于细胞膜和细胞质中。阳性细胞呈弥漫分布, 大部分位于腺癌组织间质(图1A), 少部分位于腺癌腺体(图1B), 间质阳性细胞染色深度明显大于腺体阳性细胞。部分间质血管内皮细胞也可见着色(21/33, 63.6%, 图1C)。部分腺瘤组标本(17/24, 70.8%, 图1D)和部分正常对照

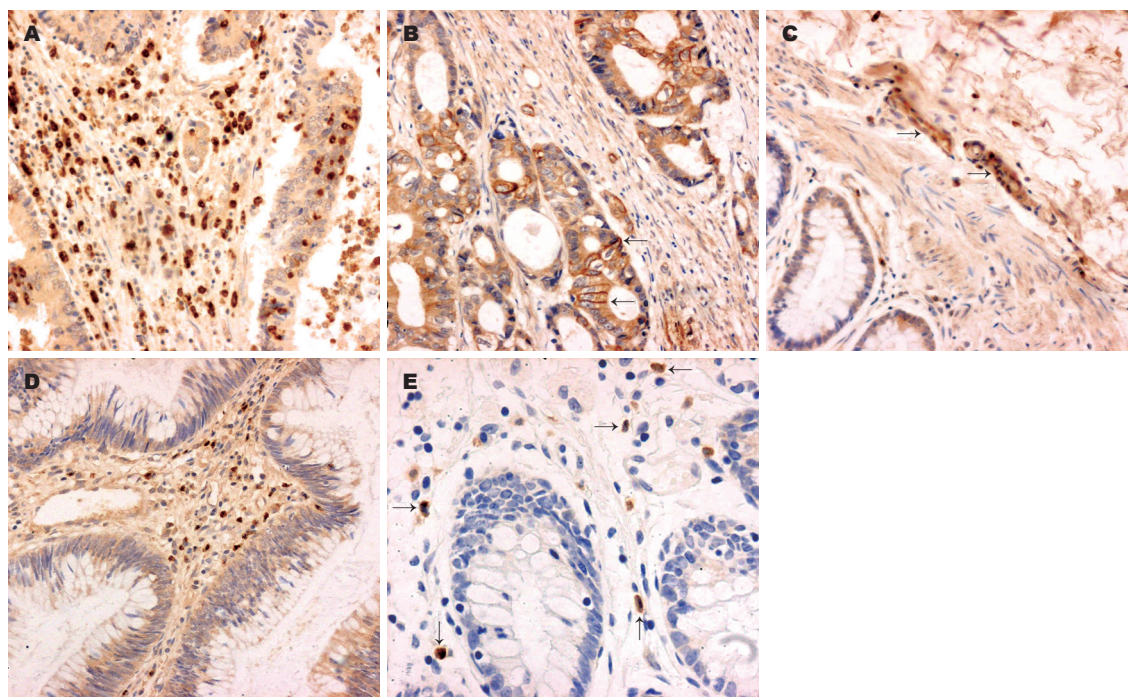


图1 Ob-R的表达(SABC法). A: 结直肠腺癌间质表达(200 \times); B: 结直肠腺癌腺体表达(200 \times); C: 结直肠腺癌间质血管内皮细胞表达(200 \times); D: 结直肠腺癌间质表达(200 \times); E: 正常大肠组织表达(400 \times). 箭头所指为Ob-R表达阳性细胞.

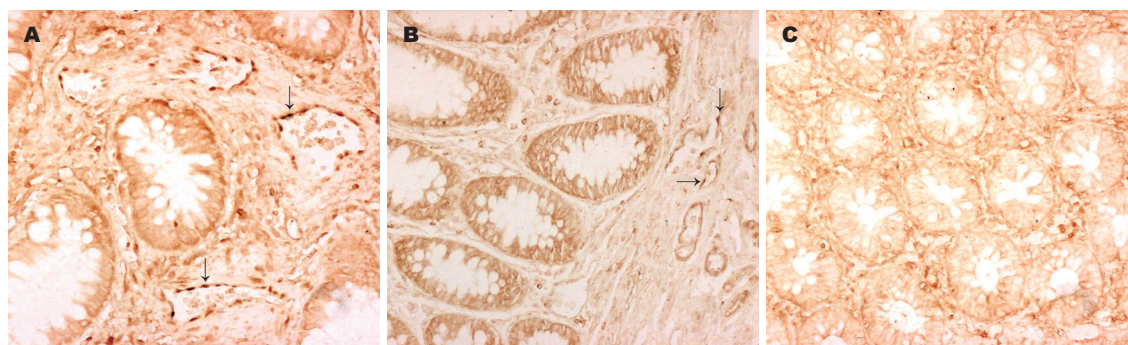


图2 NF- κ Bp65的表达(SABC法, 200 \times). A: 直结肠腺癌间质血管内皮细胞核表达; B: 结直肠腺癌间质血管内皮细胞核表达; C: 正常大肠组织表达. 箭头所指为NF- κ Bp65核表达阳性的血管内皮细胞.

■相关报道

Hardwick *et al* 研究显示, 瘦素受体在结肠癌细胞系及结肠组织中均有表达, 瘦素刺激可致 p42/44MAPK 磷酸化, 在体内体外均表现为促进增生作用, 表明瘦素是人结肠上皮细胞的生长因子. 在动物实验中, Suganami *et al* 研究证明瘦素可上调 VEGF 的表达, 并刺激视网膜血管生成. 王友彬 *et al* 实验显示, 瘦素可促进移植鼠颗粒脂肪组织血管增生从而对移植脂肪组织起促成活作用. Rouet-Benzineb *et al* 在瘦素抗凋亡的体外细胞实验中观察到瘦素处理后 NF- κ B 的活化明显增加. Patel *et al* 研究报道用同源基因 GAX 抑制血管内皮细胞的 NF- κ B 激活后, 血管生成也被抑制了.

组标本(19/35, 54.3%, 图1E)中也可见着色, 阳性细胞较少, 散在分布于间质. 染色积分光密度在癌症组与正常对照组间的差异有统计学意义(表1). NF- κ Bp65在癌症组中(35/35, 100%)广泛表达于腺瘤腺体和间质, 呈棕黄色定位于细胞质和细胞核中. 腺体细胞染色多位于细胞质中, 较浅且均匀; 而间质细胞特别是血管内皮细胞(24/35, 68.6%)则可见明显细胞核染色(图2A), 棕黄色浓集于细胞核. 部分腺瘤组标本(19/24, 79.2%)有阳性表达, 少数可见血管内皮细胞核阳性染色(图2B). 正常对照组中也有部分呈阳性表达(26/35, 74.3%, 图2C), 但染色浅, 均匀分布于细胞质中. 癌症组与正常对照组相比, 染色积分光密度的差异有显著性(表1).

表1 Ob-R, NF- κ B(p65)的积分光密度及MVD值在三组中差异的比较(mean \pm SD)

分组	n	Ob-R	NF- κ Bp65	MVD
癌症	35	27.41 \pm 2.21 ^a	45.88 \pm 5.46 ^a	23.63 \pm 2.08 ^{ac}
腺瘤	24	24.99 \pm 2.47	40.17 \pm 5.78	10.83 \pm 1.25 ^a
正常对照	35	20.45 \pm 1.63	29.11 \pm 3.89	1.97 \pm 0.37 ^c

^a $P < 0.05$ vs 正常对照; ^c $P < 0.05$ vs 腺瘤.

2.2 CD105和MVD的检测 癌症组和腺瘤组标本的CD105染色石蜡切片中, 可见众多微血管内皮细胞的胞膜和胞质呈阳性着色. 阳性反应的微血管分布不均匀, 多局限于肿瘤实质边缘的间质, 即新生血管生成区域. 其管腔多不规则, 壁

■创新盘点

以前对结直肠腺癌的研究往往着眼于肿瘤实质、腺上皮细胞的状态,而忽视了实质周围的间质细胞和内环境变化。对瘦素的研究也着重于全身血清瘦素水平的变化与摄食营养、肿瘤的关系,忽视了受全身因素影响较小的局部组织中的瘦素受体的变化,而瘦素必须与其受体结合后才能发挥效应。本实验中发现瘦素受体在结直肠腺癌间质血管内皮细胞和其他间质细胞上表达,具有促血管生成作用,并对其机制进行了初步探讨。

■应用要点

本实验结果表明结直肠腺癌组织中Ob-R表达增多对肿瘤血管生成起促进作用,并且该作用可能是通过NF- κ B途径来实现的。Ob-R和NF- κ B可能为抗肿瘤血管生成治疗提供了新的靶点。

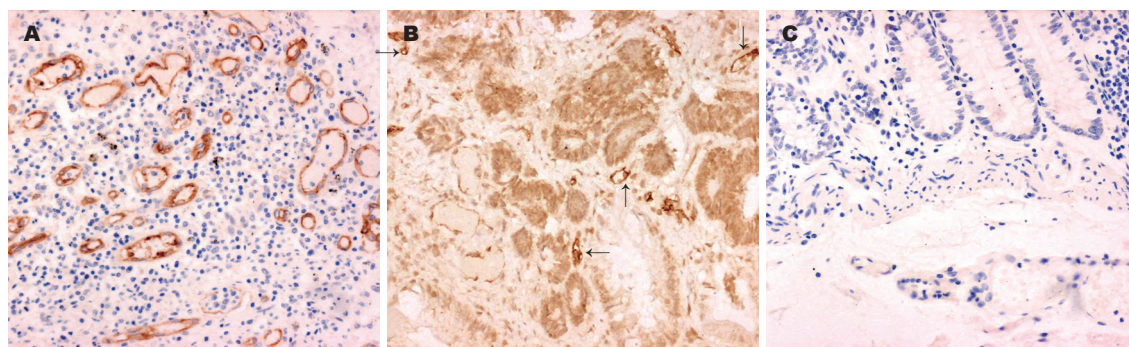


图3 MVD的检测(SABC法, 200 \times)。A: 结直肠腺癌组织; B: 结直肠腺瘤组织; C: 正常大肠组织。箭头所指为CD105标记的新生微血管。

薄且无平滑肌组织出现(图3A-B)。切片中可见陷于癌组织中的正常血管,管腔较大,管壁可见数层平滑肌细胞,这些血管的内皮细胞不与CD105抗体发生反应或仅有微弱的反应,着色强度明显低于新生血管内皮细胞。正常对照组织的血管内皮呈阴性或微弱阳性表达(图3C),三组所测的微血管密度(MVD)两两间均有显著性差异(表1)。

2.3 Ob-R, NF- κ Bp65, MVD间的相关性 35例癌症组织中Ob-R和NF- κ Bp65的染色积分光密度,二者呈正相关($r = 0.577, P < 0.05$); Ob-R的染色积分光密度与MVD值呈正相关($r = 0.673, P < 0.05$); NF- κ Bp65的染色积分光密度与MVD值也呈正相关($r = 0.396, P < 0.05$)。在Ob-R阳性的癌症组标本中,血管内皮细胞染色阳性者(21/33, 63.6%)其MVD较阴性者高(38.21 ± 2.78 vs $27.50 \pm 2.95, P < 0.05$); NF- κ Bp65血管内皮细胞核染色者(24/35, 68.6%)其MVD较未核染色者高(37.53 ± 3.07 vs $28.42 \pm 2.63, P < 0.05$)(表2)。

2.4 癌症组Ob-R, NF- κ Bp65的表达和MVD与临床病理因素的关系 Ob-R, NF- κ Bp65的表达在结直肠腺癌高、中、低分化组间,及Dukes分期间的差异无显著性。MVD在高、中、低分化组间呈递增改变;淋巴结转移及远处转移组(C+D期)的MVD大于非淋巴结转移组(A+B期),差异有统计学意义($P < 0.05$, 表3)。

3 讨论

瘦素是新发现的一种脂源性激素,研究发现瘦素具有广泛的生物学功能,在与其受体(Ob-R)结合后产生多种效应。瘦素与肿瘤的研究显示,瘦素可促进多种肿瘤细胞增殖、抗凋亡、增强侵袭力。但肿瘤的生长和转移不仅需要肿瘤细胞增殖,而且与肿瘤内新生血管形成关系密切。新

表2 Ob-R, NF- κ B(p65)血管内皮细胞不同染色组间的MVD的变化的比较(mean \pm SD)

血管内皮细胞染色情况	<i>n</i>	MVD
Ob-R (+)	21	38.21 ± 2.78^a
Ob-R (-)	12	27.50 ± 2.95
NF- κ B(p65) (+)	24	37.53 ± 3.07^c
NF- κ B(p65) (-)	11	28.42 ± 2.63

^a $t = 2.602, ^aP < 0.05$; ^c $t = 2.146, ^cP < 0.05$ 。

生血管不仅为肿瘤生长提供必需的养料并转运其代谢产物,而且为肿瘤细胞进入循环系统提供了通道,还能通过内皮细胞分泌的生长因子来促使肿瘤细胞增殖。体外实验发现,瘦素可剂量依赖性地促进血管内皮细胞增生、聚集并逐渐形成管状^[5]。动物实验也显示,瘦素具有促进血管增生的作用^[6]。但瘦素在肿瘤血管生成中的作用机制的研究报道尚少。本实验结果显示,癌症组MVD高于腺瘤组,腺瘤组MVD高于正常对照组,说明结直肠组织癌变过程中确实存在血管生成的增加。Ob-R主要在组织间质表达,癌症组明显强于正常对照组,此结果与国外报道一致^[7],并且在Ob-R与肝细胞癌的研究中也有相似的结果^[8]。本实验中还发现癌症组Ob-R的染色积分光密度与MVD值呈正相关,并且Ob-R血管内皮染色阳性者其MVD较阴性者高。说明结直肠腺癌组织血管内皮细胞和其他间质细胞上表达的Ob-R,在促进肿瘤组织血管生成方面可能有其作用。此结论与体外实验结果一致。

NF- κ B通常由p50和p65亚基组成,静息时,通过与抑制蛋白I κ B结合形成无活性的三聚体存留于胞质。在受到刺激而激活后,I κ B解离,NF- κ B进入细胞核,作用于靶基因,迅速诱导靶基因表达。其作为一个多向性转录调节因子,可

表 3 癌症组Ob-R, NF- κ B(p65)的表达和MVD与临床病理因素的关系(mean \pm SD)

病理因素	n	Ob-R	NF- κ B(p65)	MVD值
肿瘤分化程度				
高分化	10	28.48 \pm 5.14	39.65 \pm 8.02	12.90 \pm 2.83 ^a
中分化	12	27.34 \pm 3.68	44.55 \pm 8.40	22.58 \pm 1.99 ^a
低分化	13	26.65 \pm 3.25	51.91 \pm 11.19	32.85 \pm 3.25
Dukes分期				
A+B(无淋巴结转移)	14	28.21 \pm 3.70	43.72 \pm 6.37	18.21 \pm 2.12 ^a
C+D(淋巴结转移、远处转移)	21	26.88 \pm 2.81	47.32 \pm 8.17	27.24 \pm 2.95

^aP<0.05.

调控多种生长因子、黏附分子、细胞因子的表达。本实验结果中可见, NF- κ Bp65在结直肠腺癌和腺瘤组织的间质细胞特别是血管内皮细胞的细胞核表达, 代表了NF- κ B处于激活状态。且NF- κ B在血管内皮细胞核染者的MVD较未核染者高, 说明激活的NF- κ B在肿瘤组织血管生成中起了一定的作用。同时我们可以观察到Ob-R与NF- κ B的表达部位相一致, 半定量分析也显示二者呈正相关, 提示瘦素与Ob-R结合后促使NF- κ B表达和激活。这与体外细胞实验中瘦素处理后NF- κ B活化增加的结果一致^[9]。我们观察到Ob-R和NF- κ Bp65的表达在正常对照组、腺瘤组、癌症组中呈递增趋势, 但腺瘤组与其他两组间的差异无显著性。除MVD外, 亦未发现Ob-R, NF- κ Bp65与结直肠腺癌分化程度、Dukes分期等临床病理因素之间有相关性。这可能与本实验样本例数较少, 以及肿瘤血管生成的机制复杂, 而Ob-R, NF- κ Bp65的促血管生成作用仅为其中的一部分作用等原因有关, 尚待扩大样本, 增加观察指标进行进一步研究。肿瘤血管生成包括血管内皮细胞的迁移、黏附、增殖以及管状结构形成等一系列复杂过程。研究表明, NF- κ B促进基质金属蛋白酶MMP2, MMP9表达^[10], 从而加速血管下基底膜的降解, 有利于内皮细胞的迁移。NF- κ B还可增强细胞周期蛋白D的表达, 促进血管内皮细胞增殖^[11]。此外, 已证明在VEGF, IL-1 α , IL-8, TNF- α , VCAM-1等多种促血管生成因子的基因中含有NF- κ B的特异性结合位点, 其表达受NF- κ B的调控。并且还有研究报道用同源基因GAX抑制血管内皮细胞的NF- κ B激活后, 血管生成也被抑制了^[12]。可见, NF- κ B可通过多个环节促进肿瘤血管生成。本实验结果也显示, 癌症组NF- κ B的染色积分光密度与MVD值呈正相关。我们推测, 瘦素与表达在结直肠腺癌组织

间质血管内皮细胞和其他间质细胞上的Ob-R结合后, 可能通过激活NF- κ B, 直接或间接地促进肿瘤血管生成。

总之, 结直肠腺癌组织中Ob-R表达增多对肿瘤血管生成起促进作用, 并且该作用可能是通过NF- κ B途径来实现的。Ob-R和NF- κ B可能为抗肿瘤血管生成治疗提供了新的靶点。

4 参考文献

- 1 Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003; 348: 1625-1638
- 2 Frezza EE, Wachtel MS, Chiriva-Internati M. Influence of obesity on the risk of developing colon cancer. *Gut* 2006; 55: 285-291
- 3 李大林, 李杨, 林惠忠, 兰巧玲. CD105在结直肠癌中的表达及其临床意义. *中华胃肠外科杂志* 2004; 7: 144-147
- 4 Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324: 1-8
- 5 Sierra-Honigsmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papadopoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ, Flores-Riveros JR. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 1998; 281: 1683-1686
- 6 Suganami E, Takagi H, Ohashi H, Suzuma K, Suzuma I, Oh H, Watanabe D, Ojima T, Suganami T, Fujio Y, Nakao K, Ogawa Y, Yoshimura N. Leptin stimulates ischemia-induced retinal neovascularization: possible role of vascular endothelial growth factor expressed in retinal endothelial cells. *Diabetes* 2004; 53: 2443-2448
- 7 Hardwick JC, Van Den Brink GR, Offerhaus GJ, Van Deventer SJ, Peppelenbosch MP. Leptin is a growth factor for colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 2001; 121: 79-90
- 8 Wang SN, Chuang SC, Yeh YT, Yang SF, Chai CY, Chen WT, Kuo KK, Chen JS, Lee KT. Potential prognostic value of leptin receptor (Ob-R) in hepatocellular carcinoma. *J Clin Pathol* 2006
- 9 Rouet-Benzineb P, Aparicio T, Guilmeau S, Pouzet C, Descatoire V, Buyse M, Bado A. Leptin counteracts sodium butyrate-induced apoptosis

■名词解释

1 瘦素(leptin): 肥胖基因(Ob基因)的编码产物, 是由白色脂肪组织分泌的蛋白质类激素。胃主细胞、壁细胞及胃底的内分泌细胞中也存在瘦素, 其受体遍及脑和全身各处组织, 也是一种脑肠肽类激素。瘦素及其受体的结构与细胞因子具有同源性, 其细胞信号转导通路与细胞因子也有惊人的相似性。瘦素与其受体结合后具有广泛的生物学效应。

2 NF- κ B: 即核转录因子- κ B, 静息时存留于胞质, 受到刺激而激活后, 进入细胞核, 作用于靶基因, 迅速诱导靶基因表达。其作为一个多向性转录调节因子, 可调控多种生长因子、黏附分子、细胞因子的表达。是一条重要的细胞内信号转导途径。

■同行评价

本实验就一直在能量平衡和摄食行为系统中研究的脑肠肽瘦素受体与大肠癌的关系进行了研究,立题新颖,并且得出初步结果:该受体可能与大肠癌的血管生成有一定关系。课题设计合理,数据详实,对大肠癌生物学特征的阐明有一定理论意义。

- in human colon cancer HT-29 cells via NF-kappaB signaling. *J Biol Chem* 2004; 279: 16495-16502
- 10 Kim H, Koh G. Lipopolysaccharide activates matrix metalloproteinase-2 in endothelial cells through an NF-kappaB-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 269: 401-405
- 11 Joyce D, Albanese C, Steer J, Fu M, Bouzazhah B, Pestell RG. NF-kappaB and cell-cycle regulation: the cyclin connection. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001; 12: 73-90
- 12 Patel S, Leal AD, Gorski DH. The homeobox gene Gax inhibits angiogenesis through inhibition of nuclear factor-kappaB-dependent endothelial cell gene expression. *Cancer Res* 2005; 65: 1414-1424

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 •

2007 中华肝胆胰脾外科(国际)学术论坛征文通知

本刊讯 “2007中华肝胆胰脾外科(国际)论坛”应澳门特区外科学会的盛情邀请于2007-04-13/16在澳门举办,现将征文通知公布如下:

1 征文内容

(1)肝癌诊断及外科与综合治疗:新诊断技术-可切除与否的界定-综合治疗与序贯化思路-对复发转移的研究进展-微创技术实际应用的可能性;(2)医源性胆管损伤的预防-胆管下端功能状态对修复及重建的影响-肝胆管结石外科治疗的新经验-肝门胆管癌根治性切除的实施与效果;(3)胰腺炎-重症急性、出血坏死性、“凶险性”-治疗中早期复苏的策略与实施-相关并发症的预防和处理;(4)胰腺癌-早期诊断的思路与进展-根治术在当前的含义和尺度-术前减黄与并发症的处理;(5)脾功能研究进展-保脾和切脾含义和抉择-PH时单纯切脾的指征与价值;(6)肝移植-应用指征的决策-供肝切取与保存-技术性与非技术性并发症-再移植-远期存活的努力。

2 投稿要求及截稿日期

来稿请寄未曾公开发表过4000字以内全文及800字论文摘要各1份(无摘要不入汇编)并在信封上注明“会议征文”。截稿日期:2007-01-31。正式代表发论文证书并授一级继续教育学分。来稿请寄:《中华肝胆外科杂志》编辑部。

3 联系方式

地址:北京市复兴路28号;邮编:100853;电话:010-66936223;电传:010-68177009;E-mail:zhgdwkzz@vip.163.com;详情请登陆网站:www.zhgdwkzz.net.

大肠癌免疫组化表达与临床病理的关系

顾国利, 任力, 黄蓉蓉, 魏学明, 李德昌, 戴大江, 王石林

顾国利, 黄蓉蓉, 魏学明, 戴大江, 王石林, 中国人民解放军空军总医院普通外科 北京市 100036
任力, 李德昌, 中国人民解放军空军总医院病理科 北京市 100036
顾国利, 2004年中国医科大学硕士, 主治医师, 讲师, 主要从事普外科临床肿瘤学的研究。
通讯作者: 王石林, 100036, 北京市, 中国人民解放军空军总医院普通外科. wangshilin@medmail.com.cn
电话: 010-68410099-6302
收稿日期: 2006-08-19 接受日期: 2006-09-12

Immunohistochemical expression of carcinoembryonic antigen, P53, nm23, Ki-67, multidrug resistance-associated protein and their correlations with the clinicopathology in colorectal carcinoma

Guo-Li Gu, Li Ren, Rong-Rong Huang, Xue-Ming Wei, De-Chang Li, Da-Jiang Dai, Shi-Lin Wang

Guo-Li Gu, Rong-Rong Huang, Xue-Ming Wei, Da-Jiang Dai, Shi-Lin Wang, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA Air force, Beijing 100036, China
Li Ren, De-Chang Li, Department of pathology, General Hospital of Air force PLA, 100036 Beijing, China
Correspondence to: Shi-Lin Wang, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA Air Force, Beijing 100036, China. wangshilin@medmail.com.cn
Received: 2006-08-19 Accepted: 2006-09-12

Abstract

AIM: To investigate the mechanism of cyclooxygenase-2 (COX-2), basic fibroblast growth factor (bFGF) in the carcinogenesis of colorectal carcinoma and adenoma.

METHODS: The expression of CEA, P53, nm23, Ki-67 and MRP protein were detected by SP immunohistochemistry in colorectal carcinoma ($n = 73$) admitted from January 2003 to July 2006, and their clinical data and follow-up documents were analyzed retrospectively.

RESULTS: The positive rates of CEA, P53, nm23, Ki-67 and MRP protein expression in colorectal cancer were 82.2%, 68.5%, 75.3%,

84.9% and 64.4%, respectively. CEA and MRP expression had no correlations with the patients' ages, sex, tumor size or location and differentiation types of tumor, depth of invasion and lymph node metastasis, while P53, Ki-67 and nm23 expression were significantly correlated with the depth of invasion and lymph node metastasis. The positive rates of P53 and Ki-67 expression was significantly higher in Dukes C, D stages than those in Dukes A, B stages (82.8% vs 59.1%, $P < 0.05$; 100% vs 75.0%, $P < 0.05$), while the positive rate of nm23 expression was markedly lower (58.6% vs 86.4%, $P < 0.05$). The expression of CEA had a negative correlations with that of nm23 ($r = -0.296$, $P = 0.011$) in colorectal carcinoma. However, the expression of P53 had a positive correlations with that of Ki-67 ($r = 0.308$, $P = 0.008$). P53, Ki-67 and nm23 expression were significantly related to the prognosis. The positive rate of nm23 expression was notably higher in patients survived over or equal to 3 years than that in ones survived less than 3 years (92.9% vs 71.2%, $P < 0.05$), but the positive rates of P53 and Ki-67 expression were just in the opposite situation (42.9% vs 74.6%, $P < 0.05$; 64.3% vs 89.8%, $P < 0.05$).

CONCLUSION: P53, Ki-67 and nm23 were significantly correlated with the invasion, metastasis and prognosis of colorectal carcinoma. CEA may be a stimulative factor in the invasion and metastasis of colorectal cancer and MRP-induced drug resistance may be relatively independent. CEA, P53, nm23 and Ki-67 can serve as effective markers in reflecting the invasion, metastasis and prognosis of colorectal carcinoma.

Key Words: Colorectal cancer; Carcinoembryonic antigen; P53; nm23; Ki-67; multidrug resistance-associated protein; Histopathology; Immunohistochemistry

Gu GL, Ren L, Huang RR, Wei XM, Li DC, Dai DJ, Wang SL. Immunohistochemical expression of carcinoembryonic antigen, P53, nm23, Ki-67, multidrug resistance-associated protein and their correlations with the clinicopathology in colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(28):2765-2770

■背景资料

大肠癌是我国的常见消化道恶性肿瘤, 目前文献中大肠癌组织中CEA、P53、nm23、Ki-67及MRP相互作用关系的报道少见, 大肠癌中nm23蛋白表达的意义仍有争论。

■创新盘点

本文通过对所经治大肠癌病例的临床病理资料总结和免疫组化染色,配合国内外文献的学习,希望归纳出大肠癌免疫组化表达的特点及其与临床病理之间的关系,对提高临床医生在一线工作中提高对大肠癌免疫组化表达意义的认识,制订更合理的治疗方案以提高大肠癌综合治疗的疗效有一定参考价值。

摘要

目的: 探讨大肠癌CEA、P53、nm23、Ki-67、MRP免疫组化表达特点和相互关系,及其与临床病理的关系。

方法: 回顾性分析2003-01/2006-07我院收治的73例大肠癌患者的临床病理及随访资料,并对其石蜡标本采用免疫组化SP染色法检测CEA、P53、nm23、Ki-67、MRP,分析其免疫组化特点及其与临床病理之间的关系。

结果: CEA、P53、nm23、Ki-67、MRP在大肠癌中的阳性表达率依次为82.2%、68.5%、75.3%、84.9%和64.4%。CEA、MRP与大肠癌患者的各因素无统计学差异。P53、Ki-67和nm23与肿瘤的Dukes分期和淋巴结转移有关, P53、Ki-67在Dukes C、D期的阳性表达率(依次为82.8%和100%)明显高于Dukes A、B期者(59.1%和75.0%)($P < 0.05$), 而nm23在Dukes C、D期的阳性表达率(58.6%)明显低于Dukes A、B期者(86.4%)($P < 0.05$)。CEA与nm23的表达呈明显的负相关($r = -0.296$, $P = 0.011$), 而P53和Ki-67表达之间呈现明显的正相关($r = 0.308$, $P = 0.008$), 其他各指标间的表达无相关性。nm23、P53和Ki-67与预后因素关系明显, nm23在生存期 ≥ 3 a患者的阳性表达率(92.9%)高于生存期 < 3 a者(71.2%)($P < 0.05$), 而P53和Ki-67在生存期 ≥ 3 a患者的阳性表达率(依次为42.9%和64.3%)明显低于生存期 < 3 a者(74.6%和89.8%)($P < 0.05$)。

结论: P53、Ki-67和nm23的表达与大肠癌的侵袭转移和预后密切相关。CEA可能是大肠癌的侵袭转移的促进因素。MRP所引起的耐药机制是一个相对独立的机制。CEA、P53、nm23、Ki-67可作为判断大肠癌恶性程度、侵袭转移以及预后的指标。

关键词: 大肠癌; 癌胚抗原; P53; 转移抑制基因; 细胞增殖相关核抗原; 多药耐药相关蛋白; 病理; 免疫组化

顾国利, 任力, 黄蓉蓉, 魏学明, 李德昌, 戴大江, 王石林. 大肠癌免疫组化表达与临床病理的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(28):2765-2770
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2765.asp>

0 引言

大肠癌是常见消化道恶性肿瘤,其发病率占我国消化道癌的第2位;随着我国人口老龄化、生活习惯、饮食结构以及环境的改变,大肠癌

的发病率呈上升趋势^[1-2]。影响大肠癌预后的主要因素是肿瘤的生长分化和侵袭转移^[3-4]。其过程十分复杂,诸多因素参与和调控大肠癌上述生物学行为;其中最引人注意的是多种(抑)癌基因^[3-5]。但这些(抑)癌基因表达产物与大肠癌临床病理的关系、各(抑)癌基因阳性表达之间的相互关系目前尚不十分明了。我们采用免疫组化SP染色法检测癌胚抗原(CEA)、P53蛋白、转移抑制基因nm23、细胞增殖相关核抗原Ki-67和多药耐药相关蛋白(MRP)在大肠癌中的表达,以探讨他们的表达特点和相互关系,及其与大肠癌临床病理等生物学行为之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 选取2003-01/2006-07收治的、临床及随访资料完整的大肠癌患者73例。男37例,女36例。年龄18-88岁,中位年龄 59.5 ± 12.9 岁;其中 ≥ 50 岁者57例(占78.1%)。病灶部位:右半结肠23例(31.5%)、左半结肠17例(23.3%)、直肠33例(45.2%)。肿瘤直径3-18 cm(平均 6.3 ± 2.8 cm),其中 < 5 cm 18例,5-9 cm 45例, ≥ 10 cm 10例。病理分型:高分化腺癌5例(6.8%),中分化腺癌54例(74.0%),低分化腺癌10例(13.7%),黏液腺癌4例(5.5%)。Dukes分期: A期7例(9.6%), B期37例(50.7%), C期26例(35.6%), D期3例(4.1%)。本组均行根治性手术治疗,无手术死亡,术后均行化疗,部分直肠癌患者行局部放疗。全部患者采用门诊复查、电话及信访等方式随访,时间1 mo-42 mo。1例术后1 a复发再次手术切除,3例死于其他疾病,5例死于腹腔复发和肝肺转移,其余健在。73例患者中完成1 a随访52例(71.2%),完成3 a随访14例(19.2%)。试剂一抗均为鼠抗人mAb,以上抗体、试剂盒及显色液购自福州迈新生物技术开发有限公司。设备由空军总医院病理科提供。

1.2 方法 回顾性分析73例大肠癌患者的临床病理及随访资料。选取上述病例的大肠癌肿瘤组织标本经40 g/L甲醛固定,石蜡包埋,Leica RM2135切片机切片(厚度4 μ m),采用免疫组化SP法,以LAB vision Autostainer 360自动染色仪系统按说明书操作。切片脱蜡至水,30 mL/L H_2O_2 孵育10 min,蒸馏水冲洗, PBS浸泡5 min, P53、nm23、Ki-67、MRP组以pH 9.0的EDTA缓冲液微波修复5 min, CEA组不需修复。滴加正常兔血清工作液,孵育10 min后倾去,不洗;滴加一抗

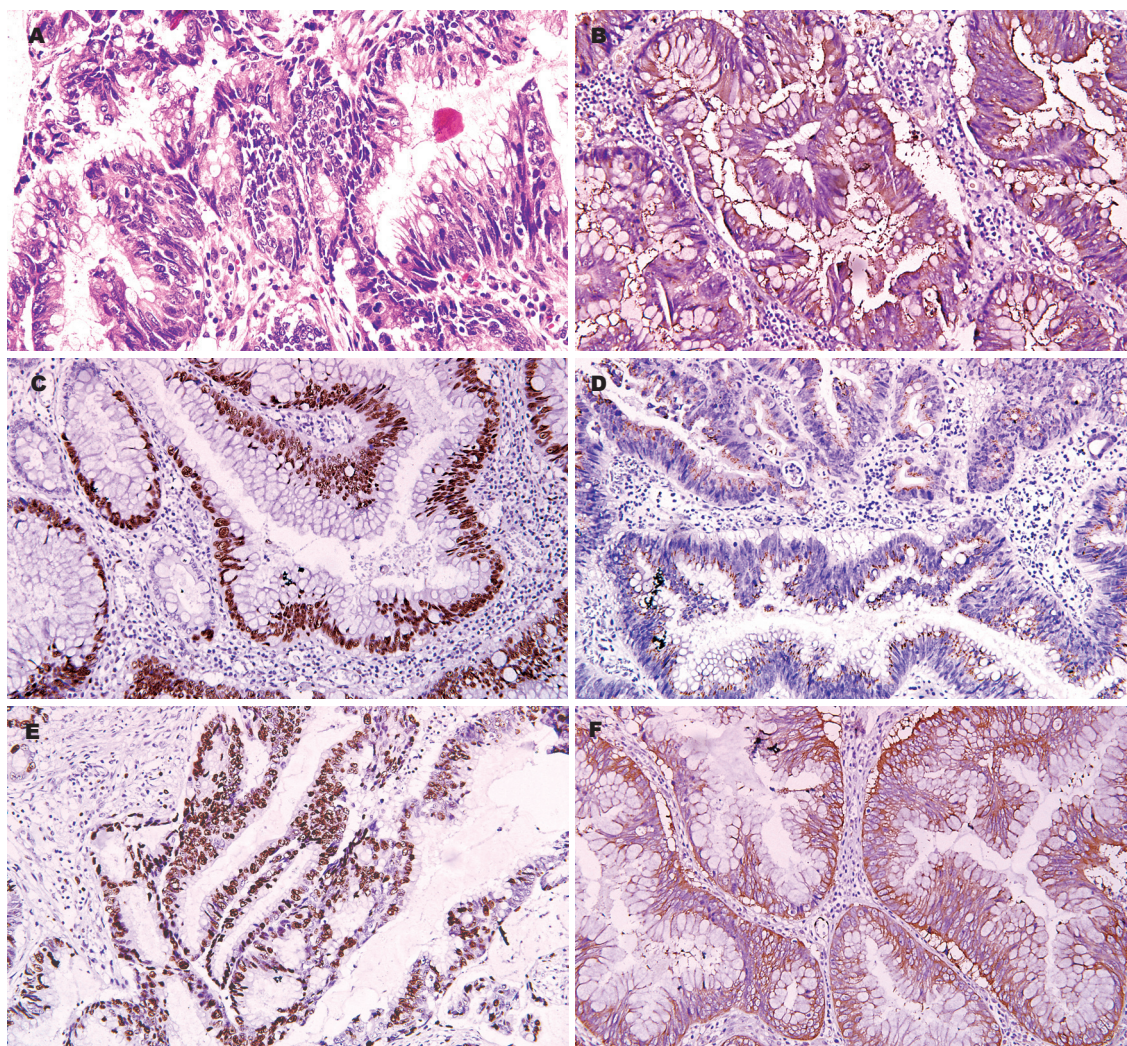


图1 大肠癌形态学和免疫组化结果. A: 大肠中分化腺癌(HE×400); B: CEA阳性(SP×200); C: P53阳性(SP×200); D: nm23阳性(SP×200); E: Ki-67阳性(SP×200); F: MRP阳性(SP×200).

■应用要点

本文提示P53、Ki-67和nm23的表达与大肠癌的侵袭转移和预后密切相关; CEA可能是大肠癌的侵袭转移的促进因素; MRP所引起的耐药机制是一个相对独立的机制. CEA, P53, nm23, Ki-67可作为判断大肠癌恶性程度、侵袭转移以及预后的指标, 分析他们的表达情况可为临床选择更合理的治疗方案提供可靠的依据.

37℃孵育2 h, PBS冲洗3 min×3次. 滴加二抗, 孵育15 min, PBS冲洗3 min×3次. 滴加三抗, 孵育15 min, PBS冲洗3 min×3次, DAB显色, 苏木素复染, 脱水, 透明, 封片. PBS代替一抗作阴性对照, 已知阳性切片作阳性对照. CEA定位于细胞质和细胞膜, P53和Ki-67定位于细胞核, nm23和MRP定位于细胞质, 用Olympus Dp70图像采集分析仪依据染色强度和阳性细胞率来计算评分. 染色强度: 0为无染色; 1为染色弱; 2为中等染色强度; 3为染色强. 阳性细胞率: 0为<1%, 1为<10%, 2为<50%, 3为<80%, 4为≥80%. 以染色强度与阳性细胞率之和计算评分, 0-2分为阴性(-), 3-5分为阳性(+), 6-7分为强阳性(++). 评分过程由两名病理科高年资医生独立完成.

统计学处理 应用SPSS 13.0统计软件统计分析. 数据用mean±SD表示, 计数资料采用多个样本率(或构成比)的比较(即: R×C表的 χ^2 检验), 免疫组化表达积分采用Spearman等级相关分析,

检验水准 $P<0.05$.

2 结果

2.1 CEA、P53、nm23、Ki-67、MRP在大肠癌中的表达特征 全部病例的肿瘤组织均经HE染色, 光镜下确诊(图1A). CEA阳性表达于细胞膜/细胞质(图1B), 呈棕色, 形成条状或环状, 弥漫性分布; 阳性60例(82.2%). P53阳性表达于细胞核(图1C), 呈棕褐色, 形成条状, 弥漫性分布; 阳性50例(68.5%). nm23阳性定位于细胞质(图1D), 呈棕褐色, 形成条状或环状, 弥漫性分布; 阳性55例(75.3%). Ki-67阳性表达于细胞核(图1E), 呈棕褐色, 形成条状或环状, 局灶性分布; 阳性62例(84.9%). MRP阳性表达于细胞质(图1F), 呈棕色, 弥漫性分布, 形成环状或条状; 阳性47例(64.4%).

2.2 CEA、P53、nm23、Ki-67、MRP表达与大肠癌临床病理参数之间的关系(表1) 本组显示CEA、MRP与大肠癌病人的性别、年龄、肿瘤大小、肿

■名词解释

CEA是大肠癌分泌的一组酸性糖蛋白,广泛存在于各种上皮性肿瘤,尤其是各种腺癌。一般认为,大肠癌分化程度越低,CEA阳性表达率越高。*p*53基因是细胞凋亡的重要调控基因,突变型*p*53因缺乏对细胞增殖的负调控作用,可促进细胞转化和增生,导致肿瘤的发生。细胞增殖相关核抗原Ki-67在多种肿瘤及癌前病变中均有异常表达,且与肿瘤的种植、浸润、转移潜能密切相关。肿瘤转移抑制基因nm23在胃肠道癌中的作用尚有争论。MRP属于ABC转运蛋白超家族成员的一种糖蛋白,在人类正常组织及肿瘤中广泛存在,是引起多药耐药的因素之一。

表 1 CEA、P53、nm23、Ki-67、MRP表达于大肠癌临床病理参数之间的关系

因素	CEA表达			P53表达			nm23表达			Ki-67表达			MRP表达		
	(-)	(+)	(++)	(-)	(+)	(++)	(-)	(+)	(++)	(-)	(+)	(++)	(-)	(+)	(++)
性别: 男	5	21	11	12	10	15	10	21	6	4	19	14	16	21	0
女	8	18	10	11	6	19	8	26	2	7	17	12	10	25	1
年龄: <45	0	6	3	4	2	3	4	4	1	0	7	2	1	8	0
45-60	5	13	8	8	5	13	3	20	3	6	12	8	8	17	1
>60	8	20	10	11	9	18	11	23	4	5	17	16	17	21	0
肿瘤大小: ≤5 cm	8	15	12	9	6	20	7	25	3	6	17	12	12	22	1
>5 cm	5	24	9	14	10	14	11	22	5	5	19	14	14	24	0
肿瘤部位: 右半结肠	2	16	5	9	7	7	6	15	2	3	12	8	6	16	1
左半结肠	6	6	5	7	4	6	5	10	2	3	8	6	8	9	0
直肠	5	17	11	7	5	21	7	22	4	5	16	12	12	21	0
分化: 高、中分化	13	28	18	16	12	31	13	39	7	10	28	21	21	37	1
低分化、黏液	0	11	3	7	4	3	5	8	1	1	8	5	5	9	0
Dukes分期: A、B	10	22	12	18	11	15	6	32 ^a	6	11	17	16	17	26	1
C、D	3	17	9	5	5	19 ^a	12	15	2	0	19 ^b	10	9	20	0
生存期: <3 a	9	31	19	15	16	28 ^a	18	38	3	6	27	26 ^b	19	39	1
≥3 a	4	8	2	8	0	6	0	9	5 ^b	5	9	0	7	7	0

^a*P*<0.05; ^b*P*<0.01.

表 2 大肠癌中CEA、P53、nm23、Ki-67、MRP表达的相关性

		CEA			P53			nm23			Ki-67		
		(++)	(+)	(-)	(++)	(+)	(-)	(++)	(+)	(-)	(++)	(+)	(-)
P53	(++)	11	15	8									
	(+)	6	8	2									
	(-)	4	16	3									
nm23	(++)	1	2	5	4	1	3						
	(+)	9	31	7	23	12	12						
	(-)	11	6	1	7	3	8						
Ki-67	(++)	8	13	5	16	7	3	1	18	7			
	(+)	11	20	5	13	9	14	5	21	10			
	(-)	2	6	3	5	0	6	2	8	1			
MRP	(++)	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
	(+)	15	23	8	24	10	12	5	33	8	16	24	6
	(-)	6	15	5	10	6	10	3	13	10	10	11	5

瘤部位、分化类型、Dukes分期等因素均无明显相关性(*P*>0.05)。P53、Ki-67和nm23与肿瘤的Dukes分期和淋巴结转移有关,而与其他因素无关。P53、Ki-67在Dukes C、D期的阳性表达率(依次为82.8%和100%)明显高于Dukes A、B期者(59.1%和75.0%)(*P*<0.05)。而nm23在Dukes C、D期的阳性表达率(58.6%)明显低于Dukes A、B期者(86.4%)(*P*<0.05)。

2.3 大肠癌中CEA、P53、nm23、Ki-67、MRP表达的相关性(表2) 本组显示大肠癌中CEA与nm23的表达呈明显的负相关($r = -0.296$, $P = 0.011$),而P53和Ki-67表达之间呈现明显的正相关($r = 0.308$, $P = 0.008$),其他各指标间的表达无相关性。

2.4 CEA、P53、nm23、Ki-67、MRP表达与大肠癌预后的关系(表1) CEA和MRP虽与大肠癌

预后无统计学差异,但其在生存期≥3 a患者的阳性表达率(依次为71.4%、50.0%)明显低于生存期<3 a者(84.7%、67.8%)。nm23、P53和Ki-67与预后因素关系明显,nm23在生存期≥3 a患者的阳性表达率(92.9%)高于生存期<3 a者(71.2%)(*P*<0.05)。而P53和Ki-67在生存期≥3 a患者的阳性表达率(依次为42.9%和64.3%)明显低于生存期<3 a者(74.6%和89.8%)(*P*<0.05)。

3 讨论

大肠癌是常见的消化道恶性肿瘤,随着我国人口老龄化、生活习惯、饮食结构以及环境的改变,其发病率呈上升趋势^[1-2]。影响大肠癌预后的主要因素就是大肠癌的生长分化和侵袭转移^[3-4]。上述过程极其复杂,多种(抑)癌基因和细胞因子参与其中^[3-5]。其中与大肠癌关系较密切的有

CEA、P53、nm23、Ki-67、MRP^[6-10].

CEA是大肠癌分泌的一组酸性糖蛋白. 研究发现^[6,11-12]: CEA广泛存在于各种上皮性肿瘤(尤其是腺癌). 一般认为, 大肠癌分化程度越低, CEA阳性表达率越高. 本组显示: CEA在不同分化类型之间无统计学差异, 但其在分化较差的低分化腺癌和黏液腺癌中的阳性表达率(100%)明显高于分化较高的高中分化腺癌(78.0%). 且其与转移抑制基因nm23的表达呈明显负相关, 而本组显示: nm23表达与大肠癌的Dukes分期和淋巴结转移呈负相关, 与预后呈正相关. 这说明CEA在大肠癌侵袭转移过程中是一个促进因素.

p53基因是细胞凋亡的重要调控基因^[7,13-15], 分为野生型和突变型两种; 前者参与细胞周期的调控, 对细胞的分裂和增殖起负调控作用, 是肿瘤抑制基因; 而后者因缺乏对细胞增殖的负调控作用, 可促进细胞转化和增生, 导致肿瘤的发生. 因此, 突变型p53是致癌基因. 由于野生型P53蛋白产物半衰期短, 含量低, 免疫组化法无法检出, 临床上仅可检出存积而稳定的突变型P53蛋白^[15-17]. Ki-67作为敏感的细胞增殖相关核抗原, 在多种肿瘤及癌前病变中均有异常表达, 其与肿瘤的种植、浸润、转移潜能密切相关. 研究显示^[9,18-20]: Ki-67可作为评估细胞的增殖能力、判断肿瘤增殖状况、良恶性鉴别等方面的重要指标. 本组P53和Ki-67在大肠癌组织中表达与肿瘤的Dukes分期及淋巴结转移均明显相关, 且P53和Ki-67两者的表达呈正相关. 这提示p53和Ki-67基因突变在大肠癌发生发展及转移过程中起着非常重要的作用. 临床上可将他们作为判断大肠癌恶性程度、侵袭、预后的重要指标, 并为临床选择更合理的治疗方案提供可靠的依据.

nm23基因是目前最引人注目的肿瘤转移抑制基因之一. 目前认为^[8,21-24]他与恶性肿瘤转移有关, 但其在胃肠道恶性肿瘤中的作用尚有争论^[23-25]. 本组显示: nm23的表达与大肠癌的Dukes分期、淋巴结转移及预后密切相关, 其在生存期 ≥ 3 a患者的阳性表达率明显高于生存期 < 3 a者. 这提示nm23在大肠癌的侵袭转移过程中是一个保护性因素. nm23的阳性表达者预后较好.

MRP在人类正常组织及肿瘤中广泛存在, 是引起多药耐药的因素之一. 目前关于其表达与胃肠道恶性肿瘤的浸润深度、肿瘤分期和淋巴结转移与否的关系尚不统一^[10,26-29]. 本组显示MRP在大肠癌中的表达为64.4%(47/73), 与文献报道一致^[10,26-29]. 而其与所探讨的大肠癌的临床

病理相关因素及预后均无明显相关性. 这提示MRP所引起的耐药机制是一个相对独立的机制, 他可能在组织癌变的同时便被启动.

4 参考文献

- 王双双, 关景明, 范玉晶. 大肠癌发病的相关因素. 世界华人消化杂志 2005; 13: 534-536
- 郑树, 蔡善荣. 中国大肠癌的病因学及人群防治研究. 中华肿瘤杂志 2004; 26: 1-3
- 张渊智, 武子涛, 李世荣. 原发性结肠癌594例的临床病理与遗传易感性. 世界华人消化杂志2004; 12: 1809-1813
- 蔡善荣, 郑树, 张苏展. 不同年龄组大肠癌预后多因素分析的比较. 中华肿瘤杂志 2005; 17: 483-485
- 谭颖, 姚宇亮, 林连捷, 郑长青. 大肠癌的基因治疗. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1451-1454
- Xu D, Li XF, Zheng S, Jiang WZ. Quantitative real-time RT-PCR detection for CEA, CK20 and CK19 mRNA in peripheral blood of colorectal cancer patients. *J Zhejiang Univ Sci B* 2006; 7: 445-451
- Zhao DP, Ding XW, Peng JP, Zheng YX, Zhang SZ. Prognostic significance of bcl-2 and p53 expression in colorectal carcinoma. *J Zhejiang Univ Sci B* 2005; 6: 1163-1169
- Demirbas S, Sucullu I, Yildirim S, Celenk T. Influence of the c-erb B-2, nm23, bcl-2 and p53 protein markers on colorectal cancer. *Turk J Gastroenterol* 2006; 17: 13-19
- Salminen E, Palmu S, Vahlberg T, Roberts PJ, Soderstrom KO. Increased proliferation activity measured by immunoreactive Ki67 is associated with survival improvement in rectal/recto sigmoid cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3245-3249
- Nishioka C, Sakaeda T, Nakamura T, Moriya Y, Okamura N, Tamura T, Nakahara T, Aoyama N, Kamigaki T, Ohno M, Kuroda Y, Kasuga M, Okumura K. MDR1, MRP1 and MRP2 genotypes and in vitro chemosensitivity in Japanese patients with colorectal adenocarcinomas. *Kobe J Med Sci* 2004; 50: 181-188
- 郭振海, 陈晓江. PCNA和CEA在大肠癌表达的免疫组化研究. 伤残医学杂志 2003; 11: 57-58
- 廉朋, 徐烨, 蔡国响, 彭俊杰, 蔡三军. 术前CEA、CA19-9和CA50的表达水平与结直肠癌临床病理特点的相关性研究-附1340例病例分析. 临床肿瘤学杂志 2006; 11: 326-330
- 陈益定, 彭佳萍, 张苏展, 郑毅雄, 郑树. bcl-2和p53表达在结直肠癌预后评估中的价值. 临床与实验病理学杂志 2003; 19: 616-618
- 邹扬, 苏震东, 狄建忠, 黄玉耀, 张惠箴, 蒋智铭. P53蛋白阳性表达与结直肠癌的临床分期及预后评估. 外科理论与实践杂志 2003; 8: 155-156
- 战玉竹. 大肠癌中P53和CD44V6的表达及其临床意义. 中国优生与遗传杂志 2006; 14: 11-12
- 于兰, 张建兵. c-erbB-2蛋白, P53蛋白在大肠癌中的表达及意义. 南通大学学报(医学版) 2005; 25: 439-440
- 王丹, 张正, 韩盛玺, 杨红. 大肠癌p53蛋白的表达及临床意义. 华西医学杂志 2006; 21: 289-290
- 姬社青, 花亚伟, 马杰, 徐勇超, 韩少良. 结直肠癌COX-2、p53、PCNA和ki-67表达. 中国肿瘤杂志 2004; 13: 527-529
- 殷于磊, 卢晨, 沈达明, 顾晏. 老年大肠癌的p53、Ki-67表达与Dukes分期的关系. 老年医学与保健杂志 2006; 12: 42-45
- 边月红, 马晓丽, 黄淑红, 黄敬爱, 翟永华, 谢经武, 张

■同行评价

文章探讨了大肠癌中CEA, p53, nm23, Ki-67, MRP等基因表达与临床病理的关系, 发现p53, nm23, Ki-67等基因的表达差异与大肠癌的转移和预后相关. 目前国内分别研究上述基因在结肠癌中作用的报道较多, 但联合研究这些基因在大肠癌中的表达的工作不多, 本文研究内容具有一定的特色, 寻找大肠癌发展过程中特定时期的差异表达分子谱具有重要的临床意义. 研究设计基本合理.

- 红卫. 结直肠癌组织中CyclinB1、p34^{cdc}、PCNA和Ki267表达的研究. 中国现代普通外科进展杂志 2005; 8: 276-278
- 21 许天文, 陈道达, 郑勇斌, 连彦军. C-erbB-2, nm23蛋白表达与结直肠癌浸润转移的相关性. 华中科技大学学报(医学版) 2005; 34: 214-216
- 22 马志祥, 刘安丽, 刘家恒, 张海燕, 尹金鹏. nm23基因在大肠癌组织中的表达及临床意义. 基层医学论坛杂志 2005; 9: 124-125
- 23 刘茗露, 刘斌, 邢传平, 陈一伟. 胃癌组织中KAI1、nm23及P53的表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2006; 14: 491-496
- 24 彭克荣, 季峰, 卢佩琳, 崔峻辉, 虞朝辉, 厉有名. nm23-H1蛋白在大肠癌表达的研究. 浙江预防医学杂志 2005; 17: 1-3
- 25 张育超, 吕永添. 组织蛋白酶-D和nm23-H1蛋白表达与结直肠癌浸润、转移的关系. 岭南现代临床外科杂志 2004; 4: 20-22
- 26 罗文军, 易永芬, 于冬青, 亓荣华, 唐博. 大肠癌组织中肺耐药蛋白和多药耐药相关蛋白的表达及临床病理意义. 重庆医科大学学报 2004; 29: 769-771
- 27 桂贤, 刘会敏, 何金, 李玉莉, 孙静, 夏春燕, 葛军辉. 多种耐药相关蛋白在大肠癌组织中的表达及临床意义. 第二军医大学学报 2005; 26: 452-454
- 28 牟江洪, 肖华亮, 王东, 李增鹏, 向德兵, 张沁宏. 耐药相关蛋白在大肠癌的表达及临床意义. 局解手术学杂志 2005; 14: 376-377
- 29 Demidenko ZN, Halicka D, Kunicki J, McCubrey JA, Darzynkiewicz Z, Blagosklonny MV. Selective killing of adriamycin-resistant (G2 checkpoint-deficient and MRP1-expressing) cancer cells by docetaxel. *Cancer Res* 2005; 65: 4401-4407

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 •

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.

结直肠癌中PTEN的缺失表达及临床意义

李季, 田素礼, 李巍, 李福蕴

李季, 田素礼, 李巍, 哈尔滨医科大学附属二院普外二科 黑龙江省哈尔滨市 150086
李福蕴, 安达市中医院, 黑龙江省安达市 151400
通讯作者: 田素礼, 150086, 黑龙江省哈尔滨市保健路157号, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外二科. lij_hangyuan@sohu.com
电话: 0451-86605044
收稿日期: 2006-05-20 接受日期: 2006-06-05

Down-regulated expression of PTEN in colorectal cancer and its clinical significance

Ji Li, Su-Li Tian, Wei Li, Fu-Yun Li

Ji Li, Su-Li Tian, Wei Li, the Second Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Fu-Yun Li, Anda Hospital of Chinese Medicine, Anda 151400, Heilongjiang Province, China
Correspondence to: Su-Li Tian, the Second Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 157 Baojian Road, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. lij_hangyuan@sohu.com
Received: 2006-05-20 Accepted: 2006-06-05

Abstract

AIM: To study the expression of PTEN in colorectal carcinoma and its correlation with the clinicopathological features.

METHODS: Immunohistochemical SP technique was used to determine the expression of PTEN protein in 65 cases of colorectal carcinoma and their corresponding adjacent tissues, 13 cases of adenoma tissues, and 20 cases of normal colorectal tissues.

RESULTS: The expression of PTEN protein was mainly located in the nucleus and cytoplasm. The expression of PTEN protein was significantly lower in human colorectal cancer tissues than that in the corresponding adjacent tissues ones (56.92% vs 86.15%, $P < 0.01$), and it was also markedly lower in the lowly- and non-differentiated adenoma than that in the highly- and moderately-differentiated one (37.50% vs 75.76%, $P < 0.01$). The expression of PTEN protein in Dukes A and B stages were significantly higher than that in Dukes C and D stages (73.33% vs

42.86%, $P < 0.05$). In addition, PTEN expression was correlated with lymph node metastasis ($\chi^2 = 7.448$, $P < 0.01$), but not with the sex, tumor sizes of patients.

CONCLUSION: The expression of PTEN is down-regulated in colorectal carcinoma, and it may be one of the molecular and biological indicators in reflecting the progression and prognosis of colorectal cancer.

Key Words: Colorectal cancer; Cancer-adjacent tissue; Phosphatase and tension homolog detected on chromosome ten; Metastasis

Li J, Tian SL, Li W, Li FY. Down-regulated expression of PTEN in colorectal cancer and its clinical significance. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(28):2771-2775

摘要

目的: 研究PTEN在结直肠癌中的表达及其与结直肠癌病理特征的关系。

方法: 应用免疫组化SP法分别检测65例癌组织和癌旁组织及13例腺瘤组织PTEN蛋白的表达。

结果: PTEN主要在细胞核或细胞质中表达, 在结直肠癌组织中阳性表达率显著低于癌旁组织阳性表达率(56.92% vs 86.15%, $P < 0.01$)。中、高分化腺癌阳性表达率显著高于低、未分化腺癌阳性表达率(75.76% vs 37.50%, $P < 0.01$)。Dukes A、B期阳性表达率显著高于Dukes C、D期阳性表达率(73.33% vs 42.86%, $P < 0.05$)。此外, PTEN的表达与淋巴转移有关($P < 0.01$), 而与性别、年龄、同期的肿瘤大小无关。

结论: PTEN在结直肠癌组织中的表达下调, 其表达水平可作为反映结直肠癌进展和预后的生物学指标之一。

关键词: 结直肠癌; 癌旁组织; PTEN基因; 转移

李季, 田素礼, 李巍, 李福蕴. 结直肠癌中PTEN的缺失表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2006;14(28):2771-2775

■背景资料

结直肠癌是临床上最长常见的恶性肿瘤之一, 在我国其发病率占恶性肿瘤第4位, 超过15/10万, 并呈上升趋势, 其死亡率在所有恶性肿瘤居第3位。随着分子生物学的发展, 从分子水平来阐述结直肠癌的发病机制, 探求有效、方便的早期筛选指标, 认识其浸润、转移的分子基础及准确判断预后等, 这些课题已成为当今结直肠癌研究的重心。

■应用要点

PTEN可能成为判断结直肠癌预后的重要分子生物学指标,其在预后的判断的价值可在以后的临床随访中加以证实。

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2771.asp>

0 引言

结直肠癌是临床中最常见的恶性肿瘤之一,近年来发现的PTEN(phosphatase and tension homolog detected on chromosome ten)^[1]是一个具有磷酸酶活性的抑癌基因,在结直肠癌的致癌作用中发挥了重要的角色^[2],它的失活是肿瘤的发生、发展过程中多步基因改变中至关重要的一步,因而临床上PTEN和肿瘤学的研究已日益得到人们的关注。

1 材料和方法

1.1 材料 哈尔滨医科大学附属二院普外三科2005-06/2006-06行结直肠癌根治手术的患者取癌组织65例、癌旁组织(含有癌组织和癌组织边缘的4 cm)65例、分别取20例正常的结、直肠组织及13例腺瘤组织做对照。65例癌组织中,男性39例、女性26例,年龄41-87(平均59)岁。组织学分型:高分化腺癌7例、中分化腺癌26例、低分化癌19、未分化腺癌13例。Dukes分期: A期11例、B期19例、C期26例、D期9例。所有患者术前均未接受放疗或化疗。一抗鼠抗人PTEN抗体和UltraSensitive™试剂盒均购于福州迈新生物技术开发有限公司。

1.2 方法 采用SP免疫组织化学方法,操作步骤按试剂盒说明进行,组织切片置入0.01 mol/L(pH 6.0)柠檬酸盐缓冲液中进行高温、高压抗原修复,用已知阳性切片作阳性对照, PBS代替一抗作阴性对照。实验组与手术结束时,立即将新鲜切除的手术标本平铺无菌单上,在肿瘤对侧纵向剖开肠管,无菌生理盐水洗净。牵拉标本使其处于无张力状态,避开缺血及坏死区,分别在癌组织、癌旁组织、正常组织及腺瘤组织各切取1 cm×1 cm组织。切取物分别置入40 g/L甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,4 μm厚连续切片。同时测量肿瘤大小,观察大体分型,记录患者临床资料后病态组织送常规病理检查及PTEN免疫组化SP法检测。

1.3 结果判定 结果综合文献进行评价,PTEN表达于细胞核或质量中,按照每个视野中阳性细胞数占全部细胞数的比例将判断标准分4级: 阳性细胞数≤10%为(-), 阳性细胞数>10%, ≤50%为(+), 阳性细胞数>50%, ≤75为(++), 阳性细胞数>75%为(+++)。

表 1 PTEN蛋白表达与结直肠癌患者临床特征的关系

临床因素	n	PTEN		χ^2
		阳性数	阳性率(%)	
性别				
男	39	16	41.03	0.011
女	26	11	42.31	
年龄				
<60	36	12	33.33	2.237
≥60	29	15	51.72	
大小 (d/cm)				
≤5	28	11	39.29	0.103
>5	37	16	43.24	

表 2 不同组织的PTEN蛋白表达

分组	n	PTEN的表达程度				阳性率 (%)	χ^2	P值
		-	+	++	+++			
正常黏膜	20	0	3	4	13	100		
癌旁组织	65	9	25	16	15	86.15		
腺瘤组织	13	3	2	4	4	76.92	5.077	^a P<0.05
癌组织	65	28	19	13	5	56.92	12.848	^b P<0.01

统计学处理 采用SPSS软件包进行 χ^2 检验, $P<0.05$ 有显著差异, $P<0.01$ 有高度显著差异。

2 结果

2.1 PTEN蛋白表达与结直肠癌患者临床特征的关系 PTEN蛋白的表达与性别、年龄及肿瘤的大小无关(表1)。

2.2 不同组织的PTEN表达 65例结直肠癌组织中, PTEN蛋白表达阳性37例, 阳性率56.92%, 65例癌旁组织中, PTEN蛋白表达阳性56例, 阳性率86.15%, 两者比较差异有高度显著性(56.92% vs 86.15%, $P<0.01$), 13例腺瘤组织中, PTEN蛋白表达阳性10例, 阳性率76.92%, 20例正常黏膜组织中, PTEN蛋白阳性表达率100%, 两者比较差异有显著性(76.92% vs 100%, $P<0.05$)。同时, 正常黏膜组织与癌组织两者比较差异有高度显著性(100% vs 56.92%, $P<0.01$)(表2)。

2.3 不同Dukes分期中结直肠癌PTEN蛋白的表达 DukesA、B期结直肠癌细胞PTEN蛋白的阳性表达明显高于DukesC、D期(73.33% vs 42.86%, $P<0.05$)。DukesA(90.91%)、B(63.16%)、C(46.15%)、D(33.33%)期两两之间癌细胞的PTEN蛋白的阳性表达有显著差异($P<0.05$)(表3)。

2.4 不同组织学分型中结直肠癌PTEN蛋白的表达 在结直肠癌PTEN蛋白表达中, 高中分化腺癌的PTEN蛋白的阳性表达明显高于低未分化腺癌的阳性表达, 差异有显著性(75.76% vs

表 3 不同Dukes分期中结直肠癌PTEN蛋白的表达

Dukes分期	n	PTEN的表达程度				阳性率 (%)	χ^2	P值
		-	+	++	+++			
A	11	1	3	2	5	90.91	8.755	^a $P<0.05$
B	19	7	2	6	4	63.16		
C	36	14	4	5	3	46.15		
D	9	6	2	1	0	33.33		
A+B	30	8	5	8	9	73.33	6.119	^b $P<0.05$
C+D	35	20	6	6	3	42.86		

表 4 不同组织学分型中结直肠癌PTEN蛋白的表达

组织学分型	n	PTEN的表达程度				阳性率 (%)	χ^2	P值
		-	+	++	+++			
高分化腺癌	9	1	2	5	1	88.89	12.384	^a $P<0.01$
中分化腺癌	24	7	5	8	4	70.83		
低分化腺癌	22	12	4	6	0	45.45		
未分化腺癌	10	8	1	0	1	20.00		
高中组	33	8	7	13	5	75.76	9.697	^b $P<0.01$
低末组	32	20	5	6	1	37.50		

表 5 淋巴结转移时PTEN蛋白的表达

淋巴结转移	n	PTEN的表达程度				阳性率 (%)	χ^2	P值
		-	+	++	+++			
有	27	17	4	3	3	37.04	7.448	$P<0.01$
无	38	11	12	9	6	71.05		

37.50%, $P<0.01$), 高(88.89%)、中(70.83%)、低(45.45%)、未分化(20.00%)腺癌之间癌细胞的PTEN蛋白的阳性表达有显著差异($P<0.01$)(表4)。

2.5 淋巴结转移时PTEN蛋白的表达 65例结直肠癌组织中, 有淋巴结转移的结直肠癌组织27例, PTEN蛋白阳性表达率37.04%, 无淋巴结转移的结直肠癌组织38例, PTEN蛋白阳性表达率71.05%, 两者间比较差异有显著性(37.04% vs 71.05%, $P<0.01$)(表5)。

3 讨论

PTEN作为一种公认的抑癌基因, 是一个具有双重特异性磷酸酶(DSP)活性和酪氨酸酶(PTP)活性的抑癌基因, 定位于人类染色体10q23, 长200 kb, 含9个外显子和8个内含子^[1,3-5], 又名MMAC₁^[6](muted in multiple advanced cancers)和TEP₁^[7](TGF-B-regulated and epithelial cell enriched phosphatase)。国内外相继报道, PTEN蛋白在多种组织和细胞中均有表达^[8-10]。研究表明, PTEN作为肿瘤抑制基因参与细胞的凋亡调控, 主要依赖脂质磷酸酶活性而实现的^[11-13]。Khaleghpour *et al*^[14]发现, 每种导致PTEN蛋白功

■名词解释

癌旁组织: 一般认为在结直肠癌的近端15 cm, 远端不超过4 cm组织容易被癌组织所浸润, 而远端4 cm以外的组织极少浸润, 所以在本文中选取癌组织边缘4 cm以内的组织为癌旁组织。

能丧失的同时都伴有脂质磷酸酶活性的丧失, 但其蛋白磷酸酶的活性可以保留, 脂质PIP₃位于细胞膜上, PTEN通过PIP₃抑制Akt/蛋白激酶B活性^[15-16], 这样通过控制主要途径来控制细胞增殖和生存。刺激细胞生长和阻断凋亡^[17-19]。PIP₃是PTEN蛋白脂质磷酸酶作用的底物, 是胰岛素和表皮生长因子(EGF)等一些细胞生长因子的第二信使。提示PTEN蛋白丢失使结直肠细胞脱离了原有正常的生长调控状态, 细胞呈无节制的生长, PTEN蛋白丢失越多, 细胞的分化程度越低, 肿瘤的恶性程度越高。Haier *et al*^[20]在研究HT29细胞的转移侵袭能力时发现, PTEN可通过其丝/苏氨酸磷酸酶的作用抑制该细胞对细胞外基质的稳定黏附。而Goel *et al*^[21]证实, 通过启动超甲基化^[22-24], PTEN外显子7和8以及10q23位缺失后多聚酶重复序列突变, 引起PTEN频繁失活, 导致了微卫星的不稳定性(MSI)^[25-26], 最终引发结直肠癌。Zhou *et al*^[27]报道, 在MSI阳性的结直肠癌中有13%的基因突变率, 蛋白表达缺失或下调率为41%, 在HNPCC中有18%的突变率, 有31%的蛋白异常表达率。实验结果显示, 在结直肠癌组织中, PTEN阳性表达率为56.92%, 阴性表达

■同行评价

本文报道通过对65例结肠癌标本和癌旁组织, 13例腺瘤及20例正常结肠组织中PTEN蛋白表达的检测对比, 证实PTEN在结肠癌中表达下调, 其表达水平有可能作为反映结肠癌进展和预后的生物学指标, 这一结果具有临床参考意义。

率43.08%, 这种表达率与组织学类型密切相关 ($P<0.01$), 与Zhou的结果相似。在研究结肠癌中PTEN蛋白表达异常与Dukes分期期间的关系中发现, 随着病期进展浸润深度加深, 淋巴结或脏器转移的出现^[28-30], PTEN阳性表达率降低, 证实了PTEN蛋白表达下调或缺失与结肠癌的进展密切相关 ($P<0.05$), 可能与MSI有直接关系。结肠癌的发生、发展是多种基因、多种机制共同作用的结果, 因不同研究者所使用的抗体及方法的不同, 以及引发这种蛋白低表达是否还有其他机制, 都可能造成研究结果的差异, 本研究与Zhou *et al* 研究结果相似, 明确显示了PTEN蛋白异常表达与结肠癌之间的密切关系, 表明了PTEN蛋白表达下调或缺失在结肠癌发展中具有重要作用, 可能成为判断结肠癌预后的重要分子生物学指标, 其在预后的判断的价值可在以后的临床随访中加以证实。

4 参考文献

- Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareisis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997; 275: 1943-1947
- Depowski PL, Rosenthal SI, Ross JS. Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer. *Mod Pathol* 2001; 14: 672-676
- Leslie NR, Gray A, Pass I, Orchiston EA, Downes CP. Analysis of the cellular functions of PTEN using catalytic domain and C-terminal mutations: differential effects of C-terminal deletion on signalling pathways downstream of phosphoinositide 3-kinase. *Biochem J* 2000; 346 Pt 3: 827-833
- Tolkacheva T, Chan AM. Inhibition of H-Ras transformation by the PTEN/MMAC1/TEP1 tumor suppressor gene. *Oncogene* 2000; 19: 680-689
- Gao X, Neufeld TP, Pan D. Drosophila PTEN regulates cell growth and proliferation through PI3K-dependent and -independent pathways. *Dev Biol* 2000; 221: 404-418
- Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH, Tavtigian SV. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 1997; 15: 356-362
- Li DM, Sun H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res* 1997; 57: 2124-2129
- Ali IU, Schriml LM, Dean M. Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1922-1932
- Davies MP, Gibbs FE, Halliwell N, Joyce KA, Roebuck MM, Rossi ML, Salisbury J, Sibson DR, Tacconi L, Walker C. Mutation in the PTEN/MMAC1 gene in archival low grade and high grade gliomas. *Br J Cancer* 1999; 79: 1542-1548
- Kondo K, Yao M, Kobayashi K, Ota S, Yoshida M, Kaneko S, Baba M, Sakai N, Kishida T, Kawakami S, Uemura H, Nagashima Y, Nakatani Y, Hosaka M. PTEN/MMAC1/TEP1 mutations in human primary renal-cell carcinomas and renal carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 2001; 91: 219-224
- Cheney IW, Johnson DE, Vaillancourt MT, Avanzini J, Morimoto A, Demers GW, Wills KN, Shabram PW, Bolen JB, Tavtigian SV, Bookstein R. Suppression of tumorigenicity of glioblastoma cells by adenovirus-mediated MMAC1/PTEN gene transfer. *Cancer Res* 1998; 58: 2331-2334
- Gu J, Tamura M, Yamada KM. Tumor suppressor PTEN inhibits integrin- and growth factor-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathways. *J Cell Biol* 1998; 143: 1375-1383
- Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 1998; 273: 13375-13378
- Khaleghpour K, Li Y, Banville D, Yu Z, Shen SH. Involvement of the PI 3-kinase signaling pathway in progression of colon adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 2004; 25: 241-248
- Arico S, Petiot A, Bauvy C, Dubbelhuis PF, Meijer AJ, Codogno P, Ogier-Denis E. The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem* 2001; 276: 35243-35246
- Tamura M, Gu J, Danen EH, Takino T, Miyamoto S, Yamada KM. PTEN interactions with focal adhesion kinase and suppression of the extracellular matrix-dependent phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem* 1999; 274: 20693-20703
- Maehama T, Dixon JE. PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends Cell Biol* 1999; 9: 125-128
- Lee JO, Yang H, Georgescu MM, Di Cristofano A, Maehama T, Shi Y, Dixon JE, Pandolfi P, Pavletich NP. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* 1999; 99: 323-334
- Georgescu MM, Kirsch KH, Akagi T, Shishido T, Hanafusa H. The tumor-suppressor activity of PTEN is regulated by its carboxyl-terminal region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 10182-10187
- Haier J, Nicolson GL. Time-dependent dephosphorylation through serine/threonine phosphatases is required for stable adhesion of highly and poorly metastatic HT-29 colon carcinoma cell lines to collagen. *Anticancer Res* 2000; 20: 2265-2271
- Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, Carethers JM, Dowell JM, Wasserman L, Compton C, Mayer RJ, Bertagnolli MM, Boland CR. Frequent inactivation of PTEN by promoter hypermethylation in microsatellite instability-high sporadic colorectal

- cancers. *Cancer Res* 2004; 64: 3014-3021
- 22 肖秀英, 周晓燕, 孙孟红, 颜歌, 杜祥. 散发性结直肠癌中微卫星不稳定性及临床病理意义. *中华肿瘤杂志* 2006; 28: 289-293
- 23 Kang YH, Lee HS, Kim WH. Promoter methylation and silencing of PTEN in gastric carcinoma. *Lab Invest* 2002; 82: 285-291
- 24 白伟良, 李巍, 陈晓秋, 王铁. 蛋白酪氨酸磷酸酶基因启动子过甲基化与喉癌的关系. *临床耳鼻咽喉科杂志* 2006; 20: 254-256
- 25 张亚历, 张振书, 吴保平, 孙正基, 林金容, 周殿元. 大肠癌相关标记物筛选高危人群的评价. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 1188-1190
- 26 张立力, 张振书, 张亚历, 吴保平, 郭文, 刘晓霞, 周殿元. 多原发大肠癌微卫星不稳定性的研究. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 397-399
- 27 Zhou XP, Kuismanen S, Nystrom-Lahti M, Peltomaki P, Eng C. Distinct PTEN mutational spectra in hereditary non-polyposis colon cancer syndrome-related endometrial carcinomas compared to sporadic microsatellite unstable tumors. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 445-450
- 28 Laghi L, Bianchi P, Roncalli M, Malesci A. Re: Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1402-3; author reply 1403-1404
- 29 Brennetot C, Buhard O, Jourdan F, Flejou JF, Duval A, Hamelin R. Mononucleotide repeats BAT-26 and BAT-25 accurately detect MSI-H tumors and predict tumor content: implications for population screening. *Int J Cancer* 2005; 113: 446-450
- 30 Romanowicz-Makowska H, Smolarz B, Langner E, Kozłowska E, Kulig A, Dżiki A. Analysis of microsatellite instability and BRCA1 mutations in patients from hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) family. *Pol J Pathol* 2005; 56: 21-26

电编 李琪 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

《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.

肝窦内皮细胞与免疫耐受

张云霞, 刘 杞

■背景资料

肝脏的免疫耐受一直是大家比较关注的问题, 其机制非常复杂, 涉及到细胞水平、分子水平, 包括细胞间互相识别作用, 信号转导, 凋亡以及其他更复杂的尚未明确的作用机制。总体上, 肝脏的免疫耐受是多因素综合作用的结果。像DC, NK一样, 近年来, LSEC在肝脏的免疫耐受方面的影响越来越受到重视。

张云霞, 刘杞, 重庆医科大学病毒性肝炎研究所 重庆市400010

国家自然科学基金资助课题, No. 30570826

通讯作者: 刘杞, 400010, 重庆市, 重庆医科大学病毒性肝炎研究所. liuqiz@hotmail.com

电话: 023-63825854

收稿日期: 2006-07-27 接受日期: 2006-09-01

摘要

肝脏似乎是一个免疫耐受多于免疫原性的器官。众多的肝脏组成细胞中许多参与肝脏免疫调节, 如肝血窦内皮细胞(LSEC)。LSEC是定居在肝脏肝血窦的细胞, 与经过肝脏的淋巴细胞直接作用, 有大量的清道夫受体, 能有效摄取抗原。LSEC处理抗原后以MHC限制性呈递给CD4T或者CD8T细胞。与LSEC作用的CD4T, CD8T细胞产生耐受性, 是LSEC在肝脏重要的免疫功能: 对循环中的可溶性抗原或口服抗原控制了免疫应答的类型。

关键词: 免疫应答; 肝窦内皮细胞; 耐受

张云霞, 刘杞. 肝窦内皮细胞与免疫耐受. 世界华人消化杂志 2006;14(28):2776-2779

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2776.asp>

0 引言

肝脏有其独特的免疫功能包括诱导及维持外周耐受。例如同种异体的肝移植可以跨越MHC屏障而不需要免疫抑制剂; 通过门静脉的抗原可以诱导耐受。肝脏的显微结构与其免疫特性有关。尤其是缓慢、间歇性的血液流经狭窄的肝血窦, 促进血液-骨髓中的淋巴细胞与固有的肝细胞作用。肝血窦内占优势的血窦内皮细胞(LSEC), 在血液和肝细胞间形成了有孔的屏障, 因此在淋巴细胞穿越肝脏并且与之作用上有重要的意义。本文对LSEC参与的免疫应答作一综述。

1 LSEC的表型

LSEC是微血管内皮细胞, 与其他大血管内皮细胞及其他器官的微血管内皮细胞相比较具有独特的表型。Knolle *et al*^[1]经流式, 体外功能测定和肝脏的免疫组化确立了LSEC以下免疫分子

的表达: CD54 ++, CD102 +, CD106 +, CD62P ±, CD31 ++, 甘露聚糖受体++, 清道夫受体++, Toll样受体4 +, CD14 +, CD32 +, CD36 +, MHC I ++, MHC II +, CD80 +, CD86 +, CD40 ++, CD4 +, CD11c +, CD95 +, CD95L +, TRAIL +, Membrane TNFα + (++)强表达, +表达, ±表示弱表达)。LSEC组成性表达与淋巴细胞相互作用必须的表面标记分子, 支持淋巴细胞黏附于LSEC。LSEC进一步表达某些识别受体使他们成为清道夫细胞。甚至, LSEC组成性表达共刺激分子(CD80, CD86, CD40)和MHC I, MHC II, 呈递抗原给T细胞。最后, LSEC表达某些髓样来源细胞表面表达的分子标记例如CD4和CD11c。这一系列表面分子使LSEC具备与T细胞通过抗原呈递而相互作用的能力。

2 LSEC的肝脏清除功能

2.1 LSEC对大分子物质的清除 LSEC已经研究得比较深入的是对大分子采取受体介导的细胞内吞作用。LSEC表达的典型识别受体例如甘露聚糖和清道夫受体, 利于LSEC清除血窦内的大分子物质。LSEC还具有吞噬接近200 nm直径大小的颗粒。LSEC以载体形式运输内吞物质至肝细胞, 接着完成跨膜运输。肝脏的清除功能由LSEC有效地从血液中摄取大分子物质, 再穿梭这些物质至肝细胞经胆管分泌或者代谢。

2.2 LSEC摄取加工抗原 Limmer *et al*^[2]研究发现, LSEC以受体介导的方式通过胞吞作用摄取抗原。LSEC对卵清蛋白(OVA)的摄取专一发生在受体介导的细胞内吞, 包含主要的甘露糖受体和清道夫受体。LSEC处理抗原的路径是经典的抗原处理相关转运蛋白(TAP)-依赖途径。热休克蛋白通过运输和对内吞抗原的处理参与交叉呈递抗原。将OVA加热, 酸化能促进LSEC交叉呈递抗原; 阻断(v-ATPase)质子泵, 或者阻止内涵体的酸化影响LSEC交叉呈递抗原。同样的, 代谢抑制物叠氮化钠也抑制LSEC交叉抗原呈递作用。以上结果说明, 受体介导的内吞作用, 内涵体的成熟和与热休克蛋白的结合即蛋白酶对抗原的

■研究前沿

目前, 大家已经对DC, NK在肝脏免疫耐受方面的作用进行了大量的研究。而LSEC相对而言, 是从细胞水平研究肝脏免疫耐受机制的一个新的视点。研究发现, LSEC参与了肝脏免疫耐受的形成, 并且被认为是免疫原性和免疫耐受间的一个调节点。

处理都是LSEC交叉呈递抗原的必要步骤.

3 LSEC的抗原呈递作用

3.1 以MHC II 分子呈递抗原至CD4⁺T细胞 LSEC表面组成性表达共刺激分子和MHC II, 能高效摄取抗原, 呈递可溶性抗原至CD4⁺T细胞. 在激活CD4⁺T细胞上, LSEC其效率与Kupffer和骨髓起源的专职抗原呈递细胞(APC)一样. LSEC像树突状细胞(DC)样能刺激初始CD4⁺T细胞, 但LSEC与CD4⁺T相互作用后, 诱导其免疫耐受这与DC不同. 再者, LSEC不需要成熟即具有呈递抗原刺激初始CD4⁺T细胞这与其他器官的微血管内皮细胞明显不同. LSEC不促进初始CD4⁺T细胞向Th1细胞分化, 反而诱导其成为调节性T细胞, 因而对诱导肝脏免疫耐受有作用. 肝脏是个独特的场所, LSEC在淋巴组织外刺激初始T细胞, 诱导调节性CD4⁺T细胞. T细胞所在的环境和由抗原呈递细胞传送的共刺激分子信号在刺激初始T细胞后决定了T细胞的功能表型(Th1, Th2, Th3, Tr). Th1细胞是产生保护性细胞介导的免疫反应如抗肿瘤和病原清除. Th2细胞支持抗体的产生和体液免疫. Th3或者Tr则与免疫耐受有关. 已经证实LSEC呈递抗原刺激的CD4⁺细胞并不分化为Th1细胞. 经LSEC刺激的T细胞表达IL-4和IL-10, 与Th0细胞分泌的细胞因子表型相一致. 相反, 专职APC刺激的CD4⁺T激活后常分化成Th1细胞, 表达大量的IFN- γ , 反过来刺激更多的T细胞分化. 由于LSEC刺激的T细胞能抑制抗原特异性T细胞应答, 所以是一个T细胞功能的调节点. LSEC刺激的T细胞不导致免疫原性, 却诱导免疫耐受性.

3.2 以MHC I 分子形式呈递外源性抗原至CD8⁺T细胞 LSEC不仅以MHC II 呈递外源性抗原, 他们同样以MHC I 呈递这些外源性抗原给CD8T细胞, 即交叉呈递. LSEC是肝脏固有的细胞, 非髓样细胞, 具有交叉呈递可溶性抗原到CD8⁺T细胞. 尽管LSEC与树突状细胞的抗原呈递有相似的分子机制, 但由LSEC激活的CD8⁺T细胞其免疫耐受多于免疫原性. 在体内, LSEC能非常有效地摄取循环中的抗原. 并且组成性表达与其他专职APC相同的表面分子如MHC I, MHC II, CD54(ICAM-I), CD106(VCAM-I), CD80, CD86, CD40. Limmer *et al*^[3]研究发现LSEC能有效地以Kb分子形式交叉呈递外源性的OVA. OVA的含量即使低至1 nmol/L(45 ng/mL), LSEC细胞也能有效诱导B3Z(CD8⁺T细胞

杂交瘤)细胞分泌IL-2. 同时实验对LSEC细胞交叉激活初始CD8⁺T细胞进行研究, 用2种表达Kb限制性的不同T细胞受体的转基因鼠, 其可识别不同的抗原. 两种类型TCR转基因鼠T细胞荧光标记后与C57BL/6或者TAP-缺陷小鼠的LSEC共同培养. 体外实验发现, 呈递抗原的LSEC诱导CD8⁺T细胞增殖, 无论内源性还是外源性抗原, LSEC必须在TAP存在下以Kb分子进行呈递. 经LSEC刺激的CD8⁺T细胞与传统的APC激活结果不同. CD8⁺T细胞逐渐丧失了分泌IFN- γ 和IL-2, 及接受IFN- γ , IL-2反复刺激促进其自身增殖的功能. CD8⁺T细胞分泌细胞因子量的多少依赖于LSEC呈递的抗原量. 如CD8⁺T细胞与不呈递抗原的LSEC共同培养, 在克隆因子重新刺激下, 其表达细胞因子不受影响. 同时研究还发现Kb特异性的CD8⁺T细胞经LSEC刺激后无特异性的细胞毒性. 推测LSEC呈递抗原后使CD8⁺T耐受. 为证明在体内LSEC参与呈递循环中抗原诱导其CD8⁺T耐受, 进行了如下实验. 在C57BL/6鼠静脉注射OVA, 24 h后分离LSEC, 并将分离得到的LSEC过继性转移至C57BL/6鼠. 1 wk后, 重复, 同时注射RMA-ova肿瘤, 结果仅有负载OVA和LSEC鼠(3/6)接受了肿瘤, 其他未处理鼠(6/6)对肿瘤显示排异性. 说明在动物体内T细胞耐受可被交叉呈递抗原的LSEC通过T细胞受体组份所诱导. 同时与髓源APC细胞如巨噬细胞和DC对可溶性抗原的浓度要求($\geq 20 \mu\text{mol/L}$)相比较, LSEC对($\leq 1 \text{ nmol/L}$)的可溶性抗原也能有效交叉呈递. 通过测定CD8⁺T细胞活化标志和增殖实验, 发现CD8⁺T被LSEC激活. 重复刺激后, CD8⁺T不能分泌IL-2, 但在外源性IL-2存在下, 免疫耐受并不发生, 说明LSEC主动激活CD8⁺T细胞阻止了IL-2的自分泌. 虽然LSEC诱导CD8⁺T耐受的分子机制目前不清楚, 但是肝脏的微环境如免疫调节细胞因子IL-10或者TGF- β 非常丰富, 可能对肝脏局部的免疫耐受有作用. LSEC交叉呈递口服抗原介导CD8T细胞耐受的相关文献[2,4]涉及到2种实验模型. 一是喂养OVA鼠的LSEC过继性转移到RAG2基因敲除鼠, 接着, 观察到基因敲除鼠其CD8T细胞具有针对特异性OVA重组TCR的增殖. 这些经喂养OVA的鼠, 分离LSEC, 观察到CD8T在活体外接受抗原特异性刺激后强烈增殖, 但表达细胞因子IFN- γ , IL-2的能力下降, 在体内通过测定其细胞毒性发现细胞毒作用丧失. 二是用表达H-2Kb转基因鼠, 证实对口服抗原CD8T耐受. 其H-2Kb的表达在内

■相关报道

Knolle, Limmer *et al* 长期致力于研究LSEC在肝脏免疫耐受方面的作用. 发表的文章中均提到LSEC是一种新型的细胞, 参与抗原提呈, 诱导免疫耐受, 维持了机体内环境的稳定.

■创新盘点

本文在参与肝脏免疫耐受的众多细胞中, 以LSEC为研究对象, 对该细胞在肝脏免疫耐受中的作用及其作用机制进行了详细的综述, 角度新颖; 采用的文献有大量实验依据为根据, 并从逻辑上逐步分析LSEC的作用环节和相关影响因素. 其中, 首次提到LSEC在参与肝脏免疫耐受中, 与肝细胞的相互作用.

■应用要点

本文不仅分析了LSEC参与肝脏免疫耐受的作用机制,而且也探讨了LSEC如何参与肝移植中免疫耐受.由浅入深对LSEC参与肝脏免疫耐受进行了分析综述.通过该文,可以深入了解LSEC在肝脏免疫耐受中的作用.

皮细胞特异启动子*tie2*控制下,只有表达MHC I H-2Kb的内皮细胞才能呈递抗原给T细胞,说明,LSEC在这个模型中参与口服抗原诱导CD8T耐受.

4 影响LSEC抗原呈递活化CD4⁺T因素

在肝脏局部微环境中,存在严密控制LSEC呈递抗原至CD4⁺T细胞的影响因子,如前列腺素PGE₂, IL-10. 这些因子其他肝细胞也有表达如Kupffer. 不仅临近的Kupffer释放可溶性因子,而且门脉血流成分也能直接影响LSEC抗原呈递^[5].

4.1 内毒素 内毒素是革兰氏阴性细菌外膜,由脂多糖组成. 内毒素引起的反应已经证实参与多种细胞(单核/巨噬细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、中性粒细胞)活化,引起细胞因子的表达,炎症介质的释放,引起病理生理的改变. 生理情况下在门静脉血中内毒素是存在的,其浓度为100 ng/L至1 μg/L. LSEC, Kupffer都能清除内毒素. 已经证实, LSEC是有效的肝脏固有的抗原呈递细胞. Knolle *et al*^[6]研究内毒素对LSEC固有功能的影响. 实验中呈递抗原的LSEC和生理条件下浓度的内毒素共同孵育,发现LSEC功能下降80%. 相反,传统的APC经内毒素处理后,其功能增加. 内毒素抑制LSEC的作用机制不是由于缺乏可溶性共刺激信号. 因为无论补充IL-1β, IL-2, IFN-γ, 或者IL-12都不能使LSEC功能恢复. 内毒素也不影响LSEC对抗原的摄取. 实验发现内毒素专一引起LSEC细胞内内涵体/溶酶体室碱化,影响LSEC对抗原的处理. 其作用环节: (1)内毒素影响蛋白抗原降解为肽段,同时pH碱化后不利于肽与MHC II连接; (2)内毒素处理后的LSEC其表面分子MHC II, CD80, CD86表达下调. 以上说明内毒素不影响LSEC清除门静脉中消化道来源的抗原,但是影响抗原处理以及细胞表面分子的表达. 肝脏局部微环境具有调节LSEC功能的作用. Uhrig *et al*^[7]证实LSEC对LPS的反应直接表现为(TLR4)/CD14的功能. LSEC接受LPS反复刺激获得对LPS的耐受性,但不失去清道夫活性. LSEC对LPS耐受性具有局部nuclear factor-κB减少的特点. 功能上,在LPS反复刺激后, LSEC表面分子CD54反应性减少,导致LSEC与白细胞黏附减少. 活体内可观察到白细胞与LSEC黏附减少,促进了肝脏微循环. 证实LPS耐受是LSEC对肝脏炎症的局部调节.

4.2 IL-10 LSEC激活CD4⁺T细胞的能力受到外源性PGE₂和IL-10的影响. Knolle *et al*^[8]证实了IL-10能下调LSEC活化T细胞. IL-10减少了

LSEC表面分子MHC II, CD80, CD86的表达,而且, IL-10还减少了LSEC甘露糖受体活性. 两者减少影响了LSEC抗原摄取和活化CD4⁺T能力. 重要的是, LSEC低表达MHC II 和缺乏共刺激信号导致T细胞无能. 因为PGE₂和IL-10是LSEC或Kupffer受生理浓度下内毒素刺激后所产生,所以这些因子不断存在,他们负面调节肝脏局部APC,可以解释抗原在肝脏难以诱导T细胞活化而清除慢性感染. 说明呈递抗原的LSEC在肝脏的微环境中并不能产生有效的细胞介导的免疫应答.

4.3 肝细胞 Edwards *et al*^[9]建立体外肝血窦模型. 在模型中,流动的淋巴细胞可以与肝血窦内皮细胞接触并受到肝细胞的调节. 实验发现肝细胞与LSEC相互作用后扩大LSEC对淋巴细胞的募集作用. 该作用是通过血窦调节LSEC黏附分子的表达及其功能,暗示在调节淋巴细胞通过肝血窦聚集的时候,组织来源的信号可能非常重要. 因为LSEC的位置与肝细胞非常近,仅仅是松的基质填充的Disse腔. LSEC与肝细胞共同培养,研究结果发现能明显增加LSEC捕捉淋巴细胞的能力,直接说明肝细胞对肝脏内淋巴细胞的聚集有调节作用. 虽然共同培养并不能最大的活化内皮细胞,因为与那些单个共同培养系统或者细胞因子活化的内皮细胞比较,外源性给予细胞因子能进一步加强淋巴细胞的黏附,增加ICAM-1和CD31更高水平的表达. 但这说明来源于肝细胞的因子促进了内皮细胞对后续炎症信号的反应. 所以,微环境不仅影响内皮细胞活化的基线水平,而且作为对炎症信号的反应促进内皮细胞聚集淋巴细胞的能力.

4.4 调节性T细胞 调节性T细胞CD4⁺ CD25⁺ (Treg)是非常重要的介导外周免疫耐受的细胞. Wiegand *et al*^[10]研究Treg是否通过LSEC, KC, 肝细胞抑制CD4⁺T. 实验发现缺乏Treg, 3种细胞都可以刺激CD4⁺T增殖, Treg存在时, CD4⁺T细胞增殖受到抑制. 与KC作用, Treg细胞数量增加,而LSEC和肝细胞相反不能诱导Treg增殖. 实验检测了存在微生物信号时,肝内潜在的细胞是否改变了Treg的抑制作用. 在免疫刺激分子CpG-寡核苷酸存在的情况下, LSEC, KC, 肝细胞的确克服了Treg介导的免疫抑制. 在LPS存在下,只有KC和肝细胞能克服Treg的抑制活性,而LSEC不能. 实验结果Treg可以抑制肝脏细胞激活的CD4⁺T. 然而微生物存在时,肝细胞可以克服Treg的抑制作用. 在微生物存在时,通过肝脏细

胞对Treg的调节可以使免疫耐受转为免疫应答。

5 LSEC与肝移植

Onoe *et al*^[11]为鉴定肝移植中哪些细胞参与诱导耐受状态,建立了同种基因的混合肝组成细胞与淋巴细胞反应系列。从C57BL/6(B6)和Balb/c中分离肝组成细胞作为刺激原, B6小鼠中分离的脾细胞作为反应细胞。照射过的肝组成细胞与荧光染料标记的脾细胞共同孵育。在同种基因的MHLR反应中,无论肝脏的组成细胞或是实质肝细胞作为刺激原,都观察到缺乏T细胞增殖。只有CD105⁺细胞即特征性的LSEC细胞从肝组成细胞刺激原中耗竭后,观察到MHLR导致了不同反应程度的CD4⁺和CD8⁺T细胞的明显增殖。Onoe *et al*^[12]同时检测LSEC对同种异体T细胞的耐受能力。结果发现LSEC表达Fas配体,能经过直接识别途径识别同种异体抗原,诱导T细胞耐受。说明LSEC通过直接识别同种异己抗原,具有调节多克隆T细胞的能力, Fas/Fas配体参与了LSEC对T细胞调节。Tokita *et al*^[13]门静脉注射供者脾细胞,发现LSEC对同种异体抗原经间接途径识别呈递引起同种异体反应性T细胞耐受。与其一致的是,门静脉注射供体的脾细胞导致后续心脏移植物的存活时间显著延长。结果说明通过经门静脉注射照射过供体脾细胞, LSEC对间接抗原的识别呈递显著有利于诱导同种异体T细胞耐受。

总之, LSEC是在两种免疫现象(免疫原性和免疫耐受)间的连接点。原因为: (1)LSEC是肝脏固有细胞,定居在肝血窦,能与血和骨髓来源的抗原直接发生作用; (2)LSEC表达不同的识别受体使LSEC自身能有效的摄取抗原; (3)LSEC表达激活T细胞必须的共刺激分子; (4)LSEC可以刺激初始CD4⁺T细胞成为调节性T细胞; (5)LSEC交叉呈递外源性抗原使CD8⁺T细胞耐受。在肝脏,血-骨髓来源的抗原优先被LSEC摄取,而不是其他肝脏组成细胞。LSEC与肝脏的淋巴细胞长期相互作用, LSEC内吞的抗原呈递给肝脏的T细胞。LSEC介导的CD4⁺CD8⁺T耐受对器官中来源于胃肠道的抗原和同时存在循环血流中的抗原产生不需要的免疫反应从而保护器官。LSEC也许代表了一种新的抗原呈递细胞类型,在外周器官其作用一方面促进免疫监督,但另一方面诱导外周耐受维持器官的完整性。

6 参考文献

- Knolle PA, Limmer A. Control of immune responses by scavenger liver endothelial cells. *Swiss Med Wkly* 2003; 133: 501-506
- Limmer A, Ohl J, Wingender G, Berg M, Jungerkes F, Schumak B, Djandji D, Scholz K, Klevenz A, Hegenbarth S, Momburg F, Hammerling GJ, Arnold B, Knolle PA. Cross-presentation of oral antigens by liver sinusoidal endothelial cells leads to CD8 T cell tolerance. *Eur J Immunol* 2005; 35: 2970-2981
- Limmer A, Ohl J, Kurts C, Ljunggren HG, Reiss Y, Groettrup M, Momburg F, Arnold B, Knolle PA. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8⁺ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* 2000; 6: 1348-1354
- Knolle PA. Involvement of the liver in the induction of CD8 T cell tolerance towards oral antigen. *Z Gastroenterol* 2006; 44: 51-56
- Limmer A, Knolle PA. Liver sinusoidal endothelial cells: a new type of organ-resident antigen-presenting cell. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2001; 49 Suppl 1: S7-11
- Knolle PA, Germann T, Treichel U, Uhrig A, Schmitt E, Hegenbarth S, Lohse AW, Gerken G. Endotoxin down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells. *J Immunol* 1999; 162: 1401-1407
- Uhrig A, Banafsche R, Kremer M, Hegenbarth S, Hamann A, Neurath M, Gerken G, Limmer A, Knolle PA. Development and functional consequences of LPS tolerance in sinusoidal endothelial cells of the liver. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 626-633
- Knolle PA, Uhrig A, Hegenbarth S, Loser E, Schmitt E, Gerken G, Lohse AW. IL-10 down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells through decreased antigen uptake via the mannose receptor and lowered surface expression of accessory molecules. *Clin Exp Immunol* 1998; 114: 427-433
- Edwards S, Lalor PF, Nash GB, Rainger GE, Adams DH. Lymphocyte traffic through sinusoidal endothelial cells is regulated by hepatocytes. *Hepatology* 2005; 41: 451-459
- Wiegand C, Frenzel C, Herkel J, Kallen KJ, Schmitt E, Lohse AW. Murine liver antigen presenting cells control suppressor activity of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Hepatology* 2005; 42: 193-199
- Onoe T, Ohdan H, Tokita D, Hara H, Tanaka Y, Ishiyama K, Asahara T. Liver sinusoidal endothelial cells have a capacity for inducing nonresponsiveness of T cells across major histocompatibility complex barriers. *Transpl Int* 2005; 18: 206-214
- Onoe T, Ohdan H, Tokita D, Shishida M, Tanaka Y, Hara H, Zhou W, Ishiyama K, Mitsuta H, Ide K, Asahara T. Liver sinusoidal endothelial cells tolerize T cells across MHC barriers in mice. *J Immunol* 2005; 175: 139-146
- Tokita D, Ohdan H, Onoe T, Hara H, Tanaka Y, Asahara T. Liver sinusoidal endothelial cells contribute to alloreactive T-cell tolerance induced by portal venous injection of donor splenocytes. *Transpl Int* 2005; 18: 237-245

■同行评价

肝脏与免疫的关系密切,作者对肝窦内皮细胞与免疫耐受的关系的研究进行了综述,视野独到,与临床联系密切,内容新颖,有一定的深度,引用的参考文献合理。

电编 张敏 编辑 张焕兰

裸质粒流体力学注射法—基因治疗研究的利器

刘亮明, 罗杰, 张吉翔, 郭宏兴, 邓欢

■背景资料

作为一个革命性的疾病治疗方法, 基因治疗具有正本清源、达到根除病患的优势。然而, 如何有效而安全地将目的基因转染入活体靶器官内, 一直以来都困扰着生物遗传学家们, 并影响着基因治疗的研究及应用。

刘亮明, 张吉翔, 邓欢, 罗杰, 南昌大学第二附属医院消化内科、江西省分子医学重点实验室 江西省南昌市 330006
国家自然科学基金项目, No. 30360037, No. 30160032.

江西省科委重点项目, No. 200110300101, No. 20041B0300300

通讯作者: 张吉翔, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科. jixiangz@tom.com

电话: 0791-6292706 传真: 0791-6262262

收稿日期: 2006-06-20 接受日期: 2006-08-10

摘要

外源基因在动物活体组织的有效表达是基因治疗研究的基础。同时, 作为一种疾病治疗方法, 安全性也是一个不容忽视的问题。本文从基因治疗研究的角度, 介绍了流体力学注射法的概念、器官靶向性、目的基因在靶器官内的转染效率、安全性和转染机制, 以及该方法在疾病模型动物基因治疗方面的应用等等。总之, 流体力学注射法以其高效、安全的肝靶向性活体基因转染、简单便捷的操作方法, 正在逐渐成为人们进行基因治疗研究的重要工具。

关键词: 流体力学注射法; 基因治疗; 肝靶向性

刘亮明, 罗杰, 张吉翔, 郭宏兴, 邓欢. 裸质粒流体力学注射法—基因治疗研究的利器. 世界华人消化杂志 2006;14(28):2780-2784

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2780.asp>

0 引言

虽然常规的医疗技术手段取得了长足的进步, 但是除了常见的感染症及一些外科疾病外, 许多疾病, 如恶性肿瘤、糖尿病、艾滋病、肝硬化、肾炎、心脑血管疾病、神经元退行性病变以及各种遗传性和血液性疾病等用传统方法是无法治愈的。只有靠基因层次的介入, 才能直捣核心, 根除这些病患。然而, 作为一种新的疾病治疗方法, 人们对其仍存有许多疑虑, 如怎样才能确保转染的外源目的基因在活体细胞内有效表达, 以及这种转染的安全性和器官靶向性如何等, 都是亟待解决的问题。

由于病毒性基因载体能有效地将目的基因转染活体组织细胞并具有一定的趋肝性, 曾一度成为研究的热点。但病毒性载体的安全性不容忽视, 如腺病毒可能引起机体过度的免疫应

答、逆转录病毒可能造成宿主细胞插入突变等。在人体基因治疗的实验中, 曾出现了多起病毒载体致人死亡的实例, 这极大地阻碍了基因治疗在人体研究的进程^[1-2]。肌肉或靶器官的电穿孔法被证实能有效地协助目的基因转染入肌肉或靶器官内, 但该方法对组织的创伤性限制了其进一步的应用。近年来, 一种新的高效安全的活体细胞基因转染方法—流体力学注射法(hydrodynamics-based procedure)在基因治疗研究领域获得广泛应用。

1 流体力学注射法的概念

流体力学注射法是一种快速大容量的裸质粒溶液的体内注射方法。借助该方法, 目的或治疗基因可经鼠尾静脉转染动物活体器官, 并在靶器官内高效表达^[3-4]。该方法是1999年Liu *et al*^[3]建立起来的。他们发现裸质粒DNA经鼠尾静脉大容量快速的注射可引起实验鼠高度的转基因表达, 其中肝脏是该转基因表达的主要器官。

2 肝脏高水平的转基因表达及其在基因治疗中的重要性

Liu *et al*^[3]发现单次鼠尾静脉注射5 μg荧光素酶表达质粒即可引起高达45 μg/g肝组织荧光素酶蛋白的表达。已证实流体力学注射法具有较肌肉等组织电穿孔更加高效和稳定的外源基因转染效率^[5], 是迄今为止最有效的活体细胞基因转染方法。我们实验室曾采用该方法将绿色荧光蛋白(GFP)表达质粒注入小白鼠体内, 借助荧光显微镜我们观察到有接近45%的肝细胞表达GFP。

肝组织内如此高水平的转基因表达, 对于疾病的基因治疗很重要。因为肝脏是合成血清蛋白质的重要器官, 具有巨大的合成各种蛋白质的能力, 而各种有功能的活性蛋白质的产生是疾病治疗的基础。同时, 肝脏本身也易罹患各种遗传性和获得性疾病。因此, 肝脏已成为基因治疗的重要靶器官。

3 简单、安全的基因治疗方法

流体力学注射法仅通过单次的裸质粒静脉注

射即能引起肝脏较长时间的转基因表达,并能较长时间地使转基因表达的蛋白质维持于治疗水平。如质粒流体力学注射后,促红细胞生成素(Epo)在观察期12 wk内^[6],人 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶基因(hAAT)在观察期6 mo内^[7]仍有高表达并存在活性。而人因子IX基因(human factor IX)经流体力学转染实验鼠后,其表达的蛋白质在血清内维持于治疗水平达1.5 a之久^[8]。Rossmanith *et al*^[9]证实,质粒DNA“裸露”(nakedness)是流体力学注射法有效转染的基础,且随时间推移,细胞会逐渐失去质粒,即外源性基因在组织细胞的表达是暂时的、是非基因组整合的,因此并无宿主细胞插入突变之虞。同时,宿主也不存在对质粒产生超敏反应的问题。组织化学分析实验还证实,流体力学转染技术对组织的毒性影响是轻微的和短暂的^[6]。因此,流体力学注射法是一个简单、方便、安全和高效的活体内转基因或基因治疗方法。

4 治疗基因体内有效转染的机制

流体力学注射法引起肝组织高效转基因表达的机制目前仍未完全清楚。我们曾进行过流体力学注射和常规注射对实验鼠器官转基因表达的对比性研究,发现常规注射除引起了少量肾小球上皮细胞表达报告基因GFP外,肝、脾、心、肺和脑组织内并无GFP的表达;流体力学注射则仅引起肝组织内GFP的高水平表达,其他组织无GFP表达。因此,大容量快速注射是动物转基因表达的前提^[10]。

曾设想,流体力学注射可使大量结构完整的质粒DNA顺利到达肝细胞质膜,并认为这有助于延迟DNA的降解和促进肝细胞对质粒的摄取。但最近发现,流体力学注射法有效转染发生于注射后的极早过程,而该过程与DNA降解的延迟和大量DNA结合于肝细胞质膜无关^[11]。Andrianaivo *et al*^[11]认为流体力学注射法外源基因的有效表达是由小量快速进入胞质的DNA分子引起的,并认为这可能是注射后压力增高,引起了质膜孔洞的结果。该假说为Kobayashi *et al*^[12-13]的实验所证实,他们发现“流体力学”注射可暂时性地增加细胞膜的通透性,并认为流体力学注射法基因转染效率取决于尾静脉注射的大容量和高速度两方面的综合效应。Zhang *et al*^[14]的实验显示,流体力学注射可诱导暂时性心功能失调、静脉压力急剧升高、肝窗(liver fenestrae)扩大和肝细胞膜通透性增加。因此,流体力学注射至少可克服以

下3个物理性屏障:(1)注射部位(尾静脉)和靶器官(肝脏)之间的空间屏障;(2)肝窗的结构性屏障(阻止大分子接近肝实质细胞);(3)肝细胞的浆膜屏障(限制亲水性分子进入胞质)。3个物理性屏障的克服使得生物大分子如质粒DNA能极容易地进入细胞内。

5 治疗基因转染活体细胞的过程是非特异性的

流体力学注射后,质粒DNA进入细胞内是一个非特异的过程^[14],该过程所具有的物理特性使得任何可以注射的物质都可能有效地转导入细胞内。已证实质粒DNA无论呈线性还是超螺旋结构、大质粒或者小质粒,甚至其他DNA^[15]、反义寡核苷酸(AS ODN)^[16]、RNA^[17]、蛋白质(如抗体)及化学物质(如聚乙二醇)^[18]等都能极有效地通过流体力学注射法转入肝细胞内。另外,Hofman *et al*^[19]还将PCR扩增片段成功地通过流体力学注射转染入肝脏并得到高效表达,这给了我们一个重要的提示,即将来人们有可能通过人工合成基因的方法来治疗疾病。近年来流体力学注射法也开始应用于RNAi的活体研究,实验已证实siRNA表达质粒的动物活体转染能显著地使目标基因“沉寂”(silencing)^[20-22]。这一成果必将带来RNAi研究的新一轮热潮。因为无论对于体内基因功能的研究还是疾病的基因治疗,RNAi技术都提供了一个方便有效的手段。

6 对疾病模型动物基因治疗的研究

6.1 肿瘤的基因治疗研究 恶性肿瘤的基因治疗是目前基因治疗研究的热点之一。流体力学注射法已应用于多种肿瘤模型动物基因治疗的研究。例如,通过流体力学转染,IL-21基因抑制了荷瘤鼠B16黑素瘤和MCA205纤维肉瘤的生长,提高了动物的存活率^[23],干扰素质粒极显著地减小了结肠癌CT-26细胞的肝和肺转移^[24],TNF- α 质粒也极显著地减小了黑素瘤的肺内转移^[25]。抑癌基因NK4(HGF拮抗基因和血管形成抑制剂)的流体力学注射则显著地抑制了实验鼠结肠癌细胞的肝转移及继发性生长,抑制了癌细胞的肝内侵袭,并延长了动物生存率^[26]。而联合基因的流体力学注射被认为较单基因注射更加有效,如Wang *et al*^[27]同时注射IL-12和GM-CSF、Kim *et al*^[28]同时应用angiostatin K1-3和endostatin基因转染实验动物,发现均较单一基因的应用更有效地抑制肿瘤生长和肿瘤侵袭。

6.2 实验性自身免疫性心肌炎的治疗 鼠实验性

■研发前沿
流体力学注射法的安全性、器官靶向性及机制的研究是目前进行活体基因治疗研究的热点。

■应用要点

流体力学注射法是活体内基因治疗研究的重要工具。该方法以其高度的转染效率和器官靶向性,以及便捷安全的操作方法,必将在疾病基因治疗的临床应用发挥越来越大的作用。

自身免疫性心肌炎(experimental autoimmune myocarditis, EAM)是一种T细胞介导的、严重影响心肌的收缩和舒张功能的疾病。该疾病模型与人类巨细胞性心肌炎相似,并无有效的常规治疗方法,而基因治疗则能显著地逆转疾病的进程。经流体力学注射转染后,治疗基因如CTLA4-Ig通过阻断T细胞辅刺激信号^[29]、IL-13-Ig通过影响靶细胞CD11b(+)和NCNI细胞上的免疫分子的表达^[30]、IL-1RA-Ig通过抑制NCNI细胞前列腺素合成酶和IL-1以及淋巴细胞Th1细胞因子等的表达^[31]等方式,减小心肌炎症的面积、降低心脏重量和体重之间的比率、抑制心房肌基因的表达,并明显改善心功能和各项血流动力学参数。

6.3 新月体性肾小球肾炎的治疗 新月体性肾小球肾炎是一个进展迅速、病情严重并以Th1在肾小球占优势的疾病。最近Higuchi *et al*^[32]用vIL-10基因经流体力学注射转染模型鼠,发现鼠肝组织及血清内有高水平的vIL-10表达,并产生了明显的治疗效应,如抑制了新月体的形成、减少了肾小球内的细胞总数和巨噬细胞及CD4+T细胞数、降低了尿蛋白并改善了肾功能。

6.4 暴发性肝衰竭的基因治疗 急性性肝衰竭(acute liver failure, ALF)是常见的一种急重疾病,临床治疗棘手,病人死亡率高。Wang *et al*^[33]对TAA诱导的ALF实验鼠进行了基因治疗的研究,发现a-MSH基因的鼠尾静脉注射明显地减小了ALF鼠的死亡率,显著地改善了肝脏的组织学表现,使肝内TUNEL阳性细胞减少,并有效地防止了IκBα的降解和iNOS、TNF-α mRNA的上调。我们最近已成功地在新克隆的丝/苏氨酸激酶Pim-3基因通过流体力学注射方法转染入大鼠肝组织内,该基因在肝细胞内的有效表达几乎完全逆转了LPS/D-GalN诱导的肝细胞凋亡。

7 治疗方法的延伸

流体力学注射法的原理不仅适用于经鼠尾静脉注射的基因转染,而且适用于活体内其他管道的器官靶向性基因转染。最近,Maruyama *et al*^[34]通过大鼠肾静脉的逆行性注射,成功地将裸质粒DNA转染入肾脏。与其他活体肾靶向性基因转染方法^[35]相比,该方法具有简单、安全和高效率的特点,并能将目的基因转染入管周毛细血管附近的成纤维细胞,使其得到长期稳定的表达^[34]。Shimizu *et al*^[36]利用该技术将抗单核细胞化学趋化蛋白-1(antimonocyte chemoattractant

protein-1)基因转入肾脏后,显著地减轻了蛋白超负荷蛋白尿(protein-overload proteinuria)诱导的小管间质性肾损害。另外,Chen *et al*^[37]也将报告基因经由胆道成功地转染入肝细胞,并发现在胆道阻塞的情况下,转染效率更高。

8 结语

外源目的基因在动物活体细胞内的有效表达是进行基因治疗研究的基础,肝脏以其巨大的合成蛋白质的能力成为进行基因治疗最重要的靶器官,流体力学注射法以其高度的肝靶向性基因转染效率正在日益成为人们进行基因治疗研究的重要工具。然而,任何事物都存在两面性,高流量液体全身注射在引起肝组织高转染效率的同时,势必对动物心肺功能带来很大的负面影响。虽然目前绝大多数作者认为这种影响是暂时性的,停止注射后动物能很快恢复且不遗留任何组织的损伤,但我们通过实验发现,注射速度过快容易引起动物发生心脏衰竭和呼吸衰竭(心肺复苏后多数动物能恢复)。因此,适当的注射速度是保证转染的高效率和动物安全性的关键。作为目前最高效和便捷的活体基因转染方法,流体力学注射技术已在基因治疗的研究中发挥着越来越大的作用。我们认为,利用流体力学的原理结合局部靶器官的注射有可能完全消除全身液体注射对循环造成的不良影响,为疾病基因治疗的临床应用开辟一条坦途。

9 参考文献

- 1 Check E. Cancer risk prompts US to curb gene therapy. *Nature* 2003; 422: 7
- 2 Marwick C. FDA halts gene therapy trials after leukaemia case in France. *BMJ* 2003; 326: 181
- 3 Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther* 1999; 6: 1258-1266
- 4 Zhang G, Budker V, Wolff JA. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 1735-1737
- 5 Jiang J, Yamato E, Miyazaki J. Intravenous delivery of naked plasmid DNA for *in vivo* cytokine expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289: 1088-1092
- 6 Maruyama H, Higuchi N, Nishikawa Y, Kameda S, Iino N, Kazama JJ, Takahashi N, Sugawa M, Hanawa H, Tada N, Miyazaki J, Gejyo F. High-level expression of naked DNA delivered to rat liver via tail vein injection. *J Gene Med* 2002; 4: 333-341
- 7 Zhang G, Song YK, Liu D. Long-term expression of human alpha1-antitrypsin gene in mouse liver achieved by intravenous administration of plasmid DNA using a hydrodynamics-based procedure. *Gene Ther* 2000; 7: 1344-1349
- 8 Miao CH, Thompson AR, Loeb K, Ye X. Long-term

- and therapeutic-level hepatic gene expression of human factor IX after naked plasmid transfer *in vivo*. *Mol Ther* 2001; 3: 947-957
- 9 Rossmannith W, Chabicovsky M, Herkner K, Schulte-Hermann R. Cellular gene dose and kinetics of gene expression in mouse livers transfected by high-volume tail-vein injection of naked DNA. *DNA Cell Biol* 2002; 21: 847-853
 - 10 Lecocq M, Andrianaivo F, Warnier MT, Wattiaux-De Coninck S, Wattiaux R, Jadot M. Uptake by mouse liver and intracellular fate of plasmid DNA after a rapid tail vein injection of a small or a large volume. *J Gene Med* 2003; 5: 142-156
 - 11 Andrianaivo F, Lecocq M, Wattiaux-De Coninck S, Wattiaux R, Jadot M. Hydrodynamics-based transfection of the liver: entrance into hepatocytes of DNA that causes expression takes place very early after injection. *J Gene Med* 2004; 6: 877-883
 - 12 Kobayashi N, Nishikawa M, Takakura Y. The hydrodynamics-based procedure for controlling the pharmacokinetics of gene medicines at whole body, organ and cellular levels. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57: 713-731
 - 13 Kobayashi N, Nishikawa M, Hirata K, Takakura Y. Hydrodynamics-based procedure involves transient hyperpermeability in the hepatic cellular membrane: implication of a nonspecific process in efficient intracellular gene delivery. *J Gene Med* 2004; 6: 584-592
 - 14 Zhang G, Gao X, Song YK, Vollmer R, Stolz DB, Gasiorowski JZ, Dean DA, Liu D. Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery. *Gene Ther* 2004; 11: 675-682
 - 15 Yang PL, Althage A, Chung J, Chisari FV. Hydrodynamic injection of viral DNA: a mouse model of acute hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 13825-13830
 - 16 Yokoi H, Mukoyama M, Nagae T, Mori K, Suganami T, Sawai K, Yoshioka T, Koshikawa M, Nishida T, Takigawa M, Sugawara A, Nakao K. Reduction in connective tissue growth factor by antisense treatment ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1430-1440
 - 17 Chang J, Sigal LJ, Lerro A, Taylor J. Replication of the human hepatitis delta virus genome is initiated in mouse hepatocytes following intravenous injection of naked DNA or RNA sequences. *J Virol* 2001; 75: 3469-3473
 - 18 Kobayashi N, Kuramoto T, Yamaoka K, Hashida M, Takakura Y. Hepatic uptake and gene expression mechanisms following intravenous administration of plasmid DNA by conventional and hydrodynamics-based procedures. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 297: 853-860
 - 19 Hofman CR, Dileo JP, Li Z, Li S, Huang L. Efficient *in vivo* gene transfer by PCR amplified fragment with reduced inflammatory activity. *Gene Ther* 2001; 8: 71-74
 - 20 Kobayashi N, Matsui Y, Kawase A, Hirata K, Miyagishi M, Taira K, Nishikawa M, Takakura Y. Vector-based *in vivo* RNA interference: dose- and time-dependent suppression of transgene expression. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 308: 688-693
 - 21 Matsui Y, Kobayashi N, Nishikawa M, Takakura Y. Sequence-specific suppression of *mdr1a/1b* expression in mice via RNA interference. *Pharm Res* 2005; 22: 2091-2098
 - 22 Takahashi Y, Nishikawa M, Kobayashi N, Takakura Y. Gene silencing in primary and metastatic tumors by small interfering RNA delivery in mice: quantitative analysis using melanoma cells expressing firefly and sea pansy luciferases. *J Control Release* 2005; 105: 332-343
 - 23 Wang G, Tschoi M, Spolski R, Lou Y, Ozaki K, Feng C, Kim G, Leonard WJ, Hwu P. *In vivo* antitumor activity of interleukin 21 mediated by natural killer cells. *Cancer Res* 2003; 63: 9016-9022
 - 24 Kobayashi N, Kuramoto T, Chen S, Watanabe Y, Takakura Y. Therapeutic effect of intravenous interferon gene delivery with naked plasmid DNA in murine metastasis models. *Mol Ther* 2002; 6: 737-744
 - 25 Kitajima M, Tsuyama Y, Miyano-Kurosaki N, Takaku H. Anti-tumor effect of intravenous TNF- α gene delivery naked plasmid DNA using a hydrodynamics-based procedure. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2005; 24: 647-650
 - 26 Wen J, Matsumoto K, Taniura N, Tomioka D, Nakamura T. Hepatic gene expression of NK4, an HGF-antagonist/angiogenesis inhibitor, suppresses liver metastasis and invasive growth of colon cancer in mice. *Cancer Gene Ther* 2004; 11: 419-430
 - 27 Wang Z, Qiu SJ, Ye SL, Tang ZY, Xiao X. Combined IL-12 and GM-CSF gene therapy for murine hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther* 2001; 8: 751-758
 - 28 Kim KS, Park YS. Antitumor effects of angiostatin K1-3 and endostatin genes coadministered by the hydrodynamics-based transfection method. *Oncol Res* 2005; 15: 343-350
 - 29 Abe S, Hanawa H, Hayashi M, Yoshida T, Komura S, Watanabe R, Lie H, Chang H, Kato K, Kodama M, Maruyama H, Nakazawa M, Miyazaki J, Aizawa Y. Prevention of experimental autoimmune myocarditis by hydrodynamics-based naked plasmid DNA encoding CTLA4-Ig gene delivery. *J Card Fail* 2005; 11: 557-564
 - 30 Elnaggar R, Hanawa H, Liu H, Yoshida T, Hayashi M, Watanabe R, Abe S, Toba K, Yoshida K, Chang H, Minagawa S, Okura Y, Kato K, Kodama M, Maruyama H, Miyazaki J, Aizawa Y. The effect of hydrodynamics-based delivery of an IL-13-Ig fusion gene for experimental autoimmune myocarditis in rats and its possible mechanism. *Eur J Immunol* 2005; 35: 1995-2005
 - 31 Liu H, Hanawa H, Yoshida T, Elnaggar R, Hayashi M, Watanabe R, Toba K, Yoshida K, Chang H, Okura Y, Kato K, Kodama M, Maruyama H, Miyazaki J, Nakazawa M, Aizawa Y. Effect of hydrodynamics-based gene delivery of plasmid DNA encoding interleukin-1 receptor antagonist-Ig for treatment of rat autoimmune myocarditis: possible mechanism for lymphocytes and noncardiac cells. *Circulation* 2005; 111: 1593-1600
 - 32 Higuchi N, Maruyama H, Kuroda T, Kameda S, Iino N, Kawachi H, Nishikawa Y, Hanawa H, Tahara H, Miyazaki J, Gejyo F. Hydrodynamics-based delivery of the viral interleukin-10 gene suppresses experimental crescentic glomerulonephritis in Wistar-Kyoto rats. *Gene Ther* 2003; 10: 1297-1310
 - 33 Wang CH, Javan B, Lee TH, Hung KS, Chou WY, Lu CN, Liu JK, Chen YJ. Single injection of naked plasmid encoding α -melanocyte-stimulating

名词解释

流体力学注射法: 是一种快速大容量的裸质粒溶液的体内注射方法。借助该方法, 目的或治疗基因可经鼠尾静脉(或其他血管、管腔)转染动物活体器官, 并在靶器官内高效表达。

■同行评价

文章层次、条理分明,用词准确,具有可读性和科学性,对基因治疗研究具有指导意义,总体评价较好.

- hormone protects against thioacetamide-induced acute liver failure in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322: 153-161
- 34 Maruyama H, Higuchi N, Nishikawa Y, Hirahara H, Iino N, Kameda S, Kawachi H, Yaoita E, Gejyo F, Miyazaki J. Kidney-targeted naked DNA transfer by retrograde renal vein injection in rats. *Hum Gene Ther* 2002; 13: 455-468
- 35 Tsujie M, Isaka Y, Ando Y, Akagi Y, Kaneda Y, Ueda N, Imai E, Hori M. Gene transfer targeting interstitial fibroblasts by the artificial viral envelope-type hemagglutinating virus of Japan liposome method. *Kidney Int* 2000; 57: 1973-1980
- 36 Shimizu H, Maruyama S, Yuzawa Y, Kato T, Miki Y, Suzuki S, Sato W, Morita Y, Maruyama H, Egashira K, Matsuo S. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates renal injury induced by protein-overload proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1496-1505
- 37 Chen CY, Liu HS, Lin XZ. Hydrodynamics-based gene delivery to the liver by bile duct injection of plasmid DNA--the impact of lasting biliary obstruction and injection volume. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 25-28

电编 李琪 编辑 张焕兰

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

● 消息 ●

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.

取样胶囊吸取胃液的模拟实验分析与研究

黄华, 邱颖, 朱文坚, 黄平

黄华, 邱颖, 解放军广州疗养院 广东省广州市 510515
朱文坚, 黄平, 解广州华南理工大学机械工程学院 广东省广州市 510640
广州市科技计划项目资助 No.2005Z3-E0341
通讯作者: 黄华, 510515, 广东省广州市, 解放军广州疗养院.
huangyue1992@tom.com
电话: 020-61657543
收稿日期: 2006-08-14 接受日期: 2006-09-12

摘要

取样胶囊主要是吸取人体消化道内的消化液进行研究, 本文以胃液为例, 对取样胶囊吸取消化液进行探讨, 分析在取样胶囊的研究中选取何种吸附材料最合适. 首先对胃液成分进行分析, 然后配置模拟胃液, 选取六种不同吸附材料进行了吸附实验, 并按实验结果绘制了不同的吸附曲线. 由实验结果, 对各种材料的吸附量、吸附稳定性和可靠性等进行了对比分析, 同时还对取样机构模型设计的简单化因素进行分析. 最后得出结论, 认为德制胶棉在各个因素上都有明显的优势, 适宜作为取样胶囊中的吸附材料.

关键词: 取样胶囊; 胃液; 吸附

黄华, 邱颖, 朱文坚, 黄平. 取样胶囊吸取胃液的模拟实验分析与研究. 世界华人消化杂志 2006;14(28):2785-2788
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2785.asp>

0 引言

近年来随着科学技术的发展, 医疗相关技术与设备的开发研制迅速崛起. 其中医疗微机器人更是得到前所未有的发展, 成为目前国内外研究的热点. 美国、日本、以色列等国家在这方面的技术处于世界领先地位. 其中, 以色列的医用胃肠道内微型机器人研究成果格外引人注目, 也已在全世界范围内得到了推广应用^[1-4]. 近年来, 我国在医疗微机器人研究也在快速发展中, 国内等都各自有不少研究成果^[5-7]. 传统上对人体消化道系统疾病的诊断和治疗是运用导管式内窥镜, 但存在不少弊端, 医疗微机器人的出现则给患者带来福音, 不但诊断时更安全舒适, 而且诊断范围能扩大到传统内窥镜所不能检测的

小肠段等. 现阶段已投入临床使用的是窥视胶囊, 给药、取样等功能的被动式微机器人的研究正在进行中. 其中用于取样的微机器人主要是吸取人体消化道内的消化液进行研究, 吸取的消化液可用于病例诊断或科学研究等^[8-9]. 在取样胶囊的研究中, 用来吸取消化液的材料的选取是关键, 本文以吸取胃液为例, 从分析胃液成分入手, 配置模拟胃液, 然后进行不同材料的吸附实验, 最后进行分析比较得出结论.

1 胃液的分析 and 模拟胃液配置

1.1 胃液成分分析 胃液是由许多成分组成的复杂系统, 如盐酸、胃蛋白酶、黏液、胆汁酸、DNA和其他蛋白质. 其中, 蛋白质占有一定的比例, 主要是糖蛋白. 胃是含多种分泌细胞的消化器官, 胃液因直接与胃黏膜接触, 能较敏感的反映胃的病变. 胃液成分的变化可以在相当程度上显示胃的功能状况. 当胃黏膜发生病变时, 其分泌功能也发生变化, 胃液蛋白质成分和浓度也会发生改变. Lowry法结合CEA检测, 测定了一组胃癌患者的胃液蛋白含量, 取95%可信度, 胃液蛋白质含量的临界值为7.7 g/L, >7.7 g/L判为阳性, 否则为阴性. 结果表明, 胃癌组的胃液蛋白质含量显著高于除胃炎异型增生以外的任何一组的蛋白质水平($P<0.01$), 胃癌敏感度65%, 特异性86.7%, 准确性81.6%, 2例早期胃癌中一例阳性. 慢性胃炎伴异型增生的胃液蛋白质含量与胃癌和胃溃疡组比较无显著差异($P>0.05$), 但高于其他4组的蛋白质水平, 其阳性率为38.5%. 肠化生和不伴肠化生两组间无显著性差异. 胃溃疡和十二指肠溃疡的胃液蛋白水平也无显著性差异. 在胃液蛋白质水平与年龄作相关分析, 发现两者呈正相关, 随着年龄的增大, 胃液蛋白质呈升高趋势. 此外胃癌患者胃液蛋白质的SDS-PAGE结果可出现13条区带, 而正常人只有8条区带以下. Moschi *et al*结果显示, 胃癌患者胃液中的酸性糖蛋白含量明显高于正常对照组, 并把他作为诊断胃癌的一项有效指标.

一般认为, 造成胃液蛋白质升高的原因是,

■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。

表 1 模拟胃液配置比例和实验测量的黏度数据

编号	黏液	水	平均黏度	黏度偏差
1	7.5	1	95.5	$\pm 0.52\%$
2	4.5	1	31.9	$\pm 1.25\%$
3	4.17	1	25.5	$\pm 1.18\%$

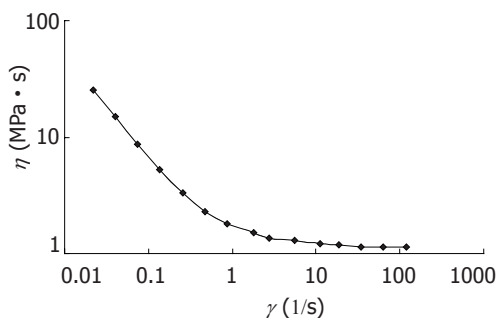


图 1 同心圆筒黏度计测试的胃液的流变特性。

肿瘤对胃壁的破坏和浸润,使细胞内成分分解进入胃液;肿瘤本身分泌和脱落的蛋白质成分进入胃液等是胃蛋白质含量升高的原因,此外,当胃、十二指肠发生炎症或其他病变时,由于炎症使黏膜微循环及细胞膜通透性增加,甚或细胞死亡,使包括蛋白质在内的血浆成分和细胞内容物进入胃液,使胃液蛋白质升高。因此,测定胃液蛋白质含量协助胃癌、胃十二指肠炎症、溃疡的诊断具有重要的临床意义^[9]。

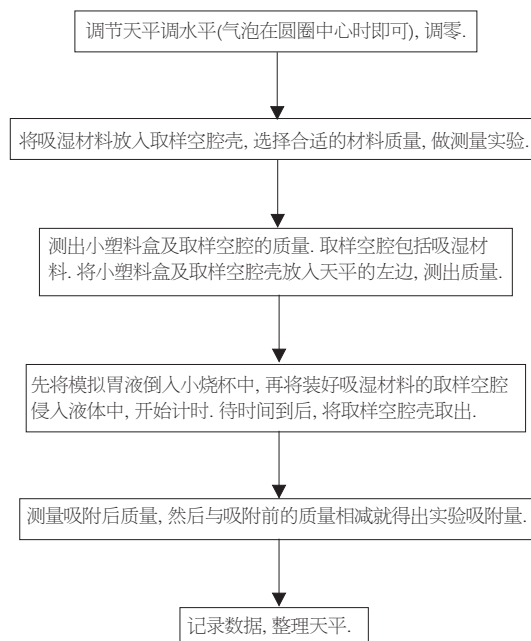
1.2 模拟胃液的配置 胶囊在体内吸附胃液时,影响吸附效果的主要因素是黏度,因此实验首先需要配置类似胃液黏度的液体,称“模拟胃液”。胃液是一种剪切减薄性非牛顿液体,他的黏度是随着剪切速率的变化而变化的。而在吸附实验中由于吸附速度和孔都很小,所以剪切速率也很小,因此配置的模拟胃液可黏度稍大,若实验成功,则实际黏度更小的胃液更容易吸附。图1是采用的仪器是日本产的Low-shear30同心圆筒黏度计测试的胃液的流变特性^[10]。图中,横坐标 γ 为剪切速率,单位为1/s;纵坐标 η 为动力黏度,单位是mPa·s。

从图中可以看出,随着剪切速率 γ 的增大,胃液的黏度 η 迅速下降;但剪切速率 γ 增大到一定程度后,胃液的黏度 η 趋势近一常数,并基本不再随剪切速率 γ 的增大而下降。根据图1的人的胃液流变特性,配置胃液在小剪切速率下的黏度。则配置黏度为25.4 MPa·s左右的模拟胃液,模拟胃液采用黏度为94 MPa·s的黏液和水来调和配置。表1给出了3种黏液和水配置比例、在室温条件下实验测量的黏度数据和黏度的偏差。通

过与图1的比较,本文采用的吸附实验以第3种配比液进行。

2 吸附实验

2.1 实验方法 由于“胶囊”在胃肠道中取样口与胃液接触的方式有很多种,而且胶囊在胃肠道中是不断蠕动的,但取样的时间有限,为保证取样的可靠性和稳定性,必须要求纤维有较强的吸湿性。本实验对多种吸湿材料用实验的方法进行对比、分析,在小烧杯放入合适量的模拟胃液,然后在取样空腔壳中放入适量的吸湿材料,在规定时间内测出吸附模拟胃液的质量,为了减小取样口与胃液的表面张力,将吸湿材料露出取样口,克服表面张力的同时将胃液导入空腔内,完成取样。测量标准可参见文献[11]。实验仪器及用具:小容量烧杯1个,取样空腔壳5个,镊子,小塑料盒1个,毛巾,秒表, TG322A型微量分析天平。实验步骤如下:



2.2 实验结果 吸附主要分为3个阶段:(1)接触期,(2)快速吸附期,(3)填充期。一般材料在2-5 min内会完成这3个阶段。每一种材料由于本身的特性,形态的不同而影响他的吸附性能。了解每种材料的吸附原理可以使其发挥最好的吸附能力,达到微胶囊所需的要求。表2给出了实验所采用的6种吸附材料,他们分别是:脱脂棉、精制棉、棉线、普通海绵、进口抹布和德制胶棉的主要吸附特性、实验表现和对其性能的评议与结论。图2中给出了由具体实验数据绘制的本实验采用的6种材料的实验结果曲线,可以看出:随着时间的增加,吸附重量增加。但是,在前60 s

表 2 吸附材料特性、实验表现及其评价

编号	材料	主要吸附特性	实验表现	评议或结论
1	脱脂棉	主要是医用, 其吸水能力比较弱, 在取样空腔中吸附液体主要是靠引流进行取样, 可能出现倒流现象.	实验中, 2 min内可以吸附较大的液体, 但这对灌装脱脂棉的要求很高, 而且为了破坏样液的表面张力, 必须有少量纤维露出取样口.	由于必须将少量细纤维露出取样口, 在脱脂棉充满整个取样空腔的同时, 为避免倒流, 要求棉花取样口与周围均匀的连接.
2	精制棉	精制棉与脱脂棉的吸附原理很相似, 都是主要靠引流来完成吸附.	精制棉之间有很多细小的棉絮, 这些棉絮对引流有阻碍的作用.	吸附效果相对脱脂棉弱一些.
3	棉线	吸水能力较好, 主要靠吸水性和导流完成吸附.	前1 min主要靠吸水及其引流, 待空腔内液体多些时, 加快了吸附速度. 但也要将少量纤维露出取样口, 露出取样口那部分棉线再分别导入其他棉线中.	棉线最大的缺点是为了破坏表面张力必须有少量棉线露出取样口, 这对模型上的设计增加了很大的困难. 若特制“单头多尾”的棉线, 吸附效果应该会更好.
4	普通海绵	海绵的吸水性一般, 但本身的结构有较好的引流性能.	实验时只需要将少量海绵与取样空腔外表面齐平就可吸附到液体, 通过海绵内部的细孔将液体导入整个空腔.	放入空腔的海绵不宜太多, 在松弛的状态下充满空腔, 并且与空腔壁有少量间隙为佳.
5	进口抹布	有很强的吸水性, 但引流能力比较差、结构较紧密.	实验中由于引流差, 所以影响了吸附速度, 另外其结构紧密, 使得吸附量相对较少.	吸水性较强, 较稳定, 且不用破坏液体表面张力就能吸附到液体, 可减少模型设计的困难.
6	德制胶棉	吸水性很强, 类似于海绵的结构, 并有较好的引流性能.	在接触液体后, 吸附速率非常快, 约15 s就能充满整个取样空腔, 在2 min内基本上都能够吸附到足够的液体.	超强的吸水性能避免破坏液体表面张力的步骤, 减小了模型设计的困难.

■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.

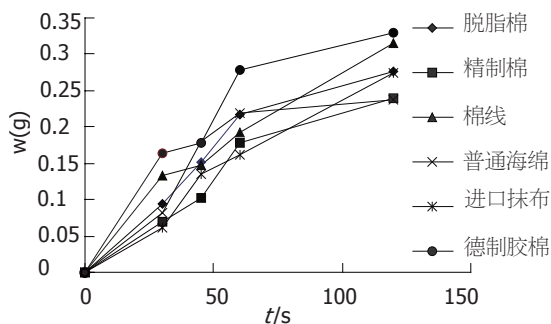


图 2 六种材料吸附实验结果曲线.

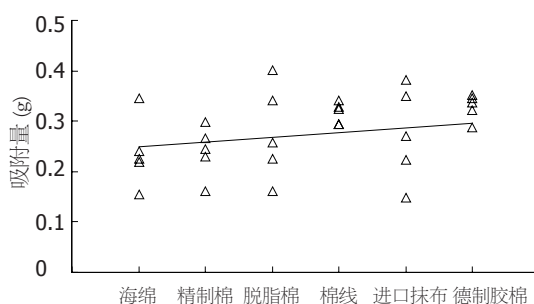


图 3 吸附量趋势比较图.

表 3 各材料吸附量mean与σ

编号	脱脂棉	精制棉	棉线	普通海绵	进口抹布	德制胶棉
mean	0.2769	0.2395	0.3145	0.2368	0.2749	0.3288
σ	0.0427	0.0228	0.0097	0.0308	0.0424	0.0114

的时间里, 通常吸附速度较大(即曲线斜率大), 而当时间继续增加时, 吸附速度有所减慢; 从总体吸附过程来看, 吸附性能由好至差的排序依次是: 德国胶棉、棉线、脱脂棉、进口抹布、精制棉和普通海绵. 2 min时的最大吸附量相差 25.81%.

2.3 讨论与结论 选择最合适的吸附材料是综合了材料的吸附量、吸附稳定性、可靠性及其可行性以及对取样机构模型设计的简单化等多方面的因素. (1)材料吸附量的对比分析:

由图3的趋势曲线图可以很明显的可以看出, 德制胶棉平均吸附量在任何时间段都处于

其他曲线的上方, 即他的平均吸附量具有明显的优势. 平均吸附量稍差的是棉线, 他在前1 min内吸附量相对偏低, 但在第2 min内速度有所提高, 最终也有较为充足的吸附量. 而精制棉和海绵的相对与前2种材料在2 min内的吸附量偏低, 进口抹布在前1 min内吸附速度比较缓慢, 从第2 min速度开始加快, 脱脂棉则比较平均. (2)材料吸附稳定性、可靠性的对比分析: 对测试数据可以以吸附的均值 \bar{x} 和方差 σ 来分析. 计算如下:

$$\text{mean为: } \bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad \sigma \text{为: } \sigma_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$$

■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。

对测量结果计算如表3所示: 以2 min吸附量数据为标准, 根据上表来对比各种材料吸附量和稳定性. 其中 \bar{x} 越大说明材料的吸附量也越大; 而 σ 越小, 表明每次吸附量与平均值越接近, 因此吸附的稳定性越高. 由表3样本平均值标准偏差的估计值可知, 棉线和德制胶棉的吸附稳定性比较好, 而其他4种材料均比较差, 且脱脂棉和进口抹布的稳定性最差, 最大值同最小值相差超过一倍. (3)对取样机构模型设计的简单化因素的分析及其可行性:

吸附性能主要是综合材料的吸水能力和引流性能好坏, 只有吸水能力很强的材料才不必破坏液体与取样空腔表面的液体张力, 就可以吸附到液体, 在本实验的6种材料中只有进口抹布和德制胶棉有很强的吸水能力, 两种材料的形态也都很适合放入取样空腔, 受时间、运输等外部因素对他的吸附性能影响比较小.

总之, 通过对以上实验的综合分析, 以及对以上几种因素讨论表明: 德制胶棉在各个因素上都有明显的优势, 较适合作为胶囊取样机构的吸附材料.

3 参考文献

- 1 Etsuko Kobayashi, Kim Daeyong, Ichiro Sakuma, Takeyoshi Dohi. A new wide-angle view endoscopic robot using wedge prisms. *International Congress Series* 2001; 149-153
- 2 J Peirs, D Reynaerts, H Van Brussel. Design of miniature parallel manipulators for integration in a self-propelling endoscope. *Sensors and Actuators* 2000; 409-417
- 3 Charles Mosse, Tim Mills, Mark appleyard, Paul Swain. Electrostimulation to move endoscopes in the small bowel. *Proc. SPIE*, 2005; 4158: 24-28
- 4 Tong Boon Tang, Erik A Johannessen, Lei Wang, Alexander Astaras, Mansour Ahmadian, Alan F Murray, Jonathan M Cooper, Steve P Beaumont, Brian W Flynn, and David R S Cumming. Toward a Miniature Wireless Integrated Multisensor Microsystem for Industrial and Biomedical Applications. *Iee Sensors Journal* 2002; 2: 628-635
- 5 岑人经. 生物力学与临床研究. 广州: 华南理工大学出版社, 1993
- 6 孙立宁, 刘品宽, 吴善强, 刘涛. 管内移动微型机器人研究与发展现状. *光学精密工程* 2003; 11:326-332
- 7 皮喜田, 郑小林. 基于的消化道微型诊疗系统研究进展. *中国医疗器械信息* 2005; 11: 18-20
- 8 王亚珍, 朱文坚, 黄平. 胶囊式胃肠道取样微机电系统的设计研究. *现代制造工程* 2004; 5: 16-18
- 9 黄华艺. 胃液蛋白质含量测定及其临床意义. *临床荟萃* 1998; 13: 585-586
- 10 周银生, 吴江红, 朱永清, 程西云, 韦云隆. 人体胃液的流变性能研究. *润滑与密封* 2000; 3: 37-38
- 11 黄长艺, 卢文祥, 熊诗波. 机械工程测量与试验技术. 北京: 机械工业出版社 2000

电编 李琪 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

国际会议

American College of Gastroenterology
Annual Scientific
20-25 October 2006
Las Vegas, NV

71st ACG Annual Scientific and
Postgraduate Course
20-25 October 2006
Venetian Hotel, Las Vegas, Nevada
The American College of
Gastroenterology

AASLD 57th Annual - The Liver Meeting™
27-31 October 2006
Boston, MA
AASLD

9th World Congress on Gastrointestinal Cancer
20-23 June 2007
Barcelona
Imedex
meetings@imedex.com

TGF- β 家族在肝纤维化中的不同作用及对策

余姣, 徐可树

余姣, 徐可树, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科 湖北省武汉市 430022

通讯作者: 徐可树, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科. xuzou@medmail.com.cn
电话: 027-67119890

收稿日期: 2006-07-10 接受日期: 2006-07-31

摘要

转化生长因子 β (TGF- β)是一组多功能多肽生长因子, 参与细胞生长分化、免疫调节、伤口愈合、血管形成、胚胎形成和细胞凋亡等。迄今为止, 哺乳动物类发现有3种TGF- β , 即TGF- β 1, TGF- β 2和TGF- β 3。尽管在许多实验中3种TGF- β 生物行为相似, 但是在胚胎形成、组织纤维化及伤口愈合过程中他们的调控机制及表达各不相同, 尤其在肝纤维化形成过程中起着不同的作用, 本文就TGF- β 3种亚型与肝纤维化之间关系的最新研究进展作一综述。

关键词: 转化生长因子 β ; 肝纤维化

余姣, 徐可树. TGF- β 家族在肝纤维化中的不同作用及对策. 世界华人消化杂志 2006;14(28):2789-2792

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2789.asp>

0 引言

肝纤维化形成过程包括一系列细胞因子和化学介质共同作用于肝星状细胞(HSC)使其激活, 产生大量的细胞外基质(ECM), 此外, 肝内金属蛋白酶(MMP)活性下降, 金属蛋白酶抑制剂(TIMPS)产生过多, 致使ECM降解减少, 从而ECM在肝内大量沉积^[1-4]。TGF- β 作为重要的细胞因子参与了肝纤维化的发生、发展。我们旨在阐述TGF- β 3种亚型在肝纤维化中的不同作用及相应的治疗对策。

1 转化生长因子 β 家族(TGF- β s)

TGF- β 最早由Delarco和Todoro从鼠肉瘤病毒转化的3T3细胞无血清培养液中分离得到, 是一组诱导非瘤细胞表达转化表型的多肽类物质, 其结构是由2个相同或相近的 M_r 1215000亚单位借二硫键连接的同源或异源二聚体碱性

蛋白组成。人类TGF- β 主要由血小板、活化的单核细胞及巨噬细胞等合成。自然界存在5种TGF- β , 在哺乳动物中发现3种类型的TGF- β , 即TGF- β 1, TGF- β 2和TGF- β 3。3者氨基酸序列有60%-80%相同, 且生物活性相似。人TGF- β 1基因位于染色体19q13.1-q13.3, TGF- β 2基因位于1q41, TGF- β 3基因位于染色体14q23-q24, 3者序列都高度保守。许多细胞表面都有转化生长因子 β 受体(TGF- β R)。TGF- β R存在着3种形式, M_r 为53000, 70000-85000和250000-350000。I, II, III型TGF- β R均为糖蛋白, TGF- β R I和TGF- β R II属于跨膜Ser/Thr激酶受体家族, 具有内在的激酶活性, 是介导TGF- β 信号转导所必需的。TGF- β R III胞内段缺乏激酶活性, 不直接参与信号转导, 主要调节TGF- β 同信号受体的结合。他与TGF- β 1, TGF- β 2和TGF- β 3 3者的亲和力相似^[5]。TGF- β 与TGF- β R II结合, 形成复合物, 此时, TGF- β 构象改变, 被TGF- β R I所识别并结合形成TGF- β R II/TGF- β /TGF- β R I 三聚体。复合物中的TGF- β R I被TGF- β R II磷酸化而活化, 活化的TGF- β R I发挥其激酶作用, 使位于细胞质的受体特异性Smad2和Smad3在靠近C2末端的SSXS序列处磷酸化, 磷酸化的Smad2和Smad3与Smad4形成复合物后进入细胞核, 与其他转录因子共同调节相应靶基因转录, 在细胞水平介导TGF- β 的生物学效应^[6-10]。此外, Smad分子作为细胞内TGF- β 信号转导的中介, 可与TGF- β 反应元件(T β RE)相结合, 并刺激CoL1A2 [α 2(I)胶原基因上游序列]转录。有研究显示, 在活化的HSC中, TGF- β /Smad信号的异常加快了胶原基因的转录。原代培养的成纤维细胞(FSC)予TGF- β 处理后, CoL1A2转录可增加10倍^[11]。Dooley *et al*^[12]在研究TGF- β 1诱导的Smad2磷酸化时发现, HSC和转分化成纤维细胞(MFB)对TGF- β 1会产生不同的反应。在HSC中TGF- β 1依赖的磷酸化Smad2明显升高, 而在MFB中, 磷酸化的Smad2数量较少。进一步研究发现, 导致此种现象不是由于磷酸化的Smad2快速降解, 而是TGF- β 信号转导下降所致。研究还显示, TGF- β 1可通过HSC上TGF- β

■背景资料

TGF- β 家族与肝纤维化的发生、发展密切相关, 本文旨在总结TGF- β 1, TGF- β 2和TGF- β 3在肝纤维化中的不同作用及对策。目前关于TGF- β 3在肝纤维化发生、发展中的作用相关报道甚少, TGF- β 3是否具抗肝纤维化的作用以及其作用机制尚待进一步研究。

■同行评价

本文选题合理, 综述内容与题目相符, 基本上阐述了TGF- β 家族在肝纤维化中的不同作用, 在一定程度上反映了该领域学术界的研究现状, 内容详实, 条理清楚, 依据基本充分。

II型受体激活细胞外信号调节激酶(RAS/ERK), 而作用于转录因子SSP-1, NF-1, 增强前胶原 $\alpha 1(I)$ 基因转录, 从而刺激胶原及纤维结合蛋白的表达^[13]。TGF- $\beta 1$ 还能刺激HSC合成透明质酸及硫酸软骨素。

2 TGF- β 与肝纤维化

2.1 TGF- β s在肝脏中的定位和表达 在正常肝组织中, TGF- $\beta 1$ 主要表达于枯否细胞, TGF- $\beta 2$ 与TGF- $\beta 3$ 的表达则远弱于TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 3$ 仅在HSC表达。在肝纤维化组织中, TGF- $\beta 1$ mRNA大量表达于所有窦内皮细胞, 而TGF- $\beta 2$ 和TGF- $\beta 3$ 则不能被检测到。Demirci *et al*^[14]检测了具有排斥反应的肝移植患者的肝组织, 同样发现TGF- $\beta 1$ 主要表达于巨噬细胞, TGF- $\beta 3$ 也主要存在于HSC。且其分布与肌腱蛋白(一种与早期基质形成有关的ECM分子)一致, 说明TGF- $\beta 3$ 可能参与了纤维化形成的早期阶段。Wickert *et al*^[15]采用实时定量PCR检测HSC转化为肌成纤维细胞(FSC)过程中TGF- β 3种亚型mRNA表达, 结果表明, 在绝大多数样本中TGF- $\beta 1$ 为主要亚型, TGF- $\beta 3$ 次之, TGF- $\beta 2$ 含量极少。静止和活化的肝HSC中均可见TGF- $\beta 1$ 和TGF- $\beta 3$ mRNA的表达, 而TGF- $\beta 2$ mRNA仅检测到极低浓度。放射线照射肝脏的后期可导致肝纤维化, Seong *et al*^[16]研究了在肝纤维化发生之前是否存在TGF- β 表达的早期改变。以 γ 射线照射SD大鼠28 d, 并且依次处死照射0-28 d的大鼠。结果显示, 肝脏被照射28 d后虽没有发生纤维化, 但TGF- $\beta 1$ 和TGF- $\beta 3$ mRNA的表达各具不同: TGF- $\beta 1$ mRNA水平逐渐升高, 在28 d时达到最高水平, 而TGF- $\beta 3$ mRNA则由第7天的**高峰水平逐渐降低到28 d时的最低水平。免疫组化也证实了TGF- $\beta 1$ 和TGF- $\beta 3$ 蛋白的表达呈同样的变化趋势, 这些说明在射线照射后的早期就存在TGF- β 表达的改变, 而TGF- $\beta 1$ 和TGF- $\beta 3$ mRNA的表达模式的不同提示: 在放射性肝纤维化形成过程中, TGF- $\beta 1$ 具有促纤维化作用, 而TGF- $\beta 3$ 可能具有抗纤维化形成的作用。

2.2 TGF- β 在肝纤维化中的作用 已有文献报道, TGF- β 在肝纤维化发生、发展中的作用: (1)促进HSC转化为FSC, 并刺激FSC合成ECM^[17-18]; (2)抑制胶原酶及基质降解, 刺激TIMP产生, 抑制MMP的活性^[19-20]; (3)刺激枯否细胞的活化和迁移, 并分泌某些细胞因子如IL-2, 6等; (4)提高细胞黏附分子的作用, 引起炎症反应; (5)对FSC、

单核细胞有趋化作用等^[21-22]。张立煌 *et al*^[23]研究发现, 各型肝炎患者TGF- $\beta 1$ 活性较正常对照组都明显增高, 随着病情的发展, TGF- $\beta 1$ 活性逐渐增高, III型前胶原(PC III)、透明质酸(HA)、层黏蛋白(LN)含量也明显增加。Wu *et al*^[24]研究发现, 随着肝纤维化进展, TGF- $\beta 1$ 的血浆水平, α -肌动蛋白(α -SMA), 尿激酶纤维蛋白溶酶原激活剂(uPA)和纤溶酶原活化因子抑制剂1(PAI-1)的蛋白表达增加。说明, TGF- $\beta 1$ 活性较好的反映肝纤维化进展状况, 是促进肝纤维化的重要因子。此外, 研究还显示, TGF- $\beta 1$ 可抑制谷氨酰半胱氨酸连接酶的表达, 促进肝细胞损害^[25], TGF- $\beta 1$ 还能抑制肝细胞DNA合成, 阻止肝细胞再生^[26-27]。

3 针对TGF- β 治疗肝纤维化的策略

应用反义TGF- β 拮抗TGF- β 的作用。有报道将TGF- $\beta 1$ 基因序列反向导入逆转录病毒载体构建反义TGF- $\beta 1$ 逆转录病毒载体, 将其整合HSC, 可在基因转录、翻译水平阻止HSC中TGF- $\beta 1$ 的表达, 同时降低I型胶原mRNA表达^[28]。可溶性新型缺陷型II型TGF- β 受体(由T β R II胞外区与IgFc段融合形成的嵌合分子)可拮抗TGF- β 的作用^[29-31]。Zheng *et al*^[32]隔日给予鼠可溶性新型缺陷型II型TGF- β 受体, 1 mg/d, 可明显改善其X线照射所致的纤维化。中和TGF- β 及抑制TGF- β 合成的药物。研究发现, 秋水仙碱药物血清能抑制HSC产生TGF- $\beta 1$, 阻止自分泌放大过程, 减少胶原等ECM的合成^[33]。肝细胞生长因子(HGF)能明显降低前胶原及TGF- β mRNA水平, 具有明显的阻止及改善肝纤维化的作用^[34-36]。IFN- α , β , γ 均能抑制3T3L细胞增殖并且下调TGF- β 及前胶原mRNA水平。地塞米松可在转录水平抑制胶原基因表达。TGF- β 可上调胶原基因的启动活性, 同时地塞米松可拮抗TGF- β 对胶原基因启动活性的上调作用。丹参可抑制TGF- $\beta 1$ 刺激的HSC胶原分泌量, 下调I型胶原基因表达; 此外, 丹参还可拮抗TGF- β 刺激的肝星状细胞内Smad2/3蛋白表达, 尤其是Smad2的磷酸化与核转化, 干扰TGF- β 在HSC内的信号转导^[37]。

肝纤维化形成是一个极其复杂的过程, TGF- β 家族与肝纤维化的发生、发展密切相关。目前关于TGF- $\beta 3$ 在肝纤维化发生、发展过程中的作用相关报道甚少。随着对TGF- β 在细胞分子水平的进一步研究, 肝纤维化的形成机制将进一步得到阐明, 针对TGF- β 的治疗将有助于肝纤维化防治水平的进一步提高。

4 参考文献

- 1 Prosser CC, Yen RD, Wu J. Molecular therapy for hepatic injury and fibrosis: where are we? *World J Gastroenterol* 2006; 12: 509-515
- 2 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218
- 3 Shek FW, Benyon RC. How can transforming growth factor beta be targeted usefully to combat liver fibrosis? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 123-126
- 4 Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G245-249
- 5 Blobel GC, Schiemann WP, Pepin MC, Beauchemin M, Moustakas A, Lodish HF, O'Connor-McCourt MD. Functional roles for the cytoplasmic domain of the type III transforming growth factor beta receptor in regulating transforming growth factor beta signaling. *J Biol Chem* 2001; 276: 24627-24637
- 6 Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in tgfbeta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21: 659-693
- 7 Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113: 685-700
- 8 Chen W, Fu X, Sheng Z. Review of current progress in the structure and function of Smad proteins. *Chin Med J (Engl)* 2002; 115: 446-450
- 9 Fortuno ES 3rd, LeSueur JA, Graff JM. The amino terminus of Smads permits transcriptional specificity. *Dev Biol* 2001; 230: 110-124
- 10 Schnabl B, Kweon YO, Frederick JP, Wang XF, Rippe RA, Brenner DA. The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation. *Hepatology* 2001; 34: 89-100
- 11 Inagaki Y, Mamura M, Kanamaru Y, Greenwel P, Nemoto T, Takehara K, Ten Dijke P, Nakao A. Constitutive phosphorylation and nuclear localization of Smad3 are correlated with increased collagen gene transcription in activated hepatic stellate cells. *J Cell Physiol* 2001; 187: 117-123
- 12 Dooley S, Delvoux B, Streckert M, Bonzel L, Stopa M, ten Dijke P, Gressner AM. Transforming growth factor beta signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during *in vitro* progression to myofibroblasts. TGFbeta signal transduction during transdifferentiation of hepatic stellate cells. *FEBS Lett* 2001; 502: 4-10
- 13 Alcolado R, Arthur MJ, Iredale JP. Pathogenesis of liver fibrosis. *Clin Sci (Lond)* 1997; 92: 103-112
- 14 Demirci G, Nashan B, Pichlmayr R. Fibrosis in chronic rejection of human liver allografts: expression patterns of transforming growth factor-TGFbeta1 and TGF-beta3. *Transplantation* 1996; 62: 1776-1783
- 15 Wickert L, Steinkruger S, Abiaka M, Bolkenius U, Purps O, Schnabel C, Gressner AM. Quantitative monitoring of the mRNA expression pattern of the TGF-beta isoforms ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$) during transdifferentiation of hepatic stellate cells using a newly developed real-time SYBR Green PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 295: 330-335
- 16 Seong J, Kim SH, Chung EJ, Lee WJ, Suh CO. Early alteration in TGF-beta mRNA expression in irradiated rat liver. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 46: 639-643
- 17 Zavadil J, Bottinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 2005; 24: 5764-5774
- 18 Dooley S, Delvoux B, Lahme B, Mangasser-Stephan K, Gressner AM. Modulation of transforming growth factor beta response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Hepatology* 2000; 31: 1094-1106
- 19 Senties-Gomez MD, Galvez-Gastelum FJ, Meza-Garcia E, Armendariz-Borunda J. Hepatic fibrosis: role of matrix metalloproteinases and TGFbeta. *Gac Med Mex* 2005; 141: 315-322
- 20 Knittel T, Mehde M, Kobold D, Saile B, Dinter C, Ramadori G. Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF-alpha and TGF-beta1. *J Hepatol* 1999; 30: 48-60
- 21 Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 76-99
- 22 Breitkopf K, Godoy P, Ciuculan L, Singer MV, Dooley S. TGF-beta/Smad signaling in the injured liver. *Z Gastroenterol* 2006; 44: 57-66
- 23 张立煌, 方海林, 裘云庆, 姚航平, 李敏伟, 刘克洲. 病毒性肝炎患者血清转化生长因子- $\beta 1$ 活性及其与肝纤维化的关系. *中华传染病学杂志* 1997; 15: 82-84
- 24 Wu XR, Lv MH, Wang Q, Shi SS, Guo WD. The plasma levels of transforming growth factor beta1 and the protein expressions of alpha-SMA, urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in liver of patients with different grades of hepatic fibrosis. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2004; 12: 400-402
- 25 Franklin CC, Rosenfeld-Franklin ME, White C, Kavanagh TJ, Fausto N. TGFbeta1-induced suppression of glutathione antioxidant defenses in hepatocytes: caspase-dependent post-translational and caspase-independent transcriptional regulatory mechanisms. *FASEB J* 2003; 17: 1535-1537
- 26 Zimmermann A. Regulation of liver regeneration. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19 Suppl 4: iv6-10
- 27 Nakamura T, Sakata R, Ueno T, Sata M, Ueno H. Inhibition of transforming growth factor beta prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats. *Hepatology* 2000; 32: 247-255
- 28 Arias M, Sauer-Lehnen S, Treptau J, Janoschek N, Theuerkauf I, Buettner R, Gressner AM, Weiskirchen R. Adenoviral expression of a transforming growth factor-beta1 antisense mRNA is effective in preventing liver fibrosis in bile-duct ligated rats. *BMC Gastroenterol* 2003; 3: 29
- 29 Breitkopf K, Haas S, Wiercinska E, Singer MV, Dooley S. Anti-TGF-beta strategies for the treatment of chronic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29: 121S-131S
- 30 Cui X, Shimizu I, Lu G, Itonaga M, Inoue H, Shono M, Tamaki K, Fukuno H, Ueno H, Ito S. Inhibitory effect of a soluble transforming growth factor beta type II receptor on the activation of rat hepatic stellate cells in primary culture. *J Hepatol* 2003; 39: 731-737
- 31 Yata Y, Gotwals P, Kotliansky V, Rockey DC. Dose-dependent inhibition of hepatic fibrosis in mice by a TGF-beta soluble receptor: implications for antifibrotic therapy. *Hepatology* 2002; 35: 1022-1030
- 32 Zheng H, Wang J, Kotliansky VE, Gotwals PJ,

- Hauer-Jensen M. Recombinant soluble transforming growth factor beta type II receptor ameliorates radiation enteropathy in mice. *Gastroenterology* 2000; 119: 1286-1296
- 33 Lee SJ, Kim YG, Kang KW, Kim CW, Kim SG. Effects of colchicine on liver functions of cirrhotic rats: beneficial effects result from stellate cell inactivation and inhibition of TGF beta1 expression. *Chem Biol Interact* 2004; 147: 9-21
- 34 Xia JL, Dai C, Michalopoulos GK, Liu Y. Hepatocyte growth factor attenuates liver fibrosis induced by bile duct ligation. *Am J Pathol* 2006; 168: 1500-1512
- 35 Sato M, Kakubari M, Kawamura M, Sugimoto J, Matsumoto K, Ishii T. The decrease in total collagen fibers in the liver by hepatocyte growth factor after formation of cirrhosis induced by thioacetamide. *Biochem Pharmacol* 2000; 59: 681-690
- 36 Yasuda H, Imai E, Shiota A, Fujise N, Morinaga T, Higashio K. Antifibrogenic effect of a deletion variant of hepatocyte growth factor on liver fibrosis in rats. *Hepatology* 1996; 24: 636-642
- 37 刘成海, 刘平, 胡义扬, 朱大元. 丹酚酸B盐对转化生长因子- β 1刺激肝星状细胞活化与胞内信号转导的作用. *中华医学杂志* 2002; 82: 1267-1272

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 •

第三届亚洲大洋洲光生物学大会

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

1 会议安排

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

2 会议联系人

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

高+Gx对猴肝细胞c-fos表达的影响

牛忠英, 张建中, 施生根, 吴斌, 李冬, 党平, 阚广捍

牛忠英, 张建中, 施生根, 李冬, 党平, 中国人民解放军第306医院 北京市 100101

吴斌, 阚广捍, 中国航天员科研训练中心, 北京市 100094

总装备部航天医学科研基金资助项目, No. HTYK02006

通讯作者: 牛忠英, 100101, 北京市朝阳区安翔北路9号, 中国人民解放军第306医院. shishenggen@163.net

电话: 010-6635 6928

收稿日期: 2006-05-12 接受日期: 2006-05-29

Effect of hypergravity on expression of c-fos gene in hepatocytes of Rhesus macaque

Zhong-Ying Niu, Jian-Zhong Zhang, Sheng-Gen Shi, Bin Wu, Dong Li, Ping Dang, Guang-Han Kan

Zhong-Ying Niu, Jian-Zhong Zhang, Sheng-Gen Shi, Dong Li, Ping Dang, the 306th Hospital of Chinese PLA, Beijing 100101, China

Bin Wu, Guang-Han Kan, Astronaut Center of China, Beijing 100094, China

Supported by the Spaceflight Medical Research Fund of General Logistics Department of China, No. HTYK02006

Correspondence to: Professor Zhong-Ying Niu, the 306th Hospital of Chinese PLA, 9 Anxiang North Road, Beijing 100101, China. shishenggen@163.net

Received: 2006-05-12 Accepted: 2006-05-29

Abstract

AIM: To detect the expression of c-fos in the hepatocytes of Rhesus macaque under hypergravity (+Gx) loads.

METHODS: A total of 9 male Rhesus macaques were randomly divided into experiment groups ($n = 7$) and control group ($n = 2$). The animals in control group was exposed to +1Gx/300s overloads, and those in the experimental groups were exposed to the overloads of +15Gx/200s ($n = 2$), +21Gx/165s ($n = 2$) and +21Gx/140s ($n = 3$), respectively. Liver tissue was fixed with 40 g/L buffered formaldehyde and embedded with paraffin, and histopathological changes were observed under microscope. The expression of c-fos was detected by an immunohistochemical method.

RESULTS: In the experimental groups, cytoplasmic swelling and alveolar degeneration were

found in the liver; the expression of c-fos was detected in the cytoplasm of hepatocytes, with a tendency of enhancement as the dosage of hypergravity increased. In the control group, no significant histopathological changes were observed and the expression of c-fos was also remarkably decreased.

CONCLUSION: Overload of gravity can induce significant injuries of the liver in Rhesus macaque.

Key Words: Hypergravity; c-fos expression; Rhesus macaque; Liver injury

Niu ZY, Zhang JZ, Shi SG, Wu B, Li D, Dang P, Kan GH. Effect of hypergravity on expression of c-fos gene in hepatocytes of Rhesus macaque. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(28):2793-2795

摘要

目的: 观察航天应急返回过程中高正加速度(+Gx)对肝脏细胞c-fos基因表达的影响。

方法: 选用♂猕猴(共9只)为对象, 随机分为4组, 对照组承受+1Gx, 300 s的超重作用; 实验组根据承受过载峰值的大小分为3个亚组, 其承受过载峰值分别为+15Gx, 200 s; +18Gx, 165 s; +21Gx, 140 s。观察高+Gx对猴肝脏细胞c-fos基因表达的影响。

结果: 实验组肝脏细胞胞质呈现不同程度的水肿及泡状变性, c-fos基因表达明显增强, 呈弥漫性胞质内棕黄色着色; 肝细胞c-fos基因表达程度随超重剂量的增加有增强趋势。对照组肝脏组织病理学改变程度明显较实验组轻微, c-fos基因表达亦明显减弱。

结论: +Gx可引起猴肝脏组织细胞c-fos基因表达增强, 提示有早期肝脏组织损伤。

关键词: 高正加速度; 恒河猴; c-fos表达; 肝损伤

牛忠英, 张建中, 施生根, 吴斌, 李冬, 党平, 阚广捍. 高+Gx对猴肝细胞c-fos表达的影响. *世界华人消化杂志* 2006;14(28):2793-2795

■背景资料

载人飞船在上升或返回, 特别是在主动段大气层外弹道式应急返回时, 航天员会遇到强大的胸-背向超重(+Gx)作用。高过载环境是航空航天活动中对人体有较大影响的因素之一, 阐明其发生发展机制, 对于+Gx的致伤效应的防治具有重要意义。高+Gx作用对机体重要器官的损伤是一个复杂的病理生理过程, c-fos基因作为核转录因子, 是调控器官和组织对刺激应答合成效应蛋白的重要开关之一, 通过研究即刻基因c-fos基因在高+Gx作用肝脏组织细胞损伤中的表达规律, 有助于深入探讨其在肝脏组织损伤发生和损伤后修复中的作用及其机制及进一步提出相应的防护措施。

■应用要点

为了保证航天员的安全,载人飞船在应急返回时,其过载最好不要超过15G,应避免出现更高G值的情况。

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2793.asp>

0 引言

载人飞船上升和返回过程中,特别是在应急返回时,航天员可能会受到较大的胸-背向高正加速度(+Gx)的作用或失重后+Gx的影响^[1]。有研究表明,超过+3Gx负荷可引起大鼠脑组织能量代谢变化,+Gx负荷可以导致脑组织缺血缺氧,引起脑功能的改变和工作效率的降低^[2-3]。c-fos基因是一种即刻早期基因,c-fos基因的表达产物Fos蛋白与靶基因的特异序列结合,调节其转录水平发挥信使作用,参与调节细胞内诸多下游基因的转录^[4]。本研究旨在探讨模拟飞船应急返回时高+Gx对猴肝脏细胞c-fos基因表达的影响,以期能更深入的了解高+Gx作用对机体重要器官造成的早期损伤,为进一步研究改善和提高机体抗损伤能力提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 实验用♂恒河猴9只,年龄5-12岁(青年),体质量5-8 kg,健康,无人畜共患病,不携带B病毒、结核杆菌等致病因子。随机分为对照组和实验组。对照组: +1 Gx, 300 s(*n* = 2只); 实验组: 根据承受+Gx峰值的大小分为3个亚组。1组为15 Gx, 200 s(*n* = 2只); 2组为18 Gx(*n* = 2只), 165 s; 3组为21 Gx, 140 s(*n* = 3只)。

1.2 方法 实验在航天医学工程研究所离心机实验室进行,采用经过技术改造后的五八型动物离心机。该离心机在计算机控制下,模拟飞行器应急返回时产生的抛物线型高+Gx。动物禁食8 h后运至离心机实验室,使用846合剂(0.15-0.2 mL/kg)进行后肢肌肉注射麻醉,仰卧固定于离心机吊篮中,背角700。离心机在动物清醒后开始运转,对照组与实验组动物分别承受相应的胸-背向+Gx作用。实验结束后,动物由吊篮移到解剖台,放血处死,取材。取实验动物的肺组织用40 g/L中性缓冲甲醛溶液固定,采用常规方法进行脱水,石蜡包埋,5 μm连续切片,苏木精伊红染色,光学显微镜下(×100)观察。采用免疫组化PicTure™两步法,观察模拟+Gx环境对肝组织c-fos表达的影响(PV-6000试剂盒为美国Zymed公司产品,抗c-fos为美国Santa Cruz公司产品)。实验步骤按照试剂盒要求程序进行,光学显微镜下分别观察对照组、实验组高+Gx对肝组织细胞c-fos表达的影响。判断结果的指标: c-fos阳性反应细胞为细胞质和细胞膜着棕色。

■名词解释

1 +Gx: (飞行器运行过程中的)超重或过载。本文是指飞船乘员在上升或返回途中受到强大的胸-背向超重作用。

2 c-fos: 是一种即刻反应基因。人体在受到缺氧、疼痛、机械和光电等刺激后,体内一些重要器官功能活动的信号转导和调控过程发生应急反应,c-fos等基因首先活化和表达。

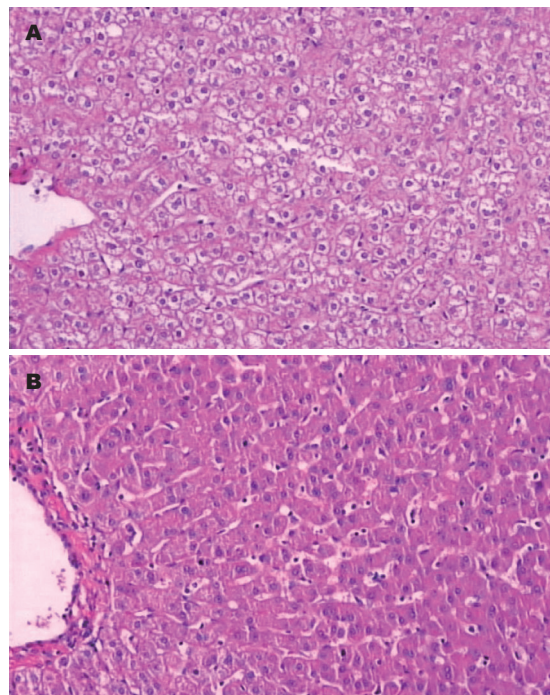


图1 肝脏组织病理学改变(H&E ×100)。A: 实验组(肝细胞明显水肿及空泡性变,肝细胞紊乱,肝窦闭合); B: 对照组(正常肝组织,未见明显的病理改变)。

2 结果

2.1 肉眼所见 对照组: 肝脏表面无明显变化; 实验组: 肝脏表面均可见多个大小不等的出血点或出血斑,这些改变随着+Gx值的加大而更加明显。

2.2 组织病理学 对照组: 肝脏组织为正常肝脏组织特征,肝小叶及肝细胞索结构有序,未见出血、变性性改变(图1A); 实验组: 15 Gx和18 Gx以及21 Gx组猴肝脏组织结构紊乱,肝细胞不同程度水肿,肝实质内及包膜下灶性出血增加,病变程度随Gx增加而加重(图2A)。部分中央静脉及肝窦扩张、淤血。

2.3 免疫组织化学 实验组肝脏细胞胞质呈现不同程度的水肿及泡状变性(图1A), c-fos基因表达明显增强,呈弥漫性细胞质和细胞膜内棕黄色着色(图2A); 肝细胞c-fos基因表达程度随超重剂量的增加有增强趋势。肝内胆管、血管和枯否细胞等不表达该抗原; 对照组肝脏组织病理学改变程度明显较实验组轻微(图1B), c-fos基因表达亦明显减弱(图2B)。

3 讨论

c-fos基因是一种即刻基因,与多数细胞增殖有关,其编码蛋白在细胞核内起着转录因子即"第三信使"的作用,参与调节细胞内诸多下游基因的转录。正常状态时该转录因子参与调节细胞调

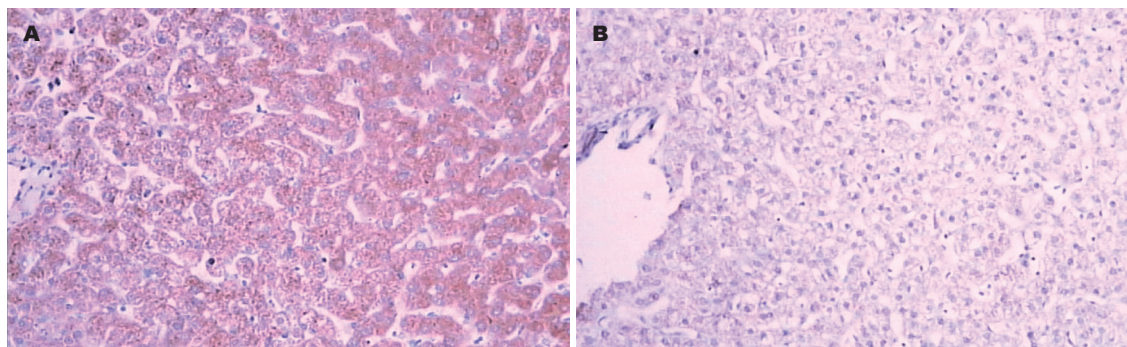


图2 肝组织c-fos表达(PicTure™两步法×100)。A: 实验组(免疫组织化学染色显示肝细胞质和细胞膜呈棕黄色颗粒状着色); B: 对照组(免疫组织化学染色显示肝细胞呈淡黄色着色)。

■同行评价

高+GX对猴肝细胞影响的研究较少, 因此, 研究有一定的新颖性, 能较好地反映航天医学基础研究的先进水平。

亡与增殖以及信号传递等生理过程, 并参与脑功能活动的信号转导和调控过程^[5]。在非正常条件下, 多种刺激因子, 如自由基、细胞因子(IL-6, TNF)、缺氧、缺血、光线刺激、机械力刺激、疼痛刺激等均可以诱导细胞中c-fos基因的表达。缺血-再灌注可诱导心肌细胞c-fos基因表达明显增强^[6]。c-fos基因的表达产物Fos蛋白与靶基因的特异序列结合, 可以调节其转录水平并发挥信使作用, 靶基因为阿片肽基因, 通过调节中枢神经系统阿片肽的水平调控痛觉^[7]。c-fos基因可作为观察高+Gx对猴肝脏肝细胞刺激作用的一个标志物, 了解机体重要器官的早期响应及其程度。高+Gx是航天活动中的对机体产生较大影响重要因素之一, 动物实验研究已经证实, +Gx负荷可以导致脑组织缺血缺氧^[8-9]。随着航天科技的高速发展, 航天器所产生的+Gx逐渐减小, 一般在+5Gx以内。但是, 在航天器应急返回过程中仍然可能产生+10~+15 Gx, 甚至更大的+Gx^[10]。为了保证航天员的安全, 载人飞船在应急返回时, 其过载最好不要超过15G, 应避免出现更高G值的工况^[11]。本研究以猴为实验动物, 采用组织病理学和免疫组织化学的方法, 观察了不同+Gx对猴肝脏组织肝细胞c-fos基因表达的变化。本研究结果显示, 高+Gx可诱导猴肝脏肝细胞c-fos基因的表达增强, 其表达程度随+Gx值的加大而增加。提示在高+Gx作用下猴肝脏肝细胞c-fos基因被激活, 参与调节细胞的凋亡过程, 还可能参与调节细胞的增殖过程。细胞凋亡与细胞增殖的双重调控意义在于受损细胞发生凋亡被淘汰的同时, 促使细胞增殖以替代凋亡细胞用于修复损伤, 从而维持重要脏器细胞增殖与凋亡的平衡。

高+Gx作用对机体重要器官的损伤是一个复杂的病理生理过程, c-fos基因作为核转录因子, 是调控器官和组织对刺激应答合成效应蛋白的重要开关之一, 通过研究即刻基因c-fos基因在高+Gx作用肝脏组织细胞损伤中的表达规律, 有助于深入探讨其在肝脏组织损伤发生和损伤后修复中的作用及其机制及进一步提出相应的防护措施。

4 参考文献

- 1 刘光远, 沈羨云, 陈涤明. 重力生理学. 北京: 国防工业出版社, 2001; 37-40
- 2 吴斌, 谢宝生, 由广兴, 刘兴华, 路盛强, 黄伟芬. +Gx负荷对大鼠脑组织能量代谢的影响. 航天医学与医学工程 2002; 15: 406-409
- 3 Kotovskaya AR, Vil-Viliams IF. tolerance following one-year real and simulated microgravity. *Physiologist* 1992; 35: S208-S209
- 4 孙喜庆, 徐志鹏, 张舒, 吴斌, 曹新生, 吴萍. 模拟失重后高+Gx作用对大鼠脑胶质细胞酸性蛋白表达的影响. 航天医学与医学工程 2006; 19: 19-22
- 5 薛朝霞, 曹定睿, 刘保江, 杨立新, 汪祖巾, 梁法禹, 阴泽民. 心肺转流下犬心肌c-fos基因的表达. 临床麻醉学杂志 2004; 20: 98-101
- 6 肖建生, 叶启发, 蔡方钢, 牛英, 张毅, 许贤林. 肝脏缺血再灌注对即早基因c-fos、c-jun表达影响的研究. 中国医学工程 2005; 13: 28-34
- 7 卢静, 戴体俊, 曾因明. c-fos基因表达的相关机制和意义. 国外医学麻醉学与复苏分册 2004; 25: 273-275
- 8 Baranov VM, Tikhonov MA, Kotov AN. The external respiration and gas exchange in space missions. *Acta Astronaut* 1992; 27: 45-50
- 9 贾宏博, 于立身, 刘正, 谢溯江, 王锦玲, 毕红哲, 刘广莉. 高Gy所致豚鼠前庭功能障碍及其预适应防护的研究. 航天医学与医学工程 2003; 16: 88-92
- 10 中国人民解放军总装备部军事训练教材编辑委员会. 航天重力生理学. 北京: 国防工业出版社, 2001; 60-68
- 11 吴斌, 刘兴华, 阚广捍, 田向东, 赵德明, 姜世忠. 高+Gx作用对猴肺脏的病理学影响. 航天医学与医学工程 2004; 17: 397-401

电编 李琪 编辑 王晓瑜

一氧化氮在雷贝拉唑对大鼠胃黏膜损伤保护中的作用

乐桥良, 林克荣, 张志坚

■背景资料

一氧化氮合成酶(NOS)广泛存在于胃肠道中,其产物NO可增加胃肠道黏膜上皮屏障、刺激上皮细胞分泌黏液和碳酸氢盐、减少中性粒细胞黏附、增加肥大细胞稳定性、抗自由基作用及增加黏膜血流量等调节胃肠道黏膜防御功能,对胃肠道黏膜损伤有重要保护作用。PPI通过抑制胃壁细胞分泌小管的H⁺/K⁺-ATP酶,抑制胃酸分泌治疗消化性溃疡,但对胃黏膜亦有保护作用,这方面研究较少,其机制目前不清楚。有关NO是否介导雷贝拉唑对胃黏膜保护作用尚未见报道。

乐桥良, 林克荣, 张志坚, 中国人民解放军南京军区福州总医院消化科 福建省福州市 350025

通讯作者: 乐桥良, 350025, 福建省福州市西二环北路156号, 中国人民解放军南京军区福州总医院消化科。leqiang@sohu.com
电话: 0591-87893856

收稿日期: 2006-06-02 接受日期: 2006-09-01

Role of nitric oxide in the protective effect of rabeprazole on gastric mucosal lesions in rats

Qiao-Liang Le, Ke-Rong Lin, Zhi-Jian Zhang

Qiao-Liang Le, Ke-Rong Lin, Zhi-Jian Zhang, Department of Gastroenterology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Correspondence to: Qiao-Liang Le, Department of Gastroenterology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, 156 Xi'erhuan North Road, Fuzhou 350025, Fujian Province, China. leqiang@sohu.com

Received: 2006-06-02 Accepted: 2006-09-01

Abstract

AIM: To explore the role of nitric oxide (NO) in the protective effect of rabeprazole on the gastric mucosal lesions in rats.

METHODS: Before gastric mucosal lesion was made in rats by pure alcohol, rabeprazole (20 mg/kg) was administered into the gastric chamber and N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 4 mg/kg), L-arginine (250 mg/kg) and D-arginine (250 mg/kg) were injected into the vein. Gastric mucosal blood flow (GMBF) was assessed with laser Doppler flowmetry (LDF); gastric mucosal and serum NO₂⁻/NO₃⁻ were measured by cadmium granulation reduction and colorimetric method; and the changes of ulcer index and the severity of tissue necrosis as well as neutrophil infiltration were observed.

RESULTS: The Ulcer index of the rabeprazole group was markedly lower than that in the controls (5.5 ± 0.5 vs 25.2 ± 2.3, *P* < 0.01), and the degrees of tissue necrosis and neutrophil infiltration were significantly milder (necrosis ++ - +++/≤+: 1/9 vs 8/2, *P* < 0.01; infiltration ++ -

+++/≤+: 3/7 vs 9/1, *P* < 0.01). The protective effect of rabeprazole was significantly decreased by prior administration of L-NAME. The inhibitory effect of L-NAME was antagonized by prior administration of L-arginine, but not D-arginine. Rabeprazole administered into the gastric chamber obviously increased GMBF, gastric mucosal and serum NO₂⁻/NO₃⁻, which was prevented by pretreatment with L-NAME, but the antisecretory effect of rabeprazole was not affected by L-NAME.

CONCLUSION: Rabeprazole can exert important protection against gastric mucosal lesions in rats mediated by nitric oxide, and the action of rabeprazole against gastric acid secretion contributes little to the protective effect.

Key Words: Nitric oxide; Rabeprazole; Gastric mucosal lesion; Cytoprotection

Le QL, Lin KR, Zhang ZJ. Role of nitric oxide in the protective effect of rabeprazole on gastric mucosal lesions in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(28):2796-2800

摘要

目的: 探讨一氧化氮(NO)在雷贝拉唑对大鼠胃黏膜损伤保护中的作用。

方法: 在乙醇诱导大鼠胃黏膜损伤前, 预先给予雷贝拉唑(20 mg/kg)灌胃, L-硝基-精氨酸甲酯(L-NAME, 4 mg/kg)、L-精氨酸(250 mg/kg)及D-精氨酸(250 mg/kg)iv。采用激光多普勒血流计(LDF)测定胃黏膜血流量(GMBF), 采用镉粒还原和比色法测定胃黏膜和血浆NO₂⁻/NO₃⁻含量, 并观察胃黏膜损伤指数(UI)、溃疡坏死组织和中性粒细胞浸润严重程度的变化。

结果: 与模型损伤组比, 雷贝拉唑组大鼠UI明显降低(5.5 ± 0.5 vs 25.2 ± 2.3, *P* < 0.01), 溃疡坏死组织和中性粒细胞浸润程度明显减轻(坏死物质++ → +++/≤+: 1/9 vs 8/2, *P* < 0.01; 中性粒细胞++ → +++/≤+: 3/7 vs 9/1, *P* < 0.01)。预先用L-NAME处理后, 雷贝拉唑保护胃黏膜损伤作用明显减弱; L-NAME抑制作用可被L-精氨

酸拮抗, 而不被*D*-精氨酸拮抗. 向胃内灌注雷贝拉唑, 可增加GMBF、胃黏膜和血浆 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, *L*-NAME可逆转这种作用, 但对雷贝拉唑抑制酸分泌作用无明显影响.

结论: 雷贝拉唑对大鼠胃黏膜损伤保护作用与NO有关, 而与雷贝拉唑抑制酸分泌作用无关.

关键词: 一氧化氮; 雷贝拉唑; 胃黏膜损伤; 细胞保护

乐桥良, 林克荣, 张志坚. 一氧化氮在雷贝拉唑对大鼠胃黏膜损伤保护中的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(28):2796-2800 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2796.asp>

0 引言

雷贝拉唑(rabeprazole)是人工合成的新一代质子泵抑制剂(proton pump inhibitor, PPI), 对酸分泌有显著的抑制作用^[1-3]; 同时对胃黏膜具有保护作用^[4-13], 但这方面作用机制尚未完全阐明. 一氧化氮(nitric oxide, NO)是扩血管物质, 可增加胃黏膜血流量(GMBF), 对胃黏膜具有保护作用^[14-23]. 本实验研究NO在雷贝拉唑对大鼠胃黏膜损伤保护中的作用, 以探讨雷贝拉唑对胃黏膜保护作用的可能机制.

1 材料和方法

1.1 材料 纯种、♂、健康SD大鼠(上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供), 体质量215-265 g, 实验前禁食24 h, 但不禁水. 雷贝拉唑是西安杨森制药有限公司提供的产品, *L*-硝基-精氨酸甲酯(*N* ω -nitro-*L*-arginine methyl ester, *L*-NAME)为Sigma公司产品, *L*-精氨酸、*D*-精氨酸为上海华美工程公司产品. 镉粒为上海亨新工厂产品, 甘氨酸、亚硝酸盐为上海试剂一厂产品, 硫酸铜、*N*-1-奈乙胺盐酸盐为上海试剂三厂产品, 对氨基苯磺酸为上海山海科技研究所产品, 硫酸、硫酸锌、氢氧化钠、酚红为上海试剂二厂产品. XHF-1高速分解器为上海金山生化仪器厂产品, TG₃₂₈ B型分析天平为上海天平仪器厂产品, 801型离心机为上海手术器械厂产品, 724微机型可见分光光度计为上海光学仪器厂产品, 眼科手术器械一套. 激光多普勒血流计(LDF), LDF-III型, 南开大学制造, 技术参数如下: He-Ne光源, 功率2 mW, 输出功率>1 mW, 光纤长2.5 m, 测定范围为1 mm半球区域, 量程选 $\times 1$ 档, 时间常数1 s档, 频率为4 kHz.

1.2 方法 大鼠禁食24 h后, 30 g/L戊巴比钠(4 mg/

kg) ip麻醉, 用无水乙醇1 mL灌胃, 制备胃黏膜损伤模型, 1 h后腹正中切口进入腹腔, 沿胃大弯处剪开胃, 并进行各项实验指标测定. 取SD大鼠100只, 分为6组, I-IV组每组20只, V, VI组每组10只. I组: 假手术组, 作为正常对照; II组: 损伤模型组, 作为损伤对照; III组: 雷贝拉唑组, 在用无水乙醇灌胃30 min前, 向胃内灌注雷贝拉唑(20 mg/kg). IV组: *L*-NAME组, 用雷贝拉唑灌胃前20 min, iv *L*-NAME(4 mg/kg); V组: *L*-精氨酸(*L*-arginine)组, 在iv *L*-NAME 15 min前, iv *L*-精氨酸(250 mg/kg); VI组: *D*-精氨酸(*D*-arginine)组, 在iv *L*-NAME 15 min前, iv *D*-精氨酸(250 mg/kg). I-IV组又各分成2小组, 每小组10只, 其中1小组用于胃酸、胃黏膜血流量、胃黏膜和血浆 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 测定, 另1小组用于胃黏膜损伤指数判定和组织学观察. 对照组给予等量的生理盐水.

1.2.1 胃黏膜损伤指数判定 按Guth标准计算溃疡指数(ulcer index, UI), 处死动物, 取出胃及十二指肠, 沿大弯侧剪开后, 展平, 按溃疡或糜烂面积大小给予计分: 斑点状糜烂为1分, 糜烂<1 mm为2分, 糜烂介于1-2 mm之间为3分, 糜烂为2-4 mm为4分, 糜烂>4 mm为5分.

1.2.2 组织学观察 全胃用40 g/L甲醛固定, 制成石蜡切片, HE染色光镜下观察, 评定标准如下: (1)坏死物质: 未见为0, 仅在溃疡底面边缘有少许为(+), 薄层覆盖整个溃疡底为(++), 厚层覆盖为(+++). (2)中性粒细胞浸润: 未见为0, 偶见(+), 明显(+++), 介于后两者之间为(++).

1.2.3 GMBF测定 采用LDF测定GMBF, 开机预热30 min调出LDF-III GMBF测定程序, 从胃大弯处作一小切口, 用LDF的探头轻轻垂直地接触胃黏膜表面, 待血流稳定后, 在胃体大小弯、胃窦大小弯取4点测定GMBF, 取其平均值, 以激光多普勒信号电压值(mV)表示血流量的相对数值.

1.2.4 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 含量测定 用钝性刀片刮取胃黏膜, 组织匀浆, 离心后取上清液, -20℃贮存待测; 取外周血2 mL, EDTA抗凝, 离心后取上清液, -20℃贮存待测; $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 含量采用镉粒还原和比色法测定^[24].

1.2.5 胃液pH测定 取胃液2 mL, 加酚红指示剂2滴, 黄色表示有胃酸存在. 用0.1 mol/L氢氧化钠滴定至粉红色. 所耗氢氧化钠毫升数乘以50, 即为胃酸浓度(mmol/L), 并换算成pH.

统计学处理 多组计量资料之间比较采用方差分析, 组间两两比较用 q 检验; 方差不齐时, 用秩和检验. 计数资料之间采用 χ^2 检验.

■创新盘点

本研究结果显示, NOS拮抗剂*L*-NAME可明显减弱雷贝拉唑对胃黏膜损伤保护作用, *L*-NAME抑制作用可被NO前体*L*-精氨酸拮抗, 而不被*D*-精氨酸(非有效前体)拮抗; 雷贝拉唑可增加胃黏膜血流量(GMBF)、胃黏膜和血浆 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, *L*-NAME可逆转这种作用, 但对雷贝拉唑抑制酸分泌作用无明显影响. 表明NO通过增加GMBF介导了雷贝拉唑对胃黏膜损伤保护, 而与雷贝拉唑抑制酸分泌作用无关.

同行评价

本文科学性、先进性好,实验设计合理,结论可靠。

2 结果

2.1 UI测定 损伤模型组大鼠UI(25.2 ± 2.3)比正常对照组(0)明显升高($P < 0.01$);雷贝拉唑组与损伤模型组比明显降低($P < 0.01$);*L*-NAME组与损伤模型组比无明显差异($P > 0.05$),而比雷贝拉唑组明显升高($P < 0.01$);*L*-精氨酸组与损伤模型组和*L*-NAME组比均明显降低($P < 0.01$),*d*-精氨酸组与损伤模型组和*L*-NAME组比均无明显差异,而比雷贝拉唑组明显升高($P < 0.01$)(表1)。

2.2 胃组织学观察 损伤模型组大鼠溃疡底部可见大量坏死物质,周围组织中中性粒细胞浸润明显;雷贝拉唑组溃疡底部坏死物质和周围组织中中性粒细胞浸润均比损伤模型组明显减轻($P < 0.01$);*L*-NAME组溃疡底部坏死物质和周围组织中中性粒细胞浸润与损伤模型组比均无明显差异($P > 0.05$),而比雷贝拉唑组严重($P < 0.01$);*L*-精氨酸组与损伤模型组和*L*-NAME组比二者均明显减轻($P < 0.01$),与雷贝拉唑组比无明显差异($P > 0.05$),*d*-精氨酸组与损伤模型组和*L*-NAME组比二者均无明显差异,而比雷贝拉唑组严重($P < 0.01$)(表1)。

2.3 GMBF 损伤模型组大鼠GMBF与正常对照组比明显降低($P < 0.01$),雷贝拉唑组与损伤模型组比明显升高($P < 0.05$),*L*-NAME组与损伤模型组比无明显差异($P > 0.05$),而比雷贝拉唑组明显降低($P < 0.05$)(表2)。

2.4 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 含量 损伤模型组大鼠胃黏膜和血浆 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 比正常对照组均非常显著增加($P < 0.01$);雷贝拉唑组比正常对照组非常显著增加($P < 0.01$),亦比损伤模型组明显增加($P < 0.05$);*L*-NAME组与雷贝拉唑组比显著减少($P < 0.01$),而与正常对照组比无明显差异($P > 0.05$,表2)。

2.5 胃液pH 损伤模型组大鼠胃液pH与正常对照组比明显降低($P < 0.05$),雷贝拉唑组与损伤模型组比明显升高($P < 0.01$),*L*-NAME组与雷贝拉唑组比无明显差异($P > 0.05$,表2)。

3 讨论

雷贝拉唑是人工合成的质子泵抑制剂(proton pump inhibitor, PPI),通过抑制胃壁细胞分泌小管的 H^+/K^+ -ATP酶,使胃酸分泌的最终步骤阻断,其抑制作用强而持久,从而可以治疗消化性溃疡^[1-3]。有研究表明,雷贝拉唑对胃黏膜损伤具有保护作用^[4-13]。Watanabe *et al*^[4]报道雷贝拉唑能有效预防乙醇引起大鼠胃体和胃窦的胃黏膜损

表 1 各组大鼠胃黏膜损伤指数变化和组织学观察($n = 10$)

分组	UI (mean \pm SD)	坏死物质		中性粒细胞	
		$\leq +$	$++/+++$	$\leq +$	$++/+++$
II	25.2 ± 2.3	2	8	1	9
III	5.5 ± 0.5^b	9	1 ^b	7	3 ^b
IV	24.7 ± 2.3^d	2	8 ^d	2	8 ^d
V	5.6 ± 0.7^b	8	2 ^b	8	2 ^b
VI	25.0 ± 2.6^d	2	8 ^d	2	8 ^d

^b $P < 0.01$ vs II组; ^d $P < 0.01$ vs III组。

表 2 I-IV组大鼠GMBF、胃黏膜和血浆 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 及胃液pH的变化(mean \pm SD, $n = 10$)

分组	GMBF (mV)	胃黏膜 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ (nmol/L)	血浆 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ($\mu\text{mol/L}$)	pH
I	323 ± 46	0.37 ± 0.03	29.94 ± 2.06	3.52 ± 0.52
II	197 ± 22^b	0.69 ± 0.06^b	54.56 ± 4.24^b	2.34 ± 0.36^a
III	298 ± 41	0.89 ± 0.07	82.41 ± 6.38	6.73 ± 0.74
IV	192 ± 25^c	0.43 ± 0.06^d	32.68 ± 3.45^d	6.82 ± 0.73

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs I, III组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs III组。

伤,在乙醇引起的溃疡模型中,也能明显改善其UI; Suzuki *et al*^[5]报道雷贝拉唑对*H. pylori*引起的蒙古沙鼠胃黏膜损伤有细胞保护作用的同时能加强细胞保护适应,预先给阿司匹林、氯化氨或应激造成的实验性胃黏膜损伤的大鼠胃内灌注雷贝拉唑,能明显减轻胃黏膜损伤^[6],对胆汁反流和应激引起的胃黏膜损害雷贝拉唑亦有很好的保护作用^[7-8]。Laheij *et al*^[9]报道雷贝拉唑能明显减轻阿司匹林引起的胃黏膜损伤及胃肠道反应, Shimatani *et al*^[10]发现雷贝拉唑对NSAIDs引起十二指肠球部溃疡有明显防治作用,雷贝拉唑对危重患者应激性胃黏膜损害及胃黏膜出血有很好的预防作用^[11],对于志愿者口服阿司匹林引起的胃黏膜损伤潘托拉唑也有保护作用^[12-13]。本实验结果显示,预先用雷贝拉唑给由乙醇诱导胃黏膜损伤大鼠灌胃,与损伤模型组比,胃黏膜损伤指数明显降低,病理组织观察,其溃疡坏死物质和周围中性粒细胞浸润亦明显减少,表明雷贝拉唑对大鼠胃黏膜损伤具有保护作用。

NO是由血管内皮细胞产生血管舒张因子^[14-15],近年来有报道,NO对胃黏膜损伤有保护作用^[14-23]。Konturek *et al*^[16]发现NO介导了vit C保护健康志愿者口服阿斯匹林诱导的胃黏膜

损伤; NO抑制剂L-NAME能增加水应激的胃黏膜损伤, 而NO前体L-精氨酸能明显减轻这种胃黏膜损伤^[17-19]; NO可减轻由乙醇诱导的实验性胃黏膜损伤的严重程度^[20-23], Kalia *et al*^[20]预先用L-NAME(NOS抑制剂)处理大鼠, 发现会加重由乙醇诱导的胃黏膜损伤, 并且这种胃黏膜损伤能被L-精氨酸逆转, 而不被D-精氨酸逆转, 另外, L-NAME能明显降低大鼠GMBF和胃黏膜血红蛋白含量^[21], 表明NO对胃黏膜损伤有保护作用. 我们用L-NAME预先处理大鼠, 能明显升高雷贝拉唑降低的胃黏膜损伤指数, 溃疡底部坏死物质增多, 周围中性粒细胞浸润也非常明显, 在L-NAME给药15 min前给予L-精氨酸则能抑制这种损伤作用, 表明NO介导了雷贝拉唑对胃黏膜的保护作用.

本实验结果显示, 向胃内灌注雷贝拉唑, 能明显增加胃黏膜和血浆NO₂⁻/NO₃⁻含量, 同时GMBF亦升高, 而在雷贝拉唑灌胃前20 min给予L-NAME则能逆转这种作用. 本实验结果还显示, 雷贝拉唑能显著提高胃液pH, 抑制胃酸分泌, 而L-NAME则对雷贝拉唑抑制胃酸分泌的作用无明显影响.

总之, 雷贝拉唑对大鼠胃黏膜损伤具有保护作用, NO通过增加GMBF参与了这种保护作用, 而与雷贝拉唑抑制胃酸分泌作用无关.

4 参考文献

- Giannini EG, Bilardi C, Dulbecco P, Mamone M, Santi ML, Testa R, Mansi C, Savarino V. A study of 4- and 7-day triple therapy with rabeprazole, high-dose levofloxacin and tinidazole rescue treatment for *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 281-287
- Hirano I, Zhang Q, Pandolfino JE, Kahrilas PJ. Four-day Bravo pH capsule monitoring with and without proton pump inhibitor therapy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 1083-1088
- Shimatani T, Inoue M, Kuroiwa T, Horikawa Y. Rabeprazole 10 mg twice daily is superior to 20 mg once daily for night-time gastric acid suppression. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 113-122
- Watanabe T, Higuchi K, Tominaga K, Fujiwara Y, Arakawa T. Cytoprotective effect of rabeprazole against ethanol-induced gastric mucosal damage: possible involvement of nitric oxide. *Drugs Exp Clin Res* 2000; 26: 41-45
- Suzuki H, Miyazawa M, Nagahashi S, Sato M, Bessho M, Nagata H, Miura S, Ishii H. Rabeprazole treatment attenuated *Helicobacter pylori*-associated gastric mucosal lesion formation in Mongolian gerbils. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 787-795
- Jaworski T, Sarosiek I, Sostarich S, Roeser K, Connor M, Brotze S, Wallner G, Sarosiek J. Restorative impact of rabeprazole on gastric mucus and mucin production impairment during naproxen administration: its potential clinical significance. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 357-365
- Santarelli L, Gabrielli M, Candelli M, Cremonini F, Nista EC, Cammarota G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Post-cholecystectomy alkaline reactive gastritis: a randomized trial comparing sucralfate versus rabeprazole or no treatment. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 975-979
- Swiatkowski M, Budzynski J, Klopocka M, Grad K, Pulkowski G, Augustynska B, Suppan K, Fabisiak J. The effect of eight weeks of rabeprazole therapy on nitric oxide plasma level and esophageal pH and motility and motility nitric oxide plasma level in patients with erosive esophagitis. *Med Sci Monit* 2004; 10: CR46-51
- Laheij RJ, Van Rossum LG, Jansen JB, Verheugt FW. Proton-pump inhibitor therapy for acetylsalicylic acid associated upper gastrointestinal symptoms: a randomized placebo-controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 109-115
- Shimatani T, Inoue M, Yokoya H, Daimaru Y. Evaluation of gastric acid secretion in two patients (each aged over 90 years) with *Helicobacter pylori*-negative nonsteroidal anti-inflammatory drug-caused duodenal ulcers. *J Gastroenterol* 2003; 38: 164-169
- Spirt MJ. Stress-related mucosal disease: risk factors and prophylactic therapy. *Clin Ther* 2004; 26: 197-213
- Itagaki F, Homma M, Yuzawa K, Nishimura M, Naito S, Ueda N, Ohkohchi N, Kohda Y. Effect of lansoprazole and rabeprazole on tacrolimus pharmacokinetics in healthy volunteers with CYP2C19 mutations. *J Pharm Pharmacol* 2004; 56: 1055-1059
- Mondal U, Ganesan M, Pal TK, Jayakumar M, Chattaraj TK, Roy K, Banerjee SN. Bioequivalence study of rabeprazole sodium on healthy human volunteers. *J Indian Med Assoc* 2004; 102: 26, 28, 30
- Uchida M, Matsueda K, Shoda R, Muraoka A, Yamato S. Nitric oxide donating compounds inhibit HCl-induced gastric mucosal lesions mainly via prostaglandin. *Jpn J Pharmacol* 2001; 85: 133-138
- Kwiecien S, Brzozowski T, Konturek PCh, Konturek SJ. The role of reactive oxygen species in action of nitric oxide-donors on stress-induced gastric mucosal lesions. *J Physiol Pharmacol* 2002; 53: 761-773
- Konturek PC, Kania J, Gessner U, Konturek SJ, Hahn EG, Konturek JW. Effect of vitamin C-releasing acetylsalicylic acid on gastric mucosal damage before and after *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Eur J Pharmacol* 2004; 506: 169-177
- Ohta Y, Nishida K. Protective effect of L-arginine against stress-induced gastric mucosal lesions in rats and its relation to nitric oxide-mediated inhibition of neutrophil infiltration. *Pharmacol Res* 2001; 43: 535-541
- Samini M, Moezi L, Jabarizadeh N, Tavakolifar B, Shafaroodi H, Dehpour AR. Evidences for involvement of nitric oxide in the gastroprotective effect of bromocriptine and cyclosporin A on water immersion stress-induced gastric lesions. *Pharmacol Res* 2002; 46: 519-523
- 乐桥良, 文晓冬. 大鼠应激性溃疡中一氧化氮的作用. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 815-816
- Kalia N, Bardhan KD, Reed MW, Jacob S, Brown

- NJ. L-Arginine protects and exacerbates ethanol-induced rat gastric mucosal injury. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 915-924
- 21 Ko JK, Cho CH, Lam SK. Adaptive cytoprotection through modulation of nitric oxide in ethanol-evoked gastritis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2503-2508
- 22 Sanchez S, Martin MJ, Ortiz P, Motilva V, Herrerias JM, Alarcon de la Lastra C. Role of prostaglandins and nitric oxide in gastric damage induced by metamizol in rats. *Inflamm Res* 2002; 51: 385-392
- 23 Gallego-Sandin S, Novalbos J, Rosado A, Gisbert JP, Galvez-Mugica MA, Garcia AG, Pajares JM, Abad-Santos F. Effect of ibuprofen on cyclooxygenase and nitric oxide synthase of gastric mucosa: correlation with endoscopic lesions and adverse reactions. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1538-1544
- 24 乐桥良, 张志坚, 林克荣, 王雯. 潘托拉唑对胃黏膜损伤保护作用及其机制. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2480-2484

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。

自身免疫性肝炎患者自身抗体的测定及意义

谭立明, 董叶, 曹莉萍, 李华, 蔡莉莉, 王园园

谭立明, 李华, 曹莉萍, 蔡莉莉, 王园园, 南昌大学第二附属医院检验科 江西省南昌市 330006

董叶, 南昌大学第二附属医院消化内科 江西省南昌市 330006

通讯作者: 谭立明, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院检验科. yuuje@sohu.com

电话: 0791-2867799

收稿日期: 2006-07-20 接受日期: 2006-08-14

Detection of autoantibodies for diagnosis of autoimmune hepatitis

Li-Ming Tan, Ye Dong, Li-Ping Cao, Hua Li, Li-Li Cai, Yuan-Yuan Wang

Li-Ming Tan, Li-Ping Cao, Hua Li, Li-Li Cai, Yuan-Yuan Wang, Department of Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Ye Dong, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Li-Ming Tan, Department of Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, 1 Minde Road, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. yuuje@126.com

Received: 2006-07-20 Accepted: 2006-08-14

Abstract

AIM: To evaluate the clinical significance of autoantibody detection in the diagnosis of autoimmune hepatitis (AIH).

METHODS: Indirect immunofluorescence was used to detect the expression of anti-nuclear antibody (ANA), anti-smooth muscle antibody (SMA), antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA), and anti-mitochondrial antibody (AMA) in patients with autoimmune hepatitis (AIH, $n = 47$), non-autoimmune hepatitis ($n = 158$) and healthy controls ($n = 40$). Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to examine the content of anti-myeloperoxidase (MPO) antibody. The result was retrospectively analyzed.

RESULTS: Comparison between the rates of ANA, SMA and ANCA showed that SMA was found the highest in AIH patients (66.0%, 31/47), significantly higher than that in non-AIH

patients (6.3%, 10/158). After chi-square test, SMA and AMA and MPO were markedly different between AIH and primary biliary cirrhosis (PBC) patients ($P < 0.01$). Finally, ANA, SMA and ANCA were correlated with AIH-I, anti-liver/kidney microsomal antibody (LKM) with AIH-II, and anti-soluble liver antigen antibody (SLA), ANCA with AIH-III.

CONCLUSION: Detection of autoantibodies is helpful in the diagnosis and therapy of AIH.

Key Words: Autoimmune hepatitis; Anti-smooth muscle antibody; Antineutrophil cytoplasmic antibody; Anti-nuclear antibody

Tan LM, Dong Y, Cao LP, Li H, Cai LL, Wang YY. Detection of autoantibodies for diagnosis of autoimmune hepatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(28):2801-2805

摘要

目的: 探讨自身抗体测定对诊断自身免疫性肝炎的临床意义。

方法: 采用间接免疫荧光法(IIF)检测47例自身免疫性肝炎患者、158例非自身免疫性肝炎患者及40例健康体检者体内抗核抗体(ANA)、抗平滑肌抗体(SMA)、抗中性粒细胞胞质抗体(ANCA)、抗线粒体抗体(AMA)等自身抗体, ELISA法检测抗MPO抗体, 并对结果进行回顾性分析。

结果: ANA、SMA及ANCA检出率的比较, 结果显示AIH中阳性率最高为SMA(66.0%, 31/47), 而非AIH中则为6.3%(10/158), 两组差异有非常显著性意义($P < 0.01$)。经 χ^2 检验, SMA、AMA和MPO抗体检测在AIH与PBC中, 均有非常显著性意义($P < 0.01$)。AIH各型自身抗体检测结果表明, AIH-I与ANA、SMA和ANCA相关, AIH-II与LKM相关, 而AIH-III与SLA和ANCA相关。

结论: 血清自身抗体的检测对诊断、治疗和阻止自身免疫性肝炎的发展有着十分重要作

■背景资料

自身免疫性肝病正日益受到临床的重视, 这类疾病还可以病毒性肝炎重叠并发, 一些病毒感染的血清学指标有可能掩盖已经存在的自身免疫性肝病, 因此, 对一些长期肝功能异常, 免疫球蛋白增高的慢性肝病患者应进行自身免疫性肝病的实验室诊断。其中自身抗体的检测最为常用, 血清自身抗体的检测对诊断、治疗和阻止自身免疫性肝炎的发展有着十分重要作用。

■研究前沿

自身免疫性肝病患者检测自身抗体对其疾病的诊断有着十分重要的意义, 但还有许多机制不是十分清楚; 对自身抗体的检测目前大多还是定性, 定量检测将是今后研究的热点。

■创新盘点

本研究对自身免疫性肝炎患者血清自身抗体进行了检测,并对其结果进行了比较爱玩耍的研究,进一步加深了对自身免疫性肝炎与自身抗体产生关系的认识.其创新之处在于抗MPO抗体的检测.

用,对提高AIH在临床上同其他肝病鉴别诊断和治疗有着非常重要的意义.

关键词: 自身免疫性肝炎; 抗平滑肌抗体; 抗中性粒细胞胞质抗体; 抗核抗体

谭立明, 董叶, 曹莉萍, 李华, 蔡莉莉, 王园园. 自身免疫性肝炎患者自身抗体的测定及意义. 世界华人消化杂志 2006;14(28):2801-2805

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2801.asp>

0 引言

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)是以肝细胞为靶抗原引起的自身免疫性疾病,也是一种病因不明,以肝脏门静脉周围病变为主的慢性炎症病变,同时外周血中常存在各种自身抗体及高球蛋白血症.主要影响女性,其临床表现是非特异的,AIH的诊断是在综合临床表现,血清学和免疫学的AIH特征并除外其他引起肝病的原因之后得到的,若不经治疗,其预后较差. AIH的临床表现多种多样,其诊断经常被忽略,患者既可无任何症状,只是常规检测时发现肝脏酶的轻度升高,又可表现为爆发性的肝衰竭,病程进展的结局就是肝硬化.我们应用免疫荧光法对47例AIH患者及158例非AIH等患者进行了自身抗体检测,现将结果分析报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 47例AIH及158例非AIH患者均为南昌大学第二附属医院1998-07/2006-05门诊、住院确诊病例,均符合2002年美国肝病学会(AASLD)诊断指南^[1],47例AIH患者中男性6例,女性41例,年龄为4-67岁,平均年龄为44岁;其中AIH-I型患者32例、AIH-II患者8例和AIH-III患者7例.该47例患者所查各项病毒感染指标均为阴性,但肝功能指标均持续异常;158例非AIH分别为原发性胆汁性肝硬化32例,乙型肝炎58例,丙型肝炎43例,戊型肝炎15例,男性68例,女性90例,年龄为19-68岁,平均年龄为37岁;对照组40例,均为我院体检中心健康体检者,男性10例,女性30例,年龄为23-47岁,平均年龄为32岁.

1.2 方法

1.2.1 检测抗核抗体(anti-nuclear antibodies, ANA)、抗平滑肌抗体(smooth muscle antibodies, SMA)、抗线粒体抗体(anti-mitochondrial antibodies, AMA)、抗心肌抗体(anti-myocardial antibodies, HRA)、抗骨骼肌抗体(anti-skeletal

表1 AIH与非AIH患者检测ANA、SMA及ANCA的检出率比较

疾病	n	ANA		SMA		ANCA	
		阳性	%	阳性	%	阳性	%
AIH	47	30 ^c	63.8	31 ^a	66.0	29 ^b	61.7
Non AIH	158	33	20.1	10	6.3	6	3.8
合计	205	63	30.9	41	20.0	35	17.1

^a $P<0.01$ vs 与非AIH; ^b $P<0.01$ vs 与非AIH; ^c $P<0.01$ vs 与非AIH.

muscle antibodies, ASA)、抗胃壁细胞抗体(anti-parietal cell antibodies, PCA)、抗双链DNA(anti-deoxyribonucleic acid antibodies, ds-DNA)抗体、抗中性粒细胞胞质抗体(antineutrophil cytoplasmic antibodies, ANCA)等自身抗体的试剂盒由德国欧蒙公司生产,选择Hep-2细胞和5种灵长类组织(猴肝和心肌组织、骨骼肌、大鼠肝、肾和胃组织)的冰冻切片作为抗原,采用生物薄片马赛克技术将6种细胞或组织组合成1个反应区的基质片检测ANA、SMA、AMA、HRA、PCA和ASA;抗肝肾微粒体抗体(anti-liver/kidney microsomal antibodies, LKM)、抗可溶性肝抗原(anti-soluble liver antigen antibodies, SLA)采用大鼠肝脏和肾脏的冰冻组织切片;ds-DNA抗体采用绿蝇短膜虫基质片;抗中性粒细胞胞质抗体采用在生物薄片马赛克上覆有中性粒细胞(乙醇或甲醛固定)、Hep-2细胞和灵长类肝组织的复合片,4℃保存备用.操作方法严格按试剂说明及我室SOP标准文件进行操作.

1.2.2 检测抗髓过氧化物酶抗体(anti-myeloperoxidase, MPO)采用德国欧蒙公司产生的ELISA法试剂,操作是将样品稀释,按加样方案向相应微孔中分别加稀释血清、阴性、阳性对照和空白对照各100 μL,室温温育30 min,洗板3次,加酶标抗体100 μL再室温温育30 min,同前洗板3次.加底物显色,5 min后加终止液,用450 nm波长比色,计算结果.

统计学处理 数据分析均采用SPSS 11.5软件进行统计分析.

2 结果

2.1 47例AIH与158例非AIH检测ANA、SMA及ANCA检出率的比较,结果显示AIH阳性数最高的为SMA 31例(31/47),阳性率为66.0%;非AIH阳性数则为10例(10/158),阳性率为6.3%,两组比较, $P<0.01$ 差异有非常显著性意义,结果详见表1.

表 2 AIH及非AIH患者检测ANA、SMA、AMA、HRA、PCA和ASA抗体结果

疾病	n	ANA		SMA		AMA		HRA		ASA		PCA	
		阳性	%	阳性	%	阳性	%	阳性	%	阳性	%	阳性	%
AIH	47	30 ^c	63.8	31 ^d	66.0	6	12.8	0	0.0	2	4.3	1	2.1
PBC	32	11	34.4	4	12.5	28 ^e	87.5	1	3.1	0	0.0	0	0.0
HBV	58	6	10.3	1	1.7	5	8.6	0	0.0	1	1.7	0	0.0
HCV	43	10	23.3	0	0.0	2	4.7	0	0.0	0	0.0	0	0.0
HEV	15	2	13.3	0	0.0	8	53.3	0	0.0	0	0.0	0	0.0
对照组	40	2	5.0	0	0.0	1	2.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0

^d $P<0.01$ vs PBC; ^e $P<0.01$ vs AIH.

表 3 AIH患者及非AIH患者检测ds-DNA、ANCA、LKM、SLA和MPO抗体结果

疾病	n	ds-DNA		ANCA		LKM		SLA		MPO	
		阳性	%	阳性	%	阳性	%	阳性	%	阳性	%
AIH	47	10 ^g	21.3	29 ^f	61.7	5	10.6	4	8.5	30 ^h	63.8
PBC	32	1	3.1	3	9.4	0	0.0	0	0.0	3	9.4
HBV	58	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
HCV	43	0	0.0	0	0.0	1	2.3	0	0.0	0	0.0
HEV	15	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
对照组	40	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0

^f $P<0.01$ vs PBC; ^g $P<0.01$ vs PBC; ^h $P<0.01$ vs PBC.

表 4 AIH各型检测ANA、SMA、ANCA、MPO、LKM和SLA等抗体结果

亚型	n	ANA		SMA		ANCA		MPO		LKM		SLA	
		阳性	%	阳性	%	阳性	%	阳性	%	阳性	%	阳性	%
AIH-I	32	27	84.4	29 ^j	90.6	27	84.4	28 ^k	87.5	0.0	0.0	0	0.0
AIH-II	8	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	5 ^m	62.5	0	0.0
AIH-III	7	3	42.9	2	28.6	3	42.9	2	28.6	0	0.0	4	57.1

^j $P<0.01$ vs 与AIH-II和AIH-III; ^k $P<0.01$ vs 与AIH-II和AIH-III; ^m $P<0.01$ vs 与AIH-I和AIH-III.

2.2 AIH及非AIH患者检测六种基质片中ANA、SMA、AMA、HRA、ASA和PCA抗体结果为SMA抗体阳性率最高均为66.0%(31/47); PBC则最高为AMA阳性率87.5%, 详细结果见表2.

2.3 AIH患者及非AIH患者检测ds-DNA、ANCA、LKM、SLA和MPO抗体结果显示AIH患者检测MPO阳性率为63.8%(30/47); 详细结果见表3.

2.4 AIH各型检测ANA、SMA、ANCA、MPO、LKM和SLA等抗体的结果, 表明AIH-I患者与ANA、SMA和ANCA相关; AIH-II患者与LKM相关; AIH-III患者与SLA和ANCA相关, 详见表4.

3 讨论

自身免疫性肝炎呈慢性免疫性肝病, 多好发于中青年女性, 其基本病理改变为肝小叶周围区

有碎屑坏死, 亦可伴有桥样坏死, 其间有明显的淋巴细胞和单核细胞浸润, 但肝内小胆管无损伤的征象. 肝细胞可呈水肿变性和气球样变, 随着病情的进展, 汇管区纤维组织增生, 肝小叶扭曲, 最终导致肝硬化. 自身免疫性肝炎无特异性的临床表现, 患者常有乏力、食欲减退、腹胀、肝区隐痛等症状, 部分患者可有低热或黄疸, 肝、脾可能增大^[2-3]. 我们对47例AIH患者检测SMA、ANA和ANCA抗体其结果阳性分别为31例、30例和29例, 阳性率分别为66.0%、63.8%和61.7%, 结果与非AIH患者比较, $P<0.01$, 表明SMA、ANA和ANCA抗体同AIH疾病有着密切的关系.

自身抗体的产生是AIH患者主要特点之一, 最常见、发现最早的自身抗体是ANA和

■应用要点

自身免疫性肝炎与自身抗体的产生有着密切的相关性, 自身免疫性肝炎患者的血清中常会出现一些特征性的自身抗体, 对于与其他各种肝炎鉴别诊断是极为重要的, 其中SMA、LKM、ANA、MPO和ANCA抗体同AIH疾病有着密切的关系.

■名词解释

抗肝肾微粒体抗体是Ⅱ型自身免疫性肝炎的标志性抗体,其分为有三型,LKM-1:靶抗原是细胞色素P450 IID6,是一种药物代谢酶,可代谢25种常用的药物,包括β-阻断剂、抗心律失常药、抗抑郁药、抗高血压药物等等.LKM-2:靶抗原是细胞色素P450 IIC9,也是药物代谢酶,可见于利尿药物诱导的药物性肝炎.LKM-3:靶抗原可能是UDP-葡萄糖醛基转移酶.

SMA. ANA最常见的靶抗原是组蛋白、RNA和DNA^[4-5]. ANA最常见的间接免疫荧光着色是“均质型”,与系统性红斑狼疮患者血清中ANA的荧光模式相同. AIH荧光模式还有“斑点型、核膜型、核仁型”等. 我们检测的AIH患者ANA滴度基本上在1:160左右,同Czaja *et al*^[6]报道基本相符. 抗平滑肌抗体无器官和种属特异性,靶抗原为三组细胞骨架蛋白,包括微纤维(G型肌动蛋白和F型肌动蛋白)、中级纤维(波形蛋白)和微管(tubulin). 最具诊断价值的靶抗原是F型肌动蛋白. SMA为AIH-I的另一血清学标志抗体. 其对疾病的诊断特异性优于ANA. 特别是高滴度SMA对AIH诊断率可达100%. Leibovitch *et al*^[7]认为,高滴度抗F肌动蛋白抗体是AIH的特异性标志物,但抗F肌动蛋白抗体也可出现在其他疾病. 本组AIH患者检测六种基质片中ANA、SMA、AMA、HRA、ASA和PCA抗体结果AIH患者最高的是SMA抗体,其阳性率最高为66.0%;PBC则为AMA最高,阳性率为87.5%,表明ANA和SMA与AIH患者存在密切的相关性;而AMA则与PBC患者存在密切的相关性. 同Bassendine *et al*^[8]报道基本相符.

LKM抗体能在肝细胞和近端肾小管细胞质着色,因而可以用于和原发性胆汁性肝硬化时的AMA相鉴别, LKM抗体是异质性的, LKM抗体是AIH-II的血清标志. LKM较少见,在成人AIH患者中仅为1%,儿童中为4%. 细胞色素单氧化酶P450 2D6抗原被确认为是LKM的靶抗原,该靶抗原与HCV及I型疱疹病毒的基因序列有一定的同源性,但后者作为AIH发病的证据尚不足. 少数丙型肝炎患者可检测出抗LKM抗体,本组病例检测结果只有1例阳性,然而在AIH中, LKM抗体的滴度要比病毒性丙型肝炎高得多.

抗SLA抗体被认为是Ⅲ型AIH的血清标志物. SLA虽然出现率低,但疾病特异性很高,几乎仅见于AIH-Ⅲ,因此具有确诊意义. 在自身抗体阴性的AIH患者中,大约有10%的患者可能仅抗SLA抗体阳性. AIH患者及非AIH患者检测LKM和SLA抗体结果显示AIH患者检测LKM阳性率为10.6%和SLA阳性率为8.5%,与文献报道基本一致^[9].

抗中性粒细胞胞质抗体指与中性粒细胞及单核细胞胞质中的溶酶体反应的抗体,分胞质型抗中性粒细胞胞质抗体(c-ANCA)和核周型抗中性粒细胞胞质抗体(p-ANCA). 常见抗原

是蛋白酶3(PR3)和髓过氧化物酶(MPO),他对系统性血管炎的诊断、预测有意义. Sobajima *et al*^[10]研究发现在AIH中p-ANCA的靶抗原是高泳动类蛋白(Highmobilitygroup, HMG1/HMG2). 核周型抗中性粒细胞胞质抗体核周型是自身免疫性肝病相关自身抗体之一. 其靶抗原主要是髓过氧化物酶(MPO). 部分原发性硬化性胆管炎可检测出该抗体^[11],故p-ANCA有助于原发性硬化性胆管炎的诊断,但其不是疾病特异性抗体, p-ANCA还可见于AIH、溃疡性结肠炎、克罗恩病和其他疾病. 本研究结果抗MPO抗体在AIH患者中阳性率为63.8%.

AIH有3个亚型^[12]. AIH-I以ANA、SMA和p-ANCA抗体阳性为特征; AIH-II以LKM抗体阳性为特征; AIH-Ⅲ以SLA抗体阳性为特征. I型抗核抗体、抗平滑肌抗体和p-ANCA阳性,又称为经典型,发病年龄有10-20岁和45-70岁两个高峰; II型抗肝肾微粒体抗体(LKM)阳性,一般抗核抗体和抗平滑肌抗体阴性,多见于儿童; III型抗可溶性肝细胞抗体阳性,多见于30-50岁成人,但此型的存在尚未获得共识. 本组病例AIH-I患者32例中女性28例,男性4例,临床表现以肝脏损害为主,同时伴有肝外病变及其他自身免疫性疾病,与国外报道^[13]基本一致. 本组患者均检测到多种自身抗体,如ANA、ds-DNA、SMA和MPO等抗体,这些自身抗体是临床区分AIH与慢性病毒性肝炎的重要指标. 对于临床表现以肝脏损害为主,伴有肝外自身免疫性疾病,并有多重自身抗体阳性的青年女性患者,应高度怀疑AIH的可能.

AIH-I中ANCA滴度较高,而在原发性胆汁性肝硬化(PBC)、AIH-II、酒精性或病毒性肝炎者很少检测到或滴度较低,故ANCA对于诊断ANA、SMA和抗LKM1抗体均阴性的AIH或病毒性肝炎、PBC很有价值. 本组AIH-I患者检测PR3阳性率为87.5%,与文献报道相符^[14-15]. 另外,原发性硬化性胆管炎(PSC)患者中亦能检出ANCA, ANCA的出现似乎与AIH-I、PSC的病情恶化或有无肝硬化有关,但目前尚未证实ANCA与肝硬化的因果关系.

我们对肝病患者进行自身抗体的检测,结果阳性率均高于对照组. 该结果报道的HBV、HCV、HEV提示, HBV患者也可以检出自身免疫抗体,其ANA阳性率为10.3%、SMA阳性率为1.7%和AMA阳性率为8.6%; HCV患者ANA阳性率为23.3%、AMA阳性率为4.7%,同HCV

可以诱导产生自身免疫抗体的结论相符^[16-17], HEV患者ANA阳性率为13.3%、AMA阳性率为53.3%。所以, 我们对肝病患者进行自身的检测十分必要。对提示自身免疫反应有可能参与了肝病的发病, 或是与自身抗体具有共同抗原成份有关。

总之, 血清自身抗体的检测对诊断、治疗 and 阻止自身免疫性肝炎的发展有着十分重要作用。对提高AIH在临床上同其他肝病鉴别诊断和治疗有着非常重要的意义。

4 参考文献

- 1 Czaja AJ, Freese DK. Diagnosis and treatment of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2002; 36: 479-497
- 2 蒋明. 自身抗体测定对诊断自身免疫性肝病的临床意义. *中国实用内科杂志* 2002; 22: 48-51
- 3 Leung PS, Coppel RL, Ansari A, Munoz S, Gershwin ME. Antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1997; 17: 61-69
- 4 Czaja AJ, Cassani F, Cataleta M, Valentini P, Bianchi FB. Antinuclear antibodies and patterns of nuclear immunofluorescence in type 1 autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 1688-1696
- 5 Czaja AJ, Nishioka M, Morshed SA, Hachiya T. Patterns of nuclear immunofluorescence and reactivities to recombinant nuclear antigens in autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1994; 107: 200-207
- 6 Czaja AJ, Carpenter HA, Santrach PJ, Moore SB. Genetic predispositions for the immunological features of chronic active hepatitis. *Hepatology* 1993; 18: 816-822
- 7 Leibovitch L, George J, Levi Y, Bakimer R, Shoenfeld Y. Anti-actin antibodies in sera from patients with autoimmune liver diseases and patients with carcinomas by ELISA. *Immunol Lett* 1995; 48: 129-132
- 8 Bassendine MF, Yeaman SJ. Serological markers of primary biliary cirrhosis: diagnosis, prognosis and subsets. *Hepatology* 1992; 15: 545-548
- 9 Manns MP, Strassburg CP. Autoimmune hepatitis: clinical challenges. *Gastroenterology* 2001; 120: 1502-1517
- 10 Sobajima J, Ozaki S, Uesugi H, Osakada F, Inoue M, Fukuda Y, Shirakawa H, Yoshida M, Rokuhara A, Imai H, Kiyosawa K, Nakao K. High mobility group (HMG) non-histone chromosomal proteins HMG1 and HMG2 are significant target antigens of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in autoimmune hepatitis. *Gut* 1999; 44: 867-873
- 11 Czaja AJ, Homburger HA. Autoantibodies in liver disease. *Gastroenterology* 2001; 120: 239-249
- 12 Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 1994; 19: 1513-1520
- 13 张炳昌, 焦玉莲, 王晓玲. 自身免疫性肝病患者生化指标及自身抗体的研究. *中华检验医学杂志* 2004; 27: 166-167
- 14 Zauli D, Ghetti S, Grassi A, Descovich C, Cassani F, Ballardini G, Muratori L, Bianchi FB. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in type 1 and 2 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1997; 25: 1105-1107
- 15 Targan SR, Landers C, Vidrich A, Czaja AJ. High-titer antineutrophil cytoplasmic antibodies in type-1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1995; 108: 1159-1166
- 16 McMurray RW, Elbourne K. Hepatitis C virus infection and autoimmunity. *Semin Arthritis Rheum* 1997; 26: 689-701
- 17 Manns MP. Hepatotropic viruses and autoimmunity 1997. *J Viral Hepat* 1997; 4 Suppl 1: 7-10

■同行评价

本文探讨了自身免疫性肝炎患者各种自身抗体的变化, 为临床诊断提供了重要的参考价值。

电编 李琪 编辑 张焕兰

白介素-8、白介素-15在结肠癌患者结肠黏膜的表达及意义

高伟, 吴瑜, 司雁菱

■背景资料

结肠癌的发病原因尚未完全明确, 细胞因子被认为在结肠癌的发病中具有极为重要的作用。与结肠癌相关的细胞因子的检测可能对患者的早期诊断、手术及术后治疗方案的制订有重要的意义。

高伟, 司雁菱, 唐山工人医院消化科 河北省唐山市 063000
吴瑜, 唐山工人医院病理实验中心 河北省唐山市 063000
通讯作者: 高伟, 063000, 河北省唐山市, 唐山工人医院消化科。
gw222001@yahoo.com.cn
电话: 0315-3722233
收稿日期: 2006-07-02 接受日期: 2006-07-31

Expression and significances of interleukin-8 and interleukin-15 in colonic mucosa of colon cancer patients

Wei Gao, Yu Wu, Yan-Ling Si

Wei Gao, Yan-Ling Si, Department of Gastroenterology, Worker's Hospital, Tangshan 063000, Hebei Province, China
Yu Wu, Central Laboratory of Pathology, Worker's Hospital, Tangshan 063000, Hebei Province, China
Correspondence to: Wei Gao, Department of Gastroenterology, Worker's Hospital, Tangshan 063000, Hebei Province, China. gw222001@yahoo.com.cn
Received: 2006-07-02 Accepted: 2006-07-31

Abstract

AIM: To investigate the expression of interleukin-8 (IL-8) and IL-15 in colonic mucosa from colon cancer patients and study their relationships with colon cancer.

METHODS: Immunohistochemical technique was used to detect the expression of IL-8 and IL-15 in 66 patients with colon cancer.

RESULTS: The positive rates of IL-8 and IL-15 were 66.7% (44/66) and 60.6% (40/66), respectively. Significant correlations existed between expression of IL-8, IL-15 and the following factors: clinical stages (IL-8: $r = 0.437$, $P = 0.006$; IL-15: $r = 0.317$, $P = 0.014$), invasive depth (IL-8: $r = 0.332$, $P = 0.003$; IL-15: $r = 0.312$, $P = 0.015$), regional lymph node metastasis (IL-8: $r = 0.316$, $P = 0.042$; IL-15: $r = 0.236$, $P = 0.017$), histologic grades (IL-8: $r = 0.826$, $P = 0.0001$; IL-15: $r = 0.368$, $P = 0.001$).

CONCLUSION: Detection of IL-8 and IL-15 ex-

pression is helpful in assessing the malignant degrees of colon cancer.

Key Words: Colon cancer; Interleukin-8; Interleukin-15; Immunohistochemistry

Gao W, Wu Y, Si YL. Expression and significances of interleukin-8 and interleukin-15 in colonic mucosa of colon cancer patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(28):2806-2809

摘要

目的: 研究结肠癌患者结肠黏膜中白介素-8(IL-8)、白介素-15(IL-15)的表达并探讨其临床应用价值。

方法: 采用免疫组化法检测结肠癌患者结肠黏膜中IL-8, IL-15的表达情况。

结果: IL-8染色阳性44例, 占66.7%。IL-15染色阳性40例, 占60.6%。IL-8和IL-15表达水平与结肠癌临床分期(IL-8: $r = 0.437$, $P = 0.006$; IL-15: $r = 0.317$, $P = 0.014$)、浸润深度(IL-8: $r = 0.332$, $P = 0.003$; IL-15: $r = 0.312$, $P = 0.015$)、淋巴结转移(IL-8: $r = 0.316$, $P = 0.042$; IL-15: $r = 0.236$, $P = 0.017$)、病理分级(IL-8: $r = 0.826$, $P = 0.0001$; IL-15: $r = 0.368$, $P = 0.001$)均呈显著正相关。

结论: 检测IL-8, IL-15的表达可做为判断结肠癌恶性程度有价值的指标。

关键词: 结肠癌; 白介素-8; 白介素-15; 免疫组化

高伟, 吴瑜, 司雁菱. 白介素-8、白介素-15在结肠癌患者结肠黏膜的表达及意义. 世界华人消化杂志 2006;14(28):2806-2809
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2806.asp>

0 引言

结肠癌的发病原因尚未完全明确, 其发病主要与环境等因素有关, 为多种因素共同作用的结果。随着研究的深入, 细胞因子被认为在结肠癌

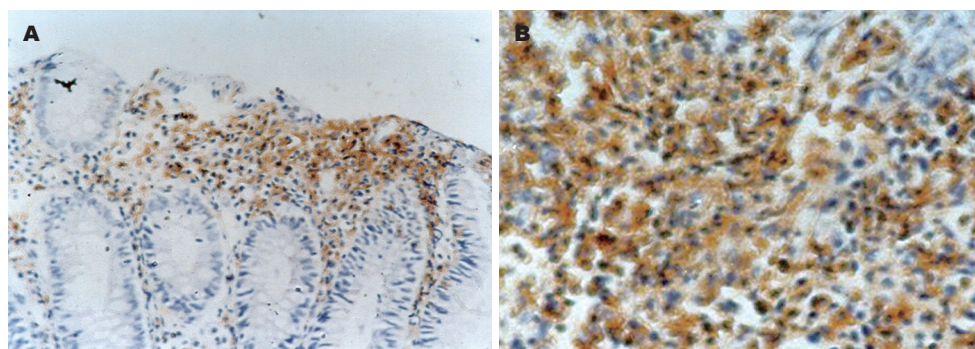


图 1 IL-8在结肠癌组织中的表达($\times 400$). A: +; B: ++.

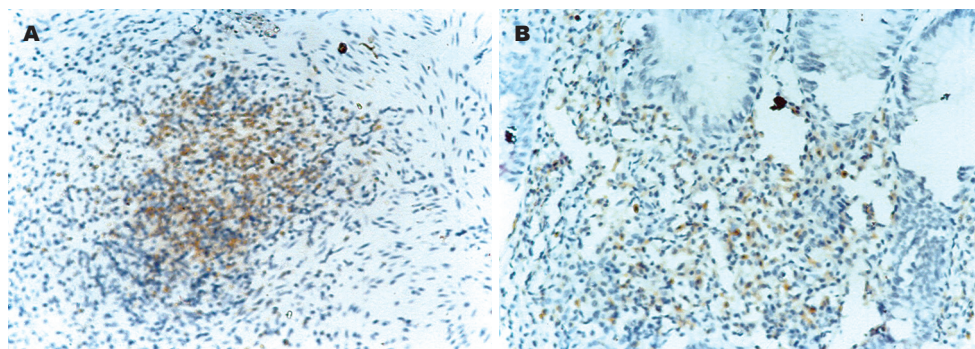


图 2 IL-15在结肠癌组织中的表达($\times 400$). A: +; B: ++.

的发病中具有极为重要的作用. IL-8和IL-15是2种重要的细胞因子, 他们参与多种疾病过程. 本研究旨在观察结肠癌患者结肠黏膜中IL-8和IL-15的表达情况并探讨其临床应用价值.

1 材料和方法

1.1 材料 唐山工人医院2004-07/2005-10经结肠镜活检常规病理学检查确诊为结肠癌并行手术治疗的病例共66例, 男32例, 女34例. 年龄23-79岁. 按WHO标准, 采用TNM分期: I-II期34例, III-IV期32例; 组织学分级 I 级21例, II级22例, III级23例. 所有病例2 mo内均未接受治疗. 各组间在年龄及性别等方面无统计学差异. 鼠抗人IL-8, IL-15 mAb购自北京中山公司, 免疫组化过氧化物酶标记的链霉卵白素(SP)试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒均购自福州迈新公司.

1.2 方法 全部蜡块均行4 μm 厚连续切片, 常规脱蜡至水, 室温下30 g/L甲醇过氧化氢去除内源性过氧化物酶, 微波修复抗原; 滴加一抗后4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 滴加二抗后于37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育30 min; DAB- H_2O_2 显色, 苏木素复染, 中性树胶封片. IL-8阳性表达多数位于结肠癌细胞质中, 部分位于核周, 呈棕黄色颗粒. IL-15阳性表达位于结肠癌细胞的胞质或细胞核内, 呈棕黄色颗粒. 随机选择10

个高倍视野, 以阳性细胞占总数的百分率进行分级, $<10\%$ 为-, $10\%-50\%$ 为+, $>50\%$ 为++.

统计学处理 采用SPSS 11.5统计软件, IL-8, IL-15与临床、病理特征的关系使用Spearman相关分析, $P<0.05$ 为显著性标准.

2 结果

2.1 IL-8, IL-15在结肠癌黏膜组织中的表达 本组66例结肠癌标本中IL-8染色阳性44例(66.7%), 其中29例(43.9%)表达为++, 15例(22.7%)表达为+(图1); IL-15染色阳性40例(60.6%), 其中27例(40.9%)表达为++, 13例(19.7%)表达为+(图2).

2.2 IL-8, IL-15表达与临床、病理参数的关系 IL-8与临床分期呈正相关($r = 0.437, P = 0.006$)、与浸润深度呈正相关($r = 0.332, P = 0.003$)、与淋巴结转移呈正相关($r = 0.316, P = 0.042$)、与病理分级呈正相关($r = 0.826, P = 0.0001$); IL-15与临床分期呈正相关($r = 0.317, P = 0.014$)、与浸润深度呈正相关($r = 0.312, P = 0.015$)、与淋巴结转移呈正相关($r = 0.236, P = 0.017$)、与病理分级呈正相关($r = 0.368, P = 0.001$). IL-8, IL-15与性别及年龄无相关性($P>0.05$, 表1-2).

3 讨论

结肠癌是消化道常见的恶性肿瘤, 其发病率在

■应用要点

本研究结果与先前的多数研究相符, 即IL-8, IL-15在结肠癌患者结肠黏膜中的表达水平与结肠癌临床分期、浸润深度、淋巴结转移、病理分级均呈显著正相关, 这表明IL-8和IL-15在结肠癌发病过程中起到了重要作用. 检测他们的表达情况可做为判断结肠癌恶性程度有价值的指标, 有助于临床诊断及治疗方案的选择.

同行评价

本文初步分析了IL-8, IL-15与结肠癌的关系,具有一定的可读性,和临床价值.但后续研究需要进一步深入探讨细胞因子与肿瘤的关系.

表 1 结肠癌组织中IL-8的表达及与临床、病理特征的关系 (n)

临床病理	n	IL-8的表达		
		++	+	-
TNM分期				
I - II	34	12	4	18
III - IV	32	17 ^b	11 ^b	4 ^b
浸润深度				
T ₁ -T ₂	31	8	3	20
T ₃ -T ₄	35	21 ^d	12 ^d	2 ^d
淋巴结转移				
有	32	18	10	4
无	34	11 ^a	5 ^a	18 ^a
病理分级				
I 级	21	4	2	15
II 级	22	9 ^f	6 ^f	7 ^f
III 级	23	16 ^f	7 ^f	0 ^f

^aP<0.05 vs 淋巴结转移组; ^bP<0.01 vs TNM I - II 期; ^dP<0.01, vs T₁-T₂期; ^fP<0.01 vs 病理分级 I 级.

表 2 结肠癌组织中IL-15的表达及与临床、病理特征的关系 (n)

临床病理	n	IL-15的表达		
		++	+	-
TNM分期				
I - II	34	9	5	20
III - IV	32	18 ^a	8 ^a	6 ^a
浸润深度				
T ₁ -T ₂	31	8	4	19
T ₃ -T ₄	35	19 ^c	9 ^c	7 ^c
淋巴结转移				
有	32	21	8	3
无	34	6 ^e	5 ^e	23 ^e
病理分级				
I 级	21	4	1	16
II 级	22	8 ^b	5 ^b	9 ^b
III 级	23	15 ^b	7 ^b	1 ^b

^aP<0.05 vs TNM I - II 期; ^bP<0.01 vs 病理分级 I 级; ^cP<0.05, vs T₁-T₂期; ^eP<0.01 vs 淋巴结转移组.

我国仅次于胃癌和食道癌,居消化道恶性肿瘤的第三位.目前认为结肠癌的发病是多因素共同作用的结果,随着研究的深入,人们发现与结肠癌相关的细胞因子的检测可能对患者的早期诊断、手术及术后治疗方案的制订有重要的意义.

IL-8是1986年Kownazki首先发现的一种强有力的中性粒细胞趋化因子和活化因子^[1],其主要生物作用为趋化并激活中性粒细胞^[2],促进中性粒细胞的溶酶体活性和吞噬作用.同时,IL-8能够趋化血管内皮细胞,促进血管的形成,此外他还具有免疫调节作用,能够影响肿瘤的微环境.有研究表明血管形成与肿瘤生长转移密切相关^[3].国内研究发现,IL-8在直、结肠癌的肿瘤血管形成中起重要作用^[4].另有研究发现IL-8能促进结肠癌细胞的增殖和转移^[5].Brew *et al*^[6]利用免疫组化和RT-PCR等方法检测结肠癌患者结肠黏膜中IL-8的表达,结果表明IL-8在结肠癌细胞系中扮演了自分泌细胞生长因子的角色.还有国外学者认为,IL-8作为结肠癌细胞的自分泌或旁分泌生长因子,具有调节肿瘤生长和转移的功能^[7].Ueda *et al*^[8]检测结肠癌患者血清中的细胞因子,其中IL-8的浓度明显升高.Hao *et al*^[9]发现,在有结肠癌家族史的正常人的结肠黏膜中,IL-8表达升高.

IL-15是1994年由Grabstein *et al*发现的分子量为14-15 kDa的糖蛋白细胞因子.IL-15与IL-2

相似,由不同类型的细胞产生,他以IL-2 α 和 γ 链的成分作为其信号传导,具有结合T细胞、B细胞、NK细胞以及上皮细胞的相应受体,促进这些细胞的活化、增生,抑制其凋亡以及促进促炎性细胞因子的合成等作用.国外研究表明,IL-15通过影响细胞的生长、侵入和凋亡而在结肠癌的发生、发展过程中发挥着重要的作用^[10].IL-15能诱导结肠癌细胞增殖、侵入和产生前血管生长因子^[11],又能促进肠上皮细胞产生血管生长因子,因此他能促进结肠黏膜增生和血管生成,导致肿瘤生长和转移^[12-13].Baier *et al*利用RT-PCR方法检测结肠黏膜中细胞因子的表达,结果IL-15的表达在结肠癌组和正常对照组间无显著差异.国外学者发现:IL-15是一种NK细胞化学诱导剂^[14],因此他应间接抑制结肠癌和其他肿瘤^[15-17]的发展,而Cao *et al*^[18]的研究证实,IL-15在结肠癌细胞和在宿主免疫系统中表现出相反的生物活性作用,即促进结肠癌细胞的生长、转移,这与Kuniyasu *et al*^[19]的研究结果相一致.Baier *et al*^[20]最新研究发现,IL-15通过消耗肿瘤相关性巨噬细胞而促进结肠癌细胞的生长.总之,多数研究表明,结肠癌患者结肠黏膜中IL-8,IL-15的表达升高,且与病情严重程度呈正相关.我们的研究结果与之相符,即IL-8,IL-15在结肠癌患者结肠黏膜中的表达水平与结肠癌临床分期、浸润深度、淋巴结转移、病理分级均呈显

著正相关, 这表明IL-8和IL-15在结肠癌发病过程中起到了重要作用. 检测他们的表达情况可作为判断结肠癌恶性程度有价值的指标, 有助于临床诊断及治疗方案的选择.

4 参考文献

- 1 Yoshimura T, Matsushima K, Oppenheim JJ, Leonard EJ. Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL 1). 1987. *J Immunol* 2005; 175: 5569-5574
- 2 Huber AR, Kunkel SL, Todd RF 3rd, Weiss SJ. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 1991; 254: 99-102
- 3 Garcea G, Lloyd TD, Gescher A, Dennison AR, Steward WP, Berry DP. Angiogenesis of gastrointestinal tumours and their metastases—a target for intervention? *Eur J Cancer* 2004; 40: 1302-1313
- 4 杨春康, 陈道达, 张惠灏, 许东坡, 田源, 张景辉. 结直肠癌趋化因子IL-8的表达与血管形成的关系. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 899-901
- 5 Itoh Y, Joh T, Tanida S, Sasaki M, Kataoka H, Itoh K, Oshima T, Ogasawara N, Togawa S, Wada T, Kubota H, Mori Y, Ohara H, Nomura T, Higashiyama S, Itoh M. IL-8 promotes cell proliferation and migration through metalloproteinase-cleavage proHB-EGF in human colon carcinoma cells. *Cytokine* 2005; 29: 275-282
- 6 Brew R, Erikson JS, West DC, Kinsella AR, Slavin J, Christmas SE. Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells *in vitro*. *Cytokine* 2000; 12: 78-85
- 7 Li A, Varney ML, Singh RK. Expression of interleukin 8 and its receptors in human colon carcinoma cells with different metastatic potentials. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 3298-3304
- 8 Ueda T, Shimada E, Urakawa T. Serum levels of cytokines in patients with colorectal cancer: possible involvement of interleukin-6 and interleukin-8 in hematogenous metastasis. *J Gastroenterol* 1994; 29: 423-429
- 9 Hao CY, Moore DH, Wong P, Bennington JL, Lee NM, Chen LC. Alteration of gene expression in macroscopically normal colonic mucosa from individuals with a family history of sporadic colon cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1400-1407
- 10 Kuniyasu H, Oue N, Tsutsumi M, Tahara E, Yasui W. Heparan sulfate enhances invasion by human colon carcinoma cell lines through expression of CD44 variant exon 3. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 4067-4072
- 11 Kuniyasu H, Oue N, Nakae D, Tsutsumi M, Denda A, Tsujiuchi T, Yokozaki H, Yasui W. Interleukin-15 expression is associated with malignant potential in colon cancer cells. *Pathobiology* 2001; 69: 86-95
- 12 Kuniyasu H, Oue N, Shigeishi H, Ito R, Kato Y, Yokozaki H, Yasui W. Prospective study of Ki-67 labeling index in the mucosa adjacent to cancer as a marker for colorectal cancer metastasis. *J Exp Clin Cancer Res* 2001; 20: 543-548
- 13 Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res* 2000; 55: 15-35
- 14 Tasaki K, Yoshida Y, Miyauchi M, Maeda T, Takenaga K, Kouzu T, Asano T, Ochiai T, Sakiyama S, Tagawa M. Transduction of murine colon carcinoma cells with interleukin-15 gene induces antitumor effects in immunocompetent and immunocompromised hosts. *Cancer Gene Ther* 2000; 7: 255-261
- 15 Di Carlo E, Meazza R, Basso S, Rosso O, Comes A, Gaggero A, Musiani P, Santi L, Ferrini S. Dissimilar anti-tumour reactions induced by tumour cells engineered with the interleukin-2 or interleukin-15 gene in nude mice. *J Pathol* 2000; 191: 193-201
- 16 Gri G, Chiodoni C, Gallo E, Stoppacciaro A, Liew FY, Colombo MP. Antitumor effect of interleukin (IL)-12 in the absence of endogenous IFN-gamma: a role for intrinsic tumor immunogenicity and IL-15. *Cancer Res* 2002; 62: 4390-4397
- 17 Fehniger TA, Cooper MA, Caligiuri MA. Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13: 169-183
- 18 Cao S, Troutt AB, Rustum YM. Interleukin 15 protects against toxicity and potentiates antitumor activity of 5-fluorouracil alone and in combination with leucovorin in rats bearing colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 1695-1699
- 19 Kuniyasu H, Ohmori H, Sasaki T, Sasahira T, Yoshida K, Kitadai Y, Fidler IJ. Production of interleukin 15 by human colon cancer cells is associated with induction of mucosal hyperplasia, angiogenesis, and metastasis. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4802-4810
- 20 Baier PK, Wolff-Vorbeck G, Eggstein S, Baumgartner U, Hopt UT. Cytokine expression in colon carcinoma. *Anticancer Res* 2005; 25: 2135-2139

电编 张敏 编辑 张焕兰

胰腺导管腺癌组织中WT1, IGF-IR表达与细胞凋亡的关系

龚勇, 赵秋, 杨芳, 王渝, 马松林

■背景资料

胰腺导管腺癌的发生涉及到抑癌基因的突变, 原癌基因的激活, WT1基因为具有抑癌基因和原癌基因样双重活性的基因, 能调节多种细胞因子如IGF-IR等的表达, IGF-IR参与细胞凋亡的调节, 探讨胰腺导管腺癌组织中WT1, IGF-IR的表达与细胞凋亡关系在胰腺导管腺癌的发生发展中有重要意义。

龚勇, 赵秋, 杨芳, 王渝, 马松林, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030

通讯作者: 赵秋, 430030, 湖北省武汉市汉口解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科。

tongji461@sina.com

电话: 027-83663611

收稿日期: 2006-07-31 接受日期: 2006-08-15

Relationship between expression of Wilms' tumor gene, insulin-like growth factor I receptor and cell apoptosis in human pancreatic duct adenocarcinoma

Yong Gong, Qiu Zhao, Fang Yang, Yu Wang, Song-Lin Ma

Yong Gong, Qiu Zhao, Fang Yang, Yu Wang, Song-Lin Ma, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Correspondence to: Qiu Zhao, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. tongji461@sina.com
Received: 2006-07-31 Accepted: 2006-08-15

Abstract

AIM: To investigate the roles of Wilms' tumor gene (WT1), insulin-like growth factor I receptor expression (IGF-IR) and cell apoptosis as well as their correlations in human pancreatic duct adenocarcinoma.

METHODS: Immunohistochemical analysis was used to detect the expression of WT1 and IGF-IR in human pancreatic duct adenocarcinoma ($n = 49$) and normal pancreatic tissues ($n = 15$). The cell apoptosis of pancreatic duct adenocarcinoma was estimated by terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) method and apoptosis index (AI) was calculated.

RESULTS: In normal pancreatic tissues, the positive rates of WT1, IGF-IR were 26.67% (4/15), 40.00% (6/15), respectively, and in pancreatic duct adenocarcinoma their positive rates were

71.43% (35/49), 77.55% (38/49), respectively. There were significant differences between cancer and normal tissues ($P < 0.05$). A positive relationship existed between the expression of WT1 and IGF-IR in pancreatic duct adenocarcinoma ($r = 0.385, P < 0.05$). The values of AI were 0.41 ± 0.13 and 5.93 ± 4.18 in the normal tissues and adenocarcinoma, respectively, and there was also a significant difference between them ($P < 0.05$). The value of AI was increased with the rising of tumor differentiation degree in adenocarcinoma, and it was lower in the IGF-IR-positive group than that in the negative group (4.11 ± 3.68 vs $12.21 \pm 5.67, P < 0.01$).

CONCLUSION: The apoptosis is inhibited in pancreatic duct adenocarcinoma, in which the over-expression of WT1 and IGF-IR may play crucial roles.

Key Words: Wilms' tumor gene; Insulin-like growth factor I receptor; Pancreatic duct adenocarcinoma; Immunohistochemistry; Cell apoptosis

Gong Y, Zhao Q, Yang F, Wang Y, Ma SL. Relationship between expression of Wilms' tumor gene, insulin-like growth factor I receptor and cell apoptosis in human pancreatic duct adenocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(28):2810-2814

摘要

目的: 研究胰腺导管腺癌组织中WT1, IGF-IR的表达与细胞凋亡关系。

方法: 应用免疫组化技术检测WT1, IGF-IR在49例胰腺导管腺癌及15例正常胰腺组织中的表达, 并应用TUNEL法检测细胞凋亡, 计算凋亡指数(AI)。

结果: WT1, IGF-IR在正常胰腺组织中的阳性表达率分别为26.67%(4/15)、40.00%(6/15); 在胰腺导管腺癌组织中的阳性表达率分别为71.43%(35/49)、77.55%(38/49), 两者在癌组织中的表达分别明显高于其在正常胰腺组织中的表达($P < 0.05$), 且在癌组织中的表达呈正相关($r = 0.385, P < 0.05$)。正常胰腺组织及癌组织中的AI分别为 0.41 ± 0.13 、 5.93 ± 4.18 , 两

■研究前沿

WT1反义寡核苷酸以及WT1基因超甲基化和去甲基化对胰腺癌细胞生长、增殖和凋亡、IGF-IR表达的影响是亟待研究的。

者比较有显著性差异($P<0.05$), 癌组织中AI随组织分化程度的升高而升高. IGF-IR表达阳性组的AI显著低于阴性组(4.11 ± 3.68 vs 12.21 ± 5.67 , $P<0.01$).

结论: 胰腺导管腺癌组织中IGF-IR的高表达抑制细胞凋亡, WT1, IGF-IR的高表达以及细胞凋亡的减少可能在胰腺导管腺癌的发生发展中起重要作用.

关键词: Wilms肿瘤基因; 胰岛素样生长因子I受体; 胰腺导管腺癌; 免疫组织化学; 细胞凋亡

龚勇, 赵秋, 杨芳, 王渝, 马松林. 胰腺导管腺癌组织中WT1, IGF-IR的表达与细胞凋亡的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(28):2810-2814
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2810.asp>

0 引言

Wilms肿瘤基因(Wilms' tumor gene, WT1)是最早发现的与Wilms肿瘤的发生、发展有关, 具有抑癌基因和原癌基因双重活性的基因, 其编码的WT1蛋白能识别、结合特异目标DNA如胰岛素样生长因子受体I(IGF-IR) 基因并调控下游靶基因转录, 从而影响某些因子的生物学活性, 在肿瘤的发生中起重要作用^[1-3]. IGF-IR为四聚体跨膜糖蛋白, 在调节细胞增殖与分化、抑制肿瘤细胞凋亡方面发挥关键作用^[4]. 我们采用免疫组化和原位细胞凋亡染色技术, 观察胰腺导管腺癌及正常胰腺组织中WT1, IGF-IR的表达并探讨其与细胞凋亡的关系, 为研究胰腺导管腺癌发生的分子机制及预防治疗提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 2000-01/2005-10华中科技大学同济医学院附属同济医院病理科存档石蜡包埋的胰腺标本64例: 正常胰腺组织15例, 其中男9例, 女6例, 平均年龄(58.5 ± 13.5)岁; 胰腺导管腺癌组织49例, 其中男30例, 女19例, 平均年龄(56.7 ± 11.9)岁. 患者术前均未行放化疗, 术后均有明确的病理学诊断. 根据UICC2003年新的分级标准进行TNM分期: I - II期21例、III-IV期28例; 组织学分级高中分化30例、低分化19例; 有淋巴结转移31例、无转移18例. 两组在性别、年龄分布上均无显著性差异($P>0.05$). WT1鼠抗人mAb、SP免疫组化染色试剂盒、TUNEL检测试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司; IGF-IR兔抗人多克隆抗体购于武汉博士德公司.

1.2 方法 SP免疫组化方法按试剂盒说明进行, WT1抗原采用酶消化修复、IGF-IR抗原采用微波热修复, 用PBS代替一抗作阴性对照, 已知的阳性片作阳性对照. 细胞凋亡检测按试剂盒说明进行, 以不含TdT的标记液替代TUNEL反应液作阴性对照, 用已知阳性胰腺癌细胞凋亡片作阳性对照. WT1, IGF-IR阳性染色均为棕黄色颗粒, 分别定位于细胞核和细胞膜. 每例随机计数1000个清晰的癌细胞, 记录阳性染色细胞数, 以(阳性染色细胞数/1000) $\times 100\%\geq 15\%$ 定为染色阳性, 即过度表达; 以细胞核内出现蓝紫颗粒为凋亡细胞, 随机选择10个视野并计数1000个肿瘤细胞, 计算细胞凋亡指数(AI): $AI=(\text{凋亡细胞数}/1000)\times 100\%$

统计学处理 用SPSS 12.0统计分析软件包进行处理, 采用 χ^2 检验、Fisher精确概率法、 t 检验、Spearman相关性分析等方法对数据进行统计学处理, 显著性水准 $\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 胰腺导管腺癌及正常胰腺组织中WT1, IGF-IR的表达 WT1, IGF-IR的阳性表达分别表现为肿瘤细胞核和胞膜呈棕黄色. WT1, IGF-IR在胰腺导管腺癌组织中的表达分别明显高于其在正常胰腺组织中的表达, 差异有统计学意义($P<0.05$, 表1). WT1, IGF-IR的表达与病人年龄、性别、肿瘤部位无关. WT1在TNM分期I - II期和III-IV期的阳性表达率分别为52.38%, 85.71%, 在高中分化组、低分化组的阳性表达率分别为60.00%, 89.47%. WT1的表达随肿瘤分期升高、细胞分化降低而升高($P<0.05$); IGF-IR在I - II期和III-IV期的阳性表达分别为61.90%, 9.29%, 两者比较有统计学差异($P<0.05$) (表1).

2.2 胰腺导管腺癌及正常胰腺组织中细胞凋亡的检测 胰腺导管腺癌及正常胰腺组织中的平均AI分别为 5.93 ± 4.18 , 0.41 ± 0.13 , 两者比较有显著性差异($P<0.05$). 在癌组织中, AI随着组织分化程度的升高而升高, 随病理分级的增高而降低, 各级之间差异有统计学意义($P<0.05$) (表1).

2.3 WT1, IGF-IR在胰腺导管腺癌中相关性表达及与细胞凋亡的关系 将秩相关分析显示胰腺导管腺癌组织中WT1, IGF-IR的表达密切正相关($r = 0.384$, $P<0.05$, 表2). WT1表达阳性组的AI与阴性组比较无差异($P>0.05$); IGF-IR 表达阳性组的AI低于阴性组, 两者呈显著负相关($P<0.05$) (表3).

■相关报道

国外学者应用免疫组化及RT-PCR等技术检测证实WT1基因及受其调节的细胞因子等在胰腺癌、胃癌、食管癌等肿瘤组织中均存在高表达, 表明WT1基因突变激活可能参与消化系统肿瘤的发生发展.

■创新盘点

以免疫组化检测WT1, IGF-IR在胰腺导管腺癌组织的表达, TUNEL分析胰腺导管腺癌细胞凋亡, 将免疫组化及TUNEL的实验结果纵向对比分析胰腺导管腺癌组织中WT1, IGF-IR的表达与细胞凋亡的关系.

■应用要点

WT1, IGF-1R的表达对胰腺导管腺癌的诊断和判断预后有一定临床意义. 设想通过反义寡核苷酸技术以WT1基因为靶点进行基因治疗, 抑制WT1基因转录活性, 降低WT1, IGF-1R的过高表达, 促进细胞凋亡, 有可能为胰腺导管腺癌的治疗提供新的途径.

表 1 WT1, IGF-1R 的表达及细胞凋亡与胰腺癌临床病理参数的关系

临床病理参数	n	WT1				IGF-1R				细胞凋亡	
		n	%	χ^2	P	n	%	χ^2	P	AI(mean \pm SD)	P
正常组织	15	4	26.7	9.67	<0.01	6	40.0	5.89	<0.05	0.41 \pm 0.13	<0.01
癌组织	49	35	71.4			38	77.6			5.93 \pm 4.18	
性别											
男	30	22	73.3	0.14	>0.05	24	80.0	0.03	>0.05	5.56 \pm 3.94	>0.05
女	19	13	68.4			14	73.7			6.51 \pm 4.54	
年龄											
≥ 60	34	26	76.5	0.69	>0.05	28	82.4	0.71	>0.05	6.01 \pm 4.36	>0.05
< 60	15	9	60.0			10	66.7			5.74 \pm 3.72	
肿瘤部位											
胰头癌	41	30	73.2	0.03	>0.05	34	82.9	2.49	>0.05	5.66 \pm 3.84	>0.05
胰体尾癌	8	5	62.5			4	50.0			6.17 \pm 4.55	
临床分期											
I - II	21	11	52.4	6.53	<0.05	12	57.1	6.86	<0.05	7.84 \pm 4.91	<0.05
III - IV	28	24	85.7			26	92.9			4.51 \pm 3.54	
组织分化程度											
高中分化	30	18	60.0	4.95	<0.05	25	83.3	0.75	>0.05	7.04 \pm 4.77	<0.05
低分化	19	17	89.5			13	68.4			4.17 \pm 2.99	

表 2 WT1, IGF-1R 在胰腺癌的相关性表达

WT1	IGF-1R			r	P
	+	-	合计		
+	31	4	35	0.385	<0.05
-	7	7	14		
合计	38	11	49		

表 3 WT1, IGF-1R 的表达与细胞凋亡的关系(mean \pm SD)

	n	A	P
WT1(+)	35	5.66 \pm 3.84	>0.05
WT1(-)	14	6.61 \pm 4.96	
IGF-1R(+)	38	4.11 \pm 3.68	<0.01
IGF-1R(-)	11	12.21 \pm 5.67	

3 讨论

Wilms肿瘤基因(Wilms' tumor gene, WT1)是从肾母细胞瘤(Wilm's瘤)染色体11p13分离出来的肿瘤基因^[1-2], 具有抑癌基因和原癌基因双重活性, 其表达产物WT1蛋白为一双向转录调节因子, 主要功能是识别、结合特异目标DNA并调节转录, 如胰岛素样生长因子受体I(IGF-1R)基因^[3]、胰岛素样生长因子II(IGF-II)基因^[5]、多种癌基因p53、HER2等^[6-7]. WT1除了在胎儿肾脏、性腺等组织中表达外, 在白血病细胞、肺癌、结肠癌、乳腺癌等恶性肿瘤中也高度表达^[8-11]. 近来研究发现WT1的表达与胰腺癌的发生发展关系密切, 国外学者Yusuke *et al*^[12]检测40例胰腺导管腺癌中WT1阳性表达率为75.00%, 正常胰腺组织中未检测到WT1的表达, 在培养的5例人胰腺癌细胞系中WT1 mRNA均存在高表达. 将反义WT1寡聚核苷酸探针转染到培养的人胰腺癌细胞株后, WT1 mRNA及WT1表达明显下降, 细胞的增殖受到显著抑制, 而细胞凋亡率上升. IGF-1R基因转录受到WT1的调节^[4]. IGF-1R是四聚体跨膜糖蛋白, 为酪氨酸蛋白激酶类受体家族的主要成员之一, IGF-1R与IGF-1结合自身磷

酸化而活化, 启动了不同的细胞信号转导途径, 促进肿瘤细胞有丝分裂, 抑制细胞凋亡^[13]. IGF-1R在多种肿瘤组织中如结肠癌、前列腺癌等过度表达, 与恶性肿瘤的发生发展有密切的联系^[14-15]. 为探讨WT1及IGF-1R在胰腺组织中的表达及相互关系, 我们采用免疫组织化学分别检测了WT1, IGF-1R在49例胰腺导管腺癌及15例正常胰腺组织中的表达, 结果癌组织中WT1, IGF-1R表达率分别为71.4%, 77.6%, 与其在正常胰腺组织中相比, 两者分别有显著性差异. 提示WT1, IGF-1R的表达与胰腺导管腺癌的发生发展关系密切. WT1, IGF-1R两者在癌组织中的表达呈正相关, 可能因为WT1具有结合目标DNA并且调控下游靶基因的转录的功能, 其作为反式作用元件与编码IGF-1R序列的DNA结合, 从而增强IGF-1R基因转录水平, 结果IGF-1R的表达被上调. WT1, IGF-1R共同参与胰腺导管腺癌的发生, 检测胰腺组织中WT1, IGF-1R表达有可能成为预测胰腺导管腺癌生物学行为的标记物. 我们进一步探讨WT1, IGF-1R的与胰腺导管腺癌临床病理联系: WT1有随肿瘤分期升高、细胞分化降低而升高的趋势并且IGF-1R与肿瘤

的临床分期相关, 即WT1和IGF-IR的高表达参与胰腺导管腺癌的发展、侵袭和转移, 这表明WT1, IGF-IR的表达状态可能预示肿瘤的侵袭性和预后. WT1, IGF-IR是否可以作为指标来反映胰腺导管腺癌的临床病理特征及预后, 有待于进一步收集随访资料来研究证实.

细胞凋亡是指为维持内环境稳定, 由基因控制的为更好地适应生存环境细胞自主有序性死亡^[16]. 他涉及一系列基因的激活、表达以及调控等的作用, 其过程受凋亡促进因子和抑制因子的共同调节. 我们利用 TUNEL检测胰腺组织中的细胞凋亡情况并计算AI. 结果49例胰腺导管腺癌和15例正常胰腺组织中的AI分别为 5.93 ± 4.18 , 0.41 ± 0.13 , 两者比较有显著性差异. AI在肿瘤组织高分化组、TNM I - II 期组明显高于低分化组、III-IV期组, 细胞凋亡的增加可能是机体本身存在自我对抗肿瘤的一种防御方式. 而凋亡与患者的性别、年龄、肿瘤部位无关, 表明凋亡主要影响胰腺癌的发展、转移及预后, 对胰腺癌的发生影响较小. 在同一病变中IGF-IR表达阳性组AI值低于阴性组, 两者相比有统计学意义, 表明IGF-IR具有调节细胞凋亡的功能, IGF-IR的过度表达可能抑制细胞凋亡的发生, 增强细胞的增殖活性, 细胞增殖与凋亡之间动态平衡被破坏, 破坏了机体的自身调节, 突变细胞逃离生长监控得以生存, 在胰腺导管腺癌发生发展中发挥负调节作用.

本研究结果表明, WT1, IGF-1R的表达与胰腺导管腺癌的发生、发展、浸润、转移密切相关. WT1, IGF-1R的表达对胰腺导管腺癌的诊断和判断预后有一定临床意义. 设想通过反义寡核苷酸技术以WT1基因为靶点进行基因治疗, 抑制WT1基因转录活性, 降低WT1, IGF-1R的过高表达, 促进细胞凋亡, 有可能为胰腺导管腺癌的治疗提供新的途径

4 参考文献

- 1 Lee SB, Haber DA. Wilms tumor and the WT1 gene. *Exp Cell Res* 2001; 264: 74-99
- 2 Loeb DM, Sukumar S. The role of WT1 in oncogenesis: tumor suppressor or oncogene? *Int J Hematol* 2002; 76: 117-126
- 3 Finkeltov I, Kuhn S, Glaser T, Idelman G, Wright JJ, Roberts CT Jr, Werner H. Transcriptional regulation of IGF-I receptor gene expression by novel isoforms of the EWS-WT1 fusion protein. *Oncogene* 2002; 21: 1890-1898
- 4 Shahrabani-Gargir L, Pandita TK, Werner H.

- Ataxia-telangiectasia mutated gene controls insulin-like growth factor I receptor gene expression in a deoxyribonucleic acid damage response pathway via mechanisms involving zinc-finger transcription factors Sp1 and WT1. *Endocrinology* 2004; 145: 5679-5687
- 5 Watanabe N, Nakadate H, Haruta M, Sugawara W, Sasaki F, Tsunematsu Y, Kikuta A, Fukuzawa M, Okita H, Hata J, Soejima H, Kaneko Y. Association of 11q loss, trisomy 12, and possible 16q loss with loss of imprinting of insulin-like growth factor-II in Wilms tumor. *Genes Chromosomes Cancer* 2006; 45: 592-601
- 6 Dupont J, Wang X, Marshall DS, Leitao M, Hedvat CV, Hummer A, Thaler H, O'Reilly RJ, Soslow RA. Wilms Tumor Gene (WT1) and p53 expression in endometrial carcinomas: a study of 130 cases using a tissue microarray. *Gynecol Oncol* 2004; 94: 449-455
- 7 Tuna M, Chavez-Reyes A, Tari AM. HER2/neu increases the expression of Wilms' Tumor 1 (WT1) protein to stimulate S-phase proliferation and inhibit apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* 2005; 24: 1648-1652
- 8 Miyawaki S, Emi N, Mitani K, Oyashiki K, Kitamura K, Morishita T, Ogawa H, Komatsu N, Soma T, Tamaki T, Kosugi H, Ohnishi K, Mizoguchi H, Hiraoka A, Kodera Y, Ueda R, Morishima Y, Nakagawa M, Tobita T, Sugimoto K, Chiba S, Inoue N, Hamaguchi M, Koga D, Tamaki H, Naoe T, Sugiyama H, Takaku F. Clinical course of the disease and the level of WT1 mRNA in 191 patients with acute myeloid leukemia (AML): joint research by 23 institutions in Japan. *Rinsho Ketsueki* 2005; 46: 1279-1287
- 9 Miyoshi Y, Ando A, Egawa C, Taguchi T, Tamaki Y, Tamaki H, Sugiyama H, Noguchi S. High expression of Wilms' tumor suppressor gene predicts poor prognosis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1167-1171
- 10 Oji Y, Miyoshi S, Maeda H, Hayashi S, Tamaki H, Nakatsuka S, Yao M, Takahashi E, Nakano Y, Hirabayashi H, Shintani Y, Oka Y, Tsuboi A, Hosen N, Asada M, Fujioka T, Murakami M, Kanato K, Motomura M, Kim EH, Kawakami M, Ikegame K, Ogawa H, Aozasa K, Kawase I, Sugiyama H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in de novo lung cancers. *Int J Cancer* 2002; 100: 297-303
- 11 Oji Y, Yamamoto H, Nomura M, Nakano Y, Ikeba A, Nakatsuka S, Abeno S, Kiyotoh E, Jomgeow T, Sekimoto M, Nezu R, Yoshikawa Y, Inoue Y, Hosen N, Kawakami M, Tsuboi A, Oka Y, Ogawa H, Souda S, Aozasa K, Monden M, Sugiyama H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in colorectal adenocarcinoma. *Cancer Sci* 2003; 94: 712-717
- 12 Oji Y, Nakamori S, Fujikawa M, Nakatsuka S, Yokota A, Tatsumi N, Abeno S, Ikeba A, Takashima S, Tsujie M, Yamamoto H, Sakon M, Nezu R, Kawano K, Nishida S, Ikegame K, Kawakami M, Tsuboi A, Oka Y, Yoshikawa K, Aozasa K, Monden M, Sugiyama H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci* 2004; 95: 583-587
- 13 Larsson O, Girnita A, Girnita L. Role of insulin-like

■名词解释

- 1 反义寡核苷酸技术: 就是根据碱基互补原理, 利用人工或生物合成的特异互补的DNA或RNA片段(或其修饰产物)抑制或封闭基因表达的技术.
- 2 TUNEL法: 即原位DNA末端标记法, 其基本原理是利用细胞凋亡过程中DNA断裂暴露的末端, 用已标记荧光的碱基与之互补连接, 而后直接用荧光显微镜观察或用相应荧光抗体与之结合, 再通过快红等显色剂显色了解有无DNA断裂从而了解细胞凋亡. 是目前检测细胞凋亡的一种常用方法.

■同行评价

本实验采用免疫组化和原位细胞凋亡染色技术,观察胰腺导管腺癌及正常胰腺组织中WT1、IGF-IR的表达情况,结果表明:胰腺导管腺癌组织中IGF-IR的高表达抑制细胞凋亡,WT1、IGF-IR的高表达以及细胞凋亡的减少可能在胰腺导管腺癌的发生发展中起重要作用。该文思路清晰,目的明确,材料方法先进,结果、结论可信,是一篇较好的研究论文。

- growth factor 1 receptor signalling in cancer. *Br J Cancer* 2005; 92: 2097-2101
- 14 Weber MM, Fottner C, Liu SB, Jung MC, Engelhardt D, Baretton GB. Overexpression of the insulin-like growth factor I receptor in human colon carcinomas. *Cancer* 2002; 95: 2086-2095
- 15 Hellawell GO, Turner GD, Davies DR, Poulsom R, Brewster SF, Macaulay VM. Expression of the type 1 insulin-like growth factor receptor is up-regulated in primary prostate cancer and commonly persists in metastatic disease. *Cancer Res* 2002; 62: 2942-2950
- 16 Pinton P, Ferrari D, Di Virgilio F, Pozzan T, Rizzuto R. Molecular machinery and signaling events in apoptosis. *Drug Development Research* 2001; 52: 558-570

电编 张焕兰 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

树突状细胞致敏的肿瘤疫苗对胰腺癌细胞的杀伤效应

陈鑫, 杨帆, 杨兴无, 张帆

陈鑫, 杨兴无, 张帆, 大连医科大学附属第二医院普外科 辽宁省大连市 116027

杨帆, 大连医科大学生物化学与分子生物学教研室 辽宁省大连市 116027

通讯作者: 陈鑫, 116027, 辽宁省大连市, 大连医科大学附属第二医院普外科. xinchent26@yahoo.com.cn

电话: 0411-84671291-3063

收稿日期: 2006-07-08 接受日期: 2006-08-10

Killing effect of tumor vaccine pulsed with dendritic cells on pancreatic carcinoma cells

Xin Chen, Fan Yang, Xing-Wu Yang, Fan Zhang

Xin Chen, Xing-Wu Yang, Fan Zhang, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116027, Liaoning Province, China

Fan Yang, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Dalian Medical University, Dalian 116027, Liaoning Province, China

Correspondence to: Xin Chen, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116027, Liaoning Province, China. xinchent26@yahoo.com.cn

Received: 2006-07-08 Accepted: 2006-08-10

Abstract

AIM: To investigate the anti-tumor effect of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) *in vitro* induced by human dendritic cells (DCs) sensitized with pancreatic carcinoma cell lysate on the primarily cultured autogenous cells.

METHODS: Pancreatic carcinoma cells from 6 patients were lysed as tumor antigens. T cells and DCs were separated from peripheral blood. The anti-tumor effects of CTLs induced by DCs sensitized with tumor antigens on the primarily cultured autogenous cancer cells were observed by Cr^{51} -release assay. CTLs pulsed by normal DCs or DCs sensitized with pancreatic cancer cell Panc1 lysate were used as negative or antigen control, respectively.

RESULTS: The killing rates of CTLs for each case in the experimental group were from $69.05\% \pm 15.79\%$ to $88.05\% \pm 15.34\%$, while in the antigen controls they were from $43.08\% \pm 6.92\%$

to $67.30\% \pm 8.91\%$, both of which were much higher than that in negative control ($P < 0.01$). In addition, the killing rates between the experimental and antigen control group were significant ($P < 0.05$).

CONCLUSION: CTLs induced by DCs pulsed with pancreatic carcinoma cell lysate have specific cytotoxic effects on the autogenous pancreatic carcinoma cells.

Key Words: Dendritic cell; Cytotoxic T lymphocyte; Pancreatic carcinoma; Cytotoxic effect

Chen X, Yang F, Yang XW, Zhang F. Killing effect of tumor vaccine pulsed with dendritic cells on pancreatic carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(28):2815-2818

摘要

目的: 研究胰腺癌细胞冻融物致敏树突状细胞(DC)诱导的细胞毒性T细胞(CTL)对原代培养的自体胰腺癌细胞的杀伤作用。

方法: 从6例手术切除的胰腺癌组织中分离胰腺癌细胞, 反复冻融获得肿瘤抗原; 以该肿瘤抗原致敏外周血DC, 诱导T细胞转变为CTL; 采用 Cr^{51} 释放法观察CTL对原代培养的自身胰腺癌细胞的杀伤活性, 分别以来源于胰腺癌细胞株Panc1的肿瘤抗原致敏DC和未致敏DC刺激的CTL作为抗原对照和阴性对照。

结果: 实验组CTL对自身细胞的杀伤活性为 $69.05\% \pm 15.79\% \rightarrow 88.05\% \pm 15.34\%$, 抗原对照组CTL的杀伤活性为 $43.08\% \pm 6.92\% \rightarrow 67.30\% \pm 8.91\%$, 两组CTL杀伤率均显著高于阴性对照组($P < 0.01$); 而实验组与抗原对照组相比, 前者的杀伤活性显著高于后者($P < 0.05$)。

结论: 胰腺癌细胞冻融物致敏的DC疫苗可以诱导T细胞产生高效的针对自体癌细胞的细胞毒效应; 新鲜肿瘤组织来源的胰腺癌细胞比传代的Panc1细胞具有更好的抗原性。

关键词: 树突状细胞; 细胞毒性T淋巴细胞; 胰腺癌细胞; 细胞毒效应

■背景资料

胰腺癌是恶性程度最高的肿瘤之一, 预后极差, 传统的治疗方法对胰腺癌的疗效及预后无明显改善, 而应用免疫生物学手段治疗胰腺癌则有望成为改善胰腺癌疗效及预后的一条有效途径。

■研发前沿

DC能有效激活CTL发挥细胞毒作用,在肿瘤免疫治疗中日益受到重视.已有多DC疫苗尝试用于乳腺癌、前列腺癌、黑色素瘤等临床治疗与研究.在胰腺癌方面,目前国外已有学者利用胰腺癌细胞冻融物或不同的免疫分子激活DC,进而介导CTL对胰腺癌细胞的杀伤作用.

陈鑫,杨帆,杨兴无,张帆.树突状细胞致敏的肿瘤疫苗对胰腺癌细胞的杀伤效应.世界华人消化杂志 2006;14(28):2815-2818
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2815.asp>

0 引言

树突状细胞(dendritic cells, DCs)在启动抗肿瘤免疫中起关键作用.研究表明,肿瘤抗原激活的DC诱导的抗肿瘤免疫在体外细胞实验及动物实验中均表现出良好的抗肿瘤作用.我们从胰腺癌患者的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)培养、扩增DC,观察胰腺癌组织细胞冻融物致敏DC诱导的细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)对胰腺癌的抗肿瘤效应.

1 材料和方法

1.1 材料 胰腺癌患者6例分别为我院住院患者,年龄范围56-76(平均65.2)岁.手术切除的肿瘤组织病理学诊断均为胰腺导管细胞癌, RPMI 1640培养液为Gibco公司产品; rhGM-CSF, rhIL-4为Promega公司产品; $\text{Na}_2\text{Cr}^{51}\text{O}_4$ 购自Amersham公司;淋巴细胞分离液、胶原酶均购自欣经科公司.胰腺癌细胞株Panc1购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心,常规培养于含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养液中.无菌条件下收集肿瘤组织,切成小块置于含抗生素的培养液中,胶原酶消化后分离胰腺癌细胞.将细胞分为两部分:一部分作为肿瘤细胞抗原,另一部分细胞进行原代培养,备作细胞毒实验用.

1.2 方法 将上述从肿瘤组织中分离的胰腺癌细胞及Panc1细胞用液氮快速冷冻-室温慢融方式,反复冻融3-4次,镜下见细胞完整性破坏后终止冻融,16 000 g离心30 min,收集上清,无菌微孔滤膜过滤后,即为肿瘤组织冻融抗原.以Bradford法对冻融抗原进行蛋白定量,冻存备用.以Thomas *et al*^[1]改良的方法分离及纯化胰腺癌患者外周血DC,主要步骤如下:抽取胰腺癌患者外周静脉血10 mL,用淋巴细胞分离液分离PBMC;悬浮于含100 mL/L AB血清的RPMI 1640完全培养基中,加入24孔板(每孔 2×10^6 细胞);在37℃,5% CO_2 培养箱中温育2 h,分别获得悬浮细胞与贴壁细胞.将悬浮的PBMC在聚丙烯Petri皿中培养,选择性除去巨噬细胞;以尼龙毛过滤除去B细胞;再与L2亮氨酸-L2亮氨酸甲酯共同培养选择性除去其中的NK细胞及细胞毒性T细胞,余下细胞则主要为T淋巴细胞.对于

贴壁细胞,每孔加入含rhGM-CSF (1000 U/mL), rhIL4 (1000 U/mL), 100 mL/L AB血清的RPMI 1640完全培养液1 mL;每2 d半量换液,并加入半量细胞因子,保持细胞因子浓度不变.3-4 d后,贴壁细胞变成悬浮的、具有突起的未成熟DC.培养第5天,将每群DC分为两组,一组加入20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 其自身来源的肿瘤抗原冻融物(自身细胞致敏DC组),另一组加入等量Panc1细胞冻融物(细胞系致敏DC组),然后继续培养;第7天收集悬浮细胞,即为具有递呈抗原能力的致敏DC.细胞毒效应按照自身肿瘤抗原致敏自身DC→诱导自身CTL→杀伤自身肿瘤细胞的方案进行,分别以细胞系致敏DC及未致敏DC诱导的CTL作用组作为抗原对照组(Ag control)和阴性对照组(negative control).具体采用4 h ^{51}Cr 释放法检测CTL的抗肿瘤效应:(1)效应细胞:将分离的外周血T细胞,培养7 d后按照DC:T=1:10的比例分别加入自身细胞致敏DC、细胞系致敏DC及未致敏DC,继续培养3-4 d后收集T细胞,此即为效应细胞CTL.(2)靶细胞:分别收集 1×10^6 Panc1以及从6例肿瘤组织中分离获得的胰腺癌细胞(编号S1-S6),重悬于0.5 mL不含碳酸氢钠的完全培养液.加入3.7 MBq ^{51}Cr 铬酸钠,37℃水浴中标记1 h,洗涤细胞三次,调整细胞浓度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$.(3)细胞毒效应:向96孔板加入靶细胞,每孔100 μL .按效应细胞:靶细胞=50:1的比例向各孔加入100 μL 不同效应细胞.每组均设3个复孔,阴性对照孔(自发释放)只加100 μL 完全培养液,阳性对照孔(最大释放)加100 μL 1% NP40 (v/v).将96孔板置37℃培养4 h后,1000 g离心培养板10 min,每孔吸取100 μL 上清在液闪计数器上测定每分钟放射活性(cpm值).细胞杀伤活性按以下公式计算:CTL活性(%)=[(实验组cpm-自发释放cpm)/(最大释放cpm-自发释放cpm)] $\times 100\%$.

统计学处理 采用SPSS统计软件,所有变量均以mean \pm SD表示.变量间差异显著性比较用方差分析(Student-Newman-Keuls法).

2 结果

以胰腺癌细胞抗原刺激的DC活化T细胞,使其转变为CTL,再通过 ^{51}Cr 释放法检测CTL在体外对胰腺癌细胞的杀伤作用,结果显示:利用从胰腺癌组织中分离的细胞冻融物作为抗原依次活化DC和CTL,其CTL对自身细胞的杀伤活性为(69.05% \pm 15.79%)-(88.05% \pm 15.34%);而

■创新盘点

从患者手术切除的胰腺癌组织中分离胰腺癌细胞,利用其自身的胰腺癌细胞冻融物作为抗原激活DC,观察活化DC介导的CTL对患者自身的胰腺癌细胞的杀伤效应,可为DC疫苗在临床上的应用提供更加切实可信的依据,这一方案目前在国内外尚未见报道.

表 1 效应细胞CTL对胰腺癌细胞的杀伤活性 (mean \pm SD, %)

靶细胞	自身细胞致敏DC组	细胞系致敏DC组	未致敏DC组
S1	86.72 \pm 13.83 ^{ab}	51.32 \pm 1.63 ^b	3.67 \pm 0.86
S2	76.36 \pm 9.16 ^{ab}	43.08 \pm 6.92 ^b	6.21 \pm 1.32
S3	70.01 \pm 6.56 ^{ab}	49.24 \pm 4.76 ^b	4.18 \pm 1.05
S4	88.39 \pm 10.75 ^{ab}	67.30 \pm 8.91 ^b	2.98 \pm 1.13
S5	69.05 \pm 15.79 ^{ab}	44.37 \pm 11.28 ^b	4.56 \pm 0.78
S6	88.05 \pm 15.34 ^{ab}	60.12 \pm 8.54 ^b	3.97 \pm 0.69
Panc1	76.05 \pm 7.70 ^{a1}	82.17 \pm 12.75 ^b	2.08 \pm 1.10

^a $P < 0.05$ vs 细胞系DC组; ^b $P < 0.01$ vs 未致敏DC组. 1: 该组所用CTL与S1组相同.

利用Panc1细胞冻融物作为抗原依次活化DC和CTL, 其CTL对自身细胞的杀伤活性为(43.08% \pm 6.92%)-(67.30% \pm 8.91%); 两组CTL杀伤率均远高于未经抗原刺激的DC活化的CTL作用组[杀伤率为(2.98% \pm 1.13%)-(6.21% \pm 1.32%), $P < 0.01$]. 上述结果说明无论是自身来源的肿瘤抗原, 还是胰腺癌细胞株来源的肿瘤抗原, 均可以有效刺激DC, 使其进一步激活CTL, 发挥杀伤胰腺癌细胞的作用(表1).

此外, 对同一靶细胞来说, 自身抗原活化DC介导的CTL对靶细胞的杀伤活性均显著高于Panc1活化DC介导的CTL的杀伤效力(各组 $P < 0.05$), 显示前者具有更强的细胞毒效应; 反之, 当以Panc1作为靶细胞时, 从癌组织中分离的胰腺癌细胞冻融物活化的DC介导的CTL杀伤效应与Panc1细胞自身冻融物刺激活化的DC介导的CTL作用相比, 二者无显著差别(表1). 上述结果提示, 新鲜肿瘤组织来源的胰腺癌细胞比传代的胰腺癌细胞系Panc1具有更好的抗原性, 因而可以更有效地激活DC.

3 讨论

DC是目前所知的最有效的激活初始化T细胞的抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC), 在肿瘤免疫治疗中日益受到重视^[2-3]. 已有多种DC疫苗尝试用于乳腺癌、脑部肿瘤、前列腺癌、黑色素瘤等临床治疗与研究^[4-5]. 研究表明, 肿瘤细胞无法被T细胞识别、杀伤是由于荷瘤宿主的DC功能有缺陷, 无法有效递呈肿瘤抗原所致. 在胃癌、甲状腺癌、黑色素瘤、肺癌、直肠癌等的研究中, 肿瘤患者存在DC数量减少及功能缺陷^[6-7]. 本实验应用反复冻融法获取胰腺癌细胞裂解产物作为胰腺癌全细胞性抗原, 由这些抗原刺激DC来完成对肿瘤抗原的摄取、加工和递呈.

本研究利用胰腺癌患者手术切除的肿瘤细胞冻融物作为抗原激活患者自体DC, 体外观察活化DC诱导产生的CTL对原代培养的患者自体胰腺癌细胞的杀伤作用, 结果6例患者的CTL在体外均显示出了很强的杀伤活性, 这一结果表明, 患者自体DC经rhGM-CSF, rhIL-4及自体胰腺癌细胞冻融物共同修饰后, 产生了良好的抗原递呈作用, 从而能有效激活CTL发挥杀伤作用. 因此, 如果将自体DC作为疫苗输入患者体内, 则活化的DC有可能使机体对肿瘤细胞免疫监视作用的缺陷得以修复, 在体内主动诱导宿主产生高效特异性的抗胰腺癌免疫应答, 抑制胰腺癌肿瘤细胞的生长. DC疫苗作为一种临床胰腺癌辅助治疗手段应具有良好的应用前景.

在靶细胞相同的情况下, 与以胰腺癌细胞株Panc1冻融物作为抗原相比, 抗原为自体胰腺癌细胞诱导产生的DC所激活的CTL具有更高的杀伤率, 其可能的原因为DC可以从胰腺癌细胞冻融物中获取全细胞抗原(即能充分获得肿瘤抗原或肿瘤相关抗原), 完全激活T淋巴细胞, 从而产生特异性的细胞毒性作用.

胰腺癌是消化道肿瘤中恶性程度最高的肿瘤, 其根治性切除术后较高的复发与转移率以及对传统化疗、放疗不敏感已成为制约胰腺癌有效治疗的主要障碍^[8-9], 必须寻找新的治疗手段才有可能解决这一问题. 我们的研究结果显示, 胰腺癌细胞裂解物致敏DC介导的CTL的细胞毒作用对胰腺癌细胞可以产生特异性的杀伤作用, 提示活化的DC疫苗可作为肿瘤免疫生物学治疗的一种崭新模式, 改善晚期胰腺癌的疗效, 预防胰腺癌根治术后的复发与转移.

4 参考文献

- 1 Thomas R, Davis LS, Lipsky PE. Comparative

■应用要点

自体胰腺癌细胞活化DC所激活的CTL具有很高的杀伤率, 表明DC疫苗可作为胰腺癌免疫生物学治疗的一种崭新模式, 改善晚期胰腺癌的疗效, 预防胰腺癌根治术后的复发与转移.

■同行评价

本研究利用胰腺癌患者手术切除的肿瘤细胞冻融物作为抗原激活患者自体DC, 体外观察活化DC诱导产生的CTL对原代培养的患者自体胰腺癌细胞的杀伤作用, 内容新颖, 实验方法先进, 结论较为明确, 文字尚流畅, 是一篇较好的实验研究, 对胰腺癌临床治疗也有一定价值。

- accessory cell function of human peripheral blood dendritic cells and monocytes. *J Immunol* 1993; 151: 6840-6852
- 2 Nishioka Y, Hirao M, Robbins PD, Lotze MT, Tahara H. Induction of systemic and therapeutic antitumor immunity using intratumoral injection of dendritic cells genetically modified to express interleukin 12. *Cancer Res* 1999; 59: 4035-4041
- 3 Fong L, Engleman EG. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 245-273
- 4 Manjili MH, Park J, Facciponte JG, Subjeck JR. HSP110 induces "danger signals" upon interaction with antigen presenting cells and mouse mammary carcinoma. *Immunobiology* 2005; 210: 295-303
- 5 Mincheff M, Zoubak S, Altankova I, Tchakarov S, Makogonenko Y, Botev C, Ignatova I, Dimitrov R, Madarzhieva K, Hammett M, Pomakov Y, Meryman H, Lissitchkov T. Human dendritic cells genetically engineered to express cytosolically retained fragment of prostate-specific membrane antigen prime cytotoxic T-cell responses to multiple epitopes. *Cancer Gene Ther* 2003; 10: 907-917
- 6 Pinzon-Charry A, Maxwell T, Lopez JA. Dendritic cell dysfunction in cancer: a mechanism for immunosuppression. *Immunol Cell Biol* 2005; 83: 451-461
- 7 Faries MB, Czerniecki BJ. Dendritic cells in melanoma immunotherapy. *Curr Treat Options Oncol* 2005; 6: 175-184
- 8 Ko AH, Dito E, Schillinger B, Venook AP, Bergsland EK, Tempero MA. Phase II study of fixed dose rate gemcitabine with cisplatin for metastatic adenocarcinoma of the pancreas. *J Clin Oncol* 2006; 24: 379-385
- 9 Abrams RA, Yeo CJ. Combined modality adjuvant therapy for resected periampullary pancreatic and nonpancreatic adenocarcinoma: a review of studies and experience at The Johns Hopkins Hospital, 1991-2003. *Surg Oncol Clin N Am* 2004; 13: 621-638

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

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*-methylaniline(*N*-甲基乙酰胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; *Ibid*, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), *S*(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, °C), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), *ρ*(密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), *φ*(体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), *T*_{max}, *C*_{max}, *V*_d, *T*_{1/2} *CI*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

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

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

Abstract

AIM:

METHODS:

RESULTS:

CONCLUSION:

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

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

摘要

目的:

方法:

结果:

结论:

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

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

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相

关研究的关系。

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

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示,在结果中应避免讨论。

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

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

致谢 致谢后加冒号,排在讨论后及参考文献前,左齐。

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

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

别平 教授

重庆第三军医大学附属西南医院全军肝胆外科研究所肝胆外科

孙殿兴 主任医师

白求恩国际和平医院肝病科

陈其奎 教授

中山大学附属第二医院消化内科

邵升 副教授

哈尔滨医科大学附属二院肝胆外科

陈卫昌 教授

苏州大学附属第一医院消化内科

唐霓 副研究员

重庆医科大学、教育部感染性疾病分子生物学重点实验室

崔云甫 教授

哈尔滨医科大学附属第二医院普外科

王晓艳 副教授

中南大学湘雅三医院消化内科

龚国忠 教授

中南大学湘雅二医院肝病研究中心

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

巩鹏 副教授

大连医科大学附属第一医院普外二科

杨冬华 教授

广州暨南大学附属第一医院消化内科

关玉盘 教授

首都医科大学附属北京朝阳医院消化科

杨希山 教授

广东省中医药局消化内科

郝春秋 副教授

第四军医大学唐都医院全军感染病防治中心(传染科)

余宏宇 教授

第二军医大学第二附属医院(上海长征医院)病理科

黄志勇 副教授

华中科技大学同济医学院附属同济医院肝脏外科中心

郁宝铭 主任医师

上海市第八人民医院结直肠外科

刘占举 教授

郑州大学第二附属医院消化内科学

张筱茵 副教授

第四军医大学西京医院消化疾病研究所内科学

刘作金 副教授

重庆医科大学附属第二医院肝胆外科

郑鹏远 教授

郑州大学第二附属医院消化科

秦成勇 教授

山东省立医院消化内科

周国雄 主任医师

南通大学附属医院消化内科

邱双健 副教授

复旦大学附属中山医院肝癌研究所、肝肿瘤外科

周士胜 教授

大连大学医学院医学研究中心

任建林 教授

厦门大学附属中山医院消化内科厦门市消化疾病研究所