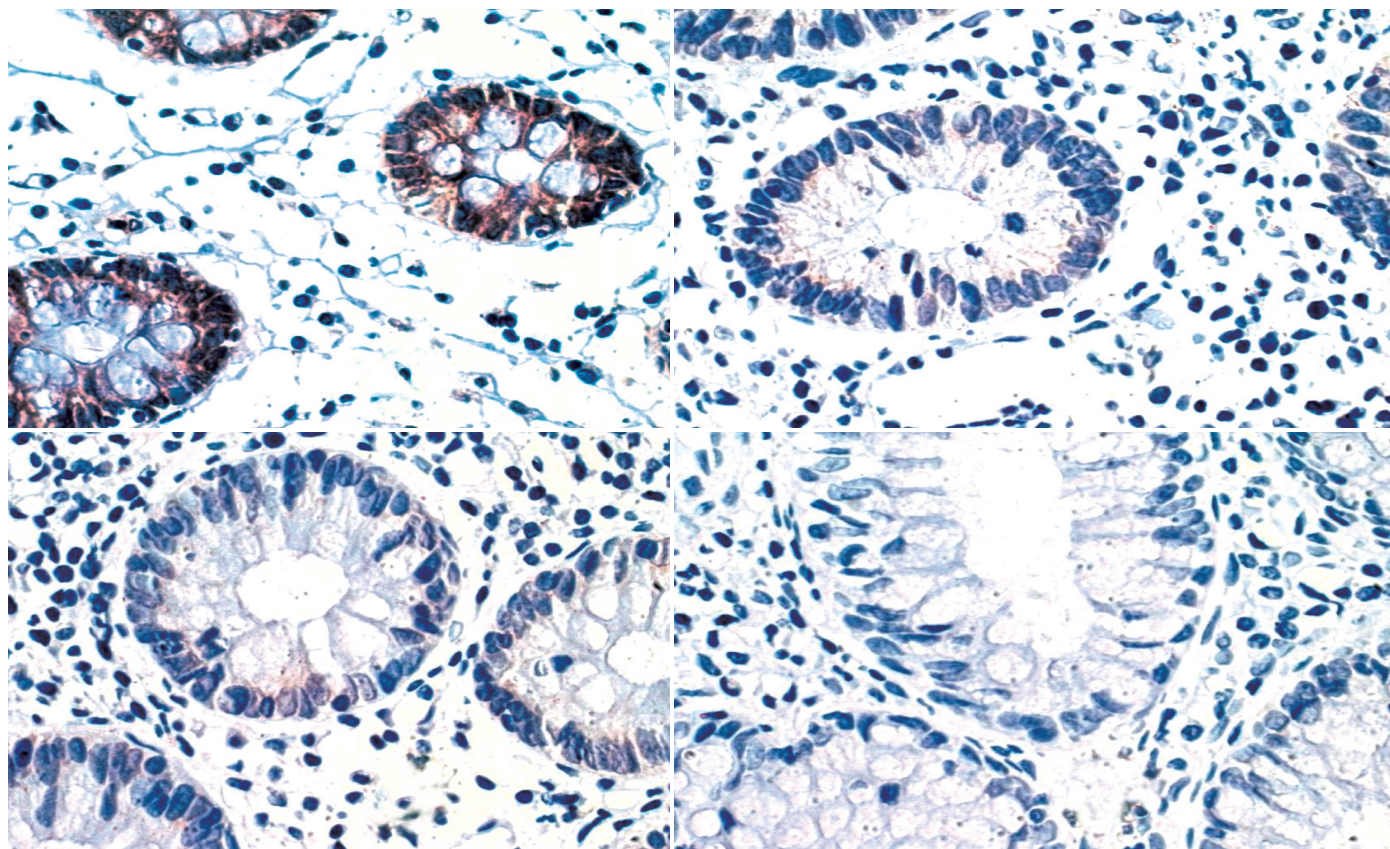


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2006 年 12 月 8 日 第 14 卷 第 34 期 (Volume 14 Number 34)



34 / 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
曹浩副教授 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 12 月 8 日 第 14 卷 第 34 期 (总第186期)

述 评

3251 表遗传学与胃肠道肿瘤 朱新江, 戴冬秋

基 础 研 究

3257 人食管癌顺铂耐药细胞系Ec9706/cDDP的建立及其生物学特征

李敏, 王志举, 李文涛, 董子明

3261 萎缩性胃炎大鼠胃黏膜主、壁细胞和G、D细胞及外周血胃泌素、生长抑素的变化

朱方石, 姒健敏, 王良静, 王冬飞, 陈萍

3268 DDFA方案对重症急性胰腺炎大鼠心肌细胞凋亡及Bax, Bcl-2表达的影响

陆正明, 方驰华, 朱明德, 史学深

3273 中性粒细胞趋化因子在急性胰腺炎相关急性肺损害中的作用

徐岷, 周国雄, 张尤历, 张建新, 何亚龙, 黄介飞, 张弘, 魏群

临 床 研 究

3278 肝硬化患者外周血单核细胞表面TLR4和TLR2表达的临床意义

苟艳子, 连建奇, 聂青和, 庄严, 刘清泉, 邵彬

3284 微导管和聚乙烯醇在部分脾栓塞中的应用

杨怀龙, 官泳松, 何志明, 王宏, 纪艳

文 献 综 述

3290 二氢嘧啶脱氢酶在胃癌中的研究现状

鲁明霄, 徐光川

3294 慢性HBV感染免疫治疗新进展 梁雪松, 万谟彬

3299 脑-肠互动在肠易激综合征发病中的作用 王敬东

研 究 快 报

3302 Celecoxib对胃癌细胞凋亡的影响

凌桂琴, 王绪, 王琳, 李小翠

3306 蛋白酶激活受体-2激动剂在应激性溃疡中的作用

窦勇鹰, 谢立群, 李俊美, 华建平, 海鸥, 李华

3311 人肝癌细胞株线粒体DNA缺失对多药耐药表型的影响

谈荣玖, 陈宗琼, 江明万, 唐春红

临 床 经 验

3314 EAP化疗联合⁶⁰Co局部放疗对晚期食管癌伴骨转移患者预后及IL-2系统的影响

达炜, 宋明全, 孙群, 朱励, 张强, 陈金联, 王龙, 王如华, 朱金水

3317 MTA1基因表达与人胃癌的浸润和转移

刘海, 胡俊波, 王志强, 卫子然

3321 系统检测慢性乙型肝炎患者外周血淋巴细胞免疫表型的临床意义

吴引伟, 文剑, 赵伟, 张亮, 宋玉华, 谈国蕾, 赵磊

3326 生脉注射液联合葛根素注射液对肝硬化患者肝纤维化指标的影响

荣晓凤, 姚蔚瑜

3330 重症胰腺炎保守治疗20例

杨建光, 于作夫, 赵宇, 孙玉华

病 例 报 告

3333 表现为Krukenberg瘤的胰腺癌卵巢转移1例

章颖, 马向涛, 付静, 余力伟

附 录	3335 世界华人消化杂志投稿须知
致 谢	3340 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	3267 第五届中国百种杰出学术期刊评选揭晓 3289 欢迎订阅2007年《世界华人消化杂志》 3293 中国学术期刊综合引证报告(2006) 3298 《世界华人消化杂志》简介 3310 第十九届全国中西医结合消化会议征文通知 3313 中华医学会第七次全国消化系疾病学术会议征文通知 3320 世界华人消化杂志关于作者署名的声明 3325 2007中华肝胆胰脾外科(国际)学术论坛征文通知 3329 2005年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序表 3332 全国消化及消化内镜诊断与治疗进展学术研讨会征文启事
封面故事	Chun-Mei Xu, Chuan-Hu Qiao. Loss of fragile histidine triad protein expression in inflammatory bowel disease. <i>World J Gastroenterol</i> 2006; 12(45): 7355-7360 http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/7355.asp
国际会议	New York Society for Gastrointestinal Endoscopy 13-16 December 2006 New York www.nysge.org 9th World Congress on Gastrointestinal Cancer 20-23 June 2007 Barcelona Imedex meetings@imedex.com

 <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 2006-12-08 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 张焕兰 王晓瑜 电子编辑 张敏 李琪 本期责任编辑 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: wjgd@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 CN 14-1260/R	邮发代号 82-262 国外代号 M 4481	国内定价 每期24.00元 全年864.00元	广告经营许可证 1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

December 2006 Contents in Brief Volume 14 Number 34

EDITORIAL	3251 Epigenetic modification and gastrointestinal tumor <i>Zhu XJ, Dai DQ</i>
BASIC RESEARCH	<p>3257 Establishment of a cisplatin-induced human esophageal carcinoma drug-resistant cell line and its biological characteristics <i>Li M, Wang ZJ, Li WT, Dong ZM</i></p> <p>3261 Changes of gastric mucosal chief and parietal cells and G, D cells as well as blood gastrin somatostatin levels in rats with chronic atrophic gastritis <i>Zhu FS, Si JM, Wang LJ, Wang DF, Chen P</i></p> <p>3268 Effects of DDFA on cardiac myocyte apoptosis and expression of Bax and Bcl-2 in rats with severe acute pancreatitis <i>Lu ZM, Fang CH, Zhu MD, Shi XS</i></p> <p>3273 Role of cytokine-induced neutrophil chemoattractant in acute lung injury during acute pancreatitis <i>Xu M, Zhou GX, Zhang YL, Zhang JX, He YL, Huang JF, Zhang H, Wei Q</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>3278 Clinical significance of Toll-like receptor 4 and 2 expression on the surface of peripheral blood mononuclear cells in patients with liver cirrhosis <i>Gou YZ, Lian JQ, Nie QH, Zhuang Y, Liu QQ, Shao B</i></p> <p>3284 Application of microcatheter and polyvinyl alcohol in partial splenic embolization for hypersplenism <i>Yang HL, Guan YS, He ZM, Wang H, Ji Y</i></p>
REVIEW	<p>3290 Current status of dihydropyrimidine dehydrogenase in gastric carcinoma <i>Lu MQ, Xu GC</i></p> <p>3294 Advance in immune therapy for chronic hepatitis B virus infection <i>Liang XS, Wang MB</i></p> <p>3299 Role of brain gut interaction in pathogenesis of irritable bowel syndrome <i>Wang JD</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>3302 Effect of Celecoxib on apoptosis of human gastric cancer cell line <i>Ling GQ, Wang X, Wang L, Li XC</i></p> <p>3306 Role of protease-activated receptor-2 agonist in the formation of stress ulcer <i>Dou YY, Xie LQ, Li JM, Hua JP, Hai O, Li H</i></p> <p>3311 Influence of mitochondrial DNA depletion on multidrug resistance phenotype of human hepatoma cell line <i>Tan RJ, Chen ZQ, Jiang MW, Tang CH</i></p>
CLINICAL PRACTICE	3314 Influence of EAP chemotherapy combined with local radiotherapy on the prognosis and interleukin-2 system of esophageal cancer patients with bone metastasis <i>Da W, Song MQ, Sun Q, Zhu L, Zhang Q, Chen JL, Wang L, Wang RH, Zhu JS</i>

	<p>3317 Expression of metastasis-associated gene 1 and its correlation with invasion and metastasis of human gastric carcinoma <i>Liu H, Hu JB, Wang ZQ, Wei ZR</i></p> <p>3321 Clinical values of systemic analysis of peripheral blood mononuclear cell subsets in patients with chronic hepatitis B <i>Wu YW, Wen J, Zhao W, Zhang L, Song YH, Tan GL, Zhao L</i></p> <p>3326 Influence of Shenmai injection combined with Gegengsu injection on liver fibrosis indexes in patients with cirrhosis <i>Rong XF, Yao WY</i></p> <p>3330 Conservative treatment of severe acute pancreatitis: an analysis of 20 cases <i>Yang JG, Yu ZF, Zhao Y, Sun YH</i></p>
CASE REPORT	<p>3333 Ovary metastasis of pancreatic cancer manifesting as Krukenberg tumor: one case analysis <i>Zhang Y, Ma XT, Fu J, Yu LW</i></p>
APPENDIX	<p>3335 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology</p>
ACKNOWLEDGMENT	<p>3340 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
COVER	<p><i>Xu CM, Qiao CH.</i> Loss of fragile histidine triad protein expression in inflammatory bowel disease. <i>World J Gastroenterol</i> 2006; 12(45): 7355-7360 http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/7355.asp</p>
INTERNATIONAL MEETINGS	<p>New York Society for Gastrointestinal Endoscopy 13-16 December 2006 New York www.nysge.org</p> <p>9th World Congress on Gastrointestinal Cancer 20-23 June 2007 Barcelona Imedex meetings@imedex.com</p>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

World Chinese Journal of Digestology

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date December 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: wcjd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

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

Copyright © 2006 by The WJG Press

表遗传学与胃肠道肿瘤

朱新江, 戴冬秋

朱新江, 戴冬秋, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科 辽宁省沈阳市 110001

国家自然科学基金资助项目, No. 30572162, No. 30271477

教育部高校博士点基金资助项目, No. 20050159001

戴冬秋, 中国医科大学医学博士, 教授, 主任医师, 博士生导师. 2000-2002年美国M.D.安德森癌症中心博士后研究员, 中国抗癌协会全国胃癌专业委员会委员, 《CMJ》及《世界华人消化杂志》等5刊编委及审稿人. 主要从事肿瘤外科, 化疗及生物治疗等工作, 专于胃癌转移分子机制及早期预测与阻断的基础和临床研究.

通讯作者: 戴冬秋, 110001, 沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院肿瘤科, 辽宁省胃癌分子病理重点实验室. daidq63@163.com

电话: 024-83283560

收稿日期: 2006-09-28 接受日期: 2006-10-11

Epigenetic modification and gastrointestinal tumor

Xin-Jiang Zhu, Dong-Qiu Dai

Xin-Jiang Zhu, Dong-Qiu Dai, Department of Oncology Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30572162, No. 30271477, and the Scientific Research Foundation of Education Ministry for the Doctors, No. 20050159001

Correspondence to: Dr. Dong-Qiu Dai, Department of Oncology Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, 155 Nanjing North Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. daidq63@163.com

Received: 2006-09-28 Accepted: 2006-10-11

Abstract

Carcinogenesis springs from the combined forces of both genetic and epigenetic events. The role of epigenetic modification in the progression of carcinoma has been suggested by a lot of evidences in recent years. An epigenetic event alters the activity of genes without changing their structure. Gastrointestinal tumor is the most common cancer in China, and the investigation of epigenetic modification is significant in cell immunity, phylaxis, cell differentiation and preventive therapy.

Key Words: Gastrointestinal tumor; Gene regulation; DNA methylation; Histone modification

Zhu XJ, Dai DQ. Epigenetic modification and gastrointestinal tumor. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(34):3251-3256

www.wjgnet.com

摘要

肿瘤的形成受遗传学和表遗传学修饰的影响. 近年来, 越来越多的证据表明, 表遗传学修饰在肿瘤进展中同样有重要作用, 表遗传调控可以影响基因转录活性而不涉及DNA序列的改变. 胃肠道肿瘤是我国最常见的肿瘤, 表遗传研究对了解胃肠道肿瘤的发病机制、细胞免疫与防御、细胞分化以及预防治疗等方面具有十分重要的意义.

关键词: 胃肠道肿瘤; 基因调控; DNA甲基化; 组蛋白修饰

朱新江, 戴冬秋. 表遗传学与胃肠道肿瘤. 世界华人消化杂志 2006;14(34):3251-3256

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3251.asp>

0 引言

1999年, Wolffe *et al*在Science杂志上对表遗传学的现代概念作了一个比较精确的描述: 表遗传学是研究非DNA序列变化引起的, 可遗传的基因表达改变表遗传学的研究对象不是基因组核苷酸序列所携带的遗传信息, 而是研究基因表达在时间和空间上的调控问题, 包括DNA甲基化、组蛋白修饰、基因组印迹、染色体重塑、基因表达重新编程、X染色体失活等, 其中最主要的两个研究内容是DNA甲基化和组蛋白修饰.

随着人类基因组测序工作的基本完成, 人类遗传学研究从基因时代进入后基因组时代, 即功能基因组时代. 近几年, 表遗传学改变的研究取得了长足进展, 成为胃肠癌临床基础研究的一个热点领域. 人类表观基因组协会(human epigenome consortium, HEC)在2003-10正式宣布开始实施人类表观基因组计划(human epigenome project, HEP)这一计划标志着表遗传学和表观基因组学研究进入一个新的阶段, 也为征服肿瘤和其他疾病带来了希望. 现拟就胃肠道肿瘤的表遗传学研究进展作一综述.

■背景资料

胃肠道肿瘤发病率居各种恶性肿瘤之首, 严重危害人类健康. 过去10 a的研究表明表遗传学在胃肠道肿瘤发生、发展中扮演重要角色, 为其早期诊断、预后判断和干预治疗提供了新的思路.

■ 研发前沿

目前国际上的表遗传学方面的研究继组蛋白乙酰化后组蛋白甲基化成为又一热点。

1 DNA甲基化与胃肠道肿瘤

1.1 DNA甲基化 甲基化修饰是脊椎动物惟一的DNA自然修饰方式, DNA甲基化是指在DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, Dnmt)的作用下, 以S-腺苷甲硫氨酸(SAM)为甲基供体, 将甲基基团转移到胞嘧啶和鸟嘌呤(CpG)二核苷酸的胞嘧啶中5位碳原子上并与其3'端的鸟嘌呤形成mCpG, 且在双链对称出现. 甲基化特征的遗传主要是通过维持性甲基转移酶(maintenance methyltransferase)实现的, 其特点是以双链中互补链为甲基化CG的CpG作为底物, 从而保证在子代细胞中有可能恢复亲代的甲基化状态, DNA甲基化在哺乳动物发育中有重要的调控功能. 胚胎起源中, 发生两步即新甲基化(denovo methylation)和再甲基化(maintenance methylation)的过程. 相应地存在两种DNA甲基化酶, 即维持甲基转移酶(maintenance DNA methyltransferase, DNMT1)重新甲基转移酶(de novo methyltransferase, DNMT3a, DNMT3b). 在甲基化的双链DNA复制后所生成的两条新的DNA链中, 只有亲代链是甲基化的, 新合成单链是非甲基化的. 维持甲基化酶的作用是识别子代DNA双链中亲代单链上已甲基化的CpG位点, 然后催化互补单链的胞嘧啶(C)发生甲基化DNA甲基化主要发生在CpG岛上. DNA甲基化异常可分为甲基化增强, 甲基化减弱和甲基化酶水平增高三种类型, 其中甲基化增强在肿瘤中最常见与肿瘤的关系比较明确, 被认为是肿瘤抑制基因失活的重要途径, 研究取得的进展也报道的最多. 癌基因多为不充分甲基化, 导致重新开放或异常表达; 抑癌基因多为过度甲基化, 从而表达受抑制, DNA异常甲基化导致肿瘤发生的可能机制如下. 首先, 在正常情况下非甲基化的CpG岛的高甲基化, 可以导致肿瘤抑制基因的失活. 其次, DNA甲基化可以促进肿瘤相关基因的突变, 因为5-甲基胞嘧啶可自发或在S-腺苷蛋氨酸的作用下引起邻位脱氨而变为胸腺嘧啶, 使甲基化的CpG突变为TpG, 这是最常见的突变, 在抑癌基因p53中也最常见, 是肿瘤相关基因甲基化促进细胞恶变的一种机制.

近年来胃肠道肿瘤相关基因的研究集中在相关基因启动子区域CpG残基的高甲基化, 特别是抑癌基因的研究, 目前已成为热点. CpG岛的定义是由Gardiner-garden和fromner提出的, 其大小范围为0.5-5 kB, 基因中平均每100 kB即可出现. 由于这些区域未发生甲基化, 故富含

CpG(60%-70%)CpG/GPC大于0.6. 目前认为: 基因表达与CpG岛甲基化程度呈负相关, CpG甲基化抑制基因转录的机制还远未完全明确.

1.2 DNA甲基化与胃癌

1.2.1 p16基因 又称多肿瘤抑制基因(multiple tumorsuppressor, MTS)定位于9p21, 全长 8.5×10^3 (M_r 8500)有2个内含子和3个外显子组成. 其编码的蛋白是一种重要的细胞周期负调控蛋白, 通过与细胞周期蛋白依赖激酶CDK4和CDK6结合而抑制蛋白激酶活性, 从而抑制细胞的增殖, 被认为是最重要的抑癌基因之一. Lee *et al*^[1]最早报道了p16甲基化与胃癌的关系, 他们用甲基化敏感性限制性内切酶研究了9个胃癌细胞株, 发现两个有甲基化, 而且不表达p16mRNA, 体外以去甲基化剂5-deoxy azacytidine对胃癌细胞处理后, 可见因CpG岛异常甲基化而封闭的基因重新表达. Lee *et al*^[2]同时测定了胃癌患者肿瘤和外周血基因的异常甲基化, p16甲基化的出现率分别为66.7%和51.9%, 而正常对照为阴性. 结果表明血清中基因异常甲基化能如实的反映肿瘤中基因异常甲基化的情况, 可作为胃癌患者的治疗筛选指标. Song *et al*^[3]用甲基化敏感性限制性内切酶研究了9个胃癌细胞株及28例原发性胃癌标本, 结果显示, 5个胃癌细胞株及5例原发性胃癌有启动子CpG岛的甲基化, 他们均不表达p16蛋白; 另外1例原发性胃癌也不表达p16蛋白, 但无CpG岛的甲基化. Shim *et al*^[4]用甲基化特异性PCR研究了88例散发性胃癌, 其中37例(42 %)有p16的甲基化. 他们通过免疫组织化学分析了41例胃癌(22例有甲基化, 19例无甲基化)的p16蛋白表达情况, 结果显示: 在22例有甲基化的胃癌标本中, 19例(86%)完全不表达p16蛋白; 而在19例无甲基化的胃癌标本中, 仅有2例(11%)完全不表达p16蛋白. 在这88例胃癌标本中, 21例曾证实有微卫星不稳定性, 这21例中13例(62%)有p16INK4a的甲基化. Kang *et al*^[5]研究表明, p16在慢性胃炎、肠化生、胃腺瘤和胃癌的甲基化频率逐渐升高, 分别为2.7%, 7%, 11.4%和43.8%, 反映了癌的演变过程, 也证明他是早期事件以上结果均证明: p16基因CpG岛甲基化可导致p16表达缺失, 是该基因灭活的重要原因. 在国内, 赵成海 *et al*^[6]的研究中发现p16基因甲基化在正常胃黏膜中未发现, 而在癌旁组织和胃癌组织中检出率分别为8.3%和33.3%. 提示胃癌中p16基因表达改变并不是由于基因突变或缺失

引起, 而主要由于启动子甲基化导致。

1.2.2 hMLH1 hMLH1是一种DNA错配修复基因与癌基因和抑癌基因一样在致癌过程中起关键作用, 他的突变或表达降低会增加受损细胞中DNA的突变频率, 不仅导致癌基因和抑癌基因的突变率增高, 还可导致微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI)的发生。Fleisher *et al*^[7]检测了65例胃癌的hMLH1甲基化情况, 其中18例胃癌有多个微卫星位点突变, 为高频率微卫星不稳定性(MSI-H); 8例胃癌仅有1个微卫星位点突变, 为低频率微卫星不稳定性(MSI-L); 39例胃癌无微卫星位点突变, 为微卫星不稳定性阴性(MSI-阴性)。结果显示: 77.8%的MSI-H胃癌发生hMLH1基因的甲基化; 75%的MSI2L胃癌发生hMLH1基的甲基化; 仅23%的MSI-阴性胃癌有hMLH1基因的甲基化。而且, 发生hMLH1基因甲基化的胃癌仅表达少量的hMLH1蛋白, 而未发生hMLH1基因甲基化的胃癌表达丰富的hMLH1蛋白。这些数据表明: hMLH1基因甲基化可导致DNA错配修复缺陷, 并且与胃癌的MSI密切相关。Leung *et al*^[8]的研究不仅证实hMLH1基因甲基化与胃癌MSI-H密切相关, 还证实hMLH1蛋白的丢失与浸润性肿瘤的发生密切相关。Nakajima *et al*^[9]还发现随着年龄的增加, hMLH1甲基化的频率显著增加, 提示其在老年人胃癌的发生过程起着重要作用。Kang *et al*^[10]研究发现hMLH1甲基化可能包含在早期胃癌发展过程中, 如hMLH1甲基化在癌组织中出频率为42.2%, 比肠化生2.1%, 腺瘤11.5%更频繁。研究表明, hMLH1在慢性胃炎、肠化生、胃腺瘤和胃癌的甲基化频率逐渐升高, 反映了癌的变化过程。

1.2.3 pS2 他主要分布在胃肠道的黏液分泌细胞, 维持黏液分泌稳定。pS2在胃肠道黏膜受到急性损伤时表达增高, 刺激胃肠道黏膜细胞的增生、修复、维护胃肠道黏膜的屏蔽作用。pS2定位于第21号染色体, 含有3个外显子和2个内显子, 编码一含有信号肽的84个氨基酸的多肽, 成熟后为一60氨基酸的分泌型胞外多肽。pS2曾被认为是胃癌特异的肿瘤抑癌基因, Fujimoto *et al*^[11]检测了胃癌、腺瘤和非肿瘤性黏膜的pS2启动子的甲基化情况。结果显示: 其主要发生在分化好的胃癌和肠化生黏膜中, 发生pS2甲基化的胃癌不表达pS2蛋白。因此他们认为, pS2启动子甲基化参与早期胃癌的发生。

1.2.4 APC APC(adenomatous polyposis coli,

APC)最初是在结肠腺瘤性息肉病中发现的。位于5q的APC基因为一个典型的抑癌基因, 其蛋白参与修饰转录活化和细胞周期的调节, 在多种人类肿瘤中发现其结构异常, 这说明APC基因可能涉及广谱人类肿瘤的发生。通过对胃癌APC基因的分析发现^[12]: 用特异化甲基PCR(MSP)对胃癌标本和胃癌细胞株的分析发现: 82.5%的原发性胃癌, 97.5%胃癌患者的癌旁胃黏膜和10个胃癌细胞株APC启动子1A呈高甲基化, 而启动子1B却没有发生甲基化。由于甲基化, 在10个细胞株中, 外显子1A没有出现APC表达, 而外显子1B却出现APC表达。说明APC启动子1A甲基化在胃癌形成的早期就出现, 可成为有用的生物标记。有研究表明: APC在慢性胃炎、肠化生、胃腺瘤和胃癌的甲基化频率均较高, 在肠化生中达80.7%, 可以说明他是胃癌发生的早期事件。

1.2.5 p14^{INK4a}/ARF(CDKN2A) 定位于染色体9p21, 编码2个不同的蛋白质, 一个为细胞周期依赖性激酶抑制剂p16^{INK4a}; 另一个产物为其可变读框基因(alter ativereading frame, ARF)编码, 产生一个由132个氨基酸组成, M_r 1390的P14蛋白, p14蛋白能稳定和提高了p53水平, 增强p53在G1S期和G2M期的限制点效应, 最终使细胞阻滞于G1期和G2期。因此p14属于肿瘤抑制基因, 具有显著的细胞周期负调控作用^[13]。目前认为, 恶性肿瘤中p14主要由于p14启动子甲基化而失活。Iida *et al*^[14]发现扩散型胃癌p14启动子甲基化率45.5%。同时, 因p14启动子甲基化而失活者, 在细胞质中可以发MDM2(murine doublegene 2), 而且p53表达失活, 用去甲基化试剂处理后, MDM2又回到细胞核而且p53也表达。Esteller *et al*^[15]对胃癌细胞株的分析发现, 7个细胞株中有5个不表达p14 mRNA, 对不表达者进一步分析, 发现其启动子高甲基化。有研究表明: p14在胃腺瘤和胃癌中的甲基化频率比在胃炎和肠化生中明显升高。

1.2.6 上皮-钙黏素 是一种重要的钙依赖性黏附分子, 在上皮细胞之间起着同质性黏附及维持组织结构完整性的作用, 在多种肿瘤中的表达降低或丢失。他在胃癌中的表达与肿瘤的浸润、转移呈负相关。在约50%的未分化型胃癌中, 上皮-钙黏素有突变, 从而被灭活。Tamura *et al*^[16]的研究显示, 上皮-钙黏素基因启动子的甲基化可导致其表达降低, 而且发生于胃癌的早期, 他们用甲基化特异性PCR-SCP及直接测序PCR产物的方法, 来研究上皮钙黏素基因启动子的甲基化

■应用要点
胃肠道肿瘤相关靶基因的异常DNA甲基化依靠MSP方法检测可用于肿瘤的早期诊断。

■创新盘点

本文介绍了存在于胃肠道肿瘤中的表遗传学改变,对近几年的研究热点和结论做了具体综述,尤其是肿瘤抑制基因启动子区甲基化状态的变化与肿瘤的发生发展之间的关系方面。

情况,该技术可以检测出启动子内所有被甲基化的胞嘧啶。对53例原发性胃癌检测结果显示,51%的胃癌有甲基化,未分化型胃癌的甲基化率(83%)明显高于其他组织类型的胃癌(34%);早期胃癌与进展期胃癌的甲基化率相似,对4例进展期胃癌和2例早期胃癌的DNA经硫化处理后进行了测序分析,发现这6例胃癌的上皮-钙黏素基因,在靠近转录起始部位的CpG均发生甲基化,经Western印迹杂交检测,证实有4例肿瘤的上皮-钙黏素蛋白表达消失或明显减少。因此可见,上皮-钙黏素基因启动子的甲基化与胃癌密切相关。

1.2.7 TIMP-3 为金属蛋白酶组织抑制基因,参与肿瘤细胞的扩散及肿瘤的生长调节。与正常细胞相比,90%的胃癌细胞株都因其CpG岛甲基化而不能表达,用去甲基化剂处理后又得到表达,说明该基因甲基化与胃癌的扩散、恶化有一定关系。关志宇 *et al*^[17]应用甲基化特异性PCR(MSP)技术和免疫组织化学方法分别检测78例患者的胃正常黏膜组织、胃癌组织及转移淋巴结中TIMP-3基因启动子甲基化和蛋白表达情况,发现胃正常黏膜组织,早期、进展期胃癌组织和转移淋巴结中TIMP3基因启动子均有甲基化修饰,其阳性率分别为35.9%(28/78);85.0%(17/20),89.7%(52/58);转移淋巴结100%(78/78)。胃正常黏膜组织TIMP3蛋白表达全部为阳性(100%),20例早期胃癌中,6例阳性(30%)。另外,胃癌70例蛋白表达阴性的标本中,64例TIMP3基因启动子甲基化阳性(91.4%)。得出结论:启动子区CpG岛高甲基化是胃癌组织中TIMP3基因表达失活的主要机制,可能成为胃癌分子诊断与病期评估的标志之一。

此外,近年人们的正在研究和关注的基因甲基化还有SOCS-1, p15INK4B, FEZ1/LZTS1, RUNX3, DCC, CD44等众多基因。

1.3 DNA甲基化与大肠癌

1.3.1 p16 p16是一个重要的细胞周期调控基因,p16基因被发现在多种肿瘤中失活,其中包括大肠癌,是一种广谱的癌特异性的甲基化的基因。多数研究表明,除了少数为等位基因的纯合性缺失外,启动子的过度甲基化是p16失活的主要原因。大约30%的结肠癌患者有p16基因启动子的甲基化,多数研究显示p16基因启动子过度甲基化的大肠癌具有一些特殊的临床病理特征。如Wiencke *et al*^[18]的研究显示p16基因启动子过度甲基化和右半结肠癌、女性和低分化癌相关。

Liang *et al*^[19]发现p16基因启动子过度甲基化的T3N0M0的大肠癌的预后较差。Herman *et al*^[20]对结直肠癌及正常结直肠黏膜的p16基因甲基化进行检测,发现在结直肠癌细胞系及原发瘤中,p16基因甲基化分别为92%(12/13),90%(18/20)。正常结直肠黏膜及5个小腺中p16基因无异常甲基化,这似乎显示p16基因甲基化是p16基因失活最重要机制而且是癌前的早期改变。

1.3.2 p14 p14也是一个细胞周期调控基因,可以通过等位基因的纯合性缺失或基因启动子的过度甲基化而失活,近1/4的大肠癌发生p14基因启动子的过度甲基化。Sato *et al*^[21]的研究显示p14启动子甲基化可能为溃疡性结肠炎相关的大肠癌发生过程中的常见的早期分子事件。Shen *et al*^[22]的研究表明在大肠癌中p14基因启动子过度甲基化与MSI关系密切,p14基因启动子过度甲基化的大肠癌更常表现为MSI。

1.3.3 hMLH1 研究表明大多数的遗传性非息肉病性结直肠癌(hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC)和部分散发性大肠癌(sporadic colorectal cancer, SCRC)(约10%-15%)表现为MSI,但二者发生MSI的原因不同,前者是由于错配修复基因的突变,而后者则主要是由于hMLH1基因启动子的过度甲基化导致hMLH1基因的沉默表达引起。研究显示MSI(+)的SCRC中hMLH1基因启动子过度甲基化的检出率高达70%-90%^[23]。Deng *et al*^[24]发现发生在hMLH1启动子近端区域(-248-178)的过度甲基化与hMLH1蛋白的失表达关系密切,前者导致了后者的发生。Arnold *et al*^[25]在hMLH1启动子过度甲基化的大肠癌细胞株的体外实验中发现,用甲基化抑制剂对细胞株进行处理使之重新表达hMLH1蛋白,可以克服大肠癌细胞株对5-FU的耐药性。Plumb *et al*^[26]在动物实验中也发现用甲基化抑制剂使hMLH1蛋白重新表达后可以逆转肿瘤对顺铂、卡铂、替莫唑胺和表柔比星的耐药性。

1.4 DNA甲基化与其他胃肠道肿瘤 有关DNA甲基化与小肠,十二指肠等的研究及报道甚少。仅有报导Laird以5-Aza-CdR(甲基转移酶抑制剂)治疗鼠小肠肿瘤,小肠腺肿平均数目由113个降为仅2个息肉,提示5-Aza-CdR可恢复因甲基化而沉默的生长调节基因而减缓肿瘤细胞的生长。

2 组蛋白的修饰与胃肠道肿瘤

2.1 组蛋白的修饰 组蛋白的修饰比DNA甲基化

复杂得多, 因为不同组蛋白(组蛋白H3和H4)的不同氨(H3末端有7个Lys和2个Ser; H4末端有5个Lys和1个Ser)可以发生不同类型的修饰, 包括乙酰化、甲基化、磷酸化、泛素化、糖基化、ADP核糖基化、羧基化等, 他们都是组蛋白密码的基本元素^[27]. 在组蛋白的修饰中, 研究最多的是乙酰化, 乙酰化修饰大多在组蛋白H3 Lys的9, 14, 18, 23和H4 Lys 5, 8, 12, 16等位点. 组蛋白乙酰化是可逆的动态过程, 组蛋白乙酰基转移酶(histone acetyltransferase, HAT)将乙酰辅酶A(乙酰CoA)乙酰基部分转移到核心组蛋白氨基末端上特定Lys残基的氨基基团. 氨基上的正电荷被消除, 这时DNA分子本身所带有的负电荷有利于DNA构象的展开, 核小体的结构变得松弛. 这种松弛的结构促进了转录因子和协同转录因子与DNA分子的接触, 因此组蛋白乙酰化可以激活特定基因的转录过程. 组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)则移去组蛋白Lys残基上的乙酰基, 恢复组蛋白的正电性, 带正电荷的Lys残基与DNA分子的电性相反, 增加了DNA与组蛋白之间的吸引力, 使启动子不易接近转录调控元件, 从而抑制转录. 许多研究已证实了组蛋白高/低乙酰化在肿瘤发生中起重要作用: 组蛋白的乙酰化促进基因转录, 而去乙酰化抑制基因转录. 甲基化也是组蛋白的修饰之一, 是由组蛋白甲基化酶(histone methyltransferases, HMT)催化的, 可以改变染色体的状态, 进而调节基因的转录, 间接导致肿瘤的发生. H3-K9甲基化可以抑制基因表达, 而H3-H4甲基化可以激活效应. 上述各种修饰方式不是独立的, 更多的时候可以通过协同或拮抗来发挥作用. 组蛋白甲基化也与DNA甲基化联合作用共同参与基因沉默, H3-K9甲基化与DNA甲基化在基因的沉默机制中有协同作用, 而H3-H4甲基化拮抗DNA甲基化所产生的基因沉默. 在哺乳动物中, DNA甲基化可能是一个优势事件, 组蛋白甲基化需在DNA甲基化的指导下才能完成.

2.2 组蛋白修饰与胃肠道肿瘤 Kondo *et al*^[28]对结肠癌细胞株的研究表明, H3组蛋白的9-赖氨酸的低乙酰化、4-赖氨酸的低甲基化和9-赖氨酸的过度甲基化p16, hMLH1和MGMT三个基因启动子过度甲基化引起的基因表达沉默相关, 提示在大肠癌中DNA的甲基化和组蛋白的修饰密切相关, 共同作用于基因的调控过程. Cameron *et al*^[29]的研究显示对p16, TIMP-3, p15和hMLH1基因启动子过度甲基化的结肠癌细胞, 单用组

蛋白脱乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)抑制剂无法使失活的基因重新表达; 但如果先用小剂量的DNA甲基化抑制剂处理使基因获得轻度的重新表达, 再用HDAC抑制剂处理后, 则可使结肠癌细胞基因重新表达显著增强, 提示组蛋白的脱乙酰化和DNA的高甲基化共存于基因失活的过程之中, 但DNA的高甲基化在导致这些基因失活中可能扮演主导作用.

3 染色质重塑

染色质重塑(remodeling)指染色质位置和结构的变化. 主要涉及密集的染色质丝在核小体连接处发生松解造成染色质解压缩, 从而暴露基因转录启动子区中的顺式作用元件, 为反式作用蛋白(转录因子)与之结合提供了一种称为可接近性(accessibility)的状态. 染色体重塑过程由两类结构介导: ATP依赖型核小体重塑复合体和组蛋白修饰复合体. 前者通过水解作用改变核小体构型; 后者对核心组蛋白N端尾部的共价修饰进行催化. 修饰直接影响核小体的结构, 并为其他蛋白提供了和DNA作用的结合位点^[30]. 染色质的重塑和组蛋白的去乙酰化是相互依赖的, DNA甲基化可能需要组蛋白去乙酰化酶(HDACs)的活动或染色质的重塑中的成分参与.

近几十年来的研究表明, 单靠传统的遗传学研究并不能解释恶性肿瘤这一复杂现象的全部问题, 肿瘤的病因和发病机制至今依然是没有明确答案的谜团. 组蛋白乙酰化水平直接影响肿瘤的进程, HDAC抑制剂能诱导多种肿瘤细胞的生长停滞和分化, 证明了组蛋白高乙酰化在肿瘤发生预防中的作用. 目前研究中表遗传学研究为肿瘤的早期诊断、预后判断和干预治疗提供了新的思路, 表观基因改变和基因改变的主要区别在于: 表观基因改变是可逆的, 能治疗剂所逆转甚至可通过饮食预防, 在这一点上, 他比基因改变有着更为广阔的治疗前景.

4 参考文献

- 1 Lee YY, Kang SH, Seo JY, Jung CW, Lee KU, Choe KJ, Kim BK, Kim NK, Koeffler HP, Bang YJ. Alterations of p16^{INK4A} and p15^{INK4B} genes in gastric carcinomas. *Cancer* 1997; 80: 1889-1896
- 2 Lee TL, Leung WK, Chan MW, Ng EK, Tong JH, Lo KW, Chung SC, Sung JJ, To KF. Detection of gene promoter hypermethylation in the tumor and serum of patients with gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1761-1766
- 3 Song SH, Jong HS, Choi HH, Kang SH, Ryu MH, Kim NK, Kim WH, Bang YJ. Methylation of specific

■同行评价

本文较全面的综述了近年来胃肠道肿瘤中个别基因, 尤其是肿瘤抑制基因的启动子区甲基化状态的变化与肿瘤的发生发展之间的关系, 具有一定的学术参考价值.

- CpG sites in the promoter region could significantly down-regulate p16^{INK4a} expression in gastric adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2000; 87: 236-340
- 4 Shim YH, Kang GH, Ro JY. Correlation of p16 hypermethylation with p16 protein loss in sporadic gastric carcinomas. *Lab Invest* 2000; 80: 689-695
 - 5 Kang GH, Lee S, Kim JS, Jung HY. Profile of aberrant CpG island methylation along multistep gastric carcinogenesis. *Lab Invest* 2003; 83: 519-526
 - 6 赵成海, 张宁, 卜献民, 李岩, 张海鹏. 胃癌多基因甲基化状态分析. *世界华人消化杂志* 2006; 4: 1004-1007
 - 7 Fleisher AS, Esteller M, Wang S, Tamura G, Suzuki H, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Smolinski KN, Shi YQ, Rhyu MG, Powell SM, James SP, Wilson KT, Herman JG, Meltzer SJ. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 1999; 59: 1090-1095
 - 8 Leung SY, Yuen ST, Chung LP, Chu KM, Chan AS, Ho JC. hMLH1 promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Res* 1999; 59: 159-164
 - 9 Nakajima T, Akiyama Y, Shiraishi J, Arai T, Yanagisawa Y, Ara M, Fukuda Y, Sawabe M, Saitoh K, Kamiyama R, Hirokawa K, Yuasa Y. Age-related hypermethylation of the hMLH1 promoter in gastric cancers. *Int J Cancer* 2001; 94: 208-211
 - 10 Kang GH, Shim YH, Jung HY, Kim WH, Ro JY, Rhyu MG. CpG island methylation in premalignant stages of gastric carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 2847-2851
 - 11 Fujimoto J, Yasui W, Tahara H, Tahara E, Kudo Y, Yokozaki H, Tahara E. DNA hypermethylation at the p52 promoter region is associated with early stage of stomach carcinogenesis. *Cancer Lett* 2000; 149: 125-134
 - 12 Tsuchiya T, Tamura G, Sato K, Endoh Y, Sakata K, Jin Z, Motoyama T, Usuba O, Kimura W, Nishizuka S, Wilson KT, James SP, Yin J, Fleisher AS, Zou T, Silverberg SG, Kong D, Meltzer SJ. Distinct methylation patterns of two APC gene promoters in normal and cancerous gastric epithelia. *Oncogene* 2000; 19: 3642-3646
 - 13 滕玥, 戴冬秋. 胃癌表遗传学的研究进展. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1814-1818
 - 14 Iida S, Akiyama Y, Nakajima T, Ichikawa W, Nihei Z, Sugihara K, Yuasa Y. Alterations and hypermethylation of the p14(ARF) gene in gastric cancer. *Int J Cancer* 2000; 87: 654-658
 - 15 Esteller M, Cordon-Cardo C, Corn PG, Meltzer SJ, Pohar KS, Watkins DN, Capella G, Peinado MA, Matias-Guiu X, Prat J, Baylin SB, Herman JG. p14^{ARF} silencing by promoter hypermethylation mediates abnormal intracellular localization of MDM2. *Cancer Res* 2001; 61: 2816-2821
 - 16 Tamura G, Yin J, Wang S, Fleisher AS, Zou T, Abraham JM, Kong D, Smolinski KN, Wilson KT, James SP, Silverberg SG, Nishizuka S, Terashima M, Motoyama T, Meltzer SJ. E-Cadherin gene promoter hypermethylation in primary human gastric carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 569-573
 - 17 关志宇, 戴冬秋. 胃癌TIMP3基因启动子甲基化及其蛋白表达的研究. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 138-143
 - 18 Wiencke JK, Zheng S, Lafuente A, Lafuente MJ, Grudzen C, Wrensch MR, Miike R, Ballesta A, Trias M. Aberrant methylation of p16INK4a in anatomic and gender-specific subtypes of sporadic colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8: 501-506
 - 19 Liang JT, Chang KJ, Chen JC, Lee CC, Cheng YM, Hsu HC, Wu MS, Wang SM, Lin JT, Cheng AL. Hypermethylation of the p16 gene in sporadic T3N0M0 stage colorectal cancers: association with DNA replication error and shorter survival. *Oncology* 1999; 57: 149-156
 - 20 Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 1995; 55: 4525-4530
 - 21 Sato F, Harpaz N, Shibata D, Xu Y, Yin J, Mori Y, Zou TT, Wang S, Desai K, Leytin A, Selaru FM, Abraham JM, Meltzer SJ. Hypermethylation of the p14(ARF) gene in ulcerative colitis-associated colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 2002; 62: 1148-1151
 - 22 Shen L, Kondo Y, Hamilton SR, Rashid A, Issa JP. P14 methylation in human colon cancer is associated with microsatellite instability and wild-type p53. *Gastroenterology* 2003; 124: 626-633
 - 23 Potocnik U, Glavac D, Golouh R, Ravnik-Glavac M. Causes of microsatellite instability in colorectal tumors: implications for hereditary non-polyposis colorectal cancer screening. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; 126: 85-96
 - 24 Deng G, Chen A, Hong J, Chae HS, Kim YS. Methylation of CpG in a small region of the hMLH1 promoter invariably correlates with the absence of gene expression. *Cancer Res* 1999; 59: 2029-2033
 - 25 Arnold CN, Goel A, Boland CR. Role of hMLH1 promoter hypermethylation in drug resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines. *Int J Cancer* 2003; 106: 66-73
 - 26 Plumb JA, Strathdee G, Sludden J, Kaye SB, Brown R. Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter. *Cancer Res* 2000; 60: 6039-6044
 - 27 Linggi BE, Brandt SJ, Sun ZW, Hiebert SW. Translating the histone code into leukemia. *J Cell Biochem* 2005; 96: 938-950
 - 28 Kondo Y, Shen L, Issa JP. Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 206-215
 - 29 Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, Baylin SB. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 1999; 21: 103-107

电编 李琪 编辑 张焕兰

人食管癌顺铂耐药细胞系Ec9706/cDDP的建立及其生物学特征

李敏, 王志举, 李文涛, 董子明

李敏, 郑州大学基础医学院微生物学与免疫学教研室 河南省郑州市 450052

王志举, 郑州大学基础医学院生理学教研室 河南省郑州市 450052

李文涛, 郑州大学第一附属医院普外科 河南省郑州市 450052

董子明, 郑州大学基础医学院病理生理学教研室 河南省郑州市 450052

李敏, 郑州大学基础医学院博士, 讲师, 主要从事病理生理学

研究。
通讯作者: 董子明, 450052, 河南省郑州市, 郑州大学基础医学院病理生理学教研室, dongzm@zzu.edu.cn

收稿日期: 2006-08-28 接受日期: 2006-09-20

Establishment of a cisplatin-induced human esophageal carcinoma drug-resistant cell line and its biological characteristics

Min Li, Zhi-Ju Wang, Wen-Tao Li, Zi-Ming Dong

Min Li, Department of Microbiology and Immunology, College of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Zhi-Ju Wang, Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Wen-Tao Li, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Zi-Ming Dong, Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Zi-Ming Dong, Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. dongzm@zzu.edu.cn

Received: 2006-08-28 Accepted: 2006-09-20

Abstract

AIM: To establish a cisplatin-induced human esophageal carcinoma drug-resistant cell line Ec9706/cDDP and study its biological characteristics.

METHODS: The drug-resistant cell line Ec9706/cDDP was established in culture by exposing Ec9706 parent cells to moderate concentration of cisplatin (cDDP) over a period of 9 months. The

resistance index to cDDP was determined by the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. Cell growth curve was painted and the doubling time was accounted. Flow cytometry (FCM) was performed to determine cell cycle. Fluorescence activated cell analysis (FACS) was employed to determine the concentration of fluorescence dye of rhodamine 123 (Rh123) in the cells for the evaluation of drug-absorptive and expelling capacity.

RESULTS: The resistant index of Ec9706/cDDP was 15.7. When Ec9706/cDDP was stored with cDDP at -196°C for 3 months and then back into the normal environment, its characteristic of anti-tumor drug resistance was still maintained. But after being cultured in RPMI-1640 without cDDP for a period of 1 month, Ec9706/cDDP showed a decrease in the resistant index. As compared with the parent cells, Ec9706/cDDP exhibited a prolonged doubling time ($29.79 \pm 0.48 \text{ h}$ vs $25.79 \pm 0.45 \text{ h}$, $P < 0.05$) and lower growth rate. The percentages of cells in S and G0/G1 phase were significantly increased in Ec9706/cDDP in comparison with those in Ec9706 ($36.49\% \pm 3.93\%$ vs $26.70\% \pm 2.62\%$, $P < 0.05$; $63.18\% \pm 5.21\%$ vs $52.81\% \pm 4.36\%$, $P < 0.05$) while the percentage of G2-phase cells was decreased ($0.33\% \pm 0.02\%$ vs $20.49\% \pm 3.71\%$, $P < 0.05$). In soft agar growth test, Ec9706/cDDP cells formed more cell clones than Ec9706 cells (69% vs 24% , $P < 0.05$). Finally, the concentration of Rh123 in Ec9706/cDDP was lower than that in Ec9706.

CONCLUSION: The newly established stable cell line Ec9706/cDDP possesses typical multi-drug resistant characteristics and its drug-resistant phenotype is stable.

Key Words: Human esophageal carcinoma; Drug resistant cell line; Cisplatin; Cell cycle; Methyl thiazolyl tetrazolium assay; Flow cytometry

Li M, Wang ZJ, Li WT, Dong ZM. Establishment of a cisplatin-induced human esophageal carcinoma drug-

■背景资料

肿瘤细胞的多药耐药性(MDR)是导致临床肿瘤化疗失败的主要原因。美国癌症协会研究表明, 90%以上的肿瘤患者不同程度上受耐药影响。建立耐药细胞系是体外研究MDR的重要手段和前提, 有助于深入研究MDR的机制、有效逆转途径。

■创新盘点

本文首次采用顺铂浓度递增法与间歇冲击法相结合的方法建立了Ec9706食管癌细胞的顺铂耐药细胞系。

resistant cell line and its biological characteristics. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(34):3257-3260

摘要

目的: 建立人食管癌顺铂耐药细胞系Ec9706/cDDP, 探讨其生物学特征。

方法: 采用顺铂(cDDP)中等浓度、间歇作用方法历时9 mo建立耐药细胞系Ec9706/cDDP, 采用MTT法测定其对cDDP的耐药指数, 观察冻存、撤药对耐药性的影响, 比较耐药与亲本细胞生长曲线、群体倍增时间及贴壁率的不同, 流式细胞仪测细胞周期, 软琼脂实验测细胞的恶性增殖能力, 罗丹明实验测其对药物的摄入、排出能力。

结果: 人食管癌顺铂耐药细胞系Ec9706/cDDP的耐药指数为15.7, 冻存对耐药性影响不大, 撤药培养可使耐药性降低, 耐药细胞群体倍增时间延长(29.79 ± 0.48 h vs 25.79 ± 0.45 h, $P < 0.05$), 生长缓慢, G0/G1、S期细胞比例增加($63.18\% \pm 5.21\%$ vs $52.81\% \pm 4.36\%$, $P < 0.05$; $36.49\% \pm 3.93\%$ vs $26.70\% \pm 2.62\%$, $P < 0.05$), G2期细胞减少($0.33\% \pm 0.02\%$ vs $20.49\% \pm 3.71\%$, $P < 0.05$), 克隆形成率明显高于亲本细胞(69% vs 24% , $P < 0.05$), 对罗丹明的摄入减少, 排出增多。

结论: 成功建立了人食管癌顺铂耐药细胞系Ec9706/cDDP, 且耐药性较稳定。

关键词: 食管癌; 耐药细胞系; 顺铂; 细胞周期; 四甲基偶氮唑蓝; 流式细胞术

李敏, 王志举, 李文涛, 董子明. 人食管癌顺铂耐药细胞系Ec9706/cDDP的建立及其生物学特征. 世界华人消化杂志 2006;14(34):3257-3260
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3257.asp>

0 引言

近年来人们发现肿瘤细胞不仅会对使用过的抗肿瘤药产生耐药性, 而且对很多未曾接触过的、甚至结构与作用机制不同的药物产生不同程度的耐药性, 即多药耐药性(multidrug resistance, MDR), 这是导致临床肿瘤化疗失败的重要原因之一^[1-3]. 建立多药耐药细胞系是体外研究MDR的重要手段, 对指导临床医生选择合理的化疗方案和化疗药物具有重要意义^[4]. 本研究采用顺铂(cDDP)中等浓度、间歇作用方法建立了人食管癌细胞的MDR细胞系Ec9706/

cDDP, 旨在探讨其生物学特征及MDR机制, 为探索逆转肿瘤耐药的有效途径奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 人食管癌细胞株Ec9706由本校病理学教研室惠赠; cDDP山东齐鲁制药厂生产; RPMI 1640培养液Gibco/BRL公司生产; 四甲基偶氮唑蓝(MTT)为美国Sigma产品; 碘化丙啶(PI)、RNase购自Amresco公司。

1.2 方法

1.2.1 耐药细胞株Ec9706/cDDP的建立 采用cDDP中等浓度、间歇作用方法建株. 以终浓度为2 mg/L的cDDP培养液冲击对数生长期的Ec9706细胞, 48 h后弃含药培养液, PBS洗3遍, 换新鲜培养液. 1-2 d换液一次洗去死亡细胞, 待形成细胞克隆时传代, 恢复稳定生长后提高cDDP浓度再次冲击, 如此反复作用直至细胞可在浓度为0.5 mg/L的cDDP培养液中维持培养。

1.2.2 MTT法测定细胞对cDDP的敏感性 常规MTT法检测, 酶标仪上以550 nm波长测吸光度值(A). 相对抑制率(%) = $(1 - \text{加药孔A值} / \text{对照孔A值}) \times 100\%$, IC₅₀计算器软件计算50%细胞生长抑制时的药物浓度(IC₅₀), 耐药指数(RI) = 耐药细胞IC₅₀/亲本细胞IC₅₀.

1.2.3 冻存、复苏及撤药对细胞耐药稳定性的影响 将加有0.5 mg/L cDDP的细胞于-196℃冻存, 3 mo后复苏测RI. 同时观察细胞在不含药培养液中培养1 mo后RI的变化。

1.2.4 细胞形态学观察、生长曲线及倍增时间测定 倒置显微镜观察细胞形态变化. 细胞以 5×10^6 个/L接种于24孔培养板中, 21孔/组, 每日消化3孔, 计数活细胞, 连续7 d. 绘制细胞生长曲线, 按Patterson公式计算群体倍增时间: $Td = T \times \lg 2 / (\lg N_2 - \lg N_1)$, N₁为起始时间细胞数, N₂为培养T小时后细胞数, T为N₁到N₂的时间(h).

1.2.5 细胞贴壁率及细胞周期的测定 细胞以 1×10^5 个/孔接于21孔板, 12孔/组, 每隔2 h随机取3孔, 计数培养液中未贴壁细胞数, 共观察8 h, 细胞贴壁率(%) = $(1 - \text{未贴壁细胞数} / \text{接种细胞总数}) \times 100\%$; 取对数生长期细胞接种于不含血清的培养液中常规培养24 h使同步化, 换含100 mL/L血清的新鲜培养液, 待细胞达90%融合时收集, PBS洗涤, 700 mL/L乙醇固定, 1 g/L RNase 37℃作用30 min, 100 mg/L PI避光染色30 min, 置流式细胞仪检测。

1.2.6 双层软琼脂试验 底层为50 g/L琼脂糖培养

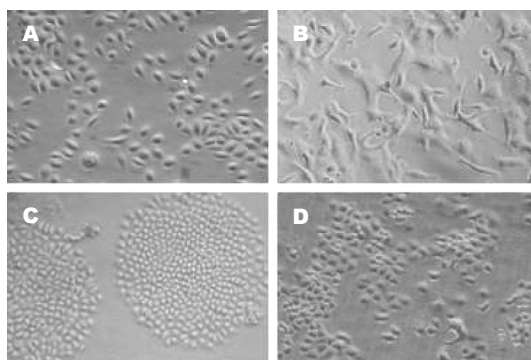


图1 不同细胞显微镜下的形态. A: 正常不加药的Ec9706细胞; B: 加药后24 h细胞; C: 加药后20 d左右形成的克隆; D: Ec9706/cDDP细胞.

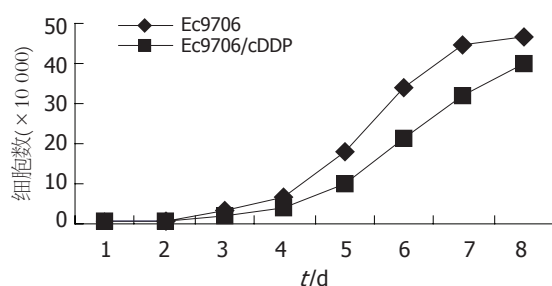


图2 Ec9706/cDDP与Ec9706细胞的生长曲线比较图.

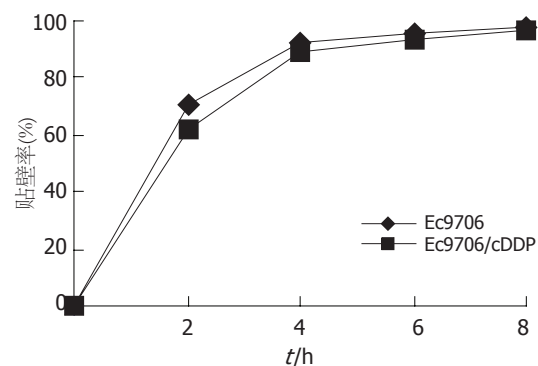


图3 Ec9706/cDDP与Ec9706细胞的贴壁率比较图.

基, 上层为含不同细胞浓度的3 g/L琼脂糖培养基, 使每孔中细胞数分别为25, 50, 100, CO₂箱中培养14 d左右, 计数细胞数大于50的克隆数.

1.2.7 罗丹明(Rh123)摄入/排出实验 Rh123摄入: 1×10^9 个/L的单细胞悬液加Rh123至终浓度为1 mg/L, 培养箱中置30 min, 离心后PBS洗3次, 流式细胞仪检测细胞内Rh123的相对荧光强度; Rh123排出: 上法处理于PBS洗3次后重悬于不含Rh123的培养液培养1 h, PBS洗涤, 流式细胞仪检测细胞内滞留的Rh123的相对荧光强度.

统计学处理 采用统计学软件SPSS10.0进行

表1 耐药细胞与亲本细胞细胞周期分布 (%)

细胞	G0/G1	S	G2/M
Ec9706	52.81 ± 4.36	26.70 ± 2.62	20.49 ± 3.71
Ec9706/cDDP	63.18 ± 5.21 ^a	36.49 ± 3.93 ^a	0.33 ± 0.02 ^a

^a $P < 0.05$ vs Ec9706组.

分析, 实验结果用均数±标准差(mean±SD)表示, 组间差异比较用 t 检验.

2 结果

2.1 Ec9706/cDDP顺铂耐药水平及其维持情况 MTT法检测结果表明, Ec9706/cDDP细胞对顺铂的耐药指数为15.7. 加药-196℃冻存3 mo复苏后其RI仍维持冻存前水平, 解除药物作用1 mo后RI为14.8, 抗药性下降约5.7%.

2.2 细胞形态学、生长曲线及倍增时间 加入cDDP后24 h光镜下可见大部分细胞因死亡而漂浮起来, 培养液略浑浊, 残留贴壁细胞发生明显改变, 大小不均, 有巨细胞产生, 形态不规则, 细胞突起及部分细胞胞质中黑色颗粒较多, 生长缓慢, 于20 d左右可形成细胞克隆, 传代后逐渐基本接近原来形状(图1). 细胞生长曲线见图2. 耐药细胞较亲本细胞生长缓慢, 群体倍增时间延长, 分别为 29.79 ± 0.48 h, 25.79 ± 0.45 h, 差别具有统计学意义($P < 0.05$).

2.3 细胞贴壁率及细胞周期分布 亲本细胞于0, 2, 4, 6, 8 h后的贴壁率分别为: 0, 70.13%, 92.32%, 95.52%, 97.85%; 耐药细胞在上述同一时间点的贴壁率则有所降低, 分别为0, 62.39%, 88.65%, 93.18%, 97.01%, 贴壁率变化曲线见图3, 但二者相比差别不明显, 无统计学意义($P > 0.05$). 耐药细胞G0/G1, S期细胞比例增加, G2/M期比例减少. 与亲本细胞相比差异有统计学意义($P < 0.05$, 表1).

2.4 双层软琼脂实验测克隆形成率 Ec9706与Ec9706/cDDP的克隆形成率分别为: 24%, 69%, 耐药细胞的克隆形成率显著增加($P < 0.05$).

2.5 Rh123摄入/排出试验结果 Ec9706/cDDP, Ec9706对Rh123的摄入量均值分别为: 36.82, 39.02, 滞留量分别为: 23.83, 29.70, 耐药细胞对Rh123的摄入少, 排出多, 二者差异有统计学意义($P < 0.05$).

3 讨论

体外建立耐药细胞系是研究肿瘤细胞耐药机制

■应用要点

本研究结果表明Ec9706/cDDP细胞具有较好的耐药表型, 可进一步用于研究肿瘤细胞MDR的机制及其有效逆转途径.

■同行评价

建立肿瘤耐药细胞系对于研究肿瘤细胞耐药机制和肿瘤化疗敏感性极其重要, 本文科学性强、设计合理、选用方法先进可行、结果准确可靠, 符合伦理要求。

及攻克临床化疗失败这一难关的前提和基础, 而建立耐药细胞系的方法有体外抗癌药物诱导法和耐药基因转染法^[5-6], 其中后者省时, 耐药机制单一, 在不含抗癌药的培养基中培养时, 耐药性稳定, 而前者是目前应用较为普遍的方法, 因其可以很好的模拟人类肿瘤化疗过程中出现的耐药现象, 该方法根据具体操作不同可分为药物浓度递增法、大剂量间歇冲击法等。药物浓度递增法诱导过程缓慢, 耗时长; 大剂量冲击法快速, 但对细胞损伤较大, 若剂量掌握不好, 有时致细胞全部死亡而中断实验。目前有不少学者采用将药物浓度递增与间歇冲击结合法二者结合的方法来诱导耐药细胞。cDDP是细胞周期非特异性的细胞毒性药物, 为临床常用的化疗药物, 抗癌谱广, 可与蛋白质、DNA、RNA形成加成物, 致DNA链间或链内交联, 以及DNA-蛋白质交叉联结, 抑制DNA复制、RNA转录, 引起细胞死亡^[7]。因此, 建立cDDP诱导的肿瘤细胞系可模拟常见的临床耐药, 具有较好的代表性。本研究采用cDDP中等浓度、间歇冲击方法对Ec9706细胞进行9 mo的体外诱导筛选获得了食管癌耐药细胞系Ec9706/cDDP, 耐药指数达15.7。有学者按耐药指数的高低将耐药分为低度(<5)、中度(5-15)、高度(>15)^[8]。该耐药性在加药-196℃冻存状态下可长时间维持, 但在培养液中培养时需加入一定浓度的药物, 以维持其耐药性的稳定。诱导耐药期间, 在加入cDDP早期时细胞形态有所变化, 包括突起及胞质中颗粒增多, 有学者认为可能与耐药细胞表面积增加, 以排除更多的药物有关, 而巨细胞的出现可能是细胞受到损伤及细胞分裂减少所致。在软琼脂实验中耐药细胞的克隆形成率明显高于亲本细胞, 表明耐药细胞的恶性增殖能力大大增强。Rh123是一种疏水性荧光染料, 可被激发出红色荧光, 易于用流式细胞仪测定。同时其化学结构与很多抗癌药物相似, 是特异性较强的P-糖蛋白的底物, 可有效的被表达P-糖蛋白的细胞排出胞

外, 对细胞毒性低, 故人们常用Rh123替代抗癌药物测定药物在胞内的蓄积情况。Rh123摄入/排出试验证实, Ec9706/cDDP对Rh123的蓄积比亲本细胞少, 表明耐药细胞膜上的泵机制可有效的将抗癌药排出胞外, 这可能是该细胞耐药机制之一。肿瘤细胞的耐药机制有多种^[9-12], 其详细的耐药机制需进一步探讨。总之, 本研究所诱导的Ec9706/cDDP耐药细胞具有稳定的耐药表型, 是研究肿瘤细胞的耐药机制、筛选耐药逆转剂的理想模型。

4 参考文献

- 1 Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A. Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents. *Pharmacol Ther* 2000; 85: 217-229
- 2 Rajagopal A, Simon SM. Subcellular localization and activity of multidrug resistance proteins. *Mol Biol Cell* 2003; 14: 3389-3399
- 3 韩全利, 丁杰, 张龙方, 王新, 郭长存, 乔泰东, 张学庸, 樊代明. Ss-A/Ro核蛋白60 ku亚单位在胃癌多药耐药中的作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 256-260
- 4 布立民, 孙淑红, 华建平, 韩英, 赖靖, 鲍文漪. 人大肠癌HCT-8/5-FU耐药细胞株的建立及P-gp测定. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2082-2086
- 5 Yang LY, Trujillo JM. Biological characterization of multidrug-resistant human colon carcinoma sublines induced/selected by two methods. *Cancer Res* 1990; 50: 3218-3225
- 6 樊爱琳, 刘国鹏, 郑善奎, 马静, 王执民, 丁振若, 杨麦贵, 郝晓柯. 逆转录病毒转染法建立兔VX-2多药耐药株. *第四军医大学学报* 2003; 24: 2129-2131
- 7 Sorenson CM, Barry MA, Eastman A. Analysis of events associated with cell cycle arrest at G2 phase and cell death induced by cisplatin. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 749-755
- 8 Snow K, Judd W. Characterisation of adriamycin- and amsacrine-resistant human leukaemic T cell lines. *Br J Cancer* 1991; 63: 17-28
- 9 Akiyama S. Mechanisms of drug resistance and reversal of the resistance. *Hum Cell* 2001; 14: 257-260
- 10 Scheffer GL, Scheper RJ. Drug resistance molecules: lessons from oncology. *Novartis Found Symp* 2002; 243: 19-31; discussion 31-7, 180-185
- 11 Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med* 2002; 53: 615-627
- 12 时永全, 肖冰, 苗继延, 赵燕秋, 尤涵, 樊代明. 构建fas基因真核表达载体逆转胃癌耐药细胞MDR表型. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 309-312

电编 张敏 编辑 王晓瑜

萎缩性胃炎大鼠胃黏膜主、壁细胞和G、D细胞及外周血胃泌素、生长抑素的变化

朱方石, 姒健敏, 王良静, 王冬飞, 陈萍

朱方石, 江苏省中医药研究院消化病研究室 江苏省南京市 210028

姒健敏, 王良静, 王冬飞, 陈萍, 浙江大学邵逸夫临床医学研究所 浙江省杭州市 310016

朱方石, 临床医学博士, 浙江大学临床医学博士后流动站出站博士后, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事胃肠病的中西医结合临床及基础研究。

中国博士后科学基金资助项目, No. 2002032232

通讯作者: 朱方石, 210028, 江苏省南京市红山路十字街100号, 江苏省中医药研究院消化病研究室. zhufs@tom.com

电话: 025-51779122 传真: 025-85637817

收稿日期: 2006-08-21 接受日期: 2006-09-27

Changes of gastric mucosal chief and parietal cells and G, D cells as well as blood gastrin somatostatin levels in rats with chronic atrophic gastritis

Fang-Shi Zhu, Jian-Min Si, Liang-Jing Wang, Dong-Fei Wang, Ping Chen

Fang-Shi Zhu, Department of Digestive Diseases, Jiangsu Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, Jiangsu Province, China

Jian-Min Si, Liang-Jing Wang, Dong-Fei Wang, Ping Chen, Sir Run Run Shaw Clinical Medical Institute of Zhejiang University, Hangzhou 310016, Zhejiang Province, China

Supported by the Postdoctoral Scientific Foundation of China, No. 2002032232

Correspondence to: Dr. Fang-Shi Zhu, Department of Digestive Diseases, Jiangsu Academy of Traditional Chinese Medicine, 100 Shizijie of Hongshan Road, Nanjing 210028, Jiangsu Province, China. zhufs@tom.com

Received: 2006-08-21 Accepted: 2006-09-27

Abstract

AIM: To study the changes of chief, parietal cells and G, D cells in gastric mucosa as well as blood levels of gastrin (GAS) and somatostatin (SS) in chronic atrophic gastritis (CAG) rats, and explore the possible mechanism of CAG generation.

METHODS: The rat models of CAG were made with 1 mL/L ammonia water, 20 mmol/L sodium deoxycholate and 600 mL/L ethanol, and the histopathological changes of gastric mucosa were observed. Pathological method and im-

munohistochemical staining were used to investigate the changes of chief, parietal cells and G, D cells in gastric mucosa and measure the blood levels of GAS and SS in CAG rats.

RESULTS: Obvious inflammation of gastric pyloric mucosa and glandular atrophy were observed, and intestinal metaphases occurred in some parts of mucosa. The numbers of gastric mucosal chief and parietal cells (7.94 ± 2.36 vs 13.13 ± 4.26 , $t = 3.014$, $P = 0.005$; 22.89 ± 7.28 vs 39.07 ± 7.17 , $t = 4.479$, $P = 0.005$) as well as the numbers of G and D cells (33.75 ± 7.34 vs 68.76 ± 21.75 , $t = 4.314$, $P = 0.025$; 21.21 ± 5.83 vs 31.37 ± 7.80 , $t = 2.953$, $P = 0.01$) were significantly decreased in the model rats as compared with those in the normal rats. The serum GAS level was markedly lower in the model rats than that in the normal ones (118.38 ± 13.62 ng/L vs 139.25 ± 17.32 ng/L, $t = 2.679$, $P = 0.025$), but the plasma SS level was notably higher in the model rats (570.04 ± 64.37 ng/L vs 435.28 ± 38.18 ng/L, $t = 5.092$, $P = 0.0005$).

CONCLUSION: The occurrence of CAG is associated with the damages of gastric mucosal barrier, decrease of mucosal chief and parietal cells, which leads to the abnormality and GAS and SS secretion.

Key Words: Chronic atrophic gastritis; Chief cell; Parietal cell; G Cell; D Cell; Gastrin; Somatostatin; Rat

Zhu FS, Si JM, Wang LJ, Wang DF, Chen P. Changes of gastric mucosal chief and parietal cells and G, D cells as well as blood gastrin somatostatin levels in rats with chronic atrophic gastritis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(34):3261-3267

摘要

目的: 研究实验性萎缩性胃炎(CAG)大鼠胃黏膜主细胞、壁细胞和G、D细胞及外周血胃泌素(GAS)、生长抑素(SS)的变化, 探讨CAG发生的可能机制。

■背景资料

近年来, 普遍认为CAG的发生、发展与胃黏膜腺体主细胞、壁细胞损害和G、D细胞密度及细胞数值的变化相关, 而对外周血中胃泌素、生长抑素的含量变化与CAG的关系则认识不一。通过模拟CAG发生的因素建立大鼠模型, 观察胃黏膜病理组织学的改变和主、壁细胞, G、D细胞的变化以及外周血GAS、SS的水平, 将从细胞水平及胃肠激素的内分泌机制角度来阐述CAG发生的病理机制。

■研究前沿

CAG的病因至今尚未完全明了,但公认的形成机制是各种致病因素的长期刺激或继发的宿主炎症反应,导致胃黏膜深层损害和腺体的破坏,而形成胃黏膜腺体萎缩和(或)肠化。探讨主、壁细胞, G、D细胞及外周血GAS、SS含量的变化对胃黏膜腺体萎缩和(或)肠化的影响,将有助于探讨CAG的神经内分泌调节机制紊乱的病理过程,以期寻找阻断CAG发生、发展的有效手段方法。

方法: 综合采用1 mL/L的氨水和20 mmol/L去氧胆酸钠及600 mL/L的乙醇及建立大鼠CAG模型,观察模型大鼠胃黏膜病理组织学的变化,采用病理学方法和免疫组织化学方法观察大鼠胃黏膜主、壁细胞和G、D细胞的变化情况,测定外周血GAS、SS水平。

结果: 模型大鼠胃窦黏膜炎症、腺体萎缩改变明显,部分出现了肠上皮化生,模型大鼠胃黏膜主细胞(7.94 ± 2.36 vs 13.13 ± 4.26 , $t = 3.014$, $P = 0.005$)壁细胞(22.89 ± 7.28 vs 39.07 ± 7.17 , $t = 4.479$, $P = 0.005$)数及G、D细胞数(33.75 ± 7.34 vs 68.76 ± 21.75 , $t = 4.314$, $P = 0.025$; 21.21 ± 5.83 vs 31.37 ± 7.80 , $t = 2.953$, $P = 0.01$)较正常大鼠主、壁细胞,及G、D细胞数明显减少,血清GAS含量(118.38 ± 13.62 ng/L vs 139.25 ± 17.32 ng/L, $t = 2.679$, $P = 0.025$)、血浆SS含量(570.04 ± 64.37 ng/L vs 435.28 ± 38.18 ng/L, $t = 5.092$, $P = 0.0005$)分别较正常大鼠降低和增高。

结论: 大鼠CAG的发生与胃黏膜屏障的破坏,主、壁细胞和G、D细胞数的减少,导致胃蛋白酶、胃酸分泌异常及GAS、SS等胃肠激素的神经内分泌调节机制紊乱有关。

关键词: 萎缩性胃炎; 主细胞; 壁细胞; G细胞; D细胞; 胃泌素; 生长抑素; 大鼠

朱方石, 刘健敏, 王良静, 王冬飞, 陈萍. 萎缩性胃炎大鼠胃黏膜主、壁细胞和G、D细胞及外周血胃泌素、生长抑素的变化. 世界华人消化杂志 2006;14(34):3261-3267
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3261.asp>

0 引言

自1980年“WHO专家会议”对“胃癌前病变的组织学定义”规定以来,由慢性胃炎→胃黏膜萎缩肠化→异型增生→胃癌这一病变演化模式过程已为国内外众多学者所认同^[1]。因此,探讨慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)的发生机制对CAG癌变的干预阻断研究和胃癌的一级预防有着重要意义。近年来,普遍研究认为CAG的发生、发展与胃黏膜腺体主细胞、壁细胞损害和G、D细胞密度及细胞数值的变化相关^[2-4],而对外周血中胃泌素(GAS)、生长抑素(SS)的含量变化与CAG的关系则认识不一。我们通过模拟CAG发生的因素建立大鼠模型,观察胃黏膜病理组织学的改变和主、壁细胞, G、D细胞的变化以及外周血GAS、SS的水平,以探

讨CAG发生的病理机制。

1 材料和方法

1.1 材料 成熟SD大鼠,清洁级,一级质量标准,体质量 200 ± 10 g,由浙江学省实验动物中心提供,空调下饲养,温度 $20 \pm 1^\circ\text{C}$,湿度50%-60%,光照每12 h明暗交替,通风8-15次/h,食用浙江大学医学院实验动物中心提供的全营养颗粒饲料。NH₃ 25.0%-28.0%分析纯,中国瓶窑医药化工试剂厂生产,批号: 20000914。去氧胆酸钠, Serva公司生产,上海化学试剂采购供应站进口分装经销,批号: 980511。DAKO免疫组织化学显色系统,中山生物试剂公司。兔抗大鼠GAS抗体,武汉博士德公司,批号: BA0245。兔抗大鼠SS抗体,第二军医大学经生物学教研室。酶标记HRP二抗,美国DAKO公司。GAS酶联免疫试剂盒,美国Lifkey公司。SS放免试剂盒,第二军医大学神经生物学教研室。Model-556型Bio-RAD酶标仪,日本富士公司。XH-6020 γ 放免计数仪及放免数据处理系统,西安262厂。DMLB荧光显微镜及Lelca Qwin图像分析系统,德国Leica公司。

1.2 方法

1.2.1 造模与分组 根据本课题组曾经报道的综合法(拟氏法)^[5-6]制作CAG模型。用含NH₃ 25.0%-28.0%分析纯,配制成浓度为1 g/L的氨水自由饮用,每天记录饮量;用去氧胆酸钠加蒸馏水配制成20 mmol/L的溶液,每日灌胃一次,其中在每周一、四晚撤除饲料,次日(周二、周五)上午9时行空腹灌胃,对体质量 <200 g, 200-250 g和 >250 g的大鼠,灌胃剂量分别为1.0, 1.5和2.0 mL;用600 mL/L的乙醇每周二、五空腹灌胃,剂量同上,处理24 wk。取同期饲养的正常SD大鼠8只设为正常对照组(A组),另取造模成功的CAG大鼠8只设为模型组(B组),与对照组大鼠同期处死,取全胃标本。

1.2.2 标本制备 剖腹取出全胃,沿大弯侧切开,生理盐水冲洗,40 g/L中性甲醛固定、酒精脱水、二甲苯将组织透明,后进行浸蜡、包埋,制成4-5 μm 的石蜡切片,进行HE染色,光镜下观察。另在胃窦、体交接处取5 mm \times 5 mm标本,25 g/L戊二醛和20 g/L 四氧化锇双重固定,乙醇脱水,醋酸异戊脂过度,临界点干燥,标本黏样,留以电镜观察。

1.2.3 胃黏膜炎症观测 参照1994年美国休斯顿胃炎诊断标准,采用半定量法,光镜低倍镜下观察整个胃黏膜。在胃窦部取10个视野,按炎细胞浸

表 1 两组大鼠胃黏膜病理指标比较 (mean ± SD)

分组	n	炎症级别	L1/L2值	1 mm长度内腺体数
A	8	0.79 ± 0.21	5.38 ± 0.57	31.86 ± 2.61
B	8	2.05 ± 0.28 ^b	2.82 ± 0.55 ^b	25.25 ± 3.41 ^b

^bP<0.01 vs A组.

润的程度分为0-3 7个级别。(0级: 无炎症; 0.5级: 镜下观察炎症介于0与1之间; 1级: 在胃小凹区或固有腺底部可见多个慢性炎性细胞浸润; 1.5级: 镜下观炎症介于1与2之间; 2级: 在胃黏膜小凹至黏膜肌层均有较多炎细胞浸润; 2.5级: 镜下观察炎症介于2与3之间; 3级: 胃黏膜内可见成堆炎细胞聚集灶)。记录胃大、小弯侧的炎症情况, 再将两者平均, 得出胃黏膜炎症级别。此外, 测量L1/L2值(黏膜腺体厚度L1/黏膜肌层厚度L2)、统计胃窦部1 mm长度内腺体数。每张切片取胃窦部黏膜5个视野, 用测微器测出每个视野的胃窦黏膜腺体厚度, 计平均值; 另测出距幽门环200-1200 μm之间(即1 mm范围)胃窦固有腺体总个数。

1.2.4 主、壁细胞及G、D细胞观察 在荧光显微镜下(HE×400), 每张切片取胃窦部5个视野, 通过Lelca Qwin图像分析系统(定标测量每视野图实际面积为33 547.8 μm²), 读取主、壁细胞数, 由计算机软件系统, 分别统计每视野图中主、壁阳性细胞均数。采用免疫组织化学方法(Envision系统二步法), 将石蜡切片烤片、二甲苯脱蜡、酒精脱水, 蒸馏水漂洗, 浸入TBS(洗涤液)中3 min, 加30 mL/L H₂O₂溶液阻断内源性过氧化酶, 蒸馏水漂洗后, 置入1 g/L柠檬酸缓冲液中, 在微波炉中95℃加热15 min抗原修复, 自然冷却, TBS漂洗10 min, 根据检测G、D细胞的不同, 各组切片上分别滴加GAS一抗(1: 500)和SS一抗(1: 600)各50 μL, 孵育30 min; 阴性对照片PBS代替一抗, TBS漂洗10 min, 滴加EnVision HRP(辣根过氧化酶)二抗100 μL, 孵育30 min, TBS漂洗10 min, 加DAB显色液, 孵育10 min, 蒸馏水漂洗, 苏木素复染20 s, 脱水、透明、封片。在荧光显微镜下(×400), 每张切片取胃窦部5个视野, 通过Lelca Qwin图像分析系统(定标测量每视野图实际面积为373 800 μm²), 读取G、D阳性细胞数, 计算其免疫组织化学显色阳性细胞灰度值。

1.2.5 血清GAS含量检测 采用ELISA法, 将两组大鼠断头处死, 取颈动脉血5 mL(分为2管, 各2.5 mL, 另一管加1 g/L肝素25 μL抗凝和抑肽酶

表 2 两组胃黏膜腺体壁细胞、主细胞数比较(mean ± SD)

分组	n	壁细胞	主细胞
A组	8	39.07 ± 7.17	13.13 ± 4.26
B组	8	22.89 ± 7.28 ^b	7.94 ± 2.36 ^b

^bP<0.01 vs A组.

1250 U用作血浆SS检测), 将1管1500 r/min离心5 min, 取10 μL血清, 分别加入包被好抗原的96孔酶标板的孔板中, 每孔中加入GAS抗体50 μL和POD(缓冲液)50 μL, 轻轻混匀30 s, 封住盖板, 室温孵育45 min, 弃除混合物, PBS洗涤5次, 甩尽板内液体, 用吸水纸拍干, 加入100 μL的TMB(酶底物), 轻轻混匀10 s, 室温孵育20 min, 加入100 μL终止液, 混匀30 s后, 在酶标仪450 nm波长下, 测A值, 计算血清中GSA含量。

1.2.6 血浆SS含量检测 采用RIA法, 将加入肝素和抑肽酶的全血离心, 取血浆, 在试管上分别标上管号, 标准品管中各加入100 μL不同浓度的标准品, 实验管中各加入300 μL待测血浆; 所有管中分别加入SS 抗血清100 μL和缓冲液200 μL, 4℃孵育24 h后, 分别加入¹²⁵I-AVP 100 μL混匀, 再次4℃孵育24 h, 加分离剂500 μL, 混匀, 室温放置45 min后, 4000 r/min离心, 20 min, 弃上清, 上放免计数器测定cpm值, 由放免数据处理系统绘制标准曲线并计算SS含量。

统计学处理 应用SPSS10.0统计学软件, 采用t检验处理分析各组实验数据, P<0.05为差异具有显著性。

2 结果

2.1 两组大鼠胃黏膜组织光镜和电镜观察 经HE染色光镜下观察, 正常组大鼠显示为正常的胃黏膜图像; 而模型组胃黏膜腺体减少, 排列紊乱, 黏膜肌层增厚, 向黏膜固有层伸展, 呈分枝状插入腺体之间, 并伴有明显炎性细胞浸润, 部分出现了肠化(图1A-B)。扫描电镜下, 模型组大鼠与正常胃黏膜比较, 见表面破溃脱落, 黏液减少(图1C-D)。

2.2 胃黏膜炎症观测结果 模型组大鼠的炎症级别和L1/L2值、1 mm长度内腺体数分别高于和低于正常大鼠(P<0.01); 模型组胃液pH值呈下降趋势, 但无显著性差异(P>0.05, 表1)。

2.3 胃黏膜腺体主细胞、壁细胞数变化 主细胞主要分布在胃腺体的下半部或下1/3管壁, 呈单层立方或柱状, 胞核呈球形, 细胞质为空泡状结

■创新盘点

由于对外周血中胃泌素、生长抑素的含量变化与CAG的关系则认识不一, 因此本文通过建立CAG大鼠模型, 从胃黏膜组织中的内分泌细胞学变化来客观阐述和分析胃肠激素分泌异常的神经内分泌调节紊乱的病理学机制。

■应用要点

通过了解CAG胃肠激素分泌异常的神经内分泌调节机制紊乱的病理学机制,可进一步为寻求阻断CAG胃黏膜腺体萎缩防治研究提供方向和对策。

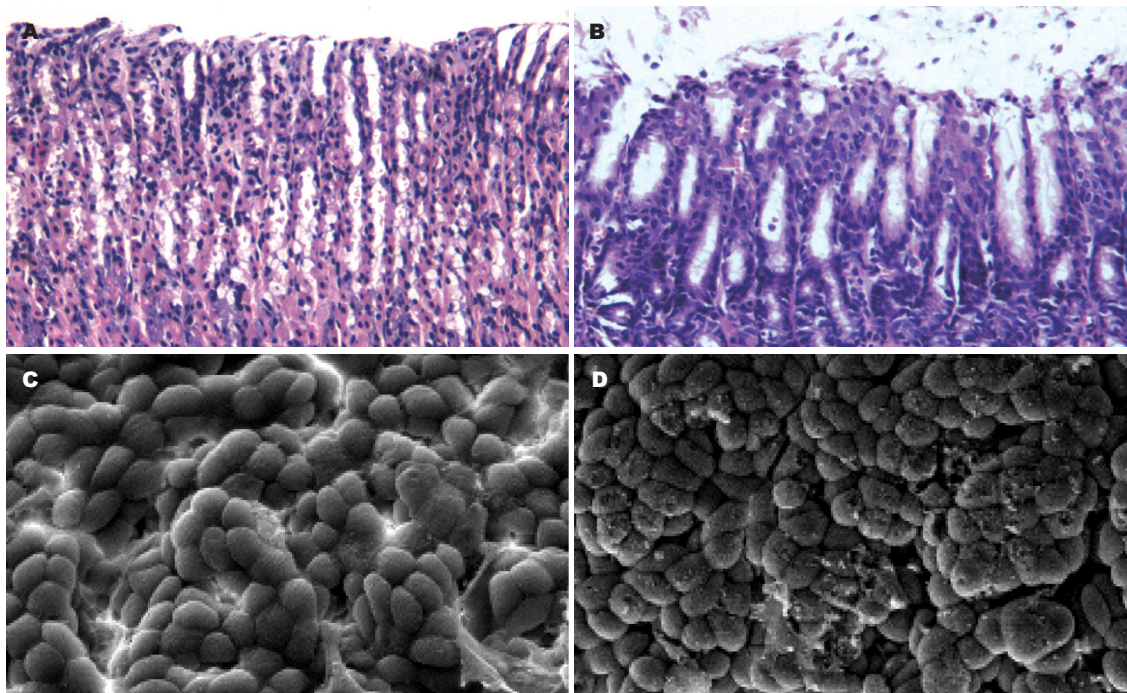


图1 两组大鼠胃黏膜组织. A: 光镜下正常大鼠胃黏膜图(HE $\times 200$); B: 光镜下模型组大鼠胃黏膜图(HE $\times 200$); C: 电镜下正常大鼠胃黏膜电镜观($\times 860$); D: 电镜下模型组大鼠胃黏膜电镜观($\times 1001$).

表3 两组G、D细胞数、灰度值比较(mean \pm SD)

分组	<i>n</i>	G细胞数	G细胞灰度值	D细胞数	D细胞灰度值
A组	8	68.76 \pm 21.75	200.63 \pm 36.51	31.37 \pm 7.80	211.26 \pm 18.67
B组	8	33.75 \pm 7.34 ^b	158.41 \pm 12.86 ^b	21.21 \pm 5.83 ^a	122.50 \pm 17.24 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs A组.

构,呈蓝色纹状(图2A中右侧箭头所指).壁细胞呈锥形,其长边在腺体基底膜侧,尖顶呈楔形挤入邻近主细胞之间,壁细胞与邻近主细胞或黏液细胞的边界较平整,有典型的闭锁小带和桥粒,通常有一个大的圆形核,位于细胞中央呈蓝色,胞质呈桃红色(图2B中左侧箭头所指).模型组大鼠较正常组大鼠胃黏膜主、壁细胞数明显下降,两组比较有显著性差异($P < 0.01$,表2).

2.4 两组胃窦部G、D阳性细胞数、灰度值比较 G、D细胞阳性反应为胞质内棕黄色或淡棕色颗粒,部分呈棕褐色,细胞分布不均匀,常单个或几个夹在腺细胞之间,对照片为阴性.胃窦部G细胞较多,主要分布在胃窦黏膜腺体的中下1/3,呈圆形、椭圆形、梭形或不规则,有的连续在一起形成团带状.D细胞数量较G细胞少,分布稍弥散,主要分布在胃窦黏膜的下1/3,偶见于黏膜中上部.D细胞形态与G细胞相似,有的发出细长突起,伸向邻近细胞(图3-4).模型组大鼠G、D细胞数及其阳性染色灰度值均较正常组大鼠明显降低,

表4 两组血清GAS、血浆SS含量比较(mean \pm SD, ng/L)

分组	<i>n</i>	GAS	SS
A组	8	139.25 \pm 17.32	435.28 \pm 38.18
B组	8	118.38 \pm 13.62 ^a	570.04 \pm 64.37 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs A组.

两组比较有显著性差异($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$,表3).

2.5 两组血清GAS、血浆SS含量比较 模型组大鼠外周血GAS含量较正常组大鼠明显降低,而SS含量却较正常组大鼠明显升高,两组比较军有显著性差异(分别为 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$,表4).

3 讨论

1998年病理专家提出慢性萎缩性胃炎(CAG)以进行性胃腺体丢失和肠化为特征,与胃癌发生密切相关,并将其列为癌前状态^[7],其癌变率在2%-8%^[8].CAG的病因至今尚未完全明了,一般认为由Hp杆菌感染、自身免疫机制和遗传因

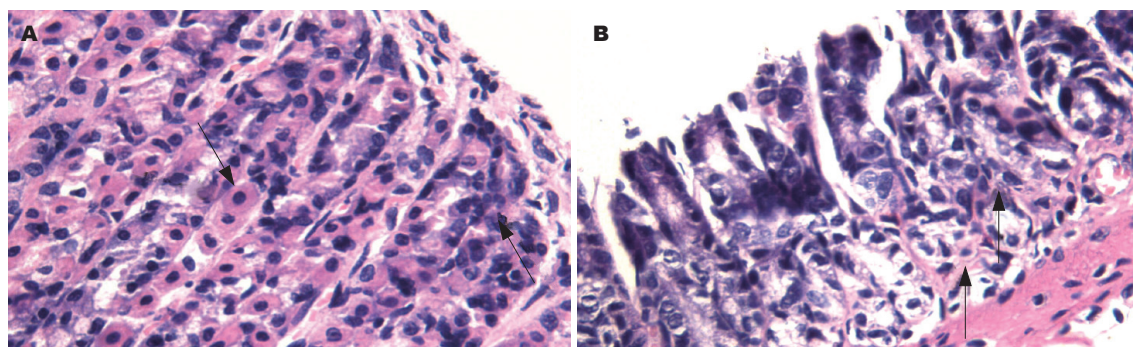


图 2 胃黏膜腺体主细胞、壁细胞(HE × 400). A: 正常组; B: 模型组.(A中右侧箭头所指为主细胞 B中左侧箭头所指壁细胞).

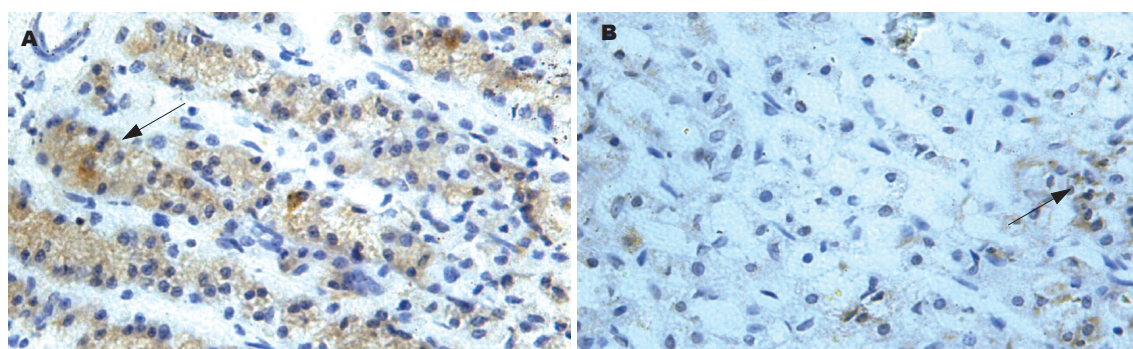


图 3 荧光显微镜下大鼠G细胞(× 400). A: 正常组; B: 模型组.(箭头所指为G细胞阳性棕褐色颗粒, 正常鼠呈团带状, 模型组阳性细胞稀少).

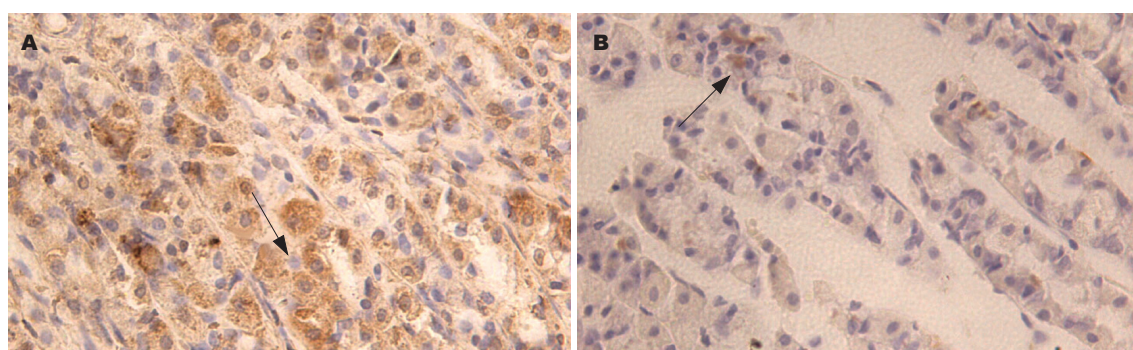


图 4 荧光显微镜下大鼠D细胞(× 400). A: 正常组; B: 模型组.(箭头所指为D细胞阳性棕黄色颗粒, 正常鼠成簇, 伸向邻近细胞, 模型鼠阳性细胞稀少).

■名词解释

壁细胞由胃黏膜腺体峡部的干细胞增殖分化形成, 又称泌酸细胞, 主要分泌盐酸; 主细胞位于腺体基底部, 主要分泌胃蛋白酶原. 二者共同参与了胃酸分泌和调节. G、D细胞为胃窦部腺体散在分布的内分泌细胞, G细胞分泌GAS, 可刺激壁细胞和主细胞而促进胃酸、胃蛋白酶分泌, 具有营养胃黏膜及壁细胞群的作用; D细胞合成和分泌SS, 可抑制胃酸和胃蛋白酶分泌, 亦可抑制GAS释放, 二者在功能上相互协调, 共同维持着胃肠的生理功能.

素、胃壁屏障功能降低如十二指肠液反流、胃黏膜损伤因子等多因素综合作用所致^[9], 但公认的形成机制是各种致病因素的长期刺激或继发的宿主炎症反应, 导致胃黏膜深层损害和腺体的破坏, 使胃黏膜不能完全修复再生, 从而形成胃黏膜腺体萎缩和(或)肠化^[10]. 我们采用综合法造成胃黏膜的损害, 建立了稳定的大鼠CAG模型, 病理组织学显示, 黏液分泌减少, 腺体数目和腺体厚度降低, 黏膜肌层增厚, 固有膜中有炎性细胞的浸润, 说明综合法造模对胃黏膜的刺激因素已损害了胃黏膜屏障, 导致了大鼠胃黏膜腺体的萎缩.

壁细胞主要由胃黏膜腺体峡部的干细胞增

殖分化形成, 又称泌酸细胞, 主要分泌盐酸; 主细胞位于腺体基底部, 主要分泌胃蛋白酶原. 正常情况下, 二者共同参与了胃酸分泌和调节, 发挥其增强胃黏膜屏障机制的作用. 已有研究证实, CAG胃黏膜萎缩、胃液pH值增高的低酸状态与壁细胞数减少、盐酸分泌不足和主细胞数的降低、胃蛋白酶原分泌下降有关, 且超微结构研究显示壁细胞线粒体及主细胞溶酶体、高尔基体和酶原颗粒明显减少^[2-3,11]. 由于壁细胞数的减少及细胞内成分结构的改变, 使盐酸分泌下降, 导致酸性黏液减少, 削弱了胃黏膜屏障的保护作用. 有人研究表明, 壁细胞数的下降伴随胃底腺消失、干细胞增多、主细胞和颈黏液

■同行评价

本文通过模拟CAG发生的因素建立大鼠模型,观察胃黏膜病理组织学的改变和主、壁细胞、G、D细胞的变化以及外周血GAS、SS的水平,从细胞水平及胃肠激素的内分泌机制角度来阐述CAG发生的病理机制,具有先进性和科学性,实验研究的结果合理,有一定的理论价值。

细胞的减少而变化,壁细胞数的减少直接影响主细胞和颈黏液细胞的分裂和迁移^[12];同时,主细胞数的下降,胃蛋白酶原释放随之减少,且由于低酸环境使胃蛋白酶原转变为活性胃蛋白酶的能力减退,分解蛋白的作用随之下降,加重了胃黏膜营养的吸收障碍和腺体的萎缩。本研究结果CAG大鼠胃黏膜主、壁细胞较正常大鼠明显减少,证实了胃黏膜腺体主、壁细胞数的变化与CAG发病相关的病理机制。在人体胃窦部腺体中,亦散在分布着较多的内分泌G、D细胞,G细胞分泌GAS,以多种不同的分子形式,储存于血液、组织及胃肠液中,可刺激壁细胞和主细胞而促进胃酸、胃蛋白酶分泌,增加胃肠黏膜细胞的分裂增殖,增加DNA、RNA的合成及胃黏膜血流量,并具有营养胃黏膜及壁细胞群的作用^[4,13-14];D细胞合成和分泌SS,存在于胃肠壁神经丛、下丘脑、胃组织、胰液、胃肠液及血循环中,SS可抑制胃酸和胃蛋白酶分泌,亦可抑制GAS释放,二者在功能上相互协调,共同维持着胃肠的生理功能^[14-16]。有研究表明,G、D细胞密度与胃窦黏膜萎缩程度相关,随着胃黏膜腺萎缩程度的加重而明显减少,甚至有学者认为,G细胞计数是一项反映肠化生严重程度的敏感指标^[4]。本研究结果显示CAG大鼠G、D细胞数较正常大鼠明显减少,亦佐证了这一理论。

GAS是胃酸分泌的主要调节激素,由G细胞分泌,其分子量2100,是含有17个氨基酸的多肽,G细胞大部分位于胃窦腺体的颈部和基底部,部分位于十二指肠近端黏膜中,其分泌受多种因素的影响^[17]。GAS通过直接刺激壁细胞的胃泌素受体而刺激壁细胞分泌胃酸,也间接通过ECL细胞的胃泌素受体刺激ECL细胞释放组胺,再以旁分泌方式激活壁细胞H受体而使之泌酸,对胃黏膜具有营养和促增生作用^[18];GAS分泌受胃内pH、进食、胃内压变化、生长抑素和其他胃肠激素及交感神经兴奋等诸多因素的影响^[19],同时GAS分泌又可引起近端胃舒张、胃窦收缩的作用^[20]。而SS是一种对外分泌、内分泌、旁分泌及自分泌均起作用的调节肽^[21],对消化系统的生物学作用主要是抑制,抑制胃泌素等各种胃肠激素的分泌,亦可抑制胃肠运动和黏膜细胞的增生,减少胃肠道壁血流量,抑制胃酸、胃蛋白酶、胰液分泌。GAS可直接作用于D细胞而刺激SS分泌,而SS又可抑制GAS的分泌,二者间具有独特的区域性调节作用^[20]。但近年来对GAS、SS在CAG模型动物或患者外周

血中含量水平高低有不同的认识,其研究结果报道也不一致。就GAS而言,普遍认为,当胃窦黏膜发生进行性萎缩时,G细胞的减少,导致了GAS分泌下降,使其含量减少^[22-23];但也有学者认为,由于胃黏膜萎缩,胃酸分泌减少,可反馈性地作用于G细胞,刺激了GAS释放,使其含量增加^[24]。而对SS含量变化有不少研究表明,CAG外周血或胃黏膜中SS含量显著低于正常,SS含量下降的原因是D细胞数目减少,使其分泌SS减少所致;并发现随萎缩病变的加重,SS呈下降趋势^[19,25]。本研究显示,CAG大鼠血清GAS含量下降,与多数报道一致;而血浆SS含量增高,与相关报道不一,但与黄氏报道相同^[26-27]。本研究结果显示的D细胞减少,而血浆SS却增高的机制尚不十分清楚。从医学图像分析系统的灰度值来看,G、D细胞内GAS、SS的含量越高,免疫组化染色越深,则灰度值越大,反之越小^[28];也有人从D细胞形态学上观察证实,随着萎缩及肠化的加重,胞质内分泌颗粒也呈减少趋势^[29],因此,似乎可以说明,CAG大鼠胃黏膜内D细胞内SS含量较正常下降,但如何解释外周血中的SS增高现象?我们分析认为,可能是在CAG成模后的初期,由于D细胞的减少,脱颗粒的增加,通过反馈性的调节,促使D细胞反应性高功能,再通过内分泌形式,一过性地将SS释放到血液中,且SS含量的一过性增高导致G细胞受抑制加强,血清GAS下降,也加剧了CAG的发展;随着胃黏膜萎缩病变的加重,反馈性调节机制的失代偿,SS含量则进一步降低。这一认识尚有待于通过胃黏膜、胃液和外周血中SS含量对比的长期实验观察来进一步证实。

总之,由于模拟CAG发生的因素损伤胃黏膜屏障,使胃黏膜主、壁细胞减少,导致胃蛋白酶分泌和盐酸分泌下降;同时,由于G、D细胞的减少变化,导致了G、D细胞分泌GAS、SS异常,是大鼠CAG的发生和发展的重要原因之一。可以肯定,CAG的发生与主、壁细胞的损伤和泌酸功能下降及G、D细胞的减少变化导致GAS、SS等胃肠激素分泌异常的神经内分泌调节机制紊乱密切相关^[4,23,30]。

4 参考文献

- 1 萧树东. 江绍基胃肠病学. 上海: 上海科学技术出版社, 2001: 617
- 2 周平, 李和泉, 永田博司. 丹参提取物F对胃黏膜主细胞的保护作用. 中国病理生理杂志 1999;15: 931-933
- 3 Lacy ER, Cowart KS, King JS, DelValle J, Smolka AJ. Epithelial response of the rat gastric mucosa to

- chronic superficial injury. *Yale J Biol Med* 1996; 69: 105-108
- 4 周凡, 唐福康, 武一曼, 周维湛, 王若愚, 葛振华. 人慢性胃炎神经内分泌G、D 细胞关系的研究. *中国组织化学与细胞化学杂志* 2000; 9: 161-163
- 5 姒健敏, 吴加国, 曹倩, 项尊, 姜玲玲, 吕文, 黄怀德. 鼠慢性萎缩性胃炎模型的建立及致萎缩因素探讨. *中华消化杂志* 2001; 21: 75-79
- 6 Xiang Z, Si JM, Huang HD. Chronic gastritis rat model and role of inducing factors. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3212-3214
- 7 Genta RM. Atrophy and atrophic gastritis: one step beyond the Sydney system. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1998; 30 Suppl 3: S273-S275
- 8 殷健, 吴志强, 唐晓兰. 慢性萎缩性胃炎长期随访71例. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 634-635
- 9 萧树东. *江绍基胃肠病学*. 上海: 上海科技出版社. 2001: 358-360
- 10 姒健敏, 王良静, 陈淑洁, 朱方石, 钱云, 徐妙. 鼠慢性萎缩性胃炎胃黏膜形态特征和细胞增殖调控因子变化研究. *中华消化杂志* 2004; 24: 476-479
- 11 邓伟民, 梁超杨, 许春梅, 劳绍贤, 王宏伟. 消胀冲剂治疗大鼠慢性萎缩性胃炎的实验研究. *广州中医药大学学报* 1998; 15: 200-201
- 12 Karam SM. Cell lineage relationship in the stomach of normal and genetically manipulated mice. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31: 271-279
- 13 谢晶日, 沈林艳, 刘朝霞. 胃灵冲剂对大鼠慢性萎缩性胃炎黏膜G细胞及D细胞的影响. *中国中西医结合消化杂志* 2006; 14: 190-191
- 14 孙凤蓬, 宋于刚, 程蔚, 赵彤. 大鼠胃溃疡自愈过程中胃泌素、生长抑素与G、D细胞变化关系的研究. *中华消化杂志* 2002; 22: 57-58
- 15 Dick AC, Ardill J, Potts SR, Dodge JA. Gastrin, somatostatin and infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Acta Paediatr* 2001; 90: 879-882
- 16 姚永莉, 张万岱, 宋于刚. 脾虚证与微肠激素关系的研究. *世界华人消化杂志* 1997; 5: 728-729
- 17 温怀凯, 刘素霞. 胃癌患者血清Gastrin含量分析及临床意义. *放射免疫学杂志* 2006; 19: 9-11
- 18 范玉林, 杨建民, 罗元辉, 郭德玉, 刘广元. 慢性萎缩性胃炎患者幽门螺杆菌根除后胃黏膜G细胞数量和血清胃泌素含量的变化. *胃肠病学* 2005; 10: 93-96
- 19 孙凤蓬, 宋于刚, 覃汉荣. 胃溃疡大鼠胃泌素、生长抑素和G、D细胞的变化. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 363-366
- 20 莫剑忠, 王承党. 胃肠激素对胃运动的调节作用. *中华消化杂志* 2005; 25: 379-381
- 21 刘全忠. 生长抑素的表达与胃黏膜上皮癌变的关系. *中国中西医结合消化杂志* 2006; 14: 102-104
- 22 李红涛, 吴开春, 李彩宁, 乔泰东, 郭学刚, 王新, 郝志明, 宋瑛, 丁杰, 樊代明. 血清胃泌素对老年人慢性萎缩性胃炎的诊断. *中华老年医学杂志* 2004; 23: 238-410
- 23 任学军, 袁红霞, 杨曼. 胃二号方CAG大鼠胃泌素D细胞作用的研究. *辽宁中医杂志* 2001; 28: 316-317
- 24 郭昱, 郭霞, 姚希贤. 慢性萎缩性胃炎胃泌素、生长抑素、表皮生长因子、血管活性肠肽的测定及意义. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 531-534
- 25 李秋娟, 仲来福, 叶建新, 宋淑云. 大鼠实验性慢性萎缩性胃炎与胃黏膜生长抑素、胃泌素关系的研究. *大连医科大学学报* 1999; 21: 89-91
- 26 黄妙珍. 慢性萎缩性胃炎与表皮生长因子和生长抑素的相关性研究. *杭州医学高等专科学校学报* 2003; 24: 205-207
- 27 黄妙珍, 陈芝芸, 严茂祥, 项伯康. 补气养阴解毒方对慢性萎缩性胃炎大鼠表皮生长因子和生长抑素的影响. *浙江中医杂志* 2003; 38: 314-316
- 28 林静, 薄爱华, 姚希贤, 沈金库, 张林西, 刑立强, 戴洁, 夏冬. 胃泌素、生长抑素和5-羟色胺与慢性萎缩性胃炎病变关系的研究. *胃肠病学与肝病学杂志* 1996; 5: 270-274
- 29 宋于刚, 何燕萍, 刘晓霞, 赖卓胜. 幽门螺杆菌感染后胃窦部G、D细胞变化的研究. *解放军医学杂志* 2002; 27: 688-690
- 30 崔儒涛, 蔡淦, 杨秋泓. 养胃冲剂治疗慢性萎缩性胃炎的实验研究. *中国中医药学报* 1998; 13: 32

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 •

第五届中国百种杰出学术期刊评选揭晓

本刊讯 第五届中国百种杰出学术期刊评选日前揭晓, 周光召院士任主编的《科学通报》、韩启德院士任主编的《北京大学学报医学版》以及马连生任主编的《World Journal of Gastroenterology》等100种期刊入选“第五届中国百种杰出学术期刊”。中国科学技术信息研究所每年出版的《中国科技期刊引证报告》, 定期公布《中国科技论文与引文数据库》(CSTPCD)收录的中国科技核心期刊的十余项科学计量指标, 目前该数据库共收录中国科技核心期刊1652种。(记者 潘锋 2006-11-08)

DDFA方案对重症急性胰腺炎大鼠心肌细胞凋亡及Bax, Bcl-2表达的影响

陆正明, 方驰华, 朱明德, 史学深

■背景资料

重症急性胰腺炎(SAP)常并发多器官功能障碍(MODS),其胰外器官损伤中,心功能障碍(胰心综合征)较为常见,重型或出血坏死型胰腺炎出现休克高达22%,3.8%死于心功能不全,SAP时的心血管失代偿是导致病死率最高的并发症。DDFA已经临床证实对SAP有明显的治疗效果,但其治疗SAP的机制如何,是否通过调控细胞凋亡对SAP起治疗作用,对机体各重要脏器细胞凋亡是否有影响,在什么时间、用什么方式、什么剂量应用影响最大、效果最好,DDFA各药物间在影响细胞凋亡方面是否有协同或拮抗作用,进一步调整该方案、调整药物间的剂量组合是否有更好的效果,等等,这些问题都需要进行验证和探索。

陆正明, 方驰华, 朱明德, 史学深, 南方医科大学珠江医院肝胆外科 广东省广州市 510282

陆正明, 2003年南方医科大学硕士生, 主要从事肝胆胰外科疾病的研究。

通讯作者: 方驰华, 510282, 广东省广州市工业大道中, 南方医科大学珠江医院普外科. fch58520@sina.com

收稿日期: 2006-07-23 接受日期: 2006-09-28

Effects of DDFA on cardiac myocyte apoptosis and expression of Bax and Bcl-2 in rats with severe acute pancreatitis

Zheng-Ming Lu, Chi-Hua Fang, Ming-De Zhu, Xue-Shen Shi

Zheng-Ming Lu, Chi-Hua Fang, Ming-De Zhu, Xue-Shen Shi, Department of Hepatobiliary Surgery, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

Correspondence to: Chi-Hua Fang, Department of General Surgery, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China. fch58520@sina.com

Received: 2006-07-23 Accepted: 2006-09-28

Abstract

AIM: To explore the effects of DDFA (dexamethasone, dextran, 5-fluorouracil and apotininum) on the cardiac myocyte apoptosis and expression of Bax and Bcl-2 in rats with severe acute pancreatitis (SAP).

METHODS: A total of 45 rats were randomized into 3 groups: pseudo-operation group ($n = 15$), SAP group ($n = 15$) and DDFA treatment group ($n = 15$). SAP model was established by retrograde injection of 50 g/L sodium taurocholate solution into the bilio-pancreatic duct of rats. At the 6th, 12th and 18th hour after the establishment of models, blood cardiac troponin I (cTn I, $\mu\text{g/L}$) and creatine kinase isoenzyme MB (CK-MB, ngat/L) were determined. The myocardial tissues were collected for light microscopic observation, and myocyte apoptosis was determined by TUNEL method. The expression

of Bax and Bcl-2 was detected by SABC immunohistochemical staining.

RESULTS: The blood cTn I (6 h: 2.14 ± 0.09 vs 0.18 ± 0.07 ; 12 h: 3.30 ± 0.25 vs 0.20 ± 0.08 ; 18 h: 3.74 ± 0.42 vs 0.19 ± 0.08) and CK-MB (6 h: 7681 ± 252 vs 3389 ± 204 ; 12 h: 11576 ± 251 vs 2553 ± 205 ; 18 h: 12972 ± 458 vs 3522 ± 218) level, the myocyte apoptosis index (6 h: 5.73 ± 0.84 vs 0.99 ± 0.13 ; 12 h: 8.79 ± 0.68 vs 1.00 ± 0.44 ; 18 h: 14.09 ± 1.22 vs 1.02 ± 0.32), and the expression of Bax (6 h: 4.42 ± 1.05 vs 1.03 ± 0.13 ; 12 h: 7.39 ± 0.38 vs 1.08 ± 0.13 ; 18 h: 8.51 ± 1.07 vs 1.02 ± 0.12) and Bcl-2 (12 h: 1.83 ± 0.18 vs 1.11 ± 0.11 ; 18 h: 3.31 ± 0.75 vs 1.02 ± 0.12) were significantly higher in SAP group than those in pseudo-operation group ($P < 0.01$), and the damages of myocardial tissues were observed. However, after DDFA treatment, the blood cTn I (6 h: 0.87 ± 0.06 ; 12 h: 1.73 ± 0.12 ; 18 h: 2.48 ± 0.34) and CK-MB (6 h: 5858 ± 232 ; 12 h: 8275 ± 257 ; 18 h: 8975 ± 430) level, the myocyte apoptosis index (6 h: 2.44 ± 0.27 ; 12 h: 5.93 ± 0.39 ; 18 h: 8.75 ± 0.66), and Bax expression (6 h: 3.05 ± 0.87 ; 12 h: 6.46 ± 0.36 ; 18 h: 6.97 ± 1.04) were significantly decreased ($P < 0.05$), while Bcl-2 expression (6 h: 3.05 ± 0.87 ; 12 h: 4.86 ± 0.46 ; 18 h: 4.53 ± 1.04) was increased ($P < 0.05$). Meanwhile, the pathological changes of myocardial tissues were relieved. The apoptosis of myocytes was positively correlated with blood level of CK-MB and cTn I ($r = 0.812$, $P < 0.05$; $r = 0.807$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Myocyte apoptosis and Bax and Bcl-2 expression may be involved in the pathogenesis of SAP. DDFA administration in the early stage is helpful for reducing the severity of myocardial injury and improving the prognosis of SAP.

Key Words: Severe acute pancreatitis; Myocardium; Apoptosis; DDFA

Lu ZM, Fang CH, Zhu MD, Shi XS. Effects of DDFA on cardiac myocyte apoptosis and expression of Bax and Bcl-2 in rats with severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(34):3268-3272

摘要

目的: 探讨DDFA方案对重症急性胰腺炎(SAP)大鼠心肌细胞凋亡及Bax、Bcl-2基因表达的影响。

方法: SD大鼠45只随机分为假手术组、SAP组和DDFA治疗组(DDFA: 地塞米松、低分子右旋糖酐、5-氟脲嘧啶、抑肽酶)大鼠SAP模型采用0.05牛磺胆酸钠逆行胆胰管注射法建立, 建模后6, 12, 18 h时测定血心肌肌钙蛋白I (cTn I, $\mu\text{g/L}$)和肌酸激酶同工酶(CK-MB, ngat/L), 光镜观察心肌组织病理变化, TUNEL法测定心肌细胞凋亡指数(AI), SABC免疫组化染色法测定心肌Bax和Bcl-2基因表达。

结果: SAP组血cTn I (6 h: 2.14 ± 0.09 vs 0.18 ± 0.07 ; 12 h: 3.30 ± 0.25 vs 0.20 ± 0.08 ; 18 h: 3.74 ± 0.42 vs 0.19 ± 0.08), CK-MB (6 h: 7681 ± 252 vs 3389 ± 204 ; 12 h: 11576 ± 251 vs 2553 ± 205 ; 18 h: 12972 ± 458 vs 3522 ± 218)和心肌细胞凋亡指数(6 h: 5.73 ± 0.84 vs 0.99 ± 0.13 ; 12 h: 8.79 ± 0.68 vs 1.00 ± 0.44 ; 18 h: 14.09 ± 1.22 vs 1.02 ± 0.32)、Bax(6 h: 4.42 ± 1.05 vs 1.03 ± 0.13 ; 12 h: 7.39 ± 0.38 vs 1.08 ± 0.13 ; 18 h: 8.51 ± 1.07 vs 1.02 ± 0.12)和Bcl-2(12 h: 1.83 ± 0.18 vs 1.11 ± 0.11 ; 18 h: 3.31 ± 0.75 vs 1.02 ± 0.12)表达较假手术组升高($P < 0.01$), 光镜下见心肌组织损害明显; 经DDFA治疗后, 血cTn I (6 h: 0.87 ± 0.06 ; 12 h: 1.73 ± 0.12 ; 18 h: 2.48 ± 0.34)、CK-MB(6 h: 5858 ± 232 ; 12 h: 8275 ± 257 ; 18 h: 8975 ± 430)和心肌细胞凋亡指数(6 h: 2.44 ± 0.27 ; 12 h: 5.93 ± 0.39 ; 18 h: 8.75 ± 0.66)、Bax表达(6 h: 3.05 ± 0.87 ; 12 h: 6.46 ± 0.36 ; 18 h: 6.97 ± 1.04)下降($P < 0.05$), 而Bcl-2表达(6 h: 3.05 ± 0.87 ; 12 h: 4.86 ± 0.46 ; 18 h: 4.53 ± 1.04)增强($P < 0.05$), 光镜下见心肌组织损害减轻。心肌细胞凋亡与血CK-MB、cTn I 呈正相关($r = 0.812$, $P < 0.05$; $r = 0.807$, $P < 0.05$)。

结论: 心肌细胞凋亡、Bax和Bcl-2表达参与SAP发病机制, 在SAP早期给予DDFA治疗对减轻心脏损害程度、改善预后是有益的。

关键词: 重症急性胰腺炎; 心肌; 细胞凋亡; DDFA方案

陆正明, 方驰华, 朱明德, 史学深. DDFA方案对重症急性胰腺炎大鼠心肌细胞凋亡及Bax, Bcl-2表达的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(34):3268-3272

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3268.asp>

www.wjgnet.com

0 引言

重症急性胰腺炎(SAP)常并发多器官功能障碍, 其胰外器官损伤中心功能障碍(胰心综合征)较为常见, 重型或出血坏死型胰腺炎出现休克高达22%, 3.8%死于心功能不全, SAP时的心血管失代偿是导致病死率较高的并发症之一^[1]。细胞凋亡在外科多种疾病的发生和转归中已受到越来越多的关注, Bax和Bcl-2是细胞凋亡的重要调控基因, 随着对SAP的发病机制过程的认识日趋深入, 人们越来越重视治疗过程中对重要脏器的保护。1997年方驰华 *et al*^[2]应用DDFA方案(D: 地塞米松, dexamethasone; D: 低分子右旋糖酐, dextran; F: 5-氟脲嘧啶, 5-fluorouracil; A: 抑肽酶, appotininum)治疗SAP取得明显效果, DDFA组较非DDFA组各项检测指标恢复快。我们利用SAP心脏损害大鼠模型, 探讨细胞凋亡和Bax, Bcl-2基因表达在SAP心脏损害发病机制中的作用以及应用DDFA治疗后的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠45只, 雌雄不限, 体质量250-300 g, 由南方医科大学实验动物中心提供。随机分成3组: 假手术组(SO组)15只; SAP组15只; DDFA治疗组15只。每组再分为6, 12, 18 h 3个时间点, 每个时间点分配5只大鼠。

1.2 方法 术前禁食不禁水12 h, SAP组用30 g/L戊巴比妥钠ip麻醉, 作上腹正中切口入腹, 近肝门处暂时夹闭胆总管, 于十二指肠降部找到胰胆管开口, 在对侧肠壁上选一无血管区, 用穿刺针扎穿肠壁, 将穿刺导管从针孔送入肠腔后穿入胰胆管内1 cm, 注入50 g/L牛磺胆酸钠(10 mL/kg)制备SAP模型(注射速度0.2 mL/min), 指压穿刺点, 查无漏胆, 逐层关腹。SO组仅行胰胆管穿刺操作, 不注射药物。DDFA组在SAP模型诱发后, 经股静脉注射地塞米松(0.5 mg/kg)+低分子右旋糖酐(40 mL/kg)+5-氟脲嘧啶(40 mg/kg)+抑肽酶(50 kU/kg)。造模后6, 12, 18 h等各时间点处死大鼠, 心脏穿刺抽血, 快速切取心脏, 测定各项指标。

1.2.1 全自动生化分析仪测定血CK-MB 采用放射免疫法测定cTn I。各心肌组织光镜标本以多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋、HE染色, 光镜观察。

1.2.2 心肌细胞凋亡的测定 采用DNA末端原位标记法(TUNEL法, 试剂盒购自武汉博士德公司)。切片常规脱蜡入水, 经30 mL/L H_2O_2 处理、蛋白酶K消化后, 加入TDT和Dig.dUTP 4℃过夜, 封闭后加生物素化抗地高辛抗体, 洗涤, 加

■研究前沿

细胞凋亡及凋亡相关基因是目前生物学领域的研究热点, 在外科多种疾病的发生和转归中已受到越来越多的关注。

■应用要点

本文拟通过动物实验解决这些问题中的一部分,以利于临床DDFA方案的进一步完善,并为此方案临床推广应用提供理论依据。

表 1 胰腺炎大鼠cTn I 和CK-MB(nkat/L)含量检测结果 (mean ± SD)

指标	组别	6 h	12 h	18 h
cTn I (μg/L)	SO	0.18 ± 0.07 ^b	0.20 ± 0.08 ^b	0.19 ± 0.08 ^b
	SAP	2.14 ± 0.09	3.30 ± 0.25	3.74 ± 0.42
	DDFA	0.87 ± 0.06 ^b	1.73 ± 0.12 ^a	2.48 ± 0.34 ^a
CK-MB (nkat/L)	SO	3389 ± 204 ^b	2553 ± 205 ^b	3522 ± 218 ^b
	SAP	7681 ± 252	11576 ± 251	12972 ± 458
	DDFA	5858 ± 232 ^a	8275 ± 257 ^a	8975 ± 430 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs SAP组.

表 2 胰腺炎大鼠心肌细胞凋亡指数、Bax及Bcl-2的表达 (mean ± SD)

指标	组别	6 h	12 h	18 h
AI	SO	0.99 ± 0.13 ^b	1.00 ± 0.44 ^b	1.02 ± 0.32 ^b
	SAP	5.73 ± 0.84	8.79 ± 0.68	14.09 ± 1.22
	DDFA	2.44 ± 0.27 ^b	5.93 ± 0.39 ^a	8.75 ± 0.66 ^b
Bax(PU)	SO	1.03 ± 0.13 ^b	1.08 ± 0.13 ^b	1.02 ± 0.12 ^b
	SAP	4.42 ± 1.05	7.39 ± 0.38	8.51 ± 1.07
	DDFA	3.05 ± 0.87 ^a	6.46 ± 0.36 ^a	6.97 ± 1.04 ^b
Bcl-2(PU)	SO	1.03 ± 0.13	1.11 ± 0.11 ^a	1.02 ± 0.12 ^b
	SAP	1.22 ± 0.14	1.83 ± 0.18	3.31 ± 0.75
	DDFA	3.05 ± 0.87 ^a	4.86 ± 0.46 ^b	4.53 ± 1.04 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs SAP组.

SABC, DAB显色, 光镜下计算心肌细胞凋亡指数 (apoptotic index, AI). AI计算方法: 细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞, 即凋亡细胞, 数5个高倍视野, 分别计算凋亡细胞数和总细胞数, $AI = \text{凋亡细胞数} / \text{总细胞数} \times 100\%$.

1.2.3 心肌细胞Bax, Bcl-2的测定 采用SABC免疫组化染色法(免疫组化试剂盒购自武汉博士德公司). 染色模式: 胞膜或胞质. 根据染色强度分为阳性(棕黄色): 弱阳性(浅黄色): 阴性(不着色). 各组切片均采用图像分析系统对免疫组化染色阳性反应产物进行定量分析. 取切片在光学显微镜下以相同倍数(40×10)随机选取10个视野, 利用图像分析系统分析阳性面积和阳性区域平均灰度值, 并将阳性面积和平均灰度值按文献方法^[3]换算成阳性单位(positive unit, PU), 以PU值大小代表阳性产物表达的多少.

统计学处理 采用SPSS10.0统计软件建立数据库, 均数比较用完全随机设计资料的方差分析, SO和DDFA组与SAP组间的比较用Dunnett T3法. 细胞凋亡与心功能损害的相关性用相关性分析 $P \leq 0.05$ 为差异有显著性意义.

2 结果

2.1 心脏组织病理学改变 SO组大体未见异常:

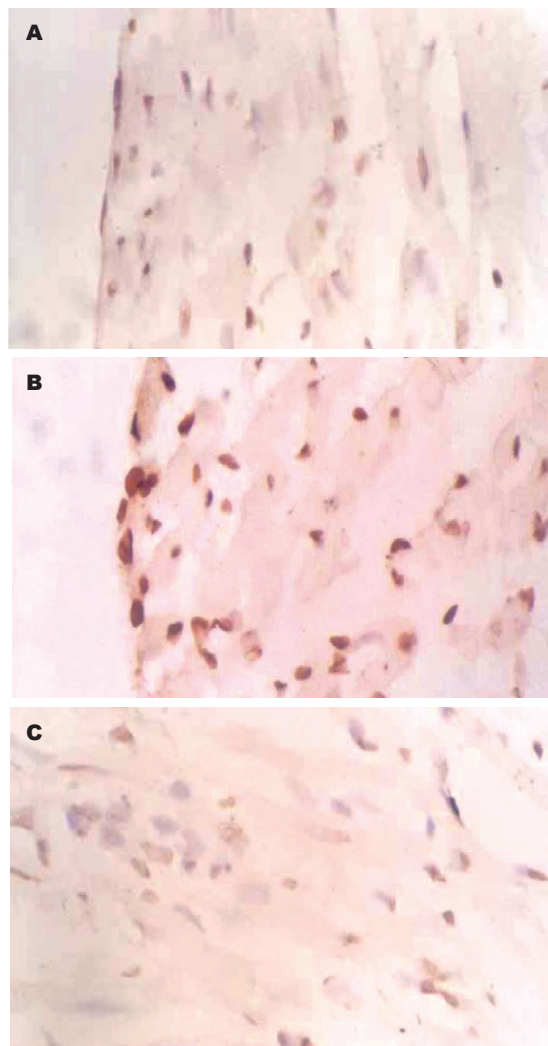


图 1 各组大鼠心肌细胞凋亡的检测结果(TUNEL × 400). A: SO组急性胰腺炎大鼠心肌细胞凋亡; B: SAP组18 h凋亡细胞明显增多; C: DDFA组18 h凋亡细胞较SAP组减少.

SAP组6 h时心脏水肿不明显; 12 h时心脏水肿, 可见血性胸水; 18 h时心脏水肿加重, 可见血性胸水; DDFA组各时间点心脏变化均较SAP组减轻. 光镜下SO组未见异常; SAP组18 h心肌细胞浊肿及肌间隙白细胞浸润加重, 肌束结构排列紊乱, 有少许心内膜下心肌出血; DDFA组各时间点镜下所见均较SAP组减轻.

2.2 血CK-MB及cTn I 的变化 SAP时血CK-MB及cTn I 明显升高, 且随着病程延长而逐渐增高; 应用DDFA治疗后, 血CK-MB及cTn I 下降, 但仍有随着病程延长而逐渐增高的趋势(表1).

2.3 心肌细胞凋亡和凋亡基因情况 SO组仅见极少量凋亡细胞, SAP组凋亡细胞明显增多, 凋亡指数升高, 并随着病程延长而逐渐增高, DDFA组凋亡指数较SAP组明显下降(图1, 表2). 心肌细胞凋亡与血CK-MB呈正相关($r = 0.812$, $P < 0.05$), 与cTn I 也呈正相关($r = 0.807$, $P < 0.05$).

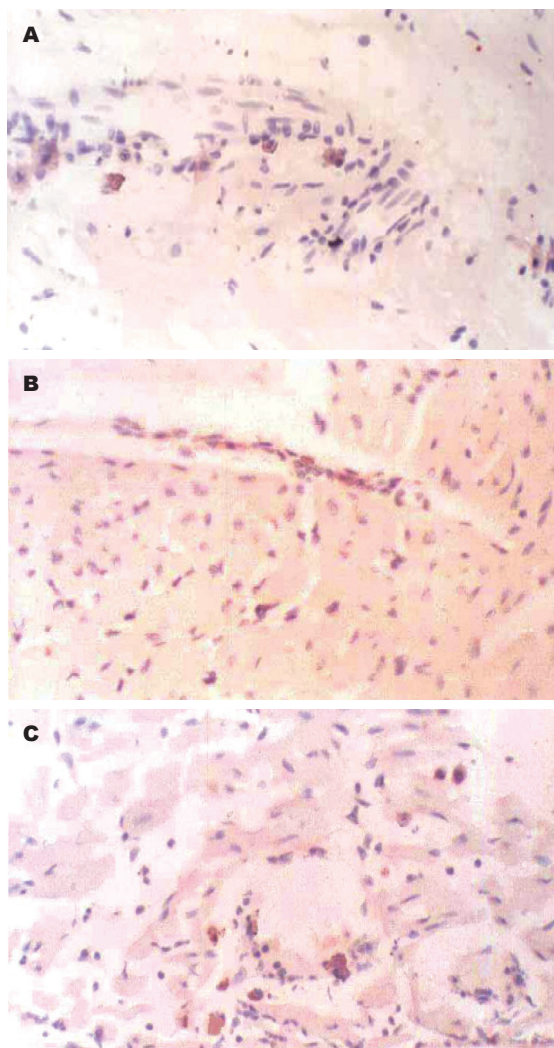


图 2 急性胰腺炎大鼠心肌Bax表达(SABC × 400). A: SO组表达较弱; B: SAP组18 h较SO组明显增强; C: DDFA组18 h较SAP组减弱.

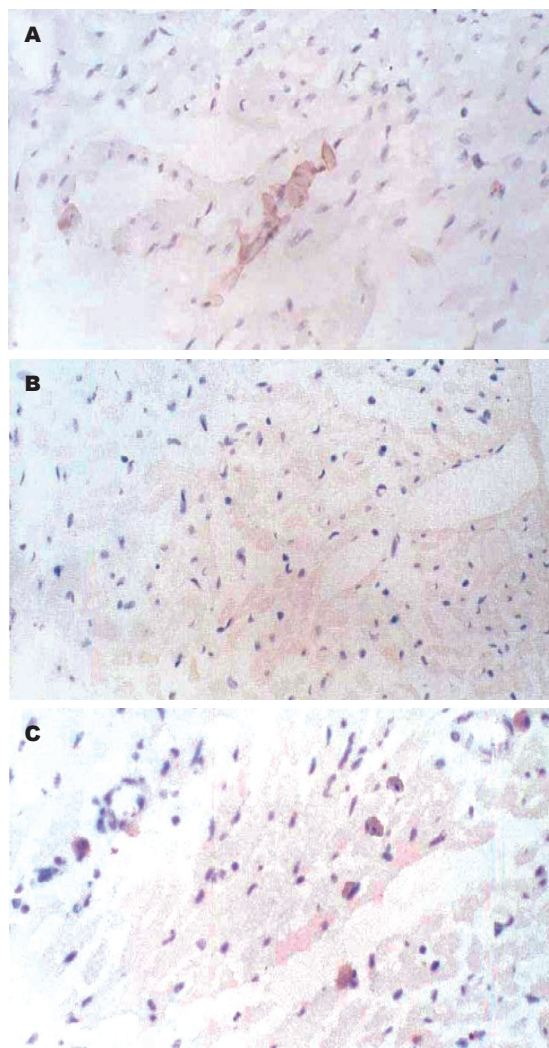


图 3 急性胰腺炎大鼠心肌Bcl-2表达(SABC × 400). A: SO组较弱; B: SAP组18 h较SO组增强; C: DDFA组18 h较SAP组进一步增强.

■同行评价

本文检测DDFA对重症急性胰腺炎(SAP)大鼠心肌细胞凋亡及Bax、Bcl-2表达的影响, 以此观察DDFA对SAP的治疗作用, 并就此阐明DDFA对SAP脏器保护作用的机制, 提供了有意义的信息, 内容较新, 具有一定的意义及价值.

SO组心肌Bax, Bcl-2的表达均很弱: SAP组两基因的表达均增强: DDFA组与SAP组比较, Bax表达明显下调, 而Bcl-2表达明显上调(图2-3, 表2).

3 讨论

缩短SAP病程及降低其死亡率的关键是防治多脏器功能损害. 因此, 探讨SAP心脏损伤及发生机制, 为其治疗提供新思路, 具有重要意义. 心肌酶可反映心肌细胞的完整性, CK-MB绝大部分存在于心肌细胞质内, 心肌损害时可从心肌细胞逸出, 导致血清心肌酶的活性升高, 该酶是一种比较特异的酶, 对心肌疾病的特异性、敏感性较强, 心肌损伤时的阳性率达97.5%, 特异性达100%^[4], CK-MB是确定心肌损害的关键指标, 可作为判断心肌损伤程度的重要依据, 能早期敏感地反映心肌细胞受损的情况, CK-MB活性越高, 提示心肌损伤程度就越重. cTn I 是一

种肌肉收缩蛋白, 当心肌细胞受到损伤而细胞膜完整性遭到破坏时, 胞质内游离cTn I 迅速入血, 3-6 h即可在外周血测得其异常, 持续至伤后24 h, 因此可以早期从血中检出, cTn I 敏感性和特异性较高, 这是因为cTn I 特异性分布于心肌, 是心肌特异性抗原, 其释放入血液循环是心肌损伤的高度敏感性和特异性标志^[5].

细胞凋亡是基因调控的细胞生理性死亡形式, 是一种主动、自发性的过程, 是目前生物学和医学界的研究热点. SAP时可出现胰腺细胞、肾细胞凋亡^[6-7]. 过去认为在终末分化的成人细胞中如心肌细胞和神经元细胞并不发生细胞凋亡, 但是最近几年的研究发现, 心肌细胞在缺氧条件下培养以及体外缺血再灌注后的心肌都出现了细胞凋亡^[8]. 我们的观察结果发现, SAP大鼠心脏的细胞凋亡数明显增多, 凋亡指数增高, 凋亡发生部位与病理改变明显的部位吻合, 心

肌细胞凋亡指数与心功能的损害程度呈正相关,说明SAP心脏损伤至少部分是通过细胞凋亡机制引起的。SAP引起心肌细胞凋亡的机制可能是:(1)SAP早期低血容量、缺氧、疼痛和应激等可使心肌 β -肾上腺素能神经兴奋性增加:SAP大量渗液进入腹腔后,刺激腹腔神经丛反射性引起包括冠状动脉在内的广泛血管痉挛,导致心肌缺血缺氧,而心肌在缺血缺氧条件下可出现细胞凋亡;(2)SAP时产生大量氧自由基,其细胞毒作用的重要机制之一就是诱导细胞凋亡:而凋亡相关基因Bcl-2基因的蛋白表达产物,定位于氧自由基产生的核膜、内质网和线粒体膜,这一分布与防止脂质过氧化的功能密切相关^[9];(3)SAP时白细胞过度激活发生瀑布效应,产生包括TNF- α 在内的大量细胞因子:同时肠道细菌移位导致内毒素血症,内毒素血症一方面可刺激血清TNF- α 升高,一方面可直接诱导心肌组织产生TNF- α 。Kapadia *et al*^[10]证明在内毒素的刺激下心脏心肌细胞和巨噬细胞几乎产生同样多的TNF- α ;而血清和心肌自身产生的TNF- α ,均可通过鞘氨醇依赖的机制诱导心肌细胞凋亡^[11]。细胞凋亡是受基因调控的,在调控细胞凋亡的基因中,Bcl-2家族是最受重视者之一,其中Bcl-2蛋白是最重要的凋亡抑制基因,Bax也是Bcl-2基因家族成员,他的功能与Bcl-2相反,主要是促进细胞凋亡。我们的实验发现,SAP时心肌Bax基因表达明显上升,并且随病程延长而逐渐增高,Bcl-2的表达也有所上升,但幅度相对较小,可能是机体代偿所致。而应用DDFA治疗后,Bax基因表达明显下调,而Bcl-2基因表达明显上调。

总之,SAP时随着心肌凋亡细胞数增多,心

功能进一步恶化,DDFA可明显改善心脏功能,并能调节Bcl-2和Bax基因,减少心肌细胞凋亡,因此认为,DDFA对心功能的保护作用可能部分是通过调节凋亡相关基因Bax和Bcl-2从而影响细胞凋亡实现的。

4 参考文献

- 1 郭金武,刘玉海,王艳.急性胰腺炎合并心脏改变-胰心综合征.中国综合临床 2001; 17: 761
- 2 方驰华,雷海录,戴永贵,邓明福. DDFA治疗重症急性胰腺炎的临床研究. 中华实验外科杂志 1997; 4 : 213-214
- 3 申洪. 免疫组织化学染色定量方法研究. 中国组织化学与细胞化学杂志 1995; 4: 89-91
- 4 许绍华,王受华,扬宗岳. CK-MB试剂盒研制和临床应用8 a评价. 上海医学检验杂志 1991; 6: 128-129
- 5 何淑莉,姚创利,李建平,刘雅. 心肌肌钙蛋白 I 在AMI诊断中的应用. 实用医技杂志 2005; 12: 2516-2518
- 6 吴彪,王春友. 细胞凋亡在实验性急性胰腺炎发病中的作用. 中国普通外科杂志 2004; 13: 732-735
- 7 朱明德,方驰华,史学深. 重症胰腺炎肾损伤中细胞凋亡相关基因的作用. 世界华人消化杂志 2005; 13 : 2103-2107
- 8 陈维,时开网,刘训良. 重症急性胰腺炎早期合并心肌损害与心肌细胞凋亡关系的实验研究. 胰腺病学 2004; 4: 167-169
- 9 Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 1992; 80: 879-886
- 10 Kapadia S, Lee J, Torre-Amione G, Birdsall HH, Ma TS, Mann DL. Tumor necrosis factor- α gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. *J Clin Invest* 1995; 96: 1042-1052
- 11 Krown KA, Page MT, Nguyen C, Zechner D, Gutierrez V, Comstock KL, Glembotski CC, Quintana PJ, Sabbadini RA. Tumor necrosis factor α -induced apoptosis in cardiac myocytes. Involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death. *J Clin Invest* 1996; 98: 2854-2865

电编 李琪 编辑 潘伯荣

中性粒细胞趋化因子在急性胰腺炎相关急性肺损害中的作用

徐岷, 周国雄, 张尤历, 张建新, 何亚龙, 黄介飞, 张弘, 魏群

徐岷, 张尤历, 何亚龙, 江苏大学附属医院消化内科 江苏省镇江市 212001

周国雄, 黄介飞, 张弘, 魏群, 南通大学附属医院消化内科 江苏省南通市 226001

张建新, 江苏大学附属医院普外科 江苏省镇江市 212001

徐岷, 2005年南通大学硕士, 现在上海第二军医大学长海医院消化内科攻读博士学位, 主治医师, 主要从事胰腺疾病的基础和临床研究。

通讯作者: 周国雄, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院消化内科. zhouguoxiong@pub.nt.jsinfo.net

收稿日期: 2006-08-01 接受日期: 2006-09-28

Role of cytokine-induced neutrophil chemoattractant in acute lung injury during acute pancreatitis

Min Xu, Guo-Xiong Zhou, You-Li Zhang, Jian-Xin Zhang, Ya-Long He, Jie-Fei Huang, Hong Zhang, Qun Wei

Min Xu, You-Li Zhang, Ya-Long He, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China

Guo-Xiong Zhou, Jie-Fei Huang, Hong Zhang, Qun Wei, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Jian-Xin Zhang, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Dr. Guo-Xiong Zhou, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. zhouguoxiong@pub.nt.jsinfo.net

Received: 2006-08-01 Accepted: 2006-09-28

Abstract

AIM: To investigate the role of cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) in the pathogenesis of acute lung injury (ALI) during acute pancreatitis (AP).

METHODS: AP model was induced by intraperitoneal injection of cerulein or retrograde infusion of 50 g/L sodium taurocholate into the bili-pancreatic duct in Sprague Dawley rats. A total of 84 rats were randomly divided into 4 groups: cerulein group, saline control group, sodium taurocholate group and operational

control group. The level of serum amylase, the pulmonary dry/wet weight ratio and histological changes were measured at different time points in each group. The expression of pulmonary CINC protein and mRNA were detected by immunohistochemistry and semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), respectively.

RESULTS: No significant difference was found between cerulein group and saline control group at different time points ($P > 0.05$). In comparison with those in operational control group, the level of serum amylase and pulmonary dry/wet weight ratio were significantly higher in sodium taurocholate group 1 h after operation ($P < 0.01$), and the expression of pulmonary CINC mRNA started to increase at the 1st h after operation (1 h: 0.23 ± 0.07 vs 0.07 ± 0.04 , $P < 0.05$; 3 h: 0.36 ± 0.07 vs 0.06 ± 0.04 , $P < 0.05$; 6 h: 0.56 ± 0.07 vs 0.09 ± 0.05 , $P < 0.01$; 12 h: 0.49 ± 0.09 vs 0.11 ± 0.03 , $P < 0.01$). The expression of pulmonary CINC protein was detected at 3rd h after operation, and then up-regulated gradually. Moreover, the expression of CINC was correlated with pulmonary histological changes.

CONCLUSION: CINC plays an important role in the pathogenesis of ALI during AP.

Key Words: Acute pancreatitis; Acute lung injury; Neutrophil chemoattractant; Immunohistochemistry; Semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction

Xu M, Zhou GX, Zhang YL, Zhang JX, He YL, Huang JF, Zhang H, Wei Q. Role of cytokine-induced neutrophil chemoattractant in acute lung injury during acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(34):3273-3277

摘要

目的: 探讨中性粒细胞趋化因子(CINC)在急性胰腺炎相关的急性肺损害(ALI)中的作用。

方法: 分别采用ip雨蛙肽和胰胆管逆行注射

■背景资料

急性胰腺炎发病率呈上升趋势,重症患者可出现休克和腹膜炎,病情凶险,死亡率高。早期诊断、早期治疗仍然是临床难题。中性粒细胞趋化蛋白(CINC)在急性胰腺炎中所起的作用逐渐受到人们的重视。CINC在急性胰腺炎的发生和病情演变过程中起何种作用,及如何参与免疫介导的炎症反应尚不太清楚。CINC在胰腺炎相关的急性肺损害等并发症中所起作用研究甚少。

■创新盘点

本文用两种不同的方法分别建立大鼠MAP和SAP模型,采用免疫组化和RT-PCR等全面的检测在不同类型AP模型肺组织中CINC及其mRNA的表达情况。

50 g/L牛磺胆酸钠建立大鼠轻症、重症急性胰腺炎模型。84只SD大鼠随机分为雨蛙肽组、生理盐水组、牛磺胆酸钠组和手术对照组。分别检测各组不同时间点血清淀粉酶、肺干湿重比和肺组织病理学改变,用免疫组织化学法和半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测肺组织中CINC蛋白和CINC mRNA表达的变化情况。

结果:雨蛙肽组各时间点CINC蛋白和CINC mRNA的表达与生理盐水组无明显差异($P>0.05$);牛磺胆酸钠组与手术对照组相比,血清淀粉酶、肺干湿重比显著升高($P<0.05$),术后1 h肺组织CINC mRNA的表达开始升高(1 h: 0.23 ± 0.07 vs 0.07 ± 0.04 , $P<0.05$; 3 h: 0.36 ± 0.07 vs 0.06 ± 0.04 , $P<0.05$; 6 h: 0.56 ± 0.07 vs 0.09 ± 0.05 , $P<0.01$; 12 h: 0.49 ± 0.09 vs 0.11 ± 0.03 , $P<0.01$),术后3 h开始有CINC蛋白的表达,随着时间的延长表达逐渐增强,且与肺组织的病理改变呈正相关。

结论:CINC可能在胰腺炎相关的急性肺损害中起了重要的作用。

关键词:急性胰腺炎;急性肺损害;中性粒细胞趋化因子;免疫组化;半定量逆转录聚合酶链反应

徐岷, 周国雄, 张允历, 张建新, 何亚龙, 黄介飞, 张弘, 魏群. 中性粒细胞趋化因子在急性胰腺炎相关急性肺损害中的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(34):3273-3277
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3273.asp>

0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)相关的急性肺损伤(ALI)常常是AP并发全身炎症反应综合征(SIRS)在肺部的表现,严重者出现急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、多器官功能不全(MODS)。AP合并ALI,病情凶险,其病死率一般在40%-70%之间^[1-5]。本实验通过建立轻症急性胰腺炎(MAP)和重症急性胰腺炎(SAP)两种不同类型的AP模型,比较不同类型模型中肺组织CINC的表达变化情况,初步探讨CINC在AP相关的ALI中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂SD大鼠84只,清洁级,体质量 250 ± 30 g,由南通大学医学院动物实验中心提供。雨蛙肽(Cerulein)和牛磺胆酸钠为美国Sigma公司产品,兔抗大鼠GRO/CINC-1抗体为美国

Assay Designs公司产品,ABC免疫试剂盒为武汉博士德公司产品,RT-PCR一步法试剂盒为芬兰Finnzymes公司产品。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立 (1)MAP模型:雨蛙肽组和生理盐水组各18只大鼠,禁食12 h和禁水6 h后,雨蛙肽组大鼠给予ip雨蛙肽(浓度10 mg/L,剂量20 μ g/kg)每小时一次,连续注射5次。分别随机选取6只大鼠在第1次注射后6, 12, 24 h予安乐死,心脏穿刺抽取血液3-5 mL,4℃ 3000 g离心15 min,离心后取血清,在-70℃中保存;取部分左肺组织用40 g/L中性甲醛固定24-48 h,石蜡包埋;部分左肺组织立即放入-70℃中保存。生理盐水组给予ip与雨蛙肽组等量的无菌生理盐水,标本采集同雨蛙肽组;(2)SAP模型:牛磺胆酸钠组和手术对照组各24只大鼠,大鼠术前禁食12 h和禁水6 h,用20 g/L戊巴比妥钠(50 mg/kg) ip麻醉,腹部皮肤消毒,正中切口进腹,胰胆管近端用无损伤金属夹夹闭,向十二指肠开口方向插入注射器针头,以0.1 mL/min的速度向胰胆管内注射50 wg/L牛磺胆酸钠,剂量为1 mL/kg,5 min后拔除注射针头,松开金属夹,缝合关腹。手术对照组仅向胰胆管注射与牛磺胆酸钠组等量的无菌生理盐水。分别随机选取6只大鼠在术后1, 3, 6, 12 h予安乐死,标本采集同前。

1.2.2 标本处理 (1)血清淀粉酶测定:采用酶法,由美国Vitros-250型全自动生化分析仪测定;(2)肺组织病理学检查:肺组织常规包埋切片,HE染色后行光镜观察;(3)肺干湿重比测定:取大鼠的右肺组织,拭去血迹后称重,所得数值为湿重。将肺组织放入60℃烤箱内72 h,取出称重,所得数值为干重。肺干湿重比为肺湿重/肺干重,反应肺组织水肿程度。

1.2.3 免疫组织化学检测 石蜡包埋的组织标本4 μ m连续切片,常规脱蜡,30 mL/L的H₂O₂阻断内源性过氧化物酶,微波抗原修复,三羟甲基氨基甲烷缓冲液(TBS)漂洗后,与兔抗大鼠GRO/CINC-1抗体(工作浓度为1:50)孵育,用TBS代替一抗作为空白对照,再次TBS液漂洗,用生物素化羊抗兔IgG二抗孵育,再以TBS液漂洗,并以0.5 g/L DAB-H₂O₂显色,最后苏木素衬染及封片。

1.2.4 RT-PCR检测 采用TRIzol试剂提取肺组织总RNA,根据GenBank中基因序列自行设计引物(表1),由上海生工生物工程公司合成。PCR循环条件:55℃ RT反应45 min;92℃预变性2 min;92℃, 30 s, 55℃, 30 s, 72℃, 1 min;循环40次;

表 1 PCR扩增的引物序列及扩增片段的大小

基因	GenBank_ID	引物序列	产物 (bp)
CINC	NM_030845	5'- ATCGATGGTCGTTCAATTCC-3' 5'- GGCATTGTGCCCTACAAACT-3'	310
GAPDH	X02231	5'- ATGGGAAGCTGGTCATCAAC-3' 5'- TTCAGCTCTGGGATGACCTT-3'	484

■应用要点

本文有助于AP发病机制的认识,为进一步阻断CINC治疗SAP提供理论依据,为临床检测患者血液中CINC水平,判断AP的严重程度及判断预后提供一个新的指标。

表 2 雨蛙肽组和生理盐水组大鼠血清淀粉酶、肺干湿重比和肺组织CINC mRNA(mean ± SD, $n = 6$)

	6 h		12 h		24 h	
	生理盐水	雨蛙肽	生理盐水	雨蛙肽	生理盐水	雨蛙肽
血清淀粉酶 (nkat/L)	33423 ± 3517	362022 ± 38991 ^b	50277 ± 4834	176119 ± 40125 ^b	42225 ± 7735	52694 ± 10819
肺干湿重比	3.88 ± 0.23	3.97 ± 0.36	3.89 ± 0.21	3.89 ± 0.29	3.86 ± 0.26	3.82 ± 0.40
CINC mRNA	0.10 ± 0.04	0.18 ± 0.04	0.13 ± 0.03	0.07 ± 0.03	0.08 ± 0.03	0.09 ± 0.04

^b $P < 0.01$ vs 相同时间点生理盐水组。

72℃延伸5 min, 反应体系为50 μL。PCR产物在17 g/L凝胶上作电泳观察结果, 用凝胶图像扫描仪测定光密度值, 以GAPDH为内参照, 半定量测定CINC mRNA的表达情况。

统计学处理 实验数据均用mean ± SD表示, 用STATA 7.0统计软件, t 检验对两组均数进行显著性检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 血清淀粉酶结果 雨蛙肽组6 h淀粉酶明显升高, 12 h明显下降, 24 h已基本降至正常水平。6 h和12 h淀粉酶均高于生理盐水组, 有显著性差异($P < 0.01$, 表2)。牛磺胆酸钠组术后1 h淀粉酶与手术对照组相比明显升高, 术后6 h达到高峰, 术后12 h稍有下降。相同时间点牛磺胆酸钠组血清淀粉酶均高于手术对照组, 有显著性差异($P < 0.01$, 表3)。

2.2 肺组织病理学改变 肉眼观察: 雨蛙肽组、生理盐水组和手术对照组各时间点大鼠肺组织均未见异常。牛磺胆酸钠组术后1, 3 h肺组织亦未见异常; 术后6 h可见肺充血水肿, 术后12 h胸腔有积液, 肺水肿加剧, 暗红色肺表面可见散在小出血点; 显微镜观察: 雨蛙肽组、生理盐水组和手术对照组各时间点镜下未见异常。牛磺胆酸钠组术后3 h开始可见肺泡间质水肿, 少量炎性细胞浸润, 术后6 h见肺泡间隔明显增厚, 肺充血伴炎性细胞浸润, 术后12 h见肺泡内有明显出血, 肺泡间隔增宽, 灶性或片状肺不张, 大量炎性细胞浸润, 以中性粒细胞为主。

2.3 肺干湿重比 雨蛙肽组各时间点的肺干湿重比与生理盐水组相比差异无显著性($P > 0.05$, 表2)。牛磺胆酸钠组术后1 h的肺干湿重比与手术对照组相比差异亦无显著性($P > 0.05$), 而牛磺胆酸钠组术后3-12 h的肺干湿重比均较手术对照组明显增高, 有显著性差异($P < 0.01$, 表3)。

2.4 免疫组织化学染色 雨蛙肽组和生理盐水组各时间点均未见CINC蛋白的表达。手术对照组亦未见CINC蛋白的表达(图1A), 牛磺胆酸钠组术后3 h开始有CINC蛋白的表达, 随着时间的延长肺泡细胞中CINC蛋白的表达逐渐增强, 术后12 h表达情况与术后6 h类似(图1B)。

2.5 逆转录聚合酶链反应 雨蛙肽组和生理盐水组之间不同时间点肺组织CINC mRNA表达无显著差异($P > 0.05$, 图2, 表2)。牛磺胆酸钠组不同时间点肺组织CINC mRNA表达均高于手术对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且表达随时间变化逐渐增强(图3, 表3)。

3 讨论

SAP并发MODS的机制尚不清楚, 在所有的SAP并发MODS的患者中, 都可以观察到不同程度的ALI或ARDS^[6], 说明SAP早期诱发SIRS/MODS过程中, 肺脏常常是首先受损的靶器官^[7]。ARDS、急性肾衰等是SAP致死的主要原因, 约60%患者1 wk内死亡原因与胰腺炎相关的ALI有关。趋化因子(cwhemokine)是细胞因子超家族成员中一类具有白细胞趋化作用的小分子蛋白多肽, 分为CXC, CC, C和CX3C 4大类。大鼠的

■名词解释

1 趋化因子是细胞因子超家族成员中一类小分子蛋白多肽(8-10 kDa),其氨基酸组成具有特异的半胱氨酸(Cys),根据其半胱氨酸排列位置的不同分为CXC、CC、C、CX3C四类,主要生物学作用包括细胞的迁移、创伤的愈合、Th1/Th2细胞的发育、血管形成、肿瘤的生长和转移、感染、淋巴器官的发育、树突状细胞的成熟等。

2 中性粒细胞趋化因子(CINC)是含ELR的CXC类趋化因子,主要由激活的单核细胞、内皮细胞、成纤维细胞产生,受体是CXCR2,介导中性粒细胞的趋化、脱颗粒及呼吸爆发。中性粒细胞趋化因子(CINC)、巨噬细胞炎症蛋白-2(MIP-2)与人的GRO- α 有相同的氨基酸序列,提示CINC、MIP-2是人类GRO- α 同源的趋化因子,功能类似于GRO- α 。

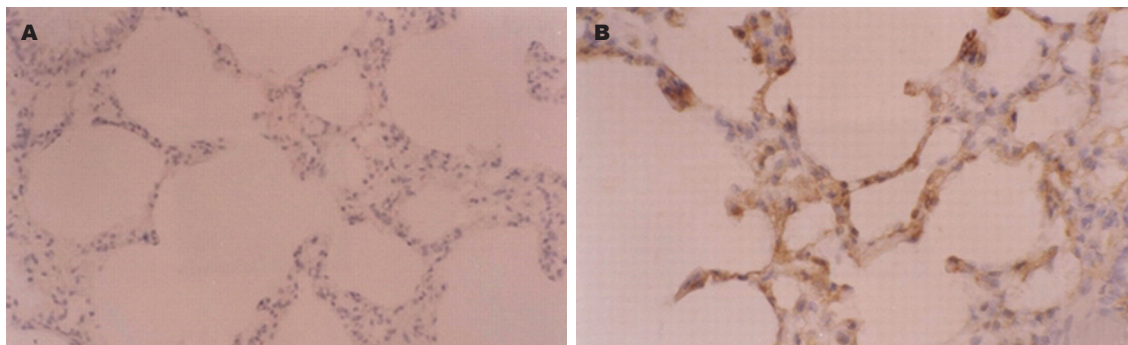


图1 免疫组织化学检测肺组织CINC蛋白的表达. A: 手术对照组12 h ($\times 250$); B: 牛磺胆酸钠组12 h ($\times 500$).

表3 牛磺胆酸钠组和手术对照组大鼠血清淀粉酶、肺干湿重比和肺组织CINC mRNA(mean \pm SD, $n = 6$)

	术后1 h		术后3 h		术后6 h		术后12 h	
	手术对照	牛磺胆酸钠	手术对照	牛磺胆酸钠	手术对照	牛磺胆酸钠	手术对照	牛磺胆酸钠
血清淀粉酶 (nkat/L)	43942 \pm 1950	69247 \pm 10385 ^b	57594 \pm 6951	156364 \pm 17203 ^b	43509 \pm 3417	207025 \pm 31923 ^b	33790 \pm 2784	165483 \pm 15770 ^b
肺干湿重比	3.89 \pm 0.25	3.97 \pm 0.21	3.96 \pm 0.21	4.31 \pm 0.25 ^b	3.83 \pm 0.19	4.74 \pm 0.38 ^b	3.80 \pm 0.22	4.93 \pm 0.39 ^b
CINC mRNA	0.07 \pm 0.04	0.23 \pm 0.07 ^a	0.06 \pm 0.04	0.36 \pm 0.07 ^a	0.09 \pm 0.05	0.56 \pm 0.07 ^b	0.11 \pm 0.03	0.49 \pm 0.09 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 相同时间点的手术对照组。

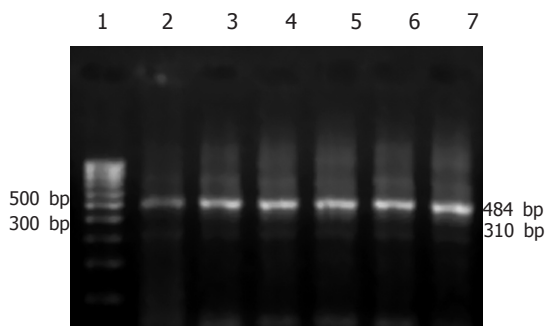


图2 雨蛙肽组和生理盐水组肺组织CINC mRNA的表达. 1: Marker; 2-4:雨蛙肽组6, 12, 24 h; 5-7: 生理盐水组6, 12, 24 h.

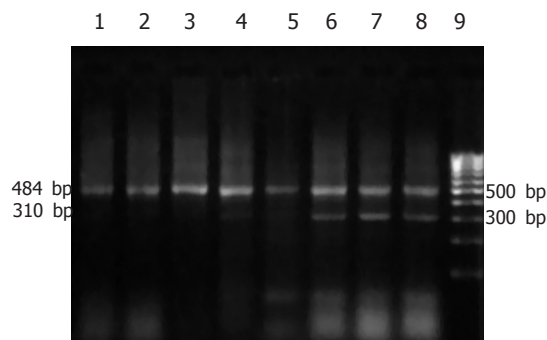


图3 牛磺胆酸钠组和手术对照组肺组织CINC mRNA的表达. 1-4: 手术对照组1, 3, 6, 12 h; 5-8: 牛磺胆酸钠组1, 3, 6, 12 h; 9: Marker.

CINC与人类生长相关基因蛋白- α (GRO- α)有相似的氨基酸序列,相当于人类含ELR的CXC类趋化因子GRO- α ,以趋化中性粒细胞为主。CINC与CXC受体2有高度的亲和力,该受体高度表达于中性粒细胞,促使他们黏附上皮细胞、通过血管壁迁移、组织入侵,产生氧自由基、脱颗粒和增加细胞内钙浓度,进一步扩大炎症反应^[8]。

趋化因子在急性重症胰腺炎中起了重要的作用^[9-12]。研究表明SAP患者血浆中含ELR的CXC类趋化因子GRO- α , ENA-78水平明显高于轻症患者,且上升较早,提示血浆CXC类趋化因子的高水平似乎与SAP引起的SIRS, MODS和早期高死亡率有关^[13-14]。本实验结果显示, SAP大鼠术后1 h肺组织即有CINC mRNA表达的升高,

术后3 h免疫组化显示CINC蛋白表达升高,同时肺干湿重比增大,且在12 h内逐渐升高;肺组织损伤程度以及肺干湿重比与CINC的表达呈正相关,而手术对照组、生理盐水组和MAP大鼠肺组织CINC几乎无表达,提示CINC的高表达可能是SAP发生ALI的原因之一,与国外的文献报道一致^[15]。

我们推测, SAP通过肺组织CINC的高表达趋化了炎症细胞加重了局部炎症,同时多形核白细胞(PMNs)在肺毛细血管聚集,激活肺泡巨噬细胞大量释放CINC, TNF- α , IL-8, 血小板活化因子(PAF)等炎症介质,两者互为因果关系,形成恶性循环,构成“第二次打击”,呼吸爆发、氧自由基、血小板聚集和微血栓形成造成

肺内皮细胞、肺实质细胞和脂膜的损害, 形成瀑布效应, 最终导致SIRS和MODS^[16-17]. Ulich *et al*^[18]研究表明用抗CINC抗体能阻断60%-70%的气管内滴入LPS所引起的肺部PMN浸润和局部炎症反应; Bhatia *et al*^[19]用绵羊抗CINC抗体处理雨蛙肽诱导的大鼠AP模型, 虽然对胰腺局部的损害没有明显作用, 但减轻了相关的急性肺损害. 因此, 我们可以尝试通过用中和趋化因子或阻断趋化因子受体来抑制急性胰腺炎早期趋化因子的活性减少有害的免疫应答, 避免炎症反应的进一步加重, 从而到达治疗急性胰腺炎和减少并发症的目的^[20].

4 参考文献

- 1 Beger HG, Rau B, Mayer J, Pralle U. Natural course of acute pancreatitis. *World J Surg* 1997; 21: 130-135
- 2 Neoptolemos JP, Raraty M, Finch M, Sutton R. Acute pancreatitis: the substantial human and financial costs. *Gut* 1998; 42: 886-891
- 3 McKay CJ, Evans S, Sinclair M, Carter CR, Imrie CW. High early mortality rate from acute pancreatitis in Scotland, 1984-1995. *Br J Surg* 1999; 86: 1302-1305
- 4 Appelros S, Borgstrom A. Incidence, aetiology and mortality rate of acute pancreatitis over 10 years in a defined urban population in Sweden. *Br J Surg* 1999; 86: 465-470
- 5 Shi C, Zhao X, Lagergren A, Sigvardsson M, Wang X, Andersson R. Immune status and inflammatory response differ locally and systemically in severe acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 472-480
- 6 Pearce CB, Zinkevich V, Beech I, Funjika V, Ruiz AG, Aladawi A, Duncan HD. Using the polymerase chain reaction coupled with denaturing gradient gel electrophoresis to investigate the association between bacterial translocation and systemic inflammatory response syndrome in predicted acute severe pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7142-7147
- 7 Mandell GL. ARDS, neutrophils, and pentoxifylline. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138: 1103-1105
- 8 Adams DH, Lloyd AR. Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet* 1997; 349: 490-495
- 9 Hotz HG, Reber HA. Acute pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterol* 1999; 15: 392
- 10 Sun J, Bhatia M. Blockade of neurokinin 1 receptor attenuates CC and CXC chemokine production in experimental acute pancreatitis and associated lung injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006
- 11 Sugita H, Yamaguchi Y, Ikei S, Yamada S, Ogawa M. Enhanced expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) by bronchoalveolar macrophages in cerulein-induced pancreatitis rats. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 154-160
- 12 Makhija R, Kingsnorth AN. Levels of the chemokines growth-related oncogene alpha and epithelial neutrophil-activating protein 78 are raised in patients with severe acute pancreatitis (Br J Surg 2002; 89: 566-72). *Br J Surg* 2002; 89: 1194
- 13 Shokuhi S, Bhatia M, Christmas S, Sutton R, Neoptolemos JP, Slavin J. Levels of the chemokines growth-related oncogene alpha and epithelial neutrophil-activating protein 78 are raised in patients with severe acute pancreatitis. *Br J Surg* 2002; 89: 566-572
- 14 Rau B, Baumgart K, Kruger CM, Schilling M, Beger HG. CC-chemokine activation in acute pancreatitis: enhanced release of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with local and systemic complications. *Intensive Care Med* 2003; 29: 622-629
- 15 Brady M, Bhatia M, Christmas S, Boyd MT, Neoptolemos JP, Slavin J. Expression of the chemokines MCP-1/JE and cytokine-induced neutrophil chemoattractant in early acute pancreatitis. *Pancreas* 2002; 25: 260-269
- 16 Liu XM, Liu QG, Xu J, Pan CE. Microcirculation disturbance affects rats with acute severe pancreatitis following lung injury. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6208-6211
- 17 Andican G, Gelisgen R, Unal E, Tortum OB, Dervisoglu S, Karahasanoglu T, Burcak G. Oxidative stress and nitric oxide in rats with alcohol-induced acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2340-2345
- 18 Ulich TR, Howard SC, Remick DG, Wittwer A, Yi ES, Yin S, Guo K, Welply JK, Williams JH. Intratracheal administration of endotoxin and cytokines. VI. Antiserum to CINC inhibits acute inflammation. *Am J Physiol* 1995; 268: L245-L250
- 19 Bhatia M, Brady M, Zagorski J, Christmas SE, Campbell F, Neoptolemos JP, Slavin J. Treatment with neutralising antibody against cytokine induced neutrophil chemoattractant (CINC) protects rats against acute pancreatitis associated lung injury. *Gut* 2000; 47: 838-844
- 20 Bhatia M, Hegde A. Treatment with antileukinate, a CXCR2 chemokine receptor antagonist, protects mice against acute pancreatitis and associated lung injury. *Regul Pept* 2006

电编 李琪 编辑 王晓瑜

肝硬化患者外周血单核细胞表面TLR4和TLR2表达的临床意义

苟艳子, 连建奇, 聂青和, 庄严, 刘清泉, 邵彬

■背景资料

Toll样受体(TLR)是天然免疫中重要的模式识别分子, 均与抗感染有关, 近年来成为很多学科的研究热点. 在人单核细胞表面表达的TLR主要有TLR4、TLR2家族成员. TLR2主要参与抗革兰阳性菌免疫应答, TLR4主要参与抗革兰阴性菌的免疫应答. TLR4通过识别LPS与CD14复合物, 从而获取革兰阴性细菌感染的信息, 启动LPS信号途径, 因此TLR4又称作革兰阴性细菌感染的传感器. 肝硬化是一种严重威胁人类健康的疾病, 其并发症较多, 而SBP是常见而且危险较大的并发症. 探讨肝硬化患者外周血中单核细胞(PBMC)表面TLR2、TLR4表达与肝硬化患者细菌感染关系有重要意义.

苟艳子, 连建奇, 聂青和, 庄严, 刘清泉, 邵彬, 第四军医大学唐都医院传染科、全军感染病诊疗中心 陕西省西安市710038

苟艳子, 第四军医大学硕士, 主治医师, 主要从事传染病学基础与临床研究.

中华肝炎防治基金会基金, No. 2006ALBPA1

通讯作者: 连建奇, 陕西省西安市, 第四军医大学唐都医院传染科、全军感染病诊疗中心, lianjq@fmmu.edu.cn

电话: 029-84777853 传真: 029-83537377

收稿日期: 2006-07-28 接受日期: 2006-08-22

Clinical significance of Toll-like receptor 4 and 2 expression on the surface of peripheral blood mononuclear cells in patients with liver cirrhosis

Yan-Zi Gou, Jian-Qi Lian, Qing-He Nie, Yan Zhuang, Qing-Quan Liu, Bin Shao

Yan-Zi Gou, Jian-Qi Lian, Qing-He Nie, Yan Zhuang, Qing-Quan Liu, Bin Shao, Center of Diagnosis and Treatment for Infectious Diseases of Chinese PLA, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China

Supported by the Fund for Hepatitis Prevention and Treatment of China, No. 2006ALBPA1

Correspondence to: Dr. Jian-Qi Lian, Center of Diagnosis and Treatment for Infectious Diseases of Chinese PLA, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China. lianjq@fmmu.edu.cn

Received: 2006-07-28 Accepted: 2006-08-22

Abstract

AIM: To explore the correlation of Toll-like receptor 4, Toll-like receptors 2 expression on the surface of peripheral blood mononuclear cells with bacterial infection in patients with liver cirrhosis, and observe the effect of antibiotics on PBMC expression of TLR4 and TLR2 in cirrhosis.

METHODS: Blood cells from a total of 42 patients (30 with ascites, 12 without ascites) with liver cirrhosis and 15 normal controls were stained with fluorescent labeling anti-TLR2/anti-TLR4/anti-CD14 monoclonal antibodies. Samples were collected and analyzed for three-color immunofluorescence by flow cytometry.

RESULTS: The expression of TLR4 and TLR2 were significantly higher in patients with ascites than those in the controls (TLR4: 22.28 ± 0.80 vs 14.45 ± 3.23 , $P < 0.05$; TLR2: 47.65 ± 0.75 vs 24.40 ± 2.77 , $P < 0.05$), and marked difference also existed before and after treatment (TLR4: 28.58 ± 0.79 vs 12.37 ± 0.35 , $P < 0.05$; TLR2: 47.79 ± 0.76 vs 17.22 ± 2.48 , $P < 0.05$). TLR4 and TLR2 expression were notably increased in patients with ascites as compared with those in ones without ascites (TLR2: 25.37 ± 1.62 ; TLR4: 14.81 ± 0.29) ($P < 0.05$), and they were not significantly different between patients without ascites and normal controls ($P > 0.05$).

CONCLUSION: PBMC expression of TLR4 and TLR2 are up-regulated in patients with liver cirrhosis, and they can be down-regulated by antibiotics treatment.

Key Words: Toll-like receptor; Liver cirrhosis; Antibiotics; Flow cytometry; Monoclonal antibody

Gou YZ, Lian JQ, Nie QH, Zhuang Y, Liu QQ, Shao B. Clinical significance of Toll-like receptor 4 and 2 expression on the surface of peripheral blood mononuclear cells in patients with liver cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(34):3278-3283

摘要

目的: 探讨肝硬化患者外周血中单个核细胞(PBMC)表面Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)、TLR2表达与肝硬化患者细菌感染关系, 观察抗生素治疗对TLR4与TLR2表达的影响.

方法: 采用三色荧光染色法, 荧光素标记的抗TLR2/抗TLR4/抗CD14 mAb对42例肝硬化患者及正常人的血液单核细胞表面TLR2、TLR4及CD14分子进行免疫荧光染色, 应用流式细胞仪检测.

结果: 肝硬化腹水组TLR2和TLR4表达($n = 30$, TLR2, 47.65 ± 0.75 ; TLR4, 22.28 ± 0.80)与正常对照组($n = 15$, TLR2, 24.40 ± 2.77 ; TLR4,

14.45±3.23)比较具有显著性差异($P<0.05$), 肝硬化腹水患者治疗前($n=20$, TLR2, 47.79±0.76; TLR4, 28.58±0.79)和治疗后($n=20$, TLR2, 17.22±2.48; TLR4, 12.37±0.35)比较具有显著性差异($P<0.05$); 肝硬化腹水患者与肝硬化无腹水患者组($n=12$, TLR2, 25.37±1.62; TLR4, 14.81±0.29)比较具有显著性差异($P<0.05$); 肝硬化无腹水患者组与正常对照组比较无显著性差异($P>0.05$).

结论: 肝硬化腹水患者TLR4与TLR2的表达显著上调, 抗生素治疗后显著下调.

关键词: Toll样受体; 肝硬化; 抗生素; 流式细胞术; 单克隆抗体

苟艳子, 连建奇, 聂青和, 庄严, 刘清泉, 邵彬. 肝硬化患者外周血单核细胞表面TLR4和TLR2表达的临床意义. 世界华人消化杂志 2006;14(34):3278-3283

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3278.asp>

0 引言

肝硬化失代偿等重症肝病患者肠道内菌群紊乱产生的内毒素在肝内不能灭活而引起内毒素血症^[1], 同时由于细菌移位致使自发性细菌性腹膜炎等并发症出现^[2]. 因此感染成为肝硬化失代偿等重症肝病严重并发症和重要的致死原因之一^[3], 迄今其预防和治疗效果不甚理想. 细菌移位(bacterial translocation, BT)的概念已从传统的有活性的肠道菌丛通过肠道屏障到达肠系膜淋巴结和肠腔外其他器官或部位, 延伸到细菌释放产物(如内毒素和细菌DNA)的移位^[4]. BT在肝硬化并发感染和高动力循环状态的发生中起着重要作用, 而后者又是门脉高压、腹水以及肝肾综合症形成的关键因素^[5]. 在肝硬化鼠模型中可观察到不是所有的过度生长的肠腔细菌移位至肠系膜淋巴结, 提示肝硬化细菌移位的机制除了肠腔细菌过度生长, 还可能包含其他的因素. 这些可能是肠黏膜屏障结构或功能的改变, 由于门脉高压可能引起血流停滞, 导致肠道细菌向血管或淋巴管的通透性增加. 在肝硬化鼠模型和肝硬化患者的肠道黏膜病理观察中可见肠道黏膜充血和水肿, 细胞间距变宽^[6]. 另一方面, 在几个包含肝硬化的门脉高压的实验模型中, 肠腔黏膜氧化损伤可能是由于门脉高压引起的局部组织缺氧, 引起肠道黏膜屏障渗透性增加, 细菌顺利移位. 已有数据证明给予抗氧化剂治疗可阻止回肠和盲肠黏膜的损伤和肝硬

化腹水鼠的细菌移位^[7]. 为探讨肝硬化患者并发感染的特点及防治对策, 我们对本科42例肝硬化住院患者及15例正常对照作一研究, 应用流式细胞仪检测其PBMC中TLR4与TLR2的表达.

1 材料和方法

1.1 材料 2005-11/2006-06第四军医大学唐都医院传染病科住院的肝硬化患者42例, 男35例, 女7例, 年龄29-70(平均42.5±2.8)岁. 其中乙型肝炎肝硬化30例, 丙型肝炎肝硬化和酒精性肝硬化各3例, 原因不明肝硬化6例. Child-Pugh A级12例, B级10例, C级20例. 将全部患者根据有无腹水分成肝硬化腹水组($n=30$)、肝硬化无腹水组($n=12$). 将全部患者随机分为3组: 对照组($n=10$)、治疗I组($n=10$)及治疗II组($n=10$), 3组患者入院时的主要临床症状、体征、实验室检查结果无显著性差异. 治疗I组给予: 100 g/L葡萄糖注射液250 mL加清开灵注射液200 mg, 静脉滴注, *qd*. 治疗II组给予氧氟沙星注射液100 mL静滴, *bid*; 50 g/L氯化钠注射液100 mL加注射用头孢哌酮钠3 g静滴, *bid*. 对照组给予100 g/L葡萄糖注射液250 mL加甘利欣注射液30 mL, 静脉滴注, *qd*. 100 g/L葡萄糖注射液加复方丹参注射液14 mL, 静脉滴注, *qd*. 肝硬化诊断由病史、临床表现、实验室和影像学检查证实, 所有病例均符合2000-09西安会议修订的《病毒性肝炎防治方案》中的诊断标准^[8]. 研究对象57例其中肝硬化患者42例, 健康人15例, 抽取健康志愿者和肝硬化患者外周静脉血各2 mL, 置于无菌EDTA-K₂抗凝管中, 4℃保存. 腹水标本肝硬化腹水患者入院后严格无菌操作条件下行腹腔穿刺术, 床边血培养瓶接10 mL送细菌培养; 肝硬化无腹水患者及肝硬化腹水患者作血细菌培养. 流式细胞仪, FACSCalibur型(美国BD公司); 低温高速离心机, Legend/RT型(德国科峻公司). 2 mL EDTA-K₂真空抗凝管(美国BD公司); 试剂荧光素FITC、PE和PerCP-CY5.5标记的mAb, 外周全血细胞表面的染色使用下列mAb: anti-human TLR2 fluorescein isothiocyanate及其IgG2a阴性对照(eBioscience, San Diego, CA公司); anti-human TLR4 peridinin chlorophyll protein及其IgG2a同型对照、anti-human CD14 peridinin chlorophyll protein及非特异性的相匹配的同型对照; RBC裂解液(美国Becton Dickinson, San Diego, CA公司).

1.2 方法 治疗前后使用流式细胞仪检测肝硬

■创新盘点

本文采用三色荧光染色法, 荧光素标记的抗TLR2/抗TLR4/抗CD14 mAb对肝硬化患者及正常人的血液单核细胞表面TLR2、TLR4及CD14分子进行免疫荧光染色, 应用流式细胞仪检测, 总结出肝硬化腹水患者较正常人及肝硬化无腹水患者TLR4与TLR2的表达显著上调, 即肝硬化腹水患者较肝硬化无腹水患者的感染更为严重.

■应用要点

本文对肝硬化患者细菌感染及单核细胞表面TLR2、TLR4的表达进行了研究,对临床实践中控制感染有一定启示,同时TLR有可能对预防感染及控制炎症反应起到一定作用。

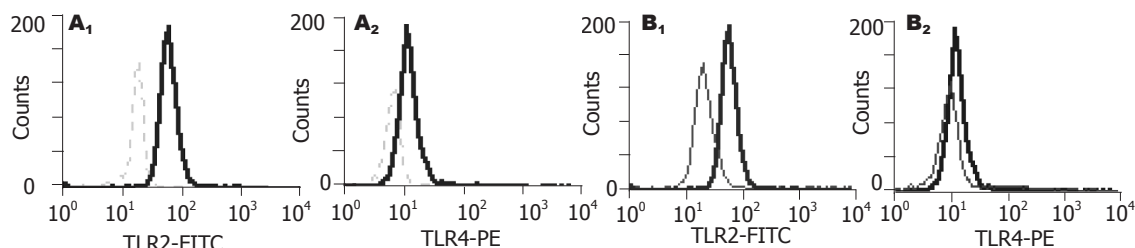


图1 肝硬化患者无腹水组TLR2和TLR4的GMF表达。A: 治疗组1; B: 治疗组2。全血染色。CD14和TLR2为直接抗体染色; TLR4为间接抗体染色。代表至少10 000个CD14设门的门内细胞。虚线: 正常对照组; 细线: 肝硬化无腹水组; 粗线: 肝硬化腹水组。

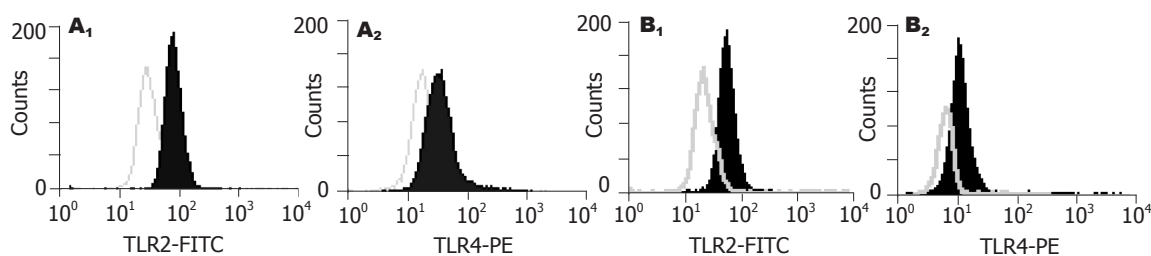


图2 肝硬化患者治疗前后TLR2和TLR4的GMF表达。A: 治疗组1; B: 治疗组2。标本均为全血染色。CD14和TLR2为直接抗体染色; TLR4为间接抗体染色。代表至少10 000个CD14设门的门内细胞。实线图: 肝硬化患者治疗前; 空心图: 肝硬化患者治疗后。

化患者外周血单核细胞表面的TLR4, TLR2表达, 肝功能化验、腹部B超由我院化验室及B超诊断室完成检测。首先处理标本, 对每份肝硬化患者血液取2只试管, 分别标记为A管、B管, 并用1个正常标本作对照。A管为FITC同型对照、PE同型对照和PerCP-cy5.5抗-CD14 mAb, B管为FITC-抗TLR2 mAb、PE-抗TLR4 mAb和PerCP-cy5.5-抗CD14 mAb, 首先在B管分别加入anti-human TLR4 phycoerythrin荧光抗体30 μ L, 抗凝全血100 μ L, 振荡混匀, 在4 $^{\circ}$ C下避光孵育30 min。再在A管、B管加入红细胞裂解液2 mL, 混匀, 室温下避光裂解15 min。300 g离心5 min, 弃上清后加入洗涤液2 mL, 300 g离心5 min, 移去上清, 再加入洗涤液2 mL 300 g离心5 min, 移去上清。再在B管加入二抗4 μ L, 在4 $^{\circ}$ C下避光孵育30 min后加入洗涤液2 mL, 300 g离心5 min, 移去上清; 再在A管加入mouse anti-human fluorescein isothiocyanate Ig2a同型对照抗体, mouse anti-human phycoerythrin isothiocyanate Ig2a同型对照抗体各30 μ L和anti-human CD14荧光抗体9 μ L, 振荡混匀, 再在B管加入anti-human TLR2 fluorescein isothiocyanate抗体30 μ L、anti-human CD14荧光抗体9 μ L, 振荡混匀, 在4 $^{\circ}$ C下避光孵育30 min后加入洗涤液2 mL, 300 g离心5 min, 移去上清, 再加入500 μ L固定液振荡混匀, 制成细胞悬液4 $^{\circ}$ C避光保存备用^[9]。应用流式细胞仪检测外周血单核细胞表面TLR2, TLR4的表

达水平, 以平均荧光强度的几何均数(GMF)表达其含量。选择CellQuest软件, 设门取单核细胞群, CD14(PerCP-cy5.5)标记外周血单核细胞, CD14PerCP-cy5.5与侧向光散射(SSC)设门圈出单核细胞, 每份样本获取10 000个CD14⁺单核细胞, 去除死亡细胞, 记录外周血单核细胞TLR2, TLR4的GMF, 作直方图比较^[10]。抽取腹水后立即在床边注入10 mL腹水于需氧血培养瓶中, 送检。静脉采血10.0 mL注入需氧血培养瓶中, 送本院细菌室培养。

统计学处理 所有实验数据均由自动分析后获取, 应用SPSS 13.0统计学软件分析, 计量资料参数采用均数 \pm 标准差表示, 采用两样本 t 检验。 $P<0.05$ 为显著性标准。治疗前后的显著性检验采用配对 t 检验, 以 $P<0.05$ 为显著性标准。

2 结果

肝硬化腹水患者TLR2和TLR4的GMF分别为 47.65 ± 0.75 和 22.28 ± 0.8 ; 肝硬化无腹水患者TLR2和TLR4的GMF分别为 25.37 ± 1.62 和 14.81 ± 0.29 ; 正常对照组TLR2和TLR4的GMF分别为 24.40 ± 2.77 和 14.45 ± 3.23 。肝硬化腹水患者与正常对照组比较有显著性差异($P<0.05$); 肝硬化腹水患者与肝硬化无腹水患者组比较有显著性差异; 肝硬化无腹水患者组与正常对照组比较无显著性差异($P>0.05$, 图1)。治疗组1治疗前TLR2和TLR4的GMF分别为 47.67 ± 1.62 和 22.31 ± 0.9 ; 治疗组1治疗7 d后TLR2和TLR4的GMF分别为17.69

± 2.48 和 12.97 ± 0.35 ; 治疗组2治疗前TLR2和TLR4的GMF分别为 47.63 ± 0.75 和 22.26 ± 0.80 ; 治疗组2治疗7 d后TLR2和TLR4的GMF分别为 16.74 ± 2.48 和 11.77 ± 0.35 ; 治疗组1、治疗组2的TLR2、TLR4的GMF表达水平下调明显优于对照组, 经统计学处理有显著性差异($P < 0.05$, 图2)。且随着治疗时间的延长下调更为明显(表1)。治疗组, 在改善症状, 消退黄疸, 降低转氨酶等方面明显优于对照组, 经统计学处理有显著性差异($P < 0.05$)。14例腹水细菌培养阳性者: 大肠埃希菌(G-菌)3例, 产酸克雷伯氏菌(G-菌)1例; 金葡菌(G+菌)3例, D群链球菌(G+菌)3例, 表皮葡萄球菌(G+菌)2例, 孔氏葡萄球菌(G+菌)1例, 藤黄微球菌(G+菌)1例。血细菌培养阳性者为大肠埃希菌(G-菌)1例; 腊样芽胞菌(G+菌)1例。

3 讨论

Toll样受体(Toll like receptor, TLR)属于模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR), 在识别和抵御各种病原微生物及其产物中发挥重要作用。TLR识别病原微生物细胞壁上一类真核细胞所不具备的特殊结构, 这类结构对表达PRR的细胞有强烈的刺激作用, 称为病原相关分子模式(pathogen associated molecular patterns, PAMPs), 包括G-菌的脂多糖(LPS)、类脂A, G+菌的肽聚糖(PGN)、脂磷壁酸(LTA)、脂阿拉伯甘露聚糖(LAM), 分枝杆菌和疏密螺旋体的脂蛋白与脂肽, 酵母菌和支原体的某些成分等。TLR如同天然免疫的“眼睛”, 监视与识别各种不同的PAMPs, 是机体抵抗感染性疾病的第一道屏障。目前, 已克隆的人类的TLR成员有10个(即TLR1-10), 他们在天然免疫中发挥重要的抗感染免疫功能, 并与免疫耐受、特异性抗感染免疫, 以及一些疾病具有相关性。近年来发现TLR4是一种功能性的细菌内毒素即LPS跨膜受体, TLR4是引起对LPS应答的主要受体。TLR2主要识别G+菌(如金葡菌)成份脂蛋白、脂多肽、真菌、酵母、分枝杆菌、支原体脂肽等的信号转导及酵母细胞壁、肽聚糖(PGN)等, 也有报道TLR2的活化与某些致病菌的LPS有关, TLR2与配体结合并产生信号转导过程必需有其他TLR的参与, 如TLR6和TLR1。总之, TLR2主要识别革兰阳性菌; TLR4主要识别革兰阴性细菌LPS成分, 是革兰阴性杆菌LPS的受体^[11], LPS与TLR4结合可导致NF- κ B激活^[12], 并且可激活单核巨噬细胞产生炎症因子^[13]。近年认为, 机体针对细菌、病毒及其

表 1 肝硬化患者TLR2和TLR4检测结果(GMF, mean \pm SD)

临床病理指标	治疗组 (n = 20)		对照组 (n = 10)	
	TLR2	TLR4	TLR2	TLR4
0	47.79 \pm 0.76	28.58 \pm 0.79	48.31 \pm 0.75	29.68 \pm 0.80
3	20.21 \pm 0.34 ^a	14.52 \pm 0.31 ^a	45.32 \pm 0.48	28.67 \pm 0.64
5	19.36 \pm 0.31 ^a	13.42 \pm 0.42 ^a	43.25 \pm 0.45	28.26 \pm 0.73
7	17.22 \pm 2.48 ^a	12.37 \pm 0.35 ^a	42.26 \pm 0.36	28.01 \pm 0.21

^a $P < 0.05$ vs 对照组。

他病原生物等病原相关分子(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)的入侵所产生的先天免疫及特异性免疫由模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)启动。TLR介导的先天免疫不仅包括针对病菌的宿主防御反应, 而且包括免疫病变^[14]。TLR是主要的PRRs, 模式识别受体的发现对了解许多有病原体感染的疾病的发病机制有着重要的意义并为将来研发各种免疫治疗提供新的靶位。另外, 一项研究显示在活体内TLR发出信号通过干扰素抑制HBV病毒复制^[15], G+菌的产物通过对TLR2的刺激, 促进TNF及可溶性TNF受体(soluble TNF receptor)增加, 与TLR2不同的是, TLR4已被确定在酒精导致的肝损伤鼠模型中起到重要作用, TLR4突变的这种鼠模型对LPS、炎症(inflammation)、TNF- α 、脂肪变性(steatosis)呈低反应性, 其与野生型对照组相比坏死减少^[16]。人肝脏星状细胞里, TLR4通过细菌脂多糖介导炎症信号释放^[17]。在部分肝切除的小鼠模型中, TLR4的表达上调加重了内毒素诱导的肝衰竭^[18]。另一项研究结果提示, 在失血性休克后, 全身炎症应答起始及肝细胞的损伤过程中, TLR4进行信号传导必不可少^[19]。

在本研究中, 肝硬化腹水患者的外周血单核细胞中的TLR2, TLR4的表达较正常人显著上调($P < 0.05$)。抗生素治疗7 d后与治疗前比较TLR2, TLR4的表达显著下调($P < 0.05$); 且随着治疗时间的延长下调更为明显; 随着敏感抗生素的使用更为明显。肝硬化腹水患者在使用了清开灵等清热解毒类中药后TLR2, TLR4的表达也显著下调($P < 0.05$); 清开灵等清热解毒类中药及抗生素对TLR2, TLR4的表达影响同样极其显著。抗生素或清开灵治疗后肝硬化患者的一般状况显著改善, Child-Pugh评分降低。在研究中, 不同病因所致的肝硬化TLR2, TLR4的表达上调无明显差异($P > 0.05$)。肝硬化腹水患者与肝硬化无腹水患者组比较有显著性差异($P < 0.05$), 肝硬化腹水患者与正常对照组比较有显著性差异($P < 0.05$); 肝硬

■同行评价

肝硬化腹水患者较正常人TLR4与TLR2的表达显著上调, 抗生素治疗后显著下调。肝硬化腹水患者的细菌感染包括革兰氏阳性及阴性细菌。对有抗生素使用指征的肝硬化腹水患者, 及时使用抗生素可以得到肯定的疗效。本文设计合理, 方法先进, 得出了有意义的结论。

化无腹水患者组与正常对照组比较无显著性差异($P>0.05$).

肝硬化患者的并发症自发性细菌性腹膜炎发病机制是肠腔来源的细菌通过肠壁,到达肠系膜淋巴结和其他器官.如果机体局部免疫防御系统不能产生充分的反应,自发性细菌性腹膜炎最终逐步发展,产生腹水.在临床和实验的初步研究中,用口服抗生素抑制肠腔需氧的革兰氏阴性菌丛,可以明显地降低肝硬化患者自发性细菌性腹膜炎的发生率和肠腔细菌过度生长的发生率,降低肝硬化鼠的细菌移位、细菌性腹膜炎的发生率^[20].临床实践中,肝硬化无腹水患者使用抗生素是否确实优于未使用者,尚需进一步深入研究.肝硬化患者的肠道细菌菌丛潜生体(cryptic growth cells, CGC)形成率和群集率可显著增高.肝硬化患者的CGC有很强的繁殖能力、运动能力和抗生素耐受力,从而具有极强的侵袭力.乳果糖及生态制剂较抗生素在调节细菌CGC形成和群集方面更理想^[21].另外,肝硬化患者中内毒素激活巨噬细胞被认为与血液循环中肿瘤坏死因子的增高有关^[22],近来的研究中观察到,以未治疗或仅以抗生素治疗做对照组,用抗生素和抗肿瘤坏死因子(anti-TNF- α)联合治疗并发细菌性腹膜炎的肝硬化鼠可降低死亡率^[23].

有趣的是,血清脂多糖结合蛋白(LPS-binding protein, LBP)水平增高的肝硬化患者显示明显的免疫激活,通过口服氟哌酸可以改善免疫激活.这种现象提示对于无感染的肝硬化患者,具有致病力的肠道细菌产物可激活免疫系统^[24].近来实验研究也估价了细菌移位在高动力循环状态的发病机制中的作用,肝硬化腹水鼠与正常鼠比较对于血管收缩内脏血管呈现低反应性,平均动脉血压也更低.存在细菌移位的肝硬化鼠的这些异常情况中更显著.一氧化氮与肿瘤坏死因子(TNF- α)的产生增加与血液动力学改变密切相关.另外,细菌移位与内毒素在肠系膜淋巴结和血液中的出现相伴随.这些研究提示细菌或其产物的肠道移位,如内毒素,能使已改变的循环状态恶化.支持这种假设的证据显示,细菌DNA的存在诱导严重肝硬化患者腹水白细胞的进一步激活.这导致培养中一氧化氮的过度产生,一氧化氮水平与一氧化氮合酶的可诱导形式存在显著的直接相关^[24].与实验结果不同的是, Gustot *et al* ^[25]在酒精性脂肪肝鼠模型中发现,抗生素的使用不影响鼠的TLR表达,而本实验中抗生素及中药对TLR2, TLR4的

表达影响均极其显著,且在使用1 d后就可出现下调,这可能因种属间差异所致.本研究结果显示:对有抗生素使用指征的肝硬化腹水患者,及时应用抗生素的治疗组在改善症状、恢复肝功能等方面优于对照组($P<0.05$),对病情的恢复是有益的.血培养、腹水培养的细菌包括革兰阴性细菌、革兰阳性细菌.另外,细菌培养及FCM检测结果显示肝硬化患者多为单一性的细菌感染,两种以上的细菌感染少见.FCM研究结果同样提示肝硬化患者的感染包括革兰阳性细菌,革兰阴性细菌.近来在肝硬化无菌腹水(培养阴性且无中性白细胞)患者的血清和腹水检测到细菌DNA,经自动化的核苷酸序列测定鉴定出DNA片段大部分来源于大肠杆菌.这种细菌也是引起肝硬化患者自发性细菌性腹膜炎发生的最常见原因^[26].

本实验中正常人对照组中剔除3例上感患者,发现他们的TLR2和TLR4的GMF分别 39.91 ± 2.50 ; 37.12 ± 9.22 ,与正常人比较TLR2和TLR4的表达上调;剔除乙型肝炎所致的肝癌患者1例,其TLR2、TLR4的GMF为 44.90 , 2.19 ,与正常人比较TLR2表达上调;此结果提示TLR2和TLR4的表达与多种因素有关,还需进一步研究.在本实验中,肝硬化腹水患者TLR2和TLR4的表达较正常人显著上调,且肝硬化腹水患者在经过抗感染治疗后显著下调,与TLR2, TLR4的表达分别与 G^+ 细菌及内毒素刺激有关的理论相符.流式细胞术检测TLR2, TLR4的表达具有快速、敏感,可相对定量的优势,对肝硬化细菌移位的检测有较强的预测性.总之,调控TLR4、TLR2的表达可能是肝硬化患者细菌感染防治的一种新策略,甚至为新型疫苗和免疫调节剂的研发均可提供新的重要理论依据^[27].肝硬化患者免疫功能明显降低,SBP等肝硬化失代偿期严重并发症经常发生^[28].另外肝硬化并出血的治疗性临床实践中对急性出血的肝硬化患者预防性使用抗生素可减少细菌感染的机会^[29].

总之,针对肝硬化腹水,可预防性应用抗生素,为了避免耐药菌的产生,应依据腹水培养和药敏试验结果,从而提高临床疗效^[30].

4 参考文献

- 1 聂青和. 内毒素血症在重型肝炎发病中的地位(专题笔谈). 实用肝脏病杂志 2004; 7: 5-7
- 2 聂青和, 李梦东, 王宇明. 实用传染病学. 第三版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 1439-1452
- 3 刘泽富, 聂青和. 病毒性肝炎的诊断和治疗. 第一版.

- 北京: 人民军医出版社, 2001: 305-328
- 4 苟艳子, 连建奇, 聂青和. 肝硬化细菌移位及其后果. 中华肝病杂志 2006; 14: 796-797
- 5 袁春, 叶进, 黄长形, 连建奇. 聚合酶链反应检测肝硬化患者腹水中细菌DNA. 中西医结合肝病杂志 2005; 15: 100-102
- 6 Such J, Guardiola JV, de Juan J, Casellas JA, Pascual S, Aparicio JR, Sola-Vera J, Perez-Mateo M. Ultrastructural characteristics of distal duodenum mucosa in patients with cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 371-376
- 7 Chiva M, Guarner C, Peralta C, Llovet T, Gomez G, Soriano G, Balanzo J. Intestinal mucosal oxidative damage and bacterial translocation in cirrhotic rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 145-150
- 8 中华医学会传染病学与寄生虫学分会、肝病学会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝病杂志 2000; 8: 324-329
- 9 金伯泉. 细胞和分子免疫学实验技术. 第四军医大学出版社, 2002: 78-81
- 10 王建中. 临床流式细胞分析. 第一版. 上海科学技术出版社, 2005: 45-69
- 11 Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 335-376
- 12 Covert MW, Leung TH, Gaston JE, Baltimore D. Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation. *Science* 2005; 309: 1854-1857
- 13 Wiest R, Garcia-Tsao G. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology* 2005; 41: 422-433
- 14 Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005; 17: 1-14
- 15 Isogawa M, Robek MD, Furuichi Y, Chisari FV. Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication *in vivo*. *J Virol* 2005; 79: 7269-7272
- 16 Iredale JP. Regulating hepatic inflammation: pathogen-associated molecular patterns take their toll. *Hepatology* 2003; 37: 979-982
- 17 Paik YH, Schwabe RF, Bataller R, Russo MP, Jobin C, Brenner DA. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2003; 37: 1043-1055
- 18 Takayashiki T, Yoshidome H, Kimura F, Ohtsuka M, Shimizu Y, Kato A, Ito H, Shimizu H, Ambiru S, Togawa A, Miyazaki M. Increased expression of toll-like receptor 4 enhances endotoxin-induced hepatic failure in partially hepatectomized mice. *J Hepatol* 2004; 41: 621-628
- 19 Prince JM, Levy RM, Yang R, Mollen KP, Fink MP, Vodovotz Y, Billiar TR. Toll-like receptor-4 signaling mediates hepatic injury and systemic inflammation in hemorrhagic shock. *J Am Coll Surg* 2006; 202: 407-417
- 20 Llovet JM, Bartoli R, Planas R, Vinado B, Perez J, Cabre E, Arnal J, Ojanguren I, Ausina V, Gassull MA. Selective intestinal decontamination with norfloxacin reduces bacterial translocation in ascitic cirrhotic rats exposed to hemorrhagic shock. *Hepatology* 1996; 23: 781-787
- 21 梁后杰, 林进乾, 徐启旺, 刘俊康, 刘为纹. 肝硬化患者肠道菌丛潜在体形成及其调控研究. 中华内科杂志 2000; 39: 251-254
- 22 Albillos A, de la Hera A, Gonzalez M, Moya JL, Calleja JL, Monserrat J, Ruiz-del-Arbol L, Alvarez-Mon M. Increased lipopolysaccharide binding protein in cirrhotic patients with marked immune and hemodynamic derangement. *Hepatology* 2003; 37: 208-217
- 23 Guarner C, Soriano G. Bacterial translocation and its consequences in patients with cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 27-31
- 24 Frances R, Munoz C, Zapater P, Uceda F, Gascon I, Pascual S, Perez-Mateo M, Such J. Bacterial DNA activates cell mediated immune response and nitric oxide overproduction in peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and ascites. *Gut* 2004; 53: 860-864
- 25 Gustot T, Lemmers A, Moreno C, Nagy N, Quertinmont E, Nicaise C, Franchimont D, Louis H, Deviere J, Le Moine O. Differential liver sensitization to toll-like receptor pathways in mice with alcoholic fatty liver. *Hepatology* 2006; 43: 989-1000
- 26 Such J, Frances R, Munoz C, Zapater P, Casellas JA, Cifuentes A, Rodriguez-Valera F, Pascual S, Sola-Vera J, Carnicer F, Uceda F, Palazon JM, Perez-Mateo M. Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative, nonneutrocytic ascites. *Hepatology* 2002; 36: 135-141
- 27 Barton GM, Medzhitov R. Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 380-383
- 28 王银, 肖绍树, 贺降福, 刘荣, 余蓉. 肝硬化失代偿期并发自发性细菌性腹膜炎的危险因素分析. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2034-2036
- 29 赵超, 陈少波, 周建平, 肖文, 范汉恭, 吴学威. 影响肝硬化食管胃底静脉曲张破裂出血预后的分析. 世界华人消化杂志 2000; 8: 466-467
- 30 丁熠, 陈金联, 朱金水. 肝硬化患者腹水感染致病菌菌谱变化和药敏分析. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1008-1011

电编 李琪 编辑 潘伯荣

微导管和聚乙烯醇在部分脾栓塞中的应用

杨怀龙, 官泳松, 何志明, 王宏, 纪艳

■背景资料

对于脾功能亢进的患者, 相关报道大部分采用明胶海绵、钢圈栓塞脾动脉主干, 易导致侧枝循环的形成或再通, 血细胞三系指标出现降低, 使中远期疗效受到影响。如何减少侧枝循环的形成, 减少术后复发, 以期提高临床中、远期治疗效果。本文就是基于以上目的进行研究。

杨怀龙, 何志明, 王宏, 纪艳, 绵阳市四零四医院医学影像中心 四川省绵阳市 621000

官泳松, 四川大学华西医院放射科 四川省成都市 610041
杨怀龙, 讲师, 主治医师, 主要从事肿瘤介入、腹部介入方面的研究。

四川省卫生厅科研课题, No. 050188

通讯作者: 官泳松, 610041, 四川省成都市国学巷37号, 四川大学华西医院放射科, guanyongsong@yahoo.com.cn

电话: 028-85421008 传真: 028-85538359

收稿日期: 2006-08-22 接受日期: 2006-09-25

Application of microcatheter and polyvinyl alcohol in partial splenic embolization for hypersplenism

Huai-Long Yang, Yong-Song Guan, Zhi-Ming He, Hong Wang, Yan Ji

Huai-Long Yang, Zhi-Ming He, Hong Wang, Yan Ji, Medical Image Center, Mianyang 404 Hospital, Mianyang 621000, Sichuan Province, China

Yong-Song Guan, Department of Radiology, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Correspondence to: Dr. Yong-Song Guan, West China Hospital of Sichuan University, 37 Guoxuexiang, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. guanyongsong@yahoo.com.cn

Received: 2006-08-22 Accepted: 2006-09-25

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy of partial embolization, with superselective catheterization of arteries in the lower part of spleen, for management of hypersplenism.

METHODS: A total of 80 cirrhotic patients with hypersplenism were treated with 1 or 2 times of partial splenic embolization, with polyvinyl alcohol (PVA) particles (300-500 μm in diameter) injected into the arteries in the inferior part. The data, including symptoms and signs, blood routine, findings by computed tomography and upper gastrointestinal endoscopy, were collected before and after embolization for statistical analysis.

RESULTS: In 80 patients, embolization was performed 105 times, involving 83 times of fever lasting 3-30 days and 83 times of bellyaches

(analgesics was used 26 times). Treatable hydrothorax was observed in 5 cases, and no severe complications occurred. The volume of embolization covered 40%-70% of the organ. White blood cell (WBC) count and blood platelet count (BPC) were elevated 24 h after embolization ($P < 0.05$) and the number of cases with normal WBC count or BPC was 78 or 79 respectively after 3 months. The improvements on general condition and remission of esophageal varices were fruitful. No incidence of upper digestive hemorrhage was encountered during the follow-up period.

CONCLUSION: Partial splenic embolization is helpful for relieving portal hypertension, diminishing the morbidity of massive hemorrhage in upper digestive tract, improving blood cell counts and immunity as well as living quality in patients with hypersplenism.

Key Words: Hypersplenism; Interventional therapy; Partial splenic embolization; Portal hypertension

Yang HL, Guan YS, He ZM, Wang H, Ji Y. Application of microcatheter and polyvinyl alcohol in partial splenic embolization for hypersplenism. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(34):3284-3289

摘要

目的: 评价超选择插管和聚乙烯醇颗粒技术在部分脾栓塞临床应用中的价值。

方法: 肝硬化合并门静脉高压伴脾功能亢进患者80例, 采用超选择插管至脾动脉分支, 行部分脾栓塞。每例患者共接受1-3次栓塞。栓塞材料是聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)微粒, 直径300-500 μm 。收集每次栓塞前、后资料, 包括症状、体征、外周血象、CT、上消化道内镜所见等, 经统计学处理后进行分析。

结果: 共进行105次部分脾栓塞, 其中15例作了第二次栓塞, 5例作第三次栓塞。栓塞范围40%-70%, 并且有83次栓塞后出现发热, 持续3-30 d。83次出现腹痛, 其中26次需用强效止痛药。5例少量胸腔积液, 经保守治疗后吸收。未出现脾脓肿等并发症。术后24 h外周血白

细胞、血小板计数开始升高($P<0.05$). 栓塞后3 mo内, 78例白细胞维持在正常水平, 79例BPC维持在正常范围. 栓塞后食欲、体能改善, 胃底食管静脉曲张程度减轻, 随访期间未发现上消化道大出血者.

结论: 部分脾栓塞治疗脾功能亢进, 能减轻门静脉高压, 降低上消化道大出血发生率, 有效改善血象, 提高机体免疫力和生活质量.

关键词: 脾功能亢进; 栓塞; 介入治疗

杨怀龙, 官泳松, 何志明, 王宏, 纪艳. 微导管和聚乙烯醇在部分脾栓塞中的应用. 世界华人消化杂志 2006;14(34):3284-3289
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3284.asp>

0 引言

对于脾功能亢进者, 采用经导管栓塞脾脏, 目的是使异常肿大的脾脏缩小, 改善机体的免疫功能, 降低脾脏破坏血细胞的能力, 以提高正常血细胞比例. 该技术在临床已得到广泛认可. 至于使用的材料和栓塞的部位, 过去多选用不锈钢圈、明胶海绵等栓塞脾动脉主干^[1-3,4]. 然而, 由于栓塞后常形成侧枝循环或发生再通, 血细胞三系指标易再次出现降低, 使中远期疗效受到影响. 该病例组与过去栓塞方法的不同之处, 主要是选用直径300-500 μm 的聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)微粒作为栓塞材料, 并采用超选择插管栓塞脾动脉下极, 以期提高临床治疗效果. 其具体方法供大家参考.

1 材料和方法

1.1 材料 肝硬化合并门静脉高压伴脾功能亢进症的患者80例, 于2002-2005年期间住院治疗, 其中男54例, 女26例, 年龄30-76岁, 平均52.6岁. 全部病例均有脾脏增大, 并经B超、CT检查明确显示. 外周血象检查三系明显降低, 其中WBC低于 $3\times 10^9/\text{L}$, BPC低于 $50\times 10^9/\text{L}$. 上消化道内镜检查显示胃底静脉曲张者75例. 本组肝功能按Child分级: A级13例、B级58例、C级9例.

1.2 方法 设备为1000mA大型数字减影心血管系统(LCV+, GE公司产). 由于脾动脉的解剖形态复杂多变, 而且该组患者均有脾肿大、脾动脉增粗和迂曲, 所以应该准备多种规格的导管和导丝, 要求材质较柔软. 我们使用的是泰尔茂公司(Terumo)产品, 导管规格5或6F, 品种有Yashiro、RH、RS、Cobra、3F同轴、SP等. 以及J形头导丝和黑色超滑亲水导丝. 通常PVA颗

粒的直径在200-1000 μm 之间, 本组选择的是300-500 μm . (颗粒太小, 则有通过小动脉进入微静脉的危险, 颗粒太大, 栓塞后形成侧枝循环、原有病症复发的比例高).

本组105次均采用Seldinger方法穿刺右侧股动脉插管, 先作脾动脉造影, 了解血管分布范围和脾脏实质染色情况后, 全部病例均进行脾动脉分支栓塞. 根据造影发现选用相应规格的导管, 60次在实现脾动脉下极分支超选择插管后进行栓塞. 由于脾动脉分支的特殊走行或有严重迂曲, 有25次栓塞脾动脉中上极分支, 其中9次为栓塞上极分支. 共进行105次栓塞, 其中60例栓塞一次, 15例栓塞2次, 5例栓塞3次. 材料选用300-500 μm PVA微粒, 栓塞范围一般控制在40%-70%. 根据栓塞后血流变化情况, 决定是否需进一步栓塞. 栓塞范围大约30%-40%时血流开始变慢, 大约50%-60%时明显减慢, 至血流淤滞可达70-80%. 栓塞后立即进行脾动脉造影, 了解栓塞范围. 脾脏被栓塞体积估算办法: (1)栓塞前后造影对比实质染色情况; (2)栓塞前后脾实质内分布的血管数量对比; (3)栓塞后B超及CT扫描评估.

术后24 h、3 d、1 wk、末次栓塞后3 mo做血常规检查(表1). 术后1-2 mo复查B超、CT影像学改变. 术后1 mo内复查上消化道内镜, 了解胃底食管静脉曲张情况.

统计学处理 采用SPSS10.0统计软件处理, 栓塞前后外周血象化验结果进行 t 检验; 计数资料之间采用 χ^2 检验. $P<0.05$ 判断为差异显著性.

2 结果

2.1 影像学表现 血管造影显示栓塞前脾动脉各分支完整, 终末血管显示完整(图1), 栓塞后脾动脉的分支减少或脾动脉段分支闭塞、中断, 实质期可见脾脏染色区域减少, 中下极及周围区域呈不同程度染色缺损区(图2). 栓塞后B超提示脾脏有不同程度的梗死表现, 体积大多无变化. CT平扫检查提示脾脏中下极均有大面积梗死区(图3). 3例左侧胸腔出现少量积液, 均为脾动脉上极分支栓塞者.

2.2 临床及实验室随访结果 经估算脾脏被栓塞的体积大约在40%-85%之间, 其中40%-60%者63例, 大于60%的27例. 随访时间均超过12 mo, 最长5例达46 mo, 36-46 mo 25例, 24-36 mo 40例, 12-24 mo 15例, 平均随访期25.6 mo. 术后3-5 d WBC、BPC均显著上升, 有16例达正常水平. 58例WBC计数超过 $10\times 10^9/\text{L}$, 于1-2 wk内降至正常水

■创新盘点

该组病例采用300-500 μm 的聚乙烯醇(PVA)颗粒、微导管与超选择插管技术相配合, 主要超选择到脾动脉下极分支进行栓塞, 以期提高临床中、远期治疗效果. 该方法相关报道较少.

■应用要点

本文从脾动脉解剖及走行的角度, 结合脾动脉的侧枝循环的形成, 系统的阐述了脾动脉栓塞的原理及栓塞方法, 并在总结了相关文献的基础上, 对如何提高脾功能亢进栓塞术前后的治疗效果, 提出了见解, 在所用材料, 栓塞技术, 预防并发症方面给予了一定的总结. 如何提高中远期治疗效果及减少并发症, 是今后不断研究的课题.

表 1 脾动脉栓塞前后外周血小板及白细胞计数结果 (mean \pm SD, $n = 105$, $\times 10^9/L$)

	术前	术后24 h	3 d 后	1 wk 后	末次栓塞3 mo 后计数
BPC	45.6 \pm 14.65	103.0 \pm 14.6	134 \pm 48.3	144 \pm 47.5	113 \pm 28.38
WBC	2.62 \pm 0.5	6.8 \pm 1.1	7.36 \pm 1.6	7.23 \pm 1.5	5.45 \pm 1.1

PSE术后不同时间段BPC、WBC与术前比较, 经 t 检验: P 均 <0.05 .

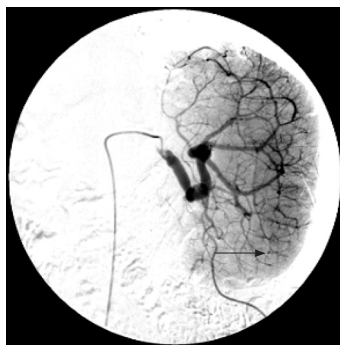


图 1 栓塞前血管造影显示脾动脉分支和终末支显示完整.

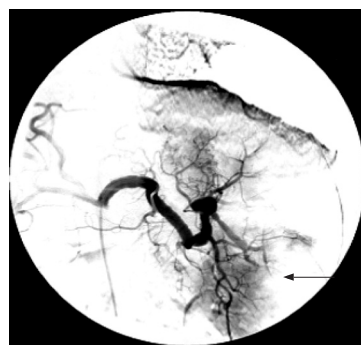


图 2 栓塞后血管造影显示脾动脉分支中断/闭塞.

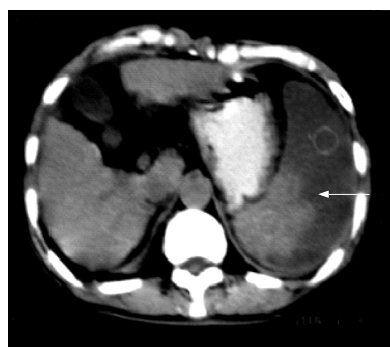


图 3 栓塞后CT扫描显示大面积低密度改变, 即梗死区.

表 2 治疗前后胃底食管静脉曲张分级(% , $n = 75$)

	正常	轻度	中度	重度
术前	0	43 (57%)	22 (29%)	10 (14%)
术后	0	56 (74%)	15 (20%)	4 (6%)

PSE术后胃底食管静脉曲张分级与术前比较, 经 χ^2 检验: P 均 <0.05 .

脾静脉窦扩大, 其中的网状内皮细胞增多, 脾脏破坏脆弱血细胞和吞噬BPC的数量增加, 结果血细胞减少, 导致患者免疫力严重受损, 发生感染的机会大大增, 严重影响生活质量. 血小板减少达 $50 \times 10^9/L$ 以下有出血倾向. 而且脾肿大者常合并有肝硬化、门静脉高压, 食管胃底静脉有不同程度的曲张, 一旦破裂即发生上消化道大出血.

部分性脾栓塞(partial splenic embolization, PSE)治疗脾功能亢进, 主要是针对外周血象降低^[1-6], 在临床已得到广泛认可. 随着对有关介入治疗方法及治疗效果的病理生理学研究的深入, 部分脾栓塞疗法正不断得到完善, 其治疗效果可以达到以下几个目的: (1)缓解门静脉高压; (2)减轻食管胃底静脉曲张, 从而尽量避免上消化道出血; (3)纠正脾功能亢进; (4)保留脾脏的功能. 栓塞脾动脉的传统介入方法, 是采用钢圈、明胶海绵进行主干栓塞. 缺点是不利于在栓塞过程中较准确地控制栓塞范围, 栓塞后并发症较多, 脾功能亢进复发率较高. 哪些因素有利于在栓塞过程中准确地控制栓塞范围, 如何减少

平. 12例BPC在1-2 wk内升至正常水平, 以后略有下降, 2 mo左右稳定. 1例BPC计数低于正常但高于栓塞前水平. 术后3 mo BPC、WBC计数明显高于术前水平, 差异具有显著性意义($P < 0.05$). 1例16 mo后BPC、WBC低于栓塞前而行第2次介入治疗. 治疗后胃底食管静脉曲张程度明显减轻, 治疗后改变以最后一次栓塞后改变为准(表2). 随访期间未发现上消化道大出血病例.

2.3 与栓塞有关的并发症 全部病例均有脾区疼痛, 大部分在1-2 wk内缓解, 疼痛时间最长1例达1 mo. 80例均有不同程度的发热, 其中18例发热超过 38.5°C , 大部分患者的体温在1-2 wk内降至正常, 有2例时间长达1 mo, 后逐渐缓解. 脾上极栓塞9例中, 有3例发生左侧胸腔积液, 其中1例为中量积液, 经对症治疗后痊愈. 全部病例均未发生脾脓肿.

3 讨论

脾脏为免疫器官, 当脾脏肿大、脾功能亢进时,

栓塞后并发症和防止病情复发, 达到较好的长期治疗效果, 是今后需不断研究的课题^[7]。

脾动脉节段性分布的特征, 为PSE提供了解剖学基础^[8]。脾脏内每一叶、段、亚段的动脉供应相应区域的脾脏组织, 各叶、段、亚段间的动脉吻合支极少, 被称为少血管区。上述特征为PSE提供了解剖学依据^[9]。即当某叶或段、亚段被栓塞后, 相应区域的脾组织就会发生缺血坏死, 而未被栓塞部分的功能仍保留。

不过近年来, 很多作者认为尽管脾动脉有清晰的分叶和分段, 但脾内动脉吻合并非少见, 脾动脉分支在脾外吻合(叶间支吻合)的发生率为6.6%-15.3%, 在脾内吻合(脾内叶间支和段间支吻合)者有15.3%-43.3%^[10]。脾动脉吻合支的存在是否对PSE的疗效产生影响, 关键在于栓塞材料的选用及所栓塞的脾动脉的部位。临床上如选用较细的颗粒对脾动脉末梢进行栓塞, 使栓塞水平达到吻合支以远的水平, 甚至脾窦水平, 可以减少因吻合支供血导致脾功能亢进复发的可能性。栓塞材料的选择对于减轻并发症、提高中远期治疗效果有极其重要的作用。传统上使用不锈钢圈、明胶海绵进行栓塞^[11], 而这两种材料均造成血管直径较大的动脉被栓塞, 结果导致大范围缺血和梗死, 发热症状重和感染率高, 栓塞后由于侧枝循环较易形成, 脾功能亢进复发率较高, 而且术中对于准确到达靶血管进行栓塞较难控制。PVA是比较理想的栓塞材料^[12], 能够达到脾脏红髓区及脾段栓塞的目的, 属于永久性栓塞剂, 不被组织吸收, 使栓塞更彻底, 栓塞后不易发生再通, 并且发热的发生率较明胶海绵少, 可能是PVA颗粒的作用更接近造成脾脏功能区被栓塞, 使脾脏功能区完全梗死(干性梗死), 减少了发热和脾脏感染的机会。通常PVA颗粒的直径在200-1000 μm 之间, 本组选择的是300-500 μm 者。颗粒太小, 则有通过小动脉进入微静脉的危险, 术后症状重。颗粒太大, 栓塞后形成侧枝循环、原有病症复发的比例高^[13-14]。Chun *et al*^[15]认为使用含抗生素微球的栓塞材料, 能在梗塞灶内释放抗生素, 对脾脓肿形成有抑制作用。根据我们的经验, 严格进行无菌操作, 术中使用庆大霉素浸泡的PVA微粒, 术后加强控制感染, 可以预防脾脓肿的发生。由于PVA颗粒体积很小, 在被释放到的区域分布均匀, 栓塞后CT复查可见梗死区呈均匀一致的低密度影, 给评估被栓塞区域的体积带来方便。

超选择插管技术配合较好的栓塞材料, 对提高临床治疗效果有极其重要的作用^[16-17]。根据脾动脉造影, 脾动脉走行可分为上弧、水平、上升、回旋和下弧形, 其中波浪型和回旋型的超选择插管十分困难, 不易成功。微导管的特点是管壁纤细, 表面光滑, 并配有微导丝, 可作走行迂曲的细小血管分支的超选择插管诊疗, 尽量选择脾动脉下极分支进行栓塞。与PVA颗粒搭配能起到相当好的效果。被栓塞的靶血管更明确, 被栓塞的脾脏组织更彻底。并有利于被栓塞组织体积的控制, 对于减少术后并发症及术后复发有极其重要意义。在栓塞过程中, 如何控制好栓塞范围是一个关键^[18]。PSE能有效缓解脾功能亢进, 其栓塞范围与疗效和并发症有密切的关系。但目前对栓塞范围无统一标准, 有30%-40%、40%-60%、50%-70%, 过小无临床治疗效果, 过大有发生脾脓肿的风险。不过栓塞的体积越大, 可以在更安全、更少影响脾功能的前提下, 保持更长久的疗效^[19]。多数人认为, 为了减少并发症, 首次栓塞的范围不应超过70%。我们的经验是: PSE的栓塞范围, 应根据患者的一般状况、病因和治疗目的来确定。肝硬化门静脉高压较严重者, 为了减少脾静脉回流、缓解门静脉高压, 栓塞范围应较大。肝癌伴脾功能亢进者, 以使血细胞回升为目的, 而且因肝癌介入治疗需多次重复, 脾栓塞范围可以较小和分次进行。血液系统疾病引起的脾功能亢进, 栓塞范围应最大。小儿患者^[20]因代谢旺盛, 脾脏组织梗死后修复较快, 与成人病情相同者应多栓塞10%。精确控制栓塞范围的方法, 目前尚未见文献报道。在本组病例中, 我们采用超选择插管技术, 尽量超选择到达脾动脉下极分支, 个别病例可进一步栓塞脾中极或脾上极动脉分支, 栓塞体积一般达到40%-70%, 过别超个75%以上。根据造影资料显示的血管分布范围, 来确定被栓塞区域的方法较为实用。在术中判断靶血管被栓塞的范围, 通过监控血流速度变化来进行估计比较可靠。血流开始变慢大约已经栓塞了整个脾脏的30%-40%, 明显减慢大约已达50%-60%, 血流淤滞可达70%-80%。采用这个方法能较好地控制栓塞的范围及程度。

全部病例栓塞后均有发热、腹痛症状, 与文献报道相符^[7,17]。但本组病例栓塞后发热、腹痛症状较轻, 严重并发症较少, 这与超选择进入靶血管、使用适当的栓塞材料有关。大部分病例超选择到达脾下极动脉分支, 栓塞后脾脏膈面的反

■同行评价

课题设计新颖, 合理, 结果可信, 具有一定的科学意义, 并且在探讨对脾功能亢进的栓塞前后的栓塞技术及术后并发症方面具有一定的临床参考价值, 同时为脾功能亢进栓塞方面的临床研究提供了一些理论依据。

应较轻,严重的并发症较少.使用同轴导管和SP导管这两种微导管,大部分病例均可插到脾下极动脉分支^[16],由于脾下极远离膈面,减少了横膈因受刺激而发生炎性渗出,疼痛症状也得以减轻.由于脾下极周围是网膜,故当发生炎症反应时,周围的腹腔网膜有包裹作用,抑制了炎症反应的扩散^[13].

虽然栓塞方法及栓塞材料在不断改进,但术后仍有部分患者出现高热、剧烈疼痛、胸腔积液等并发症^[21-23].脾下极动脉分支栓塞法能较好避免或减轻栓塞上极动脉常引起的并发症:如膈肌刺激、肺不张、胸膜疼痛等^[24].栓塞前应做好心理护理工作,同时应做好栓塞后的综合治疗.本组发现,肝功能较差合并腹水的患者,栓塞后容易发生腹膜炎或胸膜炎,腹水和胸水的产生较快,故在选择病例时应严格掌握适应证.腹水较多、门脉高压明显、脾脏巨大的患者不宜行脾动脉栓塞治疗,行脾切除术较好;对于肝功能较差、凝血功能严重障碍、高龄和伴肝癌的脾功能亢进患者宜行脾动脉栓塞治疗^[25].随着栓塞程度的增加,术后反应加重,并发症也随之增加.栓塞程度控制在60%-70%可有效治疗肝硬化脾功能亢进,分次栓塞可减轻术后反应、减少并发症^[19].与该组病例实验结果一致.

食管胃底静脉曲张处容易发生破裂,导致上消化道大出血,降低门静脉压力能有效防止食管胃底静脉破裂出血^[26-27].35%的血流量来源于脾静脉,脾栓塞能导致脾组织广泛灶性梗死,最终被纤维组织所代替,破坏了脾内血管床,从而能有效降低脾动脉和脾静脉的血流,缓解门静脉的压力,进一步缓解胃底食管静脉的压力,在一定的程度上降低了出血的风险^[28-30].本组病例已观察到栓塞后食管胃底静脉曲张程度发生明显改变的情况.

由于研究单位条件所限,本组未设随机对照.栓塞过程中利用观察血流变化情况来估算脾栓塞范围的方法也较粗略.有一些患者同时服用好几种口服药物进行治疗,这些药物对患者的血象和脾栓塞效果有何影响亦不得而知.

总之,改进栓塞技术及选择恰当的栓塞剂对治疗脾功能亢进,改善血象、提高机体免疫力,防止上消化道出血有积极的临床意义.

4 参考文献

- 1 Moreno A, Barcena R, Blazquez J, Quereda C, Gil-Grande L, Sanchez J, Moreno L, Perez-Elias

- MJ, Antela A, Moreno J, del Campo S, Moreno S. Partial splenic embolization for the treatment of hypersplenism in cirrhotic HIV/HCV patients prior to pegylated interferon and ribavirin. *Antivir Ther* 2004; 9: 1027-1030
- 2 Palsson B, Hallen M, Forsberg AM, Alwmark A. Partial splenic embolization: long-term outcome. *Langenbecks Arch Surg* 2003; 387: 421-426
- 3 Berceli SA. Hepatic and splenic artery aneurysms. *Semin Vasc Surg* 2005; 18: 196-201
- 4 姜永能,包颜明.脾动脉栓塞材料的临床运用.影像诊断与介入放射学 2002; 11: 44
- 5 Romano M, Giojelli A, Capuano G, Pomponi D, Salvatore M. Partial splenic embolization in patients with idiopathic portal hypertension. *Eur J Radiol* 2004; 49: 268-273
- 6 Liu B, Xu RY, Qiu WS, Lin N, Chen TF, Huang FZ, Liu XY. Treatment of portal hypertension by endoscopic esophageal ligation of varicose veins combined with partial splenic embolization. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 2003; 41: 721-723
- 7 Sakai T, Shiraki K, Inoue H, Sugimoto K, Ohmori S, Murata K, Takase K, Nakano T. Complications of partial splenic embolization in cirrhotic patients. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 388-391
- 8 Pereira-Sampaio MA, Marques-Sampaio BP. Anatomical study and proportional analysis of the pig spleen arterial segments. *Cells Tissues Organs* 2006; 182: 32-34
- 9 彭珍山,欧阳四新,谭建国,杨爱华,刘进才.部分性脾栓塞术的解剖学.实用放射学杂志 2005; 21: 861-864
- 10 Perisic MD, Culafic DjM, Kerkez M. Specificity of splenic blood flow in liver cirrhosis. *Rom J Intern Med* 2005; 43: 141-151
- 11 Cherukuri M, Pershad A. Late spontaneous epigastric arterial bleeding associated with abciximab: successful percutaneous treatment with coil gel-foam embolization. *J Invasive Cardiol* 2002; 14: 692-693
- 12 Zou YH. Experimental canine hepatic artery embolization with polyvinyl alcohol microspheres. *Zhonghua Fang She Xue Za Zhi* 1989; 23: 330-332
- 13 Fu RQ, Xue YH, Xu TW, Yang WH. Fundamental studies on the intermediate layer of a bipolar membrane part IV. Effect of polyvinyl alcohol (PVA) on water dissociation at the interface of a bipolar membrane. *J Colloid Interface Sci* 2005; 285: 281-287
- 14 朱康顺,单鸿,李征然,孟晓春,沈新颖,黄明声,姜在波,关守海. PVA颗粒作为栓塞材料在部分性脾栓塞术中的应用评价.介入放射学杂志 2004; 13: 19-22
- 15 Chun MK, Sah H, Choi HK. Preparation of mucoadhesive microspheres containing antimicrobial agents for eradication of *H pylori*. *Int J Pharm* 2005; 297: 172-179
- 16 甄江涛,刘丙木.微导管栓塞术在部分脾栓塞中的运用.介入放射学杂志 2002; 11: 457-458
- 17 时冰,朱晓玲.部分脾栓塞术后的预防及处理.大连医科大学学报 2005; 27: 119-119, 131
- 18 N'Kontchou G, Seror O, Bourcier V, Mohand D, Ajavon Y, Castera L, Grando-Lemaire V, Ganne-Carrie N, Sellier N, Trinchet JC, Beaugrand M. Partial splenic embolization in patients with cirrhosis: efficacy, tolerance and long-term outcome in 32 patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 179-184
- 19 朱康顺,单鸿,李征然,沈新颖,孟晓春,关守海,姜在波,黄明声.部分性脾栓塞术治疗肝硬化脾功能亢进的

- 远期疗效观察. 中华放射学杂志 2004; 38: 732-736
- 20 Watanabe Y, Todani T, Noda T. Changes in splenic volume after partial splenic embolization in children. *J Pediatr Surg* 1996; 31: 241-244
- 21 刘方军, 刘智惠. 脾部分栓塞术后门脉血流量变化及临床疗效观察. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1474-1475
- 22 秦建平, 蒋明德, 汪庆华, 李小安, 曾维政, 徐辉, 顾明. 部分脾栓塞治疗肝硬化并发门脉高压及脾功能亢进症. 世界华人消化杂志 2002; 10: 860-861
- 23 刘闽华, 周汝明. 脾动脉综合征的临床观察. 介入放射学杂志 2003; 19: 23-24
- 24 谢步东, 刘启瑜, 王东, 林华, 肖成明, 雷作强, 廖丽萍. 肝硬化门静脉高压继发脾功能亢进症的介入治疗. 实用放射学杂志 2003; 19: 1124-1126, 1135
- 25 卢武胜, 贺庆, 郑志勇, 吴少平, 徐大伟. 脾动脉栓塞与脾切除的对比分析. 介入放射学杂志 2006; 15: 399-401
- 26 朱晓玲, 刘瑞雪, 佟晗, 李胜息, 陈海鸥, 张向红, 李艳, 杨立. 部分脾栓塞术治疗肝硬化、脾功能亢进50例. 世界华人消化杂志 2002; 10: 980-982
- 27 李伯帆, 赵宏. 部分性脾动脉栓塞治疗肝硬化脾功能亢进30例. 世界华人消化杂志 2002; 10: 1343-1344
- 28 N'Kontchou G, Seror O, Bourcier V, Mohand D, Ajavon Y, Castera L, Grando-Lemaire V, Ganne-Carrie N, Sellier N, Trinchet JC, Beaugrand M. Partial splenic embolization in patients with cirrhosis: efficacy, tolerance and long-term outcome in 32 patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 179-184
- 29 Han MJ, Zhao HG, Ren K, Zhao DC, Xu K, Zhang XT. Partial splenic embolization for hypersplenism concomitant with or after arterial embolization of hepatocellular carcinoma in 30 patients. *Cardiovasc Intervent Radiol* 1997; 20: 125-127
- 30 杨建军. 部分脾动脉栓塞术治疗肝炎肝硬化脾功能亢进症36例临床分析. 实用肝脏病杂志 2006; 9: 49-52

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 •

欢迎订阅 2007 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。

《世界华人消化杂志》综合介绍以下内容: 消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化护理、消化医学影像、消化病理、消化预防医学、消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊。

《世界华人消化杂志》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。

二氢嘧啶脱氢酶在胃癌中的研究现状

鲁明骞, 徐光川

■背景资料

二氢嘧啶脱氢酶是5-FU分解代谢的起始酶和限速酶, 在5-FU的治疗过程中起着重要的作用, 研究发现, 二氢嘧啶脱氢酶与5-FU在胃癌治疗中的消除率、疗效和毒副反应密切相关。

鲁明骞, 三峡大学第一临床医学院, 湖北省宜昌市中心人民医院肿瘤内科 湖北省宜昌市 443003

徐光川, 华南肿瘤学国家重点实验室, 中山大学肿瘤防治中心内科 广东省广州市 510060

通讯作者: 鲁明骞, 443003, 湖北省宜昌市夷陵路127号, 湖北省宜昌市中心人民医院肿瘤内科. Lumingqian001@163.com

收稿日期: 2006-09-08 接受日期: 2006-09-25

摘要

5-FU是治疗胃癌最基本的化疗药物之一, 二氢嘧啶脱氢酶(dihydropyrimidine dehydrogenase, DPD)是5-FU分解代谢的起始酶和限速酶, 在5-FU的治疗过程中起着重要的作用, 肿瘤组织中DPD表达上调可加速5-FU的分解, 使5-FU在形成细胞毒作用的核苷之前代谢成无抗癌活性的代谢产物, 减少了肿瘤部位的药物浓度, 降低了抗癌效果。而外周血DPD含量增高, 导致5-FU在血浆中浓度的变化, 从而引起毒副反应的发生。

关键词: 二氢嘧啶脱氢酶; 胃癌; 化疗

鲁明骞, 徐光川. 二氢嘧啶脱氢酶在胃癌中的研究现状. 世界华人消化杂志 2006;14(34):3290-3293

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3290.asp>

0 引言

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 虽然西方国家胃癌死亡率明显下降, 但我国仍呈上升趋势, 发病率占恶性肿瘤的第二位, 死亡率占第一位。手术是胃癌的首选治疗手段, 但由于早期诊断率较低, 约60%-70%的患者确诊时已表现为局部复发或远处转移, 因此化疗在胃癌治疗中越来越受到广泛重视。5-氟尿嘧啶(5-FU)是治疗胃癌最基本的化疗药物之一, 近来研究发现, 二氢嘧啶脱氢酶(dihydropyrimidine dehydrogenase, DPD)与5-FU在胃癌治疗中的消除率、疗效和毒副反应密切相关。

1 DPD的分布

DPD广泛分布于各种正常组织, 以肝脏和外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)中分布最多, 在肿瘤组织、炎症组织中

也有分布^[1]。是由两个相同的亚基与一个相对分子质量为105 kDa的分子组成, 是一个高二聚体酶, 包括黄素腺嘌呤二核苷酸、黄素单核苷酸、铁1硫中心。被定位于染色体1q22的基因(DPD)编码, 包括23个外显子, 可转录为一种含1025个氨基酸的蛋白。他是5-FU代谢失活的限速酶, 5-FU吸收后约80%-90%在肝脏中不断代谢生成二氢氟尿嘧啶(FUH2), 进而在其他相关酶的作用下生成 α -氟 β -丙氨酸、尿素、氨和二氧化碳并排出体外, 使药物失去活性, 从而减少了药物蓄积, 降低了5-FU大量掺入到正常组织细胞中产生细胞毒作用。

2 DPD的检测方法

DPD的检测方法包括DPD活性的检测、DPD蛋白表达、DPD mRNA的表达。这些检测方法又包括血液和组织DPD的检测。

2.1 血液DPD活性的检测 (1)直接法: 应用放射酶免法测定PBMC中DPD活性, 以每毫克蛋白每分钟能代谢5-FU生成皮摩尔的二氢尿嘧啶(H₂U)表示, 单位: pmol/(min·mg)。Etienne *et al*^[2]检测了185例恶性肿瘤患者DPD活性, 95%可信区间为65-559 pmol/(min·mg), 中位数为222 pmol/(min·mg)。DPD活性<100 pmol/(min·mg)的患者接受5-FU化疗时会出现毒性。(2)间接法: DPD可将血浆中的内源性尿嘧啶(U)降解为H₂U, 因此, H₂U/U比值可间接反应DPD的活性。

2.2 组织中DPD活性的检测 可通过免疫组化和酶联免疫吸附实验来测定。Hotta *et al*^[3]用ELISA法测定术前胃癌患者组织中的胸苷磷酸化酶(TP)与DPD含量, 可为后期选择治疗提供指导意义。

2.3 DPD蛋白表达 用DPD mAb进行免疫组化来检测细胞内DPD的表达。Ishikawa *et al*^[4]采用此方法测定DPD活性范围为3.6-99.8 pmol/(min·mg), 但肿瘤组织与非肿瘤组织中的活性无差异。

2.4 DPD mRNA的表达 应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)来测定DPD mRNA水平。Ishikawa *et al*^[4]

采用此方法测定胃癌组织中的DPD mRNA水平范围为0.014-7.22 pmol/(min·mg), 低DPD mRNA水平预示肿瘤对5-FU更敏感. Yoshinare *et al*^[5]研究认为DPD酶活性及mRNA表达与肿瘤对5-FU化疗敏感性密切相关. 另外, 有人通过测定尿液中尿嘧啶含量来预测DPD活性, 作为预测和预防5-FU毒副作用的一种方法^[6-7].

3 DPD缺失的分子机制

近年DPD活性与DPD等位基因变化之间的研究日益增多, 认为DPD缺失可能与DPD等位基因变化有关. Wei *et al*^[8]1996年首次发现二氢嘧啶脱氢酶基因(DPYD) 165 bp片段丢失会导致5-FU产生毒副作用, 其中14号外显子处的G→A突变是导致DPD活性低下从而产生细胞毒性的根本原因. 295-298delTCAT, 1897delC, T85C, C703T, G2657A, G2983T等基因突变也与DPD活性降低或缺失有关, 但A1627G和G2194A位点的基因突变并不引起DPD活性的降低和5-FU产生细胞毒性作用^[9]. 此外, DPD外显子14缺失突变的携带者, 在使用5-FU治疗时, 发生致命性骨髓抑制的风险也显著增加^[10].

4 DPD与临床

DPD活性与患者的人种、性别、年龄、肿瘤部位、分期、分化、病理类型无关^[11]. 但也有学者研究认为, 肿瘤分化程度与DPD表达水平有关, 未分化型肿瘤组织比分化型显著高表达($P<0.05$), 有统计学意义^[12-13]. Yoshida *et al*^[14]采用免疫组化法测定23例肠癌和7例胃癌患者肿瘤组织和正常组织中DPD活性和TP水平, DPD活性在肠癌肿瘤组织中显著减少($P<0.01$), 但胸腺嘧啶核苷酸合成酶(TS)却显著增加($P<0.01$), 在胃癌中却没有差异, 各有3例(42.9%)患者高表达. Nakayama *et al*^[15]采用ELISA法测定111例恶性肿瘤患者TP和DPD的表达水平, 却得出了完全相反的结论, 其中30例胃癌和81例肠癌, DPD在胃癌组织中与正常组织相比高表达, 在肠癌中表达水平完全相同, DPD在胃癌中的表达水平远高于肠癌组织. Nozawa *et al*^[16]使用免疫组化法测定胃癌患者DPD的表达水平, 发现DPD指数与肿瘤进展及其他临床病理因素均无关. Ichikawa *et al*^[13]用PCR技术测定DPD在肿瘤组织中的表达与临床病理因素也无关. DPD是5-FU分解代谢的起始酶和限速酶, DPD活性的高低

与5-FU被清除的速度和量密切相关, 导致5-FU在血浆中浓度的变化, 从而引起毒副作用的发生. 但Di *et al*^[17]研究认为DPD活性与5-FU的严重毒性反应却无关. DPD决定了5-FU代谢速度, DPD表达上调可加速5-FU在肿瘤组织中的分解, 会使5-FU在形成细胞毒作用的核苷之前代谢成无抗癌活性的代谢产物5-氟-β-丙氨酸, 减少了肿瘤部位的药物浓度, 降低了抗癌效果, 进一步引起耐药性的发生. Terashima *et al*^[18-20]使用放免法测定140例胃癌患者DPD活性, 发现其水平与人体对5-FU反应的敏感性相关, 是其非常重要的预测因素, DPD活性越低, 肿瘤对5-FU越敏感. 在胃癌中, DPD活性低的肿瘤对5-FU更敏感, TP/DPD比值越高, 5-FU化疗效果越好^[21]. Takiguchi *et al*^[22]研究25例胃癌术后接受化疗的患者, 48%(12/25)对化疗有效(包括完全缓解和部分缓解). DPD活性检测6例为DPD高活性, 19例为低活性. 分析6例DPD高活性患者均属无效者, DPD低活性组中有12例对化疗有效. Kubota用DPD mRNA来预测肿瘤5-FU的敏感性^[23]. DPD与预后的关系Napieralski *et al*^[24]用PCR定量分析了7种与治疗相关性基因: TS, DPD, TP与DDP相关基因: ERCC1, ERCC4, KU80, GADD45A, 研究在进展性胃癌新辅助化疗中各个基因单独表达和联合表达与临床的关系, 结果显示, 高DPD水平常与患者治疗无反应和总生存有关. Nishna *et al*^[25]研究TP/DPD在转移性胃癌中的临床意义时, 发现高比值组与低比值组的中位生存时间分别为300 d和183 d, 有统计学意义($P<0.05$). DPD缺失会引起5-FU产生毒性. Gamelin *et al*^[26]根据H2U/U值来调整5-FU的剂量, 从而减少毒副作用的发生, 实现个体化用药. 有学者根据TP/DPD值来预测5'-脱氧5-氟胞苷(5'-DFUR)和卡倍他滨的疗效^[25]. DPD抑制剂的研究目前较成熟, 因为内脏中DPD活性越高, 导致5-FU在体内快速代谢, 减少了肿瘤组织对药物的吸收和非线性药代动力学^[27]. Eniluracil可100%的灭活DPD, 从而可减少5-FU的用量^[28]. S-1是5-氯-2, 4二氢嘧啶(CDHP)、替加氟(FT)和乳清酸钾(OXO)以0.4 : 1 : 1比例的复合制剂, 其中CDHP是DPD的抑制剂, 从而维持血中和肿瘤内的5-FU持续浓度^[29]. Shimizu *et al*^[30]用S-1一线治疗61例胃硬癌患者, 在DPD阳性组和阴性组中的反应率为45.5%, 10%($P<0.01$), 但中位生存为364 d和406 d, 无统计学意义($P = 0.626$). Usuki *et al*^[31]

■同行评价

本文综述了二氢嘧啶脱氢酶与胃癌的关系, 有一定的科学性、可读性, 但综述内容需要进一步补充和调整.

研究了DIF(DPD inhibitory fluoropyrimidines)疗效与DPD关系,在可评价的27例胃癌患者中,高DPD活性患者有效率为17%(2/12),低活性者为33%(5/15)。在低DPD活性患者中,非DIF药物疗效为无变化(NC)17%(16例),其余表现为进展(PD);优氟啉(UFT)疗效全部5例患者均为PD;而S-1的有效率为44%(7/16),NC为25%(4/16)。在高DPD活性患者中,非DIF(3例)和UFT(3例)的疗效均为PD,而S-1的缓解(PR)为33%(2/6),NC及以上疗效为67%(4/6),故推荐使用S-1而非优氟啉。

DPD与5-FU化疗毒性与敏感性的研究越来越深入,这将为肿瘤的个体化治疗提供一种较好的理论依据,他将指导临床合理选择用药和合适的用药剂量。同时,开发新一代DPD抑制剂将提高化疗效果,减少毒副反应和耐药性的发生。

5 参考文献

- Guimbaud R, Guichard S, Dusseau C, Bertrand V, Aparicio T, Lochon I, Chatelut E, Couturier D, Bugat R, Chaussade S, Canal P. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity in normal, inflammatory and tumour tissues of colon and liver in humans. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000; 45: 477-482
- Etienne MC, Lagrange JL, Dassonville O, Fleming R, Thyss A, Renee N, Schneider M, Demard F, Milano G. Population study of dihydropyrimidine dehydrogenase in cancer patients. *J Clin Oncol* 1994; 12: 2248-2253
- Hotta T, Taniguchi K, Kobayashi Y, Johata K, Sahara M, Naka T, Watanabe T, Ochiai M, Tanimura H, Tsubota YT. Preoperative endoscopic analysis of thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase in gastrointestinal cancer. *Oncol Rep* 2004; 11: 1233-1239
- Ishikawa Y, Kubota T, Otani Y, Watanabe M, Teramoto T, Kumai K, Takechi T, Okabe H, Fukushima M, Kitajima M. Thymidylate synthetase and dihydropyrimidine dehydrogenase levels in gastric cancer. *Anticancer Res* 1999; 19: 5635-5640
- Yoshinore K, Kubota T, Watanabe M, Wada N, Nishibori H, Hasegawa H, Kitajima M, Takechi T, Fukushima M. Gene expression in colorectal cancer and in vitro chemosensitivity to 5-fluorouracil: a study of 88 surgical specimens. *Cancer Sci* 2003; 94: 633-638
- Morimoto S, Shono Y, Tsuji T, Makihara K, Kawato N, Hachino Y, Mishima H, Tsujinaka T, Tabuse K. Support of TS-1, 5-FU preparation containing potent DPD inhibitor by determination of urinary uracil/serum 5-FU clearance. *Gan To Kagaku Ryoho* 2003; 30: 2083-2089
- Kobayashi K, Sumi S, Kidouchi K, Mizuno I, Mohri N, Fukui T, Akamo Y, Takeyama H, Manabe T. A case of gastric cancer with decreased dihydropyrimidine dehydrogenase activity. *Gan To Kagaku Ryoho* 1998; 25: 1217-1219
- Wei X, McLeod HL, McMurrough J, Gonzalez FJ, Fernandez-Salguero P. Molecular basis of the human dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and 5-fluorouracil toxicity. *J Clin Invest* 1996; 98: 610-615
- Wei X, Elizondo G, Sapone A, McLeod HL, Raunio H, Fernandez-Salguero P, Gonzalez FJ. Characterization of the human dihydropyrimidine dehydrogenase gene. *Genomics* 1998; 51: 391-400
- Raida M, Schwabe W, Hausler P, Van Kuilenburg AB, Van Gennip AH, Behnke D, Hoffken K. Prevalence of a common point mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) gene within the 5'-splice donor site of intron 14 in patients with severe 5-fluorouracil (5-FU)-related toxicity compared with controls. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2832-2839
- McLeod HL, Sludden J, Murray GI, Keenan RA, Davidson AI, Park K, Koruth M, Cassidy J. Characterization of dihydropyrimidine dehydrogenase in human colorectal tumours. *Br J Cancer* 1998; 77: 461-465
- Nakata B, Muguruma K, Yamagata S, Yukimoto K, Maeda K, Nishiguchi Y, Ohira M, Kato Y, Hirakawa K. Differences in dihydropyrimidine dehydrogenase activities between gastric and colorectal cancer. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 60-64
- Ichikawa W, Takahashi T, Suto K, Nihei Z, Shirota Y, Shimizu M, Sasaki Y, Hirayama R. Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase gene expression in relation to differentiation of gastric cancer. *Int J Cancer* 2004; 112: 967-973
- Yoshida T, Shimooki O, Baba Y, Abe T, Sugai T, Nakamura S. Assessment of dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase expression in gastric carcinoma and colonic carcinoma. *Gan To Kagaku Ryoho* 2005; 32: 183-187
- Nakayama Y, Inoue Y, Nagashima N, Katsuki T, Matsumoto K, Kadowaki K, Shibao K, Tsurudome Y, Hirata K, Sako T, Nagata N, Itoh H. Expression levels of thymidine phosphorylase (TP) and dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) in patients with gastrointestinal cancer. *Anticancer Res* 2005; 25: 3755-3761
- Nozawa H, Tsukui H, Nishida K, Yakumaru K, Nagawa H, Sekikawa T. Dihydropyrimidine dehydrogenase expression in preoperative biopsy and surgically resected specimens of gastric carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002; 49: 267-273
- Di Paolo A, Danesi R, Falcone A, Cionini L, Vannozzi F, Masi G, Allegrini G, Mini E, Bocci G, Conte PF, Del Tacca M. Relationship between 5-fluorouracil disposition, toxicity and dihydropyrimidine dehydrogenase activity in cancer patients. *Ann Oncol* 2001; 12: 1301-1306
- Terashima M, Irinoda T, Fujiwara H, Nakaya T, Takagane A, Abe K, Yonezawa H, Oyama K, Inaba T, Saito K, Takechi T, Fukushima M. Roles of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in tumor progression and sensitivity to 5-fluorouracil in human gastric cancer. *Anticancer Res* 2002; 22: 761-768
- Terashima M, Fujiwara H, Takagane A, Abe K, Irinoda T, Nakaya T, Yonezawa H, Oyama K, Saito K, Kanzaki N, Ohtani S, Nemoto T, Hoshino Y, Kogure M, Gotoh M. Prediction of sensitivity to fluoropyrimidines by metabolic and target enzyme activities in gastric cancer. *Gastric Cancer* 2003; 6 Suppl 1: 71-81
- Terashima M, Fujiwara H, Takagane A, Abe K, Araya M, Irinoda T, Yonezawa H, Nakaya

- T, Oyama K, Takahashi M, Saito K. Role of thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase in tumour progression and sensitivity to doxifluridine in gastric cancer patients. *Eur J Cancer* 2002; 38: 2375-2381
- 21 Inada T, Ogata Y, Kubota T, Tomikawa M, Yamamoto S, Andoh J, Ozawa I, Hishinuma S, Shimizu H, Kotake K. 5-fluorouracil sensitivity and dihydropyrimidine dehydrogenase activity in advanced gastric cancer. *Anticancer Res* 2000; 20: 2457-2462
- 22 Takiguchi N, Koda K, Ooshima H, Oda K, Suzuki H, Ishii R, Miyazaki M. Dihydropyrimidine dehydrogenase-related enzymes predict efficacy and adverse reactions of UFT1+cisplatin neoadjuvant chemotherapy for gastric cancer. *Anticancer Drugs* 2002; 13: 411-416
- 23 Kubota T. Recent advance in gastric cancer chemotherapy. *Gan To Kagaku Ryoho* 2000; 27: 2043-2047
- 24 Napieralski R, Ott K, Kremer M, Specht K, Vogelsang H, Becker K, Muller M, Lordick F, Fink U, Rudiger Siewert J, Hofler H, Keller G. Combined GADD45A and thymidine phosphorylase expression levels predict response and survival of neoadjuvant-treated gastric cancer patients. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3025-3031
- 25 Nishina T, Hyodo I, Miyaike J, Inaba T, Suzuki S, Shiratori Y. The ratio of thymidine phosphorylase to dihydropyrimidine dehydrogenase in tumour tissues of patients with metastatic gastric cancer is predictive of the clinical response to 5'-deoxy-5-fluorouridine. *Eur J Cancer* 2004; 40: 1566-1571
- 26 Gamelin E, Boisdron-Celle M, Guerin-Meyer V, Delva R, Lortholary A, Genevieve F, Larra F, Ifrah N, Robert J. Correlation between uracil and dihydrouacil plasma ratio, fluorouracil (5-FU) pharmacokinetic parameters, and tolerance in patients with advanced colorectal cancer: A potential interest for predicting 5-FU toxicity and determining optimal 5-FU dosage. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1105
- 27 Schoffski P. The modulated oral fluoropyrimidine prodrug S-1, and its use in gastrointestinal cancer and other solid tumors. *Anticancer Drugs* 2004; 15: 85-106
- 28 Ahmed FY, Johnston SJ, Cassidy J, O'Kelly T, Binnie N, Murray GI, van Gennip AH, Abeling NG, Knight S, McLeod HL. Eniluracil treatment completely inactivates dihydropyrimidine dehydrogenase in colorectal tumors. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2439-2445
- 29 Meropol NJ, Niedzwiecki D, Hollis D, Schilsky RL, Mayer RJ. Phase II study of oral eniluracil, 5-fluorouracil, and leucovorin in patients with advanced colorectal carcinoma. *Cancer* 2001; 91: 1256-1263
- 30 Shimizu T, Yamada Y, Yasui H, Shirao K, Fukuoka M. Clinical application of immunoreactivity of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) in gastric scirrhous carcinoma treated with S-1, a new DPD inhibitory fluoropyrimidine. *Anticancer Res* 2005; 25: 2997-3001
- 31 Usuki H, Ishimura K, Yachida S, Hagiike M, Okano K, Izuishi K, Karasawa Y, Goda F, Maeta H. Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) activity in gastric cancer tissue and effect of DPD inhibitory fluoropyrimidines. *Gastric Cancer* 2003; 6 Suppl 1: 66-70

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 •

中国学术期刊综合引证报告(2006)

本刊讯 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\临床科学\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].

慢性HBV感染免疫治疗新进展

梁雪松, 万谟彬

■背景资料

HBV感染慢性化率高, 且慢性感染者易进展为肝硬化和肝细胞癌。免疫调节治疗策略是通过调节特异性或非特异性免疫而提高或扩大T细胞对病毒抗原的反应性, 从而发挥免疫调节抗病毒作用。本文从目前研究较深入的几种慢性HBV感染免疫治疗方向如过继性免疫、细胞因子(IL-2, IL-12)免疫调节治疗、口服免疫调节剂(左旋咪唑及HBV外膜蛋白)、胸腺素 α -1、PEG干扰素- α 和治疗性疫苗等进行了系统的综述。

梁雪松, 万谟彬, 第二军医大学附属长海医院感染科 上海市200433

通讯作者: 梁雪松, 200433, 第二军医大学附属长海医院感染科。
liangxuesong2000@163.com

电话: 021-25072111 传真: 021-65518368

收稿日期: 2006-09-04 接受日期: 2006-09-28

摘要

慢性HBV感染有发展为肝硬化和肝细胞癌高风险。IFN- α 、拉米夫定、阿德福韦、恩替卡韦是目前批准用于HBV感染的治疗药物。这些药物是防止慢性HBV感染者发展为肝硬化和肝细胞癌的唯一策略。然而, 以发生HBeAg血清转换、血清丙氨酸转氨酶正常和血清HBV DNA水平转阴作为评价疗效标准, 这些药物的治疗效率仅占接受治疗者的20%-30%。应用拉米夫定或阿德福韦长期治疗可能导致药物耐药, 从而导致延长了应用其他核苷类似物治疗的期限。目前抗病毒治疗的缺陷使我们有必要寻找更好的治疗策略。而提高慢性HBV感染者病毒特异性T细胞活性的特异性与非特异性免疫治疗策略为抗HBV感染提供了新的治疗方向。这些免疫治疗策略包括, 过继性HBV免疫、PEG干扰素和治疗性疫苗等。

关键词: 免疫调节治疗; HBV感染

梁雪松, 万谟彬. 慢性HBV感染免疫治疗新进展. 世界华人消化杂志 2006;14(34):3294-3298

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3294.asp>

0 引言

HBV感染相关性肝炎表现为不同程度的肝组织炎症坏死。HBV感染慢性化率高, 成人感染约2%-20%进展为慢性感染, 新生儿或幼年期感染者约95%进展为慢性感染。病毒特异性细胞免疫既是宿主清楚病毒的主要途径, 又是造成宿主肝细胞损伤的主要原因。慢性HBV感染者的免疫特征是Th细胞功能失衡。免疫调节治疗策略是通过调节特异性或非特异性免疫而提高或扩大T细胞对病毒抗原的反应性。其中这些免疫调节策略包括, 过继性HBV免疫、PEG干扰素和治疗性疫苗, 本文主要就相关研究进展做简

要综述。

1 过继性免疫

动物和人体试验都证实, HBV初次感染者可通过骨髓移植(BMT)或输注外周血淋巴细胞(PBLs)从HBV免疫捐献者获得HBV过继免疫, 并发生HBsAg血清转换产生抗HBs^[1-4]。部分慢性HBV感染者也可通过BMT获得HBV过继免疫并清除HBsAg^[5-7]。大样本系列研究发现, 慢性HBV感染者通过移植HLA同源既往感染HBV康复者骨髓而获得HBV过继免疫, 并发生HBsAg清除同获得针对HBcAg的CD4⁺T淋巴细胞活性过继免疫相关, 而并非同针对HBsAg的免疫活性相关^[8]。Lau *et al*^[9]发现只有从自然感染康复者(抗HBs和抗HBc均阳性)获得的过继免疫才可发生HBsAg清除, 而从疫苗诱导免疫者(仅抗HBs阳性)获得过继免疫不能发生HBsAg清除。此外, 进一步的研究发现, 这种现象可能同骨髓捐献者的CD4⁺T细胞系的记忆细胞亚型CD45RO⁺T细胞相关。这些研究结果对实际应用的启示是, 对慢性HBV感染者进行过继免疫治疗时应该包括HBV核衣壳蛋白(或核心抗原的DNA免疫), 从而诱使HBcAg特异性CD4⁺和CD8⁺T细胞。有报道肝移植后可获得HBV过继免疫。在拉米夫定预防治疗的50例HBsAg(+)肝移植患者中21例自发产生了抗HBs, 抗HBs可在移植后平均8 d内检测到。这些患者伴随着HBsAg的很快清除, 这种现象多在接受具有HBV免疫力的器官捐献者中发生。尽管过继免疫是一种有意义的治疗慢性HBV感染的替代方法, 但却伴随着一定的风险。这些风险包括伴随BMT的一切风险及继发感染、静脉闭塞病和移植抗宿主反应等。更严重的也有报道BMT后发生暴发性肝衰竭。因此, 尽管HBV过继免疫是一种可能治疗慢性HBV感染的策略, 但由于这些伴随的风险而受到限制。

2 慢性HBV感染的细胞因子免疫调节治疗

2.1 IL-2 Gianotti *et al*^[10]在应用重组IL-2治疗HIV感染者时发现, 患者发生HBsAg清除, 并产生

抗HBs。但是应用IL-2治疗不合并HIV感染的慢性HBV感染者却未获得相同结果。进一步的随机对照研究也没有发现IL-2和安慰剂组之间有明显差异。另外, IL-2联合IFN- α 2b和单用IFN- α 2b随机对照研究也没有发现两组在血清HBV DNA, HBeAg血清转换或ALT复常方面有差异。而且联合IL-2组副作用明显。所以, 目前尚没有强有力证据证实IL-2对慢性HBV感染有抗病毒作用。

2.2 IL-12 IL-12是一种异二聚体细胞因子, 由抗原递呈细胞产生, 可诱导T细胞和NK细胞产生IFN- γ 和正常的Th1效应。因为IFN- γ 在转基因小鼠中表现出抑制HBV复制的作用, 因此可以推测IL-12可能对慢性HBV感染HBV复制具有抑制作用。Cavanaugh *et al*^[11]证实IL-12 100 ng每天一次, 应用3 d可明显抑制HBV转基因鼠病毒基因复制和表达, 并呈剂量依赖性。更高剂量IL-12可完全清除HBV DNA复制。血清HBV DNA水平也明显下降。应用重组人IL-12治疗46例血清HBV DNA阳性、ALT水平升高慢性HBV感染者发现, 治疗结束和停药12 wk时均可见HBV DNA下降。HBV DNA下降水平同IL-12剂量呈剂量依赖性, 0.5 μ g/kg组为25%, 0.25 μ g/kg组为13%, 0.03 μ g/kg组为7%。0.25 μ g/kg组2例(13.3%)患者发生HBeAg血清转换, 0.5 μ g/kg组3例(18.8%)发生HBeAg血清转换^[12]。尽管早期小规模临床研究提示IL-12对慢性HBV感染具有一定抗病毒作用, 但在作为标准推荐治疗策略应用于临床之前还需进行进一步大规模随机对照临床研究。

2.3 左旋咪唑 Krastev *et al*^[13]在一项包含25例慢性HBV感染者(16例HBeAg+, 9例HBeAg-)的研究中证实, 左旋咪唑具有一定的免疫调节作用, 表现为HBeAg阳性组血清HBV DNA水平下降, 其中3例(18.8%)发生HBeAg血清转换, 25例患者中2例发生HBsAg清除。Karaoglan *et al*^[14]用乙肝疫苗联合左旋咪唑治疗93例慢性HBV感染者, 其中43例为非活动性慢性HBV携带者, 50例为活动性慢性HBV感染者, 研究结果证实, 左旋咪唑联合乙肝疫苗对慢性HBV患者和HBV健康携带者具有治疗作用, 表现为病毒水平下降, HBeAg血清转换和ALT复常, 且没有明显副作用。

2.4 口服免疫调节剂(HBV外膜蛋白) 口服免疫调节剂包括上调或下调对特异性抗原或特定靶位特定抗原的反应性。动物实验证实, 给予低剂量HBsAg+preS1+preS2外膜蛋白可诱导产生外周免疫耐受和下调抗HBV免疫反应。Safadi *et al*^[15]

对口服HBV外膜蛋白(HBsAg+preS1+preS2)安全性和有效性进行了研究, 42例慢性HBV患者中66.6%出现血清HBV DNA明显下降, 30.0%得到肝组织学改善, 26.3% HBeAg转阴, 21.1%发生HBeAg血清转换, 但没有发现患者发生HBsAg血清转换。

2.5 胸腺素 α -1 胸腺素 α -1为一28肽氨基酸多肽, 为胸腺5肽有效成份, 是一种免疫调节剂, 可加速对HBV的清除。体外研究证实, 胸腺素 α -1可加速T细胞成熟和抗原识别。胸腺素 α -1也可刺激IFN和细胞因子分泌, 以及NK细胞介导细胞毒性活性。尽管, 胸腺素 α -1相对于IFN- α 只有轻微副作用, 但其临床效应尚没有定论。有研究用1.6 mg胸腺素 α -1每周2次, 皮下注射, 疗程6 mo。治疗反应标准为血清HBV DNA和HBeAg清除率。治疗18 mo后, 治疗组和对组治疗反应率分别为40.6%和9.4%($P = 0.004$), 但治疗结束时两组治疗反应率没有明显差异^[16]。对5个临床研究353例患者资料进行的meta分析显示, 在生化反应方面治疗组和对组之间没有明显差异, 然而治疗结束、随访6和12 mo时病毒反应差异比率分别为0.56(0.20-1.52), 1.67(0.83-3.37)和2.67(1.25-5.68)。有趣的是在停药后病毒反应率还有进一步升高^[17]。应用低剂量淋巴细胞源IFN联合胸腺素 α -1治疗15例慢性HBV感染者, 治疗12 mo后, 9例(60.0%)出现血清HBV DNA水平转阴和ALT水平正常, 40%患者发生HBsAg清除^[18]。Saruc *et al*^[19]将42例HBeAg阴性病例非随机分为3组, 组1(27例)接受胸腺素 α -1 1.6 mg, 皮下注射, 2/wk, 联合IFN- α 2b 100万U, 皮下注射, 3/wk, 治疗26 wk后继续用IFN- α 2b 100万U治疗26 wk。组2(10例)单用IFN- α 2b治疗2 wk, 组3(15例)接受IFN- α 2b联合拉米夫定治疗52 wk并继续用拉米夫定治疗; 治疗结束后随访6 mo持续存在病毒学反应和生化反应者为持续有效, 不同治疗组持续有效率分别为74.0%、40.0%和26.6%($P = 0.036$)。停药随访18 mo时, 各组持续有效率分别为71.4%、10.0%和20.0%($P = 0.0003$)。综合以上研究结果可见, 胸腺素 α -1可有效抑制HBV病毒复制, 且这种作用可延续至停药后12 mo。

2.6 PEG干扰素- α PEG干扰素是相对于常规干扰素在药代动力学和用药频次上有很大改进的一种干扰素。临床研究结果显示PEG干扰素在治疗慢性乙肝方面显示出了令人鼓舞的效果。早期II期临床研究结果显示PEG干扰素 α -2a(40 kDa)较常规干扰素在抑制HBV方面更有效(HBeAg

■同行评价

本文从目前研究较深入的几种免疫治疗方向进行了系统的综述, 基本上反应了当前慢性乙肝免疫治疗的新动向。文章整体结构清晰, 层次分明, 语言流畅, 具有临床指导意义。

转阴和ALT复常)。然而,随后的PEG干扰素联合拉米夫定研究发现,PEG IFN α -2b(12 kDa)联合拉米夫定较单用PEG干扰素并没有明显提高疗效(此研究没有设立单用拉米夫定对照组)。近期结束的两个III期临床研究分别包括537例HBeAg阴性和814例HBeAg阳性亚裔患者,随机分为PEG IFN α -2a(40 kDa)治疗组和PEG α -2a(40 kDa)联合拉米夫定组及单用拉米夫定组,治疗72 wk停药时,两个研究中的PEGIFN单独治疗或联合拉米夫定治疗组较单用拉米夫定组均获得了较高比例的治疗反应率。且这种反应持续至停药后24 wk。在PEG IFN治疗组和联合拉米夫定组3.4%病例发生HBsAg转阴和或抗HBs血清转换。在整个治疗过程中未见严重副作用发生^[20-23]。关于PEG IFN α -2b(12 kDa)的两个随机对照研究也显示了其在治疗慢性乙肝患者方面具有良好的安全性和有效性。其中一项研究包括266例慢性乙肝患者,研究病例主要是白种人,研究结果显示患者对PEG IFN α -2b(12 kDa)具有很好的耐受性,并有35%患者发生HBeAg阴转,29%患者发生HBsAg血清转换。联合拉米夫定治疗组在治疗结束时获得了较高的HBeAg阴转率(44%),然而在随访至78 wk时两组HBeAg阴转率基本相同。另一项研究包含100例HBeAg阳性病例,治疗方案是一组用PEG IFN α -2b(12 kDa)治疗32 wk后接着用拉米夫定治疗至52 wk,另一组单用拉米夫定治疗52 wk。序贯治疗组持续病毒有效率为36%,而拉米夫定治疗组为14%,治疗结束时干扰素序贯治疗组病毒下降比例明显高于拉米夫定治疗组^[26-28]。

2.7 治疗性疫苗 这是一种打破慢性HBV患者机体免疫耐受状态和激活T细胞免疫反应的治疗策略。应用重组HBsAg颗粒治疗转基因鼠可导致血清HBsAg水平下降和HBeAg转阴,甚至出现抗HBs^[29-31]。小样本临床研究显示,特异性疫苗治疗慢性乙肝患者,50%病例HBV复制水平下降。一项病例对照研究显示,疫苗接种后随访6 mo时,基因疫苗B(Pre-S2/S)组HBeAg血清转换率为13.3%,对照组为3.6%;随访12 mo时两组HBeAg血清转换率分别为18.9%和12.5%。两组均没有发生HBsAg转阴。然而,在一项随机对照研究中,疫苗治疗组并没有表现出高比例HBsAg血清转换,只有3例患者发生HBsAg血清转换,对照组无1例发生HBsAg清除或血清转换^[32-33]。明矾疫苗可以促进抗体产生,并诱发

Th2为主的免疫反应。然而要产生有效的治疗效应,必须有体液和细胞免疫的共同参与,因此,为了提高疫苗的治疗效应可以使用疫苗增强剂MF59。一项小样本研究显示,应用佐剂MF59后13例患者中11例发生了抗HBs血清转换。另一种疫苗佐剂CpG DNA可以刺激Th1反应,产生IL-12和IFN- γ 。转基因鼠研究发现,应用佐剂CpG DNA的疫苗可以诱导血清HBsAg清除和抗HBs血清转换,并伴肝细胞内HBV mRNA下降^[34-35]。T细胞表位多肽疫苗是另一种提高治疗性疫苗活性的方法。Heathcote等应用包含Th细胞表位和细胞毒性T细胞(CTL)表位的多肽疫苗CY-1899治疗19例慢性HBV患者。然而,这种疫苗诱导的CTL反应不足以清除HBV感染。事实上,这种用高剂量疫苗诱导的CTL反应较健康对照组要弱得多。

2.8 DNA疫苗 肌注DNA质粒疫苗使体内表达HBV蛋白成为可能。直接注射DNA疫苗可以诱导机体产生针对所表达抗原的免疫反应,且DNA质粒疫苗可以同时诱导体液免疫和CD8⁺CTL反应。给慢性HBV感染黑猩猩先注射表达HBsAg的DNA质粒,接着应用表达重组HBsAg的金丝雀痘为佐剂,结果血清HBV DNA水平400倍下降,并且HBsAg水平相对稳定。3个感染HBV的黑猩猩免疫接种表达HBcAg抗原的反转录病毒载体后,出现HBeAg血清转换,另外2例黑猩猩始终HBeAg阳性,并且病毒水平未见下降,尽管在其中一例可检测到HBcAg特异性CTL反应^[36-37]。理论上,治疗性疫苗可能有治疗的潜能,但还需要进行大规模临床研究去考证治疗性疫苗的疗效、安全性和毒副作用等。其中最值得考证的问题是,在疫苗激发针对HBV感染肝细胞特异性细胞毒性反应增高时所带来的其他潜在的毒副作用。总之,单用核苷类似物或核苷酸类似物似乎对大部分慢性HBV感染者都不能达到治愈的目标。随着PEG干扰素显示对慢性HBV感染者的良好治疗效果,使得PEG IFN可能在将来慢乙肝治疗指南中占据主要地位。然而,关于哪些患者可以应PEG IFN、疗程以及是否需要同其他免疫调节剂或核苷类似物联合治疗等问题尚需进一步确定。更合理的治疗模式应该是应用HBV特异性免疫治疗,包括治疗性疫苗或DNA疫苗,将来应该进行更多的寻找针对慢性HBV的免疫治疗策略的研究。

4 参考文献

- 1 Ilan Y, Nagler A, Adler R, Naparstek E, Or R, Slavin S, Brautbar C, Shouval D. Adoptive transfer of immunity to hepatitis B virus after T cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Hepatology* 1993; 18: 246-252
- 2 Shouval D, Adler R, Ilan Y. Adoptive transfer of immunity to hepatitis B virus in mice by bone marrow transplantation from immune donors. *Hepatology* 1993; 17: 955-959
- 3 Ilan Y, Nagler A, Shouval D, Ackerstein A, Or R, Kapelushnik J, Adler R, Slavin S. Development of antibodies to hepatitis B virus surface antigen in bone marrow transplant recipient following treatment with peripheral blood lymphocytes from immunized donors. *Clin Exp Immunol* 1994; 97: 299-302
- 4 Ilan Y, Nagler A, Zeira E, Adler R, Slavin S, Shouval D. Maintenance of immune memory to the hepatitis B envelope protein following adoptive transfer of immunity in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26: 633-638
- 5 Ilan Y, Nagler A, Adler R, Tur-Kaspa R, Slavin S, Shouval D. Ablation of persistent hepatitis B by bone marrow transplantation from a hepatitis B-immune donor. *Gastroenterology* 1993; 104: 1818-1821
- 6 Pan CQ, Zhang JX. Natural History and Clinical Consequences of Hepatitis B Virus Infection. *Int J Med Sci* 2005; 2: 36-40
- 7 Lau GK, Lok AS, Liang RH, Lai CL, Chiu EK, Lau YL, Lam SK. Clearance of hepatitis B surface antigen after bone marrow transplantation: role of adoptive immunity transfer. *Hepatology* 1997; 25: 1497-1501
- 8 Lau GK, Suri D, Liang R, Rigopoulou EI, Thomas MG, Mullerova I, Nanji A, Yuen ST, Williams R, Naoumov NV. Resolution of chronic hepatitis B and anti-HBs seroconversion in humans by adoptive transfer of immunity to hepatitis B core antigen. *Gastroenterology* 2002; 122: 614-624
- 9 Lau GK, Liang R, Lee CK, Yuen ST, Hou J, Lim WL, Williams R. Clearance of persistent hepatitis B virus infection in Chinese bone marrow transplant recipients whose donors were anti-hepatitis B core- and anti-hepatitis B surface antibody-positive. *J Infect Dis* 1998; 178: 1585-1591
- 10 Gianotti N, Uberti-Foppa C, Boeri E, Marinelli M, Tambussi G, Finazzi R, Lazzarin A. Hepatitis B surface antigen clearance and appearance of antibodies against hepatitis B surface antigen after treatment with recombinant interleukin 2 in a human immunodeficiency virus-infected patient. *Hepatology* 2000; 32: 1409-1410
- 11 Cavanaugh VJ, Guidotti LG, Chisari FV. Interleukin-12 inhibits hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol* 1997; 71: 3236-3243
- 12 Carreno V, Zeuzem S, Hopf U, Marcellin P, Cooksley WG, Fevery J, Diago M, Reddy R, Peters M, Rittweger K, Rakhit A, Pardo M. A phase I/II study of recombinant human interleukin-12 in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2000; 32: 317-324
- 13 Krastev Z, Jelev D, Antonov K, Alagozian V, Kotzev I. Chronic HBV infection. Immunomodulation with levamisole in viremic HBeAg positive or anti-HBe positive patients-a pilot study. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 3184-3188
- 14 Karaoglan M, Demirci F, Coskun Y, Karaoglan I, Bayraktaroglu Z, Okan V, Karsligil T. Immunomodulation therapy in children with chronic hepatitis B. *J Natl Med Assoc* 2006; 98: 143-147
- 15 Safadi R, Israeli E, Papo O, Shibolet O, Melhem A, Bloch A, Rowe M, Alper R, Klein A, Hemed N, Segol O, Thalenfeld B, Engelhardt D, Rabbani E, Ilan Y. Treatment of chronic hepatitis B virus infection via oral immune regulation toward hepatitis B virus proteins. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2505-2515
- 16 Chien RN, Liaw YF, Chen TC, Yeh CT, Sheen IS. Efficacy of thymosin alpha1 in patients with chronic hepatitis B: a randomized, controlled trial. *Hepatology* 1998; 27: 1383-1387
- 17 Chan HL, Tang JL, Tam W, Sung JJ. The efficacy of thymosin in the treatment of chronic hepatitis B virus infection: a meta-analysis. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 1899-1905
- 18 Rasi G, Mutchnick MG, Di Virgilio D, Sinibaldi-Vallebona P, Pierimarchi P, Colella F, Favalli C, Garaci E. Combination low-dose lymphoblastoid interferon and thymosin alpha 1 therapy in the treatment of chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 1996; 3: 191-196
- 19 Saruc M, Ozden N, Turkel N, Ayhan S, Hock LM, Tuzcuoglu I, Yuceyar H. Long-term outcomes of thymosin-alpha 1 and interferon alpha-2b combination therapy in patients with hepatitis B e antigen (HBeAg) negative chronic hepatitis B. *J Pharm Sci* 2003; 92: 1386-1395
- 20 Lau GK, Piratvisuth T, Luo KX. Peginterferon alfa-2a(40 kDa)(PEGASYS) monotherapy and in combination with lamivudine is more effective than lamivudine monotherapy in HBeAg-positive chronic hepatitis B: results from a large, multinational study. *Hepatology* 2004; 40(Suppl 1): 171A
- 21 Marcellin P, Lau GK, Bonino F, Farci P, Hadziyannis S, Jin R, Lu ZM, Piratvisuth T, Germanidis G, Yurdaydin C, Diago M, Gurel S, Lai MY, Button P, Pluck N. Peginterferon alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2004; 351: 1206-1217
- 22 Wursthorn K, Lutgehetmann M, Dandri M, Volz T, Buggisch P, Zollner B, Longerich T, Schirmacher P, Metzler F, Zankel M, Fischer C, Currie G, Brosgart C, Petersen J. Peginterferon alpha-2b plus adefovir induce strong cccDNA decline and HBsAg reduction in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2006; 44: 675-684
- 23 Sarin SK, Kumar M, Hissar S, Sharma BC. Combination of pegylated interferon and lamivudine for patients with chronic hepatitis B who have failed treatment. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006; 5: 374-380
- 24 Shepherd J, Jones J, Takeda A, Davidson P, Price A. Adefovir dipivoxil and pegylated interferon alfa-2a for the treatment of chronic hepatitis B: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* 2006; 10: iii-iv, xi-xiv, 1-183
- 25 Flink HJ, van Zonneveld M, Hansen BE, de Man RA, Schalm SW, Janssen HL. Treatment with Peginterferon alpha-2b for HBeAg-positive chronic hepatitis B: HBsAg loss is associated with HBV genotype. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 297-303
- 26 Janssen HL, van Zonneveld M, Senturk H, Zeuzem S, Akarca US, Cakaloglu Y, Simon C, So TM, Gerken G, de Man RA, Niesters HG, Zondervan P, Hansen B, Schalm SW. Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised

- trial. *Lancet* 2005; 365: 123-129
- 27 Chan HL, Leung NW, Hui AY, Wong VW, Liew CT, Chim AM, Chan FK, Hung LC, Lee YT, Tam JS, Lam CW, Sung JJ. A randomized, controlled trial of combination therapy for chronic hepatitis B: comparing pegylated interferon-alpha2b and lamivudine with lamivudine alone. *Ann Intern Med* 2005; 142: 240-250
- 28 Chan HL, Hui AY, Wong VW, Chim AM, Wong ML, Sung JJ. Long-term follow-up of peginterferon and lamivudine combination treatment in HBsAg-positive chronic hepatitis B. *Hepatology* 2005; 41: 1357-1364
- 29 Pol S, Nalpas B, Driss F, Michel ML, Tiollais P, Denis J, Brecho C. Efficacy and limitations of a specific immunotherapy in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2001; 34: 917-921
- 30 Zhao LS, Qin S, Zhou TY, Tang H, Liu L, Lei BJ. DNA-base vaccination induces humoral and cellular immune response against hepatitis B virus surface antigen in mice without activation of C-myc. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 239-243
- 31 Oka Y, Akbar SM, Horiike N, Joko K, Onji M. Mechanism and therapeutic potential of DNA-based immunization against the envelope proteins of hepatitis B virus in normal and transgenic mice. *Immunology* 2001; 103: 90-97
- 32 周陶友, 陈敏, 赵连三. 乙肝病毒前S/S抗原的重组表达载体对HBV转基因小鼠的免疫治疗效应. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 844-847
- 33 Yalcin K, Acar M, Degertekin H. Specific hepatitis B vaccine therapy in inactive HBsAg carriers: a randomized controlled trial. *Infection* 2003; 31: 221-225
- 34 Heineman TC, Clements-Mann ML, Poland GA, Jacobson RM, Izu AE, Sakamoto D, Eiden J, Van Nest GA, Hsu HH. A randomized, controlled study in adults of the immunogenicity of a novel hepatitis B vaccine containing MF59 adjuvant. *Vaccine* 1999; 17: 2769-2778
- 35 Davis HL. Use of CpG DNA for enhancing specific immune responses. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 247: 171-183
- 36 Sallberg M, Hughes J, Javadian A, Ronlov G, Hultgren C, Townsend K, Anderson CG, O'Dea J, Alfonso J, Eason R, Murthy KK, Jolly DJ, Chang SM, Mento SJ, Milich D, Lee WT. Genetic immunization of chimpanzees chronically infected with the hepatitis B virus, using a recombinant retroviral vector encoding the hepatitis B virus core antigen. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 1719-1729
- 37 Roy MJ, Wu MS, Barr LJ, Fuller JT, Tussey LG, Speller S, Culp J, Burkholder JK, Swain WF, Dixon RM, Widera G, Vessey R, King A, Ogg G, Gallimore A, Haynes JR, Heydenburg Fuller D. Induction of antigen-specific CD8+ T cells, T helper cells, and protective levels of antibody in humans by particle-mediated administration of a hepatitis B virus DNA vaccine. *Vaccine* 2000; 19: 764-778

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 •

《世界华人消化杂志》简介

《世界华人消化杂志》创刊于1993-01-15, 原刊名《新消化病学杂志》, 1999-03-25经国家科学技术部和新闻出版总署批准更名为《世界华人消化杂志》, 国科发财字[1999] 071号, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内外公开发行的综合性消化病学类学术期刊。2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001071号。《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊和中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》, 俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录。《世界华人消化杂志》综合介绍消化病学前沿基础与临床研究的发现, 覆盖消化病学领域中经临床实验证明的技术进展。从1993-2005《世界华人消化杂志》发表的文章可以在线<http://www.wjgnet.com>免费阅读全文。《世界华人消化杂志》综合介绍以下领域的内容: 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。

脑-肠互动在肠易激综合征发病中的作用

王敬东

王敬东, 青岛经济技术开发区第一人民医院消化科 山东省
青岛市 266555

通讯作者: 王敬东, 266555, 山东省青岛市, 青岛经济技术开发区
第一人民医院消化科. wjd0532@126.com

收稿日期: 2006-08-10 接受日期: 2006-09-11

摘要

肠易激综合征(IRS)发病机制尚未完全阐明. 目前研究认为, 其发病机制与胃肠动力异常、内脏高敏感性、肠道感染、脑-肠互动、脑肠肽和受体以及社会心理因素有关, 而脑-肠互动在IRS发病中的作用引起研究者的普遍关注, IRS上述的发病因素均可整合到脑-肠互动框架中进行阐述, 脑-肠互动是研究IRS发病机制的切入点. 本文从脑-肠轴及脑-肠互动, IRS发病因素与脑-肠互动以及临床治疗研究3个方面阐述脑-肠互动在IRS发病中的重要作用, 以揭示脑-肠互动病理生理实质.

关键词: 肠易激综合征; 脑-肠互动; 发病机制; 神经递质; 脑-肠肽

王敬东. 脑-肠互动在肠易激综合征发病中的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(34):3299-3301

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3299.asp>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IRS)是功能性胃肠病中研究最活跃的一种疾病, 病因和其发病机制尚未完全阐明. 胃肠动力紊乱是最早关注的发病机制, 曾被认为是IRS最基本的病理生理异常, 但近来进一步研究却发现, 部分IRS患者的肠道症状并无动力异常, 而是正常运动的感觉异常所致. 深入研究显示, IRS的发病还与内脏敏感性增高、肠道感染、脑肠互动、脑肠肽和受体变化以及社会生理因素等^[1]有关. 近年来, 随着人们对IRS的认识从单一生物模式向生物-心理-社会模式转变, 特别是“神经胃肠病学”(neurogastroenterology)概念的提出和发展^[2], 越来越多的研究试图把胃肠道本身与中枢通过脑-肠轴相联系, 把与IRS发病相关的诸因素整合起来, 放在脑-肠互动的框架内进行研究^[3].

1 脑-肠轴及脑-肠互动

神经胃肠病学研究发现, 胃肠道功能受自主神经-肠神经系统(ENS)的调控, ENS可自主调节、自我控制, 不受大脑中枢神经系统(CNS)和脊髓神经元的直接控制, 但ENS和CNS通过交感和副交感神经通路连接, ENS是一个分布于胃肠道的巨大网络, 包括感觉神经元、中间神经元和运动(包括兴奋性和运动性)神经元, 他可能含有传递自CNS至胃肠道的传入神经纤维和传递自胃肠道至CNS的传出神经纤维, 并可能通过各种神经递质(脑-肠肽)的释放和传递把内脏与CNS联系起来的重要神经内分泌网络^[4], 这就是脑-肠轴. 大鼠伤害性胃扩张后, 其延髓和胸髓Fos蛋白与降钙素基因相关肽(CGRP)表达均增强, 二者有显著相关性, 说明胃扩张刺激可兴奋皮质下中枢, CGRP在内脏刺激信号的传入起重要作用^[5]. 兰玲 *et al*^[6]研究发现, 焦虑大鼠可出现内脏敏感性增高, 且血清皮质酮(CORT)水平增高, 说明其发生机制可通过下丘脑-垂体-肾上腺皮质系统(HPA轴)来实现. 外源性信息(如视觉、嗅觉等)或内感性信息(如情感、思维等)通过CNS传出神经冲动影响胃肠道感知, 运动及分泌功能, 而内脏感应(如伤害感受等)也通过ENS影响CNS感知、情绪和行为, 这种胃肠道与CNS之间相互联系、相互作用的关系称之为脑-肠互动. 所以说脑-肠互动是由ENS和各种神经递质介导的, 将内外部信息整合在一起从而相互影响胃肠道及CNS功能的病理生理模式^[7], 除胃肠道神经-内分泌系统外, 肠道免疫系统失调也参与了IRS的发病^[8]. 董文珠 *et al*^[9]研究发现, IRS患者末端回肠、回盲部及升结肠黏膜肥大细胞(MC)数量增多和活性增强, 结肠黏膜脑肠肽表达增强, 表明肠免疫系统与ENS之间通路的活化可能参与了IRS的发病. 这样就可能从脑-肠之间的神经内分泌免疫功能失调的角度去研究揭示IRS发病机制的本质. 目前研究认为, 脑-肠之间的联系可能是通过分泌一些神经递质, 在CNS与ENS以及胃肠道效应细胞间传递而实现, 这些神经递质不但存在于ENS也存在于CNS, 称为脑-肠

■背景资料

IRS是目前临床上的常见病和多发病, 严重影响人类的生活质量, 其发病机制尚未完全阐明, 目前认为与胃肠动力异常、内脏高敏感性、肠道感染、脑-肠互动、脑-肠肽和受体以及社会心理因素有关, 而脑-肠互动可整合上述发病因素作为研究IRS发病机制的切入点, 在IRS的发病中起着重要作用. 初步研究认为脑与肠之间相互影响可通过CNS与ENS分泌脑-肠肽来完成, 但尚需进一步研究阐明脑-肠肽分泌状况以及其在CNS与ENS之间神经传导路径.

■应用要点

本文初步揭示了脑-肠互动及脑-肠轴在IBS发病中的病理生理实质,对进一步研究和阐明脑-肠互动在IBS发病中的重要意义提供了相关的参考资料,同时,为在临床上对IBS患者实行干预治疗以及治疗药物研发提供了理论基础。

肽,其主要兴奋递质有组胺、5-羟色胺(5-HT)、P物质(SP)、CGRP,促肾上腺皮质激素释放因子(CRP)等,抑制性递质有胆囊收缩素(CCK)、一氧化氮(NO)、去甲肾上腺素(NE)、血管活性肽(VIP)等。

2 IBS发病因素与脑-肠互动

2.1 胃肠动力紊乱 部分IBS患者存在着胃肠动力紊乱,表现为胃结肠反射异常,结肠及小肠转运加快或减慢。IBS患者受到某种应激因素刺激后结肠动力反应较正常人高,Blomhoff *et al*^[10]采用事件相关电位(ERP)研究发现,当受到情感因素刺激后IBS患者额叶大脑区的ERP和直肠张力均较正常人显著增高,说明直肠动力异常与大脑异常反应相关联。沈骏 *et al*^[11]应用血清水平依赖性功能磁共振(BOLD-fMRI)研究发现,腹泻型与便秘型IBS患者在直肠充气刺激时其中枢的脑岛皮质、额前皮质和丘脑痛觉功能区的兴奋面积和程度均增高,进一步证实脑-肠之间存在必然联系。外周给予CRF拮抗剂a-右螺旋CRF可能改善IBS患者胃肠动力反应的相关症状^[12],说明IBS患者胃肠动力紊乱存在着脑-肠轴调控失调的发生机制。

2.2 内脏高敏性 IBS患者胃肠道对机械和化学性刺激均可出现内脏高敏性。国外研究发现,94% IBS患者结肠机械扩张后出现疼痛阈降低,疼痛强度增高^[13]。同时化学物质(如松节油等)刺激IBS患者直肠后也可出现内脏高敏性和躯体投射区域扩大^[14]。而对IBS患者检测后发现其感觉阈值、排便阈值和疼痛阈值均较正常人明显降低^[9]。当受到刺激后可使胃肠道黏膜MC被激活分泌组胺、5-HT等递质,可作用邻近内分泌细胞和ENS神经纤维使之释放SP, CGRP等脑-肠肽,不但影响胃肠动力和疼痛阈值,而且将信息传至CNS进一步加重肠功能紊乱和IBS的各种症状^[15]。Silverman *et al*^[16]应用正电子发射断层扫描(PET)比较IBS患者与正常人经直肠气囊扩张后大脑活性区域的变化,疼痛刺激可引起正常人大脑扣带回前部被激活,而用同样刺激仅激活IBS患者的左侧额前皮质,扣带回前部未被激活,推测未被激活可能是由于IBS患者内生脑-肠肽介导的大脑对直肠疼痛感觉调控异常所致。另有人研究,IBS与正常人结肠和腹部皮肤电刺激所引发的诱发电位(EPS)不同,提示IBS患者CNS反馈发生了改变^[17]。国人用“恶性视听刺激”作为刺激物对IBS患者与正常人进行刺激,可使IBS患者对直肠气囊扩张的敏感度明显提

高,而正常人却无此反应^[18],说明IBS患者CNS状态可反过来影响或加重患者内脏感觉异常。由此可见,脑-肠互动在IBS患者内脏高敏性的形成中起重要的主导作用。

2.3 肠道感染 兔动物实验证明^[19],单纯肠道感染或应激不能引起较持久的肠功能紊乱,而肠道感染后再给予应激刺激可使兔大肠出现强烈的动力反应,且肠内抑制性神经递质NO减少,可能与肠功能紊乱发生有关。陈洪 *et al*^[20]也证实,大鼠经旋毛虫感染后其空回肠内MC活化和脱颗粒,5-HT的释放和表达参与了肠运动功能紊乱的发生。Neal *et al*^[21]对544例肠道感染患者进行半年观察,约25%人出现肠功能紊乱,其中约1/4人发展成IBS,且多见于女性,腹泻的时间越长发展成IBS危险性越大,少见于呕吐为主者。为什么是有1/4人发展成IBS,而大多数人不患病呢? Drossman *et al*^[22]认为,决定IBS是否发病,还有其心理素质方面的易感因素,在患过急性肠道感染的人中,只有那些具备某些精神心理素质,如抑郁症素质或受过某种重大生活刺激的人才容易发生IBS。这种推测与动物实验结果相符,肠道感染后IBS的发生可能与脑-肠互动病理生理模式有关,但神经因素与肠道神经内分泌免疫系统之间的沟通机制尚需进一步研究。且感染后IBS患者较非感染性IBS患者腹泻明显、康复(6 a随访研究)例数少,焦虑和抑郁史是阻碍康复的原因^[23]。进一步说明精神心理素质对感染后IBS患者有重要影响。

2.4 社会心理因素 孙燕 *et al*^[24]研究发现,急性和慢性束缚应激可致大鼠内脏敏感性增高,急性束缚可短暂提高促肾上腺皮质激素(ACTH)和CORT水平,慢性束缚可长期提高ACTH和CORT水平,ACTH和CORT由CRF促进释放,可能通过HPA轴对内脏发生作用。临床研究证实社会心理因素与IBS患者内脏感觉异常密切相关,心理压力和负性生活事件是导致感觉异常的重要因素^[25]。IBS患者内外向评分均明显低于正常人,神经质、焦虑、抑郁和负性生活事件评分显著高于正常人^[26],进一步说明内向和神经质个性、焦虑、抑郁及负性生活事件与IBS密切相关。急性身体和心理应激可通过脑-肠轴改变IBS患者肠特异性自主神经信息的输出而致内脏高敏性的格局^[27]。脑-肠轴在社会心理因素与IBS发病中的作用可见一斑。CRF在应激、抑郁及IBS患者脑内分泌增加,在调节脑-肠轴功能起着重要作用^[28],这一点与上述动物实验结果相一致。

3 临床治疗研究

临床研究证实, 调节CNS和ENS的许多疗法都可有效治疗IBS患者, 进一步支持脑-肠互动及脑-肠轴失调在IBS发病中的重要作用, 特别是抗抑郁药的应用为临床治疗IBS提供了新的手段。一项临床荟萃分析显示, 三环类抗抑郁药治疗IBS和内脏疼痛综合征有效, 但仍需更有效的新一代制剂^[29]。王敬东^[30]证实, 多虑平单独用于治疗IBS有效, 对不伴神经精神症状的IBS患者亦有效, 而硝苯地平在改善IBS患者肠道症状的同时, 对伴有的神经精神症状也有效。446例IBS患者服用阿米替林治疗对肠道和精神神经症状均有效, 因不良反应停药者仅为3.8%^[31]。张惠丽 *et al*^[32]也证实, 氟西汀治疗IBS患者可同时改善肠道症状及抑郁、焦虑等症状。以上临床治疗研结果均表明, IBS患者脑-肠之间存在必然联系, 二者互相影响。

4 参考文献

- 1 Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome II process. *Gut* 1999; 45 (Suppl 2): II1-II5
- 2 Kim DY, Camilleri M. Serotonin: a mediator of the brain-gut connection. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 2698-2709
- 3 胡品津. 从脑-肠互动的高度认识肠易激综合征. *中华消化杂志* 2003; 23: 261-262
- 4 Wood JD, Grundy D. Little brain-big brain V. *Neurogastroenterol Motil* 1998; 10: 377-385
- 5 章菲菲, 莫剑忠, 陈晓宇, 彭延申, 萧树东. 胃扩张对大鼠脑、脊髓和肌间神经丛Fos蛋白和降钙素基因相关肽表达的影响. *胃肠病学* 2005; 10: 70-74
- 6 兰玲, 陈玉龙. 焦虑大鼠内脏敏感性增高以及行直结肠扩张后血清皮质酮的变化及意义. *胃肠病学和肝病杂志* 2005; 14: 125-128
- 7 Wilhelmsen I. Brain-gut axis as an example of the bio-psycho-social model. *Gut* 2000; 47 Suppl 4: iv5-7
- 8 杨云生. 肠易激综合征神经免疫内分泌网络调控机制. *胃肠病学和肝病杂志* 2002; 11: 320-322
- 9 董文珠, 邹多武, 李兆申, 许国铭, 邹晓平, 朱爱勇, 尹宁, 满晓华. 肠易激综合征患者内脏高敏感性的机制研究. *中华消化杂志* 2004; 24: 18-22
- 10 Blomhoff S, Spetalen S, Jacobsen MB, Vatn M, Malt UF. Intestinal reactivity to words with emotional content and brain information processing in irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 1160-1165
- 11 沈骏, 诸琦, 袁耀宇, 张仲伟, 陈克敏. 肠易激综合征患者脑部痛觉功能区区域的变化. *胃肠病学和肝病杂志* 2005; 14: 167-171
- 12 Sagami Y, Shimada Y, Tayama J, Nomura T, Satake M, Endo Y, Shoji T, Karahashi K, Hongo M, Fukudo S. Effect of a corticotropin releasing hormone receptor antagonist on colonic sensory and motor function in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 2004; 53: 958-964
- 13 Sinhamahapatra P, Saha SP, Chowdhury A, Chakrabarti SK, Ghosh A, Maiti B. Visceral afferent hypersensitivity in irritable bowel syndrome-evaluation by cerebral evoked potential after rectal stimulation. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2150-2157
- 14 Malcolm A, Phillips SF, Kellow JE, Cousins MJ. Direct clinical evidence for spinal hyperalgesia in a patient with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2427-2431
- 15 Wood JD. 肠神经系统在胃肠动力紊乱的病理形成中的作用. *中华消化杂志* 1997; 17: 8-10
- 16 Silverman DH, Munakata JA, Ennes H, Mandelkern MA, Hoh CK, Mayer EA. Regional cerebral activity in normal and pathological perception of visceral pain. *Gastroenterology* 1997; 112: 64-72
- 17 Rossel P, Pedsen P, Niddam D. Cerebral response to electric stimulation of colon and abdominal skin in health and patients with irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 1259-1262
- 18 王伟岸, 潘国宗, 钱家鸣. 精神因素对肠易激综合征患者内脏敏感性的影响. *中华医学杂志* 2002; 82: 308-311
- 19 王利华, 方秀才, 潘国宗, 温淑豪, 杨晓鸥. 肠道感染与应激对实验兔肠运动功能的影响. *胃肠病学和肝病杂志* 2004; 13: 354-357
- 20 陈洪, 段丽萍, 朱元莉, 叶嗣懋, 杨燕琳. 肥大细胞、5-羟色胺与感染后肠运动功能紊乱发病关系的实验研究. *中华消化杂志* 2005; 25: 430-431
- 21 Neal KR, Hebden J, Spiller R. Prevalence of gastroenteritis and risk factors for development of the irritable bowel syndrome: postal survey of patients. *Br Med J* 1997; 314: 779-782
- 22 Drossman DA. The functional GI disorders and the Rome II process. In: Drossman DA et al, eds. The functional gastrointestinal disorders, Second ed, USN: McLean, 2000: 1-29
- 23 Neal KR, Barker L, Spiller RC. Prognosis in post-infective irritable bowel syndrome: a six year follow up study. *Gut* 2002; 51: 410-413
- 24 孙燕, 柳锋霖, 宋耿青, 汪步海, 钱伟, 侯晓华. 急性和慢性束缚应激对大鼠内脏敏感性和神经内分泌的影响. *中华消化杂志* 2006; 26: 38-41
- 25 Monnikes H, Tebbe JJ, Hildebrandt M, Arck P, Osmanoglou E, Rose M, Klapp B, Wiedenmann B, Heymann-Monnikes I. Role of stress in functional gastrointestinal disorders. Evidence for stress-induced alterations in gastrointestinal motility and sensitivity. *Dig Dis* 2001; 19: 201-211
- 26 张志雄, 熊汉华, 侯晓华. 肠易激综合征患者心理评价. *胃肠病学和肝病杂志* 2004; 13: 396-399
- 27 Murray CD, Flynn J, Ratcliffe L, Jacyna MR, Kamm MA, Emmanuel AV. Effect of acute physical and psychological stress on gut autonomic innervation in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2004; 127: 1695-1703
- 28 张尚志, 付明明. 功能性胃肠病研究之我见. *胃肠病学和肝病杂志* 2004; 13: 446-447
- 29 Crowell MD, Jones MP, Harris LA, Dineen TN, Schettler VA, Olden KW. Antidepressants in the treatment of irritable bowel syndrome and visceral pain syndromes. *Curr Opin Investig Drugs* 2004; 5: 736-742
- 30 王敬东. 多虑平与硝苯地平治疗肠易综合征疗效比较. *中国全科医学* 2001; 4: 241-242
- 31 张尚志. 精神性胃肠病诊治问题探讨-附521例分析. *胃肠病学和肝病杂志* 2001; 10: 140-144
- 32 张惠丽, 王葵平. 百忧解治疗肠易激综合征的临床研究. *胃肠病学和肝病杂志* 2004; 13: 407-408

■同行评价

IBD是消化系的常见病多发病, 该病虽无很大危险, 但明显降低患者的生活质量。而其发病机制尚未完全明确, 近年来对脑肠轴、脑-肠互动在IBS发病中的重要性引起人们的重视, 所以脑-肠互动的研究对阐明IBS的发病机制和防治有一定的意义。该文观点比较明确, 条理性较强, 虽深度不够, 但可以供同类研究者参考。

电编 张敏 编辑 王晓瑜

Celecoxib对胃癌细胞凋亡的影响

凌桂琴, 王 绪, 王 琳, 李小翠

■背景资料

胃癌是严重危害人类健康和生命的常见恶性肿瘤之一, 患者5 a生存率徘徊在20%-30%, 有必要寻求新的治疗靶点以提高胃癌患者的生存率. COX-2选择性抑制剂Celecoxib对胃癌生长的高效抑制及低副作用使其用于肿瘤临床治疗成为可能.

凌桂琴, 徐州医学院第二附属医院肿瘤内科 江苏省徐州市 221006

王绪, 徐州医学院医学影像学系 江苏省徐州市 221002

王琳, 徐州医学院组胚教研室 江苏省徐州市 221002

李小翠, 徐州医学院微生物学教研室 江苏省徐州市 221002

通讯作者: 凌桂琴, 221006, 江苏省徐州市, 徐州医学院第二附

属医院肿瘤内科. lingguiqin@126.com

收稿日期: 2006-08-02 接受日期: 2006-09-29

Effect of Celecoxib on apoptosis of human gastric cancer cell line

Gui-Qin Ling, Xu Wang, Lin Wang, Xiao-Cui Li

Gui-Qin Ling, Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221006, Jiangsu Province, China

Xu Wang, Department of Radiology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, Jiangsu Province, China

Lin Wang, Department of Histology and Embryology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, Jiangsu Province, China

Xiao-Cui Li, Department of Microbiology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Gui-Qin Ling, Department of Oncology, The Second Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221006, Jiangsu Province, China. lingguiqin@126.com

Received: 2006-08-02 Accepted: 2006-09-29

Abstract

AIM: To explore the effect of Celecoxib (cyclooxygenase-2 inhibitor) on the apoptosis of gastric cancer cell line SGC7901 *in vitro*.

METHODS: After gastric cancer cell line SGC7901 was treated with Celecoxib (1×10^{-5} to 1×10^{-9} mol/L) for 24 hours, the proliferation of cells was detected by MTT assay. Flow cytometry (FCM) was used to measure the apoptosis of SGC7901 cells, and immunocytochemistry was used to observe the expression of Survivin.

RESULTS: Celecoxib inhibited the proliferation of SGC7901 cells at the concentrations of 1×10^{-5} to 1×10^{-9} mol/L, and the maximal inhibitory rate was 30.03%, which was produced by 1×10^{-5} mol/L Celecoxib. After SGC7901 cells were treated with 1×10^{-5} mol/L Celecoxib for 12, 24, 48 hours, the proportions of apoptosis cells were signifi-

cantly increased in comparison with those of the control cells, and the apoptosis rate was 17.83% after 48 hours. The expression of Survivin was decreased at 3 and 24 hours, especially at 24 hours.

CONCLUSION: Celecoxib can induce the apoptosis of gastric cancer cell line SGC7901 by suppressing the expression of Survivin.

Key Words: Gastric cancer; Celecoxib; Cell apoptosis

Ling GQ, Wang X, Wang L, Li XC. Effect of Celecoxib on apoptosis of human gastric cancer cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(34):3302-3305

摘要

目的: 研究选择性环氧合酶-2(COX-2)抑制剂Celecoxib对人胃癌细胞株SGC7901凋亡的影响.

方法: 采用MTT法测定人胃癌细胞株SGC7901分别在 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} , 1×10^{-9} mol/L的Celecoxib作用48 h后生长抑制情况; 流式细胞术(FCM)观察Celecoxib对SGC7901细胞凋亡的影响; 采用免疫细胞化学染色观察Survivin的表达.

结果: Celecoxib浓度为 1×10^{-5} - 1×10^{-9} mol/L时, 对SGC7901细胞的生长均有抑制作用, 以 1×10^{-5} mol/L浓度的抑制作用最为显著, 其抑制率为30.03%; 1×10^{-5} mol/L Celecoxib作用12, 24, 48 h后, 细胞凋亡比例较对照组均明显增加, 48 h凋亡率达17.83%; 1×10^{-5} mol/L Celecoxib作用后, Survivin的表达自用药3 h起下降, 24 h最明显.

结论: Celecoxib可诱导SGC7901细胞的凋亡, 其可能的作用机制为抑制细胞Survivin基因的表达.

关键词: 胃癌; Celecoxib; 细胞凋亡

凌桂琴, 王绪, 王琳, 李小翠. Celecoxib对胃癌细胞凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2006;14(34):3302-3305

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3302.asp>

0 引言

环氧合酶(cyclooxygenase, COX)是前列腺素合成过程中重要的限速酶. COX存在两个异构体: COX-1和COX-2. COX-1被认为是“看家基因”, 定位于内质网, 参与维持机体正常的生理机能; COX-2被认为是“快速反应基因”, 定位于核膜和内质网, 参与多种病理生理过程^[1]. 近年来流行病学、动物学实验以及细胞学实验等多方面的研究表明, COX-2在多种肿瘤中普遍存在过度表达现象, COX-2表达量为基础表达量的20-80倍, 而COX-1的表达量基本不变^[2], Celecoxib是美国食品与药品管理局(FDA)批准上市的第一个COX-2选择性抑制剂, 在很多动物肿瘤模型中显示出抑瘤作用^[3-4]. 本实验旨在观察Celecoxib对体外培养的胃癌细胞株SGC7901凋亡的影响及其机制.

1 材料和方法

1.1 材料 人胃腺癌细胞株SGC7901购自中科院上海细胞生物研究所. Celecoxib为辉瑞制药有限公司产品; RPMI1640培养基、胰蛋白酶为Gibco公司产品; MTT, DMSO, PI, RNA酶为Sigma公司产品; 小牛血清为杭州四季青生物工程材料有限公司产品; 鼠抗人Survivin mAb为NeoMarkers公司产品.

1.2 方法 细胞培养人胃癌细胞株SGC7901生长于含100 mL/L小牛血清的RPMI1640培养基中, 内加青霉素100 mg/L, 链霉素100 mg/L, 37℃, 50 mL/L CO₂浓度及饱和湿度条件下常规培养, 细胞呈单层贴壁生长, 每3-4 d传代一次, 传代时用2.5 g/L胰蛋白酶-0.2 g/L EDTA 1:1消化液消化3-5 min.

1.2.1 MTT比色分析法 选择指数生长期的SGC7901细胞, 2.5 g/L胰蛋白酶-0.2 g/L EDTA 1:1消化, 以RPMI1640培养基调整细胞悬液浓度为 1×10^8 /L, 接种于96孔板, 每孔接种100 μ L, 另加培养基100 μ L. 37℃, 50 mL/L CO₂条件下培养24 h后, 更换无血清培养基继续培养24 h. 吸去上清液, 分组: 设空白组(不加细胞)、对照组(不加药)、Celecoxib组(分为 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} mol/L 5个浓度段), 每组6个复孔. 继续培养48 h, 每24 h更换新鲜培养基和药物. 终止培养前4 h加入MTT 40 μ L/孔, 使MTT终浓度为1 g/L, 避光孵育. 结束培养时, 吸去全部上清液, 加入DMSO 150 μ L/孔, 微孔板震荡器震荡

10 min使MTT结晶物充分溶解, 以只加培养液不加细胞的空白对照孔调零, 酶联检测仪上测定吸光度A值($\lambda = 492$ nm). 按下列公式计算细胞生长抑制率: 抑制率= [(对照组A-空白组A)-(实验组A-空白组A)]/(对照组A-空白组A)×100%.

1.2.2 流式细胞仪测定细胞凋亡 取指数生长期的SGC7901细胞, 2.5 g/L胰蛋白酶-0.2 g/L EDTA 1:1消化, 以RPMI1640培养基调整细胞浓度为 4×10^8 /L, 接种于50 mL培养瓶, 每瓶4 mL. 37℃, 50 mL/L CO₂培养24 h后分组. 设0 h对照, 12, 24, 48 h组, 各组分别设对照(不加药)、Celecoxib组(药物终浓度以MTT法结果最佳作用浓度为准). 每天更换含新鲜Celecoxib的培养基. 培养结束, 吸去上清, 加2.5 g/L胰蛋白酶-0.2 g/L EDTA 1:1消化, 1000 r/min离心10 min收集细胞, 700 mL/L冷乙醇1 mL固定细胞, 过夜后上机检测.

1.2.3 免疫细胞化学染色 选择指数生长期的SGC7901细胞, 2.5 g/L胰蛋白酶-0.2 g/L EDTA 1:1消化, 制成单细胞悬液, 接种于内置玻片的15 cm培养皿, 37℃, 50 mL/L CO₂条件下培养, 至70%细胞发生融合时分组: 对照组(不加药)、Celecoxib组(药物终浓度以MTT法结果最佳作用浓度为准), 分别于3, 6, 12, 24 h终止培养, 取出玻片, PBS简单冲洗, 950 mL/L乙醇固定10 min, 按SP试剂盒说明染色. 阳性细胞为胞质出现棕黄色至深棕黄色颗粒. 每次实验均设不加一抗(PBS代替一抗)的阴性对照, 用已知阳性切片作阳性对照. Survivin表达定位于细胞质. 结果应用Leica Qwin计算机图像分析仪, 随机选取100个细胞, 测其细胞灰阶度, 以反应染色强度, 比较各组染色强度差异.

统计学处理 实验数据以mean±SD表示, 采用Stata 7.0统计软件的单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 MTT比色分析 1×10^{-9} - 1×10^{-5} mol/L的Celecoxib对SGC7901细胞的增殖均有抑制作用, Celecoxib对SGC7901细胞株的抑制作用, 随浓度增高而增强. 10^{-9} mol/L的Celecoxib对细胞的增殖抑制作用无明显增加($P > 0.05$). 在 1×10^{-8} - 1×10^{-5} mol/L之间, 各浓度组间比较亦有显著性差异($P < 0.05$, 表1).

2.2 Celecoxib对SGC7901细胞凋亡的影响 SGC7901细胞在正常状况下, 凋亡率较低. 细胞经Celecoxib作用后, 12 h时凋亡比例即明显增

■ 研发前沿

肿瘤不仅是细胞增殖异常性疾病, 同时也是细胞凋亡异常性疾病, Survivin是迄今为止发现的最强凋亡抑制因子, 其表达的组织特异性及功能的多样性, 使其成为肿瘤研究领域的一个新热点.

■应用要点

本文发现Celecoxib可通过诱导细胞凋亡来抑制肿瘤细胞生长,但本研究尚处于体外实验阶段,Celecoxib的体内作用及对其他基因有无调控作用等均有待进一步的深入研究。

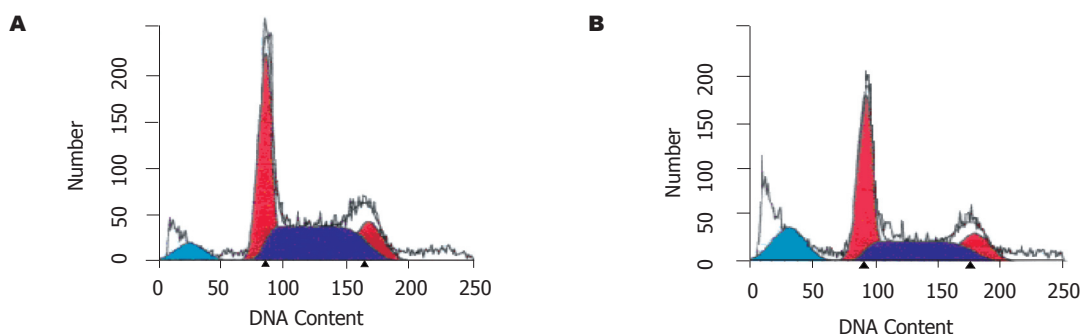


图1 Celecoxib对SGC7901细胞凋亡率的影响(流式细胞术). A: 对照组48 h; B: 1×10^{-5} mol/L Celecoxib 48 h.

表1 Celecoxib对SGC7901细胞株增殖的影响 (mean \pm SD, $n = 6$)

药物浓度(mol/L)	吸光度 (4492 nm)	抑制率(%)
0	0.6440 \pm 0.0092	\
10^{-9}	0.6113 \pm 0.0122	5.08 \pm 1.18 ^a
10^{-8}	0.5813 \pm 0.0142	9.74 \pm 1.00 ^a
10^{-7}	0.5417 \pm 0.0126	15.89 \pm 1.61 ^a
10^{-6}	0.5033 \pm 0.0189	21.85 \pm 2.08 ^a
10^{-5}	0.4507 \pm 0.0150	30.03 \pm 1.62 ^a

^a $P < 0.05$ vs 对照.

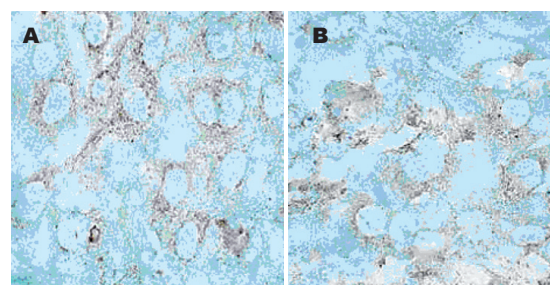


图2 Celecoxib对SGC7901细胞Survivin基因表达的影响(免疫组化染色 $\times 400$). A: 对照组24 h; B: 1×10^{-5} mol/L Celecoxib 24 h.

表2 Celecoxib对SGC7901细胞株凋亡的影响 (mean \pm SD, %, $n = 4$)

分组	0 h	12 h	24 h	48 h
对照	0.97 \pm 0.12	2.09 \pm 0.13	2.41 \pm 0.45	3.80 \pm 0.37
Celecoxib	0.97 \pm 0.12	7.29 \pm 0.80 ^b	10.44 \pm 1.23 ^b	17.83 \pm 1.17 ^b

^b $P < 0.01$ vs 对照.

加,与对照组相比差异有显著性($P < 0.01$).随着时间延长,凋亡比例亦升高(表2,图1).

2.3 Celecoxib对Survivin表达的影响 SGC7901细胞Survivin基因呈阳性表达,细胞经Celecoxib作用后, Survivin基因的表达自用药3 h起有下降,24 h最明显(图2),但只有24 h组与对照组比较有显著性差异($P < 0.05$).

3 讨论

近年来的研究发现,多种肿瘤中COX-2高表达,并且其与肿瘤的发生、发展有着较为密切的关系,而抑制COX-2表达有可能预防和逆转肿瘤的发生,表明COX-2在肿瘤的发生、发展过程中起重要作用,COX-2选择性抑制剂正被试图用作化学治疗和化学预防药物. COX-2选择性抑制剂Celecoxib在很多动物模型中抑制肿瘤的发生:在偶氮甲烷所致的鼠大肠癌模型中, Celecoxib可使大肠癌的发生率和肿瘤数量分别减少93%和97%,并抑制异常结肠腺管灶的形

成^[3].在体外培养细胞中,研究发现Celecoxib对肝癌HepG₂细胞株^[5]及SMMC-7721细胞株^[6]、结肠癌细胞株HT-29^[7],均有程度不同的抑制率.但是Celecoxib抑制肿瘤发生的机制目前还不十分清楚,这种作用可涉及多方面:如抑制肿瘤血管的形成^[8],抑制肿瘤细胞增殖,诱导肿瘤细胞死亡,对磷酸化ERK₂表达的影响^[9],并有可能逆转肿瘤消耗引起的消瘦而对正常细胞的结构、凋亡无明显影响^[10].

本实验采用MTT比色分析法测定Celecoxib对体外SGC7901细胞生长的影响. Celecoxib作用48 h后, SGC7901细胞的生长有明显的抑制.在 10^{-5} - 10^{-9} mol/L浓度范围内具有浓度依赖性,对癌细胞的抑制作用随浓度的增高而增高,各浓度组间有明显差异($P < 0.05$), 10^{-5} mol/L浓度时,抑制率达到30.03%.

调节细胞凋亡的基因参与了肿瘤的发生、发展过程,主要与3个基因家族关系密切,即Bcl-2家族、Caspase家族和IAP(inhibition of

apoptosis protein, 凋亡蛋白抑制因子)家族^[11], IAPs是继Bcl-2家族之后发现的又一个抗凋亡基因家族, Survivin是IAP家族的新成员, 定位于人染色体17q25上, 1997年由Ambrosini *et al*^[12]利用效应细胞蛋白酶受体1CDNA在人基因组文库中筛选克隆出来, 与IAPs家族其他成员不同, Survivin基因只表达于胚胎组织和恶性肿瘤组织^[13-14], 而在正常分化的成人组织中无表达。研究发现, Survivin与恶性肿瘤的发生、发展关系密切, 是迄今为止发现的最强的凋亡抑制因子。Survivin的表达与多种肿瘤的生物学和(或)疾病分期有关^[15], 在宫颈癌, 临床分期越晚, 组织分级恶性度越高, Survivin基因阳性表达率越高, 说明Survivin基因阳性表示着不良预后。本研究中发现, SGC7901细胞Survivin表达阳性。Celecoxib作用后, 与对照组相比, Survivin表达早期即下降, 但只有作用24 h后与对照组比较有统计意义($P<0.05$), 与本研究中发现Celecoxib作用后, 12 h凋亡比例即明显增加不相符, 其可能原因为: 由于胃癌细胞中影响凋亡的因素太多, 可能前期有别的凋亡抑制基因如Bcl-2等作用增强, 导致Survivin的作用被掩盖。这提示在胃癌进展过程中还受其他癌基因的调控, 是多基因参与, 多因素作用的结果, Survivin基因与其他癌基因的关系有待进一步研究。

本实验发现, Celecoxib对胃癌细胞SGC7901的生长有抑制作用, 并且诱导细胞凋亡是其作用机理之一; 同时, 研究表明, Celecoxib与化疗药物合用可增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[16]以及对放疗的敏感性^[17], 因此有望成为胃癌的新一类的辅助治疗方法。

4 参考文献

- 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
- Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, Edwards DA, Flickinger AG, Moore RJ, Seibert K. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res* 2000; 60: 1306-1311
- Jacoby RF, Cole CE, Tutsch K, Newton MA, Kelloff G, Hawk ET, Lubet RA. Chemopreventive efficacy of combined piroxicam and difluoromethylornithine treatment of Apc mutant Min mouse adenomas, and selective toxicity against Apc mutant embryos. *Cancer Res* 2000; 60: 1864-1870
- Gupta RA, Dubois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer* 2001; 1: 11-21
- 杨震, 秦成勇, 朱菊人, 任万华, 王旻. 环氧合酶-2对肝癌细胞增殖和凋亡的调节作用. *世界华人消化杂志*, 2006; 14: 1382-1387
- 樊菁, 窦科峰, 李开宗. 塞来昔布体外对类人肝胃癌细胞生长的抑制作用. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 523-526
- 张超, 刘伟, 安杰, 刘占奎. 塞来昔布对结肠癌细胞生长及肝转移瘤血管生长因子表达的影响. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2623-2626
- Gately S. The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 2000; 19: 19-27
- 张勇, 蒋明德, 曾维政, 徐辉, 熊碧君, 翁敏. 塞来昔布对胃癌细胞生长及ERK2表达的影响. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2213-2216
- Davis TW, Zweifel BS, O'Neal JM, Heuvelman DM, Abegg AL, Hendrich TO, Masferrer JL. Inhibition of cyclooxygenase-2 by celecoxib reverses tumor-induced wasting. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 308: 929-934
- Conway EM, Pollefeyt S, Steiner-Mosonyi M, Luo W, Devriese A, Lupu F, Bono F, Leducq N, Dol F, Schaeffer P, Collen D, Herbert JM. Deficiency of survivin in transgenic mice exacerbates Fas-induced apoptosis via mitochondrial pathways. *Gastroenterology* 2002; 123: 619-631
- Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997; 3: 917-921
- Kania J, Konturek SJ, Marlicz K, Hahn EG, Konturek PC. Expression of survivin and caspase-3 in gastric cancer. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 266-271
- Grabowski P, Kuhnel T, Muhr-Wilkenshoff F, Heine B, Stein H, Hopfner M, Germer CT, Scherubl H. Prognostic value of nuclear survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2003; 88: 115-119
- Altieri DC, Marchisio PC. Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer. *Lab Invest* 1999; 79: 1327-1333
- Hida T, Kozaki K, Muramatsu H, Masuda A, Shimizu S, Mitsudomi T, Sugiura T, Ogawa M, Takahashi T. Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis and enhances cytotoxicity of various anticancer agents in non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2006-2011
- Nakata E, Mason KA, Hunter N, Husain A, Raju U, Liao Z, Ang KK, Milas L. Potentiation of tumor response to radiation or chemoradiation by selective cyclooxygenase-2 enzyme inhibitors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 58: 369-375

电编 李琪 编辑 张焕兰

蛋白酶激活受体-2激动剂在应激性溃疡中的作用

窦勇鹰, 谢立群, 李俊美, 华建平, 海鸥, 李华

■背景资料

患者在遭受各类重伤(包括大手术)、重病和其他应激情况下,特别是在并发休克、出血、感染或肾、肺等脏器功能严重受损时,均易患应激性溃疡,出血率及病死率较高。质子泵抑制剂可降低出血率,但并不降低病死率。

窦勇鹰, 谢立群, 海鸥, 李华, 中国人民武装警察部队医学院附属医院消化内科 天津市河东区 300162

李俊美, 华建平, 天津市第一中心医院消化内科 天津市 300192

通讯作者: 谢立群, 天津市河东区成林路, 中国人民武装警察部队医学院附属医院消化内科. xieliquan66@hotmail

电话: 022-60578765

收稿日期: 2006-07-20 接受日期: 2006-08-10

Role of protease-activated receptor-2 agonist in the formation of stress ulcer

Yong-Ying Dou, Li-Qun Xie, Jun-Mei Li, Jian-Ping Hua, Ou Hai, Hua Li

Yong-Ying Dou, Li-Qun Xie, Ou Hai, Hua Li, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China

Jun-Mei Li, Jian-Ping Hua, Department of Gastroenterology, the First Center Hospital of Tianjin Municipality, Tianjin 300192, China

Correspondence to: Li-Qun Xie, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Chenglin Road, Hedong District, Tianjin 300162, China. xieliquan66@hotmail

Received: 2006-07-20 Accepted: 2006-08-10

Abstract

AIM: To investigate the role of protease-activated receptor-2 (PAR-2) agonist in the formation and pathogenesis of stress ulcer.

METHODS: Water immersion-restraint method was used to induce stress ulcer model in Wistar rats. Arterial blood and gastric fluid were collected for the blood gas analysis to obtain the gastric mucosal pH value. The levels of thromboxane B₂ (TXB₂) and 6-ketoprostaglandin F₁ alpha (6-K) were measured by radioimmunoassay. The content of mucosal aminohexose was detected by spectro photometer, and the histopathological changes were observed.

RESULTS: The gastric mucosal pH value (4.71 ± 0.23 vs 4.53 ± 0.11 , $P < 0.05$), the content of mucosal aminohexose (5.26 ± 1.48 g/kg vs 1.19 ± 0.58 g/kg, $P < 0.05$), and the level of 6-K (856.92 ± 165.21 ng/L vs 654.50 ± 221.31 ng/L, $P < 0.05$)

were significantly higher in the rats treated with PAR-2 agonist than those in negative controls. However, except the level of 6-K (856.92 ± 165.21 ng/L vs 687.60 ± 219.50 ng/L, $P < 0.05$), the other indexes in the rats treated with PAR-2 agonist were not markedly different from those in the positive controls ($P > 0.05$), and no obvious thrombus was found in both PAR-2 agonist group and positive control group.

CONCLUSION: PAR-2 agonist can protect gastric mucosa through promoting the secretion of gastric fluid and dilation of blood vessel, which may be associated with the activation of capsaicin-sensitive nerve cells.

Key Words: Protease-activated receptor-2; Stress ulcer; Gastric mucosa; Capsaicin

Dou YY, Xie LQ, Li JM, Hua JP, Hai O, Li H. Role of protease-activated receptor-2 agonist in the formation of stress ulcer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(34):3306-3310

摘要

目的: 探讨大鼠蛋白酶激活受体-2在应激性溃疡中的作用。

方法: 建立大鼠水浸束缚应激模型, 肉眼计算胃黏膜溃疡指数(UI); 取动脉血和胃液做血气分析计算胃黏膜内pH值(pHi); 应用分光光度计检测胃黏膜氨基己糖; 采用放射免疫方法检测血浆中6-酮前列腺素F₁α(6-K)和血栓素B₂(TXB₂); 观察胃组织病理形态学变化。

结果: PAR-2激动剂组pHi(4.71 ± 0.23 vs 4.53 ± 0.11 , $P < 0.05$)、氨基己糖(5.26 ± 1.48 g/kg vs 1.19 ± 0.58 g/kg, $P < 0.05$)、6-K(856.92 ± 165.21 ng/L vs 654.50 ± 221.31 ng/L, $P < 0.05$)高于阴性对照组, TXB₂(338.67 ± 12.91 ng/L vs 378.89 ± 15.10 ng/L, $P < 0.05$)、UI(37.50 ± 24.42 vs 69.00 ± 33.27 , $P < 0.05$)低于阴性对照组。除6-K(856.92 ± 165.21 ng/L vs 687.60 ± 219.50 ng/L, $P < 0.05$)外, PAR-2激动剂组与奥美拉唑组相比其他参数差异无统计学意义($P > 0.05$), 并且两组病理形态学观察均表现为

无明显血栓形成。

结论: 蛋白酶受体-2激动剂通过促进胃黏液分泌、舒张血管起到保护胃黏膜的作用, 其机制可能是激活辣椒素敏感性感觉神经元。

关键词: 蛋白酶激活受体-2; 应激性溃疡; 胃黏膜; 辣椒素

窦勇鹰, 谢立群, 李俊美, 华建平, 海鸥, 李华. 蛋白酶激活受体-2激动剂在应激性溃疡中的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(34):3306-3310

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3306.asp>

0 引言

应激性溃疡(stress ulcer, SU)的发病机制非常复杂, 目前尚未完全明了. 目前认为SU的发生机制涉及机体神经内分泌失调、胃黏膜保护功能削弱及胃黏膜损伤因素作用增强等诸多方面, 主要因素为胃黏膜血流量减少. 蛋白酶激活受体-2 (PAR-2)属于蛋白酶激活受体超家族成员, 是体内许多消化道腺体外分泌的直接调控者, 可活化血管内皮细胞, 影响胃肠道动力. 在胃组织中, 活化该受体可刺激辣椒素敏感性感觉神经元, 释放内源性降钙素基因相关肽、神经激肽A和P物质而发挥抑制胃酸分泌、促进黏液蛋白的分泌、短暂增加胃黏膜血流量等作用, 也可促进胃蛋白酶的分泌^[1], 起到保护胃黏膜作用. 因此, PAR-2是胃黏膜疾病治疗研究的新靶点. 本实验用人工合成的PAR-2激动剂、辣椒素和奥美拉唑预防大鼠SU, 观察其效果是否有差别, 为SU发生的神经内分泌学说提供新的理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年Wistar ♂ 大鼠, 购自中国人民解放军医学科学院实验动物中心, 清洁级, 体质量190±10 g, 普通饲料喂养, 自由饮水. PAR-2激动剂为Calbiochem公司产品, 分子式为2-Furoyl-Leu-Ile-Gly-Arg-Leu-Orn-NH₂, 辣椒素为Fluka公司产品, 氨基己糖为北京医科大学第三附属医院消化实验室馈赠, 6-酮前列腺素(6-K)和血栓素B₂(TXB₂)试剂盒购自南京建成生物工程研究所. 血气分析仪: Rapidpoint 400, Bayer; γ放射免疫计数仪: 中国科学技术大学科技实业总公司; 紫外分光光度仪, TU-1800型, 北京普析通用有限责任公司.

1.2 方法 ♂ Wistar大鼠40只分为阴性对照组、奥美拉唑组、PAR-2激动剂组、辣椒素组和无

应激组. 阴性对照组、奥美拉唑组和PAR-2激动剂组在应激前30 min分别给予1 mL 9 g/L氯化钠溶液、5 mg/kg奥美拉唑注射液和1.5 μmol/kg PAR-2激动剂ip; 辣椒素组于0, 6, 32 h分别给予25, 50, 50 mg/kg辣椒素sc, 饲养14 d后, 于应激前30 min给予1.5 μmol/kg PAR-2激动剂腹腔注入. 大鼠禁食24 h, 造模前禁水2 h, 将大鼠四肢束缚于自制鼠板上, 限制其活动, 将其直立置于20±1℃水桶中, 使水平面与大鼠的胸骨剑突水平平齐. 水浸束缚应激后, 给予大鼠3 mL生理盐水灌胃, 30 min后, 予4 g/L戊巴比妥钠9 mL/kg腹腔麻醉, 仰卧固定, 常规剪毛、消毒、铺敷, 打开腹腔, 暴露胃, 双结扎法完整取胃, 用注射器取胃液, 于血气分析仪上测量胃液内PCO₂. 双结扎法完整取胃, 沿胃大弯剪开, 用9 g/L氯化钠溶液冲洗胃腔内及黏膜面上的血迹, 观察溃疡、糜烂出血点发生的部位、大小、形状并计算黏膜损伤指数, 按Guth标准评估胃黏膜损伤溃疡指数 (ulcer index, UI)并累计积分, 斑点、糜烂为1分, 糜烂长度<1 mm为2分, 1-2 mm为3分, 2-4 mm为4分, >4 mm为5分. 在溃疡或糜烂中心取黏膜组织2块(0.5 cm×0.5 cm), 置入40 g/L甲醛溶液中, 固定48 h、常规脱水包埋, 4 μm厚切片, HE染色. 开腹, 直视下用肝素润管的5 mL注射器于腹主动脉取血3 mL, 即做血气分析, 将剩余血37℃温育30 min, 后3500 r/min离心10 min, 半径3 cm, 取上清, EP管分装. 标记后置-80℃保存, 待测各项指标. 根据胃腔液内PCO₂和动脉血HCO₃⁻浓度. 按Henderson-Hasselbalch公式计算pHi: $pHi = 6.1 + \log(HCO_3^-/PCO_2 \times 0.0307)$. 此处6.1是指在37℃时血浆中HCO₃⁻/CO₂体系的pK值; HCO₃⁻是动脉血样品实际CO₂浓度(mmol/L); PCO₂是胃液内PCO₂值; 0.0307是在37℃状态下, CO₂在血浆中的溶解度(mmol/L). 应用放射免疫方法测定6-K和TXB₂, 严格按照试剂盒进行操作. 胃黏膜氨基己糖含量测定采用Neuhaus法^[2].

统计学处理 结果以mean±SD表示, 统计学分析用SPSS11.5软件, 均数间的比较用LSD法. $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 大体观察 阴性对照组和辣椒素组大鼠胃腔内可见少量血性积液, 黏膜面附有较多血痂, 9 g/L氯化钠溶液水冲洗后, 见黏膜充血、水肿明显, 腺胃部弥漫点线状出血灶, 损伤主要位于黏膜皱襞处. 奥美拉唑组和PAR-2激动剂组胃

■应用要点

本研究观察人工合成的PAR-2激动剂、辣椒素和奥美拉唑预防大鼠应激性溃疡效果是否有区别。为应激性溃疡发生的神经内分泌学说提供新的理论依据,为胃黏膜损伤的治疗提供一个重要治疗靶点。

表 1 各组大鼠UI, pH_i, 氨基己糖, 6-K和TXB₂表达水平($n = 8$, mean \pm SD)

分组	UI	pH _i	氨基己糖(g/kg)	6-K (ng/L)	TXB ₂ (ng/L)
阴性对照组	69.00 \pm 33.27	4.53 \pm 0.11	1.19 \pm 0.58	654.50 \pm 221.31	378.89 \pm 15.10
奥美拉唑组	26.88 \pm 14.13 ^a	4.72 \pm 0.47 ^a	5.20 \pm 2.69 ^a	687.60 \pm 219.50 ^c	359.41 \pm 16.49 ^a
PAR-2激动剂组	37.50 \pm 24.42 ^a	4.71 \pm 0.23 ^a	5.26 \pm 1.48 ^a	856.92 \pm 165.21 ^a	338.67 \pm 12.91 ^a
辣椒素组	59.00 \pm 12.46 ^c	4.43 \pm 0.63 ^c	2.13 \pm 1.39 ^c	675.06 \pm 139.92 ^c	358.40 \pm 13.80 ^c
无应激组		4.94 \pm 0.22 ^c	6.21 \pm 2.67 ^c	969.38 \pm 82.97 ^a	278.86 \pm 12.38 ^a

^a $P < 0.05$ vs 阴性对照组; ^c $P < 0.05$ vs PAR-2激动剂组。

腔内无血性积液, 黏膜面附有少量血痂, 9 g/L氯化钠溶液冲洗后, 黏膜充血、水肿不明显, 糜烂、出血点较上述两组减少, UI下降。PAR-2激动剂组与阴性对照组比较, UI指数明显下降($P = 0.01$), 与奥美拉唑比较, 无明显差别($P = 0.357$), 与辣椒素组比较, UI指数明显下降($P < 0.05$), 辣椒素组与阴性对照组无明显差别($P = 0.385$, 表1)。

2.2 胃黏膜组织病理学变化 光镜下可见阴性对照组大鼠黏膜表层上皮细胞受损、脱落, 可见黏膜中断现象, 腺体结构紊乱, 间隙扩大, 其间可见炎性细胞浸润, 黏膜层、黏膜下层明显充血、水肿。可见出血、溃疡以及黏膜糜烂, 血管内有血栓形成。PAR-2激动剂组和奥美拉唑组黏膜充血、水肿程度较阴性对照组轻, 血管内聚集红细胞(图1)。

2.3 pH_i、氨基己糖、6-K和TXB₂检测结果 (1)PAR-2激动剂组与阴性对照组比较, pH_i(4.71 \pm 0.23)比阴性对照组(4.53 \pm 0.11)明显升高($P < 0.01$); 氨基己糖(5.26 \pm 1.48)比阴性对照组(1.19 \pm 0.58)显著升高($P < 0.01$); 6-K(856.92 \pm 165.21)比阴性对照组(654.50 \pm 221.31)明显升高($P < 0.05$); TXB₂(338.67 \pm 12.91)比阴性对照组(378.89 \pm 15.10)降低; UI(37.50 \pm 24.42)比阴性对照组(69.00 \pm 33.27)明显降低($P < 0.01$); 病理形态学观察, 血栓形成减少。PAR-2激动剂组与奥美拉唑组比较, pH_i、氨基己糖和UI数值相近, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 6-K(856.92 \pm 165.21)比奥美拉唑组(687.60 \pm 219.50)明显升高($P < 0.05$); TXB₂(338.67 \pm 12.91)比奥美拉唑组(359.41 \pm 16.49)降低; 病理形态学观察均表现为无明显血栓形成。PAR-2激动剂组与辣椒素组比较, pH_i、氨基己糖和6-K明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); TXB₂明显下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 表1)。

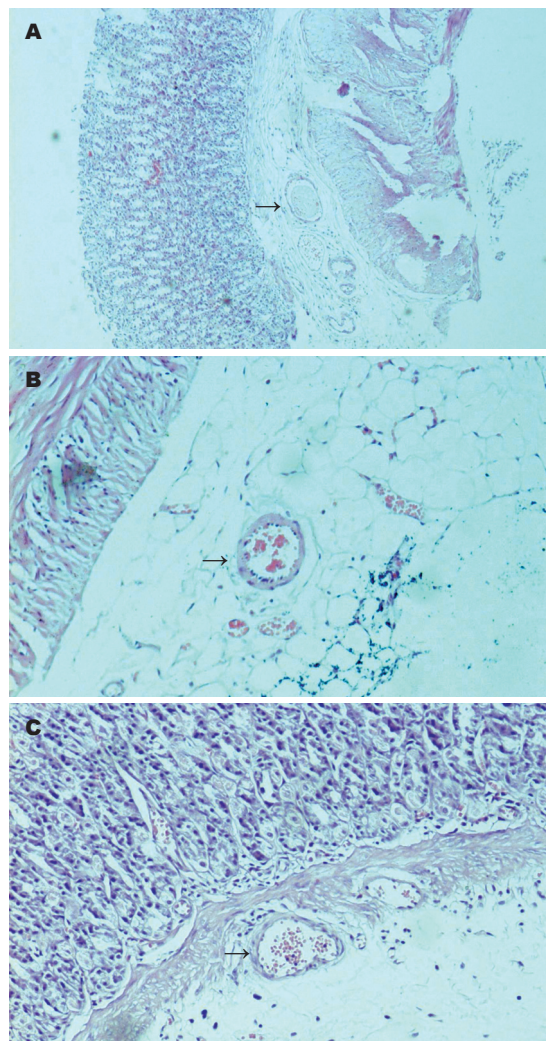


图 1 胃黏膜组织病理学变化(HE \times 100)。A: 阴性对照组, 箭头方向为血管内血栓形成; B: PAR-2激动剂组, 箭头方向为血管内红细胞聚集; C: 奥美拉唑组, 箭头方向为血管内红细胞聚集。

3 讨论

PAR-2激动剂对SU造成胃黏膜损伤的保护作用。蛋白酶激活受体(protease/proteinase-activated receptors, PARs)属于与G蛋白相偶联、有7个跨膜单位的受体家族^[1], PARs在血液循环、呼吸系

统、神经系统和消化系统中都具有非常重要的作用, 其有4个成员: PAR-1, PAR-3和PAR-4是凝血酶受体^[3-6], PAR-2是胰岛素、肥大细胞纤维蛋白溶酶、凝血因子VIIa和Xa和其他未知蛋白水解酶的受体^[3,8]. 通过蛋白水解方式把N端隐藏的激活受体暴露出来, 可激活PARs. 激活PARs后的普遍信号转导途径是由活化磷脂酶C通过G_{q/11}蛋白介导的^[1,8]. PAR-2广泛分布于胃黏膜组织中^[9]. 可通过激活辣椒素敏感性感觉神经元, 在不同类型的大鼠胃黏膜损伤模型中有胃黏膜保护作用. PAR-2激动剂可使离体大鼠胃小动脉扩张, 全身给药后, 可使麻醉大鼠胃黏膜血流量增加^[10]. 目前, 国内外对预处理PAR-2激动剂后, 与预处理奥美拉唑有无区别, 以及预处理PAR-2激动剂后, 体内舒张和收缩血管因子、保护胃黏膜屏障指标有无变化研究甚少. 本实验通过预处理PAR-2激动剂后, 观察其舒张、收缩血管因子, 血栓形成因素和胃黏膜屏障等指标, 和奥美拉唑组、阴性对照组进行比较. 并通过预处理辣椒素, 观察PAR-2是否仍具有预防SU的作用.

3.1 氨基己糖 胃黏液-碳酸氢盐屏障是构成胃黏膜防御机制的主要因素之一. 黏液覆盖于胃黏膜表面, 具有润滑作用, 可保护黏膜少受食物的机械刺激, 其黏度可使H⁺在黏液中的扩散速度比在水中减慢3-5倍, 从而减轻H⁺对黏膜的侵蚀. 黏液成分95%是水, 其他是多聚糖蛋白、电解质、肽、脂质等. 对糖蛋白组份的研究表明, 糖蛋白的碳水化合物成份有N-乙酰氨基己糖、半乳糖、N-乙酰氨基半乳糖和岩藻糖. 而N-乙酰氨基己糖含量约占23.3%^[11], 测定氨基己糖含量可间接反映糖蛋白含量. 本实验结果为, 给予PAR-2激动剂后, 氨基己糖含量较阴性对照组明显升高, 和奥美拉唑组结果相近. 表明, PAR-2激动剂可以促进胃黏膜屏障分泌黏液, 其机制可能是通过激活感觉神经元后, 释放CGRP和神经激肽A, 通过CGRP₁和NK₂受体促进黏液分泌, 起到黏膜的细胞保护作用.

3.2 6-K和TXB₂ 前列环素(prostacycline, PGI₂)是由血管壁内皮细胞合成和释放的一种抗血小板聚集和舒张血管的生物活性物质. 生物半衰期约3 min, 迅速代谢生成6-Keto-PGF₁α, 在正常生理状态下血浆或组织中血栓素A₂ (thromboxane A₂, TXA₂)和PGI₂平衡, 失调是造成血小板凝集, 血管痉挛收缩或血栓形成的原因之一. 由于TXA₂和PGI₂的不稳定性, 目前难以直接测定, 故国内外均以测定TXB₂和6-Keto-PGF₁α作为判断其浓度的指标. 本实验证实, 给予PAR-2激动剂后, 6-K明显升高, TXB₂明显下降, 表明PAR-2激动剂有明显的舒张血管作用.

3.3 pH_i pH_i值作为研究胃肠功能变化的主要检测指标^[12], 能够敏感反映胃肠黏膜缺氧情况, 较其他指标能更早提示病情的变化. 机体在维持其内环境和行使功能时所需要的能量直接来源于ATP的分解即ATP→ADP+Pi+H⁺. 当机体遭受创伤、失血感染等因素后, 组织细胞氧供缺乏, 可导致ATP的合成小于其分解而产生多余的H⁺, 大量的H⁺存在于胃黏膜内, 从而引起pH_i下降. 组织细胞缺氧越严重, pH_i值下降越显著. 因此, pH_i值提供了部分器官组织氧合与否的判定依据. 实验结果显示, 阴性对照组pH_i值明显下降, 可能是由于在SU过程中, 大鼠胃黏膜动脉收缩, 造成缺血缺氧, 导致ATP的合成小于分解而产生多余的H⁺, PAR-2激动剂组pH_i较阴性对照组明显升高, 和奥美拉唑组比较无统计学差异, 表明, PAR-2激动剂同奥美拉唑都具有改善机体氧供缺乏的作用. PAR-2激动剂可能是通过促进NO生成, 抑制内皮素分泌, 起到扩张血管、增加组织供血供氧、增加胃黏膜血流量的作用, 并通过促进黏液分泌, 起到黏膜保护作用. 胃组织病理学观察: PAR-2组大鼠血管管径增宽, 管壁内有红细胞聚集, 但没有血栓形成, 也说明PAR-2激动剂有扩张血管的作用. 奥美拉唑是经典的质子泵抑制剂, 通过抑制胃酸的生成保护胃黏膜屏障. 在实验中发现, 奥美拉唑也可以减少黏液的耗损, 可能是因为黏液层厚度和H⁺浓度有关. 胃组织病理学观察, 奥美拉唑组大鼠血管内有红细胞聚集, 但没有血栓形成, 而阴性对照组血管内则有血栓形成. 通过肉眼观察Guth评分, 也可以证实PAR-2激动剂具有和奥美拉唑一样的预防应激性溃疡的作用.

总之, PAR-2激动剂是既可促进黏液、6-K分泌, 也可抑制TXB₂分泌, 还可扩张血管, 改善胃黏膜血流量, 是一种潜在防治SU的药物.

4 参考文献

- 1 Kawabata A. PAR-2: structure, function and relevance to human diseases of the gastric mucosa. *Expert Rev Mol Med* 2002; 2002: 1-17
- 2 董秀云, 森治树, 林三仁. 洛赛克促进溃疡愈合机制的研究. *中华消化杂志* 1999; 19: 12-14
- 3 Ayala YM, Cantwell AM, Rose T, Bush LA, Arosio D, Di Cera E. Molecular mapping of thrombin-receptor interactions. *Proteins* 2001; 45: 107-116

■同行评价

本文实验研究结果提示蛋白酶激活受体-2激动剂用于预防应激性溃疡的发生有一定效果, 该剂可能具有急性胃黏膜损伤治疗新靶点的潜在意义, 有一定新意及指导意义.

- 4 Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, Kahn ML, Zheng YW, Timmons C, Tram T, Coughlin SR. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature* 1997; 386: 502-506
- 5 Landesberg R, Burke A, Pinsky D, Katz R, Vo J, Eisig SB, Lu HH. Activation of platelet-rich plasma using thrombin receptor agonist peptide. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63: 529-535
- 6 Leger AJ, Jacques SL, Badar J, Kaneider NC, Derian CK, Andrade-Gordon P, Covic L, Kuliopulos A. Blocking the protease-activated receptor 1-4 heterodimer in platelet-mediated thrombosis. *Circulation* 2006; 113: 1244-1254
- 7 Cottrell GS, Amadesi S, Grady EF, Bunnett NW. Trypsin IV, a novel agonist of protease-activated receptors 2 and 4. *J Biol Chem* 2004; 279: 13532-13539
- 8 Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 245-282
- 9 Nishikawa H, Kawai K, Nishimura S, Tanaka S, Araki H, Al-Ani B, Hollenberg MD, Kuroda R, Kawabata A. Suppression by protease-activated receptor-2 activation of gastric acid secretion in rats. *Eur J Pharmacol* 2002; 447: 87-90
- 10 Kawabata A, Kinoshita M, Nishikawa H, Kuroda R, Nishida M, Araki H, Arizono N, Oda Y, Takehi K. The protease-activated receptor-2 agonist induces gastric mucus secretion and mucosal cytoprotection. *J Clin Invest* 2001; 107: 1443-1450
- 11 钱伟, 侯晓华, 谢小平, 张锦坤. 消化性溃疡与黏膜中糖蛋白含量的关系. *中华消化杂志* 1993; 13: 232
- 12 李建忠, 余飞飞, 岳茂兴. 胃肠功能障碍患者胃黏膜内pH值的监测方法和意义. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 983-984

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。

人肝癌细胞株线粒体DNA缺失对多药耐药表型的影响

谈荣玖, 陈宗琼, 江明万, 唐春红

谈荣玖, 陈宗琼, 江明万, 唐春红, 重庆三峡中心医院消化科
重庆市 404000

通讯作者: 谈荣玖, 404000, 重庆市, 重庆三峡中心医院消化科.
tanrongjiu.51@163.com

收稿日期: 2006-09-11 接受日期: 2006-09-25

Influence of mitochondrial DNA depletion on multidrug resistance phenotype of human hepatoma cell line

Rong-Jiu Tan, Zong-Qiong Chen, Ming-Wan Jiang,
Chun-Hong Tang

Rong-Jiu Tan, Zong-Qiong Chen, Ming-Wan Jiang,
Chun-Hong Tang, Department of Gastroenterology, Three
Gorge Central Hospital, Chongqing 404000, China

Correspondence to: Rong-Jiu Tan, Department of Gas-
troenterology, Three Gorge Central Hospital, Chongqing
404000, China. tanrongjiu.51@163.com

Received: 2006-09-11 Accepted: 2006-09-25

Abstract

AIM: To clarify the influence of mitochondrial DNA depletion on the multidrug resistance (MDR) phenotype of human hepatoma cells.

METHODS: The sensitivities of hepatoma cells to chemotherapy were determined by MTT method, and P-glycoprotein (P-gp) and MDR protein (MRP) expression were detected by immunohistochemistry. The differences of P-gp and MRP expression and sensitivities to chemotherapeutic drugs were comparatively analyzed between SK-Hep1 and rho^o SK-Hep1 cells.

RESULTS: Adriamycin inhibited SK-Hep1 cells with a rate of 56%, 61%, 72%, and 75%, respectively, at 12, 24, 36, and 48 h, while cisplatin inhibited them with a rate of 54%, 60%, 77%, and 81%. However, adriamycin inhibited rho^o SK-Hep1 cells with a rate of 10%, 18%, 20%, and 22%, while cisplatin inhibited them with a rate of 19%, 20.4%, 21.3%, and 22.5%, respectively, at 12, 24, 36, and 48 h. There were significant differences between SK-Hep1 and rho^o SK-Hep1 cells ($P < 0.01$). The expression of P-gp and MRP were markedly higher in rho^o SK-Hep1 cells

than those in SK-Hep1 cells (37% vs 20%, $P < 0.01$; 33% vs 18%, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Cells with mitochondrial DNA depletion have resistance to chemotherapy, and the increased expression of P-gp and MRP may contribute to MDR of tumor cells.

Key Words: Mitochondrial DNA; Multidrug resistance; Tumor; P-glycoprotein

Tan RJ, Chen ZQ, Jiang MW, Tang CH. Influence of mitochondrial DNA depletion on multidrug resistance phenotype of human hepatoma cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(34):3311-3313

摘要

目的: 探讨人肝癌细胞株mtDNA缺失对肿瘤MDR表型的影响。

方法: 采用MTT方法检测细胞药物敏感性, 免疫组化方法检测P-gp, MRP表达。对比分析SK-Hep1细胞和rho^o SK-Hep1细胞药物敏感性和P-gp, MRP表达的差异。

结果: 阿霉素(ADR)、顺铂CDDP对SK-Hep1细胞的12, 24, 36, 48 h抑制率分别为56%, 61%, 72%, 75%和54%, 60%, 77%, 81%, 而对rho^o SK-Hep1细胞的抑制率分别为10%, 18%, 20%, 22%和19%, 20.4%, 21.3%, 22.5%。SK-Hep1与rho^o SK-Hep1细胞比较, 药物敏感性显著降低($P < 0.01$)。较之于SK-Hep1细胞, rho^o SK-Hep1细胞P-gp, MRP表达明显增加(37% vs 20%, $P < 0.01$; 33% vs 18%, $P < 0.01$)。

结论: mtDNA缺失的肿瘤细胞对化疗药物有显著抗性, P-gp, MRP表达增加可能是其MDR表型产生的重要原因。

关键词: 线粒体DNA; 多药耐药; 肿瘤; P-糖蛋白

谈荣玖, 陈宗琼, 江明万, 唐春红. 人肝癌细胞株线粒体DNA缺失对多药耐药表型的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(34):3311-3313

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3311.asp>

■背景资料

消化系统肿瘤是我国常见的恶性肿瘤, 原发性耐药占很大的比例, 故化疗疗效不理想。因此, 研究肿瘤多药耐药(MDR)的发生机制有重要理论和应用价值。研究显示, mtDNA缺失的肿瘤细胞获得MDR表型, 但其机制尚不明确。

■应用要点

肿瘤细胞耐药给临床化疗带来困难。本文探讨人肝癌细胞株mtDNA缺失对肿瘤MDR表型的影响,为肝癌化疗提供了参考依据。

0 引言

肿瘤细胞对一种化疗药物耐药的同时,也可能对其他的化疗药物存在耐药的现象,称为多药耐药(multidrug resistance, MDR)。原发性肝癌是常见的恶性肿瘤之一,临床所见者以中晚期居多。化疗是治疗的重要手段之一,但原发性肝癌原发性耐药占很大的比例,故化疗疗效常欠理想。研究发现,线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)突变可能与肿瘤MDR产生有关^[1-3]。我们以人肝癌细胞SK-Hep1及rho⁰ SK-Hep1细胞株为研究对象,研究mtDNA缺失对化疗药物敏感性和多药耐药相关因子表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 SK-Hep1细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞与生物化学研究所, rho⁰ SK-Hep1细胞由第三军医大学凌贤龙博士馈赠。浓缩型鼠抗人P-糖蛋白(P-gp),多药耐药相关蛋白(MRP) mAb均为福州迈新公司产品, EnVision法免疫组化试剂盒为丹麦Dako公司产品。顺铂(CDDP, 济南齐鲁),阿霉素(ADR, 深圳万乐)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SK-Hep1细胞在DMEM培养基,含100 mL/L FCS, 50 mL/L CO₂, 37℃条件下进行培养。rho⁰ SK-Hep1细胞通过溴化乙锭诱导获得,培养条件:高糖DMEM培养基,含15 mL/L FCS, 100 μg/L丙酮酸、50 μg/L 5'-溴-脱氧尿嘧啶, 50 mL/L CO₂, 37℃条件下进行培养。

1.2.2 MTT方法检测药物敏感性 将对数期生长的细胞接种于96孔培养板中,培养12 h后,弃去培养液,分别加入化疗药物CDDP 10 mg/L, ADR 10 μg/L,继续培养48 h;加入5 g/L的MTT 20 μL, 4 h后加入DMSO 200 μL,以490 nm为检测波长,测定各孔的光密度值,计算抑制率。

1.2.3 免疫组化 采用微波EnVision二步法免疫组化技术检测P-gp、MRP在SK-Hep1和rho⁰ SK-Hep1细胞中的表达。按试剂盒说明书进行操作,一抗工作浓度为1:100, DAB显色。P-gp, MRP以细胞质/或细胞膜着棕黄色颗粒为阳性细胞。随机计数10个高倍视野,计算阳性细胞百分率。

统计学处理 采用SPSS10.0统计软件进行 χ^2 检验及t检验。

2 结果

2.1 SK-Hep1, rho⁰ SK-Hep1细胞株药物敏感性 12, 24, 36, 48 h ADR, CDDP对SK-Hep1细胞的抑制率分别为56%, 61%, 72%, 75%和54%, 60%,

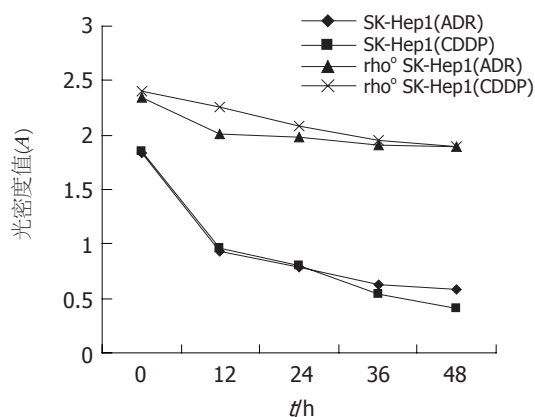


图1 药物敏感曲线。

77%, 81%, 而对rho⁰ SK-Hep1细胞的抑制率分别为10%, 18%, 20%, 22%和19%, 20.4%, 21.3%, 22.5%。SK-Hep1与rho⁰ SK-Hep1细胞比较, 都有显著差异($P < 0.01$, 图1)。

2.2 P-gp, MRP在SK-Hep1和rho⁰ SK-Hep1细胞中的表达 随机计数10个高倍视野阳性细胞数, 计算平均百分比。SK-Hep1细胞P-gp, MRP免疫组化染色阳性细胞百分比为20%, 18%, 而rho⁰ SK-Hep1细胞为37%和33%, 两者相比有非常显著差异($P < 0.01$)。

3 讨论

线粒体是真核细胞内含有核外遗传物质的细胞器,是细胞内能量合成的主要场所,亦在细胞凋亡及细胞内其他生物学行为的信号传递过程中扮演重要角色^[4]。研究显示,mtDNA缺失的肿瘤细胞获得MDR表型。本研究表明,mtDNA缺失细胞对化疗药物有明显抗性,较之于SK-Hep1细胞, rho⁰ SK-Hep1细胞对ADR, CDDP敏感性显著降低, P-gp, MRP表达增加。Pillay *et al*^[3]报道 ρ^0 细胞对ADR的敏感性显著降低,同时对其他非DNA作用药物存在MDR现象,并发现 ρ^0 细胞高表达P-gp;引起 ρ^0 细胞MDR表型还可能与线粒体热休克蛋白60(HSP60)高表达有关^[5]。结直肠癌的研究显示, HSP60在结直肠癌组织高表达^[6]。HSP60与细胞凋亡有关,他能增加胱氨酸蛋白酶的活性;还可能参与了细胞器特异的应激反应^[7]。Calcabrini *et al*^[8]对结肠癌细胞株LoVo的研究显示,敏感细胞株细胞内ROS产物显著高于药物抵抗细胞株,化疗药物的细胞毒性主要是通过细胞内存在的ROS来实现的,应用ALDH和超氧歧化酶后其细胞毒性消失。透射电镜研究发现,药物抵抗细胞株有显著的线粒体修饰,线粒

体膜过极化. 给予BASO和spermine后线粒体膜去极化. Harper *et al*^[9]比较了药物敏感和药物抵抗细胞株线粒体差异, 发现多药耐药细胞株: 线粒体膜电位较低; 逆线粒体膜质子梯度的质子转运少, 存在质子“泄漏”现象; 能量供给以脂肪为主, 细胞质内糖酵解率高; 应激状态时, 细胞内ROS水平低; 正常非应激状态, DNA损伤多于应激状态; 对凋亡不易感. 线粒体耦合蛋白2(UCP2)可能与上述差异的发生有关.

4 参考文献

- 1 Salvioli S, Storci G, Pinti M, Quaglini D, Moretti L, Merlo-Pich M, Lenaz G, Filosa S, Fico A, Bonafe M, Monti D, Troiano L, Nasi M, Cossarizza A, Franceschi C. Apoptosis-resistant phenotype in HL-60-derived cells HCW-2 is related to changes in expression of stress-induced proteins that impact on redox status and mitochondrial metabolism. *Cell Death Differ* 2003; 10: 163-174
- 2 Grandjean F, Bremaud L, Robert J, Ratinaud MH. Alterations in the expression of cytochrome c oxidase subunits in doxorubicin-resistant leukemia K562 cells. *Biochem Pharmacol* 2002; 63: 823-831
- 3 Pillay V, Martinus RD, Hill JS, Phillips DR. Upregulation of P-glycoprotein in rat hepatoma rho(o) cells: implications for drug-DNA interactions. *J Cell Biochem* 1998; 69: 463-469
- 4 韩琤波, 李凡, 辛彦. 线粒体DNA与消化性肿瘤关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 624-627
- 5 Shen DW, Akiyama S, Schoenlein P, Pastan I, Gottesman MM. Characterisation of high-level cisplatin-resistant cell lines established from a human hepatoma cell line and human KB adenocarcinoma cells: cross-resistance and protein changes. *Br J Cancer* 1995; 71: 676-683
- 6 Cappello F, Bellafiore M, Palma A, David S, Marciano V, Bartolotta T, Sciume C, Modica G, Farina F, Zummo G, Bucchieri F. 60KDa chaperonin (HSP60) is over-expressed during colorectal carcinogenesis. *Eur J Histochem* 2003; 47: 105-110
- 7 Martinus RD, Garth GP, Webster TL, Cartwright P, Naylor DJ, Hoj PB, Hoogenraad NJ. Selective induction of mitochondrial chaperones in response to loss of the mitochondrial genome. *Eur J Biochem* 1996; 240: 98-103
- 8 Calcabrini A, Arancia G, Marra M, Crateri P, Befani O, Martone A, Agostinelli E. Enzymatic oxidation products of spermine induce greater cytotoxic effects on human multidrug-resistant colon carcinoma cells (LoVo) than on their wild-type counterparts. *Int J Cancer* 2002; 99: 43-52
- 9 Harper ME, Antoniou A, Villalobos-Menuet E, Russo A, Trauger R, Vendemio M, George A, Bartholomew R, Carlo D, Shaikh A, Kupperman J, Newell EW, Bespalov IA, Wallace SS, Liu Y, Rogers JR, Gibbs GL, Leahy JL, Camley RE, Melamede R, Newell MK. Characterization of a novel metabolic strategy used by drug-resistant tumor cells. *FASEB J* 2002; 16: 1550-1557

■同行评价

本文探讨人肝癌细胞株mtDNA缺失对肿瘤MDR表型的影响. 结果发现SK-Hep1与rho^o SK-Hep1细胞比较, 药物敏感性显著降低. 较之于SK-Hep1细胞, rho^o SK-Hep1细胞Pgp, MRP表达明显增加, 为化疗提供重要的参考依据, 论文方法科学, 结果可靠, 对临床治疗有参考意义.

电编 张敏 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

中华医学会第七次全国消化系疾病学术会议征文通知

本刊讯 中华医学会消化病学分会定于2007-05月上旬在山东省济南市召开第七次全国消化系疾病学术会议. 现将会议的征文内容及有关事项通知如下.

1 征文内容

消化系统疾病的流行病学、基础及临床(包括内镜诊断和治疗)研究. 因会议论文交流将按下列组别进行分会场交流, 故务必请在下列8个组别中选择1个您认为适合的交流组别, 并在论文摘要的右下角上标明.(1)功能性胃肠疾病及动力障碍性胃肠病(包括胃食管反流病); (2)幽门螺杆菌及其相关疾病; (3)胰腺疾病; (4)肝胆疾病; (5)胃肠道肿瘤; (6)炎症性疾病; (7)胃肠激素; (8)其他.

2 征文要求

请提供800字左右的中文摘要一份, 摘要内容包括: 目的、方法、结果、结论, 注明作者的姓名、单位和邮政编码. 并提供电脑打印稿(附软盘), 经所在的单位审查盖章后寄至中华医学会学术会务部刘亚君收(北京东四西大街42号 邮编 100710), 信封上请注明会议名称. 请最好同时通过本次会议专用网站(网址: www.assimilation2007.com)邮寄电子文稿和报名. 凡已在全国性学术会议上或全国公开发行的刊物上发表过的论文, 不予受理. 截稿日期: 2007年2月28日(以当地邮戳为准)

EAP化疗联合⁶⁰Co局部放疗对晚期食管癌伴骨转移患者预后及IL-2系统的影响

达 炜, 宋明全, 孙 群, 朱 励, 张 强, 陈金联, 王 龙, 王如华, 朱金水

■背景资料

静脉化疗和放射治疗均是临床上治疗食管癌的常用治疗方法, 已经有大量报道, 作者等前期研究报道了高剂量EAP动脉化疗对晚期胃癌有效。

达炜, 宋明全, 孙群, 朱励, 张强, 陈金联, 王龙, 王如华, 朱金水, 上海交通大学附属第六人民医院消化内科 上海市200233

通讯作者: 朱金水, 200233, 上海市宜山路600号, 上海交通大学附属第六人民医院消化内科. zhujs1803@hotmail.com
电话: 021-64369181-8969 传真: 021-64837019
收稿日期: 2006-07-14 接受日期: 2006-08-10

Influence of EAP chemotherapy combined with local radiotherapy on the prognosis and interleukin-2 system of esophageal cancer patients with bone metastasis

Wei Da, Ming-Quan Song, Qun Sun, Li Zhu, Qiang Zhang, Jin-Lian Chen, Long Wang, Ru-Hua Wang, Jin-Shui Zhu

Wei Da, Ming-Quan Song, Qun Sun, Li Zhu, Qiang Zhang, Jin-Lian Chen, Long Wang, Ru-Hua Wang, Jin-Shui Zhu, Department of Gastroenterology, the Affiliated Sixth People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China

Correspondence to: Jin-Shui Zhu, Department of Gastroenterology, the Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China. zhujs1803@hotmail.com

Received: 2006-07-14 Accepted: 2006-08-10

Abstract

AIM: To observe the changes of interleukin-2 (IL-2) system and prognosis of esophageal cancer patients with bone metastasis after EAP chemotherapy combined with local radiotherapy.

METHODS: A total of 66 advanced esophageal cancer patients with bone metastasis were divided into 2 groups. One group received ⁶⁰Co local radiotherapy in combination with the regimen of intravenous chemotherapy at normal dosage of EAP (VP₁₆ 100 mg/m², topotecan 4 mg/m² and carboplatin 60 mg/m²), and the other group only received intravenous chemotherapy. The levels of IL-2, IL-2 receptor and soluble IL-2 receptor were detected before and after treatment.

RESULTS: The short-term efficacy and 1-year survival rate were significantly higher in the patients with combined treatment than those in the controls (93.93% vs 36.36%, $P < 0.01$; 90.90% vs 54.54%, $P < 0.01$). Moreover, the levels of IL-2, IL-2 receptor, soluble IL-2 receptor were also markedly higher in the former (23.6 ± 3.12 , 23.1 ± 3.14 , 771.4 ± 11.32 ng/L vs 44.1 ± 4.07 , 53.2 ± 5.24 , 123.2 ± 9.34 ng/L, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Intravenous chemotherapy in combination with radiotherapy can significantly improve the levels of IL-2, IL-2 receptor, and soluble IL-2 receptor as well as the prognosis of esophageal cancer patients with bone metastasis.

Key Words: Esophageal cancer; Interleukin-2 system; Intravenous chemotherapy; Radiotherapy

Da W, Song MQ, Sun Q, Zhu L, Zhang Q, Chen JL, Wang L, Wang RH, Zhu JS. Influence of EAP chemotherapy combined with local radiotherapy on the prognosis and interleukin-2 system of esophageal cancer patients with bone metastasis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(34):3314-3316

摘要

目的: 探讨EAP化疗联合⁶⁰Co局部放疗对晚期食管癌伴骨转移患者预后及IL-2系统的影响。

方法: 晚期食管癌伴骨转移患者66例, 分静脉化疗联合放疗治疗组和静脉化疗对照组。两组患者在治疗前及1疗程后分别检测IL-2, IL-2R和sIL-2R的水平, 并观察其近期疗效。

结果: 治疗组1疗程的近期有效率及1 a生存率显著高于对照组(93.93% vs 36.36%, $P < 0.01$; 90.90% vs 54.54%, $P < 0.01$), 并且治疗组IL-2, IL-2R, sIL-2R水平显著高于对照组(23.6 ± 3.12 , 23.1 ± 3.14 , 771.4 ± 11.32 ng/L vs 44.1 ± 4.07 , 53.2 ± 5.24 , 123.2 ± 9.34 ng/L, $P < 0.01$)。

结论: 经EAP化疗联合⁶⁰Co局部放疗治疗骨转移晚期食管癌患者, 可显著改善了其IL-2免疫系统的失衡, 并能提高晚期食管癌伴骨转移患

者的骨痛缓解率、近期有效率及生存率。

关键词: 食管癌; IL-2系统; 静脉化疗; 放疗

达炜, 宋明全, 孙群, 朱励, 张强, 陈金联, 王龙, 王如华, 朱金水. EAP化疗联合⁶⁰Co局部放疗对晚期食管癌伴骨转移患者预后及IL-2系统的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(34):3314-3316 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3314.asp>

0 引言

晚期食管癌伴骨转移往往不能进行手术治疗, 即使行单纯手术切除、静脉化疗、介入化疗等治疗疗效不佳^[1]. 局部⁶⁰Co放疗联合EAP化疗治疗食管癌及骨转移灶的应用较少, 晚期食管癌患者骨转移常有严重疼痛、进食梗阻等症状, 常规静脉化疗后存在严重的骨髓抑制及外周血粒细胞下降继发感染. 而放疗副作用主要对放射区域内的正常骨组织损伤、肿瘤放疗时间长短的控制问题^[2-3]. 我们采用常规剂量EAP化疗方案结合局部放射治疗食管癌骨转移患者取得良好疗效, 缓解了骨转移患者骨疼痛, 延长了该类患者的生存期, 改善了患者的生活质量, 并初步探讨了该方法治疗晚期食管癌骨转移疗效及相关的免疫机制.

1 材料和方法

1.1 材料 我院1999-08/2005-08收治的食管癌骨转移患者66例, 其中男35例, 女31例, 胃镜及病理证实为未分化鳞状细胞癌, 年龄36-68(平均52.3±3.2)岁. 食管癌骨内转移病灶均经CT及活检病理证实, 为无手术指征或自愿放弃手术者, 并按照生活质量的国际KPS评分标准60-90分^[4], 且治疗前均未使用干扰素或白介素-2等调节免疫的生物制品患者, 按照抽信封法随机分成一般剂量EAP静脉化疗对照组及EAP静脉化疗联合低剂量(TD3000-3500CGY) ⁶⁰Co局部放疗治疗组, 前组33例, 后组33例.

1.2 方法 所有患者均行静脉滴注化疗药物, 采用常规EAP方案(VP₁₆ 100 mg/m²+topotecan 4 mg/m²+carboplatin 60 mg/m²). 单纯静脉滴注化疗组予每6-7 wk重复一次治疗, 共予2-3个周期. 联合治疗组在原发灶及骨转移肿瘤首次局部放疗2 wk后开始常规EAP方案静脉化疗, 4 wk为1疗程; 放疗定位依照碘油肿瘤染色结合CT图像, 若病灶弥漫分布, 予食管中平面TD2000CGY; 若病灶单一或局限, 设小野照射, TD3000-3500CGY/次. 放疗分割剂量TD150-155CGY/次, 1次/d, 1-5

表 1 治疗组与对照组治疗后一疗程疗效比较(mean ± SD)

分组	CR	PR	NC	PD	死亡	合计	PR+CR(%)
治疗组	12	19	2	0	0	33	93.93 ^b
对照组	0	12	8	9	2	33	34.36

^bP<0.01 vs 对照组.

表 2 治疗组与对照组治疗前后外周血清IL-2, IL-2R, sIL-2R水平比较(mean ± SD, ng/L)

分组	n	IL-2	IL-2R	sIL-2R
治疗组	33	44.1 ± 4.1 ^b	53.2 ± 5.2 ^b	123.2 ± 9.3 ^b
对照组	33	23.6 ± 3.1	23.1 ± 3.1	771.4 ± 11.3

^bP<0.01 vs 对照组.

表 3 治疗组与对照组治疗的生存率比较(mean ± SD, %)

分组	6 mo生存率	12 mo生存率
治疗组	96.97 ^b	90.90 ^b
对照组	87.87	54.54

^bP<0.01 vs 对照组.

■应用要点

本文通过研究联合静脉化疗以及放疗来治疗晚期食管癌伴骨转移, 以求达到效果好, 副反应小等目的. 研究中用于观测的免疫学指标都已经被广泛应用. 同时, 联合治疗可以有效地改善IL-2系统的免疫调节功能, 增强免疫能力, 提高疗效, 在治疗恶性肿瘤中具有一定的优势.

次/wk, 整个化疗加放疗治疗周期为5-9 wk. 肿瘤的疗效按WHO实体瘤疗效判定标准评价, 化疗毒性按美国全国各临床肿瘤协作组制定的化疗毒性分级系统评价, 骨转移区疼痛程度按数字分级法进行评价^[2].

统计学处理 采用SPSS11.5统计软件包进行统计学处理.

2 结果

2.1 近期疗效 两组疗效均在治疗结束前后4 wk复查CT, 测量肿瘤长径×横径, 判断肿瘤近期疗效(表1).

2.2 免疫因子测定 分别于治疗前2 d, 治疗结束后2 d抽取外周血5 mL, 采用ELISA法测定外周血清IL-2, IL-2R和sIL-2R水平(表2). 治疗结束后6, 12 mo随访生存率(表3).

3 讨论

食管癌伴发进食梗阻及骨转移引起顽固性疼痛严重影响患者生活质量及预后, 我们前期研究报道高剂量EAP动脉化疗对晚期胃癌有效, 采用常规剂量静脉化疗联合低剂量的放射治疗,

同行评价

本文设计合理, 科学, 有新意, 对临床有一定实际指导价值.

在保证肿瘤局控率的前提下, 使严重的骨髓抑制发生率得以降低, 显著提高了患者治疗后的免疫调节因子IL-2, TNF- α 及IFN γ 的水平^[3-4]. 本研究⁶⁰Co局部放疗结合EAP化疗较单纯静脉化疗有利于食管癌患者机体IL-2系统的免疫调节失衡功能的恢复, 显著提高了患者治疗后IL-2及IL-2R水平, 降低了免疫抑制因子sIL-2R水平, 从而增强了机体免疫功能, 其近期有效率、半年、1 a生存率及骨疼痛缓解率显著高于对照组, 从而提高了患者的生活质量^[13-19], 我们曾采用EAP化疗结合放疗对晚期胃癌有一定疗效^[20], 但效果没有应用于治疗食管癌明显, 其机制可能与食管肿瘤组织对⁶⁰Co局部放疗高度敏感有关, 联合EAP方案中的化疗药物相对集中于肿瘤分布区, 缓慢释放, 抑制了肿瘤对周围正常组织的浸润. 多项随机对照研究认为经静脉化疗并不一定能够取得生存期的延长^[21]. 本文研究证实了在EAP静脉化疗的基础上进行局部⁶⁰Co放射治疗, 利用卡铂、VP₁₆的放疗增敏特性可有疗效相加作用, 其机制包括药物抑制放射损伤的修复, 使细胞同步化, 降低乏氧细胞的比例等, 因而化疗药物往往能增加放疗的肿瘤治疗效果^[3-5]. 根据碘油肿瘤染色, 可在透视下直接观察到骨内肿瘤位置, 提高放疗靶区定位的精确度, 减轻对正常骨组织的损伤^[6-12].

对骨转移组织实施三维放疗有利于提高靶区放疗剂量, 可望取得更好的肿瘤局控率, 相对于晚期食管癌患者而言, 肿瘤局控率的提高往往并不意味着生存期的延长, 多处器官的转移和基础疾病的恶化对生存的影响更大, 目前尚待进一步随访观察.

参考文献

- 樊青霞. 食管癌的综合治疗. 肿瘤研究与临床 2006; 18: 287-288
- 朱金水, 周信达. 现代消化系肿瘤临床治疗学. 第1版. 上海: 上海中医药出版社, 2005: 378-380
- 朱金水, 朱励, 王龙, 庄奇新, 陈维雄, 陈国强, 马积庆. 自体干细胞移植对晚期胃癌患者化疗后免疫重建作用的研究. 中华消化杂志 2003; 23: 674-677
- 王龙, 朱金水, 陈维雄, 朱励, 达伟, 王秀玲. 奥曲肽联合汉防己甲素对人胃癌细胞增殖的影响. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2318-2322
- Vij R, Triadafilopoulos G, Owens DK, Kunz P, Sanders GD. Cost-effectiveness of photodynamic therapy for high-grade dysplasia in Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 739-756
- Maier A, Tomaselli F, Matzi V, Rehak P, Pinter H, Smolle-Juttner FM. Does new photosensitizer

- improve photodynamic therapy in advanced esophageal carcinoma? *Lasers Surg Med* 2001; 29: 323-327
- Javaid B. Photodynamic therapy (PDT) for oesophageal dysplasia and early carcinoma with mTHPC (m-Tetrahydroxyphenyl chlorin): a preliminary study. *Lasers Med Sci* 2002; 17: 135
- Stepinac T, Grosjean P, Woodtli A, Monnier P, van den Bergh H, Wagnieres G. Optimization of the diameter of a radial irradiation device for photodynamic therapy in the esophagus. *Endoscopy* 2002; 34: 411-415
- Wolfsen HC, Woodward TA, Raimondo M. Photodynamic therapy for dysplastic Barrett esophagus and early esophageal adenocarcinoma. *Mayo Clin Proc* 2002; 77: 1176-1181
- Messmann H, Endlicher E, Gelbmann CM, Scholmerich J. Fluorescence endoscopy and photodynamic therapy. *Dig Liver Dis* 2002; 34: 754-761
- Radu A, Conde R, Fontollet C, Wagnieres G, Van den Bergh H, Monnier P. Mucosal ablation with photodynamic therapy in the esophagus: optimization of light dosimetry in the sheep model. *Gastrointest Endosc* 2003; 57: 897-905
- Overholt BF, Panjehpour M, Halberg DL. Photodynamic therapy for Barrett's esophagus with dysplasia and/or early stage carcinoma: long-term results. *Gastrointest Endosc* 2003; 58: 183-188
- Wolfsen HC. Endoprevention of esophageal cancer: endoscopic ablation of Barrett's metaplasia and dysplasia. *Expert Rev Med Devices* 2005; 2: 713-723
- Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbek M, Moan J, Peng Q. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 889-905
- Mall JW, Zuckermann-Becker H, Pollmann C, Opitz I, Rogalla P, Walter M. Esophageal necrosis and perforation of the left main bronchus following photodynamic therapy of esophageal carcinoma. *Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 50: 111-113
- Pech O, Nagy CD, Gossner L, May A, Ell C. Photodynamic therapy of human Barrett's cancer using 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX: an *in-vivo* dosimetry study in athymic nude mice. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 657-662
- Wolfsen HC. Photodynamic therapy for mucosal esophageal adenocarcinoma and dysplastic Barrett's esophagus. *Dig Dis* 2002; 20: 5-17
- Gossner L. Photodynamic therapy: esophagus. *Can J Gastroenterol* 2002; 16: 642-624
- Zeng ZC, Tang ZY, Wu ZQ, Ma ZC, Fan J, Qin LX, Zhou J, Wang JH, Wang BL, Zhong CS. Phase I clinical trial of oral furtulon and combined hepatic arterial chemoembolization and radiotherapy in unresectable primary liver cancers, including clinicopathologic study. *Am J Clin Oncol* 2000; 23: 449-454
- 张强, 朱金水, 姚惠香, 郭跃武, 朱励. 介入化疗联合放疗对胃癌肝转移患者免疫调控作用及疗效的影响. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1222-1225
- 陈克能, 徐光伟. 食管癌的诊断与治疗. 世界华人消化杂志 2000; 8: 196-202

电编 张敏 编辑 王晓瑜

MTA1基因表达与人胃癌的浸润和转移

刘 海, 胡俊波, 王志强, 卫子然

刘海, 中建二局二公司职工医院 华中科技大学同济医学院附属同济医院胃肠外科中心在研硕士研究生 湖北省武汉市 430030

胡俊波, 王志强, 卫子然, 华中科技大学同济医学院附属同济医院胃肠外科中心 湖北省武汉市 430030

通讯作者: 胡俊波, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院胃肠外科中心. wangzq0808@sina.com

电话: 027-83663816 传真: 027-83663400

收稿日期: 2006-09-12 接受日期: 2006-09-28

Expression of metastasis-associated gene 1 and its correlation with invasion and metastasis of human gastric carcinoma

Hai Liu, Jun-Bo Hu, Zhi-Qiang Wang, Zi-Ran Wei

Hai Liu, Jun-Bo Hu, Zhi-Qiang Wang, Zi-Ran Wei, Center of Gastrointestinal Surgery, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China.

Correspondence to: Dr. Jun-Bo Hu, Center of Gastrointestinal Surgery, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. wangzq0808@sina.com

Received: 2006-09-12 Accepted: 2006-09-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of metastasis-associated gene 1 (MTA1) in human gastric carcinoma and its correlation with tumor metastasis.

METHODS: Real time polymerase chain reaction (PCR) and Western blot were employed to detect the expression of MTA1 in gastric carcinoma and its adjacent gastric mucosa obtained from the surgical specimens of 42 patients, and the correlation between the expression of MTA1 and the differentiation and metastasis of gastric carcinoma were investigated.

RESULTS: The expression of MTA1 mRNA in gastric carcinoma was significantly higher than that in the adjacent gastric mucosa (0.6711 vs 0.3940 , $P < 0.01$), and the expression of MTA1 protein was in accordance with that of MTA1 mRNA. MTA1 mRNA expression was mark-

edly higher in the poorly-differentiated gastric carcinomas than that in the well- or moderately-differentiated ones (0.7475 vs 0.3460 , $P < 0.01$). Moreover, the expression of MTA1 mRNA was dramatically increased in the gastric carcinomas with metastasis as compared with that in the ones without metastasis (0.8128 vs 0.4933 , $P < 0.01$).

CONCLUSION: MTA1 expression is up-regulated in gastric carcinoma, which is closely correlated with the differentiation and metastasis, MTA1 may serve as a marker in predicting the biological behavior and prognosis of gastric carcinoma.

Key Words: Metastasis-associated gene 1; Gene expression; Gastric carcinoma; Tumor metastasis

Liu H, Hu JB, Wang ZQ, Wei ZR. Expression of metastasis-associated gene 1 and correlation with invasion and metastasis of human gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(34):3317-3320

摘要

目的: 探讨MTA1基因在胃癌及癌周组织中的表达及其表达水平与胃癌浸润和转移潜能的相关性。

方法: 采用荧光定量PCR及Western印迹技术, 分别在mRNA和蛋白水平检测42例手术切除的人胃癌组织及癌旁组织中MTA1的表达, 结合胃癌的临床生物学特征分析MTA1表达与胃癌病理类型、淋巴结转移的关系。

结果: 胃癌组织中MTA1 mRNA相对量的表达显著高于癌旁胃黏膜组织(0.6711 vs 0.3940 , $P < 0.01$), 蛋白水平表达与mRNA一致。低分化胃腺癌组织中的MTA1 mRNA的相对量表达显著高于中高分化胃腺癌组织(0.7475 vs 0.3460 , $P < 0.01$), 而伴有淋巴结转移的胃癌组织中MTA1 mRNA的相对量表达明显高于不伴有淋巴结转移的胃癌组织(0.8128 vs 0.4933 , $P < 0.01$)。

结论: MTA1的表达与促进胃癌的转移相关,

■背景资料

MTA1基因作为一种新的肿瘤转移相关基因, 尽管其功能还不完全清楚, 但已有的研究和资料表明, 其与许多肿瘤侵袭、转移密切相关, 并在信号传导通路中发挥作用。虽然MTA1基因在正常细胞中可能具有一定的生理功能, 但在某些癌中, 其表达量出现异常, 最终促进或导致癌转移。该蛋白可能通过影响信号传导途径发挥其功能。其功能还不是十分清楚。

■相关报道

有研究表明,食道癌、直肠癌和肝癌等中MTA1基因的高表达与肿瘤细胞的基底膜浸润、淋巴转移密切相关。

检测 MTA1表达可作为预测胃癌生物学行为、判断胃癌患者预后的一个参考指标。

关键词: 转移相关基因1; 基因表达; 胃癌; 肿瘤转移

刘海, 胡俊波, 王志强, 卫子然. MTA1基因表达与人胃癌的浸润和转移. 世界华人消化杂志 2006;14(34):3317-3320

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3317.asp>

0 引言

胃癌是我国恶性肿瘤中发病率最高的肿瘤,高转移是其一个重要的生物学特性,也是造成临床治疗失败的主要原因。而淋巴结转移是公认的预后不良因素之一。因此,探讨胃癌淋巴结转移的相关因素对其有效遏制淋巴结转移,判断预后及治疗方案的选择具有重要意义。肿瘤转移相关基因1(metastasis-associated gene 1, MTA1)是近年来发现的一个与肿瘤转移密切相关的基因,本研究主要分别从mRNA、蛋白质水平利用荧光定量PCR和Western印迹技术对MTA1在胃癌中的表达进行研究,探讨MTA1表达与胃癌浸润和转移潜能的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料 收集同济医院胃肠外科中心2003/2006年切除的胃癌癌组织标本及远离癌灶边缘5 cm无肿瘤浸润的癌旁胃黏膜组织标本42例。男26例,女16例,患者年龄29-74(平均52.50)岁,其中低分化腺癌27例,中高分化腺癌15例。42例中有淋巴结转移者22例,无淋巴结转移者20例。患者术前未经任何抗肿瘤治疗,所有病例都经病理切片证实。所取标本均置于-70℃超低温冰箱中保存备用。

1.2 方法 按TRIzol试剂盒提供的操作步骤提取总RNA, -70℃保存。利用武汉晶美公司逆转录试剂盒合成cDNA, 具体操作按试剂盒说明书中的步骤进行。cDNA产物-20℃保存。

1.2.1 荧光定量PCR检测 MTA1引物利用美国应用生物系统公司引物设计软件Primer Express Version 1.0设计, 上游引物为5'-GAGGAAGGGGAAATAGAAG -3', 下游引物为5'-TGTTCTTGTGGAGAGTATCC3-3'; GAPDH上游引物为5'-GACCCCTTCATTGACCTCAAC-3', 下游引物为5'-CTTCTCCATGGTGGTGAAGA-3'。荧光定量PCR检测反应利用美国应用生物系统公司试剂盒SYBRGreen PCR Master Mix进行。在每个25 μg反应体系中包含SYBRGreen PCR

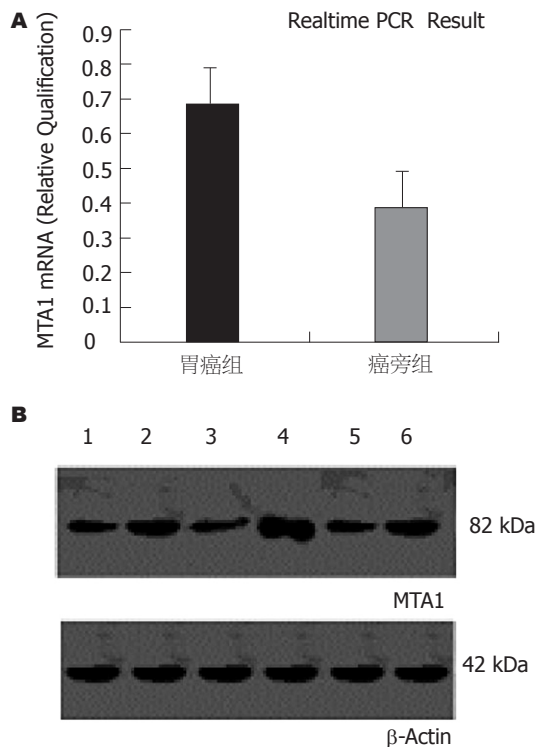


图1 胃癌组织MTA1的表达。A: 荧光定量PCR检测MTA1在胃癌中表达显著高于癌旁组织($P < 0.01$); B: Western blot显示, MTA1在胃癌中的表达显著高于其在癌周组织的表达(1, 3, 5:为癌周组织; 2, 4, 6: 胃癌组织)。

Master Mix 12.5 μL, 上下游引物各900 nmol/L, cDNA 1.0 μL。95℃变性10 min; 95℃ 10 s, 60℃ 1 min, 40个循环; 72℃延伸10 min。每种样本设3个重复孔。反应在美国应用生物系统公司7000型荧光定量PCR仪上进行。利用比较CT法检测样本的mRNA表达情况。以正常胃黏膜为校正样本, 其mRNA值设置为1, 反应体系以甘油醛232磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参照。

1.2.2 蛋白免疫印迹分析 癌组织和对应癌旁组织以三去污裂解液法(按“分子克隆”配制)提取组织中蛋白, 每孔加样50 μg蛋白, 以120 g/LSDS-PAGE凝胶电泳分离, 电转印将蛋白质转移到硝酸纤维素膜(NC膜), 用含50 g/L脱脂奶粉的TBST缓冲液37℃下封闭1 h, 将多克隆羊抗人MTA1一抗(1:1000, 美国Santa Cruz公司)和β-actin(1:200, 武汉晶美), 以含50 g/L脱脂奶粉的TBST缓冲液稀释, 分别置杂交袋中37℃孵育1 h, TBST漂洗数次后, 在1:2000稀释的HRP标记鼠抗羊IgG中于37℃孵育1 h, TBST漂洗数次, 采用ECL化学发光试剂(美国Pierce生物技术公司)于暗室中进行放射自显影。

统计学处理 采用SPSS12.0软件分析结果, 定量PCR所有数据均为正态分布, 各组间MTA1表达差异采用配对 t 检验分析。

2 结果

2.1 胃癌组织中MTA1的表达显著增高 在胃癌组织中MTA1 mRNA的比例明显高于癌旁组织, 各组mRNA相对量分别为0.6711和0.3940, 二者有显著性差异($P<0.01$); Western blot进一步证实, 胃癌组织中MTA1的蛋白表达显著高于其癌旁组织, 与mRNA一致(图1).

2.2 MTA1的表达与胃癌的分化、转移相关 荧光定量PCR对27例低分化胃癌和15例中高分化胃癌病人的手术标本检测表明, MTA1在低分化胃癌中的相对表达比例明显高于中高分化胃癌, 分别为0.7475和0.3460, 有显著性差异($P<0.01$). 22例合并有淋巴结转移者相对表达比例明显高于20例无淋巴结转移者, 分别为0.8128和0.4933, 差异有显著性($P<0.01$, 图2).

3 讨论

肿瘤致死的主要原因是瘤细胞从原发灶转移到邻近和远隔器官, 因此了解肿瘤转移所涉及的基因和基因产物是目前国内外一项重要的研究课题. 转移是一个涉及多种基因及其产物的复杂过程, 包括肿瘤细胞从原发灶脱离而侵入血管、淋巴管, 黏附内皮细胞等而停留, 在远隔部位向外浸润、诱导血管形成、逃避宿主抗肿瘤反应和在转移部位生长^[1]. 肿瘤的发展是个复杂的多阶段过程: 简单的增殖-异常的增殖-癌前病变-癌症. 最近在分子遗传学上研究表明, 不同的癌基因和抑癌基因在胃癌的发生、发展上有不同的作用. 从生物学上看, 表现在两个方面: 一是干扰肿瘤细胞的凋亡, 另一方面是异常细胞的增殖. 抑癌基因的失活或突变以及癌基因的激活或过表达, 其结果导致恶性转换或过增殖. MTA1基因作为一种新的肿瘤转移相关基因, 尽管其功能还不完全清楚, 但已有的研究和资料表明, 其与许多肿瘤侵袭、转移密切相关, 并在信号传导通路中发挥作用. Pencil *et al*^[2]利用相差杂交技术首次在鼠乳腺癌细胞株中分离一新的乳腺癌转移相关cDNA克隆, 经部分测序证明其在GEBANK EMBL数据库没有同源性核苷酸序列. Toh *et al*^[3-4]测定该基因的核苷酸序列及其蛋白产物的氨基酸序列, 命名为MTA1, 并利用Southern印迹杂交法找到其对应的人类同源物MTA1. 目前, 对于其功能还不是十分清楚, 比较确切的是MTA1蛋白能与组蛋白去乙酰化酶结合, 募集去乙酰化酶到目的基因启动子区域, 通过去除组蛋白的乙酰基来重塑染色质结构, 使

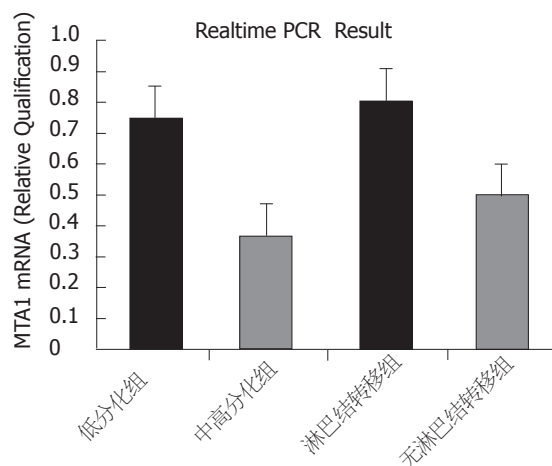


图2 荧光定量PCR检测. MTA1在低分化组与中高分化组、淋巴结转移组与无淋巴结转移组胃癌组织中相对的表达($P<0.01$).

同行评价

文章分析了肿瘤转移相关基因(MTA1)在胃癌及正常组织、转移及未转移、低分化及中高分化胃癌组织中的表达情况, 发现MTA1基因在癌、转移癌及低分化癌中表达明显增高, 认为其可作为胃癌恶性度判断的标志物, 具有一定的临床意义.

目的基因变得更加紧密而不利于转录^[5], 因此, MTA1可通过此种功能直接或者间接作用于某些抑制肿瘤浸润转移的基因, 下调其转录.

本实验利用荧光定量PCR技术检测人MTA1 mRNA在外科切除胃癌标本中的表达, 结果发现, 42例胃癌标本中mRNA的相对表达明显高于癌周正常胃黏膜, 结合相关临床病理资料可见MTA1基因表达上调, 胃腺癌分化越低, 肿瘤的浸润及淋巴结的转移率更高. 这说明, MTA1基因的过表达与肿瘤分化和转移密切相关, 可以推测MTA1 mRNA的高表达是估计胃癌恶性潜能的潜在指示因子. 这与Toh *et al*^[6]的结论是一致的. 虽然MTA1基因在正常细胞中可能具有一定的生理功能, 但在某些癌中, 其表达量出现异常, 最终促进或导致癌转移. 该蛋白可能通过影响信号传导途径发挥其功能. 我们还通过Western印迹技术发现, 胃癌组织中82 kDa蛋白条带明显高于邻近非肿瘤组织, 进一步得出MTA1在胃癌组织中可能高表达的结论.

有研究表明, 食道癌、直肠癌和肝癌等中MTA1基因的高表达与肿瘤细胞的基底膜浸润、淋巴转移密切相关^[7-9]. 这说明, MTA1基因是肿瘤浸润和转移的关键分子机制之一. Nawa *et al*^[10]发现, 抗MTA1基因的反义寡核苷酸可以抑制高表达MTA1基因mRNA的乳腺癌细胞发生转移, 并呈剂量依赖性关系. 对MTA1基因低表达的细胞没有影响, MTA1可能是通过参与信号传导与基因表达调控一系列有关浸润转移的蛋白而起重要作用^[11-12]. Iguchi *et al*^[8]用定量PCR检测13个细胞株和23个胰腺癌组织中MTA1基因的表达情况. 均发现MTA1 mRNA表达, 然而

其表达水平与发生血道远处转移的细胞株转移潜能无关。下一步我们拟通过抑制MTA1活性,探讨以MTA1为靶点基因治疗的可能性。

4 参考文献

- 1 刘霞, 王承党. 免疫分子与胃癌侵袭转移的关系. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1856-1859
- 2 Pencil SD, Toh Y, Nicolson GL. Candidate metastasis-associated genes of the rat 13762NF mammary adenocarcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 25: 165-174
- 3 Toh Y, Pencil SD, Nicolson GL. A novel candidate metastasis-associated gene, mta1, differentially expressed in highly metastatic mammary adenocarcinoma cell lines. cDNA cloning, expression, and protein analyses. *J Biol Chem* 1994; 269: 22958-22963
- 4 Toh Y, Pencil SD, Nicolson GL. Analysis of the complete sequence of the novel metastasis-associated candidate gene, mta1, differentially expressed in mammary adenocarcinoma and breast cancer cell lines. *Gene* 1995; 159: 97-104
- 5 Toh Y, Ohga T, Endo K, Adachi E, Kusumoto H, Haraguchi M, Okamura T, Nicolson GL. Expression of the metastasis-associated MTA1 protein and its relationship to deacetylation of the histone H4 in esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2004; 110: 362-367
- 6 Toh Y, Kuwano H, Mori M, Nicolson GL, Sugimachi K. Overexpression of metastasis-associated MTA1 mRNA in invasive oesophageal carcinomas. *Br J Cancer* 1999; 79: 1723-1726
- 7 Toh Y, Kuninaka S, Endo K, Oshiro T, Ikeda Y, Nakashima H, Baba H, Kohnoe S, Okamura T, Nicolson GL, Sugimachi K. Molecular analysis of a candidate metastasis-associated gene, MTA1: possible interaction with histone deacetylase 1. *J Exp Clin Cancer Res* 2000; 19: 105-111
- 8 Iguchi H, Imura G, Toh Y, Ogata Y. Expression of MTA1, a metastasis-associated gene with histone deacetylase activity in pancreatic cancer. *Int J Oncol* 2000; 16: 1211-1214
- 9 林川, 陈汉, 吴孟超, 杨广顺, 胡世杰, 戴建新. 肿瘤转移基因MTA1的分子克隆及其在肝癌组织中表达的初步研究. 中华普通外科杂志 2000; 15: 634
- 10 Nawa A, Nishimori K, Lin P, Maki Y, Moue K, Sawada H, Toh Y, Fumitaka K, Nicolson GL. Tumor metastasis-associated human MTA1 gene: its deduced protein sequence, localization, and association with breast cancer cell proliferation using antisense phosphorothioate oligonucleotides. *J Cell Biochem* 2000; 79: 202-212
- 11 Martin MD, Fischbach K, Osborne CK, Mohsin SK, Allred DC, O'Connell P. Loss of heterozygosity events impeding breast cancer metastasis contain the MTA1 gene. *Cancer Res* 2001; 61: 3578-3580
- 12 Nicolson GL, Nawa A, Toh Y, Taniguchi S, Nishimori K, Moustafa A. Tumor metastasis-associated human MTA1 gene and its MTA1 protein product: role in epithelial cancer cell invasion, proliferation and nuclear regulation. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20: 19-24

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2006-12-08)

系统检测慢性乙型肝炎患者外周血淋巴细胞免疫表型的临床意义

吴引伟, 文剑, 赵伟, 张亮, 宋玉华, 谈国蕾, 赵磊

吴引伟, 文剑, 赵伟, 张亮, 宋玉华, 谈国蕾, 赵磊, 东南大学医学院附属南京市第二医院细胞室 江苏省南京市 210003
2003年度南京市医学科技发展项目, No. YKK0328;
2003年度江苏省社会发展指导性项目, No. BS2003601
通讯作者: 吴引伟, 江苏省南京市鼓楼区钟阜路1号, 南京市第二医院细胞室. njchongchong@163.com
电话: 025-83432214-2155 传真: 025-83471484
收稿日期: 2006-08-28 接受日期: 2006-09-20

Clinical values of systemic analysis of peripheral blood mononuclear cell subsets in patients with chronic hepatitis B

Yin-Wei Wu, Jian Wen, Wei Zhao, Liang Zhang, Yu-Hua Song, Guo-Lei Tan, Lei Zhao

Yin-Wei Wu, Jian Wen, Wei Zhao, Liang Zhang, Yu-Hua Song, Guo-Lei Tan, Lei Zhao, Cell Laboratory, the Second Hospital of Nanjing Affiliated to Medical College of Southeast University, Nanjing 210003, Jiangsu Province, China
Supported by the Medical Science and Technology Foundation of Nanjing City, Jiangsu Province, No. YKK0328, and the Societal Directive Research Programs of Science and Technology Commission of Jiangsu Province, No. BS2003601

Correspondence to: Yin-Wei Wu, Cell Laboratory, the Second Hospital of Nanjing Affiliated to Medical College of Southeast University, 1 Zhongfu Road, Gulou District, Nanjing 210003, Jiangsu Province, China. njchongchong@163.com
Received: 2006-08-28 Accepted: 2006-09-20

Abstract

AIM: To study the clinical values of systemic detection for peripheral blood mononuclear cell (PBMC) subsets in patients with chronic hepatitis B (CHB).

METHODS: Flow cytometry (FCM) was used to detect the expression of CD₃, CD₄, CD₅, CD₂₅, CD₂₈ and CD₃₈ in peripheral blood lymphocytes from 28 CHB patients and 22 healthy controls, and their correlations between the quantification of hepatitis B virus (HBV) DNA.

RESULTS: The levels of CD₄⁺CD₂₅⁺, CD₈⁺HLADR⁺CD₃₈⁺, CD₃⁺CD₁₉⁺, CD₅⁺CD₁₉⁺ and CD₁₉⁺CD₃₈⁺ lymphocytes in CHB patients with

chronic hepatitis B were significantly higher than those in the controls ($t = 2.37, 3.71, 4.10, 2.31, 2.17, P < 0.05$), while the levels of CD₃⁺CD₈⁺, CD₈⁺CD₂₈⁺ and CD₃⁺CD₍₁₆₊₅₆₎⁺ lymphocytes were lower than those in the controls ($t = 3.14, 3.20, 2.51, P < 0.05$). In the patients with high replication of HBV DNA (more than 10⁹ copies/L), the numbers of CD₃⁺CD₈⁺, CD₈⁺CD₂₈⁺, CD₄⁺CD₄₅RA⁺CD₆₂L⁺, CD₈⁺CD₄₅RA⁺CD₆₂L⁺ and CD₄⁺CD₃₈⁺ cells were increased dramatically as compared with those in the patients with low HBV replication ($t = 2.16, 2.42, 2.83, 3.01, 2.50, P < 0.01$ or $P < 0.05$).

CONCLUSION: The activation of T and B lymphocytes is up-regulated in the peripheral blood of CHB patients, while the number of natural killer cells is decreased. Meanwhile, the levels of T lymphocytes are increased in patients with high HBV replication.

Key Words: Lymphocytes; Immune phenotype; Flow cytometry; Hepatitis B virus; Chronic hepatitis B

Wu YW, Wen J, Zhao W, Zhang L, Song YH, Tan GL, Zhao L. Clinical values of systemic analysis of peripheral blood mononuclear cell subsets in patients with chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(34):3321-3325

摘要

目的: 系统研究慢性乙型肝炎患者外周血淋巴细胞免疫表型以及与临床的关系。

方法: 用流式细胞术测定28例慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞膜CD₃, CD₄, CD₅, CD₂₅, CD₂₈及CD₃₈等相关CD分子的表达情况, 并与22例健康对照组比较, 并分析其与HBV DNA及临床的相关性。

结果: 28例慢性乙型肝炎患者外周血中CD₄⁺CD₂₅⁺, CD₈⁺HLADR⁺CD₃₈⁺, CD₃⁺CD₁₉⁺, CD₅⁺CD₁₉⁺及CD₁₉⁺CD₃₈⁺淋巴细胞数明显高于健康对照组($t = 2.37, 3.71, 4.10, 2.31, 2.17, P < 0.05$), 而CD₃⁺CD₈⁺, CD₈⁺CD₂₈⁺及

■背景资料

乙型肝炎的肝细胞损伤主要是通过机体一系列免疫应答所造成, 其中以细胞免疫为主。机体免疫反应的强弱及免疫调节机能是否正常与乙型肝炎临床类型及转归有密切关系。淋巴细胞在慢性乙型肝炎的发病、治疗和预后中都扮演了重要的角色, 但是在慢性乙型肝炎患者的发病过程中, 到底是哪一种淋巴细胞、哪一种淋巴细胞亚群参与了炎症反应, 以及其在种类或数量上具体有何改变, 国内外文献都未见有详细报道。

■创新盘点

本文应用流式细胞术技术以及淋巴细胞亚群分析高级组合的方法,对慢性乙型肝炎患者外周血中的淋巴细胞进行全面深入的研究,从质和量两个方面来阐明了淋巴细胞及其亚群在慢性乙型肝炎发病机理中的变化规律,系统地分析了慢性乙型肝炎患者外周血淋巴细胞的变化与临床的关系,并探求具有诊断价值和评估疗效的免疫学指标。

CD₃⁺CD₍₁₆₊₅₆₎⁺淋巴细胞数明显低于健康对照组($t = 3.14, 3.20, 2.51, P < 0.05$)。外周血中HBV DNA含量 $>10^9$ copies/L的患者其CD₃⁺CD₈⁺, CD₈⁺CD₂₈⁺, CD₄⁺CD₄₅RA⁺CD₆₂L⁺, CD₈⁺CD₄₅RA⁺CD₆₂L⁺及CD₄⁺CD₃₈⁺淋巴细胞数均显著高于HBV DNA含量 $<10^9$ copies/L的患者,差别有统计学意义($t = 2.16, 2.42, 2.83, 3.01, 2.50, P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

结论:慢性乙型肝炎患者T、B两种淋巴细胞的活化程度均较高, NK细胞数量减少;体内HBV复制活跃的患者其T淋巴细胞活化程度较高。

关键词:淋巴细胞; 免疫表型; 流式细胞术; 乙肝病毒; 慢性乙型肝炎

吴引伟, 文剑, 赵伟, 张亮, 宋玉华, 谈国蕾, 赵磊. 系统检测慢性乙型肝炎患者外周血淋巴细胞免疫表型的临床意义. 世界华人消化杂志 2006;14(34):3321-3325

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3321.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)是一种非细胞毒性病毒,其所致的肝细胞损坏是由机体针对HBV特异性抗原的免疫反应所引起, HBV感染所致的不同临床结果与机体不同的免疫状态密切相关^[1]。目前,国内外关于T细胞免疫在乙型肝炎发病中的报道较多^[2-3],但系统的对慢性乙型肝炎患者体内淋巴细胞的研究相对较少,本研究旨在系统的探讨T、B两种淋巴细胞及其活化状况在慢性乙型肝炎的发病机制以及治疗和预后中的意义。

1 材料和方法

1.1 材料 28例慢性乙型肝炎患者均为本院2004-08/2005-05收治的住院患者,其中男20例,女8例,年龄14-55(平均 28.6 ± 13.5)岁。所有病例的诊断均符合2000-09全国第10次传染病寄生虫病学术会议所修定的《病毒性肝炎防治方案》的诊断标准^[4]。22例健康对照者为本院正常体检的职工,其中男15例,女性7,年龄18-35(平均 24.5 ± 6.9)岁。流式细胞仪为美国Bectond-Dickinson公司的FACSCalibur型; EDTA. K₂抗凝管为美国Bectond-Dickinson公司产品; CD₃, CD₄, CD₅, CD₁₉, CD₂₈及CD₃₈等各种荧光标记mAb为美国Beckman Coulter公司产品。

1.2 方法

1.2.1 T、B两种淋巴细胞及其活化状况的检测 对慢性乙型肝炎患者及健康对照者的抗凝全

血应用以下荧光素: 异硫氰酸荧光素(FITC)、藻红蛋白(PE)、藻红蛋白-花青组合染料(PE-Cy5)及别藻蓝蛋白(APC)标记的单抗组合进行染色: MsIgG2α-FITC, MsIgG2α-PE, MsIgG2α-PE-Cy5, MsIgG2α-APC; CD₃, CD₁₉, CD₈, CD₄, CD₆₂L, CD₄₅RA, CD₈, CD₄, CD₄₅RO, CD₄₅RA, CD₈, CD₄, CD₉₅, CD₂₈, CD₈, CD₄, CD₂₉, CD₂₅, CD₈, CD₄, CD₃₈, HLADR, CD₈, CD₄, CD₃₈, CD₂₃, CD₁₉, CD₅, CD₃, CD₍₁₆₊₅₆₎。室温避光孵育15 min, 加入溶血素100 μL, 室温孵育10 min, 再加入ddH₂O 1000 μL, 室温孵育10 min, FACSCCELLQUEST软件进行检测分析,共收集10 000个细胞。流式细胞仪结果分析: 以前向角散射光(FSC)为横坐标, 侧向角散射光(SSC)为纵坐标, 对淋巴细胞群进行设门, 以同型对照(MsIgG2α)分别设定不同荧光素的阴性界限; 确定T、B两种淋巴细胞的百分率并分别分析淋巴细胞表面各种CD分子的表达情况。

1.2.2 慢性乙型肝炎患者外周血中HBV DNA的定量测定 检测患者T、B淋巴细胞的同时, 检测患者血清中HBV DNA的含量, 方法为荧光定量PCR法, 仪器为罗氏公司的实时荧光定量PCR仪, HBV DNA的检测阈值为 5×10^5 copies/L。

统计学处理 用SPSS10.0软件包进行统计学分析, 均数间的比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 慢性乙型肝炎患者外周血T、B淋巴细胞及其活化状况 28例慢性乙型肝炎患者外周血中CD₄⁺CD₂₅⁺, CD₈⁺HLADR⁺CD₃₈⁺, CD₃⁺CD₁₉⁺, CD₅⁺CD₁₉⁺及CD₁₉⁺CD₃₈⁺淋巴细胞数明显高于健康对照组; CD₃⁺CD₈⁺, CD₈⁺CD₂₈⁺及CD₃⁺CD₍₁₆₊₅₆₎⁺淋巴细胞数明显低于健康对照组, 差别均有统计学意义(表1)。

2.2 HBV DNA含量不同的慢性乙型肝炎患者外周血淋巴细胞及其活化状况 外周血中HBV DNA含量 $>10^9$ copies/L的患者其CD₃⁺CD₈⁺, CD₈⁺CD₂₈⁺, CD₄⁺CD₄₅RA⁺CD₆₂L⁺, CD₈⁺CD₄₅RA⁺CD₆₂L⁺及CD₄⁺CD₃₈⁺淋巴细胞数均显著高于HBV DNA含量 $<10^9$ copies/L的患者, 差别有统计学意义($P < 0.05$, 表2)。

3 讨论

HBV并不直接引起肝细胞的损伤, 机体免疫应答是引起肝细胞损害的重要原因。目前研究认为, 细胞免疫反应是HBV感染后引起肝细胞损害的主要机制^[5-8], 包括特异性杀伤T细

表 1 慢性乙型肝炎患者外周血淋巴细胞及其活化状况的测定结果(mean \pm SD, %)

CD分子标志	组别		<i>t</i>	<i>p</i>
	慢乙肝组 (<i>n</i> = 28)	对照组 (<i>n</i> = 22)		
CD ₃ ⁺	57.7 \pm 13.4	53.1 \pm 13.3	1.18	>0.05
CD ₃ ⁺ CD ₄ ⁺	33.5 \pm 11.1	28.6 \pm 10.7	1.55	>0.05
CD ₃ ⁺ CD ₈ ⁺	21.3 \pm 7.9	19.2 \pm 6.2	1.03	>0.05
CD ₃ ⁺ CD ₈ ⁺	3.4 \pm 2.0	6.7 \pm 4.8	3.14	<0.01
CD ₃ ⁺ CD ₄ ⁺ CD ₈ ⁺	2.9 \pm 8.4	2.5 \pm 5.2	0.21	>0.05
CD ₃ ⁺ CD ₄ ⁺ CD ₈ ⁺	12.5 \pm 4.7	13.4 \pm 8.3	0.50	>0.05
CD ₄ ⁺ CD ₂₉ ⁺	21.2 \pm 8.7	18.7 \pm 11.0	0.88	>0.05
CD ₄ ⁺ CD ₂₉ ⁺	13.3 \pm 11.4	10.8 \pm 5.5	0.94	>0.05
CD ₄ ⁺ CD ₂₈ ⁺	34.7 \pm 11.4	28.9 \pm 10.0	1.85	>0.05
CD ₄ ⁺ CD ₂₈ ⁺	0.8 \pm 0.9	1.3 \pm 1.3	1.42	>0.05
CD ₈ ⁺ CD ₂₈ ⁺	20.1 \pm 6.7	17.8 \pm 7.0	1.19	>0.05
CD ₈ ⁺ CD ₂₈ ⁺	5.8 \pm 3.5	10.4 \pm 6.3	3.20	<0.01
CD ₄ ⁺ CD ₄₅ RA ⁺ CD ₆₂ L ⁺	38.0 \pm 10.1	43.7 \pm 12.0	1.78	>0.05
CD ₄ ⁺ CD ₄₅ RO ⁺ CD ₄₅ RA ⁺	47.7 \pm 14.9	44.2 \pm 13.7	0.84	>0.05
CD ₈ ⁺ CD ₄₅ RA ⁺ CD ₆₂ L ⁺	43.1 \pm 13.9	39.3 \pm 14.0	0.94	>0.05
CD ₈ ⁺ CD ₄₅ RO ⁺ CD ₄₅ RA ⁺	24.5 \pm 15.4	23.4 \pm 11.7	0.27	>0.05
CD ₄ ⁺ CD ₂₅ ⁺	18.3 \pm 9.0	12.6 \pm 7.2	2.37	<0.05
CD ₄ ⁺ HLADR ⁺	3.7 \pm 5.9	2.3 \pm 2.7	0.99	>0.05
CD ₄ ⁺ CD ₃₈ ⁺	5.5 \pm 3.7	5.5 \pm 3.4	0.05	>0.05
CD ₄ ⁺ CD ₉₅ ⁺	12.8 \pm 6.8	11.9 \pm 7.4	0.44	>0.05
CD ₄ ⁺ HLADR ⁺ CD ₃₈ ⁺	3.0 \pm 2.6	2.1 \pm 1.6	1.37	>0.05
CD ₄ ⁺ CD ₈ ⁺ CD ₂₅ ⁺	3.7 \pm 10.7	5.3 \pm 11.4	0.48	>0.05
CD ₄ ⁺ CD ₈ ⁺ HLADR ⁺	3.2 \pm 9.9	2.1 \pm 6.1	0.43	>0.05
CD ₄ ⁺ CD ₈ ⁺ CD ₃₈ ⁺	0.5 \pm 1.3	0.35 \pm 0.9	0.58	>0.05
CD ₄ ⁺ CD ₈ ⁺ CD ₉₅ ⁺	0.8 \pm 2.2	1.8 \pm 2.5	1.40	>0.05
CD ₈ ⁺ HLADR ⁺ CD ₃₈ ⁺	16.6 \pm 8.2	9.0 \pm 5.3	3.71	<0.01
CD ₈ ⁺ CD ₂₈ ⁺ CD ₉₅ ⁺	61.4 \pm 18.1	60.8 \pm 16.3	0.11	>0.05
CD ₈ ⁺ CD ₂₈ ⁺ CD ₉₅ ⁺	0.12 \pm 0.3	0.3 \pm 0.8	1.21	>0.05
CD ₃ ⁺ CD ₍₁₆₊₅₆₎ ⁺	10.2 \pm 6.1	15.4 \pm 8.2	2.51	<0.05
CD ₃ ⁺ CD ₍₁₆₊₅₆₎ ⁺	3.5 \pm 3.4	3.6 \pm 2.8	0.15	>0.05
CD ₃ ⁺ CD ₁₉ ⁺	13.2 \pm 5.7	7.7 \pm 2.8	4.1	<0.05
CD ₁₉ ⁺ CD ₅ ⁺	4.1 \pm 12.7	0.3 \pm 0.4	1.38	>0.05
CD ₁₉ ⁺ CD ₅ ⁺	4.3 \pm 3.7	2.3 \pm 1.3	2.31	<0.05
CD ₁₉ ⁺ CD ₂₃ ⁺	6.9 \pm 12.1	2.2 \pm 1.4	1.79	>0.05
CD ₁₉ ⁺ CD ₂₃ ⁺	2.1 \pm 4.5	0.6 \pm 0.5	1.45	>0.05
CD ₁₉ ⁺ CD ₃₈ ⁺	2.2 \pm 4.3	0.3 \pm 0.2	2.17	<0.01

表 2 HBV DNA含量不同的慢性乙型肝炎患者外周血淋巴细胞及其活化状况(mean \pm SD, %)

CD分子标志	组别		<i>t</i>	<i>p</i>
	HBV DNA $\geq 10^9$ copies/L组 (<i>n</i> = 14)	HBV DNA $< 10^9$ copies/L组 (<i>n</i> = 12)		
CD ₃ ⁺ CD ₈ ⁺	25.2 \pm 7.4	17.2 \pm 7.7	2.16	<0.05
CD ₈ ⁺ CD ₂₈ ⁺	23.1 \pm 5.8	16.2 \pm 7.1	2.42	<0.05
CD ₄ ⁺ CD ₄₅ RA ⁺ CD ₆₂ L ⁺	43.2 \pm 9.0	29.9 \pm 6.1	2.83	<0.01
CD ₈ ⁺ CD ₄₅ RA ⁺ CD ₆₂ L ⁺	49.2 \pm 9.9	31.9 \pm 13.3	3.01	<0.01
CD ₄ ⁺ CD ₃₈ ⁺	7.7 \pm 4.5	3.2 \pm 2.6	2.50	<0.05

胞、T辅助细胞、非特异性单核巨噬细胞和NK细胞, 其中特异性杀伤T细胞被认为是免疫应答的主要效应细胞, 在病毒感染尤其是持续性病毒感染的清除中起了重要作用^[9-10]。根据外周血淋巴细胞表面CD分子的表达不同, 可以将其分为T、B两种淋巴细胞, 并可进一步分为许多亚群, 包括辅助性T细胞(CD₃⁺CD₄⁺, CD₄⁺CD₂₈⁺, CD₄⁺CD₂₅⁺等)、活化的辅助性T细胞(CD₄⁺CD₉₅⁺, CD₄⁺CD₂₅⁺, CD₄⁺CD₃₈⁺等)、抑制

性/细胞毒性T细胞(CD₃⁺CD₈⁺, CD₄⁺CD₂₈⁺等)、活化的抑制性/细胞毒性T细胞(CD₈⁺CD₂₅⁺, CD₄⁺CD₃₈⁺, CD₄⁺CD₉₅⁺等)、B淋巴细胞(CD₃⁺CD₁₉⁺)、活化的B淋巴细胞(CD₁₉⁺CD₅⁺, CD₁₉⁺CD₂₃⁺, CD₁₉⁺CD₃₈⁺等)及NK细胞(CD₃⁺CD₈⁺, CD₃⁺CD₍₁₆₊₅₆₎⁺)等。不同亚群的细胞在机体的免疫反应中扮演着不同的角色, 如CD₈⁺CD₂₈⁺细胞是MHC2类限制性细胞前体细胞, 具有MHC2类限制细胞毒活性, 在CD₄⁺T细胞分泌细胞因子的

同行评价

本文探讨了系统检测慢性乙型肝炎患者外周血淋巴细胞免疫表型的临床意义, 实验设计合理, 方法得当, 有一定的科学性和可读性。

作用下, 分化为效应性Tc, 对病毒感染后的靶细胞有特异性杀伤作用, $CD_8^+CD_{28}^-$ (Ts)细胞亚群有免疫抑制作用可抑制抗体的产生及同种异体抗体所诱导的细胞增殖反应, 抑制 CD_4^+ T细胞产生细胞因子, 从而抑制Tc细胞的毒性^[11]. 本实验结果表明, 慢性乙型肝炎患者外周血 $CD_8^+CD_{28}^+$ 细胞数高于健康对照组, 但差别无统计学意义, 而 $CD_8^+CD_{28}^-$ 细胞数明显低于健康对照组, 差别具有统计学意义($P<0.01$). 说明慢性乙型肝炎患者体内特异性杀伤T细胞作用有所增强, 而免疫抑制作用明显减弱, 导致肝脏慢性炎症的持续存在.

HBV是一种非细胞毒性病毒, 但由于HBV在复制过程中, 其病毒抗原往往表达于肝细胞膜上或细胞质内, 当机体免疫细胞作用于这些抗原时引起肝细胞的损坏. 作者检测了慢性乙型肝炎患者的T淋巴细胞活化情况, 结果表明, 慢性乙型肝炎患者 $CD_8^+CD_{38}^+HLADR^+$ 细胞数明显高于健康对照组, 这反映出慢性乙肝患者体内存在着淋巴细胞的明显激活, 这可能正是其肝细胞损伤的原因之一. 说明慢性肝炎的病情加重及持续, 主要是由于 CD_8^+ 细胞毒性淋巴细胞(即CTL)的作用, 即CTL通过人类MHC类抗原和对乙肝抗原的双重识别, 而直接杀伤肝细胞. 另外, 最近有研究表明, $CD_4^+CD_{25}^+$ 调节性T淋巴细胞可抑制T细胞免疫反应, transwell室研究显示, $CD_4^+CD_{25}^+$ 细胞介导的抑制作用呈剂量依赖性且需要细胞间的接触, 在调控自身免疫性疾病的发生、炎症反应和T细胞稳态中发挥重要作用^[12-13]. 结果显示, 慢性乙型肝炎患者其外周血中 $CD_4^+CD_{25}^+$ 细胞数明显高于健康对照组, 由此推论, $CD_4^+CD_{25}^+$ T淋巴细胞通过抑制细胞与细胞接触式的HBV特异性T细胞反应, 导致慢性乙型肝炎患者体内HBV的持续存在. NK细胞是不同于T、B淋巴细胞而具有直接杀伤靶细胞效应的一个特殊淋巴细胞系, 它具有抗肿瘤、抗感染、免疫调节等功能. NK细胞在体内针对病毒感染细胞的作用不需要特异性抗原的刺激, 免疫复合物、靶细胞表面结构及某些细胞因子均可直接诱发NK细胞的快速免疫反应, 并可在数小时或1 d内达到高峰. NK细胞在抗病毒感染中至少表现以下两方面功能, 首先NK细胞能直接杀伤被感染的细胞, 其次NK细胞能够分泌大量的具有抗病毒效应的炎性细胞因子^[14]. 作者通过研究发现, 慢性乙型肝炎患者体内的NK细胞($CD_3^+CD_8^+$, $CD_3^+CD_{16+56}^+$)明显低于健康对照, 说明慢性乙型肝炎患者体内NK细

胞的减少与慢性乙型肝炎的慢性化进程有一定的相关关系.

以往体液免疫在慢乙肝发病中的作用研究得相对较少, 本研究发现, 28例慢乙肝患者外周血中B淋巴细胞($CD_3^+CD_{19}^+$)以及活化的B淋巴细胞($CD_3^+CD_{19}^+$, $CD_{19}^+CD_{38}^+$)数明显高于健康人, 而且, 患者血清免疫球蛋白(IgG, IgA及IgM)含量也显著高于健康人^[15], 说明体液免疫在慢性肝炎的病程中也起到了关键作用. 提示患者在发生HBV感染后, 通过各种病毒抗原激发机体免疫系统使致敏B细胞转化为浆细胞, 并产生了能与相应抗原结合的抗体, 这些抗体能对血液中的HBV进行反应加以杀灭. 虽然HBV抗原大多位于胞质内, 但仍有部分位于胞膜上及核内, 因此在抗原抗体发生免疫反应过程中, 受病毒感染过的肝细胞亦遭到攻击, 使肝细胞受到损害. 抗原和抗体之间量的不平衡决定了乙型肝炎病变的程度, 当体内产生的抗体不足以清除抗原时会出现抗原过剩, 则表现为慢性肝炎, 这就可以解释为什么慢乙肝患者B淋巴系统被激活的原因了. 我们还发现, HBV DNA高复制组($HBV\ DNA>10^9\ copies/L$)的 $CD_3^+CD_8^+$ (CTL)、 $CD_8^+CD_{28}^+$ (细胞毒前体/效应T细胞)、 $CD_4^+CD_{45}RA^+CD_{62}L^+$ (真正幼稚的 CD_4^+ 细胞)、 $CD_8^+CD_{45}RA^+CD_{62}L^+$ (真正幼稚的 CD_8^+ 细胞)及 $CD_4^+CD_{38}^+$ (活化的辅助性T细胞)细胞均显著升高, 说明HBV的高复制状态能刺激静止和细胞毒性CTL细胞以及效应杀伤细胞的前体细胞的增殖, 也进一步证实了细胞免疫在慢性乙型肝炎发病过程中起到了至关重要的作用.

总之, 慢性乙型肝炎患者T、B两种淋巴细胞的活化程度均较高, NK细胞数量减少, 细胞免疫在慢性乙型肝炎发病过程中起到了重要的作用; 活化的B淋巴细胞通过体液免疫能改善患者的肝功能状况. 体内HBV复制活跃的患者其T淋巴细胞活化程度较高. 通过系统检测慢性乙型肝炎患者外周血淋巴细胞免疫表型, 可以推断慢性乙型肝炎患者的发病状况, 为临床的诊治提供参考依据.

4 参考文献

- 1 Van Hecke E, Paradijs J, Molitor C, Bastin C, Pala P, Slaoui M, Leroux-Roels G. Hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocyte responses in patients with acute and chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 1994; 20: 514-523
- 2 Maini MK, Boni C, Lee CK, Larrubia JR, Reignat S, Ogg GS, King AS, Herberg J, Gilson R, Alisa A,

- Williams R, Vergani D, Naoumov NV, Ferrari C, Bertolotti A. The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2000; 191: 1269-1280
- 3 肖光明, 姚细安, 连粤湘, 吴茂盛, 刘远煌, 雷春亮. 乙型肝炎患者外周血T淋巴细胞亚群的变化. *实用肝脏病杂志* 2005; 8: 22-24
- 4 中华传染病与寄生虫病学会和肝脏病学分会. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 324
- 5 王长嘉, 韩伟, 刘宇琼, 路洪艳, 房长茂. 慢性乙肝患者淋巴细胞亚群检测及临床应用. *中国实验诊断学* 2002; 6: 144-145
- 6 黄锦生, 张慧敏, 陈惠珍. HBV携带者细胞免疫和体液免疫功能的变化. *中国公共卫生* 2002; 18: 551-552
- 7 魏然, 夏作理, 陈彬, 韩纪举, 任道凌, 杨明峰. 慢性乙型肝炎患者外周血CD₁₄⁺细胞的功能状态. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 618-621
- 8 邢汉前, 辛绍杰, 赵景民, 陈黎明, 李保森, 游绍莉, 赵军, 周光德, 潘登. HBV慢性感染患者免疫耐受期肝组织内T、B淋巴细胞的变化. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1529-1534
- 9 杨斌, 张鸿飞, 范振平, 王福生. HBV感染患儿外周血T淋巴细胞亚群的分析与临床意义. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1295-1298
- 10 范振平, 张玲霞, 杨斌, 施明, 张晖, 王福生. 乙型肝炎患者外周血T淋巴细胞亚群的特点和意义. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 194-197
- 11 Kudoh A, Katagai H, Takazawa T. Plasma proinflammatory cytokine response to surgical trauma in chronic depressed patients. *Cytokine* 2001; 13: 104-108
- 12 王胜军, 许化溪, 杨胜利. CD₄⁺CD₂₅⁺调节性T细胞. *细胞生物学杂志* 2005; 27: 61-65
- 13 杨炼, 管小琴, 肖明. HBV感染对人T细胞免疫及细胞因子TNF-GF-的影响. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 729-733
- 14 Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 65-91
- 15 吴引伟, 文剑. 慢性乙型肝炎患者B淋巴细胞及其活化状况对治疗和预后的影响. *临床荟萃* 2006; 21: 31-33

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 •

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)请在信封上注明“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.

生脉注射液联合葛根素注射液对肝硬化患者肝纤维化指标的影响

荣晓凤, 姚蔚瑜

■背景资料

肝硬化是严重危害人类健康的常见病之一, 目前, 我国的发生率仍保持在较高水平。肝硬化的病理学基础是肝纤维化, 如何阻止肝纤维化的发展已成为治疗各种慢性肝病的核心问题, 目前缺乏理想有效的抗纤维化的西药, 中医药治疗各种慢性肝病导致的肝硬化已显示出良好趋势。故本临床观察常用中药生脉注射液和葛根素注射液对肝硬化患者肝纤维化指标的作用, 为探讨肝硬化的临床治疗方法有所启示。

荣晓凤, 姚蔚瑜, 重庆医科大学附属第一医院中西医结合科 重庆市 400016

通讯作者: 荣晓凤, 400016, 重庆市, 重庆医科大学附属第一医院中西医结合科, cyrxf@163.com

电话: 023-89012863

收稿日期: 2006-06-06 接受日期: 2006-07-10

Influence of Shenmai injection combined with Gegengsu injection on liver fibrosis indexes in patients with cirrhosis

Xiao-Feng Rong, Wei-Yu Yao

Xiao-Feng Rong, Wei-Yu Yao, Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, the Affiliated First Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China. cyrxf@163.com

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

Abstract

AIM: To study the efficacy of Shenmai injection combined with Gegengsu injection in the prevention of liver fibrosis.

METHODS: A total of 50 patients were randomly divided into 2 groups. One served as the control group, and only treated by routine methods. The other group received Shenmai and Gegengsu injection based on routine treatment. The liver function and fibrosis indexes were detected before and after treatment.

RESULTS: The overall efficacy rate was significantly higher in the experiment group than that in the control group (82.1% vs 59.1%, $P < 0.05$), and liver function was also improved. The fibrosis indexes ($\mu\text{g/L}$) such as hyaluronic acid, type III procollagen, type IV collagen, and laminin were significantly down-regulated in the experiment group in comparison with those in the control group (231.1 ± 111.3 vs 424.4 ± 166.2 ; 132.1 ± 110.5 vs 207.1 ± 105.7 ; 104.4 ± 26.5 vs 144.7 ± 26.9 ; 107.2 ± 26.8 vs 160.8 ± 46.2 ; all $P < 0.05$) and those before treatment (480.2 ± 181.4 , 216.1 ± 161.4 , 148.3 ± 27.2 , 161.8 ± 43.7) ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Chinese medicine Shenmai injection combined with Gegengsu injection can improve the liver function of and fibrosis indexes of cirrhotic patients.

Key Words: Shenmai injection; Gegengsu injection; Liver fibrosis; Cirrhosis

Rong XF, Yao WY. Influence of Shenmai injection combined with Gegengsu injection on liver fibrosis indexes in patients with cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(34):3326-3329

摘要

目的: 观察生脉注射液联合葛根素注射液对肝硬化患者血清肝纤维化指标的作用。

方法: 将50例肝硬化患者随机分为两组, 对照组22例采用常规保肝、降酶等治疗, 治疗组28例加用生脉注射液和葛根素注射液, 分别检测治疗前后的肝功能、肝纤维化指标等。

结果: 总有效率治疗组显著高于对照组 (82.1% vs 59.1%, $P < 0.05$)。治疗组肝功能优于对照组, 并且治疗前后也有显著差异 ($P < 0.05$)。治疗组纤维化指标 ($\mu\text{g/L}$) HA、PⅢP、IV-C、LN显著低于对照组 (231.1 ± 111.3 vs 424.4 ± 166.2 ; 132.1 ± 110.5 vs 207.1 ± 105.7 ; 104.4 ± 26.5 vs 144.7 ± 26.9 ; 107.2 ± 26.8 vs 160.8 ± 46.2 ; 均 $P < 0.05$), 同时也低于本组治疗前 (480.2 ± 181.4 , 216.1 ± 161.4 , 148.3 ± 27.2 , 161.8 ± 43.7) (均 $P < 0.05$)。

结论: 中药生脉注射液和葛根素注射液能明显改善肝功能, 在抗肝纤维化治疗中有确切疗效。

关键词: 生脉注射液; 葛根素注射液; 肝纤维化; 肝硬化

荣晓凤, 姚蔚瑜. 生脉注射液联合葛根素注射液对肝硬化患者肝纤维化指标的影响. *世界华人消化杂志* 2006;14(34):3326-3329

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3326.asp>

0 引言

肝硬化是一种常见的由慢性乙型肝炎、乙醇、免疫性等多种病因导致的肝脏慢性、进行性、弥漫性病变, 在广泛的肝细胞变性、坏死基础上纤维组织增生、小叶结构和血管改变, 肝质地逐渐变硬缩小, 晚期出现肝功能衰竭、门静脉高压和多种并发症, 其病理改变难于逆转^[1]。目前, 总的治疗原则以延缓病情、保护肝细胞、抗肝纤维化为主。近年研究显示, 不同功效的中药单方及复方制剂抗慢性肝病肝纤维化已取得肯定结果^[2-10]。我们采用常规保肝、降酶、支持等治疗基础上加用生脉注射液和葛根素注射液治疗肝硬化取得较好疗效, 报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 所观察病例均系2005-01/2005-12在我院我科的住院患者共50例, 其中治疗组28例, 男18例, 女10例, 年龄31-71(平均44.3)岁, 病程4 mo-6 a, 平均5.4 a, 其中乙肝后肝硬化20例、乙醇性肝硬化5例、免疫性肝硬化3例。对照组22例, 男15例, 女7例, 年龄28-74(平均46.4)岁, 病程4 mo-7 a(平均5.7a), 其中乙肝后肝硬化17例、乙醇性肝硬化4例、免疫性肝硬化1例。两组资料经统计学处理无差异性。临床诊断参照2000-09中华医学传染病与寄生虫病分会修订的病毒性肝炎防治方案^[11], 符合肝硬化失代偿诊断标准: (1)肝功能异常; (2)门脉高压症候群; (3)超声等影像学检查提示肝硬变; (4)血清4项纤维化指标中透明质酸(HA)、层黏蛋白(LN)、III型前胶原(PC-III)、IV型胶原(IV-C)有两项高于正常值; (5)除外药物性肝炎、糖尿病、高血压、肾脏病等对纤维化指标有影响的疾患。

1.2 方法 两组均采用一般治疗、补充维生素、保护肝细胞、纠正水电解质失衡及支持治疗等, 予复合维生素B、联苯双脂、安体舒通、复合氨基酸胶囊等口服。治疗组加用生脉注射液(吉林集安益盛药业生产)30-40 mL加入50 g/L葡萄糖注射液250 mL静脉滴注及葛根素注射液(北京协和制药厂生产)200-400 mg加入50g/L葡萄糖注射液250 mL静脉滴注, 1次/d, 连用15 d为一疗程, 休息5 d后, 继续第2疗程, 连续6个疗程, 用药前及用药后抽血查肝功能, 由我院检验科血清生化自动检测仪测定。透明质酸酶(HA)、III型前胶原(PHIIIP)、IV型胶原(IV-C)、层连蛋白(LN)采用放射免疫法, 由我院核医学科检测, 试剂盒由上海海军医学研究所生物技术中心提供。

表1 两组疗效比较 (n, %)

组别	n	显效	有效	无效	总有效率
治疗组	28	6(21.4) ^a	17(60.7) ^a	5(17.9) ^a	23(82.1) ^a
对照组	22	3(13.6)	10(45.4)	9(41.0)	13(59.1)

^a $P<0.05$ vs 对照组。

用药1 a后做B超检查肝脏形态, 由我院B超室检查, 主要观察肝脏大小、形态、门静脉内径、脾静脉内径等。疗效判定标准参照2000-09中华医学传染病与寄生虫病分会修订的病毒性肝炎防治方案^[11]。

统计学处理 采用 t 检验及 χ^2 检验, 应用SPSS统计软件进行统计。

2 结果

2.1 两组疗效比较 12 mo后, 治疗组疗效优于对照组($P<0.05$, 表1)。

2.2 两组用药前后肝功能测定 两组治疗后肝功能均有改善, 治疗组改善更明显($P<0.05$, 表2)。

2.3 两组用药前后肝纤维指标的变化 治疗后, 肝纤维指标均有不同程度下降, 治疗组改善更明显(表3)。

2.4 肝脏形态学的变化 治疗后, 肝脏大小、形态无明显变化; 治疗组治疗后门静脉内径有一定程度减小, 但无统计学意义。

3 讨论

肝纤维化是指肝脏内纤维性结缔组织异常增生, 是一种“创伤愈合”的慢性渐进的过程, 其机制为细胞外基质(ECM)的合成与降解失调, 病理特征为胶原纤维生成及大量ECM在disse间隙沉积。HA由肝内间质细胞合成, 经肝窦内皮细胞摄取和分解, 其升高反映了肝内间质细胞增生或血流受阻; PHIIIP由肝星状细胞(HSC)排泌到细胞外沉积时, 部分进入血循环, 所以血中PHIIIP升高可以特异性反映肝内有活跃的纤维生成; IV-C为组成基底膜的成分, 在肝纤维化进程中, 形成“毛细血管化”起重要作用; LN是基底膜的主要成分, 其升高与肝纤维化有良好的相关性。HA, PHIIIP, IV-C和LN已作为判断肝纤维化的常用指标。因此, 肝硬化后期出现的肝功能损害、门脉高压等表现多与微循环障碍有关, 而改善肝脏循环、阻断肝纤维化在治疗中起关键作用。

目前, 中医药多采用清热解毒、活血化瘀、益气活血、舒肝活络、温阳化瘀等方法,

■创新盘点

目前, 中医药抗肝纤维化的实验和临床研究有较多报道, 多以活血化瘀方药为主, 治疗主要针对病因, 其次是抑制ECM生成、促进纤维降解、抑制HSC活化等。而益气养阴类药物未见报道。中医理论认为, “肝”属木, 体阴而用阳, 喜润恶燥。肝硬化的基本病机为正衰邪盛、肝郁脾虚夹湿热血瘀。本课题组在长期临床中观察到, 本病多数为气阴两虚夹肝郁血瘀, 故治疗以益气养阴、柔肝舒郁, 佐以活血化瘀为主能减轻患者临床症状, 改善肝功能, 改善肝纤维化指标, 其机制可能与多条途径抗肝纤维化有关, 有待实验研究进一步证实。

■应用要点

本临床观察结果显示, 中药生脉注射液联合葛根素注射液能有效治疗肝硬化, 改善肝纤维化指标, 符合中医传统理论对肝脏生理功能特点的认识, 为进一步开发抗肝纤维化的中药新药打下理论基础。

表 2 两组治疗前后常规肝功能比较 (mean ± SD)

组别	<i>n</i>	ALT (μkat/L)	AST (μkat/L)	ALB (g/L)	TB (μmol/L)	
治疗组	28	治疗前	3.0 ± 1.5	4.7 ± 1.5	28.7 ± 4.3	169.2 ± 58.4
		治疗后	1.1 ± 0.5 ^{ac}	1.4 ± 0.3	31.1 ± 3.4 ^{ac}	47.3 ± 12.1 ^{ac}
对照组	22	治疗前	3.0 ± 1.5	4.5 ± 1.3	27.5 ± 4.7	174.4 ± 62.3
		治疗后	1.6 ± 1.1 ^a	1.8 ± 0.3 ^a	29.2 ± 3.2 ^a	106.4 ± 52.7 ^a

^aP<0.05 vs 本组治疗前, ^cP<0.05 vs 对照组。

表 3 两组治疗前后肝纤维指标比较 (mean ± SD, μg/L)

组别	<i>n</i>		HA	PⅢP	Ⅳ-C	LN
治疗组	28	治疗前	480.2 ± 181.4	216.1 ± 161.4	148.3 ± 27.2	161.8 ± 43.7
		治疗后	231.1 ± 111.3 ^{ac}	132.1 ± 110.5 ^{ac}	104.4 ± 26.5 ^{ac}	107.2 ± 26.8 ^{ac}
对照组	22	治疗前	461.9 ± 176.3	214.4 ± 141.6	150.3 ± 25.2	168.4 ± 46.7
		治疗后	424.4 ± 166.2 ^a	207.1 ± 105.7 ^a	144.7 ± 26.9 ^a	160.8 ± 46.2 ^a

^aP<0.05 vs 本组治疗前, ^cP<0.05 vs 对照组。

通过多途径、多层次、多靶点作用抗肝纤维化, 能有效改善患者症状和肝功能, 降低肝纤维化指标^[12-15]。熊章鄂 *et al*^[16]报道, 清热解毒方药肝平通过影响CCL₄大鼠肝纤维化肝脏TGFβ₁/Smad信号通路抗肝纤维化。郭顺根 *et al*^[17]报道, 活血化瘀方药理血清通过抑制HSC的增殖和α-SMA的表达, 使体外培养的HSC活化受到抑制, 从而达到抗纤维化作用。赵霞 *et al*^[18]报道, 活血化瘀中药益肝康能抑制IL-1β刺激的HSCs增殖及TIMP-1 mRNA表达, 发挥其抗肝纤维化功效。吴亚云 *et al*^[19]观察中药丹芍化纤方药物血清对体外大鼠肝细胞的增生及白蛋白合成有促进作用, 能显著下调肝细胞内caspase-3mRNA的表达, 抑制肝细胞凋亡, 从而干扰肝纤维化的形成。康文臻 *et al*^[20]观察到苦参素能明显减少肝纤维化大鼠肝组织I、III型胶原蛋白的表达, 对I、III型前胶原mRNA表达也有非常好的抑制作用。王丽春 *et al*^[21]观察温阳中药复方肝之福可预防或缓解大鼠肝纤维化的形成, 抗脂质过氧化是其可能的作用机制。

中医学认为, “肝”属木, 体阴而用阳、喜润恶燥。肝硬化的基本病机为正衰邪盛、肝郁脾虚夹湿热血瘀。我们在临床中观察到, 本病多数为气阴两虚夹肝郁血瘀, 故治疗以益气养阴、柔肝舒郁, 佐以活血化瘀为主。本临床观察结果也显示, 益气养阴的生脉注射液联合活血化瘀的葛根素注射液能减轻患者临床症状, 改善肝功能, 改善肝纤维化指标。

总之, 生脉注射液联合葛根素注射液能有

效治疗肝硬化, 改善肝纤维化指标。其机制可能与多条途径抗肝纤维化有关, 有待实验研究进一步证实, 对门脉内径改善不明显, 可能与疗程短有关, 值得我们进一步观察。

4 参考文献

- 1 王吉耀. 肝硬化. 见: 陈颀珠. 实用内科学. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 1983
- 2 刘平. 肝纤维化的防治. 中华肝病杂志 2000; 8: 242
- 3 陆江, 李辰蕊. 黄芪注射液对早期肝硬化患者生化及肝纤维化指标的影响. 山东中医杂志 2003; 22: 714-715
- 4 余世锋, 黄贤樟, 董光东. 不同剂量丹参注射液抗肝纤维化临床研究. 中国中西医结合杂志 2004; 24: 17-20
- 5 李湛, 蒲小平. 丹参粉针剂对四氯化碳致大鼠慢性肝纤维化的保护作用. 中国新药杂志 2006; 15: 968-971
- 6 王英, 林小玲, 张福华. 苦参素对慢性乙型肝炎患者血清肝纤维化指标的影响. 实用肝病杂志 2004; 7: 239-240
- 7 刘玉侃, 沈薇, 张霞. 虫草菌丝对实验性肝纤维化的防治作用及其机制研究. 中国新药与临床杂志 2004; 23: 139-143
- 8 李锋, 周新民, 行利, 张珊红, 姚菊峰. 活血柔肝法改善慢性肝炎肝纤维化的效果. 中国临床康复 2006; 10: 96-98
- 9 张敏, 李长春. 和络舒肝胶囊治疗慢性乙型肝炎肝纤维化56例. 中西医结合肝病杂志 2006; 16: 176-177
- 10 邱梅. 灯盏细辛对慢性乙型肝炎患者TIMP-1血清肝纤维化指标的影响. 中国中西医结合消化杂志 2006; 14: 188-190
- 11 中华医学会传染病与寄生虫病学分会. 病毒性肝炎防治方案. 中华传染病杂志 2001; 19: 56-62
- 12 王继, 陈俊红, 李兵顺. 活血、益气、软坚不同中医治则逆转大鼠肝纤维化的实验观察. 中国中医基础医学杂志 2006; 12: 420-422
- 13 刘莺, 刘平, 王磊. 扶正化瘀方对肝纤维化大鼠不同病理阶段肝组织蛋白质组变化的影响. 中华肝病杂志 2006; 14: 422-425
- 14 杜景云, 张永, 陈卫宁, 张向红, 丛德红. 补肾化纤汤抗大鼠肝纤维化的实验研究. 山东中医药大学学报

- 2006; 30: 245-246
- 15 王伟芹, 殷晓轩, 王海彬, 尹常健, 王慧霞. 柔肝抑纤饮对实验性肝纤维化大鼠肝细胞凋亡的影响. 山东中医药大学学报 2006; 30: 240-242
- 16 熊章鄂, 但自力, 唐望先, 严红梅. 中药肝炎平对CCl₄诱导的肝纤维化大鼠TGF β /Smad信号通路的影响. 世界华人消化杂志 2006; 14: 152-157
- 17 郭顺根, 张玮, 江涛, 戴敏. 活血化痰方药理血清对离体肝星形细胞影响的研究. 北京中医药大学学报 2003; 26: 24-26
- 18 赵霞, 姚希贤, 张亚平, 郑文明. 益肝康等活血化痰中药抑制IL-1 β 刺激的HSC增殖及TIMP-1的表达. 世界华人消化杂志 2006; 14: 173-178
- 19 吴亚云, 耿晓霞, 程明亮. 丹芍化纤方对体外大鼠肝细胞增生、Caspase-3mRNA及白蛋白合成的影响. 世界华人消化杂志 2005; 13: 781-783
- 20 康文臻, 谢玉梅, 聂青和, 张岩, 郝春秋, 王九平. 苦参素对实验性大鼠肝纤维化防治作用的研究. 世界华人消化杂志 2003; 11: 195-198
- 21 王丽春, 赵连三, 唐红, 刘丽, 刘聪, 张红英, 尧凡. 温阳中药复方肝之福对大鼠肝纤维化形成的影响. 世界华人消化杂志 2005; 13:330-335

■同行评价

本文结合临床, 对研究中药抗肝纤维化治疗有一定参考意义, 为开发抗肝纤维化的中药新药提供了理论基础, 有较好的临床实用性, 可继续深入观察中药抗纤维化的长期效果等.

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 •

2005 年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序表¹

代码	期刊名称	总被引频次	学科内排名	影响因子	学科内排名
G275	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	2665	1	1.062	5
G803	肝脏	369	17	0.428	15
G257	临床内科杂志	383	16	0.289	22
G855	临床消化病杂志	173	24	0.163	28
G261	临床心血管病杂志	589	13	0.289	22
G293	临床血液学杂志	256	22	0.340	19
G662	内科急危重症杂志	134	27	0.172	27
G190	世界华人消化杂志	2079	4	0.485	14
G800	胃肠病学	271	20	0.324	20
G326	胃肠病学和肝病学杂志	292	19	0.282	24
G083	心肺血管病学杂志	154	25	0.192	26
G419	血管病学进展	297	18	0.238	25
G260	心脏杂志	394	15	0.355	17
G610	胰腺病学	137	26	0.589	11
G234	中国动脉硬化杂志	670	12	0.662	10
G267	中国实用内科杂志	1167	8	0.312	21
G444	中国体外循环杂志	68	28	0.354	18
G203	中国心脏起搏与心电生理杂志	415	14	0.563	12
G633	中国血液净化	229	23	0.391	16
G231	中华肝脏病杂志	2014	5	1.573	1
G155	中华内分泌代谢杂志	1249	7	0.981	6
G156	中华内科杂志	2409	3	0.903	7
G161	中华肝脏病学杂志	1003	9	1.077	4
G211	中华糖尿病学杂志	859	11	1.209	3
G285	中华消化内镜杂志	934	10	0.782	9
G168	中华消化杂志	1645	6	0.798	8
G892	中华心律失常学杂志	269	21	0.514	13
G170	中华心血管病学杂志	2622	2	1.272	2
	平均值	849		0.593	

¹中国科技期刊引证报告/潘云涛, 马峥著. 北京: 科学技术文献出版社, 2006. 10

重症胰腺炎保守治疗20例

杨建光, 于作夫, 赵宇, 孙玉华

■背景资料

重症胰腺炎病情危重, 死亡率高, 病情变化快, 来势凶猛。随着临床实践的丰富及对该病的认识提高, 病理生理的了解, 已从过去的主张手术转变为早期采用保守治疗, 预防应用抗菌素, 早期营养支持, 抑制炎症反应, 后期感染则手术治疗为主。由于中药有多方面作用, 开发中医中药, 探讨其在保守治疗过程中作用十分必要, 意义重大。

杨建光, 于作夫, 赵宇, 孙玉华, 中国医科大学附属第四医院普外科 辽宁省沈阳市 110005

通讯作者: 杨建光, 110005, 辽宁省沈阳市和平区南七马路102号, 中国医科大学附属第四医院普外科. yjguang6911@sina.com
电话: 024-62037377

收稿日期: 2006-03-04 接受日期: 2006-09-26

Conservative treatment of severe acute pancreatitis: an analysis of 20 cases

Jian-Guang Yang, Zuo-Fu Yu, Yu Zhao, Yu-Hua Sun

Jian-Guang Yang, Zuo-Fu Yu, Yu Zhao, Yu-Hua Sun, Department of General Surgery, the Affiliated Fourth Hospital of China Medical University, Shenyang 110005, Liaoning Province, China

Correspondence to: Jian-Guang Yang, Department of General Surgery, the Affiliated Fourth Hospital of China Medical University, 102 Nanqi Road, Heping District, Shenyang 110005, Liaoning Province, China. yjguang6911@sina.com

Received: 2006-03-04 Accepted: 2006-09-26

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy of conservative treatment for severe acute pancreatitis (SAP).

METHODS: The clinical data of 20 patients with severe acute pancreatitis were analyzed retrospectively.

RESULTS: A total of 20 patients with SAP received integrated treatment of traditional Chinese and Western medicine, and inflammatory abdominal dropsy occurred in all the patients. Of the 20 patients, 6 cases were found with shock, 17 with paralytic ileus, 2 with peripancreatic infection, 3 with acute respiratory distress syndrome and 1 with renal failure. No deaths appeared.

CONCLUSION: Integrated Chinese and Western medicine is effective in the treatment of SAP.

Key Words: Severe acute pancreatitis; Integrated Chinese and Western medicine

Yang JG, Yu ZF, Zhao Y, Sun YH. Conservative treatment

of severe acute pancreatitis: an analysis of 20 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(34):3330-3332

摘要

目的: 探讨重症胰腺炎保守治疗方法。

方法: 回顾性分析20例重症胰腺炎保守治疗的临床资料。

结果: 20例重症胰腺炎经中西医结合治疗治愈。20例出现炎性腹水, 6例休克, 17例出现麻痹性肠梗阻, 2例胰周感染, 3例出现ARDS及1例肾功能衰竭, 无死亡病例。

结论: 中西医结合治疗重症胰腺炎疗效满意, 可阻止其进一步发展, 减少并发症的出现, 值得推荐。

关键词: 重症胰腺炎; 中西医结合

杨建光, 于作夫, 赵宇, 孙玉华. 重症胰腺炎保守治疗20例. 世界华人消化杂志 2006;14(34):3330-3332

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3330.asp>

0 引言

重症胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是一种病情凶险、变化多、发展快的急腹症, 并发病及死亡率较高。但由于近年来对其发病机制、病理演变过程的进一步深入了解, 影像学诊断技术的进步, 监测手段、抗生素及新抑胰酶剂的发展, 同时新中药的开发研究及临床应用的增多, 使SAP的治疗对策上有了概念上的更新。目前针对急性SAP主张“个体化”治疗的原则, 已形成了较为规范化的治疗程序, 即早期以非手术治疗为主, 后期出现继发感染后采用手术治疗, 使SAP的治愈率也有了明显的提高。我院1998-05/2005-08应用保守疗法治疗SAP患者20例, 取得较好的效果。

1 材料和方法

1.1 材料 本组共收集了保守治疗的SAP 20例, 其

中男12例,女8例,年龄29-70(平均51.5)岁,均依据临床表现、血生化检查、腹腔穿刺或B超及CT检查确诊,符合中华医学会外科分会胰腺外科学组1996年第二次方案诊断标准^[1]。其中暴饮暴食者9例,不明原因者11例,均为非胆源性。出现炎性腹水者20例,休克者6例,麻痹性肠梗阻者17例,胰周感染者2例,出现ARDS者3例及肾功能衰竭者1例,无死亡病例。

1.2 方法

1.2.1 西医治疗 (1)禁食水和胃肠减压;(2)监测重要器官功能和生化指标;(3)抑制胰酶的分泌;(4)改善全身及胰腺微循环,纠正水电解质紊乱和维持酸碱平衡,并在维持有效循环的情况下适当应用利尿剂,减少腹水;(5)早期应用广谱抗菌素防止继发感染;(6)静脉营养,肠内营养;(7)保护重要器官及防止多器官功能衰竭;(8)对有ARDS患者及时应用呼吸机治疗,以改善缺氧和胰腺微循环。

1.2.2 手术治疗 主要是在保守治疗的基础上,针对后期胰周感染等局部并发症而进行手术治疗。

1.2.3 中医中药治疗 休克者行参附注射液20 mL加入50 g/L葡萄糖或生理盐水20 mL中,静注每20 min 1次,直至血压恢复正常,再以参附注射液100 mL加入50 g/L葡萄糖或生理盐水400 mL中静滴维持,必要时合用多巴胺。无休克者以参附注射液100 mL加入50 g/L葡萄糖或生理盐水400 mL中静滴维持,每日一次。生大黄10 g于热水100-200 mL溶解后温水40℃保留灌肠,每日二次;同时经胃管注入100 mL,每12 h 1次,直至腹胀缓解。芒硝粉100 g装入棉布袋(25 cm×25 cm)敷于脐部,每昼夜更换2次,直至腹水消失。

2 结果

20例经保守治疗均治愈,出现炎性腹水者20例,休克者6例,麻痹性肠梗阻者17例,胰周感染者2例,出现ARDS者3例及肾功能衰竭者1例,无死亡病例。

3 讨论

目前认为SAP是一种全身性疾病,牵涉到胰腺微循环障碍,炎症递质和细胞因子释放导致MODS发生^[2]。尤其在急性反应期即SAP早期,由于机体受到各种物理化学感染等所致损害的侵袭,引起机体的应激反应,表现出超强的全身炎症反应综合征,进而造成全身多器官功能障碍及衰竭,此期重点在于纠正血流动力学改变,各器

官系统功能的监护与支持,手术则可能加重对机体的打击,加重急性全身炎症反应,因而趋向于早期采用保守治疗,预防应用抗菌素,早期营养支持,抑制炎症反应,后期感染则手术治疗^[3-5];而采用积极的中西医结合非手术治疗,则增加了保守治疗的方法,可防止胃肠肺等靶器官的损害,渡过危险期,提高患者的治愈率^[6]。参附注射液(shen-fu injection, SF)由人参和附子两味药组成,具有增强心肌收缩力、扩张冠状动脉、扩张外周血管、稳定血压的作用,改善微循环,减少患者对多巴胺的依赖性^[7]。还可以促进肠道的蠕动,增强肠管张力,协调肠壁运动而缓解或解除肠麻痹症状,并能抑制炎症细胞因子的活化与释放,对细胞免疫和体液免疫有增强作用,阻止急性胰腺炎的进一步发展^[8]。参附还可以降低血液黏稠度和细胞降集率,改善血液流变性,较快恢复肾灌注。同时可直接灭活嘌呤氧化酶、抗氧自由基、抑脂质过氧反应、保护组织细胞免受损害、减轻组织缺血再灌注损伤及减轻SAP时肺损伤^[9-11]。大黄的主要成分是蒽醌类化合物和鞣质,具有(1)抑制胰蛋白酶、胰脂肪酶等胰酶的分泌,松弛胆道口括约肌,减轻胰管压力,抑制血小板聚集和小动脉收缩作用,改善胰腺微循环^[12];(2)增强胃肠道平滑肌活动,提高胃肠动力,促进肠蠕动,改善和消除肠道麻痹、淤滞状态^[13];(3)抑制肠道内细菌移位及毒素吸收,促进肠道内毒素排泄,促进胃肠道新陈代谢和肠道营养的恢复,提高机体免疫力,降低炎症细胞因子和炎性介质的产生,具有一定的抑菌及对抗内毒素的作用^[14]。芒硝主要成分为硫酸钠,具有泻下、利尿、消肿、抗炎等功效。芒硝敷于腹部数小时后即有结晶块形成,说明其有吸附水分的作用,而使肿胀的腹壁、腹腔渗液及肠管得以消肿,促进消化道功能的恢复^[15-16]。可见在西医常规保守治疗的基础上配合参附注射液静点、大黄胃管注入灌肠及芒硝外敷腹部,既可减少西药的用量,减轻副反应,又能作用于胰腺炎的各个环节,减少并发症的出现,他们联合相互作用,可阻止SAP的进一步发展,值得临床推广及应用。

4 参考文献

- 1 中华医学会外科学会胰腺学组. 急性胰腺炎的临床诊断及分级标准. 中华外科杂志 1997; 35: 773-775
- 2 张延龄. 细胞因子与急性胰腺炎. 中国实用外科杂志 1999; 19: 520-522
- 3 Hartwig W, Werner J, Muller CA, Uhl W, Buchler MW. Surgical management of severe pancreatitis

■应用要点

在西药的基础上,配合使用多种中药,尤其是一些新型中药针剂,可作用于重症胰腺炎的各个环节,临床应用前景良好。

■同行评价

本文从中医中药的治疗角度来探讨对重症胰腺炎的治疗效果,立意较好,但应对病情的评价应更具体些,这样才可更好地供临床医生借鉴。

- including sterile necrosis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002; 9: 429-435
- 4 Bassi C, Larvin M, Villatoro E. Antibiotic therapy for prophylaxis against infection of pancreatic necrosis in acute pancreatitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; CD002941
- 5 Malangoni MA, Martin AS. Outcome of severe acute pancreatitis. *Am J Surg* 2005; 189: 273-277
- 6 张喜平, 王英. 中药治疗急性胰腺炎的主要机制与作用的实验研究进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 412-416
- 7 刘洪, 李群英, 高棠玲. 参附注射液治疗休克64例疗效观察. *现代中西医结合杂志* 2002; 11: 2000
- 8 宋文蔚, 宋欣伟. 参附注射液合中药灌肠对急性胰腺炎肠麻痹疗效观察. *浙江中医学院学报* 2005; 29: 22-23
- 9 罗巍, 万兰青, 马超英, 罗涵, 耿耘, 肖子辉, 吴伟, 欧阳剑波, 江光明, 罗正曜. 参附注射液对兔内毒素休克肺损伤的保护作用. *中国危重病急救医学* 1995; 7: 68-70
- 10 刘先义, 邹捍东, 余金甫, 黄海波, 熊桂仙. 参附注射液对缺血再灌注家兔多脏器损伤的治疗作用. *中华麻醉学杂志* 1997; 17: 430-432
- 11 刘欣, 刘先义, 胡刚, 夏中元. 参附注射液对大鼠重症急性胰腺炎肺损伤炎症反应的影响. *海南医学* 2005; 16: 134-136
- 12 焦东海, 苏雪生, 沈学敏, 王翹楚. 单味大黄治疗急性胰腺炎临床与基础研究报告. *新消化病学杂志* 1995; 3: 5-7
- 13 阎兆平, 陈晓理, 张正. 大黄与肠道屏障. *中国中西医结合外科杂志* 2001; 7: 411-413
- 14 夏彬, 向进见. 大黄对重症急性胰腺炎胃肠功能恢复的作用. *医药导报* 2005; 24: 1136-1137
- 15 周国芳. 大黄、芒硝在重症急性胰腺炎中的应用体会. *中国临床医生* 2005; 33: 50-51
- 16 吴玉芳, 时昭红, 江必武, 周晓黎, 高晓阳. 芒硝外敷加胰酶抑制剂治疗急性胰腺炎的疗效观察. *辽宁中医杂志* 2004; 31: 852

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 •

全国消化及消化内镜诊断与治疗进展学术研讨会征文启事

本刊讯 为提高我国消化内镜诊疗技术的整体水平,《中华消化内镜杂志》编辑部拟于2007-08在新疆乌鲁木齐召开“全国消化及消化内镜诊断与治疗进展学术研讨会”,邀请消化和消化内镜专家作有关专题学术报告.会议将出论文汇编,并授予继续教育 I 类学分,《中华消化内镜杂志》将择优刊登应征论文.

1 征文内容

征文内容包括消化系统疾病的内镜(食管镜、胃镜、十二指肠镜、小肠镜、大肠镜、肠道镜、腹腔镜、超声内镜等)诊疗技术;内镜外科的临床应用及进展;食管、胃、肠、肝胆、胰腺疾病的基础研究、临床诊治及其进展(炎症、溃疡、出血、肿瘤、异物等);消化系统疾病的中医、中西医结合治疗及其进展;消化内镜消毒及护理技术,消化系统疾病的急诊护理.

2 征文要求

应征文章按《中华消化内镜杂志》稿约要求撰写打印,并寄3000字以内全文及500字以内的论文摘要各一份;已投《中华消化内镜杂志》尚未发表的稿件,请注明稿号.应征文章经单位推荐盖公章后,寄南京市紫竹林3号《中华消化内镜杂志》编辑部卜小乐、赵在文同志收.邮编:210003.信封左下脚注“征文”字样,同时汇寄审稿费10元.请自留底稿,恕不退稿.截稿日期2007-05-31.有关会议的具体事项另行通知.

联系电话:025-83472831, 86086091.

表现为Krukenberg瘤的胰腺癌卵巢转移1例

章颖, 马向涛, 付静, 余力伟

章颖, 北京市海淀区医院妇产科 北京市 100080
马向涛, 余力伟, 北京市海淀区医院外科 北京市 100080
付静, 北京市海淀区医院病理科 北京市 100080
通讯作者: 马向涛, 100080, 北京市海淀区中关村大街29号, 北京市海淀区医院外科. xiangtao_ma@pku.org.cn
电话: 010-82619999-1887 传真: 010-62653601
收稿日期: 2006-08-06 接受日期: 2006-09-20

摘要

继发于胃肠道癌的卵巢转移性癌称作Krukenberg瘤, 而表现为Krukenberg瘤的胰腺癌卵巢转移病例尚属罕见, 本文报道1例表现为Krukenberg瘤的胰腺癌卵巢转移病例。

关键词: 胰腺癌; 卵巢; 转移

鲁明莺, 徐光川. 二氢嘧啶脱氢酶, DPD)在胃癌中的研究现状. 世界华人消化杂志 2006;14(34):3333-3334
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3333.asp>

0 引言

继发于胃肠道癌的卵巢转移性癌称作Krukenberg瘤, 也有学者将来源于全身任何部位肿瘤转移到卵巢称为Krukenberg瘤, 而表现为Krukenberg瘤的胰腺癌卵巢转移病例尚属罕见^[1-2]。

1 病例报告

女, 67岁, 因胰头十二指肠切除术后16 mo, 发现右下腹肿物1 mo, 于2005-10-17收入院。患者16 mo前因胰头癌于我院行胰头十二指肠切除术, 术后病理报告: 胰头中分化腺癌III期(T3N1M0), 肿物无明显包膜, 呈浸润性生长, 破坏胰头大部分胰腺组织。术后给予2个周期化疗, 方案为GCF(吉西他滨1000 mg/m²+5-氟尿嘧啶500 mg/m²+甲酰四氢叶酸钙200 mg iv), 连续3 wk, 休息1 wk, 间隔6-8 wk进行下一疗程化疗, CA19-9稳定于80-140 kU/L之间。入院查体: 体温 36.6℃, 血压 16/10 kpa, 皮肤巩膜无黄染, 腹软无压痛, 右下腹可触及质硬肿物, 约5 cm×4 cm大小, 表面不光滑, 活动度良好, 与皮肤无粘连, 无明显触痛, 肝脾肋下未及。实验室检查: 白

细胞 $5.36 \times 10^9/L$, 中性粒细胞0.672, 红细胞 $3.47 \times 10^{12}/L$, 血红蛋白126 g/L, 血小板 $254 \times 10^9/L$, 总蛋白68 g/L, 白蛋白41 g/L, CEA 5.12 μg/L(正常值0-3.4 μg/L), CA19-9 4406 kU/L(正常值0-35 kU/L), AFP 2.81 kU/L(正常值<5.8 kU/L)。胸片: 双肺未见异常。腹部B超: 肝脏多发转移。盆腔B超: 右附件囊实性肿物, 6 cm×5 cm×4 cm大小, 内部回声欠均匀, 左附件实性肿物, 4.3 cm×3.2 cm×2.1 cm大小, 形态不规整。盆腔CT: 盆腔内多发囊实性占位, 卵巢占位可能性大。2005-11-22于全麻下行剖腹探查术, 术中发现腹腔内少量腹水, 腹膜表面遍布白色粟粒样结节, 原手术部位黏连严重, 左右卵巢均增大, 分别为4.0 cm×3.0 cm×2.5 cm与6.0 cm×5.0 cm×4.0 cm大小, 表面光滑。术后病理为胰腺癌卵巢转移。

2 讨论

卵巢转移癌占有卵巢恶性肿瘤的2.8%-29.4%, 原发肿瘤主要来源于胃肠道、乳腺以及子宫内膜癌等^[3-4], 而表现为Krukenberg瘤的胰腺癌卵巢转移病例尚属罕见。Krukenberg瘤形成机制可能与淋巴途径转移有关。肿瘤细胞进入后腹膜淋巴系统, 阻塞淋巴管的上行通路造成淋巴引流的逆行, 将扩散的癌细胞带至腹主动脉旁淋巴结及盆腔淋巴结, 形成卵巢转移^[5-6]。临床上绝大多数Krukenberg瘤累及双侧卵巢, 因转移而增大的卵巢常保持原来的形态, 镜下可见淋巴管内癌栓^[7-8]。

Krukenberg瘤发病年龄一般为42-47岁, 一般比原发性卵巢癌年轻10-15岁, 且多见于绝经前妇女, 可能由于功能旺盛、血运丰富的卵巢适应转移瘤的生长^[9-11]。临床主要症状是下腹痛、胀满及肠道不适等, 体检常发现盆腔肿物及腹水。当患者原发肿瘤合并存在时, 两者症状可以相互干扰, 造成诊断困难^[12-13]。

原发灶诊断与继发瘤症状出现时间间隔较短, 一般不超过3 a时间, 也可同时发现原发灶和转移灶。因为胃肠道来源的卵巢转移瘤与原

■背景资料

卵巢转移癌主要来源于胃肠道、乳腺以及子宫内膜癌等, 而表现为Krukenberg瘤的胰腺癌卵巢转移病例尚属罕见。

■应用要点

姑息性切除能减轻机体对肿瘤的负荷, 有利提高术后化疗、免疫等综合治疗的疗效。

发性卵巢上皮癌形态差别不大, 所以通过HE染色来判断卵巢肿瘤是原发还是转移是有一定困难^[3-6]。CK7在一些卵巢原发性腺癌、乳腺癌、肺腺癌等中表达, 而在胃肠道来源的腺癌中一般为阴性, CK7阴性基本上排除了原发性卵巢癌^[14-16]。手术探查是明确消化道肿瘤的重要手段, 凡术前拟诊为卵巢转移瘤或术中发现肿瘤可疑者均应仔细探查腹腔。

由于原发灶在胃或结肠等腹腔器官, 常在卵巢转移瘤出现后始得到诊断, 故对于原发灶能切除者应连同卵巢转移灶一并切除^[17-19]。胃癌一般选择姑息性切除手术, 以减少出血、穿孔、梗阻等严重并发症的发生。姑息性切除能否延长生存时间一直存在争论, 但目前认为切除后能减轻机体对肿瘤的负荷, 有利提高术后化疗、免疫等综合治疗的疗效。如原发灶位于结肠一般恶性较低, 应争取和继发灶一并切除^[8]。即使如原发灶不能切除的患者, 行姑息性卵巢转移瘤切除术后再行化疗, 有些患者仍能得到比较满意的疗效。转移瘤切除范围根据患者具体情况而定, 并尽可能切除盆腔转移灶, 根据原发肿瘤的部位和性质、选择适当的抗癌药物进行化疗^[20-21]。

Krukenberg瘤预后差, 多数患者于诊断明确后1 a内死亡^[22]。卵巢转移肿瘤切除术后5 a生存率由12%-19%不等, 其中卵巢转移瘤来源于妇科肿瘤的患者5 a生存率达34%-47%, 而来源于其他部位的肿瘤患者5 a生存率只有5.4%-19%^[17,20,22]。

3 参考文献

- Kiyokawa T, Young RH, Scully RE. Krukenberg tumors of the ovary: a clinicopathologic analysis of 120 cases with emphasis on their variable pathologic manifestations. *Am J Surg Pathol* 2006; 30: 277-299
- Moore RG, Chung M, Granai CO, Gajewski W, Steinhoff MM. Incidence of metastasis to the ovaries from nongenital tract primary tumors. *Gynecol Oncol* 2004; 93: 87-91
- Hart WR. Diagnostic challenge of secondary, metastatic ovarian tumors simulating primary endometrioid and mucinous neoplasms. *Pathol Int* 2005; 55: 231-243
- Kakushima N, Kamoshida T, Hirai S, Hotta S, Hirayama T, Yamada J, Ueda K, Sato M, Okumura M, Shimokama T, Oka Y. Early gastric cancer with Krukenberg tumor and review of cases of intramucosal gastric cancers with Krukenberg tumor. *J Gastroenterol* 2003; 38: 1176-1180
- Takenoue T, Yamada Y, Miyagawa S, Akiyama Y, Nagawa H. Krukenberg tumor from gastric mucosal carcinoma without lymphatic or venous invasion: report of a case. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 1211-1214
- Shiomi M, Kamisako T, Yutani I, Kudo M, Shigeoka H, Tanaka A, Okuno K, Yasutomi M. Two cases of histopathologically advanced, stage IV) early gastric cancers. *Tumori* 2001; 87: 191-195
- Jain V, Gupta K, Kudva R, Rodrigues GS. A case of ovarian metastasis of gall bladder carcinoma simulating primary ovarian neoplasm: diagnostic pitfalls and review of literature. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16 Suppl 1: 319-321
- Sakakura C, Hagiwara A, Yamazaki J, Takagi T, Hosokawa K, Shimomura K, Kin S, Nakase Y, Fukuda K, Yamagishi H. Management of postoperative follow-up and surgical treatment for Krukenberg tumor from colorectal cancers. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 1350-1353
- Onuigbo WI. Early descriptions of Krukenberg tumors. *J Am Coll Surg* 2005; 200: 111-112
- Prat J. Ovarian carcinomas, including secondary tumors: diagnostically challenging areas. *Mod Pathol* 2005; 18 Suppl 2: S99-S111
- Glisic A, Atanackovic J. Krukenberg tumor in pregnancy. The lethal outcome. *Pathol Oncol Res* 2006; 12: 108-110
- Traina TA, Leonard GD, Tang L, Paty PB, Maki RG. Metastatic colon cancer to the ovaries in a Krukenberg-like pattern. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5255-5256
- Cetin B, Aslan S, Akinci M, Atalay C, Cetin A. A long surviving case of Pseudomeigs' syndrome caused by Krukenberg tumor of the stomach. *Jpn J Clin Oncol* 2005; 35:221-223
- Vang R, Gown AM, Barry TS, Wheeler DT, Yemelyanova A, Seidman JD, Ronnett BM. Cytokeratins 7 and 20 in primary and secondary mucinous tumors of the ovary: analysis of coordinate immunohistochemical expression profiles and staining distribution in 179 cases. *Am J Surg Pathol* 2006; 30: 1130-1139
- McCluggage WG, Young RH. Immunohistochemistry as a diagnostic aid in the evaluation of ovarian tumors. *Semin Diagn Pathol* 2005; 22: 3-32
- Baker PM, Oliva E. Immunohistochemistry as a tool in the differential diagnosis of ovarian tumors: an update. *Int J Gynecol Pathol* 2005; 24: 39-55
- Cheong JH, Hyung WJ, Chen J, Kim J, Choi SH, Noh SH. Survival benefit of metastasectomy for Krukenberg tumors from gastric cancer. *Gynecol Oncol* 2004; 94: 477-482
- Cheong JH, Hyung WJ, Chen J, Kim J, Choi SH, Noh SH. Surgical management and outcome of metachronous Krukenberg tumors from gastric cancer. *J Surg Oncol* 2004; 87: 39-45
- Ayhan A, Guvenal T, Salman MC, Ozyuncu O, Sakinci M, Basaran M. The role of cytoreductive surgery in nongenital cancers metastatic to the ovaries. *Gynecol Oncol* 2005; 98: 235-241
- McGill F, Ritter DB, Rickard C, Kaleya RN, Wadler S, Greston WM. Management of Krukenberg tumors: an 11-year experience and review of the literature. *Prim. Care Update Ob Gyns* 1998; 5: 157-158
- Vergote I. Role of surgery in ovarian cancer: an update. *Acta Chir Belg* 2004; 104: 246-256
- Kim HK, Heo DS, Bang YJ, Kim NK. Prognostic factors of Krukenberg's tumor. *Gynecol Oncol* 2001; 82: 105-109

电编 李琪 编辑 张焕兰

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。2006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2079, 位居全部1652种中国科技论文统计源期刊的第51位, 内科医学类28种期刊的第4位。2005年《世界华人消化杂志》的影响因子为0.485, 位居全部1652种中国科技论文统计源期刊的第449位, 内科医学类28种期刊的第14位。《世界华人消化杂志》的即年指标0.070, 他引率0.66, 地区分布数26, 基金论文比0.43, 国际论文比0.02, 学科影响指标0.46。世界华人消化杂志荣获2001、2003年度百种中国杰出学术期刊称号。

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

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

2 撰稿要求

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

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

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标。

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

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

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

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如 30 kD 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⁰*P* <0.05, ¹*P* <0.01; 第三套为²*P* <0.05, ³*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: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 第3套为^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^{\circ}\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片, 并考入磁盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴。

致谢 致谢后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。

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

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

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

4 投稿须知

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

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

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

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

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

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

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

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

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

World Journal of Gastroenterology创刊于1995-10-01, 原刊名《China National of New Gastroenterology》, 1995-06-27 国科发信字(95)225号批准国内外公开发行。1998-02-12经国家科学技术部和国家新闻出版总署批准更名为WJG, 国科发信字(1998)027号。2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001158号。

• 致谢 •

致谢世界华人消化杂志编委

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

陈仕珠 主任医师
解放军第541医院感染科

陈卫昌 教授
苏州大学附属第一医院消化内科

陈贻胜 教授
福建省立医院消化内科

党双锁 副教授
西安交通大学医学院第二附属医院感染科

邓长生 教授
武汉大学中南医院消化内科

樊红 副教授
东南大学医学院发育与疾病相关基因教育部重点实验室

范志宁 主任医师
南京医科大学第二附属医院内镜中心

巩鹏 副教授
大连医科大学附属第一医院普外二科

关玉盘 教授
首都医科大学附属北京朝阳医院消化科

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)

李涛 主治医师
北京大学人民医院肝胆外科

季国忠 主任医师
南京医科大学第二附属医院消化科

林勇 主治医师
第二军医大学附属长征医院消化内科

吕宾 教授
浙江中医药大学附属医院(浙江省中医院)消化科

马大烈 教授
上海市长海医院病理科

聂青和 副教授
第四军医大学唐都医院传染病科、全军感染病诊疗中心

潘秀珍 教授
福建省立医院消化研究室消化内科

秦成勇 教授
山东省立医院消化内科

任建林 教授
厦门大学附属中山医院消化内科

施瑞华 教授
南京医科大学第一附属医院消化内科

石统东 副教授
重庆医科大学附属第二医院感染病科

宋振顺 教授
第四军医大学西京医院肝胆外科

谭学瑞 教授
汕大医学院第一附属医院院长室

王春友 主任医师
华中科技大学同济医学院附属协和医院

王晓艳 副教授
中南大学湘雅三医院消化内科

王学美 研究员
北京大学第一医院中西医结合研究室

于颖彦 教授
上海交通大学医学院附属瑞金医院消化外科研究所

周丁华 主任医师
第二炮兵总医院普通外科(肝胆外科)

周国雄 主任医师
南通大学附属医中西医结合研究室消化内科

周士胜 教授
大连大学医学院医学研究中心