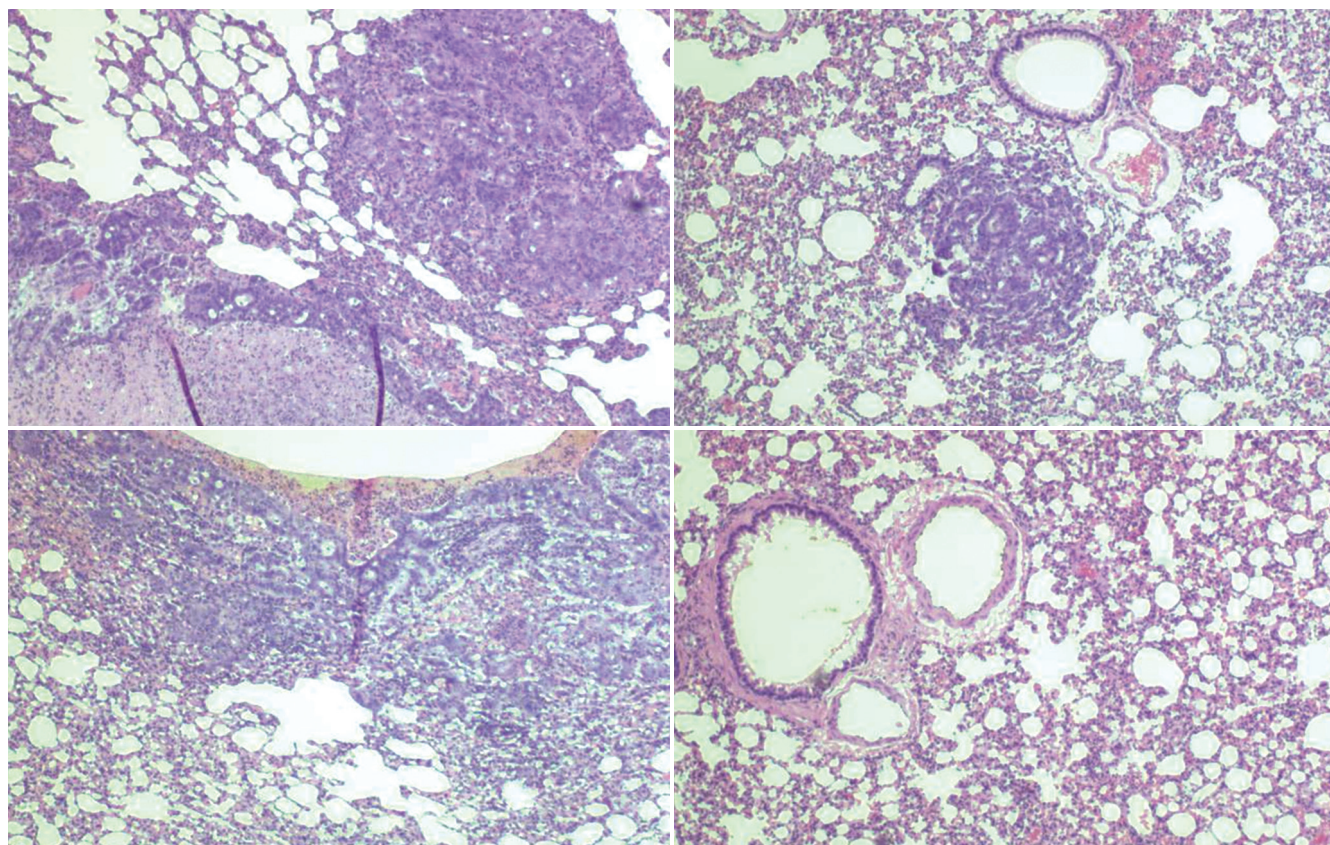


世界华人消化杂志

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2006 年 3 月 28 日 第 14 卷 第 9 期 (Volume 14 Number 9)



9 / 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
江学良副主任医师	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
白文元教授	石家庄
白玉贤教授	哈尔滨

蔡淦教授	上海
曹洁副教授	上海
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
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
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
李奇林教授	广州
李涛主治医师	北京
李晓宇主任医师	北京
李延青教授	济南
李永哲副研究员	北京
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
林勇讲师	上海
刘宝瑞教授	南京
刘冰熔教授	哈尔滨
刘成海研究员	上海
刘平教授	上海
刘杞教授	重庆

世界华人消化杂志®

编辑委员会

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

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2006 年 3 月 28 日 第 14 卷 第 9 期 (总第161期)

述 评

841 PARP-1: 一个肿瘤治疗的新靶点

黄胜辉, 黄志勇

基 础 研 究

848 大肠癌组织RAB5A和CD44v9表达的意义

李志高, 李晓冬, 董新舒, 庞洪刚, 杜杰

853 重症急性胰腺炎肺损伤内皮素的变化及丹参的治疗作用

黄晓丽, 刘顺英, 王国品, 曾皓明, 杨丽, 王智

858 轮状病毒NSP4基因在非复制型腺病毒载体中的表达及免疫活性

王大燕, 王健伟, 王彦斌, 魏 强, 屈建国, 洪涛

863 胃癌证型与肿瘤增殖的关系

施俊, 魏品康, 许玲, 何金, 孙大志

869 重组蛋白rhTRAIL₅₅₋₂₈₁与GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁有肝细胞毒性

刘洪波, 范学工, 黄建军, 李宁, 应若素, 彭建平

临 床 研 究

874 胃黏膜内类癌合并印戒细胞癌伴胃壁胰腺组织异位的临床病理观察

杨琳, 张宏图, 张洵, 孙耘田, 苏勤

879 TGF- α 和EGFR在Barrett食管和食管腺癌的表达

呼闯营, 贺彩峰

文 献 综 述

884 胆汁返流与Barrett食管及食管肿瘤

台卫平, 张玫, 罗和生

888 严重烧伤后胃肠道功能障碍的机制和防治

李晓芳

894 消化道恶性肿瘤淋巴管生成的研究进展

李锐, 高善玲

900 血红素氧合酶-1在器官移植中的保护作用

宿华威, 崔云甫, 吴德全, 韩德恩

研 究 快 报

904 表达HBeAg和HBsAg对HepG₂细胞系细胞因子分泌及ACE活性的影响

刘志英, 黄玉波, 魏红山, 宋淑静, 冯鑫, 刘亚楠, 成军

908 茶多酚对雷公藤内酯醇致小鼠肝损害的保护作用

李钦民, 韩真

912 急性梗阻性胰腺炎大鼠胰腺腺泡细胞凋亡的变化

范志宁, 刘训良, 熊观藏, 文卫, 缪林

临 床 经 验

916 慢性丙型肝炎患者血清HCV RNA, ALT与肝脏病理间的关系

李颖, 丁洋, 王雪莲, 刘沛

920 内镜下射频消融配合胃三联治疗慢性胃炎隆起糜烂型的临床观察

胡仕林, 贺降福, 余蓉, 刘荣, 黄爱霞

923 胰腺癌组织黏蛋白MUC₁表达的意义

高志强, 丁志强, 陈勇军, 李晓云, 罗强, 陈忠

927 抗生素相关性腹泻临床特征及预防控制

陈建荣, 郭锡明

病 例 报 告

930 以消化性溃疡为首发表现的恶性淋巴瘤1例

瞿国强

附 录	932 世界华人消化杂志投稿须知 937 世界华人消化杂志作者、读者、编委反馈信息
致 谢	938 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	847 国际肝胆胰协会中国分会第二届全国学术研讨会暨第三届全国普通外科主任论坛通知 852 NERD及相关疾病国际研讨会 868 中华消化学会第一届全国肝胆疾病学术研讨会 873 第十届全军普通外科学术会议征文通知 883 更正与说明专栏、专家门诊 887 全国胃黏膜癌前病变与癌前疾病诊治研讨会 893 第十一届全国普通外科学术会议征文通知 899 第二次全国中晚期消化肿瘤学术会议、第二届全国小肠疾病学术会议 907 第十八届全国中西医结合防治消化系统疾病学术会议 911 技法与经验 926 第十二届全国胆道外科学术会议征文通知 929 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》
封面故事	Myung-Hwan Kim, Sang Soo Lee, Sung Koo Lee, Seung-Gyu Lee, Chul-Won Suh, Gyung-Yub Gong, Jung-Sun Park, Young-Hoon Kim, Sang-Hee Kim. Interleukin-2 gene-encoded stromal cells inhibit the growth of metastatic cholangiocarcinomas. <i>World J Gastroenterol</i> 2006; 12(12): 1889-1894 http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/1889.asp
国际会议	Easl 2006 - The 41st Annual Meeting April 26-30, 2006 Annual Postgraduate Course May 25-26, 2006 www.asge.org/education World Congress on Gastrointestinal Cancer June 14-17, 2006 c.chase@imedex.com 7th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association September 3-7, 2006 convention@edinburgh.org www.edinburgh.org/conference 71st ACG Annual Scientific Meeting and Postgraduate Course October 20-25, 2006

 <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 2006-03-28 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生 编辑部主任 张海宁 英文编辑 张海宁 中文编辑 潘伯荣 张海宁 电子编辑 张敏 李琪 韩江燕 本期审读 王瑾晖</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: wajd@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)</p> <p>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>
<p>ISSN 1009-3079 邮发代号 82-262 国外代号 M 4481</p>	<p>国内定价 每期24.00元 全年864.00元</p>	<p>广告经营许可证 1401004000050</p>

World Chinese Journal of Digestology

March 2006 Contents in Brief Volume 14 Number 9

EDITORIAL	841 PARP-1: a new target for tumor therapy <i>Huang SY, Huang ZY</i>
BASIC RESEARCH	848 Significance of RAB5A and CD44v9 expression in colorectal cancer tissues <i>Li ZG, Li XD, Dong XS, Pang HG, Du J</i> 853 Changes of endothelin levels and therapeutic effects of <i>Danshen</i> in lung injury induced by severe acute pancreatitis in rats <i>Huang XL, Liu SY, Wang GP, Zeng HM, Yang L, Wang Z</i> 858 Generation and immunogenicity of a recombinant replication-incompetent adenovirus expressing human rotavirus NSP4 protein <i>Wang DY, Wang JW, Wang YB, Wei Q, Qu JG, Hong T</i> 863 Relationship between gastric carcinoma traditional Chinese medicine classifications of syndrome and tumor proliferation <i>Shi J, Wei PK, Xu L, He J, Sun DZ</i> 869 Toxicity assay for recombinant protein of rhTRAIL ₅₅₋₂₈₁ and GST-rhTRAIL ₅₅₋₂₈₁ to hepatic cells <i>Liu HB, Fan XG, Huang JJ, Li N, Ying RS, Peng JP</i>
CLINICAL RESEARCH	874 Coexistence of carcinoid, signet-ring cell carcinoma and heterotopic pancreas in stomach: a clinicopathological observation <i>Yang L, Zhang HT, Zhang X, Sun YT, Su Q</i> 879 Expression of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma <i>Hu CY, He CF</i>
REVIEW	884 Correlations of bile reflux with Barrett esophagus and esophageal tumor <i>Tai WP, Zhang M, Luo HS</i> 888 Mechanism of severe burn-induced gastrointestinal dysfunction and its prevention and treatment <i>Li XF</i> 894 Progress of lymph angiogenesis in digestive malignant tumor <i>Li R, Gao SL</i> 900 Protective role of hemeoxygenase-1 in organ transplantation <i>Su HW, Cui YF, Wu DQ, Han DE</i>
RAPID COMMUNICATION	904 Effects of HBeAg and HBsAg on cytokine excretion and angiotensin-converting enzyme activity in HepG ₂ cell line <i>Liu ZY, Huang YB, Wei HS, Song SJ, Feng X, Liu YN, Cheng J</i> 908 Protective effects of tea polyphenols on liver against triptolide-induced hepatic injury in mice <i>Li QM, Han Z</i> 912 Change of acinar cell apoptosis in rats with acute pancreatitis induced by bile-pancreatic-duct obstruction <i>Fan ZN, Liu XL, Xiong GY, Wen W, Miao L</i>
CLINICAL PRACTICE	916 Correlations of serum hepatitis C virus RNA and alanine transaminase with liver histopathological changes in patients with chronic hepatitis C <i>Li Y, Ding Y, Wang XL, Liu P</i>

	<p>920 Radio-frequency ablation combined with triple therapy in treatment of chronic protrusive and erosive gastritis <i>Hu SL, He XF, Yu R, Liu R, Huang AX</i></p> <p>923 Significance of mucin 1 expression in pancreatic cancer tissues <i>Gao ZQ, Ding ZQ, Chen YJ, Li XY, Luo Q, Chen Z</i></p> <p>927 Clinical characteristics of antibiotic-associated diarrhea and its prevention and control <i>Chen JR, Guo XM</i></p>
CASE REPORT	<p>930 One-case analysis of malignant lymphoma in which peptic ulcer appeared first <i>Qu GQ</i></p>
APPENDIX	<p>932 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology</p> <p>937 Feedback information from authors, readers and editorial board of World Chinese Journal of Digestology</p>
ACKNOWLEDGMENT	<p>938 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
COVER	<p><i>Kim MH, Lee SS, Lee SK, Lee SG, Suh CW, Gong GY, Park JS, Kim YH, Kim SH.</i> Interleukin-2 gene-encoded stromal cells inhibit the growth of metastatic cholangiocarcinomas. <i>World J Gastroenterol</i> 2006; 12(12): 1889-1894 http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/1889.asp</p>
INTERNATIONAL MEETINGS	<p>Easl 2006 - The 41st Annual Meeting April 26-30, 2006</p> <p>Annual Postgraduate Course May 25-26, 2006 www.asge.org/education</p> <p>World Congress on Gastrointestinal Cancer June 14-17, 2006 c.chase@imedex.com</p> <p>7th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association September 3-7, 2006 convention@edinburgh.org www.edinburgh.org/conference</p> <p>71st ACG Annual Scientific Meeting and Postgraduate Course October 20-25, 2006</p>

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 March 28, 2006

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

Edited by Editorial Board of

World Chinese Journal of Digestology

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Overseas Distributor

China International Book Trading Corporation

PO Box 399, Beijing 100044, China

Code No.M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381901

Fax: +86-10-85381893

Email: wjcd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

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

Copyright © 2006 by The WJG Press

PARP-1: 一个肿瘤治疗的新靶点

黄胜辉, 黄志勇

黄胜辉, 黄志勇, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普通外科研究室 湖北省武汉市 430030

黄志勇, 副教授, 1996年获同济医科大学医学博士学位, 1999/2002在美国从事博士后研究. 主要从事肝脏外科、肝癌发生的分子机制及治疗研究.

通讯作者: 黄志勇, 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普通外科研究室. zyhuang@medmail.com.cn

电话: 027-83663871 传真: 027-83663400

收稿日期: 2006-02-06 接受日期: 2006-02-21

摘要

聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶-1[poly (ADP-ribose) polymerase-1, PARP-1]是存在于真核细胞中催化聚ADP核糖化的细胞核酶, 他参与的聚ADP核糖化是真核细胞中蛋白质翻译后的重要修饰方式之一. PARP-1在DNA修复和细胞凋亡中发挥至关重要的作用. PARP-1的缺失使细胞对DNA损伤因子易感, 可能参与肿瘤的发生. 体外和体内研究表明抑制PARP-1则可降低DNA修复功能, 增强放疗和化疗对肿瘤的治疗效果. 目前PARP-1抑制剂已进入抗肿瘤药物 I 期临床研究, PARP-1有望成为肿瘤治疗的一个新靶点.

关键词: PARP-1; DNA修复; 肿瘤发生; 肿瘤治疗

黄胜辉, 黄志勇. PARP-1: 一个肿瘤治疗的新靶点. 世界华人消化杂志 2006;14(9):841-847

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/841.asp>

0 引言

聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶[poly(ADP-ribose) polymerase, PARP]是存在于真核细胞中催化聚ADP核糖化的细胞核酶. 1963年法国斯特拉斯堡Mandel小组发现肝细胞核中尼克酰胺单核苷酸(NMN)促进已标记的ATP合成一种难溶于酸的片段. Sugimura *et al*推测该片段是一种小分子代谢物合成的高聚物, 于1966年证实为聚腺苷酸二磷酸核糖, 并从肝细胞核中提取一种新的酶, 即PARP(Masutani *et al*^[1]提及). PARP自发现40多年来, 其在DNA损伤修复和维持基因组的稳定性方面的重要作用引起广大学者的关注, 尤其是近年来对PARP与肿瘤发生的关系及利用

调节PARP来提高肿瘤治疗效果的研究取得了令人鼓舞的成绩. 而在PARP家族成员中以PARP-1结构最典型, 研究较多.

1 PARP-1的结构与代谢

PARP-1是一种分子质量116 ku的核酶, 他包括DNA结合域(DNA-binding domain, DBD), 自身修饰域(the automodification domain, AMD)和C-端催化域(图1). 其中DBD分子质量为46 ku, 他含有2个锌指结构(F I 和 F II)及核定位信号(nuclear localization signal, NLS), 可以结合到DNA单链或双链缺口, NLS中含有凋亡相关的DEVD模体; AMD含有15个保守的谷氨酸残基作为自身聚ADP核糖基化靶位, 含有与DNA修复有关的乳腺癌感受蛋白C端模序(BRCT); C-端催化域分子质量为54 ku, 含有NAD结合位点, 在PARP家族中高度保守^[2-3].

PARP-1主要参与细胞内聚腺苷酸二磷酸核糖(PAR)的代谢. 识别DNA缺口后活化的PARP-1形成同型二聚体并催化尼克酰二核苷酸(NAD)降解为烟酸和ADP, 然后以ADP为底物在受体蛋白(包括自身)上合成聚腺苷酸二磷酸核糖基(PAR), 从而改变其功能. 这些受体蛋白包括PARP-1自身、组蛋白、各种转录因子、DNA修复因子以及信号转导因子(包括NF- κ B, AP-2, Oct-1, YY1, B-MYB, DNA依赖型蛋白激酶, P53等)等^[3]. 而PAR的分解依赖于2种酶: 聚ADP核糖水解酶[poly (ADP-ribose) glycohydrolase, PARG]和裂解酶. PARG可以清除PAR线状和分枝的核糖与核糖基, 而裂解酶则裂解最近端的单ADP核糖基, 裂解后的ADP核糖可以与烟酸再合成NAD, 实现再利用^[2,4]. PARG可裂解PARP-1上的聚ADP核糖基使其从DNA缺口上分离, 有利于PARP-1活性恢复(图2). PARP与PARG的活性平衡维持着细胞内聚ADP核糖基化的水平, 从而保持受体蛋白活性的稳定.

2 PARP-1的功能

2.1 DNA修复 PARP-1参与DNA缺口的识别.

■背景资料

PARP-1是真核细胞中催化聚ADP核糖化的一种细胞核酶. 自发现40多年来, PARP-1在DNA修复、细胞凋亡、增殖分化等方面的作用机制引起广大学者的关注, 并逐渐得到阐明. 近年来对PARP-1与肿瘤发生的关系以及利用调节PARP-1来提高肿瘤治疗效果的研究取得了令人鼓舞的成绩. 目前PARP-1抑制剂已进入抗肿瘤药物 I 期临床研究.

■同行评价

本文的内容较为详实,从PARP-1与肿瘤的各方面联系阐述了其与肿瘤发生与治疗的关系,有一定的指导意义。

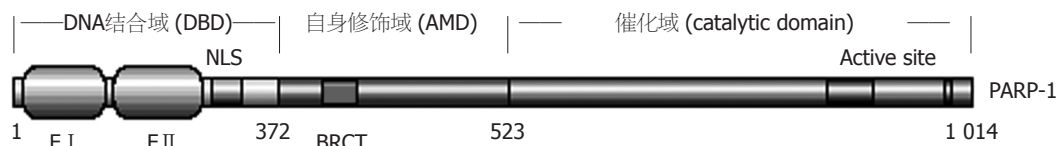


图1 PARP-1的结构。

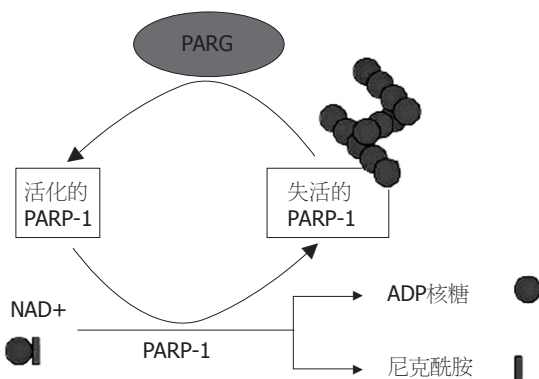


图2 PAR的代谢。

DNA缺口主要包括单链DNA缺口(single-strand break, SSB)和双链DNA缺口(double-strand break, DSB)。PARP-1作为DNA缺口感受器(DNA nick sensor), 依赖N-端DBD的两个锌指模序结合到单链DNA缺口(SSB)或双链DNA缺口(DSB)。其中, 锌指模序 I 是SSB和DSB依赖的PARP-1活化所必需的, 而锌指模序 II 主要在SSB依赖的PARP-1活化中发挥作用。而锌指模序下游的氨基酸残基与非特异DNA结合有关^[1,5]。识别DNA缺口后活化的PARP-1形成同型二聚体并催化NAD分解成尼克酰胺和ADP核糖, 利用后者为原料使核受体蛋白聚ADP核糖化, 从而影响这些修复相关蛋白的功能。PARP-1可参与DNA修复过程。DNA的修复主要有碱基切除修复, 核苷酸切除修复, 错配修复, 重组修复和非同源末端连接, 其中单链DNA缺口(SSB)的碱基切除修复(BER)中聚ADP核糖化起着重要作用。Haince *et al*^[6-7]认为, PARP-1参与SSB修复有两个主要机制: 首先, PARP-1自身和组蛋白的聚ADP核糖化加速他们与DNA链分离, 从而促进染色质的松弛, 以利于修复蛋白在缺口处的集结。PARP-1自身以及组蛋白的聚ADP核糖化改变了其电荷从而促使其与DNA链排斥分离。其次, 聚ADP核糖(PAR)和聚ADP核糖化的PARP-1促进X线修复交叉互补组合-1(X-ray repair cross-complementing group 1, XRCC1)和DNA连接酶III募集到SSBs以及DNA聚合酶beta的活化^[8-10]。另外, PAR可能与募集的蛋白中特异性PAR结合模序非共价结合从而改变了这些蛋白的功能^[11]。

双链DNA缺口(DSB)是一种致命的DNA损伤, 可以由电离辐射, 化学物质造成, 亦可由于DNA复制叉的延伸停滞所致。Susse *et al*^[12]发现, 全长PARP-1或仅DNA结合域的短暂过度表达可促使DSB修复下调, 不依赖PARP的酶活性, 并与P53在抑制染色体重排方面起协同作用。哺乳动物细胞的DSB修复主要利用两条修复旁路进行: 一是同源重组(homologous recombination, HR), 另一种是非同源末端连接(nonhomologous end-joining, NHEJ)。许多研究发现PARP-1可能影响HR。PARP-1基因缺失或活性抑制的小鼠容易发生姐妹染色单体交换(SCE)和基因扩增(gene amplification), 而SCE和基因扩增被认为是同源重组引起的, 这表明PARP-1可能影响同源重组(HR)^[13-15]。Dominguez *et al*^[15]发现PARP-1抑制剂3-AB可以促使BrdU(5-溴脱氧尿苷)处理后的中国仓鼠卵巢细胞姐妹染色单体交换(SCE)频率增加, 但并不同步增加易位的频率。Waldman *et al*^[16]研究发现, 抑制小鼠成纤维细胞PARP-1活性可影响染色体内HR, 但并不影响染色体外HR。而Schultz *et al*^[14]抑制中国仓鼠卵巢细胞PARP-1并未见HR频率改变。PARP-1的作用究竟是使引发HR的DNA损伤数量改变还是直接参与影响HR曾存在争议。同源重组需要一组叫RAD52的族蛋白, 包括Rad51, Rad52, Rad54, BRCA1和BRCA2。这些蛋白聚集在DNA损伤处形成亚核结构称为聚焦点(foci), 其中Rad51是foci动态结构的相关核心组分^[17]。绝大多数参与同源重组的蛋白位于Rad51聚焦点, 而同源重组缺陷的细胞不能形成Rad51聚焦点。然而Schultz *et al*^[14]发现, PARP-1^{-/-}细胞仍可形成Rad51聚焦点, 故推测PARP-1主要并不位于Rad51聚焦点。PARP-1抑制或缺失可以增加自发的Rad51聚焦点的形成, 而在PARP-1抑制的细胞中, 针对位点特异性DSB的同源定向修复正常。因此, 目前认为PARP-1控制着HR识别的DNA损伤而非直接影响HR的执行。

DSB的非同源末端连接(NHEJ)修复机制主要依赖Ku70/80异二聚体, Ku70/80可能作为DNA锚定亚单位与DNA依赖的蛋白激酶催化

亚单位(DNA-PKcs)结合形成DNA-PK全酶, 后者募集XRCC4和DNA连接酶IV完成NHEJ修复. 在NHEJ方面, PARP-1可能通过紧密结合到DSB与DNA-PKcs或Ku70/80相互作用^[18]. Tong *et al*^[19]亦发现, PARP-1与Ku80可能存在一定的协同作用. 另外, Audebert *et al*^[20]认为, PARP-1与XRCC1/DNA连接酶I亦可通过不依赖于DNA-PKcs, XRCC4和连接酶IV的途径参与NHEJ.

2.2 细胞凋亡 细胞凋亡过程中, 半胱-天冬蛋白酶Casepase-7和Casepase-3可以通过识别PARP-1核定位信号(NLS)的DEVD模序, 促使DNA结合域与催化域分离导致PARP-1分裂成p89和p24两个片段, 后者可不可逆结合于DNA缺口, 抑制PARP-1与DNA缺口结合能力, 导致PARP-1损伤修复作用丧失, 诱发凋亡^[21]. Casepase介导PARP-1失活的正反馈控制环存在表明PARP-1的活性阻滞对于维持正常细胞凋亡至关重要. 另外, PARP-1在凋亡诱导因子(AIF)介导的半胱-天冬蛋白酶非依赖型的细胞凋亡中发挥重要作用^[21-22]. 然而缺乏PARP基因的小鼠表型正常, 仅在老年时易发生表皮增生和肥胖. PARP-1^{-/-}小鼠表现出正常DNA切除修复、V(D)J重组和免疫球蛋白转型, 但对大剂量的 γ 射线高度敏感, 表现出姐妹染色体交换频率增加和DNA破坏诱导的微核形成. 缺乏PARP基因的细胞在给予TNF- α , γ 射线和地塞米松仍可以发生凋亡. Wang *et al*^[23-24]因此推测PARP-1在多数凋亡中是可有可无的. 尽管如此, 许多学者仍认为PARP-1的裂解在凋亡机制中发挥着重要作用.

3 PARP-1与肿瘤的发生和治疗

3.1 PARP-1与肿瘤发生 PARP-1在维持基因组的稳定性方面至关重要, 而PARP-1的抑制可能使机体细胞对烷化剂, 电离辐射等DNA损伤因子易感, 可能导致更容易发生肿瘤. 目前PARP-1的抑制模型主要有三种: 一是PARP-1基因敲除: 这种方式缺乏PARP-1结合的SSB是暴露的, SSB可形成停止复制叉, 推测SSB可能通过非PARP-1介导的修复机制参与修复. 二是利用抑制剂抑制PARP-1活性, 这阻碍PARP-1从单链DNA缺口(SSB)分离, 阻碍了BER修复蛋白募集到SSB上, 因此在细胞分裂S期末修复的SSB的复制叉将停滞. 这种停滞复制叉有赖于重组修复. 三是PARP-1基因部分损耗(depletion): 利用siRNA干扰PARP-1, 从而改变PARP和PARG的平衡, PARG活性相对增强因而使PAR降解过多. 这种

作用相当于PARP抑制剂^[7]. 这三种途径在肿瘤发生和治疗方面研究以前两种应用较多. 许多研究发现, PARP-1的基因敲除的小鼠经其他的DNA损伤因子处理后可导致肿瘤发生, 而单纯PARP-1缺失的小鼠观察至9月龄却未发现任何器官发生肿瘤^[25]. Morrison *et al*^[26]发现PARP-1^{-/-}SCID小鼠胸腺淋巴瘤发生率明显高于PARP-1^{+/+}SCID组. Tsutsumi *et al*^[27]通过破坏PARP-1外显子1产生PARP-1^{-/-}小鼠, 然后经BHP(N-二亚硝基-2-羟丙胺)处理后, 其肝血管瘤, 血管肉瘤和肺腺瘤发生率明显高于PARP-1^{+/+}组. Nozaki *et al*^[25]通过破坏PARP外显子1产生PARP-1^{-/-}小鼠, 给予AOM(氧化偶氮甲烷)后PARP-1^{-/-}小鼠结肠腺瘤和腺癌、肝脏结节发生率均明显高于PARP^{+/+}组, 然而从出生至9月龄的PARP-1^{-/-}小鼠各器官并未发生自发的肿瘤. 而Conde *et al*^[28]发现, 破坏PARP-1外显子4所产生的PARP-1和p53共缺失(PARP-1^{-/-} p53^{-/-})的小鼠和单纯p53完全缺失组鼠(PARP-1^{+/+} p53^{-/-})几乎都死于肿瘤(主要是淋巴瘤, 肉瘤, 表皮肿瘤和脑肿瘤), 然而前组无瘤生存率却明显高于后组. Tong *et al*^[29-30]发现PARP-1无效性突变(null mutation)会使p53缺失的小鼠在8周龄时髓母细胞瘤发生率增高, 破坏PARP-1外显子2产生的PARP-1^{-/-} p53^{-/-}小鼠淋巴瘤、乳腺和结肠肿瘤发生率明显增高. Dandri *et al*^[31]发现PARP抑制剂可以明显增加过氧化氢诱导HepG₂肝癌细胞的HBV整合, 提示PARP-1可以限制HBV整合到宿主DNA, 而HBV-DNA整合是肝癌的高危因素之一, 这似乎表明PARP-1与HBV相关的肝癌发生存在一定联系. 而Nomura *et al*^[32]发现, 人肝癌组织中PARP-1比邻近非肿瘤组织表达增高且活性增强, 其具体机制尚待进一步阐明. Tong *et al*^[19]研究发现, PARP-1^{-/-} Ku80^{-/-}小鼠约在胚胎至少8.5 d之前即发生生长迟滞, 并于9.5 d死亡, 提示PARP-1和Ku80双缺失对小鼠是致命的. 而且在PARP-1^{-/-}小鼠中Ku80的单个等位基因缺失将增加肝腺瘤和肝癌的发生率, 可见PARP-1与参与细胞NHEJ机制的Ku80可能存在一定的协同作用.

3.2 PARP-1与肿瘤治疗 从分子水平而言, 恶性肿瘤的治疗策略多数是利用损伤肿瘤细胞DNA的方法, 如放疗和化疗等, 来杀伤肿瘤细胞. 因此针对参与DNA损伤识别、反应和修复的分子靶向治疗探索一直是近年来研究的热点. PARP-1在DNA修复、细胞死亡、增殖分化等方面发挥着重要作用, 推测通过抑制PARP-1活性可抑

制PARP-1介导的DNA修复机制,提高放疗和化疗对肿瘤细胞DNA的损伤,因而对肿瘤可能具有潜在治疗价值.目前已有多种PARP-1抑制剂应用于临床药物研究,例如已开发的NU1025, GPII5427, AG014699, CEP-6800, AG14361, INO1001等.无论从分子水平、细胞水平,还是从整体水平,这些PARP-1抑制剂在联合化疗、放疗或单独化疗方面的治疗研究都取得一些重要进展.许多研究发现PARP-1抑制剂可加强多种抗肿瘤药(如烷化剂、拓扑异构酶抑制剂)的疗效. Tentori *et al*^[33]发现NU1025可延长脑淋巴瘤荷瘤小鼠的生存期. Delaney *et al*^[34]采用12个人类肿瘤细胞株(包括肺,结肠,卵巢,乳腺的肿瘤细胞系各3个),发现PARP-1抑制剂NU1025或NU1085与抗肿瘤药temozolomide(TMZ, 烷化剂)或topotecan(TP, 喜树碱类)联用可增强后二者对瘤细胞的生长抑制作用, NU1025和NU1085的抑瘤增强作用与二者对PARP的抑制强度有关. Guilford公司开发的PARP-1抑制剂GPII5427可增强TMZ的作用,明显延长多形性胶质母细胞瘤、脑淋巴瘤或颅内恶性黑色素瘤荷瘤小鼠的生存期^[35]. Calabrese *et al*^[36]研究皮下移植结肠癌细胞的小鼠发现, AG14361会增强TMZ的抗肿瘤作用. Miknyoczki *et al*^[37]用PARP-1抑制剂CEP-6800分别与TMZ、CPT-11(喜树碱类)或顺铂联用治疗临床相应肿瘤(U251MG人类胶质母细胞瘤, HT29人类结肠腺癌和Calu-6非小细胞肺癌)的异种移植模型,研究表明CEP-6800可分别使TMZ、喜树碱或顺铂处理后的肿瘤细胞停滞于G2/M期的时间和/或比例增加,并可增强TMZ、喜树碱和顺铂对荷瘤裸鼠的治疗效果. 尽管PARP-1抑制剂联合化疗的研究表明抗肿瘤作用显著增强,但其安全性和可行性仍然是人们担忧的一个问题. Miknyoczki *et al*^[37]的研究发现,治疗剂量的CEP-6800并未增加这三种化疗药对离体的人类肠上皮和肾脏细胞造成损害,也不增加活体小鼠中TMZ的胃肠毒性和顺铂的肾脏毒性,这预示着CEP-6800联合化疗的价值和可行性. 辉瑞公司开发的一种新型PARP-1抑制剂AG014699有望与烷化剂TMZ联合治疗恶性黑色素瘤,该药正处于I期临床研究阶段^[38]. 另外PARP-1抑制剂GPII5427由于半衰期长、生物利用度高,通过口服给药局部可达到有效药物浓度,在与TMZ联用治疗的中枢神经系统肿瘤模型取得较好疗效^[39]. Ku-DOS公司也宣布一种口服PARP抑制剂作为抗肿瘤药物(主要针

对遗传性乳腺癌和卵巢癌)进入I期临床研究阶段^[40].

PARP-1抑制剂的另一方面研究在于是否加强放疗的抗肿瘤效应. 肿瘤细胞对放疗的抵抗依赖于酶介导的双链DNA缺口(DSB)修复机制,尤其是NHEJ修复机制. 后者依赖于DNA-PK的作用,而已有研究表明PARP-1与DNA-PK之间存在相互作用^[18-19],这一定程度上为PARP-1抑制剂联合放疗的应用研究提供了理论基础. Veuger *et al*^[41]利用小鼠胚胎成纤维细胞和中国仓鼠卵巢细胞研究发现, PARP-1或DNA-PK缺失均可使相应细胞对放射的敏感性提高到4倍,并降低G0期细胞的潜在致死损伤修复(PLDR). PARP-1特异性抑制剂AG14361和DNA-PK特异性抑制剂NU7026可分别使PARP-1和DNA-PK无缺陷的细胞对放射的敏感性增加,二者联用具有加和作用. AG14361或NU7026单用分别可使非缺陷细胞的PLDR降至1/3,二者联用可完全阻止PLDR. 联用AG14361或NU7026后,即使在放射后24 h仍可阻止90%的DNA-DSB重新结合. 这种对放射介导的DNA-DSB修复抑制作用与其细胞毒作用加强相关. Calabrese *et al*^[36]在活体实验中发现AG14361可增强皮下移植结肠癌细胞的小鼠对局部放疗的敏感性. Brock *et al*^[42]发现PARP-1抑制剂INO1001可提高人类成纤维细胞对放射线的敏感性. 这些预示着PARP-1抑制剂单独应用或与其他抗肿瘤药联合可能有利于提高肿瘤对放疗的敏感性.

此外,单独抑制PARP-1在肿瘤治疗(主要是乳腺癌)研究方面取得了一定进展. 乳腺癌易感基因BRCA1和BRCA2在DNA同源重组(HR)、单核苷酸切除修复(NER)以及可能在非同源末端连接(NHEJ)中发挥重要作用^[43]. 家族性乳腺癌多数由于BRCA1或BRCA2的一个等位基因遗传缺陷引起,某些杂合子细胞由于残留的一个BRCA1或BRCA2等位基因缺失可能启动了肿瘤的发生. BRCA缺陷细胞(系指BRCA1^{-/-}或BRCA2^{-/-}细胞)同源重组(HR)缺陷,抑制PARP-1可使正常情况下依赖姐妹染色单体交换(SCE)修复的DNA损伤(lesion)产生增多,这些损伤在同源重组(HR)缺陷细胞中积聚可导致染色质失常甚至细胞死亡. Farmer *et al*^[44]通过干扰PARP-1的RNA发现, BRCA1缺陷的小鼠胚胎干细胞株比BRCA1正常的野生株克隆存活率低. 类似结果见于BRCA2缺陷的中国仓鼠卵巢细胞,以及BRCA1 mRNA损耗的人乳腺癌细胞株MCF7中.

同样, 利用PARP-1高效选择抑制剂KU0058684和KU0058948分别作用于野生株、BRCA1缺陷株和BRCA2缺陷株, 发现后两株的敏感性明显高于野生株. 而由于KU0051529不能有效抑制PARP-1和PARP-2, 其作用后三组敏感性无明显差异. KU0058684作用24 h后的细胞多数停滞在G2期. 尽管BRCA缺陷细胞对PARP-1高效抑制剂高度敏感, 杂合子的BRCA1突变细胞和杂合子BRCA2突变细胞均无此效应. Bryant *et al*^[45]将人类乳腺癌细胞系MCF7野生株和MDA-MB-231(p53突变株)分别经BRCA2-siRNA处理, 发现两株细胞对PARP抑制剂NU1025的敏感性无差异, 但NU1025仅使BRCA2-siRNA处理后的两株细胞生存率明显下降. 利用RNA干扰同时造成BRCA2和PARP-1损耗可使细胞生存率明显降低. 将BRCA2^{-/-}细胞和BRCA2^{+/-}细胞移植入裸鼠股部, 用PARP-1抑制剂AG14361作用于两组后, 发现BRCA2^{-/-}组鼠相对BRCA2^{+/-}组鼠肿瘤生长明显受抑制. BRCA2^{-/-}细胞由于同源重组缺陷, 对PARP-1抑制剂特别敏感, 因此在BRCA2^{-/-}患者的肿瘤治疗中(肿瘤组织为BRCA2^{-/-}), PARP-1抑制剂极有可能实现肿瘤特异性治疗. 最近研究表明在同源重组(HR)遗传缺陷细胞中PARP-1是必需的, 而且似乎并不局限于缺陷的是参与HR的某一种具体分子, 因此抑制PARP-1可能为HR缺陷的肿瘤的治疗提供了新的前景^[7,44-45].

总之, 对PARP-1的研究一定程度上推动了DNA修复、细胞凋亡、增殖分化的机制研究, 有助于我们进一步探索肿瘤的发生机制和治疗策略. 将来恶性肿瘤治疗策略是对肿瘤细胞的特异杀伤, 而对正常细胞DNA影响甚微的靶向治疗, PARP-1有望成为有效而特异的抗肿瘤靶分子之一. 今后PARP-1的研究大体有两个方向: 一是对PARP-1在肿瘤和其他疾病的分子机制进一步广泛和深入的研究; 另一方面是PARP-1干预手段的探索和临床应用, 包括高效特异而安全的PARP-1抑制剂的研制开发和RNA干扰等技术的应用. 相信随着PARP-1研究的进展, 以及联合其他抗肿瘤治疗手段的进步, 针对PARP-1的靶向干预在肿瘤防治中必将发挥重要的作用.

4 参考文献

- 1 Masutani M, Nakagama H, Sugimura T. Poly(ADP-ribose) and carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 38: 339-348
- 2 Nguwera PA, Fuertes MA, Valladares B, Alonso C, Perez JM. Poly(ADP-ribose) polymerases:

- homology, structural domains and functions. Novel therapeutical applications. *Prog Biophys Mol Biol* 2005; 88: 143-172
- 3 Virag L, Szabo C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 375-429
- 4 Davidovic L, Vodenicharov M, Affar EB, Poirier GG. Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism. *Exp Cell Res* 2001; 268: 7-13
- 5 Ikejima M, Noguchi S, Yamashita R, Ogura T, Sugimura T, Gill DM, Miwa M. The zinc fingers of human poly(ADP-ribose) polymerase are differentially required for the recognition of DNA breaks and nicks and the consequent enzyme activation. Other structures recognize intact DNA. *J Biol Chem* 1990; 265: 21907-21913
- 6 Rouleau M, Aubin RA, Poirier GG. Poly(ADP-ribosyl)ated chromatin domains: access granted. *J Cell Sci* 2004; 117: 815-825
- 7 Haince JF, Rouleau M, Hendzel MJ, Masson JY, Poirier GG. Targeting poly(ADP-ribosylation): a promising approach in cancer therapy. *Trends Mol Med* 2005; 11: 456-463
- 8 Leppard JB, Dong Z, Mackey ZB, Tomkinson AE. Physical and functional interaction between DNA ligase IIIalpha and poly(ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 5919-5927
- 9 El-Khamisy SF, Masutani M, Suzuki H, Caldecott KW. A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 5526-5533
- 10 Prasad R, Lavrik OI, Kim SJ, Kedar P, Yang XP, Vande Berg BJ, Wilson SH. DNA polymerase beta -mediated long patch base excision repair. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 stimulates strand displacement DNA synthesis. *J Biol Chem* 2001; 276: 32411-32414
- 11 Pleschke JM, Kleczkowska HE, Strohm M, Althaus FR. Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J Biol Chem* 2000; 275: 40974-40980
- 12 Susse S, Scholz CJ, Burkle A, Wiesmuller L. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) and p53 independently function in regulating double-strand break repair in primate cells. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 669-680
- 13 de Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M, Oliver FJ, Masson M, Dierich A, LeMour M, Walztinger C, Chambon P, de Murcia G. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 7303-7307
- 14 Schultz N, Lopez E, Saleh-Gohari N, Helleday T. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) has a controlling role in homologous recombination. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 4959-4964
- 15 Dominguez I, Mateos S, Cortes F. Yield of SCEs and translocations produced by 3 aminobenzamide in cultured Chinese hamster cells. *Mutat Res* 2000; 448: 29-34
- 16 Waldman AS, Waldman BC. Stimulation of intra-chromosomal homologous recombination in mammalian cells by an inhibitor of poly(ADP-ribosylation). *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 5943-5947
- 17 Essers J, Houtsmuller AB, van Veelen L, Paulusma

- C, Nigg AL, Pastink A, Vermeulen W, Hoeijmakers JH, Kanaar R. Nuclear dynamics of RAD52 group homologous recombination proteins in response to DNA damage. *EMBO J* 2002; 21: 2030-2037
- 18 Jackson SP. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 2002; 23: 687-696
 - 19 Tong WM, Cortes U, Hande MP, Ohgaki H, Cavalli LR, Lansdorp PM, Haddad BR, Wang ZQ. Synergistic role of Ku80 and poly(ADP-ribose) polymerase in suppressing chromosomal aberrations and liver cancer formation. *Cancer Res* 2002; 62: 6990-6996
 - 20 Audebert M, Salles B, Calsou P. Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J Biol Chem* 2004; 279: 55117-55126
 - 21 Koh DW, Dawson TM, Dawson VL. Mediation of cell death by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Pharmacol Res* 2005; 52: 5-14
 - 22 Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 2002; 297: 259-263
 - 23 Wang ZQ, Auer B, Stingl L, Berghammer H, Haidacher D, Schweiger M, Wagner EF. Mice lacking ADPRT and poly(ADP-ribosyl)ation develop normally but are susceptible to skin disease. *Genes Dev* 1995; 9: 509-520
 - 24 Wang ZQ, Stingl L, Morrison C, Jantsch M, Los M, Schulze-Osthoff K, Wagner EF. PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. *Genes Dev* 1997; 11: 2347-2358
 - 25 Nozaki T, Fujihara H, Watanabe M, Tsutsumi M, Nakamoto K, Kusuoka O, Kamada N, Suzuki H, Nakagama H, Sugimura T, Masutani M. Parp-1 deficiency implicated in colon and liver tumorigenesis induced by azoxymethane. *Cancer Sci* 2003; 94: 497-500
 - 26 Morrison C, Smith GC, Stingl L, Jackson SP, Wagner EF, Wang ZQ. Genetic interaction between PARP and DNA-PK in V(D)J recombination and tumorigenesis. *Nat Genet* 1997; 17: 479-482
 - 27 Tsutsumi M, Masutani M, Nozaki T, Kusuoka O, Tsujiuchi T, Nakagama H, Suzuki H, Konishi Y, Sugimura T. Increased susceptibility of poly(ADP-ribose) polymerase-1 knockout mice to nitrosamine carcinogenicity. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1-3
 - 28 Conde C, Mark M, Oliver FJ, Huber A, de Murcia G, Menissier-de Murcia J. Loss of poly(ADP-ribose) polymerase-1 causes increased tumour latency in p53-deficient mice. *EMBO J* 2001; 20: 3535-3543
 - 29 Tong WM, Ohgaki H, Huang H, Granier C, Kleihues P, Wang ZQ. Null mutation of DNA strand break-binding molecule poly(ADP-ribose) polymerase causes medulloblastomas in p53(-/-) mice. *Am J Pathol* 2003; 162: 343-352
 - 30 Tong WM, Hande MP, Lansdorp PM, Wang ZQ. DNA strand break-sensing molecule poly(ADP-Ribose) polymerase cooperates with p53 in telomere function, chromosome stability, and tumor suppression. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 4046-4054
 - 31 Dandri M, Burda MR, Burkle A, Zuckerman DM, Will H, Rogler CE, Greten H, Petersen J. Increase in de novo HBV DNA integrations in response to oxidative DNA damage or inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation. *Hepatology* 2002; 35: 217-223
 - 32 Nomura F, Yaguchi M, Togawa A, Miyazaki M, Isobe K, Miyake M, Noda M, Nakai T. Enhancement of poly-adenosine diphosphate-ribosylation in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 529-535
 - 33 Tentori L, Leonetti C, Scarsella M, d'Amati G, Portarena I, Zupi G, Bonmassar E, Graziani G. Combined treatment with temozolomide and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor enhances survival of mice bearing hematologic malignancy at the central nervous system site. *Blood* 2002; 99: 2241-2244
 - 34 Delaney CA, Wang LZ, Kyle S, White AW, Calvert AH, Curtin NJ, Durkacz BW, Hostomsky Z, Newell DR. Potentiation of temozolomide and topotecan growth inhibition and cytotoxicity by novel poly(adenosine diphosphoribose) polymerase inhibitors in a panel of human tumor cell lines. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2860-2867
 - 35 Tentori L, Leonetti C, Scarsella M, D'Amati G, Vergati M, Portarena I, Xu W, Kalish V, Zupi G, Zhang J, Graziani G. Systemic administration of GPI 15427, a novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, increases the antitumor activity of temozolomide against intracranial melanoma, glioma, lymphoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5370-5379
 - 36 Calabrese CR, Almassy R, Barton S, Batey MA, Calvert AH, Canan-Koch S, Durkacz BW, Hostomsky Z, Kumpf RA, Kyle S, Li J, Maegley K, Newell DR, Notarianni E, Stratford IJ, Skalitzy D, Thomas HD, Wang LZ, Webber SE, Williams KJ, Curtin NJ. Anticancer chemosensitization and radiosensitization by the novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor AG14361. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 56-67
 - 37 Miknyoczki SJ, Jones-Bolin S, Pritchard S, Hunter K, Zhao H, Wan W, Ator M, Bihovsky R, Hudkins R, Chatterjee S, Klein-Szanto A, Dionne C, Ruggeri B. Chemopotential of temozolomide, irinotecan, and cisplatin activity by CEP-6800, a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 371-382
 - 38 http://www.eddn.org/clinicalTr_caResUK.html clinical trials: Cancer Research UK
 - 39 Tentori L, Leonetti C, Scarsella M, Vergati M, Xu W, Calvin D, Morgan L, Tang Z, Woznizk K, Alemu C, Hoover R, Lapidus R, Zhang J, Graziani G. Brain distribution and efficacy as chemosensitizer of an oral formulation of PARP-1 inhibitor GPI 15427 in experimental models of CNS tumors. *Int J Oncol* 2005; 26: 415-422
 - 40 <http://www.kudospharma.co.uk/news/newsdesk.php>. First Patient Treated With New KuDOS Oral Anticancer Agent
 - 41 Veuger SJ, Curtin NJ, Richardson CJ, Smith GC, Durkacz BW. Radiosensitization and DNA repair inhibition by the combined use of novel inhibitors of DNA-dependent protein kinase and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Cancer Res* 2003; 63: 6008-6015
 - 42 Brock WA, Milas L, Bergh S, Lo R, Szabo C, Mason KA. Radiosensitization of human and rodent cell lines by INO-1001, a novel inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase. *Cancer Lett* 2004; 205: 155-160
 - 43 Tutt A, Ashworth A. The relationship between the roles of BRCA genes in DNA repair and cancer

- 44 predisposition. *Trends Mol Med* 2002; 8: 571-576
Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NM, Jackson SP, Smith GC, Ashworth A. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 2005; 434: 917-921
- 45 Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, Kyle S, Meuth M, Curtin NJ, Helleday T. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 2005; 434: 913-917

电编 张敏 编辑 潘伯荣

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

• 消息 •

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

本刊讯 第二届国际肝胆胰协会中国分会学术会议将于2006-10在武汉举行。

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

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

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

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

来稿要求: 寄全文及500-800字论文摘要, 同时寄论文的软盘一份或发电子邮件。以附件的形式发送至 chenxp@medmail.com.cn, 也可将稿件打印后寄至: 武汉市解放大道1095号, 武汉华中科技大学附属同济医院肝胆胰外科研究所张志伟、黄志勇副教授(收), 邮编: 430030; 联系电话: 027-83662599。

大肠癌组织RAB5A和CD44v9表达的意义

李志高, 李晓冬, 董新舒, 庞洪刚, 杜杰

■背景资料

研究表明RAB5A和CD44v9在肺癌和胃癌等组织中的高表达与肿瘤的分化、浸润和转移存在着正相关, 但其与多种消化道肿瘤的相关性尚待进一步研究。

李志高, 李晓冬, 董新舒, 庞洪刚, 杜杰, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院腹外科 黑龙江省哈尔滨市 150040

李志高, 2003年哈尔滨医科大学医学博士, 副教授、硕士研究生导师, 一直从事乳腺肿瘤, 消化道肿瘤的临床治疗和防治工作。

黑龙江省自然科学基金资助项目, No.9748

通讯作者: 李志高, 150040, 哈尔滨市南岗区哈平路150号, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院腹外科. doctorxht@126.com
传真: 0451-86298317

收稿日期: 2005-12-17 接受日期: 2006-02-18

Significance of RAB5A and CD44v9 expression in colorectal cancer tissues

Zhi-Gao Li, Xiao-Dong Li, Xin-Shu Dong, Hong-Gang Pang, Jie Du

Zhi-Gao Li, Xiao-Dong Li, Xin-Shu Dong, Hong-Gang Pang, Jie Du, Department of Abdomen Surgery, the Affiliated Tumor Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China

Supported by the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province, No.9748

Correspondence to: Zhi-Gao Li, Department of Abdomen Surgery, the Affiliated Tumor Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China. doctorxht@126.com

Received: 2005-12-17 Accepted: 2006-02-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of RAB5A and CD44v9 and their significances in colorectal cancer.

METHODS: SP immunohistochemical method was adopted to detect the expression of RAB5A and CD44v9 proteins in the pathological paraffin sections from colorectal cancer ($n = 43$). RNA samples of 60 fresh tissues excised from patients with colorectal cancer were extracted and reversely transcribed into cDNAs, and then real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression of RAB5A and CD44v9 genes. The correlations of RAB5A and CD44v9 expression with the differentiation and metastasis of colorectal cancer were analyzed.

RESULTS: RAB5A protein was positively expressed in cytoplasm cell membrane with a rate of 100%, while CD44v9 protein was positively

expressed only in cytoplasm with a rate of 86.7%. RT-PCR results showed that T_m of each sample was coincided with that of positive control by melting curve analysis. The expression of RAB5A cDNA was lower in highly and moderately differentiated cancers than that of poorly differentiated ones ($P < 0.01$), and it was also lower in cancers without lymph node metastasis than that with lymph node metastasis ($P < 0.01$). The expression of CD44v9 gene and protein were positively related to those of RAB5A ($\chi^2 = 14.532$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: The expression of RAB5A and CD44v9 are correlated with the differentiation and metastasis of colorectal cancer, which may play important roles in the signal transduction across cellular membrane and matrix invasion.

Key Words: RAB5A; CD44v9; Colorectal cancer; Differentiation; Metastasis

Li ZG, Li XD, Dong XS, Pang HG, Du J. Significance of RAB5A and CD44v9 expression in colorectal cancers tissues. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(9):848-852

摘要

目的: 探讨大肠癌组织RAB5A和CD44v9表达的意义。

方法: 应用SP免疫组化法检测43例大肠癌病理蜡块中RAB5A和CD44v9的蛋白质表达; 取60例大肠癌患者新鲜组织标本, 提取RNA并逆转录合成cDNA, 应用Real-time PCR法检测组织样本中RAB5A和CD44v9的基因表达; 分析CD44v9和RAB5A的基因与蛋白质表达量与大肠癌分化及转移程度的相关性。

结果: RAB5A蛋白表达阳性率为100%, 阳性表达位于胞质和胞膜; CD44v9表达阳性率为86.7%, 阳性表达位于胞质; 荧光定量PCR结果经熔解曲线分析各样本扩增产物的 T_m 值一致并与阳性对照的 T_m 值吻合。RAB5A cDNA的表达量在高分化和中分化大肠癌组织中低于低分化大肠癌组织($P < 0.01$), 在无淋巴结转移的大肠癌组织中低于有淋巴结转移的组

织($P<0.01$), 而CD44v9 cDNA的表达趋势与RAB5A相同; RAB5A与CD44v9的蛋白和基因表达均呈正相关($\chi^2=14.532, P<0.01$).

结论: RAB5A和CD44v9的表达与大肠癌的分化和转移有关, 可能在跨膜信号传导和基质侵袭中共同发挥作用.

关键词: RAB5A; CD44v9; 结直肠肿瘤; 分化; 转移

李志高, 李晓冬, 董新舒, 庞洪刚, 杜杰. 大肠癌组织RAB5A和CD44v9表达的意义. 世界华人消化杂志 2006;14(9):848-852
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/848.asp>

0 引言

大肠癌为常见多发病, 其发病率有逐年上升趋势. 近年来, 人们对大肠癌的浸润与转移机制进行了广泛的研究. RAB5A和CD44v9是近期研究较多的两类分化和转移相关靶基因, 研究表明, 其在肺癌和胃癌等组织中的高表达与肿瘤的分化、浸润和转移存在着正相关^[1], 但其与多种消化道肿瘤的相关性尚待进一步研究. 我们研究了大肠癌组织标本中RAB5A和CD44v9基因和蛋白质的表达, 以探讨二者与大肠癌分化及转移的相关性.

1 材料和方法

1.1 材料 RAB5A和CD44v9抗体由美国Santa Cruz公司生产; SYBR荧光定量PCR即用试剂盒由美国ABI公司生产; Trizol试剂由美国Invitrogen生物公司生产; MuMLv Reverse transcriptase由美国Promega生物技术公司生产; DEPC由美国Sigma生化试剂公司生产; 其他均为国产试剂纯. Gene Amp PCR System 2400型PCR仪由美国MJ公司生产; J2-21M型台式冷冻离心机由美国Beckman公司生产. 2003-01/2003-05资料完整并经病理证实的大肠癌石蜡包埋组织43例, 男27例, 女16例. 年龄26-74岁, ≥ 55 岁21例, <55 岁22例. 高分化12例, 低分化31例(含黏液腺癌10例). 应用Primer Premier5.0进行引物设计. 引物序列分别如下: CD44v9上游引物F_{CD44v9}: 5'-GCA GAG TAA TTC TCA GAG CTT CTC TAC AT-3'; 下游引物R_{CD44v9}: 5'-TTG ATG TCA GAG TAG AAG TTG TTG GAT GG-3', 扩增产物片段长度为195 bp. RAB5A上游引物F_{RAB5A}: 5'-AGC ACT AGG CTT GAT TTG-3'; 下游引物R_{RAB5A}: 5'-CAC CGC CAT AGA TAC ACT-3', 扩增产物片段长度为299 bp.

由上海生工生物工程公司合成.

1.2 方法 免疫组化按照说明书步骤进行操作, 以PBS代替一抗作为阴性对照. 结果判定: RAB5A阳性表达以细胞膜和/或细胞质内出现棕黄色颗粒为准, CD44v9以血管内皮细胞的细胞质内或细胞膜出现棕黄色颗粒者为准, 计数5个高倍视野或1 000个细胞. 按染色强度计分: 0分为无色, 1分为淡黄色, 2分为棕黄色, 3分为棕褐色. 按阳性细胞所占百分比计分: 0分为阴性, 1分为阳性细胞 $\leq 10\%$, 2分为阳性细胞数11%-50%, 3分为阳性细胞数51%-75%, 4分为阳性细胞数 $>75\%$. 染色强度与阳性细胞所占百分比乘积3-5分计为(+), 6-9分为(++), 12分为(+++). 各指标 ≥ 6 分为高表达, <6 分为低表达. 另入院手术病理证实的大肠癌患者新鲜组织标本60例, 男37例, 女23例. 年龄35-87岁, ≥ 55 岁39例, <55 岁21例. 高中分化48例, 低分化12例. 取全层组织标本约100 mg, 经典Trizol法提取总RNA、逆转录cDNA第一链合成. 先用 β -actin上、下游引物进行扩增以确定实验条件, 然后进行RAB5A和CD44v9基因扩增. RAB5A的反应条件为95℃预变性10 min; 95℃ 30 s, 50.8℃ 30 s, 72℃ 45 s; CD44v9的反应条件为95℃预变性10 min; 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 均扩增30个循环. 在每一循环的退火温度时收集荧光信号. PCR反应后, 按1.0℃/step的温度上升速率从65℃递增至99℃进行熔解曲线分析. 用ABI Prism 7000专用软件进行结果分析, cDNA的定量以扩增曲线的交叉点(crossing point, Cp)的数值来表示. 产物特异性经解链曲线分析确定, 并取反应产物5 μ L进行琼脂糖凝胶电泳, 以检验反应的特异性.

统计学处理 运用SAS 6.12软件包分析数据. 计量资料的数据以mean \pm SD表示, 组间差异采用方差分析处理, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 免疫组化检测结果 43例大肠癌组织中, RAB5A蛋白阳性率达100%, 高分化的12例中只有3例强阳性, 而低分化的31例中28例强阳性, 即随着大肠癌分化程度逐渐降低, RAB5A表达明显增高; 阳性表达位于胞质和胞膜(图1). 在43例大肠癌组织中, 35例有不同程度的CD44v9表达, 阳性率为81.4%, 阳性表达主要位于胞质(图2). 随着大肠癌分化程度逐渐降低, CD44v9蛋白表达呈明显增高的趋势. RAB5A表达随着大肠癌分

■研究前沿
RAB5A和CD44v9
与恶性肿瘤转移
的相关性为近期
研究的重点.

■创新盘点

关于RAB5A和CD44v9与大肠癌的相关研究目前多集中于蛋白水平,而本文则从基因水平对其与大肠癌的相关性作了较为深入的研究。

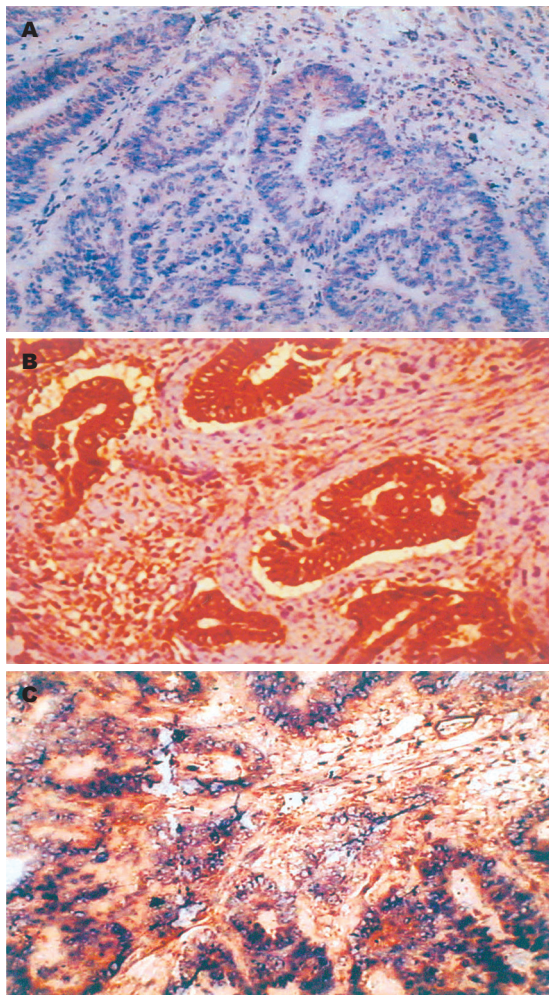


图1 大肠癌组织RAB5A蛋白表达(SP×200)。A: 阴性对照; B: 低分化大肠癌组织; C: 高分化大肠癌组织。

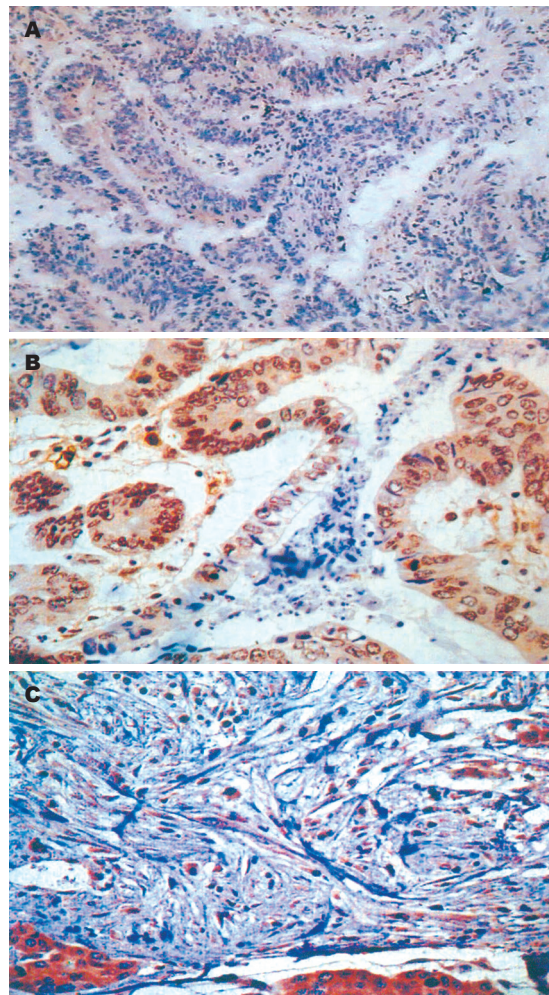


图2 大肠癌组织CD44v9蛋白表达(SP×200)。A: 阴性对照; B: 低分化大肠癌组织; C: 高分化大肠癌组织。

化程度的降低而明显增高($P<0.01$),而与大肠癌患者的年龄、性别无明显相关($P>0.05$,表1)。不同分化程度大肠癌组织CD44v9的表达程度差异有显著性($P<0.01$),与大肠癌患者的年龄、性别也无明显相关($P>0.05$,表1)。此外,RAB5A蛋白强阳性表达的31例中,26例同时CD44v9强阳性表达,5例CD44v9阴性/弱阳性表达;RAB5A蛋白弱阳性表达12例中,10例同时CD44v9阴性/弱阳性表达,2例CD44v9强阳性表达,两者的表达水平差异有显著性($P<0.01$),显示RAB5A蛋白与CD44v9的表达呈正相关。

2.2 荧光定量PCR实验结果 经熔解曲线分析各样本扩增产物的 T_m 值一致并与阳性对照的 T_m 值吻合,阴性对照均未见扩增(图3A-B)。其中,RAB5A cDNA的表达量在高分化和中分化大肠癌组织中要低于低分化大肠癌组织($P<0.05$),显著低于大肠癌黏液腺癌组织($P<0.01$)。而CD44v9 cDNA的表达趋势与RAB5A相同。定量PCR产物琼脂糖凝胶电泳结果可见RAB5A基因的产物在

表1 RAB5A与CD44v9蛋白表达程度与大肠癌临床病理特征间的关系

临床及病理学指标	n	RAB5A蛋白表达程度		CD44v9表达程度	
		+ / ++	+++	- / ++	+++
男	27	8	19	14	13
女	16	4	12	9	7
年龄≤55	21	6	15	12	9
>55	22	6	16	11	11
高分化	12	9	3	10	2
低分化	31	3	28 ^b	13	18 ^b
有淋巴结转移	32	5	27	13	19
无淋巴结转移	11	8	3 ^d	8	3 ^d

^b $P<0.01$ vs 高分化, ^d $P<0.01$ vs 有淋巴结转移。

299 bp处有特异性条带(图4),而CD44v9基因的产物在195 bp处有特异性条带。

3 讨论

RAB5A是位于质膜,早期内体上的GTP酶开关,

负责调控胞吞中早期内体的融合, 与细胞内物质运输、蛋白分选以及信号传导、受体下调和病原体吞噬有关. RAB5A蛋白突变体研究表明, RAB5A蛋白的突变可导致细胞功能失调, 引起多种疾病发生. 李钰 *et al*^[2]采用mRNA差异展示技术发现RAB5A基因在具有高转移潜能的人肺腺癌细胞系Anip973中高表达, 而在其低转移潜能的母系AGZY83-a中低表达, 是一个肺癌转移相关基因. 陈宇 *et al*^[3]曾应用免疫组化SP法检测胃癌石蜡包埋组织RAB5A蛋白的表达情况, 发现RAB5A与胃癌分化程度相关, 分化程度越低RAB5A的表达越高. 为进一步研究RAB5A与消化道肿瘤分化程度的相关性, 我们以大肠癌为研究对象, 选用与大肠癌分化相关的细胞黏附分子CD44v9作为参照, 以探讨其在大肠癌进而在肿瘤的形成和演进中的作用. CD44是细胞黏附分子家族中的一员, 主要位于细胞表面, 介导细胞与细胞间或细胞与基质间相互接触和结合, 以配体-受体对应的形式发挥作用. CD44基因在转录过程中, 外显子经过选择性剪切可产生多种变异型, 与肿瘤的形成、演进、转移及复发有明显关系^[4]. CD44v9是由外显子14插入CD44标准型近细胞膜细胞外功能区上形成的. Higashikawa *et al*^[5]研究证明CD44v9与消化道肿瘤关系最为密切, 可能与大肠癌的分化有密切关系.

我们发现, RAB5A蛋白在43例高低不同分化程度的大肠癌组织中表达的阳性率达100%(43/43), 其表达随着大肠癌分化程度的降低而明显增高($P<0.01$), 并随着大肠癌转移度的增高而增加($P<0.01$), 提示RAB5A蛋白的表达程度可能与大肠癌细胞分化以及浸润转移的能力密切相关. 同时发现CD44v9蛋白表达随着大肠癌分化程度的降低也明显增高($P<0.01$), 这与已有研究报道相符^[6-7]. 统计学相关性分析表明RAB5A蛋白与CD44v9的表达水平呈显著性正相关($P<0.01$), 因此与分化相关细胞黏附分子CD44v9可作为阳性参照, 以探讨RAB5A与大肠癌分化的关系, 并进一步探讨RAB5A作为蛋白质跨膜分选的信号调控开关, 在高低不同分化程度的大肠癌中与CD44v9表达的相关性. 同时也提示两者在大肠癌分化过程和浸润转移中共同发挥调控作用, 联合检测两蛋白表达对预测肿瘤分化程度、远隔转移的发生及评估预后将具有一定的指导意义.

荧光定量PCR技术是目前基因定量的最

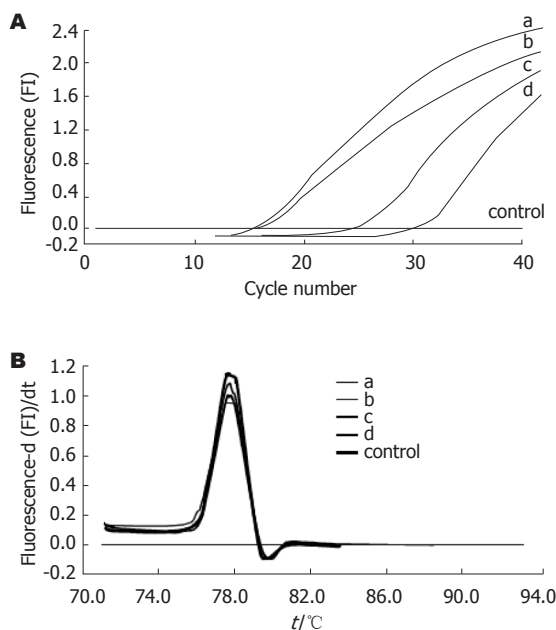


图3 RAB5A cDNA定量RT-PCR结果和熔解曲线. A: 定量RT-PCR结果; B: 熔解曲线. a: 黏液腺癌; b: 低分化腺癌; c: 中分化腺癌; d: 高分化腺癌; control: 阴性对照组.

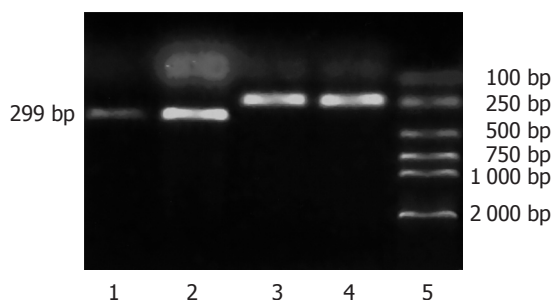


图4 大肠癌标本RAB5A定量PCR特异性检测. 1: 高分化无转移; 2: 低分化有远处转移; 3, 4: 相应标本的 β -actin PCR产物; 5: DL2000 Marker.

常用的技术, 可以实时动态地显示PCR扩增曲线的生成, 定量的线性范围大于7个数量级, 区分5 000和10 000个拷贝的DNA模板可信度达99.7%. SYBR Green I是一种只与DNA双链结合的荧光染料, 与DNA双链结合时发出荧光, 从DNA双链上释放出来时, 荧光信号急剧减弱. 因此, 在一个体系内, 其信号强度代表了双链DNA分子的数量^[8]. 本研究应用SYBR Green I荧光染料一步法, 对60例大肠癌临床标本中RAB5A和CD44v9的表达进行了研究. 结果可见, RAB5A基因在大肠癌标本中均有表达, 随着肿瘤分化程度的降低其表达量逐渐增多, 尤其是伴有淋巴结转移的组织, 其表达量明显高于无转移的组织. 同时, CD44v9基因的表达也随其转移度的增加而增加. 此现象与应用免疫组化法

应用要点

本文为进一步研究肿瘤转移相关基因提供了新的研究靶点, 下一步可对其与肿瘤细胞的侵袭等转移相关特性进行研究.

■同行评价

本文采用的方法合理,结果可信,对大肠癌的转移和预后评估增加了新的指标。

得出的RAB5A和CD44v9蛋白质表达趋势相同。两结果互相验证,从而在mRNA和蛋白质两个水平同时证明了RAB5A和CD44v9的表达与大肠癌的转移程度呈正相关。

总之, RAB5A和CD44v9的表达与大肠癌的分化和淋巴结转移有关, RAB5A在大肠癌的发展和分化过程中可能通过调控蛋白质跨膜运输通路发挥重要的作用, 并且二者可能共同在肿瘤转移过程中发挥作用, 而其中的具体机制有待于进一步研究。

4 参考文献

- 1 Eisterer W, Bechter O, Hilbe W, van Driel M, Lokhorst HM, Thaler J, Bloem AC, Gunthert U, Stauder R. CD44 isoforms are differentially regulated in plasma cell dyscrasias and CD44v9 represents a new independent prognostic parameter in multiple myeloma. *Leuk Res* 2001; 25: 1051-1057
- 2 李钰, 宋岩, 陆纲, 邹荣, 邹亚男, 张贵寅, 李璞. 一个与非小细胞肺癌转移相关的基因——RAB5A基因. *遗传* 1999; 21: 6-10
- 3 陈宇, 李钰, 白静, 周立新, 张贵寅, 李璞. 胃癌组织中RAB5A蛋白的表达及其与转移的关系. *中国肿瘤* 1999; 8: 234-236
- 4 Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 1990; 61: 1303-1313
- 5 Higashikawa K, Yokozaki H, Ue T, Taniyama K, Ishikawa T, Tarin D, Tahara E. Evaluation of CD44 transcription variants in human digestive tract carcinomas and normal tissues. *Int J Cancer* 1996; 66: 11-17
- 6 Wielenga VJ, Heider KH, Offerhaus GJ, Adolf GR, van den Berg FM, Ponta H, Herrlich P, Pals ST. Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res* 1993; 53: 4754-4756
- 7 高远帆, 何金, 陈泳莲. CD44及其变异型在大肠癌浸润转移中的表达. *上海医学* 2000; 23: 151-153
- 8 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

电编 张敏 编辑 潘伯荣

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

• 消息 •

NERD及相关疾病国际研讨会

本刊讯 NERD及相关疾病国际研讨会将于2006-08在三亚举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文和结构式摘要800字, 电脑打印附软盘或E-mail, 2006-06-15截稿。

2 联系方式

北京市鼓楼大街41号中国医学论坛报社 张莉; 邮编: 100009; 电话: 010-64002844; E-mail: NERD@gisummit.com.

重症急性胰腺炎肺损伤内皮素的变化及丹参的治疗作用

黄晓丽, 刘顺英, 王国品, 曾皓明, 杨丽, 王智

黄晓丽, 东南大学临床医学院, 东南大学附属南京江北人民医院消化科 江苏省南京市 210048

刘顺英, 东南大学附属中大医院消化科 江苏省南京市 210009

王国品, 曾皓明, 杨丽, 东南大学附属南京江北人民医院 江苏省南京市 210048

王智, 东南大学临床医学院 江苏省南京市 210009

黄晓丽, 2006年东南大学医学院硕士生, 从事重症胰腺炎诊断和治疗研究。

南京市科技发展项目, No. YKK0465

通讯作者: 刘顺英, 210009, 江苏省南京市丁家桥87号, 东南大学附属中大医院消化科。

电话: 025-83272034

收稿日期: 2005-12-22 接受日期: 2006-02-21

Changes of endothelin levels and therapeutic effects of *Danshen* in lung injury induced by severe acute pancreatitis in rats

Xiao-Li Huang, Shun-Ying Liu, Guo-Pin Wang, Hao-Ming Zeng, Li Yang, Zhi Wang

Xiao-Li Huang, Clinical Medical College of Southeast University; Department of Gastroenterology, Nanjing Jiangbei Municipal People's Hospital, Nanjing 210048, Jiangsu Province, China

Shun-Ying Liu, Department of Gastroenterology, the Affiliated Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China

Guo-Pin Wang, Hao-Ming Zeng, Li Yang, Nanjing Jiangbei Municipal People's Hospital, Nanjing 210048, Jiangsu Province, China

Zhi Wang, Clinical Medical College of Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China

Supported by Nanjing Science and Technology Development Program, No. YKK0465

Correspondence to: Department of Gastroenterology, the Affiliated Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China

Received: 2005-12-22 Accepted: 2006-02-21

Abstract

AIM: To explore the changes of endothelin (ET) levels, in serum and lung, and the therapeutic effects of labiatae on severe acute pancreatitis (SAP) with lung injury in rats.

METHODS: A total of 60 Wistar rats were randomized into sham operation group (J), model group (F), and *Danshen* treatment group (D). The model of SAP was established by retrograde injection of 50 g/L sodium taurocholate into the

pancreatic and biliary duct. The rats in group D were intraperitoneally injected with *Danshen* (5 mL/kg) 1 d before and 10 min after modeling. The levels of serum and pulmonary endothelin-1 were evaluated 24 and 48 h after modeling. Meanwhile, the changes of pulmonary histopathology and lung index were observed.

RESULTS: In comparison with those in group J, the pulmonary histopathological changes in group F were significantly aggravated, and the level of serum endothelin-1 and lung index were increased markedly 24 and 48 h after modeling (endothelin-1: 75.8 ± 4.8 , 70.4 ± 4.8 ng/L vs 32.0 ± 6.9 , 30.3 ± 4.8 ng/L, $P < 0.01$; lung index: 0.62 ± 0.06 , 0.73 ± 0.07 vs 0.41 ± 0.08 , 0.41 ± 0.07 , $P < 0.01$). Meanwhile, the expression of pulmonary endothelin-1 (using optical density) was elevated (F group: 0.48 ± 0.09 , 0.61 ± 0.10 ; J group: 0.05 ± 0.01 , 0.05 ± 0.01 , $P < 0.01$; for 24 and 48 h respectively). Compared with those in group F, the pulmonary pathological changes in group D were notably alleviated, and the levels of serum endothelin-1 and lung index were notably dropped 24 and 48 h after modeling (60.2 ± 7.3 ng/L, 0.52 ± 0.06 , $P < 0.05$; 57.9 ± 5.4 ng/L, 0.58 ± 0.06 , $P < 0.01$), and the expression of pulmonary endothelin-1 was also decreased significantly (0.23 ± 0.10 , 0.36 ± 0.09 , for 24 and 48 h, respectively, $P < 0.01$ vs group F). The expression of pulmonary endothelin-1 was correlated with the lung index both at 24 and 48 h ($r = 0.736$, $P < 0.01$; $r = 0.828$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Endothelin-1 plays an important role in lung injury induced by SAP. *Danshen* can protect lung tissues from such injury.

Key Words: Severe acute pancreatitis; Lung injury; Endothelin; *Danshen*

Huang XL, Liu SY, Wang GP, Zeng HM, Yang L, Wang Z. Changes of endothelin levels and therapeutic effects of *Danshen* in lung injury induced by severe acute pancreatitis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(9):853-857

摘要

目的: 探讨重症急性胰腺炎(SAP)肺损伤时血

■背景资料

SAP常伴有除多脏器功能的损害, 其中肺损伤是最常见和最严重的并发症之一。ET是由内皮细胞合成和释放的生物活性肽, 它是胰腺炎急性炎症反应的重要介质, 同时ET也与许多肺部疾病的发生、发展具有密切关系, 而丹参具有活血化淤、抑制氧自由基、解除血小板聚集、调节脂质炎症介质的代谢等作用。

■研究前沿

急性肺损伤是SAP早期最常见和最严重的并发症之一,故有人认为其可以作为临床评价SAP严重程度的标准之一。因此,对于ALI的发病机制、诊断和治疗已经成为SAP研究中的一重要课题。

清和肺组织内皮素(ET)变化及丹参的保护作用。

方法: Wistar大鼠60只,随机分为假手术组(J组)、模型组(F组)和丹参治疗组(D组)。50 g/L牛磺胆酸钠胰胆管逆行注射方法制作SAP模型。D组大鼠分别在造模前1 d和造模后10 min ip丹参注射液(5 mL/kg)。各组在制模后24 h及48 h测定血清ET-1水平及其在肺组织(光密度)表达情况,同时观察肺系数变化及肺组织病理学改变。

结果: 与J组比较, F组24和48 h肺组织损伤明显加重, 血清ET-1水平(F组: 75.8 ± 4.8 , 70.4 ± 4.8 ng/L; J组: 32.0 ± 6.9 , 30.3 ± 4.8 ng/L)和肺系数显著增高(F组: 0.62 ± 0.06 , 0.73 ± 0.07 ; J组: 0.41 ± 0.08 , 0.41 ± 0.07)($P < 0.01$), 肺组织24和48 h ET-1表达增高(F组: 0.48 ± 0.09 , 0.61 ± 0.10 ; J组: 0.05 ± 0.01 , 0.05 ± 0.01)($P < 0.01$)。与F组比较, D组24和48 h肺组织学损伤明显减轻, 血清ET-1水平和肺系数明显下降(60.2 ± 7.3 ng/L, 0.52 ± 0.06 , $P < 0.05$; 57.9 ± 5.43 ng/L, 0.58 ± 0.06 , $P < 0.01$), 肺组织ET-1表达明显减少(0.23 ± 0.10 , 0.36 ± 0.09 , $P < 0.01$)。相关性分析显示, 造模后24和48 h肺组织ET-1表达与肺系数密切相关($r = 0.736$, $P < 0.01$; $r = 0.828$, $P < 0.01$)。

结论: ET-1在SAP肺损伤中起着重要的作用, 丹参对SAP肺损伤具有保护作用。

关键词: 胰腺炎; 肺损伤; 内皮素; 丹参

黄晓丽, 刘顺英, 王国品, 曾皓明, 杨丽, 王智. 重症急性胰腺炎肺损伤内皮素的变化及丹参的治疗作用. 世界华人消化杂志 2006;14(9):853-857

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/853.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)常伴有胰外多脏器的损害, 其中肺损伤是最常见和最严重的并发症之一, 且多在SAP的早期出现^[1]。SAP发病2 wk内死亡者, 约50%以上是由于并发肺损伤所致^[2]。SAP时的微循环障碍是胰腺及肺、肾等胰外器官损害的重要原因之一。内皮素(endothelin, ET)及其受体对肺通气和肺循环起着重要的调节作用, 其合成、分泌和代谢的异常与许多肺部疾病的发生、发展具有密切关系^[3]。我们旨在观察SAP大鼠血清和肺组织ET的变化及其与肺损伤的相关性, 同时探讨丹参的保护机制。

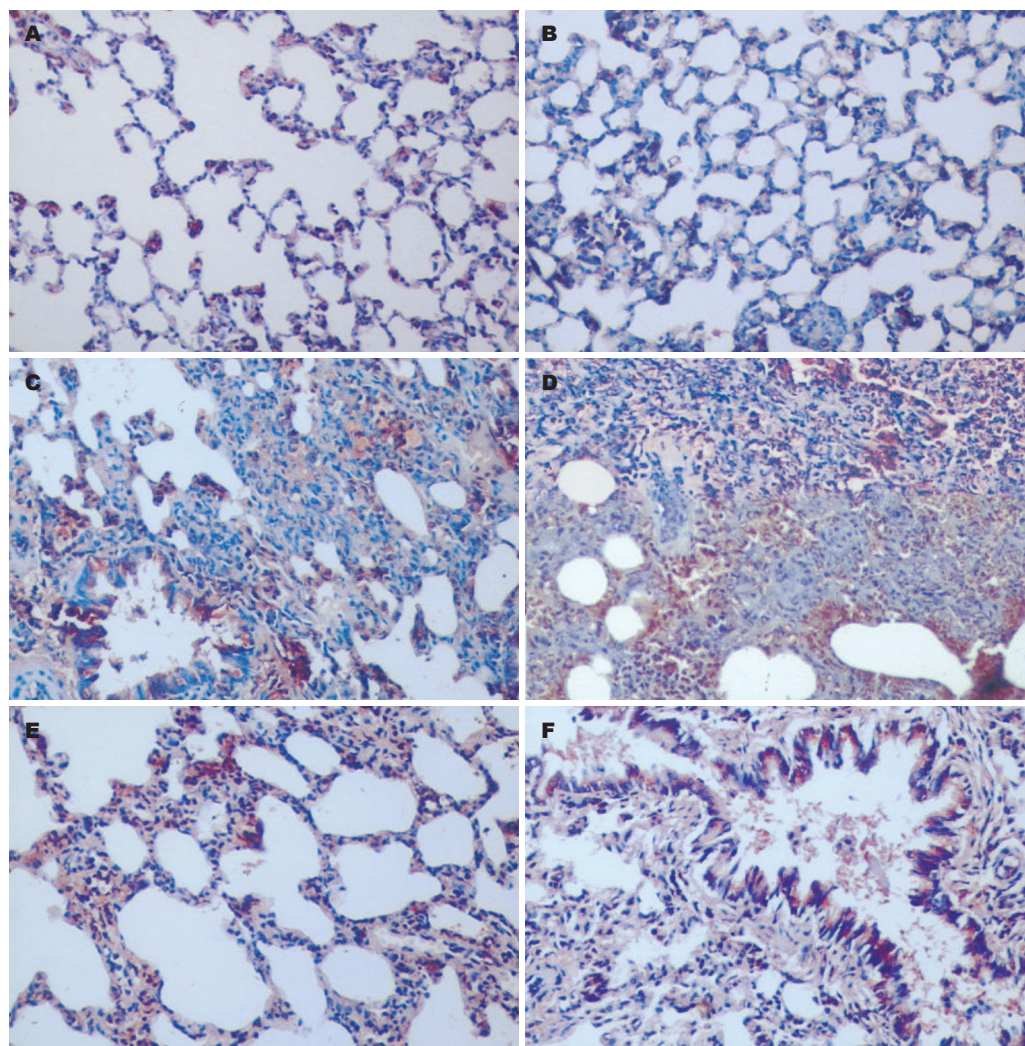
1 材料和方法

1.1 材料 成年健康Wistar δ 大鼠60只, 体质量200-300 g, 购自南京安立默科技有限公司。牛磺胆酸钠购自美国Sigma公司; 戊巴比妥钠购自中国医药上海化学试剂公司; 丹参注射液为四川升和制药有限公司产品; 内皮素ELISA试剂盒由美国DR lab提供; SP-9000免疫组化染色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司; ET-1一抗购自北京博奥森生物技术有限公司。CliniBio 128C酶标仪; 澳大利亚ASYS Hitech GmbH。

1.2 方法 将大鼠随机分为3组: 急性重症胰腺炎假手术组(J组)、模型组(F)、丹参治疗组(D)。各组又按模型制备后24 h, 48 h分为2组, 每组10只。大鼠术前禁食12 h, 不禁水, 按体质量腹腔内注射30 g/L戊巴比妥钠溶液(40 mg/kg), 麻醉生效后, 上腹正中切口, 寻找到十二指肠及胰胆管, 用小动脉夹阻断胰胆管近肝门端及近肠端, 以4.5号针头逆行穿刺入胰胆管, 注入50 g/L牛磺胆酸钠溶液, 剂量1.5 mL/kg, 注毕5 min后去除小动脉夹, 观察到出现胰腺水肿伴出血后缝合腹壁。J组仅作剖腹及轻轻翻动十二指肠和胰腺。D组在造模前1 d及造模后10 min内分别ip丹参注射液, 剂量5 mL/kg, 余两组ip等容积生理盐水。各组大鼠均在麻醉前5 min计算呼吸频率, 并在手术清醒后每30 min计算一次呼吸频率, 连续观察6 h, 同时观察临床变化。大鼠处死后取肺和胰腺组织, 40 g/L福尔马林溶液固定, 取胰头部及右下肺组织常规脱水石蜡包埋, 4-6 μ m切片, HE染色, 光镜观察胰腺和肺组织充血、水肿、出血、坏死、炎细胞浸润情况。模型成功后在规定时间内相点, 取大鼠股动脉血2 mL, 离心取上清, -20℃低温保存, 采用ELISA方法检测血清ET-1水平, 参照ELISA试剂盒说明书操作。

肺系数计算: 肺湿质量(g)/大鼠质量(g) \times 100。肺组织ET-1免疫组化染色: 取各组大鼠肺石蜡切片, 常规S-P法免疫组化染色, 按SP-9000免疫组化染色试剂盒说明书操作, 工作浓度1: 200, PBS代替一抗为空白对照。结果判断: 细胞染色为棕黄色, 定位于胞质。着色强度: (-)为未着色, (+)为浅黄色, (++)为黄色, (+++)为棕黄色。大鼠肺组织ET-1免疫染色切片(每组5张切片), 并用图像分析软件计算每张切片中5个肺小血管壁及5个细支气管壁的ET-1平均A值。

统计学处理 所有数据均以mean \pm SD来表示, 采用单因素方差分析和 q 检验, 肺组织A值与肺系数采用Pearson相关分析, 以 $P < 0.05$ 为差异



■ 创新盘点

本文分别观察了造模成功后24 h和48 h ET在血液和肺组织中的表达与肺损伤的关系, 而其他文章多数报道造模24 h内一些炎性介质的变化, 未见用免疫组化法检测ET在SAP相关肺损伤的肺组织中表达的类似报道。

图1 SAP大鼠肺组织ET-1表达(SP×200)。A: J 24 h; B: J 48 h; C: F 24 h; D: F 48 h; E: D 24 h; F: D 48 h。

显著性。采用SPSS 11.5软件包进行统计学处理。

2 结果

各组大鼠在实验前呼吸平稳, 呼吸频率(RR)为40-50次/min, F组制模后呼吸立即加快, RR为90-100次/min, 显著高于术前, 伴有呼吸窘迫, 口唇紫绀; D组动物术后呼吸困难渐减轻, RR为70-90次/min; J组动物术后呼吸稍快, 为60-70次/min。

2.1 胰脏组织病理改变 胰腺组织: J组胰腺组织正常; F组大鼠的胰腺腺泡细胞坏死融合成大片状, 叶间隔、小叶间隔及腺泡间隔显著增宽, 炎症细胞浸润明显, 微血管充血伴血栓形成并可见红细胞渗透至间质; D组上述病变程度减轻; F和D组中24 h组均较48 h组病变程度轻。肺组织: J组肺组织正常; F组大鼠的肺内及支气管周围大量炎细胞浸润、间质充血、水肿、出血, 肺泡壁完整性破坏; D组上述病变程度减轻; F和D组中24 h组均较48 h组病变程度轻(图1-2)。

2.2 血清ET-1水平 F组各时点血清ET-1水平显著高于D和J组($P<0.01$), D组明显高于J组($P<0.01$), F组中制模后24 h组的血清ET-1水平稍高于制模后48 h组, 但差异无显著性(表1)。

2.3 肺系数和肺组织ET-1表达 F组各时点肺系数明显高于J组和D组($P<0.01$), D组明显高于J组($P<0.01$), 且F组中制模后48 h组的肺系数较24 h组明显升高($P<0.05$, 表1)。ET-1主要在支气管黏膜细胞, 血管浆液细胞、肺泡II细胞的胞质表达, 阳性细胞表现为棕黄色颗粒物。F组ET-1免疫组化呈强阳性表达(+++), D组呈阳性表达(+~++), J组呈阴性至弱阳性表达(-~+)(图1)。F组各时点的A值显著高于D和J组($P<0.01$), D组显著高于J组($P<0.01$), F组中制模后48 h组高于24 h组, 但差异无统计学意义(表1)。

2.4 相关性分析结果 制模后24 h肺组织免疫组化A值与肺系数密切相关($r = 0.736$, $P<0.01$); 制模后48 h肺组织免疫组化A值与肺系数密切相关($r = 0.828$, $P<0.01$)。

■应用要点

本文不是临床研究,虽然丹参在实验中的作用被证实,但临床应用的确切作用尚不能确立,因此临床意义有限。

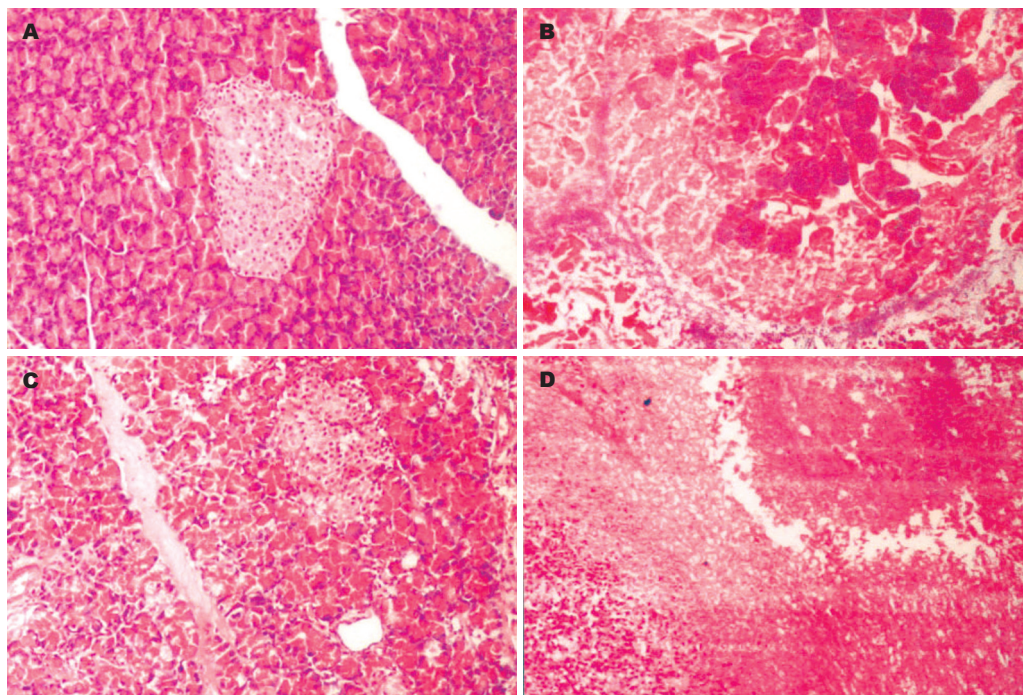


图2 SAP大鼠胰腺组织HE染色(SP×200)。A: J 24 h; B: F 24 h; C: D 24 h; D: F 48 h。

表1 SAP大鼠血清ET-1水平、肺系数和肺组织ET-1 A值比较(mean±SD, n=10)

分组	血清ET-1 (ng/L)		肺系数		肺组织ET-1 A值	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
假手术组(J)	32.00±6.86	30.30±4.83	0.41±0.08	0.41±0.07	0.05±0.01	0.05±0.01
模型组(F)	75.80±4.76 ^a	70.40±4.77 ^a	0.62±0.06 ^a	0.73±0.07 ^{ab}	0.49±0.09 ^a	0.61±0.10 ^a
治疗组(D)	60.20±7.29 ^{ad}	57.90±5.43 ^{ad}	0.52±0.06 ^{ac}	0.58±0.06 ^{bd}	0.26±0.10 ^{ad}	0.36±0.09 ^{ad}

^aP<0.01, ^bP<0.05 vs J组; ^cP<0.05, ^dP<0.01 vs F组; ^eP<0.05 vs F 24 h组。

3 讨论

ET为内皮细胞分泌释放的一种具多种活性功能的血管活性多肽,他是迄今认为在体内作用最强、持续时间最久的缩血管物质。肺脏是体内ET含量最丰富的器官^[4],ET在肺内广泛分布于肺血管、呼吸道上皮、黏膜腺体和拟交感神经节。肺既是ET作用的靶器官,又是ET合成、分泌、代谢的重要场所^[5],肺内主要产生ET-1,亦有少量的ET-3。ET-1具有强烈的缩血管和促进气管、支气管平滑肌收缩的功能^[6]。

本实验应用Aho *et al*^[7]牛磺胆酸钠胰胆管逆行注射方法成功复制了SAP模型,病理标本可见胰腺及肺组织充血、水肿,光镜下胰腺腺泡和肺组织均有不同程度坏死、出血、间质水肿、炎细胞浸润,符合胰腺炎相关性肺损伤病理改变。本实验结果表明:大鼠造模后24 h血清ET-1水平增高,且在肺组织中高表达,随着时间的延

长,肺组织损伤加重,ET-1在肺组织中表达更明显,但血清ET-1的浓度反而有所下降,原因可能为:由于肺损伤的加重,肺组织破坏增加,肺组织中ET-1代谢减慢,而其合成和释放入血液的ET-1减少。ET-1的这种变化提示我们,ET-1可能主要在SAP肺损伤的早期起作用。另外,相关性分析也显示,在不同的时间点肺组织ET-1的A值与肺系数呈密切正相关,间接提示肺内ET-1水平与肺水肿程度密切相关。这与陈晓玲 *et al*^[8]有关肺组织ET-1含量与急性肺损伤病变的程度呈正相关的报道一致。SAP时由于肠道细菌移位出现内毒素血症,而内毒素又是ET-1合成与释放的强烈刺激因素,使血清和肺内ET-1升高。ET的过度生成可造成血液循环障碍^[9],降低胰血流,引起胰腺局部缺血坏死^[10-11],并可引起肺血管的强烈收缩,导致肺动脉高压和肺水肿。同时,ET可导致气管、支气管和细支气管的持续收缩,

加重缺氧, 从而导致肺组织进一步损伤. ET还可通过引起细胞外钙内流及动员细胞内钙库, 导致细胞内钙超载^[12], 进而促发炎症细胞的呼吸爆破、释放氧自由基等, 促进介质损伤胰腺和肺泡细胞.

本实验发现丹参治疗组胰腺和肺病理改变均较模型组轻, 大鼠临床症状减轻, 肺系数也有所下降, 提示丹参对胰腺坏死及肺损伤具有一定的保护作用. 丹参具有活血化淤、抑制氧自由基、解除血小板聚集、调节脂质炎症介质的代谢等作用, 并能阻止细胞外钙内流, 而使细胞内游离钙浓度维持在生理许可范围内. 已有一些实验证明, 丹参通过以上作用减轻胰腺损害^[13-16]. 本实验还发现丹参治疗组血清ET-1水平及其在肺组织的表达均较模型组降低, 提示丹参还能降低血和肺组织ET-1水平. ET-1具有收缩肺血管的作用, 其水平的降低可使肺血管舒张, 改善肺组织血流, 同时可改善气管、支气管和细支气管的持续收缩, 缓解肺组织缺氧使损伤减轻. 总之, 丹参在SAP发病早期应用, 对其并发的肺脏损伤具有一定抑制作用.

4 参考文献

- 1 王祥瑞, 杭燕南主编. 急性肺损伤-基础与临床. 第1版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2005: 211-217
- 2 Steer ML. Relationship between pancreatitis and lung diseases. *Respir Physiol* 2001; 128: 13-16
- 3 杨新良, 周文波, 富维骏. 内皮素在肺部的作用及其研究进展. 国外医学呼吸系统分册 1998; 18: 104-107
- 4 Matsumoto H, Suzuki N, Onda H, Fujino M. Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 164: 74-80
- 5 Michel RP, Langleben D, Dupuis J. The endothelin system in pulmonary hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 2003; 81: 542-554
- 6 Franco-Cereceda A, Matran R, Lou YP, Lundberg JM. Occurrence and effects of endothelin in guinea-pig cardiopulmonary tissue. *Acta Physiol Scand* 1990; 138: 539-547
- 7 Aho HJ, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Ultrastructure of sodium taurocholate-induced pancreatic lesions. *Scand J Gastroenterol* 1980; 15: 417-424
- 8 陈晓玲, 梁延杰, 杨毅. 急性肺损伤的内皮素-1免疫组化改变及其在发病中的作用. 中华外科杂志 1997; 35: 251-253
- 9 Hunley TE, Kon V. Update on endothelins-biology and clinical implications. *Pediatr Nephrol* 2001; 16: 752-762
- 10 Foitzik T, Eibl G, Hotz B, Hotz H, Kahrau S, Kasten C, Schneider P, Buhr HJ. Persistent multiple organ microcirculatory disorders in severe acute pancreatitis: experimental findings and clinical implications. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 130-138
- 11 Eibl G, Hotz HG, Faulhaber J, Kirchengast M, Buhr HJ, Foitzik T. Effect of endothelin and endothelin receptor blockade on capillary permeability in experimental pancreatitis. *Gut* 2000; 46: 390-394
- 12 Gandhi CR, Berkowitz DE, Watkins WD. Endothelins. *Biochemistry and pathophysiologic actions. Anesthesiology* 1994; 80: 892-905
- 13 赵晓晏, 夏时海, 郭萍, 周渝. 丹参治疗重症急性胰腺炎的血流变学及其相关指标的实验研究. 微循环学杂志 2001; 11: 31-34
- 14 张铁, 陈铁良. 丹参对急性胰腺炎大鼠氧自由基水平的影响. 中国中西医结合外科杂志 2004; 10: 34-36
- 15 李雷, 王桂敏, 蒋俊明, 夏庆, 黄宗文, 陈光远. 丹参对重症急性胰腺炎早期多器官组织脂质过氧化的影响. 中国中西医结合消化杂志 2005; 13: 1-3
- 16 余晓兵, 陈玉石. 丹参治疗急性坏死性胰腺炎的实验研究. 中华医院感染学杂志 2004; 14: 174-176

■同行评价

内皮素是急性炎症反应的重要介质, 也是SAP合并肺损伤的介质. 本文实验研究SAP大鼠模型的内皮素改变与肺损伤的关系以及丹参的治疗作用及机制, 是当前研究的热点, 有一定意义.

电编 张敏 编辑 潘伯荣

轮状病毒NSP4基因在非复制型腺病毒载体中的表达及免疫活性

王大燕, 王健伟, 王彦斌, 魏强, 屈建国, 洪涛

■背景资料

轮状病毒感染是腹泻住院的主要原因之一, 而预防接种是控制全世界婴幼儿轮状病毒腹泻最有效的手段, 故WHO将轮状病毒疫苗作为优先开发的疫苗项目之一。轮状病毒腹泻对世界各国、地区和家庭的卫生保健带来相当大的影响, 发展安全、有效, 可用于世界各地儿童的轮状病毒疫苗迫在眉睫。

王大燕, 王健伟, 王彦斌, 魏强, 屈建国, 洪涛, 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所 北京市 100052

王大燕, 博士, 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所助理研究员, 主要从事分子病毒学研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30000145, 30370066

国家863计划资助项目, No. 2003AA215071

通讯作者: 王健伟, 100052, 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 现在北京东单三条9号, 中国医学科学院病原生物学研究所. wangjw28@vip.sina.com

电话: 010-63511368

收稿日期: 2006-02-07 接受日期: 2006-02-13

Generation and immunogenicity of a recombinant replication-incompetent adenovirus expressing human rotavirus NSP4 protein

Da-Yan Wang, Jian-Wei Wang, Yan-Bin Wang, Qiang Wei, Jian-Guo Qu, Tao Hong

Da-Yan Wang, Jian-Wei Wang, Yan-Bin Wang, Qiang Wei, Jian-Guo Qu, Tao Hong, Institute for Viral Disease Control and Prevention, China CDC, Beijing 100052, China Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30000145, 30370066 and the Foundation of National 863 Project, No. 2003AA215071

Correspondence to: Dr. Jian-Wei Wang, Institute for Viral Disease Control and Prevention, China CDC, Beijing 100052, China. wangjw28@vip.sina.com

Received: 2006-02-07 Accepted: 2006-02-13

Abstract

AIM: To investigate the efficacy of passive protection induced by the recombinant adenovirus bearing human rotavirus NSP4 gene and to explore the clues for novel rotavirus vaccine development.

METHODS: Human rotavirus NSP4 protein was expressed in a recombinant adenovirus. AdEasy system was recruited to facilitate the preparation and the NSP4 gene was inserted into the early 1 region of the vector by homologous recombination in *E.coli*. The expression of NSP4 was confirmed by Western blotting. The resultant recombinant adenovirus rvAdEasyNSP4 was in-

duced to mice by intranasal (i.n.) immunization. Specific IgG and IgA antibodies were detected in the murine serum. Murine pups born to the rvAdEasyNSP4 immunized dams were challenged with simian rotavirus SA11 strain orally 4 d after birth, and the induced diarrhea was graded.

RESULTS: The recombinant adenovirus rvAdEasyNSP4 showed typical morphology under electron microscope. The transcription of NSP4 specific mRNA by rvAdEasyNSP4 was confirmed with RT-PCR in infected 293 cells, and the expression of the NSP4 protein was verified by Western blotting. After immunization for three times, the positive rates of serum IgG antibody were 28.5%, 85.7% and 100%, respectively, while after the first immunization, the titer of serum IgG reached 1 : 1 000. After immunization, the positive rate of IgA antibody reached the level of 71.4%. Moderate protection was achieved after simian rotavirus SA11 strain challenged in murine pups.

CONCLUSION: NSP4 protein of human rotavirus strain can be expressed by a recombinant adenovirus vector and trigger effective immune response in mice, laying a solid foundation for the development of novel rotavirus genetic engineering vaccine.

Key Words: Rotavirus; NSP4; Adenovirus vector; Immunization

Wang DY, Wang JW, Wang YB, Wei Q, Qu JG, Hong T. Generation and immunogenicity of a recombinant replication-incompetent adenovirus expressing human rotavirus NSP4 protein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(9):858-862

摘要

目的: 研究以非复制型重组腺病毒表达人轮状病毒NSP4基因作为新型轮状病毒基因疫苗的可行性。

方法: 用AdEasy系统构建表达NSP4蛋白的

重组腺病毒, 并通过形态学观察、PCR、RT-PCR、Southern blot和Western blot等对重组腺病毒进行鉴定. 通过滴鼻途径免疫早小鼠, 对免疫后母鼠生产的乳鼠(4日龄)用SA11株轮状病毒灌胃攻击, 观察腹泻的产生情况并进行腹泻评级.

结果: 获得了重组腺病毒rvAdEasyNSP4. Southern blot表明, 在重组腺病毒中确有特异性的NSP4基因整合, Western blot证明, 目的蛋白得到表达. 初次免疫小鼠后血清IgG抗体的滴度可达1:1 000, 但阳转率仅为28.5%; 再次免疫后, 血清抗体阳转率达到了85.7%; 第3次免疫后, 血清抗体阳转率达到100%. 血清IgA阳转率可以达到71.4%. 实验组乳鼠攻毒后腹泻的百分率和腹泻评分(反应腹泻严重程度)均较对照组低.

结论: 腺病毒载体可有效表达轮状病毒非结构蛋白NSP4并可有效诱导小鼠免疫反应, 这些结果的取得为新型轮状病毒疫苗的研制提供了依据.

关键词: 轮状病毒; NSP4; 腺病毒载体; 免疫

王大燕, 王伟伟, 王彦斌, 魏强, 屈建国, 洪涛. 轮状病毒NSP4基因在非复制型腺病毒载体中的表达及免疫活性. 世界华人消化杂志 2006;14(9):858-862
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/858.asp>

0 引言

早在1980年代初, 人们就开始研制一些轮状病毒口服活疫苗, 用于预防儿童严重脱水性腹泻及其导致的死亡. 其中猴-人轮状病毒四价重配株口服活疫苗RotaShield于1998年在美国被批准作为计划免疫疫苗, 但是由于怀疑与肠套叠发病有关而于次年退出市场^[1]. 在意外地发现RotaShield与肠套叠有关后, 口服活疫苗就在公众心中蒙上了阴影. 与口服疫苗不同, 肠道外轮状病毒疫苗、非复制型重组疫苗等可能不会涉及到肠套叠问题. 轮状病毒非结构蛋白NSP4(nonstructural protein 4)因其在轮状病毒的形态发生和致病性中发挥重要作用^[2-3], 近来备受瞩目. 我们以非复制型重组腺病毒表达NSP4基因, 并以滴鼻途径免疫动物, 初步探讨其作为新型轮状病毒基因疫苗的可行性.

1 材料和方法

1.1 材料 含有NSP4基因的克隆质粒pGEM-

11zf-NSP4为本课题组构建. 腺病毒骨架质粒载体pAdEasy-1, 穿梭载体pShuttle-CMV质粒及*E.coli* BJ5183均由美国Johns Hopkins大学TC He博士惠赠; 腺病毒E1区转化的人胚肾细胞293购自美国ATCC. 用*Sal* I 和*Not* I 双酶切pGEM-11zf-NSP4质粒, 回收NSP4片段, 克隆入pShuttle-CMV载体, 得到重组穿梭质粒pShuttle-CMV-NSP4. 用*Pme* I 单酶切线性化pShuttle-CMV-NSP4, 与腺病毒骨架质粒pAdEasy-1共同电转化*E.coli* BJ5183, 再将所得的重组腺病毒质粒pAdEasy-1-NSP4转化宿主菌DH10B(rec A1, end A1), 挑取目的克隆, 提取质粒用*Pac* I 酶切线性化后, 使用Lipofectamine 2000(GIBCO)转染293细胞, 将获得的重组腺病毒命名为rvAdEasyNSP4. 用293细胞常规培养重组腺病毒, 待细胞病变完全后, 反复冻融3次, 离心后取病毒液上清少许, 经磷钨酸负染后在透射电子显微镜下观察病毒形态. 用PCR扩增鉴定目的基因片段. Southern blot: 采用Roche公司探针标记与杂交试剂盒, 按说明书进行操作. 使用野生型Ad5作为阴性对照. RT-PCR检测目的基因的转录, 按照试剂盒说明进行. Western blot分析目的蛋白表达, 方法参照分子克隆实验室手册^[4].

1.2 方法 将6-8周龄♀Balb/c纯系小鼠随机分组, 接种前, 通过小鼠尾部采取基础血进行轮状病毒和NSP4抗体检测. 鼻腔接种时, 先用乙醚麻醉小鼠, 然后将100 μ L(2×10^8 IFU)的重组腺病毒滴入小鼠鼻腔. 分别于免疫后4 wk和8 wk, 再次经尾部采血, 并用与初次免疫时等量的病毒加强免疫, 对照组接种等量的野生型5型腺病毒, 其他处理完全相同. 按常规方法用间接ELISA法测定小鼠血清标本中抗NSP4的特异性IgG抗体, 用0.05 mol/L碳酸盐缓冲液(pH 9.6)稀释纯化的GST-NSP4_r蛋白^[5]包被96孔酶标板(Costar), 二抗为辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠IgG(Santa Cruz Biotechnology). 用间接ELISA法检测小鼠血清中特异性抗NSP4 IgA抗体, 二抗为HRP标记的抗鼠IgA抗体(Sigma-Aldrich). 乳鼠攻毒试验: 将小鼠免疫3次后与♂小鼠(轮状病毒抗体阴性)合笼, 使其怀孕, 对生产的乳鼠(4日龄)用SA11株轮状病毒灌胃(10DD₅₀), 观察腹泻的产生情况并进行腹泻评级, 方法参见文献^[6].

2 结果

将穿梭载体pShuttle-CMV和pGEM-11zf-NSP4质粒分别用*Sal* I 和*Not* I 酶切、回收、连接后,

■ 研发前沿

目前发展的轮状病毒疫苗主要有两大类: 口服轮状病毒活疫苗和非复制性疫苗. 口服轮状病毒活疫苗模拟自然轮状病毒感染保护作用, 包括单价疫苗和重配疫苗. 非复制型疫苗有其理论上的优点, 即不需要人工减毒, 没有回复突变的危险等.

■同行评价

本研究立意依据充分,起点高,方法先进,条理性强,对防治轮状病毒具有重要的临床意义。

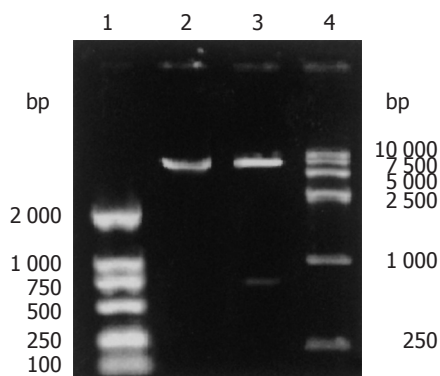


图1 NSP4重组腺病毒穿梭载体酶切鉴定结果. 1: DNA Markers; 2: pShuttle-CMV经*Sal* I and *Not* I 酶切; 3: pShuttle-CMV-NSP4经*Sal* I and *Not* I 酶切; 4: DNA Markers.

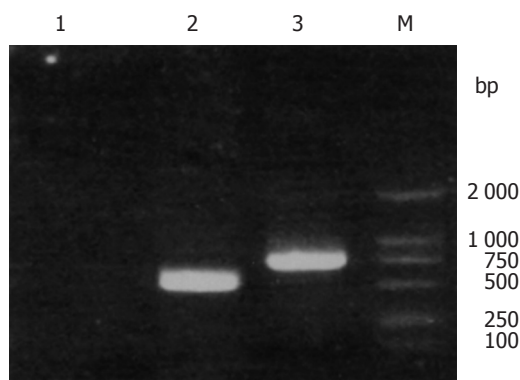


图2 重组腺病毒基因组中NSP4基因的PCR检测. 1: Ad5; 2: rvAdEasyNSP4(编码区); 3: rvAdEasyNSP4(全长); M: DNA Markers.



图3 重组腺病毒rvAdEasyNSP4中特异性NSP4基因片段的Southern blot检测. 1: Ad5/*Bam* H I 阴性对照; 2: rvAdEasyNSP4/*Bam* H I.

得到pShuttle-CMV-NSP4(图1). 293细胞经反复冻融释放出重组腺病毒, 经磷酸钨负染, 在透射电镜下可见病毒典型二十面体结构, 直径约为70 nm, 具有典型的腺病毒形态. 分别用NSP4全长引物和编码区引物, 对获得的重组腺病毒进行PCR扩增, 可以检测到全长750 bp和编码区525 bp的特异性扩增条带(图2). Southern blot分析: 提取第10代重组腺病毒的DNA, 经*Bam* H I

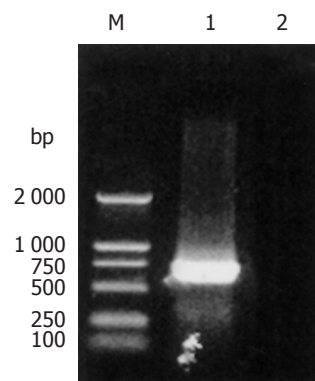


图4 重组腺病毒中NSP4基因转录的检测. M: DNA Markers; 1: rAdEasyNSP4; 2: 阴性对照.

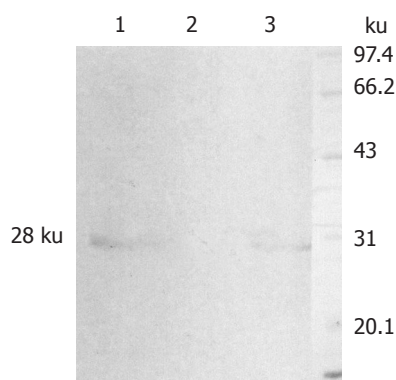


图5 NSP4表达产物的Western blot分析. 1: rAdEasyNSP4(沉淀); 2: 野生型Ad5; 3: rAdEasyNSP4(上清液).

酶切、凝胶电泳、转膜后, 与针对NSP4的特异性探针进行杂交反应, 结果表明在重组腺病毒中确有特异性的RV NSP4基因稳定整合. 图3为重组腺病毒rvAdEasyNSP4的*Bam* H I 酶切产物与NSP4探针杂交的结果. 实验中使用了野生型Ad5作为阴性对照.

2.1 NSP4在重组腺病毒中的表达 经RT-PCR获得的目的片段与预计的大小一致(图4). 分别用rvAdEasyNSP4、Ad5野毒株感染293细胞48 h后, 收获细胞, 行SDS-PAGE, 转膜后用山羊抗NSP4多克隆抗体进行Western blot以检测表达产物, 可见上清和沉淀在30 ku附近均检测到特异的条带(图5), 而Ad5对照则无特异条带产生.

2.2 诱发NSP4特异性抗体 以野生型腺病毒免疫后的小鼠血清为阴性对照. 初次免疫后血清抗体的滴度可达1:1 000, 但是阳转率仅为28.5%; 再次免疫后, 最高血清抗体滴度仍为1:1 000, 但是血清抗体阳转率有了较大幅度的提高, 达到了85.7%; 第三次免疫后, 血清抗体阳转率达到100%. 除了血清中的IgG外, 我们还对免疫后

小鼠血清中IgA的产生情况进行了分析, 在第3次加强免疫后, 血清IgA的滴度为1:50-1:100, 阳转率可以达到71.4%.

2.3 对SA11株轮状病毒的免疫保护作用 重组腺病毒免疫小鼠后能产生针对SA11株轮状病毒的免疫保护作用, 用SA11攻击后, 重组腺病毒免疫组腹泻的百分率和腹泻评分(反应腹泻严重程度)均较对照组低(图6).

3 讨论

预防接种是控制全世界婴幼儿轮状病毒腹泻最有效的手段, WHO将轮状病毒疫苗作为优先开发的疫苗项目之一. RV腹泻具有的较高发病率和死亡率造成的巨大的疾病负担^[7-9], 对世界各国、地区和家庭的卫生保健带来相当大的影响, 发展安全、有效, 可用于世界各地儿童的轮状病毒疫苗迫在眉睫^[10]. 轮状病毒非结构蛋白NSP4有可能成为轮状病毒疫苗的候选基因, 是因为: (1)非结构蛋白NSP4较外壳结构蛋白保守^[11], 因此可能产生较好的交叉免疫保护作用, 有助于解决轮状病毒的高变异问题; (2)NSP4在病毒复制过程中发挥关键作用^[12], 因而针对NSP4的免疫反应有可能在病毒复制的早期阶段便可发挥作用; (3)NSP4在轮状病毒致病中发挥重要作用^[13-16], 是目前发现的唯一与轮状病毒腹泻发生直接相关的轮状病毒蛋白, 抗轮状病毒腹泻研究自然要考虑NSP4的作用; (4)已有的研究表明, 轮状病毒自然感染后有针对NSP4蛋白的免疫反应^[17], 在血清中可以检测到低滴度的抗NSP4抗体. 对NSP4作为轮状病毒疫苗候选基因的研究工作不仅将为新型RV疫苗的研制提供理论依据, 而且对于其他病毒疫苗的研究也有借鉴作用.

由于腺病毒载体在哺乳动物及多种细胞上进行基因转移和蛋白表达的高效性, 使其在基因疫苗、基因治疗及蛋白功能等的研究中受到人们的青睐, 成为当今使用最多的病毒载体之一^[18-21]. 与复制型腺病毒相比, 非复制型腺病毒更为安全, 而且因非复制型腺病毒是以低剂量的方式产生抗原蛋白, 不裂解细胞, 有利于激发长期的免疫反应^[22-26]. 运用AdEasy系统, 我们获得了表达NSP4蛋白的重组腺病毒, 经滴鼻途径免疫动物, 结果表明, 重组腺病毒不仅能诱导高滴度的抗NSP4 IgG抗体, 而且能诱导IgA抗体的产生. 因为已知只有IgG可以通过胎盘, 活化T细胞、IgA等不能通过胎盘, 在重组腺病毒

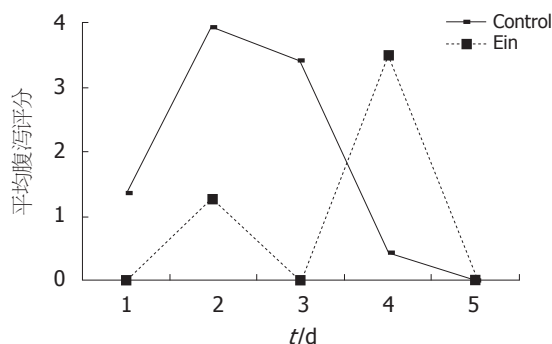


图6 轮状病毒SA11攻击后小鼠的腹泻评分. Control: 对照组; Ein: 实验组.

rvAdEasyNSP4免疫过的母鼠产生免疫反应之后, 其产下的乳鼠对轮状病毒攻击有抵抗作用, 腹泻的百分率和腹泻评分(反应腹泻严重程度)均较对照组低, 这提示抗NSP4的IgG具有保护作用. 但是也可以看出, 经SA11攻毒后, 试验组与对照组腹泻的持续时间并没有区别, 而且尚不能产生完全的免疫保护作用, 不过考虑到小鼠细胞并非人腺病毒的许可细胞, 而且使用的NSP4基因并未进行优化密码子的改造, 本研究取得的结果还是有积极意义的.

4 参考文献

- Murphy TV, Gargiullo PM, Massoudi MS, Nelson DB, Jumaan AO, Okoro CA, Zanardi LR, Setia S, Fair E, LeBaron CW, Wharton M, Livengood JR. Intussusception among infants given an oral rotavirus vaccine. *N Engl J Med* 2001; 344: 564-572
- Silvestri LS, Tortorici MA, Vasquez-Del Carpio R, Patton JT. Rotavirus glycoprotein NSP4 is a modulator of viral transcription in the infected cell. *J Virol* 2005; 79: 15165-15174
- Huang H, Schroeder F, Estes MK, McPherson T, Ball JM. Interaction(s) of rotavirus non-structural protein 4 (NSP4) C-terminal peptides with model membranes. *Biochem J* 2004; 380: 723-733
- Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: a laboratory manual (M). 3rd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998: 254-325
- 王大燕, 王健伟, 魏强, 屈建国, 于修平, 洪涛. 人轮状病毒NSP4蛋白的表达及其致小鼠腹泻作用的初步研究. *中国病毒学* 2003; 18: 217-220
- Horie Y, Nakagomi O, Koshimura Y, Nakagomi T, Suzuki Y, Oka T, Sasaki S, Matsuda Y, Watanabe S. Diarrhea induction by rotavirus NSP4 in the homologous mouse model system. *Virology* 1999; 262: 398-407
- Soriano-Gabarro M, Mrukowicz J, Vesikari T, Verstraeten T. Burden of rotavirus disease in European Union countries. *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25: S7-S11
- Leung AK, Kellner JD, Davies HD. Rotavirus gastroenteritis. *Adv Ther* 2005; 22: 476-487
- Gleizes O, Desselberger U, Tatochenko V, Rodrigo C, Salman N, Mezner Z, Giaquinto C, Grimprel E. Nosocomial rotavirus infection in European

- countries: a review of the epidemiology, severity and economic burden of hospital-acquired rotavirus disease. *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25: S12-S21
- 10 Franco MA, Angel J, Greenberg HB. Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine* 2006; 24: 2718-2731
- 11 Borgan MA, Mori Y, Ito N, Sugiyama M, Minamoto N. Antigenic analysis of nonstructural protein (NSP) 4 of group A avian rotavirus strain PO-13. *Microbiol Immunol* 2003; 47: 661-668
- 12 Mirazimi A, Magnusson KE, Svensson L. A cytoplasmic region of the NSP4 enterotoxin of rotavirus is involved in retention in the endoplasmic reticulum. *J Gen Virol* 2003; 84: 875-883
- 13 Ball JM, Tian P, Zeng CQ, Morris AP, Estes MK. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science* 1996; 272: 101-104
- 14 Browne EP, Bellamy AR, Taylor JA. Membrane-destabilizing activity of rotavirus NSP4 is mediated by a membrane-proximal amphipathic domain. *J Gen Virol* 2000; 81: 1955-1959
- 15 Zhang M, Zeng CQ, Dong Y, Ball JM, Saif LJ, Morris AP, Estes MK. Mutations in rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 are associated with altered virus virulence. *J Virol* 1998; 72: 3666-3672
- 16 Zhang M, Zeng CQ, Morris AP, Estes MK. A functional NSP4 enterotoxin peptide secreted from rotavirus-infected cells. *J Virol* 2000; 74: 11663-11670
- 17 Iosef C, Chang KO, Azevedo MS, Saif LJ. Systemic and intestinal antibody responses to NSP4 enterotoxin of Wa human rotavirus in a gnotobiotic pig model of human rotavirus disease. *J Med Virol* 2002; 68: 119-128
- 18 Majhen D, Ambriovi-Ristov A. Adenoviral vectors-How to use them in cancer gene therapy? *Virus Res* 2006
- 19 Maeda K, West K, Hayasaka D, Ennis FA, Terajima M. Recombinant adenovirus vector vaccine induces stronger cytotoxic T-cell responses than recombinant vaccinia virus vector, plasmid DNA, or a combination of these. *Viral Immunol* 2005; 18: 657-667
- 20 Zhou D, Ertl HC. Therapeutic potential of adenovirus as a vaccine vector for chronic virus infections. *Expert Opin Biol Ther* 2006; 6: 63-72
- 21 Gao W, Soloff AC, Lu X, Montecalvo A, Nguyen DC, Matsuoka Y, Robbins PD, Swayne DE, Donis RO, Katz JM, Barratt-Boyes SM, Gambotto A. Protection of mice and poultry from lethal H5N1 avian influenza virus through adenovirus-based immunization. *J Virol* 2006; 80: 1959-1964
- 22 Holterman L, Vogels R, van der Vlugt R, Sieuwerts M, Grimbergen J, Kaspers J, Geelen E, van der Helm E, Lemckert A, Gillissen G, Verhaagh S, Custers J, Zuijdgeest D, Berkhout B, Bakker M, Quax P, Goudsmit J, Havenga M. Novel replication-incompetent vector derived from adenovirus type 11 (Ad11) for vaccination and gene therapy: low seroprevalence and non-cross-reactivity with Ad5. *J Virol* 2004; 78: 13207-13215
- 23 Chung I, Deisseroth AB. Recombinant adenoviral vector containing tumor-specific L-plastin promoter fused to cytosine deaminase gene as a transcription unit: generation and functional test. *Arch Pharm Res* 2004; 27: 633-639
- 24 Duraiswamy J, Bharadwaj M, Tellam J, Connolly G, Cooper L, Moss D, Thomson S, Yotnda P, Khanna R. Induction of therapeutic T-cell responses to subdominant tumor-associated viral oncogene after immunization with replication-incompetent polypeptide adenovirus vaccine. *Cancer Res* 2004; 64: 1483-1489
- 25 Wolins N, Lozier J, Eggerman TL, Jones E, Aguilar-Cordova E, Vostal JG. Intravenous administration of replication-incompetent adenovirus to rhesus monkeys induces thrombocytopenia by increasing *in vivo* platelet clearance. *Br J Haematol* 2003; 123: 903-905
- 26 Shiver JW, Fu TM, Chen L, Casimiro DR, Davies ME, Evans RK, Zhang ZQ, Simon AJ, Trigona WL, Dubey SA, Huang L, Harris VA, Long RS, Liang X, Handt L, Schleif WA, Zhu L, Freed DC, Persaud NV, Guan L, Punt KS, Tang A, Chen M, Wilson KA, Collins KB, Heidecker GJ, Fernandez VR, Perry HC, Joyce JG, Grimm KM, Cook JC, Keller PM, Kresock DS, Mach H, Troutman RD, Isopi LA, Williams DM, Xu Z, Bohannon KE, Volkin DB, Montefiori DC, Miura A, Krivulka GR, Lifton MA, Kuroda MJ, Schmitz JE, Letvin NL, Caulfield MJ, Bett AJ, Youil R, Kaslow DC, Emini EA. Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature* 2002; 415: 331-335

电编 张敏 编辑 潘伯荣

胃癌证型与肿瘤增殖的关系

施俊, 魏品康, 许玲, 何金, 孙大志

施俊, 魏品康, 许玲, 孙大志, 第二军医大学长征医院中医科
上海市 200003

何金, 第二军医大学长征医院病理科 上海市 200003

施俊, 2005年第二军医大学硕士, 讲师, 主要从事中西医结合消化肿瘤的防治研究。

通讯作者: 魏品康, 200003, 上海市凤阳路415号, 第二军医大学
长征医院中医科. czzyk@smmu.edu.cn

电话: 021-63610109-73188 传真: 021-63520020

收稿日期: 2006-01-15 接受日期: 2006-02-21

Relationship between gastric carcinoma traditional Chinese medicine classifications of syndrome and tumor proliferation

Jun Shi, Pin-Kang Wei, Ling Xu, Jin He, Da-Zhi Sun

Jun Shi, Pin-Kang Wei, Ling Xu, Da-zhi Sun, Department of Traditional Chinese Medicine, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

Jin He, Department of Pathology, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

Correspondence to: Dr. Pin-Kang Wei, Department of Traditional Chinese Medicine, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, 415 Fengyang Road, Shanghai 200003, China. czzyk@smmu.edu.cn

Received: 2006-01-15 Accepted: 2006-02-21

Abstract

AIM: To study the relationship between gastric carcinoma traditional Chinese medicine (TCM) classifications of syndrome and tumor proliferation.

METHODS: Ninety-one patients with gastric carcinoma were assigned into 6 groups according to TCM classification of syndrome criteria before operation. Specimens prepared from operation were detected for Ki67 and Cyclin E protein expression by EnVision method of immunohistochemistry.

RESULTS: The positive rates of Ki67 and Cyclin E expression were 98.90% (90/91) and 72.53% (66/91), respectively, in gastric carcinoma. The expression of Cyclin E protein was correlated with the histological types ($P = 0.0394$) and

distant metastasis ($P = 0.0096$). There was significantly positive relationship between Cyclin E protein expression and distant metastasis in female patients ($P = 0.0193$). The expression of Ki67 protein had significant correlations with gastric carcinoma TCM classifications of syndromes ($P = 0.0377$), but the expression of Cyclin E protein did not ($P = 0.1254$). The expression of Ki67 in the syndrome of "Incoordination between the Liver and Stomach" was significantly higher than that of "Phlegm-damp Coagulation" ($P < 0.05$) or "Deficiency of both Qi and Blood" ($P < 0.01$), and it was more significant in the syndrome of "Stomach-heat and Deficiency of Stomach-yin" than that of "Phlegm-damp Coagulation" ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Cyclin E can be used as an important marker in the judgment of gastric carcinoma prognosis. Tumor proliferation is partly different among different gastric carcinoma TCM classifications of syndromes, with which Ki67 protein expression is correlated.

Key Words: TCM classification of syndrome; Proliferation; Ki67; Cyclin E

Shi J, Wei PK, Xu L, He J, Sun DZ. Relationship between gastric carcinoma traditional Chinese medicine classifications of syndrome and tumor proliferation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(9):863-868

摘要

目的: 探索胃癌中医证型与肿瘤增殖的关系。

方法: 胃癌患者91例, 术前按中医辨证分型标准归类成6型, 术后标本用免疫组化Envision法检测胃癌组织Ki67与Cyclin E的蛋白表达, 观察不同证型肿瘤增殖差异。

结果: Ki67, Cyclin E阳性表达率分别为98.90%(90/91), 72.53%(66/91)。Cyclin E的表达与胃癌病理分型($P = 0.0394$)及远处转移($P = 0.0096$)存在相关性, 女性患者有无远处转移与Cyclin E表达有统计学意义($P = 0.0193$), 有远处转移的患者表达较高。Ki67与预后相关因

■背景资料

中医证型的研究是“证”本质研究的基础, 是近年来的热点和难点, 对于中风、慢性哮喘病、胆囊炎等特定疾病的证型探索正在不断地深入, 并且已经在部分疾病上取得了很可喜的进展和发现。对胃癌这一常见恶性肿瘤证型的探索和本质研究起步不到10 a, 近5 a相关研究报道才日渐增多, 正在向广度深度发展, 研究角度从简单的病理形态、胃酸pH值等深入到肿瘤相关基因的表达, 研究水平也从蛋白水平深入到分子水平, 甚至借助了基因芯片、蛋白芯片等技术手段, 取得了部分的成绩。

■研究前沿

胃癌证型的研究目前主要包括以下几个方面: (1)胃癌辨证分型的文献研究, 包括对胃癌证型“金标准”的探索和归纳。 (2)胃癌证型与病理及TNM分期关系, 包括对*H. pylori*、病理分型等预后相关因素的探索。 (3)胃癌证型与内环境之间关系, 包括血液流变学、胃内低酸环境、亚硝酸盐含量、血清必需脂肪酸、甲状腺功能等。 (4)胃癌证型蛋白基因水平探索, 包括肿瘤相关C-myc、P21、P53、PCNA、C-erbB-2、Bel-2、Bax、nm23、P18等基因蛋白与分子水平表达。 (5)胃癌特定证型的研究, 如以脾虚证作为研究的重点, 探索Cyclin E、T细胞亚群、红细胞C3b受体花环等的变化。

素未见相关性。Ki67的表达与证型存在相关性($P = 0.0377$), 肝胃不和型与痰湿凝结型、气血双亏型Ki67表达存在差异, 肝胃不和型高于痰湿凝结型($P < 0.01$)、气血双亏型($P < 0.05$), 胃热伤阴型与痰湿凝结型Ki67存在差异, 胃热伤阴型高于痰湿凝结型($P < 0.05$); Cyclin E的表达各证型未见统计学差异($P = 0.1254$)。

结论: Cyclin E可作为判断胃癌预后的重要指标。胃癌不同证型存在部分增殖差异, Ki67与胃癌证型相关, Cyclin E与证型无关。

关键词: 中医证型; 增殖; Ki67; Cyclin E

施俊, 魏品康, 许玲, 何金, 孙大志. 胃癌证型与肿瘤增殖的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(9):863-868

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/863.asp>

0 引言

证在中医治疗中占有极其重要的地位, 证型的确立是诊治疾病的关键。《丹溪心法》中说: “欲知其内者, 当以观乎外; 诊于外者, 斯以知其内。盖有诸内者形诸外”, 特定疾病的不同中医证型必定存在着其内在的不同病理生理变化及其不同基因表达的差异, 探明这些差异是探讨中医证内涵的关键。肿瘤的生长主要决定于肿瘤细胞的增殖能力, 细胞增殖的异常与癌变密切相关, 甚至有人认为肿瘤即是一类细胞周期疾病(cell cycle disease)。各种癌基因、抑癌基因等多基因的作用及其功能效应, 最终都会聚集到细胞周期机制上来。类同的内在基因表达与细胞周期改变, 经过机体一系列复杂的病理反应过程, 必有“症”作为外在表达的“信号”, 最终必会出现特定的症候群或者说特定的证, 其在疾病的发展过程中有规律地变化和发展, 如同潮涨潮落, 特定证型的出现可能预示肿瘤细胞增殖能力的增强或者减弱, 病情进展或者好转。

细胞周期素存在于细胞周期的不同阶段, Cyclin E是Cdk2的调节亚单位, 是细胞周期中G1期进入S期的一个重要调控因子。Ki67为细胞增殖的一种标记物, 存在于细胞周期G1期、S期、G2期和M期, 其高度表达与细胞增殖关系密切, 已被广泛用来作为细胞增殖活性的重要指标之一。我们选取Cyclin E及Ki67作为观察细胞增殖活性的代表指标, 探索胃癌中医证型与肿瘤增殖的关系, 从增殖角度探索胃癌中医证候的部分内涵, 力图证本质的研究探索有规律的信息。

1 材料和方法

1.1 材料 Ki67: 鼠抗人蛋白一抗, 购自福州迈新生物技术开发公司; Cyclin E: 鼠抗人蛋白一抗, 购自福州迈新生物技术开发公司; 免疫组化EnVision试剂盒购自DAKO公司。标本来源: 2002-11/2004-05长征医院外科住院手术病理证实为胃癌94例, 按下法辨证分型, 收集病例资料, 包括手术记录、术后病理报告、辅助检查等, 并将手术标本以石蜡块形式保存以备用, 辅助检查明确有远处转移灶的则记录转移部位。因石蜡切片未切至肿瘤组织或掉片, 剔除3例, 最终91例, 胃癌各证型年龄、病理分型等均未见统计学差异($P > 0.05$, 表1)。

1.2 方法 术前1 d由2名主治医师以上医师同时辨证, 记录辨证相关症状、体征、舌脉象等, 并拍摄舌象照片。辨证方法参照1978年全国第一届胃癌学术会议北京市胃癌协作组制定的分型方法及本科自然科学基金课题“胃癌证型与肿瘤侵袭、转移的关系研究”(30271626)胃癌中医证型文献研究结果^[1-2]分为6型: 肝胃不和、瘀毒内阻、痰湿凝结、脾胃虚寒、胃热伤阴、气血双亏。采用主症次症打分法, 具备主症2项, 舌脉象基本符合, 或者主症1项, 次症2项, 舌脉象基本符合即可。具体分型标准如下: (1)肝胃不和型: 主症为胃脘胀痛或窜及两胁; 嗳气频繁; 嘈杂泛酸, 次症为呃逆呕吐; 口苦口干; 大便不畅。舌质淡红, 苔薄白或薄黄, 脉沉或弦细; (2)脾胃虚寒型: 主症为胃脘隐痛; 胃痛喜按喜温; 食后胀闷痞满; 纳呆少食; 便清腹泻, 次症为朝食暮吐, 暮食朝吐; 面色苍白; 肢冷神疲; 便溏浮肿。舌淡而胖, 苔白滑润, 脉沉缓; (3)瘀毒内阻型: 主症为胃脘刺痛不移; 胃痛日久不愈; 大便潜血或黑便, 次症为心下痞硬; 吐血; 皮肤甲错。舌质暗紫, 可见瘀斑, 脉沉细涩; (4)胃热伤阴型: 主症为胃脘灼热食后疼痛; 口干欲饮; 大便干燥, 次症为胃脘嘈杂; 五心烦热; 食欲不振。舌红少苔, 或苔黄少津, 脉弦细数; (5)痰湿凝结型: 主症为胸闷痞满; 呕吐痰涎; 进食发噎; 痰核累累, 次症为腹胀便溏; 面黄虚肿; 口淡无味; 乏力纳呆。舌淡红, 苔滑腻; (6)气血双亏型: 主症为神疲乏力; 面色无华; 头晕目眩; 次症为心悸气短; 虚烦不寐; 自汗盗汗; 畏寒肢冷。舌淡苔薄, 边有齿痕, 脉沉细无力。免疫组化采用EnVision法, 按试剂盒说明书常规操作。用DAB显色, 阳性为棕色, 虽然阳性染色分布不均匀, 强度有差别, 但只要有明确阳性产物即作为阳性细胞。以任意5个高倍镜视

表 1 胃癌证型病例一般资料

分析因素		肝胃不和	脾胃虚寒	瘀毒内阻	胃热伤阴	痰湿凝结	气血双亏	合计
年龄	<40	2	0	1	2	1	1	7
	≥40	14	15	14	12	15	14	84
性别	男	10	10	8	5	12	10	55
	女	6	5	7	9	4	5	36
病理	腺癌	14	14	14	12	14	15	83
	印戒	2	1	1	2	2	0	8
分化	较好	5	9	6	8	9	6	43
	较差	11	6	9	6	7	9	48
浸润程度(T)	1	0	1	1	1	1	0	4
	2	5	3	5	3	4	2	22
	3	6	10	7	5	7	8	43
	4	5	1	2	5	4	5	22
部位	贲门	1	3	2	0	0	1	7
	胃底	0	1	2	0	0	2	5
	胃窦	6	4	4	3	7	4	28
	胃体	5	2	3	2	2	3	17
	小弯	4	3	4	9	7	5	32
	残胃	0	2	0	0	0	0	2
淋巴结转移(N)	0	5	5	4	6	7	4	31
	1	5	5	7	3	1	3	24
	2	6	5	4	5	8	8	36
远处转移(M)	0	15	14	13	10	12	15	79
	1	1	1	2	4	4	0	12

■创新盘点

对于胃癌证型的研究角度多样,包括与侵袭转移关系、与抑癌基因关系等,但目前尚未有胃癌证型与肿瘤增殖关系的相关报道,本文正是从肿瘤增殖角度,选取代表性的指标来探讨胃癌证型与增殖的关系。

表 2 胃癌中医证型与Ki67及Cyclin E表达的关系

证型	Ki67分值	平均秩和	Cylin E分值	平均秩和
肝胃不和	5.63 (90/16)	59.19	1.69 (27/16)	45.13
脾胃虚寒	3.87 (58/15)	43.30	1.60 (24/15)	56.33
瘀毒内阻	4.27 (64/15)	47.43	2.00 (30/15)	55.30
胃热伤阴	5.36 (75/14)	55.68	1.64 (23/14)	46.43
痰湿凝结	2.94 (47/16)	37.97	1.31 (21/16)	38.50
气血双亏	3.47 (52/15)	33.06	1.07 (16/15)	35.13

野中阳性显色作为评定依据。浅棕色(+), 棕黄色(++), 深棕色(+++). 免疫组化着色按其强弱分为-、+、++、+++ , 分别给予分值为0, 1, 2, 3分; 细胞表达数0, 1%-25%, 26%-50%, 51%-75%, 76%-100%, 分别给予分值为0, 1, 2, 3, 4分; 将每一标本的两个分值相乘, 作为结果。

统计学处理 采用SAS统计软件包, 非正态分布资料用完全随机化设计资料的非参数检验进行数据处理和分析, 两两比较用Nemenyitest法检验。

2 结果

2.1 预后相关因素与Ki67、Cyclin E的关系 Ki67, Cyclin E阳性表达率分别为98.90%(90/91), 72.53%(66/91)。Cyclin E的表达在性别、TNM分期、部位、浸润深度、分化程度、淋巴结转移上未见统计学差异($P>0.05$), 与病理分型($P=0.0394<0.05$)及远处转移($P=0.0096<0.01$)存

在相关性, 女性患者无远处转移者平均分值为1.52(47/31), 有远处转移者为3.00(15/5), 有统计学意义($P=0.0193<0.05$), 有远处转移的患者表达较高。Ki67与各预后相关因素未见相关性。

2.2 胃癌证型与Ki67、Cyclin E的关系 胃癌证型与Ki67存在相关性($P=0.0377<0.05$, 表2)。进一步进行证型间的两两比较统计表明, 肝胃不和证型与痰湿凝结证型、气血双亏证型Ki67表达存在差异($P<0.01$, $P<0.05$), 肝胃不和证型Ki67表达高于痰湿凝结证型、气血双亏证型; 胃热伤阴证型与痰湿凝结证型Ki67存在差异($P<0.05$), 胃热伤阴证型Ki67表达高于痰湿凝结证型。统计分析显示胃癌中医证型与Cyclin E未见明显相关性($P=0.1254>0.05$, 表2)。

3 讨论

现代认为肿瘤是多基因变化导致细胞周期紊乱, 细胞失控性生长所致的一类疾病, 几乎所有肿

■应用要点

本文就胃癌与增殖的关系只是选取了具有代表性的2个指标,并且目前尚处于蛋白水平,相对于肿瘤增殖研究来说,还有流式细胞仪检测凋亡等多种角度与方法可运用,也可以进一步深入到分子水平,利用RT-PCR等技术探讨分子水平的相关性。本文对于胃癌证型与增殖的研究起到一个抛砖引玉的作用。

瘤都有一个根本的共同特征:细胞周期调控机制的破坏,导致细胞无控制地增殖。正常的细胞周期包括G1、S、G2、M四期,细胞周期调控是由一系列基因参与的非常复杂的过程。细胞周期关卡(检测点 check point)保证细胞周期按一定的次序完成,主要有3个,即G1/S、G2/M、M中期/M后期。细胞周期的关卡调控系统主要由细胞周期素(Cyclins)-细胞周期素依赖性激酶(CDKs)-细胞周期素依赖性激酶抑制蛋白(CKIs)-视网膜母细胞瘤蛋白(pRb)组成。为了确保细胞周期事件发生的时间性、协同性,CDKs的时相性激活是细胞周期调控机制的核心,他主要依赖于Cyclins的细胞周期特异性或时相性表达、累积与分解。人类细胞主要的细胞周期素有Cyclin B1、Cyclin A、Cyclin E、Cyclin D1、D2和D3,CDK1(CDC2)与Cyclin B1的结合是M期事件的启动和进行的必要条件,CDK2与Cyclin A的结合是G2期事件的启动和进行的必要条件,CDK2还负责S期的进行,与Cyclin E结合是S期启动的必要条件,而CDK5、CDK6与Cyclin D1、D2、D3结合是G1期运行的必要条件^[3]。Cyclin E基因定位于19q12-13,有4个外显子及3个内含子,转录2.2kb的mRNA,编码395个氨基酸的蛋白质^[4]。Cyclin E作为一种核蛋白,最初是从酿酒酵母菌中提取出来的,其是细胞周期G1/S期转移调控的一个正性调节因子。其合成开始于G1期中期,最大化表达出现在细胞进入S期时刻,而在整个S期中又逐渐降解直至消失,其含量在细胞周期中成周期性变化^[5]。Cyclin E通过与CDK2结合并激活CDK2,促进G1/S期转换,Cyclin E的过表达可缩短G1期时间或加速G1期进行。国外学者在肺、肾、胰腺、胃、结肠等肿瘤研究中认为Cyclin E应是一个致癌基因,在肿瘤组织中他的表达在质和量上都有异常。异常情况下Cyclin E蛋白失去周期性表达,而在整个细胞周期中表达水平高,则持续性在整个周期中激活CDK2,促使G1/S期转换,使细胞发生异常增殖^[6]。现代研究发现Cyclin E与胃癌有密切关系。刘晓波 *et al*^[7]发现Cyclin E表达与组织病理分化程度呈负相关,分化差表达强,与肿瘤侵袭、淋巴结转移、远处转移无明显关系。李远晔 *et al*^[8]发现Cyclin E有肝转移组明显高于无肝转移组,与分化也存在相关性。刘天孚 *et al*^[9]研究发现Cyclin E的阳性表达率为48.7%(19/39),Cyclin E阳性者的S期细胞比例明显高于阴性者。金顺花 *et al*^[10]研究Cyclin E阳性

率为45.2%。杨苏敏 *et al*^[11]发现Cyclin E表达阳性率为62%,在胃癌与癌旁组织中存在差异,与分化程度呈负相关,而与淋巴结转移无关。刘勇 *et al*^[12]利用显微摄像计算机图像分析技术发现Cyclin E的过表达与胃癌的发生、发展明显相关,Cyclin E过表达对细胞增殖有促进作用,其表达与组织类型、分化程度、淋巴结转移无明显关系,仅与癌细胞的浸润有关。刘玉村 *et al*^[13]发现Cyclin E分别与分化程度、浸润深度、淋巴结转移相关。王力 *et al*^[14-15]则发现与浸润深度、淋巴结转移、TNM分期有关,与分化无关。赵仲生 *et al*^[16]研究发现Cyclin E表达水平与肿瘤大小、浸润深度、局部淋巴结转移、脉管侵犯和远处转移均相关。杨晓东 *et al*^[17]研究结论类似,在低分化、有淋巴结转移和(或)远处转移及浸润胃壁全层的胃癌中Cyclin E表达明显增高。

综上所述,众多研究已经证实Cyclin E的过表达与预后相关因素存在关联,如分化程度、淋巴结转移等。我们发现Cyclin E阳性表达率为72.53%(66/91),比文献所载40%-62%稍高;Cyclin E的表达与胃癌病理分型及远处转移存在相关性,而在性别、TNM分期、胃癌发生部位、浸润深度、分化程度、淋巴结转移上未具有统计学意义,这可能与本观察中早期胃癌病例较少有关,有待于进一步扩大样本研究,但从与病理类型和远处转移的相关性来看同样证实了Cyclin E与胃癌的恶性潜能有关,可作为判断胃癌预后的一项重要指标。从性别角度进一步对Cyclin E的表达进行分析,女性患者有无远处转移Cyclin E表达有统计学意义,有远处转移的患者表达较高,男性则无此现象,这提示Cyclin E对于女性患者似乎关系更为密切,Cyclin E对于预后的价值在女性患者上体现的更为明显。我们前期胃癌不同证型性别构成差异研究结果提示^[18],女性虚证比例明显升高,气血双亏、胃热伤阴型女性患者多于男性。结合中医理论,邪正相争,正气虚损,虚证多出现在疾病后期来看,按Cyclin E表达强,预后差来推断,女性患者预后潜在就比男性差,这与临床观察女性患者预后差,恶性程度高的文献报道相符合^[19]。

正常和肿瘤组织的增殖活性由参与细胞周期的细胞数和完成细胞周期的时间所决定。肿瘤细胞的高增殖率与肿瘤的恶性进展和不良预后高度相关。因此,检测细胞增殖可为协助诊断和判断肿瘤预后提供参考。Ki67抗原是典型的与细胞周期相关的核蛋白,在增殖细胞的G1、

S、G2和M期表达, G0期不表达, 与细胞的合成代谢有关, 能够客观地反映肿瘤的性质, 在一些方面甚至优于增殖细胞核抗原(PCNA). 正常组织中Ki67蛋白的分布反映了细胞的动力特点, 扁桃体的生发中心细胞、上皮的基底细胞和睾丸组织的未分化精原细胞均表达Ki67抗原, 而肝、肾和脑细胞不表达. 由于肿瘤细胞具有高增殖活性, 故有关Ki67与胃癌的研究多见报道. 如郭长青 *et al*^[20]研究发现, Ki67核抗原的表达与胃癌的侵袭、低分化、淋巴结转移显著相关. 田丽峰 *et al*^[21]研究表明Ki67表达与胃不典型增生程度、分化程度、组织学类型有关, 与EGFR有协同作用. 徐佑 *et al*^[22]研究发现Ki67指数和浸润深度、淋巴结转移有关. 陈玉芳 *et al*^[23]研究提示胃癌恶性度低, Ki67指数低, 反之则高. 总之, 多数研究表明Ki67和胃癌病理密切相关, 可作为胃癌预后的参考指标. 我们未发现Ki67与预后相关因素的相关性, 可能与胃癌早期症状隐蔽, 发现皆较晚, 手术患者大多数已非早期, 造成纳入病例中晚期为主有关, 有待于进一步扩大样本研究.

证是中医特有的一个概念, 既是对疾病临床表现的概括, 又是在一定程度上对疾病本质的反映. 《丹溪心法》中说: “欲知其内者, 当以观乎外; 诊于外者, 斯以知其内. 盖有诸内者形诸外”. 不同中医证型其内在的不同病理生理变化, 不同基因表达的差异是探讨中医证内涵的关键. 胃癌证型研究近年在蛋白基因水平上不断深化. 如张万岱 *et al*^[24]检测胃癌组织c-myc、p21、p53阳性表达, 结果提示阳性表达各证型依次为脾胃虚寒>胃阴不足>肝胃不和>寒热夹杂, 提示癌基因及抑癌基因表达与胃癌及癌前病变中医分型有一定关系. 章锐^[25]研究发现胃癌虚、实证患者其胃癌组织中PCNA、p53基因、C-erbB-2基因表达显著升高($P<0.01$), 虚证更为显著, 不同阶段PCNA、癌基因、抑癌基因表达不同, 晚期即中医虚证阶段表现更为显著. 周冬枝 *et al*^[26]检测胃癌组织P53、Bel-2、Bax蛋白的表达, 发现脾虚组患者P53、Bel-2蛋白的阳性表达率及表达水平显著高于非脾虚组($P<0.05$), 脾虚患者症状积分与P53、Bel-2蛋白表达水平呈正相关, 提示p53、bel-2基因是脾虚证的物质基础之一. 刘莺 *et al*^[27]运用基因芯片技术寻找不同胃癌证型组织中的相关基因表达谱表达差异, 结果表明胃癌患者的基因表达有相同表达改变, 不同中医证型的基因谱表达改

变不相同, 如nm23基因增高等. 我们曾就胃癌不同证型转移相关基因表达进行探索, 发现不同证型虽在病理类型上未见差异^[28], 但是转移相关基因E-Cad上存在差异, 瘀毒内阻与肝胃不和型表达偏低^[29-30]. 由此可见在胃癌不同证型中肿瘤侵袭转移存在着内在的部分差异. 我们发现Ki67与胃癌证型密切相关, 此结果未见文献报道. 研究结果提示胃癌各个证型Ki67表达存在显著差异, 而Cyclin E却未见证型间差异, 这可能与Ki67和Cyclin E针对细胞周期作用点不同有关, 一般认为Ki67在G1、S、G2和M期表达, G0期不表达, 而Cyclin E只作用于G1晚期及S早期, 这提示我们不同证型增殖差异是否存在于Ki67与Cyclin E表达不同的G2和M期. Ki67表达两两比较发现部分证型间差异亦明显, 这提示我们不同证型增殖可能存在不同的内在机制, 或者增殖影响环节存在差异, 值得进一步进行探索研究.

4 参考文献

- 1 孙大志, 许玲, 姜林娣, 魏品康. 中医药治疗胃癌临床研究文献质量的调查评价. 中国临床医学 2003; 10: 833-835
- 2 许玲, 孙大志, 施俊, 陈亚琳, 魏品康. 胃癌中医证型分类的文献研究. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1457-1459
- 3 Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 2000; 60: 3689-3695
- 4 Hayashi H, Ito T, Yazawa T, Ikeda M, Inayama Y, Nakatani Y, Kameda Y, Nakamura N, Kitamura H. Reduced expression of p27/Kip1 is associated with the development of pulmonary adenocarcinoma. *J Pathol* 2000; 192: 26-31
- 5 Gong J, Ardelt B, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Unscheduled expression of cyclin B1 and cyclin E in several leukemic and solid tumor cell lines. *Cancer Res* 1994; 54: 4285-4288
- 6 Resnitzky D, Gossen M, Bujard H, Reed SI. Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 1669-1679
- 7 刘晓波, 姜彦多, 王继红, 庄家珠. Cyclins E蛋白异常表达在胃癌的意义. 中国肿瘤临床 2000; 27: 508-510
- 8 李远晁, 徐志林. 胃癌组织Cyclins E和p53蛋白表达的研究. 中国现代医学杂志 2002; 12: 23-25
- 9 刘天孚, 耿敬妹. 细胞周期素A、E在胃癌组织中的表达及与细胞周期的关系. 黑龙江医学 2003; 27: 422-423
- 10 金顺花, 朴熙绪, 金海峰, 朴凤顺, 许强. P27kip1、CyclinE和CyclinA在胃癌中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1804-1806
- 11 杨苏敏, 李金龙, 王崇宇, 原学斌, 王翠莲. 胃癌组织Cyclin E表达的研究. 长治医学院学报 2000; 14: 167-168
- 12 刘勇, 路名芝. 细胞周期调控因子p27、cyclin E和Ki-67在早期胃癌中的表达. 中华普通外科杂志 2002; 17: 366
- 13 刘玉村, 高付生, 高红桥, 王振军, 万远廉. p27、Cyclin E、Rb蛋白在胃癌中的表达及临床意义. 北京

■名词解释

证: 是一组特定症状和体征的综合, 也是疾病的病因、病理、病位、病变性质、正与邪双方力量对比状况等方面的综合概念, 并据此提出治疗原则, 如脾胃虚寒、肝胃不和等.
症: 指单一的症状或体征, 如头痛、发热等.

- 大学学报(医学版) 2001; 33: 20-22
- 14 王力, 钟德珩. 胃癌p27, Cyclin E蛋白表达及其意义. 中国现代医学杂志 2004; 14: 64-66
- 15 王力, 钟德珩. 胃癌Cyclin E蛋白表达及其意义. 南华大学学报·医学版 2003; 31: 275-277
- 16 赵仲生, 茹国庆, 马杰. 细胞周期素E和p53蛋白在胃癌组织中表达及预后意义. 中国癌症杂志 2003; 13: 211-214
- 17 杨晓东, 王杉, 梁斌, 姜可伟, 于永祥. 细胞周期素E及细胞周期素依赖性激酶2在胃癌组织中的表达及意义. 中华普通外科杂志 2001; 16: 301-303
- 18 施俊, 许玲, 孙大志. 胃癌不同证型的性别构成比较分析. 中国中西医结合杂志 2005; 25: 480
- 19 赵平, 唐令超, 黄蔚, 罗进, 杨玉波. 女性胃癌127例临床分析. 肿瘤防治杂志 2001; 8: 508-509
- 20 郭长青, 李继昌, 李建生, 刘国永. Ki67核抗原在良、恶性胃黏膜病变中的表达及临床意义. 胃肠病学和肝病学杂志 2002; 11: 249-250, 264
- 21 田丽峰, 李莹杰, 陈嘉薇, 吴克菲, 付红, 朱江. EGFR和Ki67在胃不典型增生和胃癌中的表达及二者相关性. 哈尔滨医科大学学报 2001; 35: 116-118
- 22 徐佳, 张一楚, 孙久远, 张忠德, 张文竹, 钱惠琴. bcl-2, bax, Ki67在胃癌中的表达及意义. 肿瘤 2001; 21: 211-212
- 23 陈玉芳, 万美珍, 史永娟. 胃癌组织中Ki-67抗原表达的意义. 河南肿瘤学杂志 2002; 15: 118-119
- 24 张万岱, 王小虎, 曾锦章, 张亚历, 孙勇. 胃癌及癌前病变的中医分型与幽门螺杆菌感染、癌基因表达的关系. 中国中西医结合脾胃杂志 1998; 6: 5-6
- 25 章锐. 胃癌中医证型与细胞增殖活性及癌基因关系的研究. 临床中老年保健 2001; 4: 159-161
- 26 周冬枝, 吴苏冬, 刘永惠, 邓景元, 谢宏. 胃癌中医证型与p53、bcl-2、bax基因蛋白表达关系的研究. 中国中西医结合杂志 2003; 26: 56-59
- 27 刘莺, 李俊军, 朱文锋, 刘平. 胃癌中医证型相关基因的表达谱. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1318-1321
- 28 许玲, 孙大志, 何金, 刘龙, 秦志丰, 施俊, 李峻, 魏品康. 胃癌病理分型与辨证分型的关系探讨. 中华实用中西医杂志 2005; 18: 272-274
- 29 许玲, 刘龙, 孙大志, 魏品康. E-钙黏蛋白与胃癌中医证型关系的研究. 成都中医药大学学报 2004; 27: 40-43
- 30 许玲, 孙大志, 何金, 刘龙, 魏品康. 胃癌同证型中肿瘤转移相关基因蛋白的表达. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2782-2787

电编 李琪 编辑 潘伯荣

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

·消息·

中华消化学会第一届全国肝胆疾病学术研讨会

本刊讯 中华消化学会第一届全国肝胆疾病学术研讨会将于2006-07-27/30在长春举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

结构式摘要(500字)及全文3 000字各1份, 2006-03-31截稿.

2 联系方式

长春市新民大街1号吉林大学白求恩医学部一院消化科 迟宝荣 教授(130021); 电话: 0431-4612437; E-mail: chibaorong@sohu.com.

重组蛋白rhTRAIL₅₅₋₂₈₁与GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁有肝细胞毒性

刘洪波, 范学工, 黄建军, 李宁, 应若素, 彭建平

刘洪波, 范学工, 李宁, 应若素, 彭建平, 中南大学湘雅医院感染病科 湖南省长沙市 410008
黄建军, 中南大学生物科学与技术学院生物化学系 湖南省长沙市 410008
刘洪波, 1992年湖南师大生物系学士, 讲师, 现在中南大学湘雅医院传染科攻读博士, 从事感染与免疫研究.
通讯作者: 范学工, 410008, 湖南省长沙市湘雅路87号, 中南大学湘雅医院感染病科. xgfan@hotmail.com
电话: 0731-4327392
收稿日期: 2006-02-16 接受日期: 2006-02-21

Toxicity assay for recombinant protein of rhTRAIL₅₅₋₂₈₁ and GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁ to hepatic cells

Hong-Bo Liu, Xue-Gong Fan, Jian-Jun Huang, Ning Li, Ruo-Su Ying, Jian-Ping Peng

Hong-Bo Liu, Xue-Gong Fan, Ning Li, Ruo-Su Ying, Jian-Ping Peng, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China
Jian-Jun Huang, Department of Biochemistry, School of Biology Science and Technology, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China
Correspondence to: Professor Xue-Gong Fan, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, 87 Xiangya Road, Changsha 410008, Hunan Province, China. xgfan@hotmail.com
Received: 2006-02-16 Accepted: 2006-02-21

Abstract

AIM: To investigate the toxicity of recombinant protein rhTRAIL₅₅₋₂₈₁ and GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁ to human hepatic cells, and to provide the experiment evidence for development of anti-tumor drugs.

METHODS: Primary cultured human hepatic cells were obtained from adult and fetus by trypsin digestion and mechanical separation. GST tag was cut off by Factor-Xa from recombinant protein GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁ to gain rhTRAIL₅₅₋₂₈₁. Human hepatic cell strain L-02, primary cultured human hepatic cells from adult and fetus and normal human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were intervened by recombinant protein rhTRAIL₅₅₋₂₈₁ or GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁, and finally the apoptosis of cells were detected by flow cytometry.

RESULTS: The viability of primary cultured human hepatic cells from adult and fetus exceed 95%, and the purity of rhTRAIL₅₅₋₂₈₁ without GST tag was 97%. Mass of apoptosis was detected in L-02, adult human hepatocytes and human fetal hepatocytes, and the apoptosis rates were 79.1%, 72.8%, and 42.2% or 80.3%, 74.7%, and 47.2%, respectively, 48 h after rhTRAIL₅₅₋₂₈₁ or GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁ intervention at concentration of 10 mL/L. However, PBMCs showed little apoptosis.

CONCLUSION: Recombinant protein rhTRAIL₅₅₋₂₈₁ or GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁ is limited in the development of antineoplastics due to its hepatocyte toxicity.

Key Words: Recombinant protein; rhTRAIL₅₅₋₂₈₁; GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁; Antineoplastics; Toxicity; Human hepatic cells; Apoptosis

Liu HB, Fan XG, Huang JJ, Li N, Ying RS, Peng JP. Toxicity assay for recombinant protein of rhTRAIL₅₅₋₂₈₁ and GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁ to hepatic cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(9):869-873

摘要

目的: 检测重组蛋白rhTRAIL₅₅₋₂₈₁与GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁的对肝细胞的毒性, 以确定其是否可以开发为抗肿瘤药物.

方法: 采用胰酶消化与机械分离结合的方法, 获取原代成人肝细胞和胎肝细胞. 用Factor-Xa切除重组蛋白GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁的GST标签获取rhTRAIL₅₅₋₂₈₁蛋白, 然后分别利用rhTRAIL₅₅₋₂₈₁与GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁干预肝细胞株L-02、原代成人肝细胞、原代胎肝细胞及对照组正常人外周血单个核细胞(PBMC), 最后利用流式细胞仪检测细胞的凋亡率.

结果: 获得的原代成人肝细胞和胎肝细胞细胞活力达95%以上, 无GST标签的rhTRAIL₅₅₋₂₈₁蛋白纯度达到97%; rhTRAIL₅₅₋₂₈₁与GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁使肝细胞株L-02及原代成人肝细胞、胎肝细胞大量凋亡. 在10 mL/L的浓度下, 48 h后凋亡率分别为79.1%, 72.8%, 42.2%与80.3%, 74.7%, 47.2%, 而对照组正常

■背景资料

TRAIL能强烈诱导转化细胞、肿瘤细胞和病毒感染细胞等凋亡, 而正常组织细胞却对其不敏感, 这种选择性细胞毒性使其在肿瘤治疗中有着潜在的广泛应用前景. Jo *et al*发现, 虽然人TRAIL-His对鼠肝细胞没有毒性, 对原代成人肝细胞却有强烈的细胞毒性. Nagata与Gura呼吁对于TRAIL药物的开发要十分谨慎.

■创新盘点

本文经过对肝细胞株、原代成人肝细胞、胎肝细胞进行测试,验证了自制的两种重组蛋白rhTRAIL₅₅₋₂₈₁与GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁对人肝细胞的毒性。

人PBMC基本不凋亡。

结论: 重组蛋白rhTRAIL₅₅₋₂₈₁与GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁有肝细胞毒性。

关键词: 重组蛋白; rhTRAIL₅₅₋₂₈₁; GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁; 抗肿瘤药物; 肝细胞; 毒性; 细胞凋亡

刘洪波, 范学工, 黄建军, 李宁, 应若素, 彭建平. 重组蛋白rhTRAIL₅₅₋₂₈₁与GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁有肝细胞毒性. 世界华人消化杂志 2006;14(9):869-873

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/869.asp>

0 引言

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF related apoptosis inducing ligand, TRAIL)是TNF超家族成员中的一员。TRAIL能强烈诱导转化细胞、肿瘤细胞和病毒感染细胞等凋亡,而正常组织细胞却对其不敏感,这一特征使其在肿瘤治疗中有着潜在的广泛应用前景^[1-2]。但近来的研究表明,重组蛋白rhTRAIL有肝细胞毒性^[3],这制约着rhTRAIL作为抗肿瘤药物开发。本研究组已经克隆出非全长人TRAIL基因,随后对他进行了体外表达及纯化的深入研究,纯化出大量GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁,并检测了GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁的凋亡活性^[4-5]。本研究在此基础上,利用rhTRAIL₅₅₋₂₈₁与GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁干预肝细胞株L-02及原代成人肝细胞、胎肝细胞,然后利用流式细胞仪进行凋亡检测,以确定rhTRAIL₅₅₋₂₈₁与GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁肝细胞毒性的大小,为重组蛋白rhTRAIL₅₅₋₂₈₁与GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁是否可以作为抗肿瘤药物开发提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 重组蛋白GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁系本研究室纯化^[5]。Factor-Xa购自Pharmacia公司。超滤器Centricon YM-10, 30购自Millipore公司。Glutathione Sepharose 4B、胰酶购自Amersham公司。胎牛血清、DMEM等购自Gibco公司。细胞生长因子、铁硫蛋白、鼠尾胶系卢瑾硕士惠赠。人肝细胞株L-02系我室保存。成人肝组织系本院手术取得,人胎肝组织系本院水囊式人工流产约14 wk胎儿身上取得(以上均取得病患与医院伦理委员会批准)。凋亡检测试剂盒购自鼎国生物科技公司。

1.2 方法 用Factor-Xa切除重组蛋白GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁的GST标签,重组蛋白GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁溶于冰浴PBS中,加入Glutathione

Sepharose 4B琼脂糖珠,冰浴缓摇2 h后,4℃,500 r/min离心5 min,将琼脂糖珠重悬于冰浴20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4),0.1 mol/L NaCl缓冲液中。加入适量的Factor-Xa,4℃,24 h,500 r/min离心5 min,上清小心倒入超滤器Centricon YM-30,4℃,1 500 r/min离心15 min,滤液小心加入超滤器Centricon YM-10,4℃,1 500 r/min离心15 min,适量PBS溶解超滤器中截留的切除了GST的rhTRAIL₅₅₋₂₈₁蛋白,利用紫外分光光度仪检测其蛋白浓度。原代成人肝细胞与胎肝细胞的分离与培养采用胰酶消化与机械分离结合的方法,试剂准备同肝脏原位灌注消化法^[5]。收集细胞,在DMEM中加入10 mL/L胎牛血清,500 r/min离心5 min,如此洗涤细胞2-3次,最后用含100 mL/L胎牛血清、0.1 g/L细胞生长因子、1 g/L铁硫蛋白DMEM培养基、用鼠尾胶处理^[6]后的一次性塑料培养瓶,在37℃,50 mL/L CO₂的培养条件下培养。24 h贴壁后换液,用台盼蓝排斥法检测细胞活力,细胞活力达95%以上的就可用于重组蛋白rhTRAIL₅₅₋₂₈₁与GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁的肝细胞毒性检测实验。人肝细胞株L-02的培养按照常规方法进行,培养基为DMEM+100 mL/L小牛血清,培养条件为37℃,50 mL/L CO₂。培养至细胞80%-85%时进行rhTRAIL₅₅₋₂₈₁与GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁肝细胞毒性检测实验。以分离的正常人的外周血单个核细胞(PBMC)为对照组,在L-02细胞株、活力检测后的原代成人肝细胞与胎肝细胞中加入稀释度为100 mL/L的rhTRAIL₅₅₋₂₈₁与GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁,及无关蛋白(白蛋白)干预24, 36及48 h。然后按流式细胞术检测的要求与方法分别收获细胞,碘化丙啶(PI)染色后,用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

统计学处理 采用配对t检验和相关分析。

2 结果

GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁的GST标签被Factor-Xa有效的切除,切除GST标签后, rhTRAIL₅₅₋₂₈₁的分子量大小约为 M_r 25 000,利用超滤器Centricon YM-10, 30,有效的去除了Factor-Xa(M_r 48 000),使rhTRAIL₅₅₋₂₈₁纯度达到97%,与GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁相当(图1)。用胰酶消化与机械分离结合的方法获得了大量的原代成人肝细胞与胎肝细胞。这些原代细胞贴壁换液后,逐渐伸展为多边形(图2)。利用台盼蓝排斥法进行活力检测,发现其活力在95%以上。胎肝细胞还有很强的分裂能力,但成人肝细胞却基本不能分裂,原代成人肝细胞在

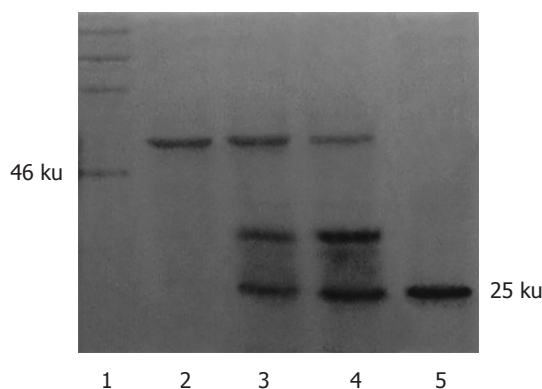


图 1 GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁的GST标签的切除与纯化, 100 g/L SDS-PAGE胶电泳图. 1: 蛋白质分子量标准; 2: 纯化的GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁蛋白; 3, 4: Factor-Xa消化后GST标签部分被切除; 5: 纯化的rhTRAIL₅₅₋₂₈₁蛋白.

■同行评价
文章有理论意义和实际应用价值, 是一篇具有较高价值的论文.

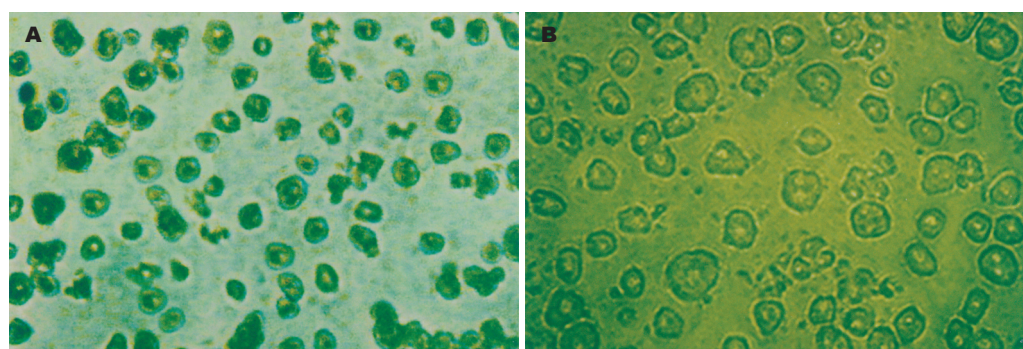


图 2 原代培养的人胎肝细胞与成人肝细胞 (绿色滤镜). A: 原代人胎肝细胞 ($\times 400$); B: 原代成人肝细胞 ($\times 500$).

表 1 重组蛋白rhTRAIL₅₅₋₂₈₁或GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁干预下细胞凋亡率

分组	Th	PBMC	L-02	成人肝细胞	人胎肝细胞
白蛋白 (无关蛋白)	48	0.8 ± 0.15	0.6 ± 0.17	0.9 ± 0.20	0.7 ± 0.16
1 : 100 rhTRAIL ₅₅₋₂₈₁	12	0.8 ± 0.14	17.49 ± 1.21^{bcd}	16.22 ± 1.27^{bcd}	9.0 ± 1.79^{bc}
	24	1.2 ± 0.31	39.52 ± 3.11^{bcd}	33.17 ± 4.57^{bcd}	18.64 ± 3.06^{bc}
	48	2.3 ± 0.20	79.11 ± 4.79^{bcd}	72.83 ± 6.12^{bcd}	42.15 ± 3.93^{bc}
	12	0.9 ± 0.12	19.89 ± 2.03^{bcd}	16.63 ± 0.79^{bcd}	11.01 ± 1.29^{bc}
1 : 100 GST-rhTRAIL ₅₅₋₂₈₁	24	1.5 ± 0.17	41.47 ± 3.45^{bcd}	34.86 ± 2.19^{bcd}	19.67 ± 4.22^{bc}
	48	2.3 ± 0.23	80.31 ± 5.13^{bcd}	74.73 ± 5.03^{bcd}	47.15 ± 5.31^{bc}

^b $P < 0.05$ vs 白蛋白 (无关蛋白); ^c $P < 0.05$ vs PBMC; ^d $P < 0.05$ vs 人胎肝细胞.

培养10 d逐渐开始死亡. 他们都可以很好的满足重组蛋白rhTRAIL₅₅₋₂₈₁与GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁的肝细胞毒性检测实验. 通过对L-02细胞株、检测后的原代成人肝细胞与胎肝细胞等细胞的干预, 发现rhTRAIL₅₅₋₂₈₁与GST-rhTRAIL₅₅₋₂₈₁对L-02细胞株、原代成人肝细胞与胎肝细胞均有较强的细胞毒性(表1), 且两者的毒性无统计学差异, 原代胎肝细胞的凋亡率明显低于L-02细胞株与原代成人肝细胞. 他们对正常人PBMC无细胞毒性.

3 讨论

TRAIL能强烈诱导转化细胞、肿瘤细胞和病毒

感染细胞等凋亡, 而正常组织细胞却对其不敏感, 这种选择性细胞毒性使其在肿瘤治疗中有着潜在的广泛应用前景. 通过多次小鼠的体内试验研究发现, 重组人TRAIL蛋白并没有毒副作用, 应该是安全的^[2,7-8]. 但是, 随后Jo *et al*^[3]发现, 虽然人TRAIL-His对鼠肝细胞没有毒性, 对原代成人肝细胞却有强烈的细胞毒性. Nagata与Gura呼吁对于TRAIL药物的开发要十分谨慎^[9-10]. 当然, 也有不同的声音: 认为通过去除标签, 加入锌离子使外源表达的TRAIL分子形成完整的三聚体后, 不会对肝细胞产生毒性^[11]; 天然的TRAIL蛋白对于人正常的角质化细胞与黑色素细胞几乎没有细胞毒性^[12]. 最近研究又发

现: DR4和DR5可诱导肝细胞凋亡^[13]; 在体的正常肝细胞可抵抗*TRAIL*诱导的凋亡, 而在体外则无法避免^[14]; 胆汁酸可对死亡受体的信号转导起调节作用, 他可以促进*TRAIL*诱导肝细胞凋亡^[15-17]; 正常人关节软骨细胞对*TRAIL*诱导的凋亡也很敏感^[18]; 也有人认为在体内与体外均对肝细胞无毒性^[19]。基于以上正反两方面的观点, *TRAIL*药物的开发还是要十分谨慎, 安全性亟待深入研究。然而, 我国有人在追捧*TRAIL*, 甚至某大型生物科技有限公司为*TRAIL*药物的开发投入资金达亿元。为了为*TRAIL*抗肿瘤药物开发的可行性提供实验依据, 我们利用rh*TRAIL*₅₅₋₂₈₁与GST-rh*TRAIL*₅₅₋₂₈₁干预肝细胞株L-02及原代成人肝细胞、胎肝细胞, 然后利用流式细胞仪进行凋亡检测, 以确定rh*TRAIL*₅₅₋₂₈₁与GST-rh*TRAIL*₅₅₋₂₈₁肝细胞毒性的。通过实验, 重组蛋白rh*TRAIL*₅₅₋₂₈₁与GST-rh*TRAIL*₅₅₋₂₈₁对正常人PBMC无细胞毒性, 这与本研究小组早前报道的结果是一致的^[20], 综合本研究小组对可溶性GST-rh*TRAIL*₅₅₋₂₈₁凋亡活性的检测实验^[4], 可以再次肯定: *TRAIL*重组蛋白对细胞有选择性毒性。重组蛋白rh*TRAIL*₅₅₋₂₈₁与GST-rh*TRAIL*₅₅₋₂₈₁对肝细胞有毒性, 这与Jom *et al*对His标签的重组蛋白*TRAIL*-His的研究结果一致。因此, 无论是全长还是非全长的, 无论是*TRAIL*-His还是GST-rh*TRAIL*₅₅₋₂₈₁与rh*TRAIL*₅₅₋₂₈₁都对肝细胞有较强的毒性, 重组蛋白rh*TRAIL*₅₅₋₂₈₁与GST-rh*TRAIL*₅₅₋₂₈₁作为抗肿瘤药物开发受到其肝细胞毒性的制约。至于原代胎肝细胞的凋亡率明显低于L-02细胞株与原代成人肝细胞的原因, 可能是胎儿尚处于免疫发育不完全时期, 胎肝细胞的*TRAIL*死亡受体表达不完整抑或诱骗受体*TRAIL*-R4高表达造成^[21-22], 有待我们进一步研究。

鉴于以上实验结果, 我们认为: 对于*TRAIL*药物的开发要把安全性放在首位, 在大量投入资金之前, 必须验证他对正常细胞可能的杀伤作用, 以免如同Fas药物开发一样^[23], 造成不必要的巨大浪费。

致谢: 宋惠萍教授及张卫社教授给予了热忱的帮助。

4 参考文献

- 1 范学工. 一个新的凋亡分子——Trail. 世界华人消化杂志 2000; 8: 84-85
- 2 Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le

- T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JC, Lynch DH. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand *in vivo*. *Nat Med* 1999; 5: 157-163
- 3 Jo M, Kim TH, Seol DW, Esplen JE, Dorko K, Billiar TR, Strom SC. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat Med* 2000; 6: 564-567
- 4 李宁, 范学工. 人Trail分子的克隆、表达及鉴定. 中国现代医学杂志 2004; 14: 82-85
- 5 刘洪波, 范学工, 李宁, 黄建军, 朱才. 可溶性GST-rh*TRAIL*₅₅₋₂₈₁最佳表达条件及凋亡活性研究. 生命科学研究 2005; 9: 267-271
- 6 Lu J, Gu YP, Xu X, Liu ML, Xie P, Song HP. Adult islets cultured in collagen gel transdifferentiate into duct-like cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3426-3430
- 7 Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, McMurtry AE, Hebert A, DeForge L, Koumenis IL, Lewis D, Harris L, Bussiere J, Koeppen H, Shahrokh Z, Schwall RH. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 1999; 104: 155-162
- 8 Chinnaiyan AM, Prasad U, Shankar S, Hamstra DA, Shanaiah M, Chenevert TL, Ross BD, Rehemtulla A. Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1754-1759
- 9 Nagata S. Steering anti-cancer drugs away from the TRAIL. *Nat Med* 2000; 6: 502-503
- 10 Gura T. Cancer research. Caution raised about possible new drug. *Science* 2000; 288: 786-787
- 11 Lawrence D, Shahrokh Z, Marsters S, Achilles K, Shih D, Mounho B, Hillan K, Totpal K, DeForge L, Schow P, Hooley J, Sherwood S, Pai R, Leung S, Khan L, Gliniak B, Bussiere J, Smith CA, Strom SS, Kelley S, Fox JA, Thomas D, Ashkenazi A. Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat Med* 2001; 7: 383-385
- 12 Qin J, Chaturvedi V, Bonish B, Nickoloff BJ. Avoiding premature apoptosis of normal epidermal cells. *Nat Med* 2001; 7: 385-386
- 13 Armeanu S, Lauer UM, Smirnow I, Schenk M, Weiss TS, Gregor M, Bitzer M. Adenoviral gene transfer of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand overcomes an impaired response of hepatoma cells but causes severe apoptosis in primary human hepatocytes. *Cancer Res* 2003; 63: 2369-2372
- 14 Mundt B, Kuhnel F, Zender L, Paul Y, Tillmann H, Trautwein C, Manns MP, Kubicka S. Involvement of TRAIL and its receptors in viral hepatitis. *FASEB J* 2003; 17: 94-96
- 15 Higuchi H, Bronk SF, Takikawa Y, Werneburg N, Takimoto R, El-Deiry W, Gores GJ. The bile acid glycochenodeoxycholate induces trail-receptor 2/DR5 expression and apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276: 38610-38618
- 16 Higuchi H, Bronk SF, Taniai M, Canbay A, Gores GJ. Cholestasis increases tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-R2/DR5 expression and sensitizes the liver to TRAIL-mediated cytotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 303: 461-467
- 17 Higuchi H, Yoon JH, Grambihler A, Werneburg

- N, Bronk SF, Gores GJ. Bile acids stimulate cFLIP phosphorylation enhancing TRAIL-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2003; 278: 454-461
- 18 Pettersen I, Figenschau Y, Olsen E, Bakkelund W, Smedsrod B, Sveinbjornsson B. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces apoptosis in human articular chondrocytes *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 671-676
- 19 Hao C, Song JH, Hsi B, Lewis J, Song DK, Petruk KC, Tyrrell DL, Kneteman NM. TRAIL inhibits tumor growth but is nontoxic to human hepatocytes in chimeric mice. *Cancer Res* 2004; 64: 8502-8506
- 20 范学工. T细胞Trail受体表达及Trail诱导的T细胞凋亡. *中国免疫学杂志* 2000; 16: 122-124
- 21 Ichikawa K, Liu W, Zhao L, Wang Z, Liu D, Ohtsuka T, Zhang H, Mountz JD, Koopman WJ, Kimberly RP, Zhou T. Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity. *Nat Med* 2001; 7: 954-960
- 22 刘智敏, 陈俊杰. 肝脏中死亡受体的生物学和病理生物学作用. *生物医学工程学杂志* 2002; 19: 510-513
- 23 Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, Suda T, Nagata S. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 1993; 364: 806-809

电编 张敏 编辑 潘伯荣

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

• 消息 •

第十届全国普通外科学术会议征文通知

本刊讯 由解放军普通外科专业委员会主办, 南京军区福州总医院承办的“第十届全国普通外科学术会议”拟定于2006-07在福州举行. 会议采用院士论坛、专题报告等形式, 对普通外科近年来的新技术、新方法及发展趋势进行介绍和讨论. 欢迎军内外普通外科医师参加会议.

1 征文内容

有关普通外科疾病的诊断、治疗的基础和临床研究及护理内容.

2 征稿要求

(1)要求中文全文(4 000字以内)及摘要(500字以内)各1份. 稿件请寄软盘(Word 格式), 欢迎用电子邮件方式投稿. (2)来稿请注明单位、作者姓名、邮编及联系电话(请自留底稿, 恕不退稿), 请在信封左下角注明“会议征文”字样.

来稿请寄: 邮编: 350025, 福建省福州市西二球路156号 南京军区福州总医院普通外科 王烈 收. 电子邮件地址: www.fzptwk@public.fz.fj.cn, 传真: 0591-83796855, 电话: 0591-24937077, 军线: 0611-97077, 959770.

胃黏膜内类癌合并印戒细胞癌伴胃壁胰腺组织异位的临床病理观察

杨琳, 张宏图, 张洵, 孙耘田, 苏勤

■背景资料

胃内同时发生内分泌细胞增生并典型类癌和印戒细胞癌非常少见, 更未见上述两癌合并胃壁胰腺组织异位的病例。本文报道了上述三个病变共存1例的情况, 其病理诊断和鉴别诊断是难点, 涉及到胃黏膜内分泌细胞增生与类癌的诊断标准; 典型类癌与印戒样内分泌细胞癌和印戒细胞癌的鉴别以及与异位胰腺灶旁多灶内分泌细胞增生的鉴别。明确这一点将直接影响本例类癌的临床分期, 与患者的预后判断密切相关。本文会对今后胃肿瘤病理诊断实践有帮助。

杨琳, 张宏图, 张洵, 孙耘田, 苏勤, 中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤医院病理科 北京市 100021

杨琳, 2003年获中国医科大学硕士, 现从事肿瘤病理诊断及研究工作。

国家自然科学基金资助项目, No.30171052和No.30572125

通讯作者: 苏勤, 100021, 北京市, 中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤医院病理科. q.su@wjgnet.com

电话: 010-87788435

收稿日期: 2005-12-28 接受日期: 2006-02-08

Coexistence of carcinoid, signet-ring cell carcinoma and heterotopic pancreas in stomach: a clinicopathological observation

Lin Yang, Hong-Tu Zhang, Xun Zhang, Yun-Tian Sun, Qin Su

Lin Yang, Hong-Tu Zhang, Xun Zhang, Yun-Tian Sun, Qin Su, Department of Pathology, Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30171052 and No. 30572125

Correspondence to: Dr. Qin Su, Department of Pathology, Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China. q.su@wjgnet.com

Received: 2005-12-28 Accepted: 2006-02-08

Abstract

AIM: To report a case with synchronous occurrence of carcinoid, signet-ring cell carcinoma (SRC) and heterotopic pancreas in stomach.

METHODS: One male patient aged 63 years old was diagnosed with coexistence of carcinoid, signet-ring cell carcinoma and heterotopic pancreas in stomach by gastroscopy and pathological examination. These three lesions were further observed by histopathological, histochemical and immunohistochemical approaches, with the related literatures reviewed.

RESULTS: Multiple foci of proliferative endocrine cells were found in lamina propria of the corpus, and carcinoid was found in corpus on

the greater curve of the stomach, with muscularis mucosae involved. The tumor cells were strongly positive for neuron-specific enolase, synaptophysin and chromogranin A. An intramucosal SRC lesion was found in the lesser curve of corpus. Heterotopic pancreatic tissue was observed in muscularis propria of the antrum on the lesser curve, with hyperplasia of endocrine cells producing multiple pancreatic hormones.

CONCLUSION: Carcinoid in corpus of the greater curve and SRC in the lesser curve are independent lesions; the foci of endocrine cells in the muscularis propria and serosa are hyperplastic lesions from the heterotopic pancreatic tissue, rather than carcinoid dissemination.

Key Words: Heterotopic pancreas; Carcinoid; Signet-ring cell carcinoma; Gastric tumor; Endocrine cell hyperplasia

Yang L, Zhang HT, Zhang X, Sun YT, Su Q. Coexistence of carcinoid, signet-ring cell carcinoma and heterotopic pancreas in stomach: a clinicopathological observation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(9):874-878

摘要

目的: 报道胃黏膜内类癌合并印戒细胞癌和胃壁内胰腺组织异位1例, 并结合文献探讨其诊断和鉴别诊断问题。

方法: 患者, 男, 63岁, 主因“上腹部烧灼样不适2 a余, 加重2 mo”行胃镜检查, 见胃体大弯前壁黏膜结节状扁平隆起, 直径0.7 cm, 镜下为类癌。遂行胃大部切除, 常规取材病理送检发现上述3个不同部位的病变, 对此进行组织病理学、组织化学和免疫组织化学观察并复习相关文献。

结果: 胃体黏膜固有层内多灶内分泌细胞增生并于胃体大弯侧形成类癌, 局灶浸润黏膜肌层, 病变呈嗜铬颗粒蛋白A和突触素强阳性; 胃体小弯黏膜固有层内查见印戒细胞癌; 胃

窦小弯侧肌壁内查见异位胰腺组织伴内分泌细胞成分显著增生, 后者由胰岛素、胰高血糖素、生长抑素和胃泌素阳性细胞构成。

结论: 胃体大弯黏膜内类癌与小弯黏膜内印戒细胞癌是各自独立的病变; 肌层和浆膜层内分泌细胞团是增生的胰腺内分泌组织而非类癌浸润。

关键词: 异位胰腺组织; 类癌; 印戒细胞癌; 胃肿瘤; 内分泌细胞增生

杨琳, 张宏图, 张洵, 孙耘田, 苏勤. 胃黏膜内类癌合并印戒细胞癌伴胃壁胰腺组织异位的临床病理观察. 世界华人消化杂志 2006;14(9):874-878

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/874.asp>

0 引言

胃类癌较少见, 占胃肠道肿瘤的0.4%-1.8%^[1]; 但印戒细胞癌为较常见的胃癌^[2]。他们发病隐匿, 早期诊断较困难, 但二者的生物学行为有明显区别。胃壁胰腺组织异位常为胃外科手术或尸检时偶然发现, 发病率为0.6%-13.7%^[3]。目前尚未见有关上述3种病变共存的报道。我们报道了胃黏膜内类癌合并印戒细胞癌伴有胃壁内胰腺组织异位1例, 结合文献探讨了上述3种病变的鉴别诊断。

1 材料和方法

1.1 材料 患者, 男, 63岁, 主因“上腹部烧灼样不适2 a余, 加重2 mo”行胃镜检查, 见胃体大弯前壁黏膜呈结节状扁平隆起, 直径0.7 cm, 活检病理报告为“胃体神经内分泌源性恶性肿瘤”(经免疫组织化学证实)。入院后查体发现剑突下深压痛。胸片、上消化道造影、腹部超声未见异常; 腹部CT检查显示胃窦部胃壁略增厚; 血清胃泌素93.2 mg/L, 血清CA19-9、癌胚抗原(CEA)、CA724及CA242水平均正常。患者否认肿瘤家族史。术中取大弯前壁黏膜隆起病变(病变1)做冰冻切片, 结合形态及活检切片诊断“符合类癌”, 行根治性远端胃大部切除术。

1.2 方法 胃大部切除标本经广泛取材, 常规石蜡切片, 苏木精-伊红(HE)、阿尔辛蓝/过碘酸雪夫(AB/PAS)和免疫组织化学染色。免疫组织化学反应采用PV-9000通用型二步法检测试剂盒, 第一抗体包括针对胰高血糖素、胃泌素、生长抑素、血管活性肠肽(VIP)、胰多肽(PP)等的多克隆抗体; 以及针对细胞角蛋白(CK)18、胰岛

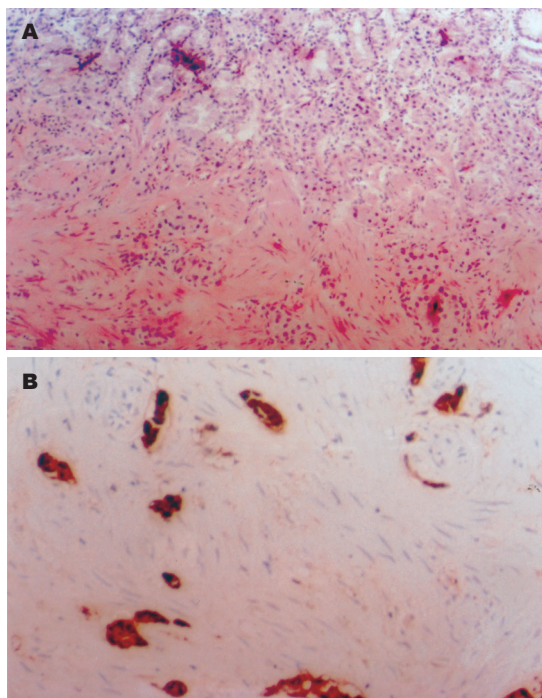


图1 胃体部大弯侧黏膜内类癌, 浸润黏膜固有层和黏膜肌。
A: HE × 20; B: 类癌组织呈CgA阳性, IHC × 20。

素、促肾上腺皮质激素(ACTH)、突触素(SY)、嗜铬素颗粒蛋白A(CgA)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、波形蛋白、P53(DO-7)和Ki-67等的单克隆抗体。上述试剂均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

2 结果

远端胃大部切除标本, 小弯长11.5 cm, 大弯长16.0 cm。于胃体大弯前壁见一直径约1.0 cm缺损区(病变1, 冰冻已取材), 镜下见轻-中度慢性萎缩性胃炎改变伴黏膜固有层内多灶性内分泌细胞增生, 并在病变1处形成一个直径为0.7 cm的结节。病变主要位于黏膜固有层, 部分浸润黏膜肌, 呈CK18、NSE、SY和CgA阳性(图1)。胃体小弯侧局部黏膜略增厚, 病变大小为3.0 cm × 2.0 cm(病变2)。镜下为黏膜固有层内印戒细胞癌, AB/PAS染色显示肿瘤细胞内含混合性黏液(图2), 神经内分泌标志物阴性。胃窦小弯侧查见一肌壁增厚区(厚约2.5 cm), 切面见黏膜下层和肌层之间有一边界清楚的灰黄色类圆形结节(病变3), 大小为2.5 cm × 2.5 cm × 2.0 cm, 质地中等; 镜下显示病变为分化较成熟的胰腺腺泡、导管及胰岛结构, 伴平滑肌组织显著增生; 病变周边见成团的小圆细胞, 他们形态均一, 胞质淡染, 分布于深肌层和浆膜层, 排列成索状, 有的位于扩张的血窦内(图3); 这些细胞团呈CK18、

同行评价

胃内同时发生典型类癌和腺癌或印戒细胞癌非常少见, 曾有1例胃内同时出现腺癌、类癌和神经内分泌黏液瘤的报道。本病例在胃的不同部位同时出现三种不同类型的肿瘤或病变, 确实非常罕见, 有报道价值。

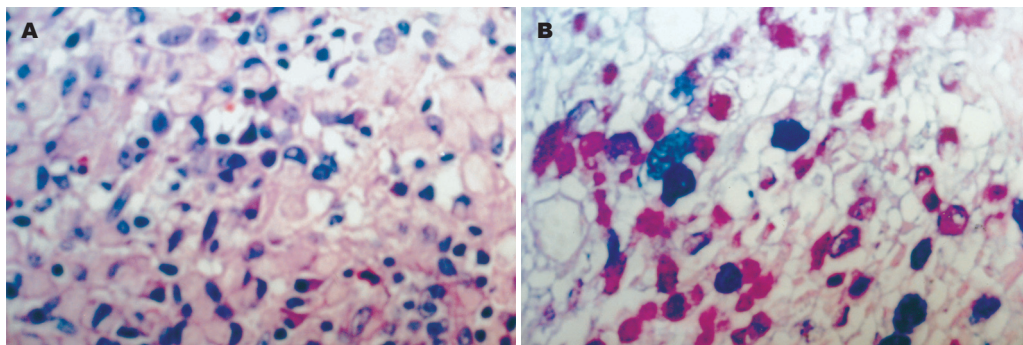


图2 胃体部小弯侧黏膜固有层内印戒细胞癌。A: HE $\times 40$; B: AB/PAS $\times 40$ 。

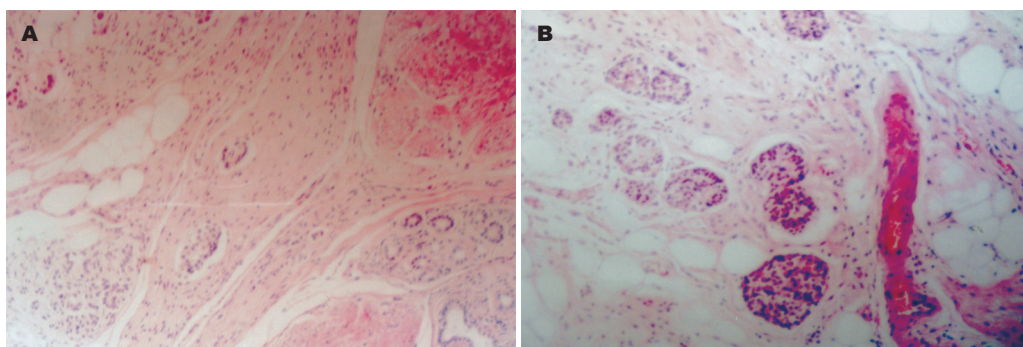


图3 胃窦部肌层异位胰腺组织, 镜下显示病变为分化较成熟的胰腺腺泡、导管及胰岛结构, 伴平滑肌组织显著增生。A: HE $\times 10$; B: 异位胰腺组织病变周边见成团的小圆细胞, 他们形态均一, 胞质淡染, 分布于深肌层和浆膜层, 排列成索状, 有的位于扩张的血窦内, HE $\times 20$ 。

CgA、SY阳性, 由产生胰岛素、胰高血糖素、生长抑素和胃泌素的细胞组成, 形态学和免疫组织化学表型上与异位胰腺组织内胰岛结构相似。上述3种病变不连续, 其组织化学表型也不同(表1)。

病理诊断为: 胃体小弯黏膜内浅表平坦型印戒细胞癌; 胃体大弯前壁多灶性内分泌细胞增生伴类癌形成, 类癌组织浸润至黏膜肌层; 胃窦-幽门部肌层及浆膜层内胰腺组织异位伴内分泌细胞增生。上、下切缘净。胃旁淋巴结未见肿瘤转移灶(0/12)。该患者术后已13 mo, 未见肿瘤复发或转移证据。

3 讨论

2000年WHO将胃的内分泌肿瘤分为类癌(高分化内分泌肿瘤), 小细胞癌(低分化内分泌肿瘤)和瘤样病变(包括内分泌细胞增生和不典型增生)^[4], 其中类癌占大多数, 主要由肠嗜铬样细胞(ECL细胞)组成^[5]。类癌分为3型: I型与自身免疫性萎缩性胃炎相关; II型与多发性内分泌肿瘤综合征I型(MEN-I)和/或卓-艾综合征(ZES)相关; III型为散发型^[6]。I、II型遵从“内分泌

细胞增生-不典型增生-肿瘤形成”的发生、发展过程, 内分泌细胞增生和不典型增生均被认为是其前期病变^[7]。当内分泌细胞增生形成结节直径 >0.5 cm或浸润黏膜下层时即应诊断为类癌^[8]。本例胃黏膜活检表现为自身免疫性轻-中度萎缩性胃炎伴多灶性内分泌细胞增生, 并在局部形成直径0.7 cm的结节, 该病变浸润黏膜肌层, 其相邻胃黏膜内可见内分泌细胞增生, 符合内分泌细胞增生伴I型类癌形成。

本例标本在胃体小弯黏膜内查见表浅的印戒细胞癌(病变2)。这是否为一种特殊的印戒样内分泌细胞癌^[9-11]? 即这个病灶是否由类癌(病变1)播散而来? 有3点理由不支持上述假设。首先, 二者形态不同, 类癌和印戒细胞癌均为典型的病变, 形态学表型无相似之处; 其次, 两个病变发生部位不同, 而且相距较远; 另外, 两个病变各有不同的组织化学表型, 病变1呈黏液染色阴性、神经内分泌标志物阳性, 而病变2为黏液反应阳性、神经内分泌标志物阴性。因此, 二者为各自独立的病变。文献中胃类癌合并腺癌的报道共5例^[12-16], 其中仅1例为合并印戒细胞癌^[16]。

表 1 胃黏膜内类癌、印戒细胞癌和胃壁异位胰腺组织的免疫组织化学表型

标志物	黏膜病变			异位胰腺 (病变3)			
	类癌 (病变1)	增生的内 分泌细胞 (病变2)	SRC (病变2)	增生的内分 泌细胞团	胰岛	腺泡	导管
CK18	+++	+++	+++	+	+	++	++
Vimentin	-	-	-	-	-	-	-
NSE	++	+-++	-	+++	+++	-	+
CgA	+++	+++	-	+++	+++	-	+
Synaptophysin	+++	+++	-	+++	+++	-	+
Insulin	-	-	-	+++	+++	-	±
Glucagon	-	-	-	++	++	-	+
Somatostatin	-	+	-	++	++	±	±
Gastrin	-	++	-	++	++	-	±
VIP	±	+	-	±	±	-	-
ACTH	-	-	-	-	-	-	-
PP	-	-	-	-	-	+	±
P53 protein	2%	-	-	-	-	-	-
Ki-67-LI (%)	2	<1	20	1	<1	3	5

CgA: 嗜铬颗粒蛋白A; VIP: 血管活性肠肽; PP: 胰多肽; Ki-67-LI: Ki-67标记指数; 阳性定义标准: 显微镜下任选5个代表性区域, 计数阳性细胞占同类细胞的百分比。未见阳性细胞为(-); 阳性细胞比率<5%为(±); 25%-50%为(++); >50%为(+++)。

胃内胰腺组织异位发生率为0.6%-13.7%^[3], 通常位于幽门附近、胃大弯前壁或后壁, 最常见于黏膜下, 也可位于肌层或浆膜下。组织学上, 胰腺组织异位分为四型: I型包含有胰腺的全部成分; II型仅由胰导管成分构成; III型仅由腺泡成分构成; IV型仅含有内分泌组织, 由产生多种胰岛激素的细胞构成^[17]。胃壁胰腺异位通常无症状, 偶可因胃黏膜侵蚀引起腹痛、上消化道反复出血、梗阻或恶变。异位胰腺恶变几率虽然相当低, 但已经有转变为腺癌^[18-25]或神经内分泌肿瘤的报道^[26]。判定异位胰腺恶变的标准有3点: 肿瘤必须在异位胰腺组织内部或附近; 肿瘤必须与异位胰腺组织有移行; 非恶变的胰腺组织应当包含分化良好的腺泡和导管^[3]。此外, 功能性胰腺内分泌肿瘤仅由分泌一种激素的细胞组成, 此点与内分泌组织增生不同。本例属于I型胰腺组织异位, 但内分泌部增生较显著, 尤其是在病变周边部分, 在肌层和浆膜层内浸润, 有的位于扩张的血窦内。这些内分泌细胞增生性病变形态与病变1(类癌)相似。那么, 病变3中的这些多灶内分泌细胞增生是否已经是肿瘤性病变(即类癌)? 与类癌(病变1)的关系如何? 是否属于病变1的浸润性病灶? 明确这一点将直接影响本例类癌的临床分期。我们的观察显示, 病变3大部分区域中内分泌部与外分泌部相间排列; 功能上, 病变3的内分泌组织由胰岛素、胰高血

糖素和生长抑素阳性细胞组成, 这与正常胰岛的细胞组成相似, 反映了其多克隆性; 而病变1中未见上述激素合成(表1)。这说明, 病变3中的内分泌组织是非肿瘤性增生, 与病变1各自独立, 不是由后者播散形成的。本例属于I型类癌伴胃黏膜内印戒细胞癌及胃窦和幽门部胰腺组织异位。至于这3种病变在发生机制上是否有内在联系, 有待今后观察。

致谢: 此研究得益于与刘复生教授的讨论以及薛新华和刘秀云技师的支持。

4 参考文献

- 1 Modlin IM, Kidd M, Lye KD. Biology and management of gastric carcinoid tumours: a review. *Eur J Surg* 2002; 168: 669-683
- 2 Yang XF, Yang L, Mao XY, Wu DY, Zhang SM, Xin Y. Pathobiological behavior and molecular mechanism of signet-ring cell carcinoma and mucinous adenocarcinoma of the stomach: a comparative study. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 750-754
- 3 Lack EE. Congenital and developmental abnormalities of the pancreas. In: *Pathology of the Pancreas, Gallbladder, Extrahepatic Biliary, and Ampullary Region*. 1st ed. New York: Oxford University Press Inc, 2003: 44-62
- 4 Hamilton SR, Aaltonen LA. (Eds): *Endocrine tumours of the stomach*. In: *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*. Lyon: IARC Press, 2000
- 5 Modlin IM, Lye KD, Kidd M. Carcinoid tumors of

- the stomach. *Surg Oncol* 2003; 12: 153-172
- 6 Rindi G, Luinetti O, Cornaggia M, Capella C, Solcia E. Three subtypes of gastric argyrophil carcinoid and the gastric neuroendocrine carcinoma: a clinicopathologic study. *Gastroenterology* 1993; 104: 994-1006
- 7 Solcia E, Fiocca R, Villani L, Luinetti O, Capella C. Hyperplastic, dysplastic, and neoplastic enterochromaffin-like-cell proliferations of the gastric mucosa. Classification and histogenesis. *Am J Surg Pathol* 1995; 19: S1-S7
- 8 Bordi C, Annibale B, Azzoni C, Marignani M, Ferraro G, Antonelli G, D'Adda T, D'Ambra G, Delle Fave G. Endocrine cell growths in atrophic body gastritis. Critical evaluation of a histological classification. *J Pathol* 1997; 182: 339-346
- 9 Waldum HL, Aase S, Kvetnoi I, Brenna E, Sandvik AK, Syversen U, Johnsen G, Vatten L, Polak JM. Neuroendocrine differentiation in human gastric carcinoma. *Cancer* 1998; 83: 435-444
- 10 Sugihara A, Nakasho K, Yamada N, Nakagomi N, Tsujimura T, Terada N, Tsuji M. Neuroendocrine differentiation of periodic-acid Schiff and Alcian blue-negative signet-ring cell-like cells and tubular adenocarcinoma cells within a gastric cancer. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 795-800
- 11 Morii S, Oka K, Hakozaiki H, Nihei T, Mori N. CEA-producing mucin-negative gastric signet-ring cell carcinoma with neuroendocrine markers: a case report. *J Clin Gastroenterol* 1999; 29: 82-85
- 12 Olinici CD, Crisan D, Racu I. Synchronous gastric adenocarcinoma and carcinoid. *Rom J Gastroenterol* 2004; 13: 135-137
- 13 De Marco L, Carlinfante G, Botticelli L, Di Maira PV, Putrino I, Cavazza A. Mixed neoplasia of the stomach: description of a case of tubular adenoma combined with carcinoid. *Pathologica* 2003; 95: 214-216
- 14 Adhikari D, Conte C, Eskreis D, Urmacher C, Ellen K. Combined adenocarcinoma and carcinoid tumor in atrophic gastritis. *Ann Clin Lab Sci* 2002; 32: 422-427
- 15 翟梅娟, 章美珍, 赵再秋, 吴丽娟, 黄雅萍. 胃肠道混合性类癌-腺癌三例. *中华肿瘤杂志* 2003; 25: 447
- 16 Fujiyoshi Y, Kuhara H, Eimoto T. Composite glandular-endocrine cell carcinoma of the stomach. Report of two cases with goblet cell carcinoid component. *Pathol Res Pract* 2005; 200: 823-829
- 17 Hammock L, Jorda M. Gastric endocrine pancreatic heterotopia. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126: 464-467
- 18 Emerson L, Layfield LJ, Rohr LR, Dayton MT. Adenocarcinoma arising in association with gastric heterotopic pancreas: A case report and review of the literature. *J Surg Oncol* 2004; 87: 53-57
- 19 Ura H, Denno R, Hirata K, Saeki A, Hirata K, Natori H. Carcinoma arising from ectopic pancreas in the stomach: endosonographic detection of malignant change. *J Clin Ultrasound* 1998; 26: 265-268
- 20 Song DE, Kwon Y, Kim KR, Oh ST, Kim JS. Adenocarcinoma arising in gastric heterotopic pancreas: a case report. *J Korean Med Sci* 2004; 19: 145-148
- 21 Sun Y, Wasserman PG. Acinar cell carcinoma arising in the stomach: a case report with literature review. *Hum Pathol* 2004; 35: 263-265
- 22 Osanai M, Miyokawa N, Tamaki T, Yonekawa M, Kawamura A, Sawada N. Adenocarcinoma arising in gastric heterotopic pancreas: clinicopathological and immunohistochemical study with genetic analysis of a case. *Pathol Int* 2001; 51: 549-554
- 23 Herold G, Kraft K. Adenocarcinoma arising from ectopic gastric pancreas: two case reports with a review of the literature. *Z Gastroenterol* 1995; 33: 260-264
- 24 Hickman DM, Frey CF, Carson JW. Adenocarcinoma arising in gastric heterotopic pancreas. *West J Med* 1981; 135: 57-62
- 25 Tanimura A, Yamamoto H, Shibata H, Sano E. Carcinoma in heterotopic gastric pancreas. *Acta Pathol Jpn* 1979; 29: 251-257
- 26 Chetty R, Weinreb I. Gastric neuroendocrine carcinoma arising from heterotopic pancreatic tissue. *J Clin Pathol* 2004; 57: 314-317

电编 张敏 编辑 潘伯荣

TGF- α 和EGFR在Barrett食管和食管腺癌的表达

呼闯营, 贺彩峰

呼闯营, 贺彩峰, 苏州大学附属第二医院消化科 江苏省苏州市 215004

呼闯营, 2005年华中科技大学同济医学院博士毕业, 讲师, 主要从事消化道肿瘤的研究。

通讯作者: 呼闯营, 215004, 江苏省苏州市三香路1055号, 苏州大学附属第二医院消化科, huchuangying@163.com

电话: 0512-68631229 传真: 0512-68284303

收稿日期: 2006-02-14 接受日期: 2006-03-06

Expression of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma

Chuang-Ying Hu, Cai-Feng He

Chuang-Ying Hu, Cai-Feng He, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou 215004, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Dr. Chuang-Ying Hu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Suzhou University, 1055 Sanxiang Avenue, Suzhou 215004, Jiangsu Province, China. huchuangying@163.com

Received: 2006-02-14 Accepted: 2006-03-06

Abstract

AIM: To investigate the expression of transforming growth factor alpha (TGF- α) and epidermal growth factor receptor (EGFR) in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma.

METHODS: Immunohistochemistry (SABC assay) was used to detect the expression of TGF- α and EGFR protein in patients with reflux esophagitis ($n = 13$), Barrett's esophagus ($n = 17$), esophageal adenocarcinoma ($n = 11$) and normal esophageal mucosa ($n = 30$).

RESULTS: In the development of reflux esophagitis, Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma, the expression of TGF- α and EGFR protein increased gradually and closely correlated with each other ($r = 0.951$, $P < 0.01$). TGF- α protein was mainly expressed in the cytoplasm. EGFR was expressed in the cellular membrane in the normal esophageal mucosa and reflux esophagitis, but strongly positively expression

was also observed in the cytoplasm and nucleus of cells in Barrett's esophagus with dysplasia and esophageal adenocarcinoma.

CONCLUSION: TGF- α and EGFR expression increase and may play synergic roles in the development of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma.

Key Words: TGF- α ; EGFR; Barrett's esophagus; Esophageal adenocarcinoma

Hu CY, He CF. Expression of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(9):879-883

摘要

目的: 研究Barrett食管和食管腺癌中TGF- α 和EGFR的表达意义。

方法: 采用免疫组化SABC法检测反流性食管炎13例、Barrett食管17例和食管腺癌11例中TGF- α 和EGFR的表达, 并以30例正常食管黏膜为对照, 运用免疫组化图像分析加以定量, 进行统计学的分析和比较。

结果: TGF- α 和EGFR在正常食管黏膜、反流性食管炎、Barrett食管和食管腺癌的表达逐渐增高, 二者呈明显的正相关($r = 0.951$, $P < 0.01$); TGF- α 主要表达于细胞质, EGFR在正常食管黏膜和反流性食管炎表达于细胞膜, 而在Barrett食管非典型增生和食管腺癌, 则可见细胞质和细胞核的明显表达。

结论: TGF- α 和EGFR在反流性食管炎、Barrett食管和食管腺癌中表达逐渐增高并且相互作用, 可能对Barrett食管和食管腺癌的发生、发展起一定的作用。

关键词: 转化生长因子 α ; 表皮生长因子受体; Barrett食管; 食管腺癌

呼闯营, 贺彩峰. TGF- α 和EGFR在Barrett食管和食管腺癌的表达. *世界华人消化杂志* 2006;14(9):879-883

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/879.asp>

■背景资料

胃食管反流病是消化系统的常见病。慢性胃食管反流一个常见和潜在的严重后果是食管原有的鳞状上皮被化生的柱状上皮增殖所替代, 这一状况被称为Barrett食管。这种化生上皮可能进展至食管腺癌。本文研究了Barrett食管和食管腺癌中TGF- α 和EGFR的表达意义。

■ 研发前沿

源于Barrett上皮化生的食管腺癌的形成是一个由多因素参与的多步骤的过程,包括有癌基因与抑癌基因、生长因子、黏附分子、细胞增殖与凋亡及其调控失衡等的参与和作用。

表 1 TGF- α 和EGFR免疫组化表达量(面密度, mean \pm SD)

分组	<i>n</i>	男:女	年龄(岁)	TGF- α	EGFR
对照组	30	21:9	43(26-71)	0.036 \pm 0.003	0.089 \pm 0.005
反流性食管炎	13	9:4	41(28-67)	0.045 \pm 0.009	0.236 \pm 0.031
Barrett食管	10	7:3	39(26-51)	0.469 \pm 0.054	0.381 \pm 0.029
非典型增生	7	5:2	52(35-71)	0.590 \pm 0.053	0.388 \pm 0.033
食管腺癌	11	6:5	60(37-75)	0.768 \pm 0.069	0.426 \pm 0.040

0 引言

Barrett食管是反流性食管炎的主要并发症之一,他是由于长期胃食管反流导致柱状上皮化生替代正常食管鳞状上皮的一种病理现象,被认为是食管腺癌的癌前病变^[1-2]。在过去30 a里,食管腺癌的发病增长速度远远超出其他肿瘤,严重威胁着人类健康,而大多数食管腺癌可能来源于Barrett上皮化生^[3-7]。但是,在胃食管反流者中只有少数发生了Barrett食管,而Barrett食管发展为食管腺癌的年发生率估计约为0.2%-2%^[8-10]。目前研究表明,源于Barrett上皮化生的食管腺癌的形成是一个由多因素参与的多步骤的过程,在这一过程中,转化生长因子(transforming growth factor alpha, TGF- α)和其受体表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)可能起一定作用^[11-12]。我们通过免疫组化法及图像分析,探讨TGF- α 和EGFR在反流性食管炎、Barrett食管和食管腺癌中的表达变化及其意义,初步阐述二者在其发生、发展中的作用,为Barrett食管和食管腺癌的发病机制提供可能的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 反流性食管炎13例经临床、内镜及24 h食管pH检测确诊,根据我国食管炎内镜诊断标准^[13]分级为II-III级。Barrett食管17例,其组织标本来源于胃-食管交界处上方3 cm以上的舌形、岛形或环周形病灶黏膜,均在内镜下取得,并经病理诊断证实伴有肠化者收入本研究;在17例Barrett食管中,7例属非典型增生,其中6例为中-重度不典型增生。食管腺癌11例收集于病理科标本。对照组30例为反流性食管炎和Barrett食管患者自身正常食管黏膜,均取自胃-食管交界处上方3 cm以上且距病灶缘至少5 cm之外,并经病理证实为正常食管鳞状上皮。TGF- α 和EGFR多克隆抗体、相应二抗IgG和SABC试剂盒均购自武汉博士德生物公司。

1.2 方法 实验采用免疫组织化学链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合法SABC法,具体操作步骤按说明书进行,免疫反应阳性物呈淡黄色或棕褐色,以PBS代替一抗作为阴性对照。免疫组化图像分析采用北航多功能真彩色病理分析图像-[miad]软件,每例标本选3个不同视野,以阳性目标总面积/统计场总面积即面密度为指标,在光镜下进行定量分析。

统计学处理 计量资料用mean \pm SD表示, TGF- α 和EGFR组内差异分别采用 F 检验,二者之间的相关性采用Spearman等级相关分析法, $P < 0.05$ 为显著性差异。

2 结果

2.1 TGF- α 和EGFR的表达 在正常食管黏膜, TGF- α 几乎无表达, EGFR弱表达;在反流性食管炎, TGF- α 表达仍很低,而EGFR的表达明显增加($P < 0.05$);在Barrett食管, TGF- α 和EGFR表达量均较反流性食管炎明显增加($P < 0.05$, $P < 0.05$);在Barrett食管非典型增生, TGF- α 和EGFR的表达虽然有所增加,但与Barrett食管组相比无统计学意义; TGF- α 和EGFR在食管腺癌中的表达最高,与Barrett食管相比,具有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.05$)(表1)。TGF- α 主要表达于细胞质; EGFR则定位于正常食管黏膜和反流性食管炎的细胞膜,在Barrett食管中-重度非典型增生和食管腺癌中, EGFR除表达于细胞质,在细胞核也可见明显的表达(图1)。

2.2 TGF- α 和EGFR的相关性 TGF- α 和EGFR在正常食管黏膜、反流性食管炎、Barrett食管、Barrett食管非典型增生和食管腺癌组表达增幅虽不尽一致,但均呈逐渐增高趋势。通过绘制散点图发现, TGF- α 和EGFR在上述五组中的表达呈非线性关系,而且为等级资料,故采用Spearman等级相关分析法,二者在统计学上呈显著的正相关($r = 0.951$, $P < 0.01$)(图2)。

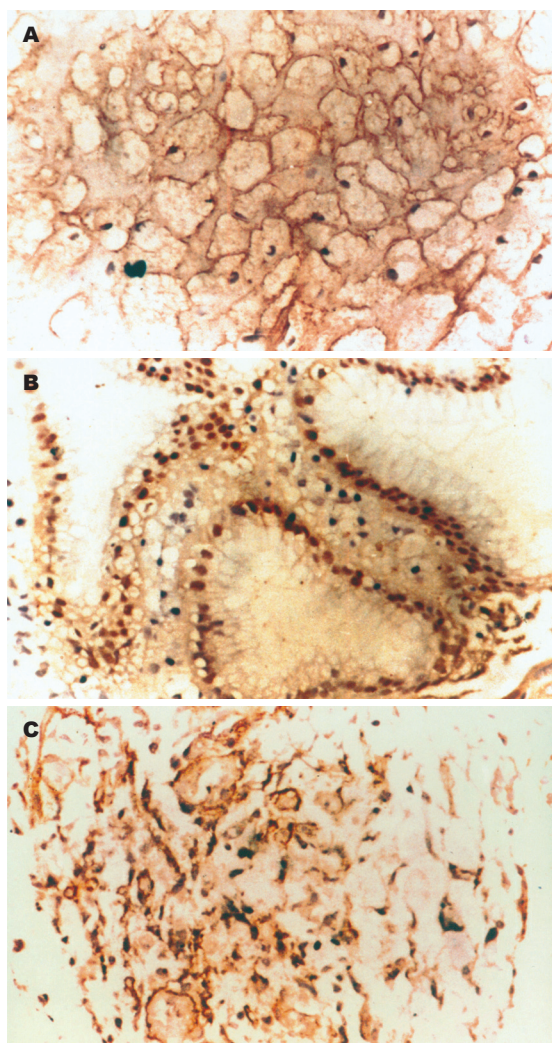


图1 食管组织EGFR的表达 (SABC $\times 200$). A: 反流性食管炎; B: Barrett食管非典型增生; C: 食管腺癌.

3 讨论

生长因子是一类能与细胞膜特异受体呈高亲和力结合而刺激细胞增殖的多肽. 肿瘤细胞自身分泌的生长因子可不断地刺激自身细胞的生长, 是肿瘤发生和发展的重要因素之一^[14-16]. TGF- α 最早发现于病毒感染细胞, 此后证实多种肿瘤细胞可分泌TGF- α 并促进自身的生长. EGFR是TGF- α 和表皮生长因子EGF的共同受体, 与TGF- α 和EGF的亲合力相同, 但EGF的活性远远低于TGF- α . 表达异常的TGF- α 如果与过量表达或结构改变的EGFR结合并相互作用, 则可使细胞获得恶性增殖优势^[17-18]. 在食管炎、Barrett食管和食管腺癌也分别有TGF- α 和EGFR表达异常的报道^[19-23]. 我们采用免疫组化法和图像分析定量, 检测了包括反流性食管炎、Barrett食管和食管腺癌以及正常食管黏膜TGF- α 和EGFR的表达变化, 以期从肿瘤细胞自身分泌生长因子方

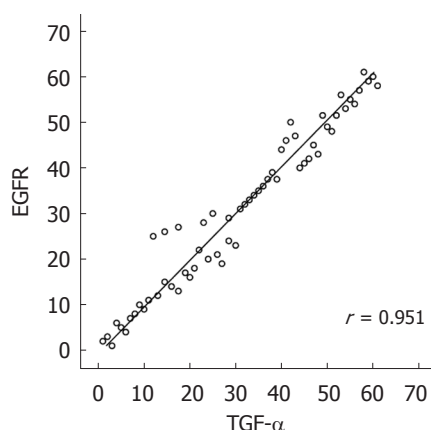


图2 TGF- α 和EGFR的相关性 (Spearman等级相关分析法).

面解释部分反流性食管炎发展为Barrett食管, 并在此基础上恶变为食管腺癌的可能机制. 结果显示: 从正常食管黏膜、反流性食管炎、Barrett食管和非典型增生到食管腺癌, TGF- α 和EGFR的表达呈现逐渐增高的趋势, 但增幅并不一致, TGF- α 主要定位于细胞质, EGFR则表达广泛. 在正常食管黏膜, TGF- α 几乎无表达, 提示正常食管鳞状上皮可能缺乏生成和分泌TGF- α 的能力, EGFR则少量表达于细胞膜. 在反流性食管炎, TGF- α 表达仍很低, 提示TGF- α 在反流性食管炎炎症反应中不起重要作用, 而EGFR表达增高可能是机体保护反应所致, 其机制可能与其他因素有关^[24-25]. 当Barrett食管形成后, 肠化型柱状细胞可大量合成和分泌TGF- α 及EGFR, 二者结合可促进细胞的分化和增殖, 而且细胞异型性增生程度越高, 这种能力越强, 最终导致部分细胞发生癌变. 在Barrett食管非典型增生和食管腺癌, TGF- α 和EGFR的表达明显增高, 而且EGFR分布广泛, 他不仅表达于细胞质, 细胞核也可见明显的表达. EGFR的高表达特别是细胞核的高表达可能是细胞核过度增殖和细胞异型的表现, 是细胞恶性程度的标志之一^[26-27]. EGFR从细胞膜转位至细胞核是否参与了Barrett食管和食管腺癌的发生、发展过程, 尚有待进一步证实.

我们试用Spearman等级相关分析法探讨了TGF- α 和EGFR从正常食管黏膜、反流性食管炎、Barrett食管和非典型增生到食管腺癌过程中表达的相关性, 统计学显示二者存在明显的正相关, 提示TGF- α 和EGFR同时参与并可能共同作用于Barrett食管和食管腺癌的发生、发展, 其内在机制可能在于二者系受体配体间相互作用的关系^[28-30]. 综上所述, TGF- α 和EGFR在反流性食管炎、Barrett食管和食管腺癌中表达逐渐

■创新盘点

本实验系统地研究了转化生长因子TGF- α 及其受体EGFR在反流性食管炎-Barrett食管-食管腺癌这一序贯过程中的表达, 结果发现二者呈逐渐增高的趋势, 并且具有明显的相关性, 提示TGF- α 和EGFR可能在Barrett食管和食管腺癌的发生、发展中起一定的作用.

同行评价

本文探讨了Barrett食管和食管腺癌中TGF- α 和EGFR的表达情况,对认识Barrett食管和食管腺癌中分子生物学的改变有一定意义。立题新颖,设计合理。

增高及其相互作用,可能对Barrett食管和食管腺癌的发生、发展起一定的作用。TGF- α 和EGFR在反流性食管炎、Barrett食管和食管腺癌的表达并不一致,联合检测TGF- α 和EGFR可能更有助于准确地判断病情和预测疾病的进展。

参考文献

- Falk GW. Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2002; 122: 1569-1591
- Solaymani-Dodaran M, Logan RF, West J, Card T, Coupland C. Risk of oesophageal cancer in Barrett's oesophagus and gastro-oesophageal reflux. *Gut* 2004; 53: 1070-1074
- Blot WJ, McLaughlin JK. The changing epidemiology of esophageal cancer. *Semin Oncol* 1999; 26: 2-8
- Deviere J. Barrett's oesophagus: the new endoscopic modalities have a future. *Gut* 2005; 54: i33-i37
- Pohl H, Welch HG. The role of overdiagnosis and reclassification in the marked increase of esophageal adenocarcinoma incidence. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 142-146
- van Blankenstein M, Looman CW, Hop WC, Bytzer P. The incidence of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the esophagus: Barrett's esophagus makes a difference. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 766-774
- Solaymani-Dodaran M, Logan RF, West J, Card T. Mortality associated with Barrett's esophagus and gastroesophageal reflux disease diagnoses-a population-based cohort study. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2616-2621
- Conio M, Bianchi S, Lapertosa G, Ferraris R, Sablich R, Marchi S, D'Onofrio V, Lacchin T, Iaquinio G, Missale G, Ravelli P, Cestari R, Benedetti G, Macri G, Fiocca R, Munizzi F, Filiberti R. Long-term endoscopic surveillance of patients with Barrett's esophagus. Incidence of dysplasia and adenocarcinoma: a prospective study. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1931-1939
- Murray L, Watson P, Johnston B, Sloan J, Mainie IM, Gavin A. Risk of adenocarcinoma in Barrett's oesophagus: population based study. *BMJ* 2003; 327: 534-535
- Wolfsen HC. Present status of photodynamic therapy for high-grade dysplasia in Barrett's esophagus. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 189-202
- Yacoub L, Goldman H, Odze RD. Transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor receptor, and MiB-1 expression in Barrett's-associated neoplasia: correlation with prognosis. *Mod Pathol* 1997; 10: 105-112
- 付建华, 杨达宽, 黄云超, 胡国强. EGFR基因蛋白在食管癌组织的表达及临床意义. *消化外科* 2004; 3: 105-108
- 任旭. 反流性食管炎的内镜和病理学诊断及分级. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 1127-1128
- Bianco R, Troiani T, Tortora G, Ciardiello F. Intrinsic and acquired resistance to EGFR inhibitors in human cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12: S159-S171
- Hofer EL, La Russa V, Honegger AE, Bullorsky EO, Bordenave RH, Chasseing NA. Alteration on the expression of IL-1, PDGF, TGF-beta, EGF, and FGF receptors and c-Fos and c-Myc proteins in bone marrow mesenchymal stroma cells from advanced untreated lung and breast cancer patients. *Stem Cells Dev* 2005; 14: 587-594
- Gee JM, Robertson JF, Gutteridge E, Ellis IO, Pinder SE, Rubini M, Nicholson RI. Epidermal growth factor receptor/HER2/insulin-like growth factor receptor signalling and oestrogen receptor activity in clinical breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12: S99-S111
- Hantschmann P, Jeschke U, Friese K. TGF-alpha, c-erbB-2 expression and neoangiogenesis in vulvar squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2005; 25: 1731-1737
- Mulet A, Garrido G, Alvarez A, Menendez T, Bohmer FD, Perez R, Fernandez LE. The enlargement of the hormone immune deprivation concept to the blocking of TGFalpha-autocrine loop: EGFR signaling inhibition. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 628-638
- Fujiwara Y, Higuchi K, Hamaguchi M, Takashima T, Watanabe T, Tominaga K, Oshitani N, Matsumoto T, Arakawa T. Increased expression of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptors in rat chronic reflux esophagitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 521-527
- Aloia TA, Harpole DH Jr, Reed CE, Allegra C, Moore MB, Herndon JE 2nd, D'Amico TA. Tumor marker expression is predictive of survival in patients with esophageal cancer. *Ann Thorac Surg* 2001; 72: 859-866
- Wilkinson NW, Black JD, Roukhadze E, Driscoll D, Smiley S, Hoshi H, Geradts J, Javle M, Brattain M. Epidermal growth factor receptor expression correlates with histologic grade in resected esophageal adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg* 2004; 8: 448-453
- Nishigaki H, Wada K, Tatsuguchi A, Sueoka N, Futagami S, Gudis K, Miyake K, Tsukui T, Sakamoto C. ErbB2 without erbB3 expression in metaplastic columnar epithelium of Barrett's esophagus. *Digestion* 2004; 70: 95-102
- Li Y, Wo JM, Ray MB, Jones W, Su RR, Ellis S, Martin RC. Cyclooxygenase-2 and epithelial growth factor receptor up-regulation during progression of Barrett's esophagus to adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 928-934
- Hou Z, Sang S, You H, Lee MJ, Hong J, Chin KV, Yang CS. Mechanism of action of (-)-epigallocatechin-3-gallate: auto-oxidation-dependent inactivation of epidermal growth factor receptor and direct effects on growth inhibition in human esophageal cancer KYSE 150 cells. *Cancer Res* 2005; 65: 8049-8056
- Lanas AI, Blas JM, Ortego J, Soria J, Sainz R. Adaptation of esophageal mucosa to acid- and pepsin-induced damage: role of nitric oxide and epidermal growth factor. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 1003-1012
- Lo HW, Hsu SC, Hung MC. EGFR signaling pathway in breast cancers: from traditional signal transduction to direct nuclear translocation. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 95: 211-218
- Lo HW, Hung MC. Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival. *Br J Cancer* 2006; 94: 184-188
- Tamada H, Tominaga M, Kida K, Kawate N, Inaba T, Matsuyama S, Sawada T. Detection of transforming

- growth factor- α and epidermal growth factor receptor mRNA and immunohistochemical localization of the corresponding proteins in the canine uterus during the estrous cycle. *Histol Histopathol* 2005; 20: 817-824
- 29 Martinez-Arca S, Bech-Serra JJ, Hurtado-Kuttner M, Borroto A, Arribas J. Recycling of cell surface pro-transforming growth factor- $\{\alpha\}$ regulates epidermal growth factor receptor activation. *J Biol Chem* 2005; 280: 36970-36977
- 30 Yamamoto M, Yanaga H, Nishina H, Watabe S, Mamba K. Fibrin stimulates the proliferation of human keratinocytes through the autocrine mechanism of transforming growth factor- α and epidermal growth factor receptor. *Tohoku J Exp Med* 2005; 207: 33-40

电编 张敏 编辑 潘伯荣

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

• 消息 •

更正与说明专栏

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

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

• 消息 •

专家门诊

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

胃溃疡诊断和治疗

个人简介(附3.5 cm \times 5 cm照片一张)

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

0 引言

1 诊断

2 治疗

3 特色

4 门诊时间

胆汁返流与Barrett食管及食管肿瘤

台卫平, 张玫, 罗和生

■背景资料

Barrett食管是一类公认的食管腺癌癌前病变, 目前有研究显示胆汁返流与Barrett食管及食管腺癌有关联。有研究显示胆汁返流可能导致Barrett食管发病率上升, 从而食管腺癌发生率亦上升。其可能的机制涉及到返流时胆盐在Barrett食管过程中对有关癌基因的影响、慢性炎症在其中的作用、胆囊切除术后相应的解剖学改变等。

台卫平, 张玫, 首都医科大学宣武医院消化内科 北京市 100053

罗和生, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060
北京市委组织部北京市优秀人才培养专项基金资助, No. 20042D0501814

通讯作者: 台卫平, 100053, 北京市, 首都医科大学宣武医院消化内科, taiweiping@sohu.com

电话: 010-63010046

收稿日期: 2006-01-11 接受日期: 2006-02-08

摘要

Barrett食管是一类公认的食管腺癌癌前病变, 在西方国家常见。近年来在中国也有上升的趋势。目前有研究显示胆汁返流与Barrett食管及食管腺癌有关联。有研究显示胆汁返流可能导致Barrett食管发病率上升, 从而食管腺癌发生率亦上升。其可能的机制涉及到返流时胆盐在Barrett食管过程中对有关癌基因的影响、慢性炎症在其中的作用、胆囊切除术后相应的解剖学改变等。本文就此作一综述。

关键词: 胆汁返流; Barrett食管; 肿瘤

台卫平, 张玫, 罗和生. 胆汁返流与Barrett食管及食管肿瘤. 世界华人消化杂志 2006; 14(9): 884-887

http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/884.asp

0 引言

1950年, 英国医师Barrett首次报告了食管的柱状上皮化病例, Barrett食管(Barrett esophagus, BE)最初的定义为食管远端的正常鳞状上皮被替代, 其受累长度大于3 cm。目前认为, 食管下端的复层鳞状上皮被化生的柱状上皮所代替, 无论是化生的胃上皮、小肠上皮或者大肠上皮, 都可以定义为BE, 而不考虑其受累长度。Barrett食管是一类公认的食管腺癌癌前病变, 在西方国家常见。近年来在中国也有上升的趋势。食管腺癌的发病率在西方国家中在过去的数十年间上升了数倍, 食管腺癌的主要危险因素为Barrett食管。结直肠腺瘤-腺癌序列及其潜在的分子突变序列已经作为癌变进展模型被广泛接受, 与之类似的食管腺癌模型发生通路正在建立, 包括食管黏膜炎症-化生-不典型增生-癌序列。许多学者的研究显示不仅胃返流, 十二指肠返流在

BE和腺癌的病理生理过程中也起到一个重要的作用。以前有观点认为BE是先天性发育异常所致, 现认为BE是胃食管返流疾病(GERD)的严重并发症, 大多继发于返流性食管炎。长期以来, 胃酸一直被认为是引起GERD患者食管损伤的主要因素^[1]。随着食管内24 h pH检测及胆红素监测的应用, 胆汁返流在BE形成中的作用日益受到重视^[2]。胆汁是十二指肠内容物的主要成分, 故测定食管内胆汁的含量可代表食管暴露于十二指肠内容物的时间及量。

1 相关结果

十二指肠食管返流已被证实可以促进实验动物中食管癌的发生, 最近的研究证实十二指肠返流(DERD)或者十二指肠胃返流(DGRD)可以促进食管癌的发生, 甚至是在没有致癌物质存在的情况下^[3]。相反, 单纯胃返流并不能导致这一化生-癌的序列发生^[4]。这些试验证实了暴露于十二指肠内容物情况下食管腺癌肿瘤发生的重要性^[5]。

BE的抗返流手术其效果尚不确切。有文献报道抗返流手术后BE可以完全缓解^[6], 化生和肿瘤的危险性可以下降, 但同时也有报道认为抗返流手术很少能够导致完全缓解^[7]。一篇综述报道在340名经历抗返流手术的BE患者中, 74% BE没有变化, 完全和部分缓解的比例分别为4%和12%^[8]。

相反, 最近一项全美国范围的回顾性序列研究提示在经历抗返流手术后, BE患者发展为食管腺癌的危险性较普通人群要高。因此, 抗返流手术可否诱导BE的衰退以及预防其发展为肿瘤仍需要进一步研究^[9]。

也有研究证实十二指肠以及十二指肠胃内容物不仅可以诱导大鼠腐蚀性食管炎, 而且可以诱导为食管腺癌^[10]。相反, 单独胃内容物诱导BE的几率很低, 并不能诱导任何食管腺癌。这些证据显示十二指肠内容物而非胃内容物在大鼠BE的起源和随后的食管腺癌发生中起着重要作用。近年来随着Bilitec 2000胆汁返流检测仪的应

用,使更加可靠的诊断十二指肠返流成为可能,其检测结果与其他十二指肠返流检测方法的大量临床对照研究结果基本一致,被认为能准确地反映十二指肠胃返流和十二指肠胃食管返流。张俊*et al*^[11]研究证实酸返流和胆汁返流在GERD病中均具有重要作用,二者可能具有正性协同作用。

2 机制

2.1 胆盐在Barrett食管病理过程对癌基因的影响 在Barrett食管患者中可以检测到比正常人或者GERD患者更高的胆盐浓度^[12]。其确切机制尚不甚明了,他可以导致c-myc,一类前癌基因的过表达^[13]。一类假设是胆酸可以引起正常细胞凋亡,而已经有p53基因突变的细胞则不然^[14]。给予这些患者明显的胆汁返流而非胃酸,例如,那些经历过胃部手术的患者,其Barrett食管患病率并没有明显的提高,似乎胆酸在其中并不是起关键性的作用^[15-16]。有证据显示只有在胆盐被酸化的情况下,才可以诱导COX-2和c-myc的上调,而在中性pH值环境中则不然^[17]。在pH位于3和6之间时,胆酸是可溶解的而非离子化的,这样使得其可以通过黏膜屏障,集聚于黏膜细胞间,可能导致细胞损伤^[18]。但是,在高pH值时,其仍保持离子状态,从而不能通过细胞屏障。在更低的pH值时,胆酸则被排斥出来。因此,不完全的酸抑制可能事实上促使胆酸施加其毒性作用。同时,联合胆汁和酸性返流在体内已被证实有损伤作用^[19],在体外的作用尚不能够支持这一点^[20]。

2.2 慢性炎症在其中的作用 Fein *et al*^[21]采用以下术式:在胃-食管连接处以上横断食管,切除全胃,十二指肠旷置,将食管断端吻合到Treitz韧带远端、肠系膜对侧的空肠壁上。于术后2 wk和6 wk均未在反流液中检测到N-亚硝基-牛磺胆酸、N-亚硝基-甘氨酸或其他N-亚硝基产物;所有反流液标本虽均表现有细胞毒性,但均无基因毒性。因此胆汁反流的致癌机制与特异性致癌物无关,尤与N-亚硝基-胆汁酸无关,他们认为胆汁反流的致癌作用与食管黏膜的慢性炎症有关。这一观点得到Buttar *et al*^[3]的支持,他们发现胆汁反流能诱导食管黏膜环氧合酶-2(COX-2)的表达,导致组织中前列腺素E₂(PGE₂)水平显著升高。组织中PGE₂水平的升高与黏膜炎症程度加重和腺癌发生率增加显著相关。肿瘤组织中PGE₂的水平显著升高,黏膜的炎症程度亦显著加重。选择性COX-2抑制剂能显著减轻黏

膜炎症,腺癌发生率亦随之降低。但是,组织中COX-2的表达及PGE₂水平的升高不影响Barrett食管和不典型增生的发生率,而Barrett食管是公认的食管腺癌的癌前病变,说明存在其他原因与两者有关。研究认为慢性炎症中的氧化应激损伤可能是原因之一,这一发现来自于大鼠补铁治疗纠正贫血后,食管黏膜炎症显著加重,Barrett食管、不典型增生和腺癌的发生率均显著增高,且癌组织显著增大,表明腺癌发生较早或癌细胞浸润加快^[22]。研究发现组织中脂质、蛋白质和DNA的氧化损伤产物水平显著增高,Barrett上皮细胞和癌细胞中具有细胞保护效应的氧化应激反应基因血红素氧化酶21(HO-1)和金属硫蛋白(MT)基因的表达异常活跃,食管鳞状上皮的基底层细胞亦有MT过量表达,另外,通过组织化学染色发现,铁颗粒在Barrett上皮及围绕其周围的巨噬细胞中沉积明显增多^[23],说明长期胆汁反流能造成食管黏膜炎症,补铁治疗虽纠正了贫血,却使铁离子在炎症局部沉积,而铁离子是目前已知的诱导氧自由基产生最有效的金属离子,因此导致食管黏膜存在持续的氧化应激损伤^[24]。研究认为食管鳞状上皮的基底层细胞内存在上皮内干细胞^[24],其MT基因的过量表达,表明其亦遭受氧化应激损伤,氧自由基使其基因发生突变,致使其向腺上皮分化,形成Barrett食管,而Barrett上皮细胞是Barrett食管黏膜中氧化应激损伤的靶细胞,其基因受氧自由基的损伤,亦发生突变,导致不典型增生,继而形成腺癌。癌细胞中基因的氧化损伤可能与恶性度增加、肿瘤浸润加快有关,表现为癌组织显著扩张。以上研究表明长期胆汁反流能诱导食管黏膜COX-2表达,使PGE₂水平升高,导致食管黏膜炎症。炎症时氧化应激活跃,产生大量氧自由基,氧自由基使食管鳞状上皮基底层的上皮内干细胞发生基因突变,向腺上皮化生,形成Barrett食管。Barrett上皮细胞内基因受氧自由基的损伤,发生突变,形成不典型增生。快速增生的细胞分裂活跃,基因经常暴露于氧自由基而受损伤,因突变累积而形成腺癌。癌细胞的基因再受氧自由基的损伤,使其恶性程度增加、浸润加快。在Barrett食管组织体外培养系统中,酸和胆汁的刺激均能造成COX-2的表达增加,而二羟基胆酸能促进COX-2的转录。

2.3 胆囊切除术与胆汁返流及食管癌 有研究证实患者大于60岁的,比起年轻患者其食管

■研究前沿

目前该领域的研究热点集中在有关癌基因的影响、慢性炎症在其中的作用、胆囊切除术后相应的解剖学改变、动物模型的制作以及大规模的临床前瞻性实验等。

■创新盘点

本文率先对胆汁返流与Barrett食管及食管肿瘤的相关性进行了综述。

腺癌的危险性要高。没有发现食管鳞癌和胆囊切除术的联系。该文发现胆囊切除术和食管腺癌有关,而非胆囊结石。和食管鳞癌之间有关联。其可能的机制是十二指肠胃食管返流(DGER)引起的GERD。胆囊切除后十二指肠胃返流和胃食管返流增加的可能是因为十二指肠液进入食管的可能性增加。在动物试验中已经发现十二指肠液可以增加腺癌的可能性。在鼠的实验研究中,通过建立食管胆囊吻合,可以诱导食管腺癌,而当胆汁引流到下消化道时,则食管腺癌并无增加;已经发现十二指肠胃食管返流(DEGR)导致前肠黏膜(pre-intestinal mucosal)增生,淀粉酶和胆盐对肝脏细胞、结肠细胞以及食管黏膜是有害的^[25-26]。Barrett食管患者有一个高流行的DGER,在发展为腺癌的患者中其发病率更高。其病理生理机制尚不清楚。有不同的理论来解释。一个理论是DGER的食管黏膜中的表皮生长因子的增加,导致了不成熟的细胞转移到表皮表面^[27-28],他们对胆汁成分所引起的损害更加易感。这一机制似乎是由环氧合酶-2介导,在体外已有实验发现选择性阻断该酶可以降低肿瘤细胞在体外的生长。更深入的研究发现胆酸可以主动转运入表皮细胞,因此使细胞内膜和外膜以及连接断裂^[29]。该报道深入的阐述了DGER在食管腺癌的肿瘤发生过程中的作用。以下的发现支持GERD合并DGER是胆囊切除后食管腺癌患者的主要危险暴露因素:(1)食管鳞癌和返流性疾病没有联系;(2)外科手术而非胆囊结石增加了食管腺癌的危险性。胆汁返流在人类食管腺癌发生中的作用需要进一步研究。

总之,胆汁返流与Barrett食管和食管肿瘤关系密切,目前已经有相当的动物试验和大规模的临床回顾性研究证实了这一点,其涉及到的可能机制有前癌基因的改变、慢性炎症等,还需要进一步的动物和临床试验来证实这一点。

3 参考文献

- 1 孟立娜. Barrett食管的研究现状和展望. 浙江中医学院学报 2003; 27: 1-3
- 2 Raj A, Jankowski J. Acid suppression and chemoprevention in Barrett's oesophagus. *Dig Dis* 2004; 22: 171-180
- 3 Buttar NS, Wang KK, Leontovich O, Westcott JY, Pacifico RJ, Anderson MA, Krishnadath KK, Lutzke LS, Burgart LJ. Chemoprevention of esophageal adenocarcinoma by COX-2 inhibitors in an animal model of Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2002; 122: 1101-1112
- 4 Miwa K, Sahara H, Segawa M, Kinami S, Sato T, Miyazaki I, Hattori T. Reflux of duodenal or gastro-

- 5 duodenal contents induces esophageal carcinoma in rats. *Int J Cancer* 1996; 67: 269-274
- 5 Nishijima K, Miwa K, Miyashita T, Kinami S, Ninomiya I, Fushida S, Fujimura T, Hattori T. Impact of the biliary diversion procedure on carcinogenesis in Barrett's esophagus surgically induced by duodeno-esophageal reflux in rats. *Ann Surg* 2004; 240: 57-67
- 6 Bowers SP, Mattar SG, Smith CD, Waring JP, Hunter JG. Clinical and histologic follow-up after antireflux surgery for Barrett's esophagus. *J Gastrointest Surg* 2002; 6: 532-538
- 7 Parrilla P, Martinez de Haro LF, Ortiz A, Munitiz V, Molina J, Bermejo J, Canteras M. Long-term results of a randomized prospective study comparing medical and surgical treatment of Barrett's esophagus. *Ann Surg* 2003; 237: 291-298
- 8 DeMeester SR, DeMeester TR. Columnar mucosa and intestinal metaplasia of the esophagus: fifty years of controversy. *Ann Surg* 2000; 231: 303-321
- 9 Ye W, Chow WH, Lagergren J, Yin L, Nyren O. Risk of adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia in patients with gastroesophageal reflux diseases and after antireflux surgery. *Gastroenterology* 2001; 121: 1286-1293
- 10 Sato T, Miwa K, Sahara H, Segawa M, Hattori T. The sequential model of Barrett's esophagus and adenocarcinoma induced by duodeno-esophageal reflux without exogenous carcinogens. *Anticancer Res* 2002; 22: 39-44
- 11 张峻, 杨昭徐. 酸返流与胆汁返流在胃食管返流病中的作用. 胃肠病学 2000; 5: 207-210
- 12 Stein HJ, Barlow AP, DeMeester TR, Hinder RA. Complications of gastroesophageal reflux disease. Role of the lower esophageal sphincter, esophageal acid and acid/alkaline exposure, and duodenogastric reflux. *Ann Surg* 1992; 216: 35-43
- 13 Tselepis C, Perry I, Dawson C, Hardy R, Darnton SJ, McConkey C, Stuart RC, Wright N, Harrison R, Jankowski JA. Tumour necrosis factor-alpha in Barrett's oesophagus: a potential novel mechanism of action. *Oncogene* 2002; 21: 6071-6081
- 14 Jankowski JA, Harrison RF, Perry I, Balkwill F, Tselepis C. Barrett's metaplasia. *Lancet* 2000; 356: 2079-2085
- 15 Avidan B, Sonnenberg A, Schnell TG, Sontag SJ. Gastric surgery is not a risk for Barrett's esophagus or esophageal adenocarcinoma. *Gastroenterology* 2001; 121: 1281-1285
- 16 Taha AS, Angerson WJ, Morran CG. Reflux and Barrett's oesophagitis after gastric surgery-long-term follow-up and implications for the roles of gastric acid and bile in oesophagitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 547-552
- 17 Tselepis C, Morris CD, Wakelin D, Hardy R, Perry I, Luong QT, Harper E, Harrison R, Attwood SE, Jankowski JA. Upregulation of the oncogene c-myc in Barrett's adenocarcinoma: induction of c-myc by acidified bile acid in vitro. *Gut* 2003; 52: 174-180
- 18 Batzri S, Harmon JW, Schweitzer EJ, Toles R. Bile acid accumulation in gastric mucosal cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991; 197: 393-399
- 19 Fass R, Sampliner RE, Malagon IB, Hayden CW, Camargo L, Wendel CS, Garewal HS. Failure of oesophageal acid control in candidates for Barrett's oesophagus reversal on a very high dose of proton pump inhibitor. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 597-602

- 20 Kaur BS, Triadafilopoulos G. Acid- and bile-induced PGE (2) release and hyperproliferation in Barrett's esophagus are COX-2 and PKC-epsilon dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G327-G334
- 21 Fein M, Fuchs KH, Stopper H, Diem S, Herderich M. Duodenogastric reflux and foregut carcinogenesis: analysis of duodenal juice in a rodent model of cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21: 2079-2084
- 22 Chen X, Yang G, Ding WY, Bondoc F, Curtis SK, Yang CS. An esophagogastrroduodenal anastomosis model for esophageal adenocarcinogenesis in rats and enhancement by iron overload. *Carcinogenesis* 1999; 20: 1801-1808
- 23 Chen X, Ding YW, Yang G, Bondoc F, Lee MJ, Yang CS. Oxidative damage in an esophageal adenocarcinoma model with rats. *Carcinogenesis* 2000; 21: 257-263
- 24 Pera M, Brito MJ, Poulson R, Riera E, Grande L, Hanby A, Wright NA. Duodenal-content reflux esophagitis induces the development of glandular metaplasia and adenosquamous carcinoma in rats. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1587-1591
- 25 Spivey JR, Bronk SF, Gores GJ. Glycochenode-oxycolate-induced lethal hepatocellular injury in rat hepatocytes. Role of ATP depletion and cytosolic free calcium. *J Clin Invest* 1993; 92: 17-24
- 26 Latta RK, Fiander H, Ross NW, Simpson C, Schneider H. Toxicity of bile acids to colon cancer cell lines. *Cancer Lett* 1993; 70: 167-173
- 27 Liron R, Parrilla P, Martinez de Haro LF, Ortiz A, Robles R, Lujan JA, Fuente T, Andres B. Quantification of duodenogastric reflux in Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 32-36
- 28 Stein HJ, Kauer WK, Feussner H, Siewert JR. Bile reflux in benign and malignant Barrett's esophagus: effect of medical acid suppression and nissen fundoplication. *J Gastrointest Surg* 1998; 2: 333-241
- 29 Stein HJ, Kauer WK, Feussner H, Siewert JR. Bile acids as components of the duodenogastric refluxate: detection, relationship to bilirubin, mechanism of injury, and clinical relevance. *Hepato-gastroenterology* 1999; 46: 66-73

■同行评价

本文内容新颖, 叙述完整, 对读者具有一定启发。

电编 韩江燕 编辑 王瑾晖

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

•消息•

全国胃黏膜癌前病变与癌前疾病诊治研讨会

本刊讯 全国胃黏膜癌前病变与癌前疾病诊治研讨会将于2006年秋季在重庆将行, 现将征文通知如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文及摘要800字(附软盘), 2006-07-15截稿。

2 联系方式

重庆市第三军医大学西南医院消化科赵晶京收(邮编: 400038); E-mail: zhaojingjing-1@sina.com.

严重烧伤后胃肠道功能障碍的机制和防治

李晓芳

■背景资料

严重烧伤后发生的急性胃肠黏膜缺血损害以及由此而引起的胃肠道屏障功能的改变,是导致烧伤后SIRS和MODS发生的重要原因,也是降低烧伤休克复苏质量,诱发肠源性感染和内毒素血症的危险因素,而MODS既是严重烧伤的常见并发症,也是常见的致死原因之一。故进一步了解胃肠道屏障功能的机制,采取有效的防护措施,减少并发症的发生,在严重烧伤的治疗中具有重要意义。

李晓芳, 中南大学湘雅二院烧伤整形外科 湖南省长沙市 410011

通讯作者: 李晓芳, 410011, 中南大学湘雅二院烧伤整形外科.
ylxf@126.com

电话: 0731-5295139

收稿日期: 2006-01-03 接受日期: 2006-01-25

摘要

严重烧伤后发生的急性胃肠黏膜缺血损害以及由此而引起的胃肠道屏障功能的改变是导致烧伤后炎症反应综合征(SIRS)和多器官功能障碍综合征(MODS)发生的重要原因,也是降低烧伤休克复苏质量,诱发肠源性感染和内毒素血症的危险因素。本文详细阐述了烧伤后胃肠道功能的改变、具体的机制及防治对策,对提高烧伤后胃肠道功能障碍的认识有重要意义。

关键词: 严重烧伤; 胃肠道功能; 多器官功能障碍综合征

李晓芳. 严重烧伤后胃肠道功能障碍的机制和防治. 世界华人消化杂志 2006;14(9):888-893
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/888.asp>

0 引言

严重烧伤后常发生多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS),其死亡率高,救治难度大,是目前烧伤并发症研究领域中的重大课题。

长期以来,人们对肠道功能的认识偏重于肠道对营养物质的消化吸收。自1970年代以来人们发现死于脓毒症的相当部分患者找不到明确的感染灶或细菌培养阴性,而且仍有部分病例的原发感染灶即使在尸检时也找不到。这些感染大多为革兰氏阴性(G⁻)杆菌、肠球菌及白色念珠菌等肠道常驻菌所致,应用抗生素预防和控制感染并不能有效地降低MODS的发生率与病死率,进一步观察到这类患者及动物模型体内常表现明显的肠道细菌移位现象,推测肠道是这类脓毒症患者的细菌感染源,为此有学者提出GOS(gut origin sepsis)的概念^[1]。近20 a来,通过大量动物实验和临床研究,对肠道屏障

机制和肠黏膜代谢的认识、肠道免疫功能的进一步了解,以及对全身性炎症反应综合征(SIRS)和MODS发生机制的进一步阐明,使人们对胃肠道作为一个独立器官在外科应激反应时的功能和结构的变化,进行了大量研究和再认识。现已知,胃肠道是人体最大的免疫器官,含有约50%的网状内皮细胞和其他免疫细胞,体液免疫的80%也来自于肠道。各种致伤因素如创伤、烧伤、感染、休克、缺血再灌注损伤、放射治疗、化疗药物等作用于机体以及SIRS本身都直接(或)间接地导致肠道内细菌过度生长、肠机械屏障破坏和(或)机体免疫力降低,引起肠内细菌和(或)毒素移位,产生SIRS、脓血症,甚至MODS^[2-3]。本文就严重烧伤后胃肠道功能的改变,具体机制及防治做一综述。

1 烧伤后胃肠道屏障功能障碍

正常状态下,胃肠道依赖于胃肠黏膜屏障的防御机能,能够保护宿主免受肠腔中细菌、内毒素的侵袭。严重烧伤后发生的急性胃肠黏膜缺血损害以及由此而引起的胃肠道屏障功能的改变,是导致烧伤后SIRS和MODS发生的重要原因,也是降低烧伤休克复苏质量,诱发肠源性感染和内毒素血症的危险因素。胃肠黏膜屏障包括机械屏障、生物屏障和免疫屏障三部分,他们共同作用形成一个多方面、多层次的防护网^[4]。一方面,肠黏膜上皮细胞、细胞间紧密连接与菌膜三者构成肠黏膜机械屏障,他限制定植于肠黏膜表面的常驻菌穿透黏膜进入体内;另一方面,肠道常驻菌与宿主的微空间结构形成一个相互依赖又相互作用的微生态系统,他构成了肠道内的生态屏障。在此情况下,肠道菌群的定植性、繁殖性等作用使外来菌无法在肠道内定植。特别是正常菌群中厌氧菌对机体定植抗力(colonization resistance)具有重要作用,可阻止肠道条件致病菌的定植与大量增殖。此外,肠相关淋巴细胞(包括肠黏膜间质存在的T淋巴细胞、B淋巴细胞和浆细胞等)及其免疫活性产物构成了重要的免疫屏障。其中肠黏膜表面免

疫活性成分分泌性IgA对维持肠道正常的免疫功能具有极其重要的作用, 他能有效阻止细菌对肠上皮表面的吸附、中和病毒、毒素和酶等生物活性抗原等。生理情况下, 由于宿主有完整的肠黏膜机械屏障, 肠道菌群的微生态平衡及健全的免疫防御系统, 肠道细菌一般不易发生移位。但在多种应激因素打击下, 机体肠黏膜屏障破坏则可引起肠道细菌移位/内毒素血症的发生^[5], 进一步发展可能诱发脓毒症及MODS。严重烧伤后胃肠道屏障功能障碍发生的原因和下列因素密切相关。

1.1 缺血缺氧与肠黏膜损伤 机体在正常情况下, 循环血流的30%流经胃肠道。当机体遭受严重烧伤甚至休克时, 机体为了保护心、脑等重要器官, 使全身血液重新分配, 胃肠道血流明显减少。若全身血流量减少10%, 即可导致胃肠道血流减少40%^[6]。研究表明, 在各种应激时, 胃肠道最早发生缺血缺氧, 又最迟得到恢复, 易较早受损或衰竭^[7]。在烧伤抗休克复苏过程中很容易忽视隐性代偿性休克, 即无低血容量临床表现, 在循环和生命体征平稳的背后, 隐藏着内脏器官缺血的危机。隐性休克时胃肠道血流量减少, 胃肠道黏膜pH值降低^[8]。肠黏膜在解剖上有其特点: 小肠绒毛营养血管呈发夹状, 发夹顶端位于绒毛顶部, 故其血供较差。加之绒毛营养血管从母支直角分发, 出现血球“跳跃”现象, 致营养绒毛血液的氧容量下降, 因此在病理情况下, 肠绒毛顶端更容易发生缺血性损害。缺血缺氧时, 使得肠黏膜上皮水肿, 上皮细胞膜及细胞间连接断裂, 细胞坏死, 上皮从绒毛顶端开始脱落甚至黏膜全层脱落而形成溃疡, 导致肠通透性增加, 细菌移位发生^[9]。

1.2 缺血再灌注与肠黏膜损伤 组织缺血后, 最根本的治疗措施是尽快恢复组织的血液灌注。然而在动物实验和临床上观察发现, 恢复血液再灌注后, 部分动物或患者细胞代谢障碍及结构破坏反而加重, 这种损伤远超过原缺血对组织细胞的损伤, 这种现象称之为缺血再灌注损伤。导致肠缺血再灌注损伤的主要机制是形成具有毒性的活性氧代谢产物, 包括超氧阴离子(O_2^-)、过氧化氢(H_2O_2)、羟自由基($OH\cdot$)等。这些氧代谢产物可损伤核酸、蛋白质、脂质等, 导致细胞功能障碍甚至细胞死亡。而且肠组织中富含黄嘌呤氧化酶, 肠黏膜细胞所遭受的应激损伤更为显著^[10]。

1.3 炎症介质与肠黏膜损伤 在严重烧伤后, 炎症

介质大量产生并相互作用, 形成网络, 且不断循环促进, 形成“瀑布样”反应, 造成肠黏膜损伤并加重甚至衰竭。参与的炎症介质包括血小板活化因子(PAF)、肿瘤坏死因子(TNF)、白介素(IL)、 γ 干扰素($IFN-\gamma$)、一氧化氮(NO)等。TNF作为一种细胞因子主要由巨噬细胞产生, 在机体受到致病因素作用后, 产生最快, 到达高峰的时间亦最早, $TNF\alpha \rightarrow IL-1 \rightarrow IL-6$ 是细胞因子级联反应的基本过程^[10]。在细胞因子复杂的连锁反应中, $TNF\alpha$ 可能起着核心作用, $TNF\alpha$ 能激活中性粒细胞, 促使中性粒细胞释放大量的活性氧与弹性蛋白酶, 对血管内皮细胞和器官组织细胞产生损害作用; $TNF\alpha$ 还可诱导大量NO生成, 造成持续低血压, 微循环淤血, 加重组织的缺血缺氧; $TNF\alpha$ 还能通过交感-肾上腺髓质系统使儿茶酚胺分泌增加, 而后者可以促进多种血管活性物质释放, 如白三烯、PAF、TXA₂等, 加剧了微循环障碍。余佩武 *et al*^[11]通过研究发现大鼠烫伤后, 血和肠细胞PAF水平均显著升高, 与内毒素水平呈正相关, 大鼠肠黏膜通透性增加, 给予PAF拮抗剂治疗能明显降低血浆内毒素水平以及肠黏膜通透性。

1.4 内毒素与肠黏膜损伤 内毒素是G菌胞壁的脂多糖(LPS)部分, 其生物学效应及病理生理作用是由脂多糖的类脂A部所致。内毒素可引起黏膜水肿, 肠绒毛顶部细胞坏死, 肠黏膜通透性增加, 从而破坏肠黏膜屏障功能。当机体受到严重创伤、烧伤、感染和长期传统的肠外营养时, 肠黏膜有可能发生通透性增高, 导致细菌和内毒素移位。内毒素可以激活补体、激活血液凝固, 产生刺激血管的激肽和激活巨噬细胞的IL-1等。当门静脉内毒素浓度增高时, 又可使肝脏免疫功能受损, 同时肝脏库否细胞吞噬内毒素后可释放一系列花生四烯酸产物及细胞因子, 如前列腺素、血栓素、TNF、IL-1、IL-6等, 引起多器官损害。Chakravorty *et al*^[12]通过试验发现内毒素对肠黏膜屏障功能的破坏作用是通过成纤维细胞来调节的, 内毒素可刺激成纤维细胞产生 $TNF\alpha$ 等细胞因子, 给予 $TNF\alpha$ 抗体时, 内毒素对肠黏膜屏障功能的破坏作用明显减弱^[13]。临床研究也发现^[14], 大面积烧伤早期血浆内毒素水平增高, 在伤后7-12 h和3-4 d形成两个高峰, 和伤后肠道通透性增高发生时间相符, 并常与MODS的发生与预后显著相关。

1.5 营养障碍与肠黏膜损伤 严重烧伤后, 患者处于高代谢、负氮平衡和负热量平衡状态, 往

■ 研发前沿

胃肠道屏障功能障碍的机制的实验研究主要集中在动物实验上, 临床实验由于标本的局限而进展不大; 临床研究的重点主要是早期胃肠道营养防治胃肠道屏障功能障碍, 以及特殊营养物质的应用。

■ 创新盘点

本文从严重烧伤所致的急性胃肠道功能障碍出发,详细的阐述胃肠道功能障碍的机制,尤其指出胃肠道动力障碍的特殊性和重要性;防治重点在于肠内营养及特殊营养物质的应用。

往伴有营养代谢障碍。营养不良可引起肠上皮细胞DNA含量减少、蛋白质合成及细胞增生减弱,肠腔内黏液层厚度变薄,导致黏膜萎缩及继发肠黏膜酶活性下降。同时营养不良又降低了机体蛋白质水平,使免疫球蛋白水平下降,淋巴细胞减少,影响了肠道及全身的免疫功能。过去人们对危重患者给予营养支持时,只着重于能量与蛋白质的补充,而忽视了特殊成分萎缩、肠通透性增加、细菌和内毒素移位^[15]。另外,长期禁食或TPN患者,其肠黏膜缺少食物和消化道激素刺激,黏膜更新修复能力降低。同时,胃酸、胆汁、溶菌酶、黏多糖等分泌减少,肠液化学杀菌能力减弱,都可促使肠道致病菌大量繁殖,导致肠屏障功能障碍。

1.6 细菌移位 在过去的20 a中,人们对胃肠道在严重创伤和多种疾病时的改变及其与机体代谢和炎症反应的关系进行了深入的研究,许多研究证实:在休克、创伤等重症状态下,肠源性细菌和内毒素移位是确实存在的。正常情况下,胃肠中的微生物占人体总微生物量78%,肠道的优势菌群是专性厌氧菌,约占肠道细菌总数的99%,需氧菌和兼性厌氧菌占1%^[15]。出血性休克、创伤、内毒素血症和烧伤等打击均可引起肠道黏膜屏障功能不全,从而导致肠道细菌移位到肠系膜淋巴结,甚至侵入其他器官和血循环。王忠堂 *et al*^[16]采用单因素及多因素方法,分析128只体表面积30% III度烧伤大鼠肠源性细菌移位与肠道机械屏障、生物屏障、免疫屏障相关的7项指标间的关系。结果显示,烫伤后细菌移位率为53.9%(69/128)。单因素分析发现细菌移位组血浆内毒素和IL-6水平、回盲部菌群中大肠杆菌和真菌数、回肠损伤评分显著增高,肠黏液sIgA、肠道菌群中双歧杆菌量显著减少。多元Logistic逐步回归发现回肠损伤评分和回盲部菌群中双歧杆菌量是烫伤后细菌移位发生的独立危险因素。该研究表明,肠道黏膜屏障功能和肠道菌群中双歧杆菌量为肠源性细菌移位发生的独立预测因素。此外,严重烧伤患者长期使用广谱抗生素,肠道内菌群拮抗平衡被破坏,代之以致病菌过度生长。当念珠菌达到一定数量后则可穿越肠黏膜进入门静脉系统,肠球菌和链球菌也有类似现象。肠道菌群失衡加之正常肠屏障功能障碍,使胃肠成为“病原库”,大量细菌和内毒素侵入循环系统导致全身性感染。通过对烫伤大鼠肠黏膜凋亡情况的研究发现严重烧伤后可引起肠黏膜上皮发生广泛细胞凋亡,

延迟复苏使其加重,可导致其通透性显著增高,可能是诱发肠道内毒素和细菌移位的重要原因之一^[17-18]。

1.7 肠道免疫防御体系障碍 严重的创伤、休克时,肠道免疫防御体系会发生影响。于勇 *et al*^[19]对烫伤大鼠肠道固有层及上皮内淋巴细胞数量进行测定,证实CD3⁺、CD4⁺淋巴细胞明显减少,导致CD4⁺/CD8⁺比值倒置。SIgA是机体分泌量最大免疫球蛋白,能中和毒素,防止细菌黏于肠壁。创伤、烧伤致B淋巴细胞分泌免疫球蛋白减少,黏膜面SIgA含量下降,有利于细菌、毒素侵入体内^[20]。肝脏库否细胞数量占全身吞噬细胞的70%,吞噬能力占95%,细菌和内毒素由肠道进入肝脏,逃逸库否细胞吞噬后方能进入体循环。在生理情况下,肠道有少量内毒素进入门静脉,回流进入肝脏后可被库否细胞吞噬清除。所以肝脏库否细胞在调节机体防御反应方面起重要作用,这也就是肠肝轴(gut-liver axis)假说,在机体遭受严重创伤、休克时,肝脏库否细胞功能受抑制,一方面,肠道内细菌和内毒素侵入循环系统引起肠源性感染;另一方面,库否细胞被进入肝脏的内毒素激活,可以释放一系列炎症介质,如TNF α 、IL-1、IL-6、前列腺素E2、血栓素A2、血小板活化因子等^[21]。这些炎症介质可以相互作用,形成网络,循环促进,进一步造成肠黏膜以及远距离器官组织损伤,库否细胞的双重性作用在危重患者具有重要的病理生理意义。

2 严重烧伤后胃肠道动力功能障碍

正常生理状态下,胃肠节律性收缩、舒张,通过蠕动一方面将营养物质消化吸收,另外还将废物排出体外。大面积烧伤对机体是严重的应激,对胃肠道动力系统的影响以抑制为主。严重烧伤创伤后消化系统的改变主要有两个方面:一是胃肠黏膜的缺血缺氧性损害,由此而导致的消化道出血,应激性溃疡等;另一则是胃肠运动障碍,表现为腹胀、呕吐、腹泻,严重者可表现为中毒性肠麻痹等^[22]。王少根 *et al*^[23]采用碳素墨汁灌胃的方法对严重烫伤豚鼠胃排空及小肠结肠推进功能进行了广泛研究,结果表明严重烫伤早期胃排空及肠道推进功能明显下降,结肠动力恢复较快,表现为先抑制后增强,甚至激惹现象,而胃动力恢复较慢,休克期后仍低于正常水平。进一步研究发现烫伤面积越大,休克时间越长,胃动力受损越重,恢复也越慢。胃肠运动

受到神经-内分泌系统的调节, 整个胃肠道本身也是个巨大的内分泌器官. 有些激素主要存在于胃肠道内分泌细胞, 有的主要存在于胃肠道神经系统中, 有的则同时存在于两者之中. 他们以内分泌、旁分泌或神经分泌三种方式发挥作用. 在胃肠肽中以内分泌为主要作用方式的有胃泌素(GAS), 胆囊收缩素(CCK), 胃动素(MTL), 神经降压素(NT)等, 而以胃肠神经肽为主要作用方式的有血管活性肠肽(VIP), 生长抑素(SS), 降钙素(LT), 降钙素基因相关肽(CGRP), P物质, 脑啡肽(ENK)等^[24]. 这些物质可能参与了烧伤后胃肠动力紊乱的病理过程. 刘正玉 *et al*^[24]发现烫伤大鼠肠道组织ATP酶活性下降, 可能是肠道动力降低的原因之一. 王少龙 *et al*^[25]认为给严重烫伤动物早期进食, 可促进胃泌素分泌, 改善胃肠动力. 李兆申 *et al*^[26]对16例烧伤患者血浆内VIP, CCK-8、SS、GAS含量进行放免测定, 发现血浆CCK-8、SS、GAS含量显著升高, VIP含量明显降低. 胡大海 *et al*^[27]动态观察体表面积30% III度烫伤大鼠空肠免疫活性P物质及绒毛内P物质-免疫反应(SP-IR)阳性神经纤维的变化, 结果发现烫伤后大鼠空肠内P物质出现应激性释放与消耗, P物质可能参与了烫伤后大鼠的肠道损伤, 肠绒毛内的P物质能神经纤维是肠黏膜损伤的直接参与因素. 胃肠道运动和排空能促进吸收、分泌, 防止细菌过度繁殖及移位, 是机体防御功能的一部分. 严重烫伤后胃肠蠕动减弱, 瘀滞麻痹的肠道使有害细菌繁殖加剧, 内毒素吸收及细菌移位大大增加. 烧伤后吸收入血的内毒素反过来作用于胃肠道而使胃肠动力进一步降低, 促成恶性循环, 损伤效应不断扩大, 导致SIRS加重直至MODS.

3 严重烧伤后胃肠道功能障碍的防治策略

烧伤后肠道屏障功能障碍是一个多因素致伤的疾病, 因此在防治策略上不能单采用任何单项治疗措施或依靠单一药物, 应强调重在预防, 重在早期全方位内脏复苏. 一旦出现肠道屏障功能障碍时, 应结合患者的个体差异, 及时采用多疗法有机结合的方式, 发挥其协同作用.

3.1 建立快速有效的全方位内脏复苏治疗方案(total splanchnic resuscitation) 以预防和减轻烧伤后早期缺血再灌注损伤. 对于入院晚因延迟复苏出现休克的患者, 应在严密心肺功能的监护下实施快速复苏或“冲击疗法”, 于入院后1-2 h内快速输注2000-3000 mL的乳酸钠林格氏液或输入预算液体

总量的1/3-1/2, 维持机体稳定的血流动力学状态和良好的氧动力学状态, 迅速补充并恢复有效血容量^[28], 相应增加血液动力学和氧合指数、动脉血清乳酸(BLA)、胃黏膜pH值(pHi)和碱缺失(BD)等指标监测, 以纠正隐性代偿性休克^[8]. 通过以上措施, 尽力避免休克的发生.

3.2 早期应用特殊营养物质, 行肠内营养支持治疗. 同样是营养支持, 在维护肠黏膜结构完整性方面肠内营养明显优于肠外营养, 肠道对营养需求的特殊性即需要食物中的营养成分与肠黏膜直接接触, 否则肠黏膜细胞的增殖和分化能力将受到抑制, 甚至造成黏膜细胞的死亡^[29], 肠腔中的食物是肠黏膜生长最重要的刺激剂, 调节肠黏膜细胞的更新. 大量研究发现早期肠内营养可以减轻肠黏膜受损程度, 促进肠黏膜修复, 有利于严重烧伤的治疗^[30-33]. 生长激素(GH)是垂体前叶嗜酸性细胞合成分泌的促合成代谢激素, 应用合成的rhGH能促进合成代谢, 促进机体蛋白质合成, 促进创面愈合, 广泛应用于严重烧伤的治疗^[34]. rhGH联合肠内营养能更有效保护肠道功能, 减少内毒素入血, 减轻炎症反应^[35], 其机制可能是rhGH增加肠黏膜IGF-1 mRNA的表达, 通过IGF-1刺激肠黏膜生长繁殖, 维护肠黏膜的机械和免疫屏障, 减少了内毒素的移位, 减少促炎症介质释放的结果. 故烧伤患者在能耐受的情况下, 应优先采用经肠道营养, 并且越早越好. 特殊营养物质是指具有抗炎、调控免疫作用以及可维持细胞结构和功能正常的营养物质, 其中首推谷氨酰胺和精氨酸. 近20 a, 国内外临床营养学者和外科学、危重症医学学者对谷氨酰胺口服颗粒和双肽谷氨酰胺注射剂进行了从动物基础研究到临床随机、对照、双盲的研究, 在肠内营养支持治疗中加用谷氨酰胺, 研究结果显示可明显改善烧(创)伤后肠道黏膜损害, 维护或降低肠道通透性, 减少肠源性细菌和内毒素的移位率^[36-39]. 精氨酸是一种含有两个碱性基团及氨基和胍基的氨基酸, 是人体的一种条件必需氨基酸. 精氨酸作为肠内营养剂, 具有维护肠道健康与屏障功能的作用. 精氨酸可在肠道细胞精氨酸酶的作用下生成鸟氨酸和尿素, 鸟氨酸在鸟氨酸脱羧酶的催化下转化成多胺, 从而增加肠道黏膜总厚度及小肠绒毛数量, 为肠道正常菌群提供营养支持, 以维持肠道固有细菌的正常比例, 维护肠黏膜微生物屏障, 改善肠道血流灌注, 降低肠黏膜通透性并减轻肠道细菌/毒素移位等. 添加精氨酸进行肠内营养后, 大

■ 应用要点

本文对严重烧伤后胃肠道功能障碍的防治有一定指导意义.

鼠肠黏膜上皮增殖细胞核抗原(PCNA)阳性数量增加, 肠黏膜DNA含量恢复较快; 组织病理学观察也证实, 精氨酸具有明显的促进肠黏膜上皮细胞增殖的作用^[40]。精氨酸还可产生免疫效应, 它具有组织特异性免疫刺激作用。但是, 目前学术界对危重病患者采用精氨酸进行免疫营养治疗仍持有不同的看法, 邓诗琳^[41]认为对危重烧伤患者应用精氨酸等免疫营养制剂治疗的关键在于掌握恰当的时机, 选择适当的药物剂量和正确的给药方式; 对处于严重脓毒症/MODS的危重病患者, 应慎用或不用。

3.3 及时发现和去除应激因素, 早期切痂植皮封闭创面。

3.4 采用中西医结合治疗 应用中医通里攻下、活血化瘀、清热解毒、调理脾胃等治疗原则辨证施治。史洪涛 *et al*^[42]发现谷参肠安对家兔缺血再灌注损伤肠道有保护作用。谷参肠安是复方制剂, 由茯苓、白术、甘草和谷氨酰胺等成分组成, 中药成分含皂甙类、脂肪酸、维生素、酶类, 具有调节中枢神经系统功能, 增强机体抗病能力的作用。

总之, 胃肠道已不仅被认为是营养吸收的重要场所, 而且还是重要的代谢、免疫器官以及体内肠道菌群及其毒性产物的有效屏障。随着对胃肠生理学和炎症反应相关的分子生物学的深入研究, 严重烧伤后胃肠道功能障碍的发生机制将会进一步得到阐明。

4 参考文献

- 1 张平, 杨午鸣. 肠源性脓毒症. 急诊医学 1999; 8: 423-425
- 2 MacFie J, O'Boyle C, Mitchell CJ, Buckley PM, Johnstone D, Sudworth P. Gut origin of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity. *Gut* 1999; 45: 223-228
- 3 Matejovic M, Rokyta R Jr, Krouzecky A, Novak I. Gastrointestinal tract dysfunction in critical illness. *Cas Lek Cesk* 2002; 141: 46-50
- 4 Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Adv Exp Med Biol* 1999; 473: 11-30
- 5 MacFie J. Enteral versus parenteral nutrition: the significance of bacterial translocation and gut-barrier function. *Nutrition* 2000; 16: 606-611
- 6 刘春峰, 袁壮. 内脏缺血缺氧代谢障碍在SIRS和MODS中的作用. 小儿急救医学 2000; 7: 180-182
- 7 Secchi A, Ortanderl JM, Schmidt W, Gebhard MM, Martin E, Schmidt H. Effect of endotoxemia on hepatic portal and sinusoidal blood flow in rats. *J Surg Res* 2000; 89: 26-30
- 8 覃凤均, 孙永华. 严重烧伤延迟复苏的损伤机制及治疗. 中国医刊 2005; 40: 32-34
- 9 Boros M, Takaichi S, Hatanaka K. Ischemic time-dependent microvascular changes and reperfusion injury in the rat small intestine. *J Surg Res* 1995; 59: 311-320

- 10 Mitsuoka H, Schmid-Schonbein GW. Mechanisms for blockade of *in vivo* activator production in the ischemic intestine and multi-organ failure. *Shock* 2000; 14: 522-527
- 11 余佩武, 肖光夏, 府伟灵, 袁建成, 秦孝健, 周立新. 血小板活化因子在烧伤大鼠早期肠源性内毒素血症发病中的作用. 中华医学杂志 1999; 79: 136-138
- 12 Chakravorty D, Kumar KS. Modulation of barrier function of small intestinal epithelial cells by lamina propria fibroblasts in response to lipopolysaccharide: possible role in TNFalpha in inducing barrier dysfunction. *Microbiol Immunol* 1999; 43: 527-533
- 13 全竹富, 刘放南, 石群立, 黎介寿. 抗TNF 抗体防治腹腔感染诱发多器官功能障碍综合征的作用. 医学研究生学报 2001; 14: 432-435
- 14 Yao YM, Sheng ZY, Tian HM, Yu Y, Wang YP, Yang HM, Guo ZR, Gao WY. The association of circulating endotoxaemia with the development of multiple organ failure in burned patients. *Burns* 1995; 21: 255-258
- 15 蒋朱明, 于康. 肠黏膜屏障损害与肠外和肠内营养. 外科理论与实践 2000; 5: 54-56
- 16 王忠堂, 姚咏明, 肖光夏, 盛志勇. 烧伤大鼠肠源性细菌移位危险性多因素分析. 解放军医学杂志 2002; 27: 770-773
- 17 张诚, 盛志勇, 胡森, 高建川, 姚咏明, 董宁, 晋桦, 刘毅, 于晟, 张世范. 烧伤延迟复苏后肠上皮细胞凋亡诱导肠道内毒素和细菌移位. 中国危重病急救医学 2003; 15: 150-153
- 18 张诚, 盛志勇, 胡森, 高建川, 吕艺, 孙晓庆, 黎君友, 刘毅, 张绪生, 张世范. 烧伤延迟复苏后细胞凋亡对肠黏膜通透性的影响. 西北国防医学杂志 2004; 25: 10-13
- 19 于勇, 盛志勇, 田惠民, 王亚平, 于燕, 陆连荣, 常国友, 马诺山. 大鼠烧伤后肠道免疫屏障损伤的实验研究. 中华整形烧伤外科杂志 1996; 12: 86-89
- 20 Chen LW, Hsu CM, Huang JK, Chen JS, Chen SC. Effects of bombesin on gut mucosal immunity in rats after thermal injury. *J Formos Med Assoc* 2000; 99: 491-498
- 21 陈意生, 史景泉. 多器官功能障碍综合征的病理基础. 创伤外科杂志 2001; 3: 72-74
- 22 王少根. 严重烧伤创伤后胃肠动力改变. 中国烧伤创疡杂志 2001; 13: 271-273
- 23 王少根, 陈侠英, 王立基, 汪昌荣, 徐凡. 严重烧伤休克期肠道运动功能的改变及意义. 中国中西医结合脾胃杂志 2000; 8: 80-82
- 24 刘正玉, 郭力, 何小川, 施泽宏, 刘承荣. 大鼠烧伤早期肠道组织内ATP酶对肠道动力及其功能的影响. 中国临床康复杂志 2005; 9: 88-89
- 25 王少龙, 汪仕良, 黎鳌. 烧伤创伤后应激与肠道营养支持. 中华整形烧伤外科杂志 1998; 14: 225-227
- 26 李兆申, 刘婧, 许国铭, 尹宁. 烧伤患者急性期胃动力及相关神经肽变化的研究. 解放军医学杂志 1999; 24: 125-127
- 27 胡大海, 陈壁, 林树新, 汤朝武. 烧伤大鼠肠道P物质含量和P物质能神经的观察分析. 中华整形烧伤外科杂志 1996; 12: 93-97
- 28 吴祖煌, 刘敏, 夏照帆, 占新华, 刘世康. 严重延迟复苏烧伤脓毒症的早期综合防治. 中国危重病急救医学杂志 2004; 16: 198-201
- 29 Uchida K, Kado S, Onoue M, Tohyama K. Relationship between the nature of mucus and crypt multiplicity in aberrant crypt foci in the rat colon. *Jpn J Cancer Res* 1997; 88: 807-814
- 30 彭曦, 汪仕良, 尤忠义, 陶凌辉. 肠道营养减轻严重烧伤所致肠道损害的实验研究. 重庆医学 2002; 31: 311-320

- 198-200
- 31 韩焱福. 生长激素和能全力营养支持治疗严重烧伤的临床观察. 肠外与肠内营养 2003;10:32-37
- 32 陈华德, 余薇, 赖文, 谢举临, 郑少逸, 高辉, 郑立志. 大面积烧伤病人胃肠内外营养支持治疗的临床研究. 中国现代医学杂志 2000; 10: 11-16
- 33 蒋晓松, 周新华. 蛋白质膳在中重度烧伤病人应用的临床观察. 肠外与肠内营养 2004; 11: 289-291
- 34 邓诗琳, 曹丽萍. 重组人生长激素在烧伤营养支持中的作用及前景. 中华烧伤杂志 2001; 17: 197-199
- 35 蔡晨, 郭光华, 李国辉. 肠内营养联合生长激素对烫伤大鼠免疫功能和炎症反应的影响. 肠外与肠内营养 2005; 12: 1-4
- 36 彭曦, 尤忠义, 汪仕良, 王凤君, 解伟光, 贺光照, 陶凌辉, 赵云. 谷氨酰胺保护严重烧伤病人肠黏膜屏障功能的研究. 肠外与肠内营养 2001; 8: 205-207
- 37 彭曦, 尤忠义, 黄显凯, 张才全, 贺光照, 解伟光, 全竹富. 谷氨酰胺颗粒对创伤患者肠黏膜屏障功能的影响. 中华创伤杂志 2004; 20: 424-427
- 38 周业平, 蒋朱明, 孙永华, 何桂珍, 舒红, 王秀荣, 马恩陵. 谷氨酰胺双肽改善烧伤患者切痂术后肠黏膜通透性、内毒素血症和预后的研究. 中国临床营养杂志 2003; 11: 14-18
- 39 彭曦, 尤忠义, 黄显凯, 张才全, 贺光照, 解伟光, 全竹富, 汪仕良. 口服谷氨酰胺颗粒对烧伤患者的疗效及安全性分析. 中华烧伤杂志 2004; 20: 206-209
- 40 任建安, 汪仕良, 黎鳌. 富含精氨酸早期肠内营养对烧伤后肠黏膜增殖的实验研究. 中华烧伤杂志 2001; 17: 219-221
- 41 邓诗琳. 精氨酸在烧伤免疫营养治疗中的作用. 中华烧伤杂志 2005; 21: 241-243
- 42 史洪涛, 邓志龙, 冷恩仁. 谷参肠安对缺血再灌注家兔肠道的保护作用. 重庆医学 2002; 31: 96-97

电编 李琪 编辑 王瑾晖

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

• 消息 •

第十一届全国普通外科学术会议征文通知

本刊讯 中华普通外科杂志编辑部将于2006-07下旬在内蒙古呼和浩特市召开“第十一届全国普通外科学术会议”。本次会议将围绕普通外科手术并发症与外科再手术的主题就普通外科临床与基础研究、外科并发症、以及外科再手术等问题进行研讨。会议邀请国内外著名外科专家, 对热点问题做专题演讲, 参会代表进行学术交流、经验介绍和开展讨论。

1 征文内容

征文内容包括: (1)腹部外科手术并发症和外科再手术经验; (2)普通外科的新进展、新诊断、新技术、新方法、新手术、新经验; (3)临床研究、基础研究、实验研究; 手术适应证、禁忌证问题; (4)腹腔镜手术; (5)肿瘤的放化疗; (6)手术并发症和再手术的营养支持; (7)手术并发症和再手术的护理等。

2 征文要求

征文要求包括: (1)请将未公开发表的论文全文以及800字以内的中文摘要各1份, 并附拷贝软盘, 寄到100034, 北京西城区阜内大街133号 齐老师 收; 联系电话: 010-66168321转3126, 010-66164704. (2)来稿请注明单位、作者姓名、邮编及联系电话(请自留底稿, 恕不退稿), 请在信封左下角注明“普外会议征文”字样. 参会代表将获得国家级继续医学教育一类学分. (3)截稿日期: 2006-06-30.

消化道恶性肿瘤淋巴管生成的研究进展

李锐, 高善玲

■背景资料

消化道恶性肿瘤的发病率日益增多, 而肿瘤的淋巴道转移是导致患者最终死亡的重要因素之一。在某些恶性肿瘤中已经证实有淋巴管生成, 被称为淋巴管生成因子的VEGF-C、VEGF-D及其受体VEGFR-3能够诱导淋巴管的生成。恶性肿瘤中的淋巴管生成因子不但能够促进肿瘤淋巴管的生成, 而且与淋巴道转移密切相关。

李锐, 高善玲, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150086

通讯作者: 李锐, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科. xinyu0426@163.com
电话: 0451-89808026

收稿日期: 2006-02-16 接受日期: 2006-03-03

摘要

消化道恶性肿瘤的发病率日益增高, 而肿瘤的淋巴道转移是导致患者最终死亡的重要因素之一。在某些恶性肿瘤中已经证实有淋巴管生成, 被称为淋巴管生成因子的VEGF-C、VEGF-D及其受体VEGFR-3能够诱导淋巴管的生成。恶性肿瘤中的淋巴管生成因子不但能够促进肿瘤淋巴管的生成, 而且与淋巴道转移密切相关。近年来对于消化道恶性肿瘤的淋巴管生成以及淋巴道转移的研究正在开展, 本文将对消化道恶性肿瘤淋巴管生成机制, 淋巴管生成与肿瘤淋巴道转移的关系, 最新研究进展以及此项研究的临床意义加以综述。

关键词: 恶性肿瘤; 淋巴管生成; 血管内皮生长因子; 消化道

李锐, 高善玲. 消化道恶性肿瘤淋巴管生成的研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(9):894-899

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/894.asp>

0 引言

消化道恶性肿瘤发病日益增多, 而恶性肿瘤的淋巴道转移是导致患者最终死亡的重要因素之一。淋巴管和区域淋巴结肿瘤细胞的检测对肿瘤的分期, 手术和放疗均有重要意义^[1]。因此肿瘤淋巴管生成与淋巴道转移的关系是近年肿瘤转移机制的一大研究热点。

1 肿瘤淋巴管的生成

血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)能够明显的促进某些内皮细胞的有丝分裂, 特别是具有强大的促血管生成作用。VEGF-C和VEGF-D是VEGF家族的两个新成员。VEGF-C被确认为是一种刺激酪氨酸受体Flt4 (VEGFR-3)因子, 其mRNA在成人组织包

括胎盘、卵巢、肌肉和小肠中表达。VEGF-D是另一个重要的淋巴管生成因子, 与VEGF-C高度同源, 在皮肤角质细胞中过表达时也有淋巴管生成作用^[2]。血管内皮生长因子受体有3种, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, 这3种受体的表达有所不同, 其中VEGFR-1表达于血管内皮细胞, VEGFR-2在血管、淋巴管内皮细胞上均有表达, 而VEGFR-3在胚胎早期可表达于血管内皮细胞, 到胚胎后期和出生后VEGFR-3仅表达于淋巴管内皮细胞。VEGF-C和VEGF-D两者既可与VEGFR-2结合介导血管、淋巴管的生长, 又可与VEGFR-3结合介导淋巴管生长^[3]。

由于VEGF-C与VEGFR-3的高度亲和力, 使VEGF-C促进淋巴管生成作用成为主导, VEGF-C的作用属于一种旁分泌模式, 通过结合受体(VEGFR-2/VEGFR-3)使受体自身磷酸化, 通过胞质内信号传导, 使DNA有丝分裂增强, 导致细胞增殖^[4]。VEGF-C还可能是肿瘤细胞自分泌的一种肿瘤细胞活性调节因子^[5]。He *et al*^[6]在动物模型中发现新的淋巴管形成主要是从原有淋巴管以发芽的方式生成。Szuba *et al*^[7]曾采用兔耳淋巴水肿模型观察了重组VEGF-C对淋巴管生成的促进作用, 发现经皮下注射VEGF-C后, 不但兔耳淋巴管显著增生, 而且淋巴管功能明显改善。另有研究^[8]显示, VEGF-C^{-/-}小鼠会出现持续的组织淋巴水肿, VEGF-C^{-/-}基因剔除胚鼠静脉内皮可以向淋巴管内皮转化, 但无法出芽形成淋巴管, 导致胚鼠因广泛组织水肿死亡, 在转染了VEGF-C、VEGF-D后, 静脉可以出芽形成淋巴管。

2 肿瘤微管的特点及淋巴管的识别

2.1 肿瘤微淋巴管的特点 很多研究表明, 肿瘤内部存在着无功能的条索状的淋巴管, 而肿瘤周围即癌旁的淋巴管呈管腔状, 淋巴管的密度(LMVD)增加, 淋巴管有功能。Padera *et al*^[9]研究表明, 小鼠转移瘤周围检测到VEGFR-3阳性的功能性淋巴管, 并认为癌周扩大的淋巴管足以导致肿瘤淋巴道转移。张雅芳 *et al*^[10]在电镜下

观察到癌组织周围的淋巴管密度较正常高, 淋巴管内皮细胞及细胞器均有明显变化, 内皮细胞连接开关增加. 常见淋巴管管壁破坏和不完整, 而癌区淋巴管分布于各层组织中, 超微结构变化不明显. Yanai *et al*^[11]的研究则认为将人胃癌细胞系AZ521(该细胞系极少出现淋巴转移和VEGF-C表达)创建的VEGF-C转染子(AZ VEGF-C)转染到裸鼠胃内后, 这些细胞出现了较高的转移潜能, 并促进肿瘤内淋巴管生长. 也有报道认为在乳腺癌中没有分化的淋巴管, 未分化的淋巴管多存在于肿瘤周围, 而淋巴管的密度与肿瘤的侵袭性呈负相关, 并认为乳腺癌的淋巴转移可能是通过预先存在的淋巴管进行的^[12]. 不同实验结果的原因可能是所用试剂规格不同, 所用仪器设备有差别, 更重要的是没有找到真正能够识别肿瘤中新生淋巴管的特异的方法.

2.2 淋巴管的识别 常用的淋巴管识别技术: 淋巴管注射法; 酶组织化学染色方法; 免疫组织化学方法; 电镜技术; 放射性核素示踪技术等. 免疫组化染色法目前被认为是鉴别淋巴管内皮细胞, 尤其是与血管内皮细胞相鉴别的最佳方法. VEGFR-3是淋巴管最具特异性的标志物, 也是在培养的淋巴管内皮细胞中保持其特异性表达的唯一标志物. Veikkola *et al*^[2]报道, VEGFR-3转基因鼠皮下淋巴管增生、扩张; 敲除VEGFR-3基因或可溶性VEGFR-3转基因鼠胚则出现淋巴管发育不全. Witmer *et al*^[13]则通过连续切片法, 并采用PAL-E标记可进一步判断VEGFR-3阳性脉管的归属. Prox-1是同源异型盒转录因子基因产物, 与胚胎淋巴管芽的生长, 内皮细胞的表型改变紧密相关^[14], 是淋巴管发育不可缺少的因子. 敲除prox-1基因后, 静脉内皮细胞无法向淋巴内皮细胞定向分化, 胚胎发育时以出芽方式自静脉内皮细胞生成淋巴管过程受阻, 表明prox-1是淋巴管生成最基本的调控因子^[15]. Podoplanin(肾小球足突细胞膜黏蛋白)为一种膜性黏蛋白, 可选择性表达于淋巴管内皮上. Podoplanin在淋巴管内皮细胞的表达有许多特点, 在正常组织表达与淋巴管管径大小有关, 由单层内皮构成的淋巴毛细细胞表达最明显, 而有平滑肌的淋巴管表达稍差^[16]. 在人体中Podoplanin表达于成骨细胞、肾的足细胞、肺泡I型上皮细胞和胸膜及胸腺上皮细胞, 在皮肤淋巴管上也有强烈表达^[17]. LYVE-1(淋巴管内皮透明质酸受体)参与淋巴管内皮对透明质酸的结合和吸收,

是第一个在淋巴管内皮上发现的透明质酸受体, 在活体LYVE-1只表达于淋巴管, 均匀分布于淋巴管内皮细胞基底面和胞腔面. Mouta *et al*^[18]和Jackson *et al*^[19]的实验研究则表明, LYVE-1除表达于淋巴管内皮细胞外, 也表达于正常肝窦内皮细胞上, 故而认为LYVE-1与prox-1联合检测会更好地标淋巴管内皮细胞. Cursiefen *et al*^[20]采用免疫金标记技术及免疫电镜技术研究了角膜的淋巴管生成, 发现表达Podoplanin和LYVE-1的内皮细胞具有淋巴内皮细胞的超微结构特点, 因而认为二者可以作为淋巴管内皮细胞特异性标志物. 其他标志物还有Desmoplakin, Lyp-1等, 但他们都不是真正意义上的淋巴管特异性标记物, 因此寻找更加特异的标志物是我们研究中需要努力完成的任务之一.

3 VEGF-C和肿瘤淋巴管生成与肿瘤淋巴道转移的关系

许多研究者通过RT-PCR、原位杂交、Western blot、免疫组化等方法从基因水平和分子水平上检测到许多肿瘤细胞如黑色素瘤、甲状腺癌、乳腺癌、肺癌、口腔部鳞癌等都表达VEGF-C. 并且其表达水平与肿瘤淋巴管生成及淋巴道转移呈正相关. 为研究消化道肿瘤淋巴管生成及淋巴道转移提供了依据. 如Skobe *et al*^[21]发现转染VEGF-C的黑色瘤细胞的移植肿瘤有显著的瘤内血管和淋巴管生成, 癌周也有丰富的扩张淋巴管, 淋巴管的数量与肿瘤淋巴道转移密切相关. Mattila *et al*^[23]发现过表达VEGF-C的乳腺癌细胞接种裸鼠后肿瘤生长增快, 在无血管区出现淋巴管增生; 可溶性VEGFR-3蛋白可以中和VEGF-C, 能阻止VEGF-C的淋巴管生成作用, 但不能使肺转移的发生率降低. 但Krishnan *et al*^[24]的研究表明, 以可溶性VEGFR-3受体球蛋白封闭VEGF-C和VEGF-D活性可抑制淋巴结和肺转移. Beasley *et al*^[25]采用免疫组化及实时PCR等技术分析了人头颈癌标本, 分析结果表明, 人恶性肿瘤能诱导肿瘤淋巴管生成, 而瘤灶内淋巴管计数与肿瘤的颈淋巴转移相关. 多因素分析还显示VEGF-C是预测术后5 a生存率的危险因子. Nisato *et al*^[26]用转基因动物研究发现, VEGF-C不是通过促进淋巴管增生, 而是通过活化已存在的淋巴管来完成肿瘤淋巴道转移. 淋巴管内皮细胞可能会在局部释放旁分泌因子影响瘤细胞浸润, 或是通过改变现有或新生的淋巴管内皮细胞的一些特性以有利

■创新盘点

本文从基本知识开始逐步深入主题, 通过大量近5 a来国内外科研究成果来说明此项研究的意义及研究进展, 使读者读后即能对该研究有所认识.

■应用要点

首先是在科研上, 继续不断发现特异性淋巴管特异性标志物, 从而更准确的得出肿瘤转移与淋巴管新生的关系, 指导临床进一步的抗淋巴管生成治疗。

于肿瘤细胞向淋巴管内渗透、转移^[21-22]。Arinaga *et al*^[27]采用免疫组化方法检测了180例非小细胞肺癌VEGF-C表达, 发现VEGF-C表达与淋巴转移无关, 但提示预后较差。AL-Rawi *et al*^[28]研究发现, IL-7可明显上调MCF-7乳腺癌细胞VEGF-D的表达, 从而诱导淋巴管生成及肿瘤的淋巴道转移。但对此尚未有确切研究证实。

临床病理研究中VEGF-C表达与肿瘤淋巴转移的关系较明确, 但肿瘤内淋巴管密度与VEGF-C表达和淋巴转移关系的研究尚少。Schoppmann *et al*^[29]研究显示乳腺癌肿瘤内淋巴管密度与淋巴转移显著相关。VEGF-C也可促进肿瘤血管生成及其血道转移。Valtola *et al*^[30]报道VEGF-C与乳腺癌的血管生成和血道转移有关。VEGF-C、VEGF-D亦可结合并激活VEGFR-2可解释在一定的条件下能够促进肿瘤血管生成, 但Hamada *et al*^[31]研究表明VEGF-C/VEGFR-3信号通路也与血管发生和造血有关。这也可能成为增加肿瘤向血液循环系统播散的因素之一。

4 消化道肿瘤淋巴管生成与肿瘤淋巴道转移的研究进展

国内外对于消化道恶性肿瘤淋巴管生成的研究日渐增多。Auvinen *et al*^[32]报道食管Barrett's上皮向异型增生和Barrett's腺癌进展过程中VEGF-C表达逐渐增加, 且VEGFR-3表达也相应上调, 尤其是在异型增生和腺癌阶段。龙志强 *et al*^[33]在食管鳞癌患者的研究中得出, 血清VEGF-C水平为区分有无淋巴转移提供了有意义的补充, 是食管鳞癌淋巴转移的可靠标志物。

Ishikawa *et al*^[34]证明胃癌中VEGF-C、VEGF-D表达与淋巴浸润有明确的相关性, 而与血道转移无关。未分化型早期胃癌VEGF-C阴性表达者无淋巴转移, 而VEGF-D阳性表达者有淋巴转移, VEGF-C和VEGF-D阳性染色者有较高淋巴转移率(44%), 相反VEGF-C和VEGF-D阴性染色者未发生淋巴转移。胃癌中VEGF-C及其蛋白表达与淋巴侵犯, 静脉侵犯, 淋巴转移及低的5 a生存率相关^[35]。董文广 *et al*^[36]用免疫组化检测得出, 与正常组织相比胃癌VEGF-C与VEGFR-3表达均上调, 相应淋巴管密度增加, VEGF-C与VEGFR-3表达无相关性。与文献[37]报道相一致。Yonemura *et al*^[38]研究显示胃癌肿瘤内淋巴管密度与VEGF-C表达及淋巴转移均显著相关。Shida *et al*^[39]对50对正常胃组织和胃癌组织研究, 结果是VEGF-C和

VEGF-D在大多数病例中表达, 只有VEGF-C的表达导致肿瘤淋巴转移, VEGFR-3的表达伴随VEGF-C和VEGF-D的表达, 但是不伴有淋巴转移, 但其表达与肿瘤的不良预后相关联。

Furudoi *et al*^[40]发现152例结肠癌中有71例在肿瘤浸润边缘有肿瘤细胞VEGF-C表达, VEGF-C与淋巴管和淋巴转移密切相关。许天文 *et al*^[41]对94例大肠癌患者进行分析, 其中53.2%的患者VEGF-C呈阳性表达, VEGF-C在淋巴转移阳性中表达与阴性比较有统计学意义, 并与淋巴管浸润及Dukes'分期密切相关。姜金波 *et al*^[42]经实验证明VEGF-C阳性的患者生存率明显低于VEGF-C阴性的患者($P = 0.002\ 25$), LMVD高密度组患者生存率明显低于LMVD低密度组患者($P = 0.0036$), VEGF-C和LMVD在结肠癌淋巴转移中起重要作用, 对于判断结肠癌的侵袭性和预后有重要的参考价值, LMVD可以作为判断结肠癌预后的独立指标。牟江洪 *et al*^[43]得出高LMVD的结直肠癌的患者5 a生存率较低LMVD的患者有所降低, 并认为癌周LMVD检测可以判断肠癌患者预后。

胆管癌组织与正常胆管组织VEGF-C表达水平之间有显著性差异, 且VEGF-C表达与胆管癌的分化程度, 肿瘤大小和淋巴转移有关^[44]。陈元文 *et al*^[45]实验得出胰腺癌VEGF-C与VEGFR-3表达增高, 具有促进胰腺癌的淋巴管增生的作用。VEGF-C与VEGFR-3和LMVD都与胰腺癌淋巴道转移有关, 都可以作为检测胰腺癌有无淋巴转移的重要指标。VEGF-C与VEGFR-3的作用, 对控制胰腺癌的淋巴道转移可能是一个有效的选择。Wang *et al*^[46]证明肝癌的淋巴道转移归因于淋巴管的生成, VEGF-C和VEGF-D的改变可能影响淋巴管的生成, 并对肝癌的淋巴转移产生有效的影响。

5 研究消化道肿瘤淋巴管生成的临床意义

大量研究表明VEGF-C/VEGF-D可通过活化VEGFR-3, 刺激肿瘤淋巴内皮细胞增殖、迁移, 促进淋巴管生成, 从而增加肿瘤淋巴道转移的发生率。因此, 阻断淋巴管生成是抑制肿瘤淋巴道转移的有效方法。对于肿瘤的抗淋巴管治疗国内外已有一些研究, 一些抗肿瘤淋巴管生成治疗已在动物模型上成功开展, 并取得了抑制肿瘤淋巴道转移的作用。如功能性阻断抗体, 可溶性VEGFR-3, 小分子肽抑制剂, PCs抑制剂。利用VEGFR-3抑制剂或VEGF-C、VEGF-D的中和

性抗体阻断其信号通道时, 就可以抑制实验动物模型中的淋巴管生成^[47]。用可溶性VEGFR-3受体蛋白能够明显抑制小鼠肺癌的淋巴管生成, 降低淋巴结转移率^[48]。Shimizu *et al*^[49]在胃癌的动物模型研究中应用抗VEGFR-3抗体可明显降低肿瘤的淋巴管密度及淋巴结转移。Karpanen *et al*^[50]采用AdR3-Ig静脉注射治疗转染VEGF-C的乳腺癌细胞系MCF-7鼠原位种植肿瘤, 结果其肿瘤内不存在增生淋巴管。表明静脉注射AdR3-Ig可抑制肿瘤淋巴管生成及淋巴道转移的发生。 $\alpha 1$ -PDX是一种PCs的广泛性抑制剂^[51], 通过阻止VEGF-C或VEGF-D的成熟, 可能达到抑制肿瘤淋巴管生成的作用。

大量的研究已证实消化道肿瘤存在着肿瘤淋巴管生成, 而肿瘤淋巴管生成可促进淋巴道转移, 淋巴管系统参与肿瘤生长与转移的各个环节, 肿瘤转移的早期诊断有赖于应用特异敏感的淋巴管标志物与先进的技术方法对淋巴管生成与淋巴结转移作出准确的诊断, 有助于对肿瘤生物学特性进行精确的评估。消化道恶性肿瘤有些会在早期即发生淋巴道转移, 因此应以早期发生淋巴道转移的肿瘤为重点, 深入探讨肿瘤淋巴道转移与肿瘤新生淋巴管调控机制。肿瘤淋巴道转移机制与肿瘤新生淋巴管研究成为继血管生成机制研究的前沿领域, 针对肿瘤新生淋巴管机制研制特异性拮抗剂有望成为肿瘤生物治疗的一种新途径。

6 参考文献

- 1 Tille JC, Nisato R, Pepper MS. Lymphangiogenesis and tumour metastasis. *Novartis Found Symp* 2004; 256: 112-131
- 2 Veikkola T, Jussila L, Makinen T, Karpanen T, Jeltsch M, Petrova TV, Kubo H, Thurston G, McDonald DM, Achen MG, Stacker SA, Alitalo K. Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J* 2001; 20: 1223-1231
- 3 Kleespies A, Guba M, Jauch KW, Bruns CJ. Vascular endothelial growth factor in esophageal cancer. *J Surg Oncol* 2004; 87: 95-104
- 4 Makinen T, Veikkola T, Mustjoki S, Karpanen T, Catimel B, Nice EC, Wise L, Mercer A, Kowalski H, Kerjaschki D, Stacker SA, Achen MG, Alitalo K. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *EMBO J* 2001; 20: 4762-4773
- 5 Lalla RV, Boisoneau DS, Spiro JD, Kreutzer DL. Expression of vascular endothelial growth factor receptors on tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 129: 882-888
- 6 He Y, Rajantie I, Ilmonen M, Makinen T, Karkkainen MJ, Haiko P, Salven P, Alitalo K. Preexisting lymphatic endothelium but not endothelial progenitor cells are essential for tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer Res* 2004; 64: 3737-3740
- 7 Szuba A, Skobe M, Karkkainen MJ, Shin WS, Beynet DP, Rockson NB, Dakhil N, Spilman S, Goris ML, Strauss HW, Quertermous T, Alitalo K, Rockson SG. Therapeutic lymphangiogenesis with human recombinant VEGF-C. *FASEB J* 2002; 16: 1985-1987
- 8 Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 2004; 5: 74-80
- 9 Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, Carreira CM, Brown EB, Boucher Y, Choi NC, Mathisen D, Wain J, Mark EJ, Munn LL, Jain RK. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* 2002; 296: 1883-1886
- 10 张雅芳, 赵玲辉, 刘慧冬, 李玉兰, 李益民, 徐晶莹. 人结肠癌和胃癌淋巴管形态结构的研究. *解剖科学进展* 2003; 9: 8-12
- 11 Yanai Y, Furuhashi T, Kimura Y, Yamaguchi K, Yasoshima T, Mitaka T, Mochizuki Y, Hirata K. Vascular endothelial growth factor C promotes human gastric carcinoma lymph node metastasis in mice. *J Exp Clin Cancer Res* 2001; 20: 419-428
- 12 Williams CS, Leek RD, Robson AM, Banerji S, Prevo R, Harris AL, Jackson DG. Absence of lymphangiogenesis and intratumoural lymph vessels in human metastatic breast cancer. *J Pathol* 2003; 200: 195-206
- 13 Witmer AN, van Blijswijk BC, Dai J, Hofman P, Partanen TA, Vrensen GF, Schlingemann RO. VEGFR-3 in adult angiogenesis. *J Pathol* 2001; 195: 490-497
- 14 Hong YK, Detmar M. Prox1, master regulator of the lymphatic vasculature phenotype. *Cell Tissue Res* 2003; 314: 85-92
- 15 Wigle JT, Oliver G. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 1999; 98: 769-778
- 16 Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Horvat R, Amann G, Kriehuber E, Diem K, Weninger W, Tschachler E, Alitalo K, Kerjaschki D. Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol* 1999; 154: 385-394
- 17 Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Horvat R, Amann G, Kowalski H, Kerjaschki D. Podoplanin-a specific marker for lymphatic endothelium expressed in angiosarcoma. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1999; 83: 270-275
- 18 Mouta Carreira C, Nasser SM, di Tomaso E, Padera TP, Boucher Y, Tomarev SI, Jain RK. LYVE-1 is not restricted to the lymph vessels: expression in normal liver blood sinusoids and down-regulation in human liver cancer and cirrhosis. *Cancer Res* 2001; 61: 8079-8084
- 19 Jackson DG. Biology of the lymphatic marker LYVE-1 and applications in research into lymphatic trafficking and lymphangiogenesis. *APMIS* 2004; 112: 526-538
- 20 Cursiefen C, Schlotzer-Schrehardt U, Kuchle M, Sorokin L, Breiteneder-Geleff S, Alitalo K, Jackson D. Lymphatic vessels in vascularized human corneas:

■名词解释

PCs: PCs叫前蛋白转化酶, 广泛存在于生物界, 参与多种前体蛋白转化为成熟蛋白的酶解过程。在多种疾病如肿瘤, 糖尿病, 病毒感染等中发挥作用。VEGF-C/VEGF-D成熟过程中涉及PCs的作用, 其前体蛋白能激活VEGFR 3。

■同行评价

本文内容较新,综述较全面,表达清楚,有一定的指导意义。

- immunohistochemical investigation using LYVE-1 and podoplanin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 2127-2135
- 21 Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, Riccardi L, Alitalo K, Claffey K, Detmar M. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 2001; 7: 192-198
- 22 Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, Banerji S, Huarte J, Montesano R, Jackson DG, Orci L, Alitalo K, Christofori G, Pepper MS. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J* 2001; 20: 672-682
- 23 Mattila MM, Ruohola JK, Karpanen T, Jackson DG, Alitalo K, Harkonen PL. VEGF-C induced lymphangiogenesis is associated with lymph node metastasis in orthotopic MCF-7 tumors. *Int J Cancer* 2002; 98: 946-951
- 24 Krishnan J, Kirkin V, Steffen A, Hegen M, Weih D, Tomarev S, Wilting J, Sleeman JP. Differential *in vivo* and *in vitro* expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D in tumors and its relationship to lymphatic metastasis in immunocompetent rats. *Cancer Res* 2003; 63: 713-722
- 25 Beasley NJ, Prevo R, Banerji S, Leek RD, Moore J, van Trappen P, Cox G, Harris AL, Jackson DG. Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 1315-1320
- 26 Nisato RE, Tille JC, Pepper MS. Lymphangiogenesis and tumor metastasis. *Thromb Haemost* 2003; 90: 591-597
- 27 Arinaga M, Noguchi T, Takeno S, Chujo M, Miura T, Uchida Y. Clinical significance of vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2003; 97: 457-464
- 28 Al-Rawi MA, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG. Interleukin 7 upregulates vascular endothelial growth factor D in breast cancer cells and induces lymphangiogenesis *in vivo*. *Br J Surg* 2005; 92: 305-310
- 29 Schoppmann SF, Birner P, Studer P, Breiteneder-Geleff S. Lymphatic microvessel density and lymphovascular invasion assessed by anti-podoplanin immunostaining in human breast cancer. *Anticancer Res* 2001; 21: 2351-2355
- 30 Valtola R, Salven P, Heikkila P, Taipale J, Joensuu H, Rehn M, Pihlajaniemi T, Weich H, deWaal R, Alitalo K. VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *Am J Pathol* 1999; 154: 1381-1390
- 31 Hamada K, Oike Y, Takakura N, Ito Y, Jussila L, Dumont DJ, Alitalo K, Suda T. VEGF-C signaling pathways through VEGFR-2 and VEGFR-3 in vasculoangiogenesis and hematopoiesis. *Blood* 2000; 96: 3793-3800
- 32 Auvinen MI, Sihvo EI, Ruohola T, Salminen JT, Koivistoinen A, Siivola P, Ronnholm R, Ramo JO, Bergman M, Salo JA. Incipient angiogenesis in Barrett's epithelium and lymphangiogenesis in Barrett's adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2971-2979
- 33 龙志强, 李简. 血清VEGF-C水平作为食管鳞癌淋巴转移标志物的临床研究. *中国现代医学杂志* 2005; 15: 2885-2888
- 34 Ishikawa M, Kitayama J, Kazama S, Nagawa H. Expression of vascular endothelial growth factor C and D (VEGF-C and -D) is an important risk factor for lymphatic metastasis in undifferentiated early gastric carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2003; 33: 21-27
- 35 达明绪, 伍晓汀, 罗婷. 淋巴管生成因子与消化道肿瘤. *中国普外基础与临床杂志* 2005; 12: 630-633
- 36 董文广, 王天宝, 韩方海, 李玉明, 詹文华. 淋巴管生成与胃癌病期进展的关系. *四川大学学报(医学版)* 2005; 36: 743-744
- 37 Noguchi T, Takeno S, Shibata T, Uchida Y, Yokoyama S, Muller W. VEGF-C expression correlates with histological differentiation and metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Oncol Rep* 2002; 9: 995-999
- 38 Yonemura Y, Fushida S, Bando E, Kinoshita K, Miwa K, Endo Y, Sugiyama K, Partanen T, Yamamoto H, Sasaki T. Lymphangiogenesis and the vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-3 in gastric cancer. *Eur J Cancer* 2001; 37: 918-923
- 39 Shida A, Fujioka S, Kobayashi K, Ishibashi Y, Nimura H, Mitsumori N, Yanaga K. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and -D in gastric carcinoma. *Int J Clin Oncol* 2006; 11: 38-43
- 40 Furudoi A, Tanaka S, Haruma K, Kitadai Y, Yoshihara M, Chayama K, Shimamoto F. Clinical significance of vascular endothelial growth factor C expression and angiogenesis at the deepest invasive site of advanced colorectal carcinoma. *Oncology* 2002; 62: 157-166
- 41 许天文, 陈道达, 陈剑英, 郑勇斌, 连彦军. 血管内皮生长因子-C在大肠癌中的表达及其与淋巴转移的关系. *中华实验外科杂志* 2005; 22: 598-600
- 42 姜金波, 朱民, 李雪梅, 寿楠海, 吕丽红, 邵军, 尹金岭. 结肠癌VEGF-C表达、淋巴管密度与淋巴转移和预后的关系. *山东大学学报(医学版)* 2005; 43: 616-620
- 43 牟江洪, 阎晓初, 李增鹏, 王东, 段光杰, 向德兵, 肖华亮, 张沁宏. 结直肠癌淋巴管生成的特点及其临床病理意义. *中华病理学杂志* 2005; 34: 348-352
- 44 马玮, 张云锋, 王作仁. 肝胆管癌中血管内皮生长因子C(VEGF-C)的表达及意义. *中华肝胆外科杂志* 2004; 10: 463-465
- 45 陈元文, 钱学华. VEGF-C表达和淋巴管生成与胰腺癌淋巴道转移的关系. *重庆医科大学学报* 2005; 30: 542-543
- 46 Wang KF, Ye SL, Weng YQ, Liang CM, Zhao Y, Gao DM, Tang ZY. The relationship between lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in murine hepatic carcinoma of high and low metastatic potentialities. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2006; 14: 187-191
- 47 Makinen T, Jussila L, Veikkola T, Karpanen T, Kettunen MI, Pulkkanen KJ, Kauppinen R, Jackson DG, Kubo H, Nishikawa S, Yla-Herttuala S, Alitalo K. Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat Med* 2001; 7: 199-205
- 48 He Y, Kozaki K, Karpanen T, Koshikawa K, Yla-Herttuala S, Takahashi T, Alitalo K. Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 819-825

- 49 Shimizu K, Kubo H, Yamaguchi K, Kawashima K, Ueda Y, Matsuo K, Awane M, Shimahara Y, Takabayashi A, Yamaoka Y, Satoh S. Suppression of VEGFR-3 signaling inhibits lymph node metastasis in gastric cancer. *Cancer Sci* 2004; 95: 328-333
- 50 Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, Kubo H, Yla-Herttuala S, Jaattela M, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res* 2001; 61: 1786-1790
- 51 Bergeron E, Basak A, Decroly E, Seidah NG. Processing of alpha4 integrin by the proprotein convertases: histidine at position P6 regulates cleavage. *Biochem J* 2003; 373: 475-484

电编 张敏 编辑 潘伯荣

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

• 消息 •

第二次全国中晚期消化肿瘤学术会议

本刊讯 第二次全国中晚期消化肿瘤学术会议将于2006-08在哈尔滨举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文3000字及摘要800字各1份, 电脑打印(附软盘), 2006-06-15截稿.

2 联系方式

哈尔滨市哈尔滨医科大学二院消化内科 刘冰熔 教授, 电话: 13313695959, E-mail: liubingrong@medmail.com.cn.

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

• 消息 •

第二届全国小肠疾病学术会议

本刊讯 第二届全国小肠疾病学术会议将于2006-08-23/27在太原举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文, 结构式摘要(1000字), 电脑打印(附软盘)或E-mail, 2006-04-31截稿.

2 联系方式

山西省太原市双塔东街29号山西省人民医院内镜中心 陈星; 邮编: 030012; 电话: 0351-4960028; E-mail: senj29@163.com.

血红素氧合酶-1在器官移植中的保护作用

宿华威, 崔云甫, 吴德全, 韩德恩

■背景资料

血红素氧合酶-1 (HO-1) 又称热休克蛋白-32, 近年来大量的研究发现其具有抗炎、抗凋亡、抗增生反应等多种保护作用。HO-1不仅可以在机体生理状态下发挥作用, 更为重要的是他可以在机体非正常状态包括应激状态下被诱导, 被认为是在细胞受损时维持其氧化和抗氧化动态平衡的关键因素。

宿华威, 崔云甫, 吴德全, 韩德恩, 哈尔滨医科大学附属第二医院肝胆胰器官移植外科 黑龙江省哈尔滨市 150086

通讯作者: 宿华威, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区保健路246号, 哈尔滨医科大学附属第二医院肝胆胰器官移植外科。huawei97@msn.com

电话: 0451-88671108

收稿日期: 2006-01-03 接受日期: 2006-02-21

摘要

血红素氧合酶(heme oxygenase, HO)是体内唯一一种催化血红素分解代谢的限速酶, 他可以氧化降解血红素, 将其分解为一氧化碳、自由铁和胆绿素。血红素氧合酶-1(HO-1)是唯一可以被诱导的血红素氧合酶, 近年来大量的研究发现HO-1具有抗炎、抗凋亡、抗增生反应等多种保护作用。HO-1不仅可以在机体生理状态下发挥作用, 更为重要的是他可以在机体非正常状态包括应激状态下被诱导, 被认为是在细胞受损时维持其氧化和抗氧化动态平衡的关键因素。本文就HO-1在器官移植研究领域的细胞保护作用作如下综述。

关键词: 血红素氧合酶-1; 器官移植; 缺血再灌注损伤; 排斥反应

宿华威, 崔云甫, 吴德全, 韩德恩. 血红素氧合酶-1在器官移植中的保护作用. 世界华人消化杂志 2006;14(9):900-903
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/900.asp>

0 引言

血红素氧合酶(heme oxygenase, HO)是体内唯一一种催化血红素(heme)分解代谢的限速酶, 几乎分布于所有组织器官并存在于整个生长发育过程之中。他可以氧化降解血红素, 将其分解为一氧化碳(CO)、自由铁(Fe^{2+})和胆绿素(biliverdin), 胆绿素随后又被胆红素还原酶转化为胆红素(bilirubin)。血红素氧合酶有三种同工酶: HO-1又称热休克蛋白-32(HSP-32), 广泛存在于哺乳动物细胞中; HO-2存在于大脑和睾丸中, HO-2与HO-1的氨基酸和核苷序列存在43%的相似性; HO-3只表达很低的酶活性, 可能与血红素的识别或绑定有关^[1-2]。其中HO-1是唯一可以被诱导的血红素氧合酶, 其特性最早于1968年为

Tenhunen *et al*^[3]所描述。HO-1基因被认为是一种应对体内血红素蓄积的管家基因(house-keeping gene)。近年来大量的研究发现HO-1具有抗炎、抗凋亡、抗增生反应等多种保护作用。HO-1不仅可以在机体生理状态下发挥作用, 更为重要的是他可以在机体非正常状态包括应激状态下被诱导, 被认为是在细胞受损时维持其氧化和抗氧化动态平衡的关键因素。就HO-1在器官移植研究领域的细胞保护作用作如下综述。

1 HO-1及其催化产物的细胞保护机制

1.1 HO-1和CO的细胞保护机制 HO-1的细胞保护作用最早是在急性肺损伤和内毒素休克动物模型上被发现的^[4-5]。随后在小鼠心脏异种移植模型上得到验证, 当HO-1不能被诱导或者HO-1活性被抑制剂锌原卟啉(Snpp)所抑制时, 心脏将很快被排斥, 这证明HO-1的表达对防止移植心脏被排斥是十分重要的。令人惊奇的是当供受体均用CO处理后, 即使在HO-1的活性被抑制的情况下, 也可以防止急性排斥反应的发生, 并且可以达到与HO-1表达一样的效果。由此可见CO可作为HO-1的替代物, 并可以抑制导致移植器官排斥的致炎反应。单核巨噬细胞可以在很多条件下控制细胞的炎症平衡, 在细菌脂多糖(LPS)刺激下可产生多种致炎细胞活素包括TNF- α 和抗炎症细胞活素如IL-10。如果单核巨噬细胞在受到LPS的刺激之前过表达HO-1或暴露于CO环境则能够抑制致炎细胞活素TNF- α 的分泌, 同时能促进抗炎症细胞活素IL-10的分泌, 致炎反应被显著抑制, 而抗炎反应则明显增强^[6]。CO的抗炎作用不依赖于IL-10, 而IL-10的产生则需要HO-1表达和CO的生成。IL-10和HO-1形成了一个抗炎症反应的正反馈循环: IL-10诱导单核巨噬细胞中HO-1基因的表达, HO-1又可以促进IL-10的生成。在这一正反馈循环过程中血红素是必不可少的, 因为只有有血红素存在的条件下HO-1才能够产生足够的CO, 而在器官移植过程中, 缺血再灌注损伤(IRI)形成的溶血提供了维持这一循环必需的血红素。这一正反馈

■研究前沿

血红素氧合酶-1在脏器移植过程中的细胞保护作用, 是近年来移植外科领域的研究热点之一。大量的动物实验研究显示HO-1及其代谢产物CO、胆红素、铁离子均具有抗氧化等细胞保护作用, 可显著抑制移植过程中出现的缺血再灌注损伤。同时, 对急性排斥反应和慢性移植排斥也具有抑制作用。

循环被认为是HO-1和CO保护作用的核心机制之一^[7]. CO还可以直接抑制可诱导一氧化氮合成酶(iNOS)的活性, 从而下调NO的产量, 这一作用已被证明能够保护TNF- α 介导的对移植肝脏的损害^[8]. CO的另外3个抗炎机制是: (1)CO可以抑制血小板的激活和聚集, 从而抑制血栓形成和由激活的血小板所诱导产生的致炎反应; (2)CO下调了M ϕ 细胞中纤溶酶原激活物抑制剂(PAI-1)的表达. 此过程在CO保护肺缺血再灌注损伤中发挥了关键作用; (3)CO可以阻止多种细胞的凋亡, 包括内皮细胞、肝细胞、胰岛 β 细胞和成纤维细胞. 细胞的广泛凋亡可以加剧炎症反应, 尤其是凋亡的血管内皮细胞可以刺激血栓形成, 因此CO的抗凋亡作用在其细胞保护作用中是十分重要的. CO还可以显著抑制平滑肌细胞的增生反应, 从而减少气囊血管成形术后血管内膜的增生, 明显降低再狭窄的发生率^[9].

1.2 胆绿素和胆红素的细胞保护机制 胆绿素和胆红素的细胞保护作用主要是因为其具有抗氧化特性, 能够清除多种氧自由基. 同时在胆绿素分解酶的作用下形成的胆绿素-胆红素循环又进一步放大了其抗氧化作用^[10-11]. 二者还能阻止过氧化亚硝酸盐介导的蛋白过氧化, 抑制脂质过氧化. 在体外实验中胆绿素能够抑制补体生成; 胆红素可以抑制人类淋巴细胞反应, 包括抑制PHA诱导的增殖, IL-2的生成以及抗体、非抗体依赖细胞介导的细胞毒性^[12-13].

2 HO-1与器官移植缺血再灌注损伤

越来越多的研究证实, 在多种脏器移植中内源性HO-1表达可以抑制缺血再灌注损伤^[14-21]. 而且诱导移植器官HO-1过表达还可防止慢性移植器官无功能的发生. 目前此种保护机制尚未完全阐明, 但已证实此保护机制不仅在于HO-1能够减少缺血再灌注损伤过程中出现的自由血红素, 还依赖于HO-1的代谢产物一氧化碳(CO)、自由铁(Fe^{2+})和胆绿素的作用. 缺血再灌注损伤产生的高水平溶血引起血红蛋白血管内释放和氧化生成甲基血红素. 甲基血红素使移植器官血管内皮细胞对于缺血再灌注期间产生的ROS的细胞毒性作用更加敏感. 针对于血管内皮细胞的细胞毒性可以激活补体级联反应, 促进血小板聚集, 暴露内皮细胞下层基质, 所有这些均会导致微血管血栓形成, 这是缺血再灌注损伤病理过程的核心机制^[22-23]. 血管内皮细胞过表达HO-1将会阻止血红素以及其他强氧化剂的细胞

毒性作用.

HO-1能够清除细胞内血红素, 当细胞内血红素含量下降到一定阈值水平后, 促氧化血红蛋白如NAD(P)H氧化酶、COX-2、iNOS的表达和功能都将被抑制. NAD(P)H氧化酶是缺血再灌注损伤中超氧化物阴离子的主要来源, 因此HO-1能够明确抑制NAD(P)H氧化酶这一作用具有重要意义. 当同时抑制了超氧化物阴离子、前列腺素和NO(分别合成自COX-2和iNOS), 将会显著抑制缺血再灌注损伤的不良作用. 清除细胞外的血红素可能也是HO-1预防缺血再灌注损伤的机制之一. 最新研究表明, 细胞外血红素能够增强与激活中性粒细胞相关的致炎细胞活素的分泌, 并能抑制中性粒细胞的凋亡, 从而维持其致炎活性^[24]. HO-1通过减少细胞外血红素的水平来抑制致炎反应以达到限制缺血再灌注损伤的作用.

HO-1产生的胆绿素具有强大的保护作用. 在ROS和胆绿素分解酶同时存在的条件下, 通过胆红素-胆绿素循环可以清除大量的ROS预防缺血再灌注损伤. 此外, 在缺血再灌注过程中胆红素可以利用其抗氧化活性抑制氧化应激反应信号转导通道, 也就是NF- κ B的活化作用. CO和NO在缺血再灌注损伤过程中起重要的调节作用, 二者均能激活鸟苷酸环化酶促进生成cGMP, 并抑制内皮细胞血管收缩因子(ET-1, PDGF-B)的表达, 从而松弛平滑肌, 扩张血管, 减轻缺血再灌注损伤. 血小板中cGMP产量增多可抑制血小板聚集, 减少微血管血栓形成. CO还可通过丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)途径下调一些促细胞因子, 抑制内皮细胞凋亡; 通过IL-10和HO-1正反馈循环发挥保护作用.

3 HO-1与器官移植

3.1 急性排斥反应 1997年Poss *et al*发现, HO-1的表达可调节T淋巴细胞的激活和增殖, 缺乏HO-1基因的小鼠外周血中CD4 T淋巴细胞明显多于野生型鼠. 最近的研究表明CD4 T淋巴细胞的激活与HO-1表达上调直接相关, HO-1过表达能抑制CD4 T淋巴细胞的增殖. HO-1的催化产物CO和胆绿素被证实也能起到相同的作用. 他们与CD4 T淋巴细胞的激活和增殖形成了一个负反馈循环链. 诱导HO-1表达可引发受体的CD4 T淋巴细胞发生AICD(控制CD4 T淋巴细胞反应程度的调节机制). 有趣的是CO在血管内皮细胞中表现为抗凋亡作用而在CD4 T淋巴细胞则表现为

■创新盘点

本文总结近年来关于血红素氧合酶-1在脏器移植领域的研究报道, 从缺血再灌注损伤、急性排斥反应、慢性移植排斥等几个方面探讨其保护作用的机制.

■应用要点

本综述为今后进一步研究血红素氧合酶-1在器官移植过程中的细胞保护作用提供了指导,并为将诱导血红素氧合酶-1表达作为一种预处理方法应用于临床打下基础。

促凋亡作用。这两种截然相反的作用相协同,进一步增强了移植器官抗排斥反应的能力。通过保护血管内皮细胞免于凋亡,HO-1可以限制在缺血再灌注和急性排斥反应过程中发生的移植器官的不可逆损伤。同时通过促进激活的CD4 T淋巴细胞凋亡可以限制其对移植器官造成更严重的损害。这可能是CO促进移植器官长期存活的重要机制。胆绿素也具有很强的免疫抑制作用。在小鼠的心脏同种异体移植模型中,胆绿素通过建立供体特异的T淋巴细胞耐受能促进移植心脏的长期存活^[25]。胆绿素还可发挥强大的抗T淋巴细胞增殖作用,破坏T淋巴细胞受体信号以及IL-2(T淋巴细胞激活、增殖所需的细胞活素)的转录。此作用是通过封闭IL-2转录所需的转录因子(如NF- κ B和NF-AT)的核转位而实现的。

3.2 慢性移植器官功能丧失 多个实验证明内源性或外源性HO-1过表达可以阻止小鼠心脏移植模型慢性排斥反应的发展^[26-28]。外源性CO也可起到相似的保护作用,CO可抑制心血管系统白细胞浸润与激活并抑制平滑肌细胞的增殖。这两种作用可以抑制移植器官微血管新生内膜的形成,而微血管新生内膜的形成是慢性移植器官无功能的一个重要病理改变。CO的抗平滑肌细胞增殖作用是通过激活鸟苷酸环化酶生成cGMP,继而激活p38MAPK,表达细胞周期抑制因子p21^{Cip1},使平滑肌细胞周期停滞在G1/S阶段。还有证据显示CO能够抑制细胞周期蛋白A相关激酶和细胞周期蛋白依赖激酶2(cdk2)的活性,这些似乎对其抗增殖作用有帮助。值得注意的是基因敲除p21^{Cip1}可以消除CO对体外培养的平滑肌细胞的抗增殖作用,但并未损害其抑制气球样损伤后小鼠血管的重塑。这说明除了对平滑肌细胞具有抗增殖的作用以外,CO还具有足以抑制新生内膜形成的其他的保护作用。CO对血管内皮细胞和单核巨噬细胞亦具有强大的抗炎和细胞保护作用^[29]。HO-1调节细胞内Fe²⁺含量是否具有阻止慢性移植器官无功能的作用目前仍需进一步研究。已有研究发现血浆低铁蛋白水平与受体死亡率升高相关^[30]。也有实验证实胆红素和胆绿素与移植后动脉硬化相关,血浆胆红素水平高于正常的受体其血管疾病发生率明显降低^[31-33]。最新的研究表明胆绿素具有阻止大鼠气球样变损伤后动脉硬化病灶发展的作用。这一作用对阻止移植相关的动脉硬化病灶形成十分关键。但上述作用是否能够阻止慢性移植器官无功能的发生,仍需更多研究来证实。

4 临床应用前景

CO通常被认为是一种有毒气体,但其对人体的毒性只表现在其浓度超过一定的阈值时,而在小剂量应用的情况下(0.25 mL/L)其有益作用在大小鼠及猪实验模型上都得到了证实。胆绿素和胆红素的临床应用目前也在进一步研究当中,已证明当胆红素血浆水平接近42.75 μ mol/L时,在发挥其保护作用的同时没有发现不良作用。在将诱导HO-1表达应用于临床之前需要解决几个问题,首先:人体内编码HO-1基因的启动子的GT重复序列长度是有个体差异的,称为GT长度的多样性。研究证实GT重复序列越长HO-1对各种应激信号的反应能力越弱,而GT重复序列越短则具有较高的表达能力^[34]。也就是说在人群中使用相同的预处理方法后诱导HO-1表达的程度是不同的,产生保护作用的能力也是不同的;其次,使用HO-1诱导剂是否存在其他的不良药理作用尚需进一步临床研究来证实。今后如证明其可以安全使用的话,无疑将具有广泛的临床应用前景。

总之,近年来大量的研究表明HO-1作为哺乳动物体内唯一可以被诱导的血红素氧合酶同工酶具有抗炎、抗凋亡、抗增生反应等多种保护作用。HO-1可以在机体非正常状态下如:组织缺血、缺氧、氧过多、炎症、高温、辐射等条件下被诱导。HO-1及其催化产物:CO、胆绿素、胆红素等的表达上调在器官移植的多个阶段均可以发挥重要的移植保护作用,具有重要的临床意义。

5 参考文献

- 1 Kato H, Amersi F, Buelow R, Melinek J, Coito AJ, Ke B, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. Heme oxygenase-1 overexpression protects rat livers from ischemia/reperfusion injury with extended cold preservation. *Am J Transplant* 2001; 1: 121-128
- 2 Immenschuh S, Ramadori G. Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 1121-1128
- 3 Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. *J Lab Clin Med* 1970; 75: 410-421
- 4 Otterbein LE, Mantell LL, Choi AM. Carbon monoxide provides protection against hyperoxic lung injury. *Am J Physiol* 1999; 276: L688-L694
- 5 Sarady JK, Otterbein SL, Liu F, Otterbein LE, Choi AM. Carbon monoxide modulates endotoxin-induced production of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 27: 739-745
- 6 Minamino T, Christou H, Hsieh CM, Liu Y, Dhawan V, Abraham NG, Perrella MA, Mitsialis

- SA, Kourembanas S. Targeted expression of heme oxygenase-1 prevents the pulmonary inflammatory and vascular responses to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 8798-8803
- 7 Lee TS, Chau LY. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med* 2002; 8: 240-246
- 8 Sass G, Soares MC, Yamashita K, Seyfried S, Zimmermann WH, Eschenhagen T, Kaczmarek E, Ritter T, Volk HD, Tiegs G. Heme oxygenase-1 and its reaction product, carbon monoxide, prevent inflammation-related apoptotic liver damage in mice. *Hepatology* 2003; 38: 909-918
- 9 Gerard C, Bruyns C, Marchant A, Abramowicz D, Vandenabeele P, Delvaux A, Fiers W, Goldman M, Velu T. Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. *J Exp Med* 1993; 177: 547-550
- 10 Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 16093-16098
- 11 Fondevila C, Shen XD, Tsuchiyashi S, Yamashita K, Csizmadia E, Lassman C, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW, Bach FH. Biliverdin therapy protects rat livers from ischemia and reperfusion injury. *Hepatology* 2004; 40: 1333-1341
- 12 Poss KD, Tonegawa S. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 10925-10930
- 13 Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, Ohta K, Kasahara Y, Koizumi S. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest* 1999; 103: 129-135
- 14 Yet SF, Tian R, Layne MD, Wang ZY, Maemura K, Solovyeva M, Ith B, Melo LG, Zhang L, Ingwall JS, Dzau VJ, Lee ME, Perrella MA. Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice. *Circ Res* 2001; 89: 168-173
- 15 Yet SF, Perrella MA, Layne MD, Hsieh CM, Maemura K, Kobzik L, Wiesel P, Christou H, Kourembanas S, Lee ME. Hypoxia induces severe right ventricular dilatation and infarction in heme oxygenase-1 null mice. *J Clin Invest* 1999; 103: R23-R29
- 16 Fujita T, Toda K, Karimova A, Yan SF, Naka Y, Yet SF, Pinsky DJ. Paradoxical rescue from ischemic lung injury by inhaled carbon monoxide driven by derepression of fibrinolysis. *Nat Med* 2001; 7: 598-604
- 17 Katori M, Buelow R, Ke B, Ma J, Coito AJ, Iyer S, Southard D, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Heme oxygenase-1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an antiapoptotic pathway. *Transplantation* 2002; 73: 287-292
- 18 Tullius SG, Nieminen-Kelha M, Buelow R, Reutzel-Selke A, Martins PN, Pratschke J, Bachmann U, Lehmann M, Southard D, Iyer S, Schmidbauer G, Sawitzki B, Reinke P, Neuhaus P, Volk HD. Inhibition of ischemia/reperfusion injury and chronic graft deterioration by a single-donor treatment with cobalt-protoporphyrin for the induction of heme oxygenase-1. *Transplantation* 2002; 74: 591-598
- 19 Amersi F, Buelow R, Kato H, Ke B, Coito AJ, Shen XD, Zhao D, Zaky J, Melinek J, Lassman CR, Kolls JK, Alam J, Ritter T, Volk HD, Farmer DG, Ghobrial RM, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 1999; 104: 1631-1639
- 20 Nakao A, Kimizuka K, Stolz DB, Seda Neto J, Kaizu T, Choi AM, Uchiyama T, Zuckerbraun BS, Bauer AJ, Nalesnik MA, Otterbein LE, Geller DA, Murase N. Protective effect of carbon monoxide inhalation for cold-preserved small intestinal grafts. *Surgery* 2003; 134: 285-292
- 21 Katori M, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Heme oxygenase-1 system in organ transplantation. *Transplantation* 2002; 74: 905-912
- 22 Korb LC, Ahearn JM. C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *J Immunol* 1997; 158: 4525-4528
- 23 Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Endothelial cells undergoing apoptosis become proadhesive for nonactivated platelets. *Blood* 1999; 93: 3831-3838
- 24 Arruda MA, Rossi AG, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Graca-Souza AV. Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF-kappaB. *J Immunol* 2004; 173: 2023-2030
- 25 Yamashita K, McDaid J, Ollinger R, Tsui TY, Berberat PO, Usheva A, Csizmadia E, Smith RN, Soares MP, Bach FH. Biliverdin, a natural product of heme catabolism, induces tolerance to cardiac allografts. *FASEB J* 2004; 18: 765-767
- 26 Hancock WW, Buelow R, Sayegh MH, Turka LA. Antibody-induced transplant arteriosclerosis is prevented by graft expression of anti-oxidant and anti-apoptotic genes. *Nat Med* 1998; 4: 1392-1396
- 27 Tsui TY, Wu X, Lau CK, Ho DW, Xu T, Siu YT, Fan ST. Prevention of chronic deterioration of heart allograft by recombinant adeno-associated virus-mediated heme oxygenase-1 gene transfer. *Circulation* 2003; 107: 2623-2629
- 28 Bouche D, Chauveau C, Roussel JC, Mathieu P, Braudeau C, Tesson L, Souillou JP, Iyer S, Buelow R, Anegón I. Inhibition of graft arteriosclerosis development in rat aortas following heme oxygenase-1 gene transfer. *Transpl Immunol* 2002; 9: 235-238
- 29 Camara NO, Soares MP. Heme oxygenase-1 (HO-1), a protective gene that prevents chronic graft dysfunction. *Free Radic Biol Med* 2005; 38: 426-435
- 30 Sempos CT, Looker AC, Gillum RF. Iron and heart disease: the epidemiologic data. *Nutr Rev* 1996; 54: 73-84
- 31 Krijgsman B, Papadakis JA, Ganotakis ES, Mikhailidis DP, Hamilton G. The effect of peripheral vascular disease on the serum levels of natural anti-oxidants: bilirubin and albumin. *Int Angiol* 2002; 21: 44-52
- 32 Madhavan M, Wattigney WA, Srinivasan SR, Berenson GS. Serum bilirubin distribution and its relation to cardiovascular risk in children and young adults. *Atherosclerosis* 1997; 131: 107-113
- 33 Ko GT, Chan JC, Woo J, Lau E, Yeung VT, Chow CC, Li JK, So WY, Cockram CS. Serum bilirubin and cardiovascular risk factors in a Chinese population. *J Cardiovasc Risk* 1996; 3: 459-463
- 34 Kimpura T, Takeda A, Watanabe K, Itoyama Y, Ikawa S, Watanabe M, Arai H, Sasaki H, Higuchi S, Okita N, Takase S, Saito H, Takahashi K, Shibahara S. Microsatellite polymorphism in the human heme oxygenase-1 gene promoter and its application in association studies with Alzheimer and Parkinson disease. *Hum Genet* 1997; 100: 145-147

同行评价

本文对血红素氧合酶-1在器官移植中的保护作用进行了综述, 国内未见相同综述文章, 引用文献较全面, 有指导意义。

表达HBeAg和HBsAg对HepG₂细胞系细胞因子分泌及ACE活性的影响

刘志英, 黄玉波, 魏红山, 宋淑静, 冯鑫, 刘亚楠, 成军

■背景资料

近期研究显示, 肝组织局部肾素血管紧张素系统(RAS)的激活与肝纤维化的发生有关, 并证实激活的肝星状细胞表达血管紧张素1型受体。但在慢性乙型肝炎肝纤维化发生过程中, 乙型肝炎病毒(HBV)抗原与肝组织局部RAS活性之间的关系尚不明确。

刘志英, 黄玉波, 魏红山, 宋淑静, 冯鑫, 刘亚楠, 成军, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011

北京市优秀人才专项经费资助项目, No. 20041D0301548

通讯作者: 魏红山, 100011, 北京市东城区安外大街地坛公园13号, 北京地坛医院传染病研究所, drliwer@163.com

电话: 010-64211031-2358 传真: 010-64211031-2306

收稿日期: 2006-01-13 接受日期: 2006-01-24

Effects of HBeAg and HBsAg on cytokine excretion and angiotensin-converting enzyme activity in HepG₂ cell line

Zhi-Ying Liu, Yu-Bo Huang, Hong-Shan Wei, Shu-Jing Song, Xin Feng, Ya-Nan Liu, Jun Cheng

Zhi-Ying Liu, Yu-Bo Huang, Hong-Shan Wei, Shu-Jing Song, Xin Feng, Ya-Nan Liu, Jun Cheng, Institute of Infectious Disease, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China

Supported by Program for Excellent Talents in Beijing, No. 20041D0301548

Correspondence to: Hong-Shan Wei, Institute of Infectious Disease, Beijing Ditan Hospital, 13 Ditan Park, Anwai Street, Beijing 100011, China. drliwer@163.com

Received: 2006-01-13 Accepted: 2006-01-24

Abstract

AIM: To evaluate the effects of hepatitis B virus surface and e antigens (HBeAg and HBsAg) on the activity of angiotensin-converting enzyme (ACE) and cytokines excretion in hepatocellular carcinoma cell line HepG₂.

METHODS: The eukaryotic expression plasmids, including pcDNA3.1(-)-HBsAg, pcDNA3.1(-)-HBeAg, and empty plasmid pcDNA3.1(-), were transfected into HepG₂ cells, and the levels of cytokines, such as IL-6 and IL-8, and the activity of ACE were determined in the supernatants 48 h after transfection by flow cytometry and biochemical methods, respectively.

RESULTS: The expression of HBeAg and HBsAg were detected in the supernatants, but there was no significant difference of ACE activity between the cells transfected with pcDNA3.1(-)-HBsAg, pcDNA3.1(-)-HBeAg, and empty plas-

mid pcDNA3.1(-). The levels of IL-6 and IL-8 in the supernatants had no significant differences between the cells transfected with pcDNA3.1(-)-HBsAg, pcDNA3.1(-)-HBeAg and the control cells.

CONCLUSION: HBeAg and HBsAg has no significant effects on ACE activity and IL-6, IL-8 secretion in HepG₂ cells.

Key Words: Hepatitis B virus; Fibrogenesis; Angiotensin-converting enzyme; HepG₂

Liu ZY, Huang YB, Wei HS, Song SJ, Feng X, Liu YN, Cheng J. Effects of HBeAg and HBsAg on cytokine excretion and angiotensin-converting enzyme activity in HepG₂ cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(9):904-907

摘要

目的: 观察HBeAg和HBsAg对人肝癌细胞系HepG₂细胞中血管紧张素转化酶(ACE)分泌的影响。

方法: 利用本所既往构建的表达乙肝病毒(HBV)表面抗原和E抗原的真核表达载体pcDNA3.1(-)-HBsAg、pcDNA3.1(-)-HBeAg及空载体pcDNA3.1(-)转染HepG₂细胞, 观察转染24, 48 h后细胞上清中ACE活性和炎症细胞因子IL-6、IL-8的变化。培养细胞上清液内ACE活性采用底物裂解法检测; IL-6、IL-8浓度采用流式细胞仪检测。

结果: 转染48 h的HepG₂细胞裂解液中检测到了HBsAg和HBeAg的表达, 但二者细胞上清中的ACE与转染空载体对照pcDNA3.1(-)细胞上清中的ACE无显著差异; 同样, 炎症因子IL-6和IL-8也没有显著差异。

结论: HBV HBsAg和HBeAg对ACE活性、IL-6和IL-8不具有显著的上调或下调作用; HBsAg和HBeAg在肝纤维化发生过程中的作用机制尚待进一步阐明。

关键词: HBV; 肝纤维化; 血管紧张素转化酶; HepG₂

刘志英, 黄玉波, 魏红山, 宋淑静, 冯鑫, 刘亚楠, 成军. 表达HBeAg和HBsAg对HepG₂细胞系细胞因子分泌及ACE活性的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(9):904-907

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/904.asp>

0 引言

近期我们研究结果显示, 肝组织局部肾素血管紧张素系统(RAS)的激活与肝纤维化的发生有关, 并证实激活的肝星状细胞表达血管紧张素1型受体^[1-2]. 该观点随后也被国外研究所证实^[3-4]. 但在慢性乙型肝炎肝纤维化发生过程中, 乙型肝炎病毒(HBV)抗原与肝组织局部RAS活性之间的关系尚不明确. 本研究旨在探讨HBV某些抗原对RAS中关键成分, 血管紧张素转化酶的表达活性、某些炎性细胞因子表达水平的影响, 以期明确慢性乙型肝炎肝纤维化发生与RAS活性之间可能的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 绿色荧光蛋白表达质粒pEGFP、E抗原表达质粒P-HBeAg、表面抗原表达质粒P-HBsAg、pcDNA3.1(-)真核表达载体、感受态JM109和HepG₂细胞由本室保存, 限制性内切酶*Kpn* I 和*Nhe* I 购自欣经科生物公司, GeneJammer多胺转染试剂购自Stratagene公司, 磁珠法质粒提取试剂盒购自Promega公司, 血管紧张素转化酶(ACE)检测试剂盒购自九强公司, 炎性细胞因子测定试剂盒购自美国BD公司.

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的提取、测序和酶切鉴定 按试剂盒说明书进行质粒的中量提取, 设计针对pcDNA3.1(-)载体多克隆位点插入片段上下游引物序列: 上游: 5' GAG AAC CCA CTG CTT ACT GGC 3', 下游: 5' AAC TAG AAG GCA CAG TCG AGG 3', 对提取质粒进行序列测定, 并用*Kpn* I 和*Nhe* I 对重组质粒进行双酶切鉴定.

1.2.2 细胞培养 HepG₂细胞生长于含100 mL/L胎牛血清(Hyclone)的1640培养基中. 于转染前24 h消化, 接种于6孔培养板中, 调节细胞浓度至 2×10^5 细胞/孔.

1.2.3 细胞转染 将表达载体pcDNA3.1(-)-HBeAg, pcDNA3.1(-)-HBsAg按GeneJammer转染试剂说明书转染入HepG₂细胞, 按1 μ g DNA/3 μ L转染试剂/孔的量进行转染; 设pcDNA3.1(-)空载体对照和正常细胞对照, 另外设立转染效率对照

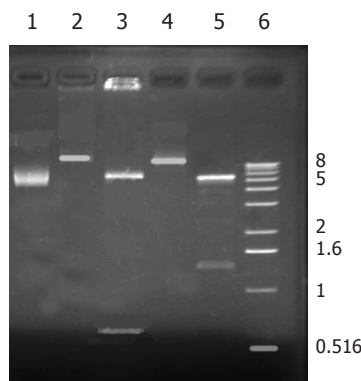


图1 重组质粒的酶切鉴定图. 1: pcDNA3.1(-); 2: pcDNA3.1(-)-HBeAg; 3: pcDNA3.1(-)-HBeAg/*Nhe* I +*Kpn* I 双酶切; 4: pcDNA3.1(-)-HBsAg; 5: pcDNA3.1(-)-HBsAg/*Bam*H I +*Hind* III 双酶切; 6: 1 kb DNA ladder.

pEGFP. 分别于转染24, 48 h后收集转染细胞上清液, 测定上述细胞内ACE和炎性细胞因子IL-6和IL-8在上清的分泌情况; 在转染48 h消化收集转染后的细胞, 用化学发光法检测细胞裂解液中HBeAg和HBsAg的表达. 并在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白表达情况, 计算转染效率.

1.2.4 ACE和细胞因子的测定 ACE测定用购自九强生物公司的试剂盒, 在大型自动生化分析仪(型号: HITACHI7180)进行.

1.2.5 炎性细胞因子(IL-6、IL-8)测定 BD CBA试剂盒购自美国BD公司, 用流式细胞仪进行测定.

统计学处理 计量资料以mean \pm SD表示, 组间差异采用ANOVA分析. 统计软件使用Office 2000 EXCEL.

2 结果

2.1 重组质粒的酶切鉴定 重组质粒pcDNA3.1(-)-HBeAg和pcDNA3.1(-)-HBsAg经*Nhe* I +*Kpn* I 双酶切鉴定可见639 bp的HBeAg和1.2 kb的HBsAg片段(图1). 序列测定结果表明重组质粒构建正确.

2.2 pcDNA3.1(-)-HBeAg, pcDNA3.1(-)-HBsAg及pEGFP转染结果的检测 pEGFP转染HepG₂细胞结果显示, pEGFP转染成功且转染率达到30%-40%. 化学发光法检测转染pcDNA3.1(-)-HBeAg和pcDNA3.1(-)-HBsAg表达载体的细胞培养上清液和细胞裂解液, 结果表明转染48 h后细胞裂解液中HBeAg和HBsAg检测阳性, pcDNA3.1(-)-HBeAg和pcDNA3.1(-)-HBsAg转染成功, 并且在HepG₂细胞内得到了有效的表达(图2). 但二者在细胞培养液上清中检测结果均为阴性.

■ 研究前沿

利用构建的HBeAg和HBsAg表达质粒, 转染HepG₂细胞系的研究结果显示, 转染HBeAg和HBsAg表达质粒后, 培养HepG₂细胞上清液内血管紧张素转化酶活性并未见增加, 提示HBeAg和HBsAg可能不是肝组织局部RAS活性的直接调控因子.

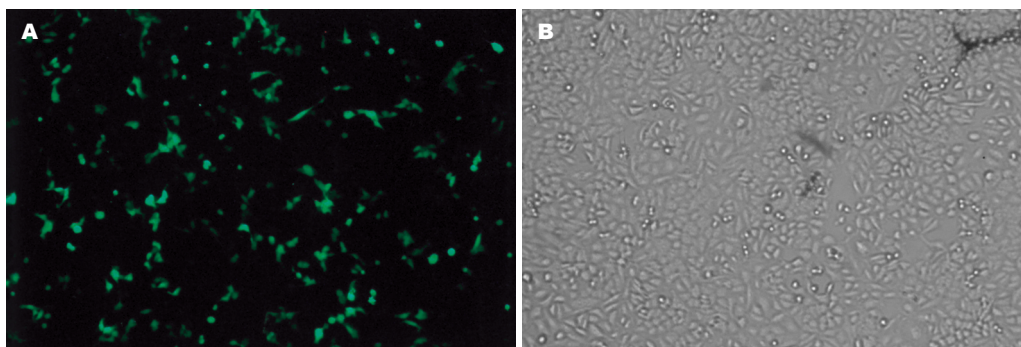


图2 转染48 h后的HepG₂细胞. A: 转染48 h后荧光显微镜下显示的HepG₂细胞; B: 同一视野下普通光学显微镜下显示的HepG₂细胞.

表1 质粒对细胞培养上清中ACE、IL-6和IL-8表达的影响 (mean ± SD)

组别	n	ACE (活性单位)		IL-6 (ng/L)		IL-8 (ng/L)	
		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
pcDNA3.1(-)-HBeAg	4	2.89 ± 1.98	2.51 ± 1.59	414.62 ± 98.98	369.77 ± 37.43	24.32 ± 18.32	77.84 ± 57.57
pcDNA3.1(-)-HBsAg	4	4.47 ± 0.87	3.07 ± 2.04	394.97 ± 47.75	402.58 ± 37.54	21.25 ± 11.94	126.01 ± 63.47
pcDNA3.1(-)	4	2.54 ± 1.18	3.78 ± 2.33	368.11 ± 68.97	295.37 ± 78.93	21.25 ± 11.94	98.00 ± 47.01

2.3 ACE和细胞因子的测定 转染pcDNA3.1(-)-HBeAg, pcDNA3.1(-)-HBsAg后24, 48 h后HepG₂细胞上清液与同期转染空载体对照的pcDNA3.1(-)的细胞上清液分泌的ACE比较无统计学差异, 同时细胞上清分泌的炎症细胞因子IL-6和IL-8也无显著的差异(表1).

3 讨论

早期, 我们的研究曾经揭示, 肝组织局部RAS的激活与肝纤维化发生有关, 血管紧张素转化酶抑制剂和血管紧张素II受体阻断剂可以延缓肝纤维化的发生^[5]. 肝纤维化是肝硬化发生的必然过程, 但乙型肝炎病毒表达蛋白与肝纤维化之间的关系仍然未明确, 一个临床上显而易见的事实是某些慢性HBV携带的患者, 尽管没有显著的慢性肝损伤病史却同样可以导致肝硬化的发生. 究竟是什么因素导致了慢性HBV感染后肝纤维化的发生? 我们试图明确HBV编码蛋白是否可以通过组织局部RAS激活, 即是否通过非炎症机制促进了肝纤维化的发生.

Bruns *et al*^[6]研究结果显示, HBV非感染性亚病毒颗粒对肝细胞HBV具有自身增强作用. 表达HBV表面大蛋白(large surface protein of hepatitis B virus, LHBs)可以导致肝细胞毛玻璃样变, 提示HBV编码蛋白可能通过非炎症机制导致肝细胞的直接损伤^[7]. 利用构建的HBeAg和HBsAg表达质粒, 转染HepG₂细胞系的研究

结果显示, 转染HBeAg和HBsAg表达质粒后, 培养HepG₂细胞上清液内血管紧张素转化酶活性并未见增加, 提示HBeAg和HBsAg可能不是肝组织局部RAS活性的直接调控因子, 但LHBs对ACE的活性影响我们正在观察过程中. 但不能排除的一个因素是体外培养的HepG₂细胞系可能本身即不表达ACE活性. 另外, 本研究中转染后细胞培养上清中HBeAg和HBsAg两种蛋白检测为阴性结果, 可能与载体pcDNA3.1(-)不具有分泌活性有关.

IL-6是一个与肝细胞分泌密切相关的细胞因子, 并具有肝细胞自身保护作用, IL-6基因缺陷小鼠对乙醇诱导的肝细胞损伤更为敏感^[8]. 体内研究还揭示, 高表达IL-6显著降低暴发性肝衰竭的发生率^[9]. IL-8是一个肝细胞和肝星状细胞表达的炎症趋化因子, 高表达IL-8可加剧镉诱导的肝细胞损伤^[10-11]. 为了进一步明确HBeAg和HBsAg对培养肝细胞系的可能间接影响, 我们对转染后的HepG₂培养上清液内的IL-6、IL-8表达水平也进行了检测. 如表1所示, 转染HBeAg后IL-6有所降低, IL-8有所升高, 而HBsAg似乎也有类似影响, 但与转染空质粒相比无显著性差异.

基于现有的研究资料, HBV表达的蛋白中只有LHBs对肝细胞有直接毒性作用的客观证据^[7], 但因LHBs具有很强的细胞内滞留性, 质粒构建和表达相对困难^[12], 相应的研究我们目前正

在进行中.

4 参考文献

- 1 Wei HS, Lu HM, Li DG, Zhan YT, Wang ZR, Huang X. The expression of AT1 receptor on hepatic stellate cells in rat fibrosis induced by CCl₄. *Chin Med J* 2001; 114: 583-587
- 2 魏红山, 李定国, 陆汉明, 展玉涛, 王志荣, 黄新, 徐芹芳. 血管紧张素 II 对肝星状细胞增殖及胶原合成影响. *中华肝病杂志* 2001; 9: 133
- 3 Paizis G, Tikellis C, Cooper ME, Schembri JM, Lew RA, Smith AI, Shaw T, Warner FJ, Zuilli A, Burrell LM, Angus PW. Chronic liver injury in rats and humans upregulates the novel enzyme angiotensin converting enzyme 2. *Gut* 2005; 54: 1790-1796
- 4 Bataller R, Sancho-Bru P, Gines P, Lora JM, Al-Garawi A, Sole M, Colmenero J, Nicolas JM, Jimenez W, Weich N, Gutierrez-Ramos JC, Arroyo V, Rodes J. Activated human hepatic stellate cells express the renin-angiotensin system and synthesize angiotensin II. *Gastroenterology* 2003; 125: 117-125
- 5 魏红山, 李定国, 陆汉明, 展玉涛, 王志荣, 黄新, 徐芹芳, 陈颖伟. 肾素-血管紧张素系统与肝纤维化发生. *中华消化杂志* 2001; 21: 145-147
- 6 Bruns M, Miska S, Chassot S, Will H. Enhancement of hepatitis B virus infection by noninfectious subviral particles. *J Virol* 1998; 72: 1462-1468
- 7 Foo NC, Ahn BY, Ma X, Hyun W, Yen TS. Cellular vacuolization and apoptosis induced by hepatitis B virus large surface protein. *Hepatology* 2002; 36: 1400-1407
- 8 El-Assal O, Hong F, Kim WH, Radaeva S, Gao B. IL-6-deficient mice are susceptible to ethanol-induced hepatic steatosis: IL-6 protects against ethanol-induced oxidative stress and mitochondrial permeability transition in the liver. *Cell Mol Immunol* 2004; 1: 205-211
- 9 Hecht N, Pappo O, Shouval D, Rose-John S, Galun E, Axelrod JH. Hyper-IL-6 gene therapy reverses fulminant hepatic failure. *Mol Ther* 2001; 3: 683-687
- 10 Gutierrez-Ruiz MC, Bucio L, Correa A, Souza V, Hernandez E, Gomez-Quiroz LE, Kershenovich D. Metadoxine prevents damage produced by ethanol and acetaldehyde in hepatocyte and hepatic stellate cells in culture. *Pharmacol Res* 2001; 44: 431-436
- 11 Horiguchi H, Harada A, Oguma E, Sato M, Homma Y, Kayama F, Fukushima M, Matsushima K. Cadmium-induced acute hepatic injury is exacerbated in human interleukin-8 transgenic mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; 163: 231-239
- 12 Bruss V. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. *Virus Res* 2004; 106: 199-209

电编 张敏 编辑 王瑾晖

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

• 消息 •

第十八届全国中西医结合防治消化系统疾病学术会议

本刊讯 第十八届全国中西医结合防治消化系统疾病学术会议将于2006-08在哈尔滨举行, 现将征文通知如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文(3 000字), 结构式摘要(1 000字), 电脑打印(附软盘)或E-mail, 2006-05-31截稿.

2 联系方式

哈尔滨市南岗区学府路45号解放军第211医院中医科 孙旗立; 邮编: 150080; 电话: 0451-57752440; E-mail: 211zyke@163.com.

茶多酚对雷公藤内酯醇致小鼠肝损害的保护作用

李钦民, 韩真

■背景资料

中草药及其提取物引起的肝损害现已屡见不鲜, 临床表现多样化, 其机制也往往较为复杂。为促进植物药的研究和应用, 人们提取其有效活性成分, 并通过改变药物的剂型、吸收途径以及联合用药等多种方式以达增效减毒的目的, 某些传统解毒中药也受到研究者越来越多的重视。

■研发前沿

雷公藤内酯醇是从经典抗免疫中草药雷公藤分离得到的主要有效成分之一, 在器官移植抗排斥反应方面已显示广阔的应用前景, 但它的毒性限制了临床应用; 茶多酚是同样经典的减毒中草药茶叶中的主要有效成分, 国内外大量报道证实其对多种原因所致的实验性肝损伤有保护作用。本文将二者联合应用于小鼠观察茶多酚的肝肾保护作用, 并初步探讨相关机制。

李钦民, 韩真, 皖南医学院附属弋矶山医院消化内科 安徽省芜湖市 241001

通讯作者: 韩真, 241001, 安徽省芜湖市, 皖南医学院附属弋矶山医院消化内科. liqm1029@sohu.com

电话: 0553-5738856-2316 传真: 0553-573999-2021

收稿日期: 2006-01-20 接受日期: 2006-02-09

Protective effects of tea polyphenols on liver against triptolide-induced hepatic injury in mice

Qin-Min Li, Zhen Han

Qin-Min Li, Zhen Han, Department of Gastroenterology, Yijishan Hospital, Wannan Medical College, Wuhu 241001, Anhui Province, China

Correspondence to: Zhen Han, Department of Gastroenterology, Yijishan Hospital, Wannan Medical College, Wuhu 241001, Anhui Province, China. liqm1029@sohu.com

Received: 2006-01-20 Accepted: 2006-02-09

Abstract

AIM: To investigate the effects of tea polyphenols (TP) on liver toxicity induced by triptolide (TPI) in mice, and to explore the correlated mechanism.

METHODS: Seventy mice were randomly and averagely divided into five groups: high dose TPI (0.03 mg/kg) group, low dose TPI (0.015 mg/kg) group, high dose TPI (0.03 mg/kg) plus TP (300 mg/kg) group, low dose TPI (0.03 mg/kg) plus TP (300 mg/kg) group, and control group. After treatment with the corresponding methods for 60 d, we observed the levels of serum alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), the activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), and the contents of malondialdehyde (MDA) in liver homogenate, as well as the histopathological changes of liver and kidney.

RESULTS: In comparison with those in control group, the level of serum ALT and the content of hepatic MDA were significantly elevated in group A and B (ALT: 63.7 ± 10.9 , 95.8 ± 12.5 $\mu\text{kat/L}$ vs 38.2 ± 5.6 $\mu\text{kat/L}$, $P < 0.01$; MDA:

8.11 ± 1.38 , 12.86 ± 2.01 nmol/mgp vs 6.39 ± 0.98 nmol/mgp, $P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the activities of hepatic SOD and GST were significantly dropped (92.31 ± 10.26 , 75.93 ± 9.11 U/mgp vs 122.23 ± 15.27 U/mgp, $P < 0.05$ or $P < 0.01$; 15.17 ± 4.41 , 11.25 ± 3.46 U/mgp vs 20.53 ± 5.16 U/mgp, $P < 0.05$ or $P < 0.01$). Pathological examination showed degeneration of hepatic and renal cells in group A and B. The level of serum ALT (39.4 ± 5.0 , 43.4 ± 6.3 $\mu\text{kat/L}$), the content of hepatic MDA (6.42 ± 1.04 , 6.58 ± 1.19 nmol/mgp) and the activity of SOD (119.10 ± 12.72 , 109.53 ± 11.58 U/mgp) had no significant difference in group C and D from those of control group. The activity of hepatic GST in group C was higher than that in control group (27.19 ± 5.24 U/mgp vs 20.53 ± 5.16 U/mgp, $P < 0.05$). No marked pathological changes of liver and kidney were observed in group C and D.

CONCLUSION: TPI has toxicity on the liver and kidney in mice, while TP can decrease the toxicity efficiently by inhibiting lipid peroxidation and inducing hepatic drug-metabolizing enzymes.

Key Words: Triptolide; Tea polyphenols; Liver toxicity; Lipid peroxidation

Li QM, Han Z. Protective effects of tea polyphenols on liver against triptolide-induced hepatic injury in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(9):908-911

摘要

目的: 观察不同剂量雷公藤内酯醇(TPI)致小鼠肝损害的作用以及茶多酚(TP)对其损害的保护作用, 并初步探讨相关机制。

方法: 昆明种小鼠70只, 随机平均分成5组: 低剂量TPI(0.015 mg/kg)组(A)、高剂量TPI(0.03 mg/kg)组(B)、低剂量TPI(0.015 mg/kg)+TP(300 mg/kg)组(C)、高剂量TPI(0.03 mg/kg)+TP(300 mg/kg)组(D)和正常对照组。实验60 d后观察各组小鼠肝功能酶、肝匀浆丙二醛(MDA)含量、过氧化物歧化酶(SOD)活性、谷胱甘肽-S转移酶(GST)活性及肝肾病理组织学的特点。

结果: 与对照组相比, A, B组血清ALT、肝匀浆MDA的含量显著提高(ALT: 63.7 ± 10.9 , 95.8 ± 12.5 $\mu\text{kat/L}$ vs 38.2 ± 5.6 $\mu\text{kat/L}$, $P < 0.01$; MDA: 8.11 ± 1.38 , 12.86 ± 2.01 nmol/mgp vs 6.39 ± 0.98 nmol/mgp, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 肝匀浆SOD和GST的活性显著降低(92.31 ± 10.26 , 75.93 ± 9.11 U/mgp vs 122.23 ± 15.27 U/mgp, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$; 15.17 ± 4.41 , 11.25 ± 3.46 U/mgp vs 20.53 ± 5.16 U/mgp, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 病理组织学均可见肝肾细胞变性等改变; C, D组血清ALT(39.4 ± 5.0 , 43.4 ± 6.3 $\mu\text{kat/L}$)、肝匀浆MDA含量(6.42 ± 1.04 , 6.58 ± 1.19 nmol/mgp)、SOD活性(119.10 ± 12.72 , 109.53 ± 11.58 U/mgp)无显著性改变, 肝肾病理组织学未见异常. C组肝匀浆GST的活性增高(27.19 ± 5.24 U/mgp vs 20.53 ± 5.16 U/mgp, $P < 0.05$).

结论: TPI对小鼠肝肾均有一定的损害, 而TP具有很好的保护作用, 其机制与对抗脂质过氧化反应和诱导肝药酶有关.

关键词: 雷公藤内酯醇; 茶多酚; 肝毒性; 脂质过氧化

李钦民, 韩真. 茶多酚对雷公藤内酯醇致小鼠肝损害的保护作用. 世界华人消化杂志 2006;14(9):908-911

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/908.asp>

0 引言

雷公藤内酯醇(triptolide, TPI), 又称雷公藤甲素, 是从卫矛科雷公藤属植物中分离得到的二萜内酯化合物, 是雷公藤中的主要有效成分之一, 具有显著的免疫抑制、抗炎、抗生育及抗肿瘤等多种生物活性, 尤其在器官移植抗排斥反应方面具有广阔的应用前景^[1]. 同时他属于毒性很强的药物, 多系统不良反应限制了他的临床应用. 茶多酚(tea polyphenols, TP)是茶叶中一种主要活性成分, 具有清除自由基和抗氧化等重要生物活性, 对多种原因所致的实验性肝损伤有保护作用^[2]. 本实验旨在观察TPI对小鼠肝脏的毒性作用, 并通过TP的对照干预观察TP的保护作用, 探讨相关机制, 为TPI和TP的进一步临床应用和研究提供实验基础.

1 材料和方法

1.1 材料 实验动物用健康成年昆明种小鼠70只(购自南京医药大学实验动物中心), 雌雄各半, 体质量 20 ± 2 克. TPI由中国医学科学院南京皮肤病研究所马鹏程教授惠赠, 纯度99.78%, 用二甲亚砜(DMSO)配成2 g/L原液, -20°C 保存, 用

时配成所需浓度溶液. TP购自安徽茶多酚厂(TP含量为99.1%, 儿茶素含量83.9%, EGCG含量57.2%, 批号: 20050320-2). 相关生化指标测定的试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供.

1.2 方法 实验动物70只随机平均分成5组, 每组14只, 雌雄各半(分笼饲养): A组, 每天灌胃TPI 0.015 mg/kg; B组, 每天灌胃TPI 0.03 mg/kg; C组, 每天灌胃TPI 0.015 mg/kg+TP 300 mg/kg; D组, 每天灌胃TPI 0.03 mg/kg+TP 300 mg/kg; 正常对照组, 每天灌胃生理盐水. 每天给药1次, 连续60 d, 小鼠在实验期间自由进食和饮水, 每周称体质量一次, 根据体质量调整用药量. 末日隔夜禁食不禁水, 次日晨摘眼球取血后处死小鼠, 分离血清测定肝功能, 并取所需器官测定质量计算脏器指数、肝匀浆生化指标及病理组织学检查.

1.2.1 肝功能测定 标本采用空腹12 h以上的动脉血, 取血后立即分离血清, -80°C 保存, 测定血清谷丙转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP).

1.2.2 肝匀浆生化指标测定 取肝左叶, 4°C 下制成100 g/L肝匀浆, 分别测定丙二醛(MDA)、过氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽-S转移酶(GST). 结果以每克肝组织蛋白的含量表示. MDA采用硫代巴比妥酸法(TBA法); SOD采用羟胺法; GST采用化学比色法; 组织蛋白含量采用考马斯亮蓝法测定. 以上均按试剂盒说明书操作方法测定.

1.2.3 病理组织学检查 取肝左叶及右肾, 40 g/L甲醛固定, 石蜡包裹, 切片后常规HE染色, 显微镜下观察肝组织及肾组织病理变化. 每张切片分别随机拍摄2个视野的低倍镜(10×10)和高倍镜(10×40)图像, 观察肝细胞变性情况.

统计学处理 定量资料数据用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 使用单因素方差分析以及SNK- q 检验进行统计分析.

2 结果

2.1 肝肾脏器指数 实验期间, 各组小鼠活动、进食、毛发正常, 实验4 wk时, B组雌鼠死亡1只; 实验结束时观察各组肝肾脏器指数, B组肝肾脏器指数与对照组相比显著下降($P < 0.01$); A、C、D三组肝肾脏器指数与对照组相比无显著差异($P > 0.05$, 表1).

2.2 血清ALT、ALP AST是肝细胞内非特异性功能酶, 血清ALT是反映肝细胞损伤较灵敏的指标; ALP主要从胆汁中排泄, 胆汁淤积时血清

■ 相关报道

华中科技大学药物研究所梅之南 *et al*利用固体脂质纳米粒降低小鼠雷公藤内酯醇肝毒性取得显著效果, 但固体脂质纳米粒工艺繁琐、价格昂贵, 难以推广使用, 另外, 他们对肾脏等其他脏器的影响也未作探讨.

■ 创新盘点

本文首次运用茶多酚对雷公藤内酯醇致小鼠肝损害进行干预, 发现雷公藤内酯醇的肝脏损害与雷公藤内酯醇自身固有性引起肝细胞脂质过氧化等机制有关; 而茶多酚对肝肾均有很好的保护作用, 其作用与抗氧化、诱导肝药酶的活性等有关.

■应用要点

本研究为雷公藤内酯醇和茶多酚的进一步研究和临床应用提供了实验基础,也为有毒中药的减毒治疗研究提供了新的思路。

ALP增高。如表2所示, A、B两组ALT活性与对照组相比显著升高; C、D两组ALT活性与对照组无显著差异; A组与C组、B组与D组ALT活性相比均有显著升高, B组与A组相比也有显著升高; A、B、C、D组ALP与对照组无显著差异。

2.3 肝匀浆生化指标 SOD、MDA是反映组织脂质过氧化常用的指标, GST是肝药酶的一种, 兼有清除体内过氧化物及解毒双重功能。如表3所示, A、B两组肝组织SOD、GST活性及MDA含量与对照组有显著差异(表现为SOD、GST活性降低, MDA含量增加), 而C、D两组SOD活性及MDA含量与对照组比较变化不明显; C组GST活性高于对照组。

2.4 病理组织学改变 (1)各组肝脏、肾脏大体形态正常, 包膜完整, 色泽鲜红, 未见明显病变。(2)光镜下HE染色显示肝细胞索排列规则, A、B两组可见肝细胞水样变性, 伴片状坏死, 坏死区可见大量淋巴细胞浸润, 以小叶3区带显著; 此外A、B两组还可见肾小球滤过膜细胞显著增生, 部分切片可见肾小球坏死伴淋巴细胞浸润, 同时有肾小管上皮细胞变性和轻度坏死, 部分肾小管管腔内可见蛋白管型; B组病变较A组显著, 雌性较雄性病变显著。C、D、E组肝脏及C、E组肾脏大致正常, D组肾脏亦有肾小球滤过膜细胞增生及肾小管上皮细胞变性, 但程度较轻, 并且无肾小球、肾小管上皮细胞的坏死。

3 讨论

随着中草药及其制剂日益广泛使用, 植物药引起药物性肝病的报道及相关药物种类也逐年增加^[3]。药物一般通过中毒性肝损害、免疫反应介导两种途径引起肝脏损害, 前者呈剂量依赖性, 即剂量越大, 损害越重, 而后者往往和个体体质有关, 无明显剂量依赖性。雷公藤临床使用安全范围比较窄, 不良反应时有报道。TPI是雷公藤主要有效成分, 同时又是毒性成分, 肝损害是其主要副反应之一^[4]。通过本实验观察, TPI肝脏损害主要表现为非特异性肝细胞变性、坏死, 无胆汁淤积, 雌性小鼠肝损害较雄性显著, 且损害程度与剂量呈正比, 提示TPI是通过自身固有毒性直接引起肝脏损害。药物本身含有的或经肝药酶代谢产生的有毒物质如自由基、亲电子基、氧基等, 可通过肝脏SOD、GST等的解毒作用而不产生肝损伤, 当这些有毒活性物质的产生超过了肝脏的代偿水平, 即可发生中毒性肝损害^[5]。本实验中肝匀浆SOD、GST活性降低及MDA含

表 1 实验60 d后小鼠肝肾脏器指数 (mean ± SD)

组别	n	脏器指数(×10 ⁻²)	
		肝	肾(右侧)
A组	14	3.23 ± 0.29	0.67 ± 0.036
B组	13	2.89 ± 0.22 ^b	0.61 ± 0.047 ^b
C组	14	3.40 ± 0.30	0.69 ± 0.043
D组	14	3.47 ± 0.37	0.67 ± 0.033
对照组	14	3.51 ± 0.33	0.70 ± 0.048

^bP<0.01 vs 对照组。

表 2 实验后小鼠血清ALT、ALP活性 (mean ± SD, μkat/L)

组别	n	ALT	ALP
A组	14	63.7 ± 10.9 ^{bc}	72.7 ± 12.5
B组	13	95.8 ± 12.5 ^{bf}	85.9 ± 15.4
C组	14	39.4 ± 5.0	63.6 ± 16.2
D组	14	43.4 ± 6.3	78.1 ± 15.9
对照组	14	38.2 ± 5.6	61.1 ± 15.3

^bP<0.01 vs 对照组; ^cP<0.05 vs C、B、D组; ^fP<0.01 vs A组。

表 3 肝组织 SOD、GST活性、MDA含量 (mean ± SD)

组别	n	SOD (U/mgp)	MDA (nmol/mgp)	GST (U/mgp)
A组	14	92.31 ± 10.26 ^{ac}	8.11 ± 1.38 ^{ac}	15.17 ± 4.41 ^{ac}
B组	13	75.93 ± 9.11 ^{bc}	12.86 ± 2.01 ^{bc}	11.25 ± 3.46 ^{bc}
C组	14	119.10 ± 12.72	6.42 ± 1.04	27.19 ± 5.24 ^a
D组	14	109.53 ± 11.58	6.58 ± 1.19	18.99 ± 6.31
对照组	14	122.23 ± 15.27	6.39 ± 0.98	20.53 ± 5.16

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 对照组; A和B组、A和C组及B和D组间比较, ^cP<0.05。

量显著增加提示TPI肝毒性应与过量自由基、亲电子基、氧基等产生引起肝细胞脂质过氧化等病变有关。

TP含有多个酚羟基, 极易被氧化成为醌类而提供质子H⁺, 具有较强的供氢能力, 能够显著地清除体内的有害自由基并抑制原来的自由基链锁反应。Lee *et al*^[6]在Fe³⁺诱导的沙鼠脑组织匀浆脂质过氧化过程中, 发现TP单体EGCG抗脂质过氧化能力超过trolox、硫辛酸和褪黑素等常见的抗氧化物质。除了抗氧化作用之外, TP还可通过抑制肠道细菌生长以减少肠源性内毒素产生^[7]、阻断NF-κB活化和TNF-α mRNA及其蛋白表达^[8]等途径参与肝脏保护作用。本实验结果提示, TP可有效降低TPI致肝损害的小鼠肝组织过氧化产物MDA含量、增强SOD活性, 提高肝脏抗氧化能

力. TP同时显著增强GST活性, 提高肝脏解毒能力, 提示TP的肝脏保护作用还与诱导肝药酶的活性有关. 我们同时观察肾脏的变化, 进一步证实TP对肾脏亦有很好的保护作用^[9], 相关保护机制尚有待进一步研究.

总之, TPI在器官移植、抗炎、抗生育及抗肿瘤等领域有很好的疗效, 但对肝肾均有一定的损害; 而TP具有很好的保护作用, 且在我国来源广泛, 价格低廉, 将二者联合使用有很好的应用前景, 也为中药的减毒治疗提供了思路, 但尚需对二者联用后的疗效作进一步的观察.

4 参考文献

- 1 梅之南, 杨祥良, 徐辉碧. 雷公藤内酯醇的药理研究. 中国医院药学杂志 2003; 23: 9
- 2 刘少锋, 韩真. 茶多酚的生物活性及其对实验性肝损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2429-2431
- 3 Aithal GP. When is a herb a drug? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 391-393
- 4 Mei Z, Li X, Wu Q, Hu S, Yang X. The research on the anti-inflammatory activity and hepatotoxicity of triptolide-loaded solid lipid nanoparticle. *Pharmacol Res* 2005; 51: 345-351
- 5 刘平, 宋东春. 药物性肝损伤的发病机理. 中华肝脏病杂志 2001; 6: 40
- 6 Lee SR, Im KJ, Suh SI, Jung JG. Protective effect of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate and other antioxidants on lipid peroxidation in gerbil brain homogenates. *Phytother Res* 2003; 17: 206-209
- 7 Zhong Z, Froh M, Connor HD, Li X, Conzelmann LO, Mason RP, Lemasters JJ, Thurman RG. Prevention of hepatic ischemia-reperfusion injury by green tea extract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G957-G964
- 8 Ooshima T, Minami T, Matsumoto M, Fujiwara T, Sobue S, Hamada S. Comparison of the cariostatic effects between regimens to administer oolong tea polyphenols in SPF rats. *Caries Res* 1998; 32: 75-80
- 9 陈贵良, 刘惠茹, 姚林, 张艳淑. 茶多酚对关木通所致小鼠肾脏损伤及锌、铜、镁含量的影响. 中国职业医学 2005; 32: 27-29

■同行评价

文章具有一定的科学性, 但创新性不够, 不过仍不失为好的探索.

电编 李琪 编辑 王瑾晖

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

●消息●

技法与经验

本刊讯《世界华人消化杂志》2006年设置“技法与经验”专栏, 及时报道微创、内镜下治疗消化病新的技术和方法及成熟的经验. 我们热烈欢迎本领域主任医师、副主任医师踊跃投稿, 免费刊登彩色照片(附单位证明). 写作格式如下:

结肠镜下黏膜剥离切除术

0 引言

1 技术方法 1.1 原理; 1.2 适应证; 1.3 器材准备; 1.4 步骤; 1.5 实例

2 结果

3 讨论 3.1 并发症; 3.2 优点和缺点; 3.3 经验与技巧

4 参考文献

慢性丙型肝炎患者血清HCV RNA, ALT与肝脏病理间的关系

李颖, 丁洋, 王雪莲, 刘沛

■背景资料

HCV感染与慢性肝炎、肝硬化甚至肝癌的发生关系密切, 目前HCV感染导致的肝硬化也是肝移植的主要原因。世界人群HCV感染率约为3%, 我国人群HCV感染率约为3.2%。HCV感染导致慢性化和肝损伤的机制研究一直备受关注, 明确其间的关系, 对于明确HCV感染者疾病的状态并采取有效的治疗措施具有重要的意义。

李颖, 丁洋, 王雪莲, 刘沛, 中国医科大学附属第二医院感染科 辽宁省沈阳市 110004

辽宁省医学科技创新工程技术项目(辽财企), No. [2004]302

通讯作者: 刘沛, 110004, 沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属第二医院感染科, sylupei2003@yahoo.com.cn

电话: 024-83956451 传真: 024-83956451

收稿日期: 2006-01-20 接受日期: 2006-01-26

Correlations of serum hepatitis C virus RNA and alanine transaminase with liver histopathological changes in patients with chronic hepatitis C

Ying Li, Yang Ding, Xue-Lian Wang, Pei Liu

Ying Li, Yang Ding, Xue-Lian Wang, Pei Liu, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Supported by the Medical Science and Technology Innovation Project of Liaoning Province, No. [2004]302

Correspondence to: Pei Liu, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. sylupei2003@yahoo.com.cn

Received: 2006-01-20 Accepted: 2006-01-26

Abstract

AIM: To investigate the relationship among serum hepatitis C virus RNA titer, alanine transaminase (ALT) and liver histological changes in patients with chronic hepatitis C.

METHODS: Fluorescent quantitative polymerase chain reaction was used to detect the level of serum HCV RNA in 132 patients with chronic hepatitis C; meanwhile, the levels of serum ALT were measured by biochemical instrument. Liver biopsy was performed in 30 of 132 patients, and histopathological changes were observed by HE staining under light microscope and scored according to the grades of liver necro-inflammatory activity and stages of liver fibrosis.

RESULTS: Of 132 cases, 98 (74.2%) were positive

for HCV RNA (over 1.0×10^6 copies/L), and 99 (75.0%) were with a higher ALT level. No significant correlation was noted between HCV RNA titer and ALT level ($r = 0.40$, $P = 0.695$), but a statistical relationship was noted between HCV RNA titer and the abnormal rate of ALT level ($r = 1.00$, $P < 0.01$). Liver biopsies indicated that HCV-RNA titer was not significantly correlated with the grades of liver necro-inflammatory activity ($r = 0.50$, $P = 0.667$) or the stage of liver fibrosis ($r = 0.20$, $P = 0.80$). The level of serum ALT was not markedly correlated with the stages of liver fibrosis ($r = 0.40$, $P = 0.60$), either, but statistically correlated with the grades of liver necro-inflammatory activity ($r = 1.00$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: HCV RNA titer has no correlation with ALT level, and it can not reflect the degree of liver histological damage in patients with chronic hepatitis C. ALT level has no correlation with the stages of liver fibrosis, but it can reflect the grades of liver necro-inflammatory activity to some extent.

Key Words: Hepatitis C Virus; RNA; Aminotransferase; Histopathology

Li Y, Ding Y, Wang XL, Liu P. Correlations of serum hepatitis C virus RNA and alanine transaminase with liver histopathological changes in patients with chronic hepatitis C. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(9):916-919

摘要

目的: 探讨慢性丙型肝炎患者血清HCV-RNA水平、ALT浓度及肝组织病理改变三者之间的关系。

方法: 采用荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)检测132例慢性丙型肝炎患者血清中HCV RNA的水平, 用生化自动分析仪检测ALT值, 其中30例患者进行了肝脏活检, 用HE染色, 光学显微镜下观察肝脏病理改变。

结果: 在132例慢性丙型肝炎患者中有98例

HCV RNA水平超过 1.0×10^6 拷贝/L, 阳性率为74.2%, 有99例ALT水平超过正常值, 异常率为75.0%。HCV-RNA水平与ALT浓度相关性不显著($r = 0.40$, $P = 0.695$), 与ALT异常率呈明显相关($r = 1.00$, $P < 0.01$)。肝穿病理结果表明, HCV-RNA水平与肝脏的炎症活动度和纤维化程度均不相关($r = 0.50$, $P = 0.667$; $r = 0.20$, $P = 0.80$)。ALT浓度与肝脏的纤维化程度不相关($r = 0.40$, $P = 0.60$), 而与肝脏的炎症活动度呈明显相关($r = 1.00$, $P < 0.01$)。

结论: 慢性丙型肝炎患者血清HCV RNA水平与ALT浓度无关, 也不能反映肝组织病理损伤程度; ALT浓度与肝脏的纤维化程度无关, 但可在一定程度上反映肝脏的炎症改变。

关键词: 丙型肝炎病毒; RNA; 丙氨酸氨基转移酶; 组织病理学

李颖, 丁洋, 王雪莲, 刘沛. 慢性丙型肝炎患者血清HCV RNA, ALT与肝脏病理间的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(9):916-919
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/916.asp

0 引言

自从1989年发现丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)以来, HCV感染已经被认为是引起世界范围内慢性肝脏疾病并导致慢性肝炎、肝硬化甚至肝癌发生的主要原因^[1-2]。世界人群HCV感染率约为3.0%(0.1%-10%)^[3], 我国一般人群HCV感染率为3.2%, 约3800万人感染HCV^[4]。HCV感染的实验室诊断主要是用酶联免疫吸附试验(ELISA)和聚合酶链反应法(PCR)分别检测血清中的抗-HCV和HCV RNA^[5-6]。长期以来, 对于丙型肝炎慢性化和肝损伤的机制一直都在探讨之中^[3]。我们应用近几年发展起来的荧光定量聚合酶链反应法(fluorescent quantitative polymerase chain reaction, FQ-PCR)^[7-8]定量检测132例慢性丙型肝炎患者血清中HCV RNA的水平, 用大型自动生化分析仪检测丙氨酸氨基转移酶(aminotransferase, ALT)浓度, 并对30例肝脏活检标本的病理改变进行回顾性研究, 以探讨HCV RNA水平、ALT浓度与肝组织损伤三者之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 132例血清标本均来自我科2004-09/2005-09住院患者, 男92例, 女40例, 年龄15-84岁, 平均 46.64 ± 13.94 岁, 诊断均符合2000年西安全国传染病与寄生虫病学术会议修订的病毒性肝

表 1 血清HCV-RNA与ALT的关系

HCV-RNA水平 (拷贝/L)	n	ALT (mean \pm SD) (nkat/L)	ALT异常	
			n	%
$<1 \times 10^6$	34	$1\ 290.6 \pm 1\ 165.6$	19	57.57
10^6	10	$1\ 299.0 \pm 943.8$	6	60.00
10^7	8	$1\ 278.9 \pm 1\ 135.6$	6	75.00
10^8	18	$1\ 442.4 \pm 1\ 123.9$	14	77.77
10^9	38	$1\ 434.1 \pm 987.2$	32	84.21
10^{10}	24	$1\ 550.8 \pm 1\ 455.8$	22	91.66

炎防治方案中拟订的诊断标准。132例标本经检测抗-HCV抗体均为阳性, 且排除甲、乙、戊型肝炎病毒感染。

1.2 方法 HCV RNA定量检测采用荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR), 仪器为大和Line-Gene II 荧光定量PCR扩增仪, 由杭州博日公司提供; 试剂由深圳匹基公司提供。HCV RNA载量的正常值为 $<1 \times 10^6$ 拷贝/L。具体方法: 在150 μ L裂解液中加入50 μ L血清、50 μ L氯仿, 充分混匀, 离心13 000 g, 10 min, 取上清, 加入等量异丙醇, 离心, 然后用750 mL/L的乙醇洗一次, 沉淀中加入PCR反应液, Tag酶, 按如下条件, 逆转录与扩增一步完成: 42 $^{\circ}$ C 30 min, 95 $^{\circ}$ C 3 min, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40个循环, 反应体系50 μ L。每次实验均设强阳性、弱阳性和阴性对照。ELISA检测抗-HCV。试剂由华美生物工程公司提供的第3代抗-HCV诊断试剂盒, 所使用的包被抗原为含有丙肝病毒结构区核心抗原及非结构区抗原的合成多肽抗原及基因工程抗原。检测的方法按照说明书操作, 阈值 = $0.05 + 0.08 \times$ 阳性对照平均值。ALT的检测由日立全自动生化分析仪完成。肝穿取肝组织1-2 cm以上, 立即40 g/L甲醛溶液固定, 常规脱水, 石蜡包埋切片后, 作HE染色, 病理诊断参考2000年西安全国传染病与寄生虫病学术会议修订的病毒性肝炎诊断标准中的组织病理学诊断标准进行分级和分期^[9], 由中国医大附属二院病理室协助完成。

统计学处理 采用SPSS 10.0软件进行相关性分析。HCV RNA水平与ALT浓度的相关性采用Pearson相关分析, 其他组别采用Spearman相关分析。

2 结果

在132例慢性丙型肝炎患者血清中, HCV RNA水平 $>1 \times 10^6$ 拷贝/L的标本98例, 阳性率为74.2%, ALT >667 nkat/L的标本有99例, 异常率为75.00%(表1)。经相关性分析, HCV RNA水平与

■创新盘点

国内学者发表的相关文章大多都是将HCV RNA水平与ALT进行比较以确定HCV RNA与肝损伤的关系, 真正有肝脏病理结果的文章很少。第二军医大学谭龙益 *et al* 的文章对肝脏病理结果按轻、中、重度进行分组。本文的创新之处就在于不仅进行了30例的肝脏活检并按照肝脏炎症活动度和纤维化程度的分级和分期将HCV RNA、ALT和肝脏病理三者之间的相关性进行了分析, 所得结果更详细、更客观。

■应用要点

本文结果提示,虽然HCV RNA水平对于HCV感染者的抗病毒治疗和疗效判断具有重要的意义,但并不能确切反映肝损伤的情况,肝脏活检仍是临床判定丙型肝炎患者肝脏病理改变的金标准。

表 2 炎症活动度分级、纤维化分期与HCV-RNA、ALT的关系

肝脏病理	<i>n</i>	HCV-RNA (10 ³ 拷贝/L)	ALT浓度 (nkat/L)
炎症活动度分级	G ₁	16	6 723 202 ± 14 878 180
	G ₂	7	2 205 885 ± 3 559 531
	G ₂₋₃	7	10 151 442 ± 24 301 624
纤维化分期	S ₀₋₁	15	1 076.9 ± 893.1
	S ₁₋₂	6	1 119.6 ± 893.1 ^b
	S ₂₋₃	5	1 143.4 ± 460.1
	S ₃₋₄	4	1 052.2 ± 926.8

^b*P* < 0.01.

ALT浓度之间相关性不显著($r = 0.40$, $P = 0.695$). ALT异常率随着HCV RNA水平的升高而增加,且二者之间相关性非常显著($r = 1.00$, $P < 0.01$).我们对30例HCV RNA阳性患者的肝脏活检标本进行了回顾性研究,按其炎症活动度分级, G₁ 16例, G₂ 7例, G₂₋₃ 7例.若按照肝脏纤维化分期,则 S₀₋₁ 15例, S₁₋₂ 6例, S₂₋₃ 5例, S₃₋₄ 4例.经相关性检验, HCV RNA水平与肝脏炎症活动度($r = 0.50$, $P = 0.667$)及纤维化程度($r = 0.20$, $P = 0.80$)均不相关, ALT浓度与肝脏纤维化程度的相关性不明显($r = 0.40$, $P = 0.60$),而与肝脏炎症活动度明显相关($r = 1.00$, $P < 0.01$, 表2).

3 讨论

在HCV感染者中,大约有80%的个体可发展为慢性化,在这些慢性感染者中有近1/3的人其病程可在20-30 a的过程中逐渐进展为肝损伤、肝纤维化,直至肝硬化,而这些肝硬化患者每年发展成肝癌的机率是1.5%-4%^[10-11].现在已经有证据表明,在大多数国家内由于肝癌而导致的死亡人数增加的主要原因是HCV感染^[12-13], HCV感染导致的晚期肝硬化也是肝移植的主要原因^[1,10]. HCV感染者病程变化是非常不同的,有些患者病程可以十几年甚至几十年缓慢进展,而有些患者则可在几年之内进展到肝硬化、肝病晚期,甚至肝癌^[3,11].虽然这其中的主要原因并不清楚,但已经有研究证明, HCV感染者病程进展与诸多因素有关,包括性别、感染HCV的年龄、过度饮酒、脂肪变性、合并感染HBV/HIV、免疫抑制(如器官移植)等^[10,14-15].也有很多学者研究了HCV RNA水平、ALT浓度、HCV基因型等因素与肝脏损伤程度的关系,但所得结果却完全不同. Adinolfi *et al*^[16]认为,血清HCV RNA水平与肝损伤程度相关,高水平的病毒载量与脂肪

变性共同作用,可加速肝损伤的进展. Zechini *et al*^[17]认为, ALT水平,特别是AST的水平,与肝损伤的程度有关.而Puoti *et al*^[18-21]则认为,肝损伤程度与临床症状、ALT水平、HCV基因型和病毒载量不相关.我们的实验对这几方面的关系进行了研究,结果显示, HCV RNA水平与ALT浓度不相关($r = 0.40$, $P = 0.695$),但和ALT异常率的相关性非常显著($r = 1.00$, $P < 0.01$). HCV RNA水平与肝脏炎症活动度和纤维化程度无关($P = 0.667$ 和 $P = 0.80$). ALT浓度与肝脏的纤维化程度无关($P = 0.60$),但与肝脏炎症活动度呈明显相关($r = 1.00$, $P < 0.01$).我们的结果表明, HCV RNA水平与ALT浓度并不相关,也不能反映肝脏病理改变的程度, ALT水平不能反映肝脏纤维化的情况,但是可在一定程度上反映肝脏炎症的改变.目前有学者研究结果显示,在慢性HCV感染者中,有约30%的患者在诊断时其ALT水平是正常的,而且他们当中的很多人在其后的随访中ALT也一直正常,但肝活检结果却显示,他们中有很多人有明显的肝纤维化甚至肝硬化的改变^[21-23].因此,有无明显肝损伤的改变或将来ALT有无升高的可能性是不能完全由病毒学或生化学的检测所能预测的.我们的结果也提示血清中病毒载量和ALT水平高低不能反映慢性丙型肝炎病理改变程度.

有学者认为,慢性丙型肝炎肝损伤的发病机制是HCV与宿主免疫反应之间复杂的相互作用的结果^[24],也有学者认为其肝损伤很可能是由于病毒蛋白的直接细胞病变作用和免疫介导机制联合作用所引起,这种免疫介导机制包括细胞溶解作用和由CTLs(cytotoxic T lymphocytes)与炎性细胞因子介导的非细胞溶解作用^[25],我们的结果则提示, HCV可能不直接参与慢性丙型肝炎肝损伤的发生.总之,虽然HCV RNA水平对

于慢性丙型肝炎患者的抗病毒治疗和疗效判定具有重要的意义^[26-27], 但是, 血清HCV RNA水平并不能确切反映患者肝脏的病理改变, 虽然ALT浓度在某种程度上可反映肝脏炎症的改变程度, 但是不能反映肝脏纤维化的程度. 由于我们肝脏活检的样本量小, 这种关系还有待于我们今后继续观察和总结.

4 参考文献

- Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 558-567
- Poynard T, Yuen MF, Ratzin V, Lai CL. Viral hepatitis C. *Lancet* 2003; 362: 2095-2100
- Alberti A, Benvenuto L. Management of hepatitis C. *J Hepatol* 2003; 38: S104-S118
- 庄辉. 重视丙型肝炎的研究. 中华肝病杂志 2004; 12: 65-66
- Pawlotsky JM. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: S65-S73
- Alter MJ, Kuhnert WL, Finelli L. Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep* 2003; 52: 1-13
- Castelain S, Descamps V, Thibault V, Francois C, Bonte D, Morel V, Izopet J, Capron D, Zawadzki P, Duverlie G. TaqMan amplification system with an internal positive control for HCV RNA quantitation. *J Clin Virol* 2004; 31: 227-234
- Komurian-Pradel F, Paranhos-Baccala G, Sodoyer M, Chevallier P, Mandrand B, Lotteau V, Andre P. Quantitation of HCV RNA using real-time PCR and fluorimetry. *J Virol Methods* 2001; 95: 111-119
- 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝病杂志 2000; 8: 324-326
- Leone N, Rizzetto M. Natural history of hepatitis C virus infection: from chronic hepatitis to cirrhosis, to hepatocellular carcinoma. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2005; 51: 31-46
- Marcellin P, Asselah T, Boyer N. Fibrosis and disease progression in hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: S47-S56
- El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma: an epidemiologic view. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35: S72-S78
- El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States. *Gastroenterology* 2004; 127: S27-S34
- Orellana N I, Poniachik T J, Smok S G, Madrid S AM, Menendez A A, Tobar A E, Brahm B J. Factors associated with the severity of liver damage in chronic hepatitis C. *Rev Med Chil* 2005; 133: 1311-1316
- Ramos Gomez M. Natural history of chronic hepatitis C. *Rev Gastroenterol Mex* 2002; 67: S17-S20
- Adinolfi LE, Utili R, Andreana A, Tripodi MF, Marracino M, Gambardella M, Giordano M, Ruggiero G. Serum HCV RNA levels correlate with histological liver damage and concur with steatosis in progression of chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 1677-1683
- Zechini B, Pasquazzi C, Aceti A. Correlation of serum aminotransferases with HCV RNA levels and histological findings in patients with chronic hepatitis C: the role of serum aspartate transaminase in the evaluation of disease progression. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 891-896
- Puoti C, Magrini A, Stati T, Rigato P, Montagnese F, Rossi P, Aldegheri L, Resta S. Clinical, histological, and virological features of hepatitis C virus carriers with persistently normal or abnormal alanine transaminase levels. *Hepatology* 1997; 26: 1393-1398
- 谭龙益, 张莉, 王皓, 何金, 陈洁, 胡海清, 侯晓管, 何洁兰, 袁媛, 冀俊峰. HCV RNA含量与肝脏组织病理学损伤之间的关系. 第二军医大学学报 2004; 25: 1307-1309
- Anand BS, Velez M. Assessment of correlation between serum titers of hepatitis C virus and severity of liver disease. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2409-2411
- Bacon BR. Treatment of patients with hepatitis C and normal serum aminotransferase levels. *Hepatology* 2002; 36: S179-S184
- Rumi MG, De Filippi F, Donato MF, Del Ninno E, Colombo M. Progressive hepatic fibrosis in healthy carriers of hepatitis C virus with a transaminase breakthrough. *J Viral Hepat* 2002; 9: 71-74
- Pradat P, Alberti A, Poynard T, Esteban JI, Weiland O, Marcellin P, Badalamenti S, Trepo C. Predictive value of ALT levels for histologic findings in chronic hepatitis C: a European collaborative study. *Hepatology* 2002; 36: 973-977
- Rehermann B. Interaction between the hepatitis C virus and the immune system. *Semin Liver Dis* 2000; 20: 127-141
- Cerny A, Chisari FV. Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence. *Hepatology* 1999; 30: 595-601
- Zeuzem S, Lee JH, Franke A, Ruster B, Prummer O, Herrmann G, Roth WK. Quantification of the initial decline of serum hepatitis C virus RNA and response to interferon alfa. *Hepatology* 1998; 27: 1149-1156
- Davis GL. Monitoring of viral levels during therapy of hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: S145-S151

电编 张敏 编辑 潘伯荣

急性梗阻性胰腺炎大鼠胰腺腺泡细胞凋亡的变化

范志宁, 刘训良, 熊观瀛, 文卫, 缪林

■背景资料

急性胆源性胰腺炎通常是由于胆总管、胰管受到不同程度的梗阻, 造成胆汁返流入胰管, 激活胰酶, 损害胰腺细胞, 或造成胰液排出受阻, 胰管内压升高, 导致胆源性胰腺炎的发生。近年来, 大量的研究发现, 在不同程度的急性胰腺炎动物模型中胰腺炎的严重程度与胰腺腺泡细胞凋亡呈负相关的, 表明细胞凋亡可能是对胰腺细胞损伤有益的保护反应, 并有可能减轻急性胰腺炎的严重程度。在梗阻早期腺泡细胞以坏死为主, 随着梗阻时间的延长坏死细胞逐渐增多; 在解除梗阻后腺泡细胞凋亡率增加而坏死减少。

范志宁, 刘训良, 熊观瀛, 文卫, 缪林, 南京医科大学第一附属医院胰腺外科 江苏省南京市 210029
通讯作者: 范志宁, 210011, 江苏省南京市下关区姜家园121号, 南京医科大学第二附属医院消化内镜中心。
fanzhining@hotmail.com
电话: 025-58509932 传真: 025-58509931
收稿日期: 2006-01-17 接受日期: 2006-02-08

Change of acinar cell apoptosis in rats with acute pancreatitis induced by bile-pancreatic-duct obstruction

Zhi-Ning Fan, Xun-Liang Liu, Guan-Ying Xiong, Wei Wen, Lin Miao

Zhi-Ning Fan, Xun-Liang Liu, Guan-Ying Xiong, Wei Wen, Lin Miao, Department of Pancreatic Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Dr. Zhi-Ning Fan, Center of Endoscopy, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, Jiangsu Province, China. fanzhining@hotmail.com
Received: 2006-01-17 Accepted: 2006-02-08

Abstract

AIM: To analyze the correlations of the degrees of acute pancreatitis with the duration of bile-pancreatic duct obstruction (BPDO) and acinar cell apoptosis by observing the change of bile duct pressure.

METHODS: The model of acute pancreatitis was established by ligation of bile-pancreatic duct. Bile duct pressure was examined 4, 8, and 12 h after BPDO as well as 1 and 3 d after removal of BPDO. Flow cytometry was used to detect the acinar cell apoptosis (AnnexinV-FITC/PI assay) and the expression of Caspase-3.

RESULTS: Compared with that in control group (16.42 ± 1.03), the pressure of bile-pancreatic duct increased with the prolonging of obstruction duration (49.98 ± 3.05 , 90.20 ± 8.66 , 589.00 ± 60.10 for 4, 8, 12 h after obstruction, respectively). When BPDO was removed, the pressure decreased and returned to the normal level within 1 d (17.50 ± 2.84 , 16.37 ± 0.46 for 1 and 3 d after

removal of obstruction, respectively), and the difference was significant ($P < 0.01$). AnnexinV-FITC/PI assay showed that the number of apoptotic cells increased significantly 4 h after BPDO, but it decreased while the number of dead cells increased 12 h after BPDO. However, after removal of BPDO, acinar cell apoptosis increased while cell death decreased markedly with the prolonging of BPDO ($P < 0.01$). Caspase-3 detection confirmed that apoptosis reached the peak at 4 h, and then decreased gradually. Cell death was mostly observed at 12 h. One day after removal of BPDO, cell death still covered the most percentage, but 3 d later, apoptosis was significantly observed ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Enhancement of bile duct pressure is one of the mechanisms in the pathogenesis of acute pancreatitis, which leads to a decrease of acinar cell apoptosis. It is effective to resume the enhanced pressure to normal level at the early stage in the prevention of the disease from development.

Key Words: Acute obstructive pancreatitis, Bile duct pressure; Acinar cell apoptosis

Fan ZN, Liu XL, Xiong GY, Wen W, Miao L. Change of acinar cell apoptosis in rats with acute pancreatitis induced by bile-pancreatic-duct obstruction. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(9):912-915

摘要

目的: 结合胆管压力的变化来探讨胰腺炎轻重程度与胆胰管梗阻时间及腺泡细胞凋亡的关系。

方法: 采用结扎胆胰管的方法制成胰腺炎模型。分别于梗阻后4、8、12 h以及解除梗阻后1、3 d分别测定胆管压力。流式细胞分析法检测胰腺腺泡细胞AnnexinV-FITC/PI和Caspase-3的表达。

结果: 与正常对照组(16.42 ± 1.03)相比, 随着梗阻时间的延长, 胆管压力明显增高(4, 8, 12 h分别为 49.98 ± 3.05 , 90.20 ± 8.66 , 589.00

±60.10), 而在解除梗阻后, 压力迅速下降并在1 d即恢复正常(1, 3 d分别为 17.50 ± 2.84 , 16.37 ± 0.46), 变化显著($P < 0.01$). AnnexinV-FITC/PI检测显示梗阻4 h时细胞凋亡较多, 至梗阻12 h时, 腺泡细胞凋亡明显减少而坏死增加; 在解除梗阻后, 随着时间的延长凋亡明显增多, 坏死逐渐减少, 变化显著($P < 0.01$). Caspase-3检测显示在梗阻4 h时凋亡表达最高, 梗阻8 h已明显减少, 12 h则以坏死为主要表达方式; 解除梗阻后1 d仍以坏死为主, 到第3天则表现出大量的凋亡, 变化显著($P < 0.01$).

结论: 胆管压力升高引起的胆胰液返流是胰腺炎的发病机制之一, 并可引起胰腺腺泡细胞的凋亡减少, 而早期恢复正常胆胰管压力可使细胞凋亡增多, 有效的阻止急性胰腺炎的病情发展.

关键词: 急性梗阻性胰腺炎; 胆胰管压力; 腺泡细胞凋亡

范志宁, 刘训良, 熊观瀛, 文卫, 缪林. 急性梗阻性胰腺炎大鼠胰腺腺泡细胞凋亡的变化. 世界华人消化杂志 2006;14(9):912-915
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/912.asp>

0 引言

急性胰腺炎的死亡率高达10%以上, 急性胆源性胰腺炎(acute biliary pancreatitis, ABP)占急性胰腺炎的34%-54%. 常因结石通过或嵌顿在壶腹部, 胆胰管共同通路梗阻, 导致胆汁反流至胰管, 诱发胰腺实质损伤而引起^[1]. 急性胰腺炎病情的严重程度与胰腺腺泡细胞凋亡程度密切相关, 凋亡基因及其信号的传导在该作用中起着重要的调节作用.

我们通过结扎胆胰管制成急性胰腺炎模型, 检测解除梗阻前后胰腺腺泡细胞凋亡的情况, 结合胆管压力的变化来探讨胰腺炎轻重程度与腺泡细胞凋亡及梗阻时间的关系.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 ♂ SD大鼠(清洁型)35只, 质量为200-250 g, 上海西普尔公司提供. 随机分为6组: 正常对照组, 梗阻4 h组, 8 h组及12 h组; 解除梗阻1 d组及3 d组.

1.1.2 主要试剂及溶液 胶原酶XI、透明质酸酶、胰蛋白酶抑制因子、Fluo-3/AM(荧光标记细胞内钙离子示踪剂)、多聚赖氨酸, 均购自美

国Sigma公司; Hanks液; 无钙Hanks液; HBSS液(含2.5 g/L牛血清白蛋白和0.1 g/L的刀豆胰蛋白酶抑制因子的Hanks平衡盐溶液); 无钙HBSS液; Caspase-3和AnnexinV-FITC/PI试剂盒购自晶美生物公司.

1.1.3 主要仪器 微型生物换能器(安徽蚌埠微型电子仪器设备公司). 流式细胞分析仪(FACS Vamcage SE, 美国B-D公司).

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立 采用结扎胆胰管的方法制成梗阻型胰腺炎模型. 用2 g/L的乌拉坦腹腔注射麻醉(6 mL/kg), 将大鼠仰卧固定, 上腹剑突下正中开腹后, 确认胆胰管, 沿十二指肠寻找并确认胆胰管, 将腰麻管(塑料经改良与大鼠胆胰管直径基本吻合)逆行刺入胆胰管末端, 将胆胰管末端与腰麻管一起扎紧, 固定后逐层关腹, 在体外结扎腰麻管使胆管梗阻. 梗阻组分别于梗阻后4、8和12 h测定胆管压力后处死大鼠取胰腺组织检测. 解除梗阻组于梗阻12 h后解除梗阻, 并于解除梗阻后1、3 d分别测定胆管压力后处死大鼠取胰腺组织检测.

1.2.2 胰腺腺泡细胞的分离 参照Zhou *et al*^[2]和Padfield *et al*^[3]方法并改良. 处死大鼠取胰腺组织, 于大试管内剪碎组织, 加入10 mL消化液(含0.2 g/L XI胶原酶和0.4 g/L透明质酸酶的Hanks液), 37℃振荡水浴温孵10 min, 并通以950 mL/L O₂和50 mL/L CO₂混合气体, 静置. 更换消化液再温孵10 min, 静置. 重复两次, 将收集的上清液用200目尼龙网过滤, 500 r/min离心3 min, 弃上清液, HBSS液洗2次, 收集胰腺腺泡细胞. 将胰腺腺泡细胞混悬于无钙的HBSS液中, 经台盼蓝排斥实验证实细胞存活90%以上, 计数在 10^9 - 10^{13} 个细胞/L间.

1.2.3 腺泡细胞凋亡的检测 按试剂盒说明在细胞悬液中加入AnnexinV-FITC, 避光孵育10 min, 再加入碘化丙啶液(终浓度为1 mg/L), 采用流式细胞分析. AnnexinV-FITC阳性而PI阴性为凋亡, AnnexinV-FITC阴性而PI阳性为坏死.

1.2.4 Caspase-3的检测 按试剂盒说明在细胞悬液中加入缓冲液后在冰中孵育10 min, 再加入含10 mmol/L DTT的缓冲液和含1 mmol/L DEVD-AFC的酶化物后于37℃孵育1 h, 立即在流式细胞仪上进行分析.

统计学处理 所测数据用mean±SD表示, 通过SPSS11.0统计软件, 采用单因素方差分析对各组均数进行显著性检验, $P < 0.05$ 具有显著性差异.

■ 创新盘点

本文结合梗阻前后胆胰管的压力变化、梗阻的时间及解除梗阻的时间来探讨细胞凋亡和胰腺炎的病情变化.

■应用要点

近10 a, 对急性胆源性胰腺炎早期治疗性ERCP虽被认可, 但是仍缺乏相应的研究资料, 在临床上广泛推广仍有一定的难度, 因此本课题通过研究胰腺炎轻重程度与胆胰管梗阻时间及腺泡细胞凋亡的关系来探讨临床早期治疗性ERCP的应用意义。

表 1 急性胰腺炎大鼠模型在梗阻解除前后的胆管压力变化的表达

组别	正常对照	梗阻4 h	梗阻8 h	梗阻12 h	解除梗阻1 d	解除梗阻3 d
鼠数 (n)	6	6	7	6	5	5
胆管压力	16.42 ± 1.03	49.98 ± 3.05 ^b	90.20 ± 8.66 ^b	589 ± 60.1 ^b	17.50 ± 2.84	16.37 ± 0.46

^bP<0.01 vs 正常对照组。

表 2 急性胰腺炎大鼠模型在梗阻解除前后腺泡细胞凋亡的表达

组别	正常对照	梗阻4 h	梗阻8 h	梗阻12 h	解除梗阻1 d	解除梗阻3 d
鼠数 (n)	6	6	7	6	5	5
AnnexinV	0.58 ± 0.55	16.96 ± 2.96 ^b	17.10 ± 4.27 ^b	3.63 ± 0.43 ^b	18.47 ± 6.87 ^b	69.81 ± 5.46 ^b
Caspase-3	7.85 ± 1.49	48.65 ± 5.08 ^b	9.74 ± 2.31 ^{bd}	0.65 ± 0.38 ^b	9.34 ± 3.98 ^b	52.2 ± 9.25 ^{bf}

^bP<0.01 vs 正常对照组; ^dP<0.01 vs 梗阻4 h; ^fP<0.01 vs 解除梗阻1 d。

2 结果

2.1 形态学改变 正常对照组胰腺组织无明显病理改变。在胰腺炎各组大体可见胰腺肿大, 呈灰白色, 严重者胰腺大片出血、有黄色坏死灶, 腹水, 腹腔脏器黏连, 大网膜、肠系膜和脏器表面可见皂化斑。光镜下可见叶间隙增宽、水肿, 中性粒细胞渗出, 血管充血变形, 血管破裂、大量出血, 胰腺腺泡解体、胞质空泡形成及坏死。以上表现均随梗阻时间延长而加重, 解除梗阻后随时间延长有所好转。

2.2 胆管压力的变化 随着梗阻时间的延长, 胆管压力明显增高。而在解除梗阻后, 压力迅速下降, 在1 d内即恢复正常(表1)。

2.3 腺泡细胞凋亡的表现 与正常对照组相比, AnnexinV-FITC/PI染色显示梗阻4 h时细胞凋亡较多, 梗阻12 h时, 腺泡细胞凋亡明显减少而坏死增加。梗阻8 h与4 h相比无明显变化。解除梗阻后, 凋亡细胞明显增多, 坏死逐渐减少。Caspase-3在梗阻4 h时凋亡表达最高, 梗阻8 h已明显减少, 12 h以坏死为主要表达方式; 解除梗阻后1 d仍以坏死为主, 第3天则表现出大量的凋亡(表2)。

3 讨论

胆石嵌顿于壶腹部或排石损伤引起壶腹部水肿, 壶腹部压力超过胰管分泌压, 造成胆胰液返流入胰管是急性胆源性胰腺炎发病的重要原因。临床上行早期治疗性经内镜逆行胰胆管造影(ERCP)可有效的缓解病情, 然而早期解除梗阻对急性胰腺炎的病程发展所起作用机制尚不清

楚。近年来大量的文献报道认为, 急性胰腺炎的病情轻重程度与腺泡细胞的凋亡程度呈负相关。轻型胰腺炎时腺泡细胞以凋亡为主, 此时胞膜完整, 凋亡小体被巨噬细胞吞噬, 无溶酶体和炎症介质等的释放。重症胰腺炎时腺泡细胞以坏死为主, 胞膜破裂, 引起多种酶和炎症介质的释放, 诱发了更严重的炎症反应, 产生瀑布样效应, 最终可导致死亡。可见细胞凋亡是机体对胰腺腺泡受损的一种保护性反应^[4]。

由于多种原因导致的壶腹部暂时性或功能性的梗阻, 导致胆管压力大于胰管压力(正常生理情况下胰管压力大于胆管压力), 胰液引流不畅。当胰管被暂时或持久阻塞, 胰管内压力升高(正常值不超过12 cm H₂O)达60 cm H₂O时, 可引起胰腺腺泡膜的破裂, 胰酶释放入胰腺间质组织, 引发胰腺炎。曾有人通过增加狗的腹压来制造胰腺炎模型, 发现由于腹压上升引起胆管压力的升高, 可使胰腺炎加重^[5]。Acosta *et al*^[6]也认为胆源性胰腺炎的严重程度与壶腹部梗阻的持续时间呈正相关。在本研究中, 结扎大鼠胆胰管可在短时间内明显增高胆管内压力, 并随着时间的延长, 压力增高幅度也随着增加。与此相应, 胰腺组织水肿坏死也逐渐加重; 胰腺腺泡细胞凋亡逐渐减少, 而坏死明显增加。在解除梗阻后, 1 d内胆管压力恢复至正常水平, 至第3天时, 胰腺组织的水肿坏死情况明显好转, 腺泡细胞凋亡也明显增加。可见梗阻所引起的胆胰管返流是胰腺炎的发病机制之一, 而早期恢复正常胆胰管压力可有效的阻止急性胰腺炎的病情发展。

在细胞凋亡早期, 细胞表面发生变化, 细胞膜内部的磷脂酰丝氨酸(PS)迁移到细胞外层表面, 巨噬细胞就是通过识别凋亡细胞表面细胞的磷脂酰丝氨酸将凋亡细胞或凋亡小体吞噬, 保护机体避免因细胞内部暴露引起的炎症反应. AnnexinV是一种对 Ca^{2+} 依赖, 对PS有高度亲和力的磷脂结合蛋白, 可作为探针识别细胞膜表面是否有PS, 从而识别凋亡细胞. Caspase是半胱氨酸天门冬氨酸蛋白酶(cysteiny aspartate-specific proteinase)的简称, 参与细胞凋亡和炎症反应. 其中Caspase-3(CPP32 apopain)是哺乳动物细胞凋亡中的关键酶. 临床常用Caspase 3来检测早早期的细胞凋亡.

在急性胰腺炎中, Caspase通过多种途径参与腺泡细胞的凋亡, 包括细胞膜途径、线粒体途径和内质网途径^[7-8]. Frossard *et al*^[9]用Cx32基因缺失的大鼠制作急性胰腺炎模型, 表现出胰腺炎连续的发病过程, 腺泡细胞数目减少, Caspase-3活性下降. Gallagher *et al*^[10]对胰腺炎细胞凋亡情况进行检测发现, FasL、FasL-mRNA和Caspase-3增加. 在本研究中, 随着梗阻时间的延长, Caspase-3的活性逐渐减少; 而在解除梗阻后, 随着时间的延长, 残留的腺泡细胞再生, 逐步恢复了胰腺腺泡细胞的功能, 其死亡方式也逐渐转为凋亡, Caspase-3的活性也逐渐增加.

并且我们发现, 在梗阻4 h组和8 h组间, Caspase-3和AnnexinV变化的幅度不大, 而12 h组与上两组相比两项指标均发生明显的变化, 即凋亡明显减少, 大量的细胞走向坏死. 相应的在梗阻解除后第1天, Caspase-3和AnnexinV所反映的细胞凋亡增加并不明显, 而在第3天两项指标发生了明显变化, 细胞凋亡明显增加. de Dios *et al*^[11]的研究也认为对于梗阻24 h以上的胰腺腺泡细胞的坏死是无法逆转的, 只有在解除梗阻3 d后胰腺腺泡细胞才能通过凋亡方式死亡.

由本研究可见, 在胆管梗阻早期, 胆管的压力上升还不多, 此时胰腺腺泡细胞尚有一定的

代偿能力, 其死亡方式以凋亡为主; 而当压力持续上升, 腺泡细胞膜破裂, 大量坏死引起急性胰腺炎的发生. 当梗阻解除后, 胆管压力迅速下降, 但在开始时仍有大量腺泡细胞坏死, 只有经过一定的时间后才逐步恢复正常. 因此在临床上, 对于胆源性胰腺炎患者采用早期ERCP+十二指肠乳头括约肌切开术(EST)的治疗, 可以有效减轻甚至阻止急性胰腺炎的发生与发展.

4 参考文献

- 1 李兆申, 许国铭主编. 胰腺疾病内镜诊断与治疗学. 第1版. 上海: 第二军医大学出版社, 2004: 251-253
- 2 Zhou W, Levine BA, Olson MS. Platelet-activating factor: a mediator of pancreatic inflammation during cerulein hyperstimulation. *Am J Pathol* 1993; 142: 1504-1512
- 3 Padfield PJ, Panesar N. Ca^{2+} -dependent amylase secretion from SLO-permeabilized rat pancreatic acini requires diffusible cytosolic proteins *Am J Physiol* 1995; 269: G647-G652
- 4 Bhatia M. Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G189-G196
- 5 田伏州, 黎冬暄, 陈玉琼, 袁成良, 邵洪, 李小军. 胰胆管压力变化及胆胰返流的原因分析. *中华实验外科杂志* 1997; 7: 207-208
- 6 Acosta JM, Rossi R, Galli OM, Pellegrini CA, Skinner DB. Early surgery for acute gallstone pancreatitis: evaluation of a systematic approach. *Surgery* 1978; 83: 367-370
- 7 Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316
- 8 Tibbetts MD, Zheng L, Lenardo MJ. The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis. *Nat Immunol* 2003; 4: 404-409
- 9 Frossard JL, Rubbia-Brandt L, Wallig MA, Benathan M, Ott T, Morel P, Hadengue A, Suter S, Willecke K, Chanson M. Severe acute pancreatitis and reduced acinar cell apoptosis in the exocrine pancreas of mice deficient for the Cx32 gene. *Gastroenterology* 2003; 124: 481-493
- 10 Gallagher SF, Yang J, Baksh K, Haines K, Carpenter H, Epling-Burnette PK, Peng Y, Norman J, Murr MM. Acute pancreatitis induces FasL gene expression and apoptosis in the liver. *J Surg Res* 2004; 122: 201-209
- 11 de Dios I, Urunuela A, Manso M. Effects of early decompression and cholecystokinin inhibition in rats with acute pancreatitis induced by bilepancreatic duct obstruction. *J Lab Clin Med* 2003; 141: 265-271

■同行评价

急性胆源性胰腺炎在急性胰腺炎中占重要比例, 本研究以动物模型胆管压力变化来探讨胰腺炎轻重程度与细胞凋亡及梗阻时间关系, 研究目的明确, 研究设有对照组, 研究观察指标合理, 科学性强. 实验数据经统计学处理图表简明、清晰, 结果可信度强, 结论分析与实验结合较紧密, 逻辑性好. 结论论证了急性胰腺炎早期治疗重要性和尽早解除梗阻(引流)的重要性作出了理论上的支持, 具有一定的理论和临床指导意义.

电编 韩江燕 编辑 王瑾晖

内镜下射频消融配合胃三联治疗慢性胃炎隆起糜烂型的临床观察

胡仕林, 贺降福, 余蓉, 刘荣, 黄爱霞

■背景资料

在临床工作中常常遇到单纯用药物治疗, 隆起的糜烂不易平复难以治愈。联想到胃、肠黏膜上的广基息肉, 射频消融治疗效果很好, 用射频消融治疗隆起糜烂型灶, 效果也会一样好。

胡仕林, 贺降福, 余蓉, 刘荣, 黄爱霞, 黄石市第五医院消化内科 湖北省黄石市 435005

通讯作者: 胡仕林, 435005, 湖北省黄石市新下陆大道97号, 黄石市第五医院消化内科。

电话: 0714-5333937

收稿日期: 2005-07-04 接受日期: 2005-08-03

Radio-frequency ablation combined with triple therapy in treatment of chronic protrusive and erosive gastritis

Shi-Lin Hu, Xiang-Fu He, Rong Yu, Rong Liu, Ai-Xia Huang

Shi-Lin Hu, Xiang-Fu He, Rong Yu, Rong Liu, Ai-Xia Huang, Department of Gastroenterology, Huangshi Fifth Hospital, Huangshi 435005, Hubei Province, China

Correspondence to: Shi-Lin Hu, Department of Gastroenterology, Huangshi Fifth Hospital, 97 Xinxialu Avenue, Huangshi 435005, Hubei Province, China

Received: 2005-07-04 Accepted: 2005-08-03

Abstract

AIM: To discuss the effect of radio-frequency ablation (RFA) combined with triple therapy in the treatment of patients with chronic protrusive and erosive gastritis.

METHODS: One-hundred and six patients, diagnosed with chronic protrusive and erosive gastritis and *H pylori* positive by endoscopy, were divided into 2 groups and treated with RFA combined with triple therapy (Omeprazole plus Amoxicillin plus Clarithromycin) and triple therapy (control group), respectively.

RESULTS: The reversion rate and efficacy in treatment group were significantly higher than those in control group (100% vs 27.2%, $P < 0.05$; 94.1% vs 58.2%, $P < 0.05$). *H pylori* eradication rate was not markedly different between the two groups ($P > 0.05$).

CONCLUSION: RFA combined with triple therapy is an effective and convenient method in the treatment of chronic protrusive and erosive

gastritis.

Key Words: Radio-frequency ablation; Triple therapy; Chronic protrusive and erosive gastritis

Hu SL, He XF, Yu R, Liu R, Huang AX. Radio-frequency ablation combined with triple therapy in treatment of chronic protrusive and erosive gastritis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(9):920-922

摘要

目的: 探讨射频局部消融配合胃三联治疗慢性胃炎隆起糜烂型的疗效。

方法: 内镜下符合慢性胃炎隆起糜烂型诊断, *H pylori*阳性的患者106例, 随机分为治疗组: 射频消融+洛赛克omeprazole、阿莫西林Amoxicillin、克拉霉素Clarithromycin (简称胃三联)治疗, 对照组: 单纯胃三联治疗。

结果: 治疗组隆起糜烂病灶平复率、临床症状有效率分别为100%和94.1%, 对照组隆起糜烂病灶平复率、临床症状有效率分别为27.2%和58.2%, 优于对照组($P < 0.05$)。 *H pylori*根除率治疗组88.2%, 对照组85.7%, 二者之间无显著差异($P > 0.05$)。

结论: 射频局部消融配合胃三联治疗慢性胃炎隆起糜烂型疗效确切、操作简单、安全。

关键词: 射频消融; 三联疗法; 慢性隆起糜烂型胃炎

胡仕林, 贺降福, 余蓉, 刘荣, 黄爱霞. 内镜下射频消融配合胃三联治疗慢性胃炎隆起糜烂型的临床观察. 世界华人消化杂志 2006;14(9):920-922

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/920.asp>

0 引言

当前多数学者认为慢性胃炎在临床上分为: 萎缩性胃炎和非萎缩性胃炎两大类, 而在内镜下肉眼直观分型又可分为: 充血渗出型胃炎、平坦糜烂型胃炎、隆起糜烂型胃炎、萎缩型胃

■创新盘点

以前文献报道治疗隆起糜烂型胃炎多为单纯用微波或射频或抗*H pylori*治疗, 本文创新点是将两者有机结合, 取得了良好治疗效果。

炎、出血型胃炎、皱襞增生型胃炎、反流型胃炎等^[1]。其中隆起糜烂型胃炎较常见,此种胃炎单纯药物治疗效果不理想,往往于症状消失后复查胃镜时,隆起糜烂病灶依旧存在^[2]。因此,我院消化内科2002-11/2004-12对内镜下诊断为隆起糜烂型胃炎患者,采用局部射频消融内服胃三联药物治疗,疗效满意,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 2002-11/2004-12共作胃镜检查6 359例,内镜所见符合慢性隆起糜烂型胃炎106例,其中男78例,女28例。年龄最大72岁,最小19岁,平均年龄43.8岁。病程小于1 a 29例,1-5 a 57例,大于5 a 20例。临床表现为上腹痛94例,腹胀、嗝气106例,烧心21例,胸骨后灼痛5例,胸骨后阻塞感17例;内镜所见呈圆形或类圆形隆起、中央凹陷糜烂96例,不规则隆起顶端凹陷糜烂10例,隆起糜烂数 ≤ 3 个38例, ≥ 4 个68例,散在分布82例,密集成簇状分布24例;全部病例*H pylori*均为阳性(检测*H pylori*使用试剂为福建三强快速尿素酶试剂盒),胃镜检查采用2930K型潘太克斯电子胃镜。

1.2 方法

1.2.1 分组 随机分治疗组(射频+胃三联)、对照组(胃三联)。治疗组51例、对照组55例;治疗组采用射频为四川绵阳电子有限公司生产的LDRF-50型射频治疗仪,两组所用胃三联为阿斯-利康公司生产的洛赛克,江苏恒瑞制药厂生产的克拉霉素及本院生产的阿莫西林,其含量分别为20 mg, 0.25 g及0.25 g。

1.2.2 射频治疗的具体方法 在内镜直视下,从活检孔插入电极导管,顶端伸出内镜活检孔约1 cm,使电极直接密切接触隆起糜烂处,将射频输出功率调至30 W,每个隆起处治疗时间1 s;另外根据隆起范围大小也可采用点面或滑动消融治疗,至创面呈灰白色停止治疗,术后服胃三联。

1.2.3 治疗组和对照组胃三联服法 洛赛克20 mg 1次/日、阿莫西林1 g 2次/日、克拉霉素0.25 g 2次/日,连服7 d。治疗完成4 wk后复查胃镜,并于胃窦处取一块组织查*H pylori*。

1.2.4 疗效判断标准 内镜所见及临床症状显效-临床症状消失,镜下见隆起平复,糜烂愈合;有效-症状减轻,隆起基本平复,黏膜糜烂愈合;无效-临床症状无明显改变,隆起仍存在或部分存在,糜烂未愈合,*H pylori*根除以4 wk后复查尿

表 1 治疗组与对照组隆起糜烂疗效比较

	显效	有效	无效
治疗组	48	3	0
对照组	5	10	40

$$\chi^2 = 89.5, P < 0.05.$$

表 2 治疗组与对照组临床症状疗效比较

	显效	有效	无效
治疗组	34	14	3
对照组	9	23	23

$$\chi^2 = 29.3, P < 0.05.$$

表 3 治疗组与对照组*H pylori*根除比较

	根除	未根除
治疗组	45	6
对照组	47	9

素酶试验转阴性为有效。

2 结果

治疗组隆起平复、糜烂消失显效48例、有效3例,有效率100%,临床症状改善48例,有效率为94.1%;对照组显效5例,有效10例,有效率27.2%,临床症状改善32例,有效率58.1%,经统计学分析显示:治疗组隆起平复、糜烂消失、临床症状改善均优于对照组($P < 0.05$,表1, 2),而*H pylori*根除率两组无显著差异($P > 0.05$,表3)。

3 讨论

慢性胃炎虽是一种最常见的疾病,但长期以来对其病因、发病机制、临床分类等问题一直争论不休,尤其是在临床诊断及内镜诊断上所述语一直混淆不清,除国外学者根据镜下所见对胃黏膜呈散在或簇状隆起中央凹陷有糜烂、似痘疹样,将其分为胃窦型及弥漫性疣赘性胃炎外^[3],自1970年代纤维胃镜在我国应用后,直至2004年前我国一些学者也根据胃镜下直观所见称这些有隆起糜烂的慢性胃炎为疣赘型胃炎,且进行了一些组织病理学研究。如李德忠 *et al*^[4]电镜观察发现病变局部有*H pylori*、浆细胞、炎细胞浸润;有人^[5-8]观察了隆起糜烂型胃炎中的*H pylori*感染情况,发现阳性率较一般的慢性

■应用要点

对内镜下诊断为隆起糜烂型胃炎,合并有幽门螺杆菌(*H pylori*)感染的患者,应用该方法治疗效果理想。对严重心、肺、肝功能不全的患者禁用。

■名词解释

射频消融: 通过极性变换很高的射频电流, 使组织升温, 细胞内外水分蒸发干燥、固缩, 使蛋白质变性坏死。

浅表性胃炎高, 且差异显著, 认为 *H pylori* 可能是隆起糜烂型胃炎的主要病因。近年来, 不少研究认为隆起糜烂型胃炎与组织学上的淋巴细胞胃炎有对应关系, 将二者相提并论^[9]。直到2004年我国著名消化病专家萧树东^[1]根据悉尼分类^[10]及国内大多数学者意见, 明确提出的慢性胃炎在临床上只分为萎缩性及非萎缩性两大类, 在内镜直观下主要分为7型, 其中对内镜下所见到的胃黏膜隆起中央凹陷糜烂者(以前称为疣状胃炎), 命名为慢性胃炎隆起糜烂型, 与平坦型糜烂相比存在显著的差异^[11], 并认为他是一种具有特征性病理变化的胃炎^[12]。其临床症状与其他各型胃炎相仿, 如患者自觉上腹胀、上腹痛、嗝气、烧心, 少数人胸骨后有阻塞感疼痛等。根除 *H pylori* 和抑酸治疗虽可解除其症状, 但部分病灶仍持续存在, 不易消退。近年来有一些应用微波、电凝等内镜下治疗隆起糜烂型胃炎的报道^[13-15]。

我们选择幽门螺杆菌感染阳性的慢性隆起糜烂型胃炎, 分为治疗与对照组进行治疗观察, 治疗组先进行内镜下射频消融治疗, 术后用胃三联治疗1 wk, 对照组单纯用胃三联治疗1 wk, 第4 wk复查胃镜。观察隆起糜烂灶平复情况, 临床症状变化及 *H pylori* 根除情况。结果显示: 治疗组的隆起糜烂消失情况、临床症状改善情况明显优于对照组, 而 *H pylori* 根除率二者无区别。说明射频消融+“胃三联”药物治疗对隆起糜烂型慢性胃炎有较好治疗效果。

射频消融治疗技术的优点是: 操作简单, 电极不黏组织, 不产生烟雾和火花, 可根据需要调整输出功率和时间来控制深度, 从而减少对正常组织损伤。射频治疗的机制主要是通过极性交换率很高的射频电流, 使组织升温, 细胞内外水分蒸发干燥、固缩, 使蛋白质变性而无菌坏死, 从而使隆起糜烂消失。但应注意如对射频消融治疗操作掌握不好也可引起胃黏膜组织受到损伤, 进一步受胃酸等因素作用, 可导致溃疡出

血、穿孔, 故术后应及时使用洛赛克抑制胃酸分泌, 使用胃黏膜保护剂及原有的阿莫西林、克拉霉素联合抗 *H pylori* 等综合治疗。故我们的病例除取得较好的疗效外, 未发生一例出血、穿孔情况。因此我们认为: 内镜下射频局部消融配合胃三联治疗隆起糜烂型胃炎疗效好, 操作简便且安全, 易于推广, 解决了长期单纯用药物不能消除隆起糜烂的困扰, 是一种值得推广的治疗方法。

4 参考文献

- 1 施尧. 慢性胃炎的分类及诊断. 萧树东主编. 胃肠病学和肝病学—基础理论与临床进展. 第1版. 上海, 西安, 北京, 广州: 世界图书出版公司, 2004: 380-383
- 2 付峻林, 吴云林. 疣状胃炎的历史、现状与思考. 国外医学·消化系疾病分册 2005; 25: 155-157
- 3 Gallagher CG, Lennon JR, Crowe JP. Chronic erosive gastritis: a clinical study. *Am J Gastroenterol* 1987; 82: 302-306
- 4 李德忠, 李道芬, 肖同浩, 王一鸣, 武晓华, 许桦林. 疣状胃炎的电镜观察. 电子显微学报 1995; 6: 413-414
- 5 白歌, 胡伏莲. 疣状胃炎与幽门螺杆菌的关系及其治疗的研究. 中国内镜杂志 1997; 3: 14-18
- 6 陈淑萍, 周似春. 疣状胃炎幽门螺杆菌感染率分析. 浙江中西医结合杂志 2003; 13: 416
- 7 丁西平, 王巧尼, 郑帮海, 任学雷, 殷保书, 杨仁松. 疣状胃炎外周血T淋巴细胞亚群检测及其临床意义. 临床消化病杂志 2003; 15: 111-112
- 8 徐光辉, 柏乃运, 石碧坚. 隆起糜烂性胃炎患者幽门螺杆菌感染与高胃泌素血症的关系. 中华消化杂志 2001; 21: 121-122
- 9 Haot J, Jouret A, Willette M, Gossuin A, Mainguet P. Lymphocytic gastritis-prospective study of its relationship with varioliform gastritis. *Gut* 1990; 31: 282-285
- 10 Sipponen P, Kekki M, Siurala M. The Sydney System: epidemiology and natural history of chronic gastritis. *J Gastroenterol Hepatol* 1991; 6: 244-251
- 11 张昌保. 胃黏膜隆起糜烂与平坦糜烂的比较. 世界华人消化杂志 1998; 6: 593
- 12 邱建亭. 隆起糜烂性胃炎148例临床及内镜分析. 中原医刊 2002; 29: 34-35
- 13 李健, 常中凡. 高频电凝治疗隆起糜烂性胃炎156例. 中国内镜杂志 2004; 10: 111
- 14 冯莉, 吴云林, 钟捷, 诸琦. 氩离子凝固术治疗疣状胃炎40例. 世界华人消化杂志 2000; 8: 1332-1335
- 15 纪红梅. 内镜下微波治疗隆起糜烂性胃炎47例疗效观察. 中华临床新医学 2003; 3: 1019

电编 张敏 编辑 张海宁

胰腺癌组织黏蛋白MUC₁表达的意义

高志强, 丁志强, 陈勇军, 李晓云, 罗强, 陈忠

高志强, 丁志强, 陈勇军, 李晓云, 罗强, 陈忠, 华中科技大学同济医学院附属同济医院胆胰外科 湖北省武汉市 430030
通讯作者: 高志强, 430030, 华中科技大学同济医学院附属同济医院胆胰外科. gaozqyl@126.com
电话: 027-62415764
收稿日期: 2006-01-14 接受日期: 2006-02-08

摘要

目的: 探讨MUC₁在胰腺癌组织中的表达及其在胰腺癌诊断和治疗中的意义。

方法: 采用免疫组化方法检测43例原发性胰腺癌组织和15例正常胰腺组织中MUC₁的表达。

结果: MUC₁在胰腺癌组织中的阳性表达率为67.4%, 明显高于正常胰腺组织(20.0%), 与正常胰腺组织之间存在统计学差异($\chi^2 = 8.293$, $P < 0.01$)。MUC₁在胰腺癌组织中阳性表达率与胰腺癌淋巴结转移及TNM分期存在关联($\chi^2 = 5.180$, $P = 0.023$; $\chi^2 = 4.289$, $P = 0.038$)。

结论: MUC₁可作为胰腺癌患者预后评价指标, 并可用于诊断及作为免疫治疗的靶抗原。

关键词: 胰腺癌; 黏蛋白; MUC₁; 免疫组化

高志强, 丁志强, 陈勇军, 李晓云, 罗强, 陈忠. 胰腺癌组织黏蛋白MUC₁表达的意义. 世界华人消化杂志 2006;14(9):923-926
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/923.asp>

0 引言

胰腺癌(pancreatic cancer)是预后较差的恶性肿瘤之一, 其发病率有逐年上升趋势, 在西方国家已成为癌症死亡的第5位^[1]。由于胰腺癌发病早期无明显临床症状, 恶性程度高, 较早发生局部浸润和远处转移, 使得胰腺癌患者临床治疗效果差^[2]。因此, 寻找胰腺癌的早期诊断和治疗的新途径具有重要的现实意义。黏蛋白(MUC)是一类高度糖基化的高分子质量糖蛋白, 主要存在于体腔上皮细胞及其分泌的黏液中, 起保护和润滑功能, 参与了细胞间黏附、信息传导、作为细胞受体等多种功能。MUC₁是MUC黏蛋白家族的成员, 属I型跨膜蛋白^[3], 在多种肿瘤过度表达, 但MUC₁黏蛋白的表达与胰腺癌的临床病

理特征的关系报道较少。因此, 我们采用免疫组化的方法检测MUC₁在胰腺癌中的表达及意义, 以检测MUC₁在胰腺癌诊断和治疗中的意义。

1 材料和方法

1.1 材料 标本来源于华中科技大学同济医学院附属同济医院1997/2005手术切除的胰腺癌标本43例。男29例, 女14例。年龄20-79岁, 平均53岁。高分化癌11例, 中分化癌24例, 低分化癌8例。肿瘤位于胰头者29例, 位于胰体尾者14例。正常对照组标本, 取自法医学系非胰腺疾病死亡人员尸检标本15例, 男9例, 女6例, 年龄16-67岁, 平均48岁。胰腺标本经病理检查均无炎症、化生及增生性病变。MUC₁mAb(克隆系Ma695)购自北京中杉生物试剂公司, SP试剂盒及DAB显色剂购自福州迈新生物技术公司。

1.2 方法 采用SP免疫组化技术, 石蜡切片脱蜡水化, 30 mL/L H₂O₂室温孵育10 min, 以消除内源性过氧化物酶活性, 蒸馏水洗, 以微波法进行抗原修复, PBS浸泡5 min, 100 mL/L山羊血清封闭液室温孵育10 min, 滴加一抗4℃过夜, 生物素标记的二抗及辣根酶标记链霉卵白素37℃各30 min, DAB显色, 水洗、苏木精复染、脱水, 光学显微镜下对染色结果进行评估。非肿瘤着色细胞占总细胞的百分数大于或等于10%为阳性, 小于10%为阴性表达。仅在胰腺导管细胞顶膜表达为正常表达。

统计学处理 计数资料采用 χ^2 检验, 所得数据运用SPSS 12.0软件系统进行处理, $P < 0.05$ 为结果有统计学意义。

2 结果

2.1 MUC₁在胰腺组织中的表达 胰腺癌组织43例中有29例MUC₁呈阳性表达(阳性率67.4%), 可见棕黄色或深棕色颗粒。阳性信号主要位于细胞质中(图1A)。在正常对照组15例中有12例为MUC₁阴性表达(图1B), 只有3例呈弱阳性表达(阳性率20.0%)。MUC₁在胰腺癌中的阳性表达率和在正常胰腺组织中的阳性表达率差异有显著

■背景资料

胰腺癌(carcinoma of pancreas)为发生在胰腺外分泌部分腺体的癌。由于其早期症状不明显且位置隐蔽, 早期诊断困难, 发现时多已是晚期, 治疗效果极差。寻求早期诊断方法和有效的治疗措施一直是医学工作者努力的目标。肿瘤标志物检测及肿瘤生物学治疗在近年得到了广泛而深入的研究, 并带来了医学的进步。肿瘤生物学治疗的基础是肿瘤相关抗原的存在。随着多种与肿瘤的发生、发展密切相关的肿瘤抗原的发现并广泛应用于临床, 越来越多的肿瘤患者得到了更早的诊断, 治疗效果有了很大提高。

■创新盘点

MUC₁与多种肿瘤相关已有较多研究,但MUC₁与胰腺癌临床病理特征的研究较少。本研究主要探讨了MUC₁与胰腺癌的临床病理的关系,有利于指导胰腺癌的诊断治疗。

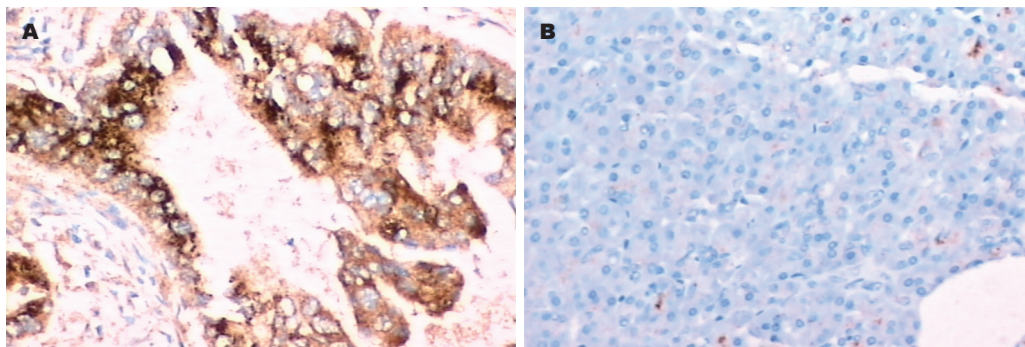


图 1 MUC₁在胰腺组织中表达(SP × 200). A: 胰腺癌; B: 正常胰腺.

表 1 胰腺癌组织中MUC₁表达和临床病理特征的关系

项目		MUC ₁ 阳性表达	
TNM分期	I – II	9/18	50.0%
	III – IV	20/25 ^a	80.0%
组织学分化	高	6/11	54.5%
	中	18/24	75.0%
	低	5/8	62.5%
肿瘤部位	胰头	20/29	67.0%
	胰体尾	9/14	64.3%
淋巴转移	有转移	19/23	82.6%
	无转移	10/20 ^a	50.0%

^aP<0.05.

性($\chi^2 = 8.293$, $P = 0.004 < 0.01$).

2.2 MUC₁的表达与胰腺癌临床病理的关系
MUC₁在胰腺癌中的表达随淋巴结转移的出现及肿瘤TNM分期的升高而明显增高,存在显著统计学意义($P < 0.05$).但与肿瘤位置及分化程度无明显相关.说明MUC₁表达随肿瘤病变进展逐渐增强(表1).

3 讨论

胰腺癌起病隐匿,早期无特异性症状和体征,在诊断明确时多已属晚期,治疗效果不佳,预后极差^[4]. 5 a生存率 I, II 期为30%, III期和IV期分别只有7.9%和0%^[5]. 目前在西方国家胰腺癌发病率及病死率仍然很高^[6], 在我国的发病率亦有上升趋势^[7]. 寻找对胰腺癌敏感和特异的诊断方法和有效的治疗方法已成为临床医务工作的重要组成部分. 黏蛋白(mucins, MUC)是广泛分布于机体正常各黏膜表面的高分子量的糖蛋白,对正常的上皮起保护作用,同时还介导信号传导和细胞黏附.而在肿瘤组织中MUC多出现异常表达,表现为量和质的改变并与肿瘤的浸润、转移及预后相关^[8-10]. MUC₁属于黏蛋白家族中的

I型跨膜蛋白,由三部分组成,即胞外段,跨膜段和胞内段.在正常腺上皮细胞, MUC₁有较低表达.主要分布于腺细胞表面,呈顶端表达,极性分布.主要起物理屏障和维护环境的稳定、信号传导作用,并可释放某些活性分子、参与细胞免疫^[11-12]. MUC₁在多种肿瘤组织中异常表达^[13-18],表现为量的增加和结构改变.其畸形糖基化或糖基化不全,使MUC₁暴露出新的蛋白表位或新的糖抗原.其同种型MUC_{1/V}具有肿瘤特异性.因此, MUC₁已作为一种肿瘤生物学标志物运用于乳腺癌、卵巢癌、胃肠肿瘤等的诊断和微小淋巴结转移检测.胡晓宁 *et al*^[19]将MUC₁运用于乳腺癌前哨淋巴结阴性患者的检测,在发现微小转移并指导治疗方面发挥了积极作用.本结果提示MUC₁在胰腺癌组织中过度表达,且患者TNM分期越高, MUC₁表达越高. Hinoda *et al*^[20]也报道MUC₁在胰腺癌中有过量表达,且MUC₁的表达与TNM分期、患者生存期有显著相关关系.这说明MUC₁在胰腺癌的侵袭和转移过程中发挥着重要的作用.其发挥作用的可能作用机制为: (1)直接促进肿瘤的生长和加速其转移,这可能与抗黏附作用相关. Spicer *et al*^[21]研究表明, MUC₁功能缺陷鼠能显著降低致癌基因诱导的乳腺肿瘤的生长及减缓肿瘤转移的倾向. (2)通过分子间相互作用,促进癌基因的表达和抑制抗癌基因的表达^[22]. (3)高表达MUC₁黏蛋白的肿瘤组织存在某种免疫逃逸机制,包括MUC₁分子对抗原抗体结合的空间位阻作用、中央型免疫耐受、肿瘤细胞抗原组成的改变、肿瘤细胞分泌的免疫抑制物的作用及诱导CTL凋亡^[23].

胰腺癌的早期无特异性症状,诊断十分困难.影像学检查阳性结果需肿瘤发展到一定大小才会出现.各项标志物检查的敏感性和特异性均不能达到单独运用于临床的要求.往往需

要多项指标的联合检查并结合临床及影像学资料才能得出较可靠的诊断. 在本研究中, MUC₁黏蛋白在胰腺癌组织中的阳性率为67.4%, 与正常胰腺组织存在显著差异, 有望成为胰腺癌的一个鉴别诊断指标. 本研究同时表明, MUC₁黏蛋白的表达与胰腺癌的TNM分期及胰腺周围淋巴结转移之间有着明显的正相关趋势. 胰腺癌的TNM分期及有无淋巴结转移是胰腺癌的两个重要的预后指标, 这已为很多研究所证实. 故MUC₁黏蛋白的表达可作为患者预后的一个指标. MUC₁具有抗原性, 在肿瘤中, 由于糖基化不全及异常糖基化, 肽表位暴露, 可诱导抗肿瘤的免疫应答, 使MUC₁成为一种生物治疗的靶分子^[24]. 最近, 对MUC₁疫苗的研究已取得很大进展^[25-26], 尤以治疗乳腺癌的研究较为深入^[27-29]. 本研究证明, MUC₁在胰腺癌, 特别是在有淋巴结转移的胰腺癌中高表达, 是一种能较好反映胰腺癌临床病理特征的生物学标志物, 可能成为胰腺癌靶向治疗的潜在靶点, 随着对MUC₁与胰腺癌相关关系的逐步深入认识, 将针对MUC₁的疫苗及其他治疗方式运用于胰腺癌的治疗存在着广阔前景, 有进一步研究开发的价值.

4 参考文献

- Rosewicz S, Wiedenmann B. Pancreatic carcinoma. *Lancet* 1997; 349: 485-489
- Barkin JS, Goldstein JA. Diagnostic and therapeutic approach to pancreatic cancer. *Biomed Pharmacother* 2000; 54: 400-409
- Moniaux N, Escande F, Porchet N, Aubert JP, Batra SK. Structural organization and classification of the human mucin genes. *Front Biosci* 2001; 6: D1192-D1206
- Freelove R, Walling AD. Pancreatic cancer: diagnosis and management. *Am Fam Physician* 2006; 73: 485-492
- 郑树森, 黄东胜, 李启勇, 梁延波, 王伟林, 沈岩, 张珉, 吴健, 徐骁, 俞军. 胰腺癌的早期诊断是提高疗效的关键. *中华外科杂志* 2003; 41: 322-323
- Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 10-30
- 王丽, 杨功煊, 李辉, 陆星华. 1991-2000年中国胰腺癌病死率的变迁. *中华内科杂志* 2005; 44: 509-513
- Handra-Luca A, Lamas G, Bertrand JC, Fouret P. MUC1, MUC2, MUC4, and MUC5AC expression in salivary gland mucoepidermoid carcinoma: diagnostic and prognostic implications. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 881-889
- Cozzi PJ, Wang J, Delprado W, Perkins AC, Allen BJ, Russell PJ, Li Y. MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC and MUC6 Expression in the Progression of Prostate Cancer. *Clin Exp Metastasis* 2005; 22: 565-573
- Hebbar V, Damera G, Sachdev GP. Differential expression of MUC genes in endometrial and cervical tissues and tumors. *BMC Cancer* 2005; 5: 124
- Brayman M, Thathiah A, Carson DD. MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2: 4
- Stepensky D, Tzehoval E, Vadai E, Eisenbach L. O-glycosylated versus non-glycosylated MUC1-derived peptides as potential targets for cytotoxic immunotherapy of carcinoma. *Clin Exp Immunol* 2006; 143: 139-149
- Karsten U, von Mensdorff-Pouilly S, Goletz S. What makes MUC1 a tumor antigen? *Tumour Biol* 2005; 26: 217-220
- Patel KN, Maghami E, Wreesmann VB, Shaha AR, Shah JP, Ghossein R, Singh B. MUC1 plays a role in tumor maintenance in aggressive thyroid carcinomas. *Surgery* 2005; 138: 994-1001
- Singh AP, Chauhan SC, Bafna S, Johansson SL, Smith LM, Moniaux N, Lin MF, Batra SK. Aberrant expression of transmembrane mucins, MUC1 and MUC4, in human prostate carcinomas. *Prostate* 2006; 66: 421-429
- Baldus SE, Wienand JR, Werner JP, Landsberg S, Drebber U, Hanisch FG, Dienes HP. Expression of MUC1, MUC2 and oligosaccharide epitopes in breast cancer: prognostic significance of a sialylated MUC1 epitope. *Int J Oncol* 2005; 27: 1289-1297
- Boonla C, Srija B, Thuwajit P, Cha-On U, Puapairoj A, Miwa M, Wongkham S. MUC1 and MUC5AC mucin expression in liver fluke-associated intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4939-4946
- Yuan SF, Li KZ, Wang L, Dou KF, Yan Z, Han W, Zhang YQ. Expression of MUC1 and its significance in hepatocellular and cholangiocarcinoma tissue. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4661-4666
- 胡晓宁, 李玉兰, 张殿龙. 乳腺癌前哨淋巴结阴性患者CK20及MUC1检测的临床意义. *中国肿瘤临床与康复* 2005; 12: 132
- Hinoda Y, Ikematsu Y, Horinouchi M, Sato S, Yamamoto K, Nakano T, Fukui M, Suehiro Y, Hamanaka Y, Nishikawa Y, Kida H, Waki S, Oka M, Imai K, Yonezawa S. Increased expression of MUC1 in advanced pancreatic cancer. *J Gastroenterol* 2003; 38: 1162-1166
- Spicer AP, Rowse GJ, Lidner TK, Gendler SJ. Delayed mammary tumor progression in Muc-1 null mice. *J Biol Chem* 1995; 270: 30093-30101
- Levi E, Klimstra DS, Andea A, Basturk O, Adsay NV. MUC1 and MUC2 in pancreatic neoplasia. *J Clin Pathol* 2004; 57: 456-462
- Mukherjee P, Ginardi AR, Madsen CS, Sterner CJ, Adriance MC, Tevethia MJ, Gendler SJ. Mice with spontaneous pancreatic cancer naturally develop MUC-1-specific CTLs that eradicate tumors when adoptively transferred. *J Immunol* 2000; 165: 3451-3460
- Acres B, Limacher JM. MUC1 as a target antigen for cancer immunotherapy. *Expert Rev Vaccines* 2005; 4: 493-502
- 张淑芳, 台桂香. 以MUC1为靶点的肿瘤疫苗的研究进展. *吉林大学学报(医学版)* 2004; 30: 489-491
- Hanisch FG. Design of a MUC1-based cancer vaccine. *Biochem Soc Trans* 2005; 33: 705-708
- Miles D, Papazisis K. Rationale for the clinical development of STn-KLH (Theratope) and anti-MUC-1 vaccines in breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2003; 3: S134-S138
- Mukherjee P, Madsen CS, Ginardi AR, Tindler TL, Jacobs F, Parker J, Agrawal B, Longenecker BM,

■名词解释

1 MUC黏蛋白是一族由多肽骨架和通过O-糖苷键与多肽骨架连接的糖基侧链组成的高糖基化、高分子量的糖蛋白, 其核心肽内含O-糖基化位点、富含苏氨酸和/或丝氨酸的一前一后的重复序列(TR)区域为特征. 到目前为止, 人类已经克隆出至少12个独特的MUC黏蛋白基因.

2 MUC₁黏蛋白是一种I型跨膜蛋白, 又称附膜蛋白, 分子量在240-450 ku, 其中O-连接的糖类占其80%. 在MUC中MUC₁基因克隆最早, 他定位于染色体1q21-24. MUC₁具有高度多态性, 由于不同等位基因TR数目的不同, 致使他在不同组织中出现不同的表达型.

■同行评价

本研究起点不高,但MUC₁黏蛋白的表达与胰腺癌的临床病理特征的关系报道相对较少,有一定意义。

- Gendler SJ. Mucin 1-specific immunotherapy in a mouse model of spontaneous breast cancer. *J Immunother* 2003; 26: 47-62
- 29 Scholl SM, Balloul JM, Le Goc G, Bizouarne N, Schatz C, Kieny MP, von Mensdorff-Pouilly S,

Vincent-Salomon A, Deneux L, Tartour E, Fridman W, Pouillart P, Acres B. Recombinant vaccinia virus encoding human MUC1 and IL2 as immunotherapy in patients with breast cancer. *J Immunother* 2000; 23: 570-580

电编 张敏 编辑 张海宁

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

•消息•

第十二届全国胆道外科学术会议征文通知

本刊讯 中华医学会外科学分会胆道外科学组拟定于2006-07在辽宁省沈阳市召开第12届全国胆道外科学术会议. 此次会议由全国胆道外科学组委托中国医科大学附属第二医院(盛京医院)承办, 中国实用外科杂志社协办. 大会将全面展示我国胆道外科近年来的新进展、新成果. 届时将邀请国内外知名肝、胆外科专家作专题演讲. 凡参会者均颁发国家级继续教育学分证书. 现将征集论文的有关事宜通知如下:

1 征文内容

征文内容包括: (1)胆道外科学基础研究(胆道解剖与胆道疾病、胆石成因、胆道感染、胆道肿瘤、胆胰管结合部异常与胆道先天性疾病). (2)胆道外科的临床研究(胆囊、胆管结石、胆道肿瘤、意外性胆囊癌、胆道损伤、肝移植后胆道狭窄等). (3)胆道外科诊断与治疗的新技术、新方法(腹腔镜技术、内镜技术、介入技术、影像技术等). (4)胆道外科疾病的其他诊疗经验等.

2 征文要求

征文要求包括: (1)请寄论文全文及800字以内的摘要各一份. 4号字打印, 附电子稿件. 无摘要者恕不受理. (2)论文要求科学性强、数据可靠、重点突出、文字精炼且未经发表者. 论文须由作者所在单位审查盖章同意, 并在信封正面注明会议征文字样. (3)截稿时间: 2006-05-08(当地邮戳为准). 稿件邮寄地址: 辽宁省沈阳市和平区三好街36号 中国医科大学附属第二医院 第一微创、胆道外科; 邮政编码: 110004. 联系人: 吴硕东. 投稿E-mail地址: wushuodong@yahoo.com.cn.

抗生素相关性腹泻临床特征及预防控制

陈建荣, 郭锡明

陈建荣, 郭锡明, 南通大学附属医院分院(南通市老年康复医院)消化内科 江苏省南通市 226001

通讯作者: 陈建荣, 226001, 江苏省南通市北郭新村16号, 南通大学附属医院分院(南通市老年康复医院)消化内科. chenysheg945@126.com

电话: 0513-85624251

收稿日期: 2006-01-11 接受日期: 2006-02-08

摘要

目的: 了解医院抗生素相关性腹泻(antibiotic associated diarrhea, AAD)的发病率、发病因素、临床特点, 提出预防控制措施。

方法: 对合并AAD患者的临床资料进行回顾性分析。

结果: AAD的发生率9.3%, 60岁以上发生率高($\chi^2 = 4.73, P < 0.05$)。采取医疗干预措施、使用抗生素种类越多、抗生素使用时间 ≥ 7 d AAD发生率高。引起AAD的抗生素依次为半合成青霉素或加酶抑制剂、第三代头孢菌素类、青霉素、克林霉素、碳青霉烯类、头孢二代、喹诺酮类。AAD患者多为单纯性腹泻, 通过停药及调整肠道菌群等药物治疗大多可治愈, 但明显延长了住院时间, 增加了患者的经济负担。

结论: 合理选择和使用抗生素; 减少侵袭性操作; 提高对AAD的认识; 对急危重症、高龄患者根据病情及早选用强效广谱抗生素, 避免频繁更换抗生素, 于病情好转及感染控制后及时停药, 是预防控制AAD的关键措施。

关键词: 腹泻; 抗生素; 预防控制

陈建荣, 郭锡明. 抗生素相关性腹泻临床特征及预防控制. 世界华人消化杂志2006; 14(9): 927-929

http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/927.asp

0 引言

抗生素是临床治疗各种感染性疾病的主要药物, 由于抗生素种类多, 应用广, 由其引起菌群失调而导致抗生素相关性腹泻(antibiotic associated diarrhea, AAD)并不鲜见, 常导致停

用抗生素和病情加重并延长住院时间。我们对2002-02/2005-05我院内科AAD的临床资料进行分析如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 诊断标准 本组患者AAD的诊断符合2001-01-02颁发的《医院感染诊断标准(试行)》^[1]的诊断标准。具体入选标准: 在应用抗生素过程中或之后新出现腹泻, 多次粪镜检示球菌和杆菌比例失调, 粪涂片多次发现阳性球菌或真菌, 包括假膜性肠炎、出血性结肠炎、真菌性肠炎。排除标准: 食物中毒、脂肪泻、肠易激综合征、病毒性肠炎、菌痢、沙门氏肠炎、缺血性肠炎及慢性肠炎^[2-3]。

1.1.2 一般资料 78例中男42例, 女36例; 年龄在22-88岁, 平均年龄 58.4 ± 9.6 岁。入院诊断: 肺部感染42例, 胆系感染22例, 糖尿病合并尿路感染6例, 自发性细菌性腹膜炎8例。同期上述患者计842例。

1.2 方法 分析患者住院病历, 记录一般情况、基础疾病、临床表现及相关实验室、肠镜检查结果, 观察抗生素应用种类、剂量、疗程, 采取的医疗干预措施等。

统计学处理 计量资料以均数 \pm 标准差表示, 各组间发病率的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 临床表现 上述患者均除有不同程度原发病的表现外, 发生AAD时腹泻表现为大便次数增多、水样便、黏液便、脓血便, 患者有不同程度的恶心、呕吐、发热、脱水及电解质紊乱等表现; 腹部体征较少, 多为轻微腹部压痛, 肠鸣音增强, 4例不完全肠梗阻者。症状出现于抗生素应用第3-20 d, 平均 13.7 ± 6.4 d。腹泻持续时间2-22 d, 平均 9.7 ± 6.4 d。

2.2 AAD发生率 总发生率9.3%(78/842), 60岁以上398例患者中发生AAD 61例, 发生率11.6%, 60

■背景资料

据世界卫生组织公布的调查报告显示, 我国住院患者抗生素类药物使用率高达80%, 联合使用两种以上抗生素的占58%, 远远高于国外的30%。由于抗生素的应用, 其不良反应明显增加, 抗生素相关性腹泻(antibiotic associated diarrhea, AAD)是其较为突出的表现之一, 虽然大多可治愈, 但明显延长了住院时间, 增加了患者的经济负担, 因此, 提高AAD的诊断水平及预防控制已是当务之急。

■创新盘点

AAD与患者年龄、采取医疗干预措施、使用抗生素种类、抗生素使用时间等有关。急危重症患者频繁升级应用抗生素时, 腹泻发生率高, 持续时间长。

■应用要点

提高对AAD的诊
断水平,避免误
诊、漏诊;合理选
择和使用抗生素;
减少侵袭性操作;
对急危重症、高
龄患者根据病情
及早选用强效广
谱抗生素,避免频
繁更换抗生素,于
病情好转及感染
控制后及时停药,
可减少ADD的发
生。

岁以下发生率7.2%(32/444),两者有显著性差异($\chi^2 = 4.73, P < 0.05$)。

2.3 医疗干预措施与AAD的关系 采取侵袭性操作措施(鼻饲、气管插管、气管切开、呼吸机、泌尿道插管等)107例中发生ADD 37例,发生率34.6%;未采取者发生率5.6%(41/735)。采取医疗干预措施后AAD发生率增高($\chi^2 = 93.5, P < 0.01$)。

2.4 粪常规及培养 镜检时并无特征性改变,可有红、白细胞,球/杆比例失调,粪涂片多次发现阳性球菌或真菌,部分病例镜检未发现细胞成分。52例粪普通培养15例有真菌生长,未发现难辨梭状芽孢杆菌;22例粪便作厌氧菌培养,6例有难辨梭状芽孢杆菌生长。

2.5 电子肠镜检查 有6例顽固性腹泻者行电子肠镜检查,发现乙状结肠、降结肠、横结肠、升结肠黏膜水肿、充血、糜烂及溃疡,有孤立的黄色隆起,灰绿色或褐色伪膜。

2.6 抗生素应用情况 78例中使用2种及以下、3、4种及以上抗生素者分别为21例、30例及27例,ADD发生率分别5.2%(21/406)、10.2%(30/294)、19.2%(27/142),显示联合使用抗生素种类越多AAD发生率越高($\chi^2 = 24.46, P < 0.05$)。抗生素使用时间最少3 d、最多25 d,平均为 10.0 ± 4.4 d,使用时间 < 7 d 322例中ADD 21例发生率6.5%,抗生素使用时间 ≥ 7 d 442例中ADD 57例发生率12.8%,两者有显著性差异($\chi^2 = 6.79, P < 0.05$),表明使用抗生素疗程越长,AAD发生率也越高。使用抗生素剂量多为常规剂量,与腹泻的发生及严重程度无关。引起AAD的抗生素依次为半合成青霉素或加酶抑制、头孢三代、青霉素、克林霉素、头孢二代、碳青酶烯类、喹诺酮类。

2.7 治疗及转归 停用广谱抗生素,原发感染未控制者改用窄谱抗生素或加用微生态调节剂双歧杆菌等;配合支持对症治疗如蒙脱石粉、补液等;有霉菌者口服制霉菌素。58例经以上处理在2-13 d内腹泻缓解;14例脓血便、发热、肠镜明显异常者用去甲万古霉素、甲硝唑、双歧杆菌后好转,腹泻持续时间8-22 d;2例出院时仍有腹泻;4例死亡,死亡原因主要为感染加重、多脏器功能衰竭。

对重症患者抗生素应用分析显示:14例入院时首先选择抗菌能力强的抗生素(如亚胺培南/西司他丁、美罗培南),其腹泻时间短为4-10 d,住院20 d,而9例入院后首先选用青霉素类、头

孢二代、氧氟沙星等较弱的抗生素的患者,因疗效不佳导致抗生素不断升级,频繁更换抗生素,腹泻时间延长至9-16 d,3例死于严重感染,5例住院时间明显延长至30-45 d。

3 讨论

近年来,由于广谱抗生素的应用,大量感染性疾病患者的生命得以挽救,但广谱抗生素的滥用也使其不良反应明显增加,ADD是其较为突出的表现之一。引起ADD的因素有以下几方面^[4]:(1)难辨梭状芽孢杆菌感染是ADD公认的主要机制,其他病原体有产气荚膜梭菌、金黄色葡萄球菌、产酸克雷伯菌、抗药沙门菌以及念珠菌等;(2)抗生素使肠道生理性细菌明显减少,使多糖发酵成短链脂肪酸减少,未经发酵的多糖不易被吸收,滞留于肠道而引起渗透性腹泻;(3)抗生素的直接作用可引起肠黏膜损害、肠上皮纤毛萎缩及细胞内酶的活性降低,或者与肠道内胆汁结合使脂肪吸收减少,从而导致吸收障碍性腹泻。几乎所有的抗生素均有可能引起AAD,不同的人群、不同的抗生素其AAD的发病率不同,一般在1.99%-23.70%之间^[5-6],本文发生率9.3%。由于以上因素可同时存在或以一种为主,故其临床表现不尽相同,以肠道菌群失调为主者可表现为单纯性腹泻,大便镜检无异常;以严重难辨梭状芽孢杆菌感染为主者表现为结肠炎或伪膜性肠炎而引起黏液脓血便及全身症状。

通过本组资料分析发现ADD有下列临床特点:(1)抗生素使用时间 ≥ 7 d,腹泻发生率明显升高;联合使用抗生素种类越多,引起腹泻的发生率越高;高级广谱抗生素种类越多,引起腹泻的危险性越高;使用抗生素剂量与腹泻的发生及严重程度无关;(2)医疗干预措施越多、年龄越大引起ADD的发生率越高;可能与老年人本身肠道内双歧杆菌等正常菌群减少有关,使用抗生素后更易造成正常菌群的破坏,合并真菌感染的可能性增加有关^[7];(3)从引起AAD的抗生素种类来看,依次为广谱青霉素或加酶抑制剂、头孢三代、青霉素、克林霉素、头孢二代、碳青酶烯类、喹诺酮类,三代头孢菌素尤其是头孢曲松及其与其他抗生素联合用药者占50%以上,三代头孢菌素引起AAD多的原因与临床使用三代头孢菌素的频率过高有关;(4)粪常规及普通培养的非特异性可使AAD被误诊为一般的肠炎或菌痢,本文4例初期因此误诊,继

续使用原药物或加用针对杆菌的抗生素而使腹泻加重, 应引起临床医生的重视. 应常规作厌氧菌培养, 必要时在肠镜下进行黏膜活检并进行厌氧培养提高难辨梭状芽孢杆菌检出阳性率^[8], 但危重患者进行肠镜检查时有引起肠穿孔等严重并发症的危险, 应谨慎; (5)ADD患者多为单纯性腹泻, 通过停药及调整肠道菌群、对症处理(但应注意避免使用解痉剂以防毒素滞留肠腔)、健康人新鲜大便滤液灌肠^[9]等治疗, 虽然大多可治愈, 但明显延长了住院时间, 增加了患者的经济负担和痛苦.

总之, 在住院患者中ADD的发生率较高, 且很难完全避免. 为减少ADD的发生, 关键是合理地选择和使用抗生素, 尽量减少侵袭性操作, 提高对ADD的认识, 避免误诊、漏诊. 对于感染相对不严重的轻症患者, 针对性地尽可能选用窄谱抗生素, 避免滥用抗生素; 对于急危重症、高龄的患者, 根据病情需要及早选用强效广谱抗生素, 尽可能避免频繁更换抗生素, 并于病情好

转及感染控制后及时停药.

4 参考文献

- 1 中华人民共和国卫生部. 医院感染诊断标准(试行). 北京: 中华人民共和国卫生部 2001: 10-12
- 2 赵松, 李文雄, 陈惠德, 李有信. 外科重危患者与抗生素相关性腹泻. 中华医院感染学杂志 2001; 11: 161-162
- 3 易霞云, 王曼平, 龚瑞娥, 冯丽. 医院感染性腹泻的临床特征分析. 中华医院感染学杂志 2003; 13: 18-20
- 4 周雪艳. 抗生素相关性腹泻的发病机制. 中国微生态学杂志 2004; 16: 376-377
- 5 梁春杰, 杨雪英, 黄大鸣, 卓纯, 王薇. 抗生素相关性腹泻临床研究. 中华医院感染学杂志 2004; 14: 1279-1281
- 6 尹曙明, 郑松柏, 翁书强, 曹秀英, 王根生. 老年住院患者抗生素相关性腹泻调查. 老年医学与保健 2004; 10: 41-44
- 7 蓝宇, 韩燕茹, 梁学亚, 黄小民, 阴英, 全燕丽. 老年住院患者抗生素相关腹泻特征. 北京医学 2002; 24: 265-267
- 8 徐国良, 潘夺嘉, 孙勇, 张秀荣. 肠黏膜细菌培养诊断抗生素相关性腹泻的价值. 现代消化及介入诊疗杂志 1999; 4: 37-38
- 9 王薇. 难辨梭菌性肠炎. 国外医学·消化系统疾病分册 2003; 23: 96-99

■同行评价

通过对78例AAD的临床分析, 得出的一些结论有临床参考价值.

电编 韩江燕 编辑 张海宁

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

• 消息 •

欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》

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

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

《世界华人消化杂志》2006年由北京报刊发行局发行, 国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 邮发代号82-262, 出版日期8, 18, 28日, 月价72.00, 年价864元. 欢迎广大消化科医务工作者及科教人员、各大图书馆订阅. 联系地址: 100023 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社. 联系电话: 010-85381901-1020; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; 网址: www.wjgnet.com.

以消化性溃疡为首发表现的恶性淋巴瘤1例

瞿国强

■背景资料

随着胃肠淋巴瘤的认识加深,相关报道亦较多,但多数为集中对原发性胃肠淋巴瘤的认识,对所谓继发性胃肠淋巴瘤报道较少。

瞿国强, 安徽省铜陵市第四人民医院内科 安徽省铜陵市 244000

通讯作者: 瞿国强, 244000, 安徽省铜陵市杨家山路98号, 安徽省铜陵市第四人民医院内科. swboc2004@sina.com
电话: 0562-2827821

收稿日期: 2005-09-10 接受日期: 2005-09-30

摘要

1例以消化性溃疡为首发表现, 同时发现浅表淋巴结肿大, 考虑胃癌伴淋巴结转移, 但反复胃镜下活检病理不支持, 最终取浅表淋巴结活检确诊为恶性淋巴瘤。胃恶性淋巴瘤常误诊为胃癌、胃溃疡等疾病, 临床医生应提高警惕。

关键词: 消化性溃疡; 恶性淋巴瘤

瞿国强. 以消化性溃疡为首发表现的恶性淋巴瘤1例. 世界华人消化杂志 2006;14(9):930-931

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/930.asp>

0 引言

近年来有关胃淋巴瘤的误诊、误治病例报告较多, 对本病认识有了一定的提高, 但仍存在某些认识上的不足, 如原发性胃淋巴瘤与继发性胃淋巴瘤的区别以及本病易误诊为胃溃疡、胃癌, 仍存在警惕性不高、思路单一等。本文报告了一例继发性胃淋巴瘤误诊为胃癌伴淋巴结转移的病例, 以进一步提高认识。

1 病例报告

患者, 男, 66岁。因“上腹部胀痛20 d”于2005-05-18入院。患者入院前20 d来无明显诱因出现上腹部胀痛, 无放射性痛, 进食后加剧, 伴暖气、反酸, 无畏寒、发热, 无呕血、黑便, 发病以来, 纳差, 体质量进行性减轻5 kg以上, 故来我院门诊。检查胃镜示胃体小弯见一大约2.5 cm×2.5 cm溃疡, 苔秽, 边缘尚规则, 质地脆, 触之易出血; 胃窦见多发结节样隆起; 另十二指肠球部见一大约0.5 cm×0.8 cm溃疡。考虑“复合性溃疡; 胃窦多发隆起病变; 性质待查”。同时分别进行胃体及胃窦部活检, 病理示黏膜慢性浅表性炎。予B超示腹腔占位性病变。为进一步诊治收入院。入院查体: T 36.7℃, P 68次/min, R 20次

/min, BP 17.2/9.3 kPa(130/70 mmHg), 神志清楚, 巩膜及皮肤、黏膜无黄染及出血点, 右侧腹股沟处可及2枚直径分别为1.5 cm×1.5 cm、1.0 cm×1.0 cm肿大淋巴结, 触痛(+), 质硬, 颈软, 心肺未及明显异常, 腹软, 未及肠型及胃蠕动波, 肝、脾未及肿大, 剑突下压痛(+), 未及任何包块, 腹水征(-), 肠鸣音正常, 双下肢无浮肿。入院处理按“复合性溃疡”予质子泵抑制剂等抑酸、护胃治疗, 症状缓解不明显。2005-05-20予上腹部CT示胃壁增厚, 考虑胃肿瘤, 伴有肝胃韧带、肝十二指肠韧带以及腹膜后主动脉旁广泛淋巴结肿大, 侵犯右侧腰大肌。再次胃镜检查仍示胃体小弯巨大溃疡及胃窦多发隆起病变, 考虑“胃癌”再取活检, 病理结果仍示黏膜慢性浅表性炎。为进一步明确诊断, 决定进行右侧腹股沟肿大的淋巴结切取活检, 病理结果明确为弥漫性B细胞恶性淋巴瘤。故诊断明确, 予CHOP方案第1次化疗, 自觉症状明显好转。3 wk后第2次CHOP方案化疗, 再次上腹部CT检查示胃壁明显变薄, 腹腔内及腹膜后淋巴结较前明显缩小、减少。胃镜复查示胃体溃疡红色疤痕期, 胃窦未见明显隆起病变, 再取活检送病理, 结果还是慢性炎性变。目前随访, 患者恢复良好, 已完成第3次化疗, 自觉无不适表现。

2 讨论

淋巴瘤(lymphoma)起源于淋巴结和淋巴组织, 是免疫系统的恶性肿瘤^[2]。按组织病理学分型分为霍奇金淋巴瘤(Hodgkin lymphoma, HL)和非霍奇金淋巴瘤(non Hodgkin lymphoma, NHL)两大类^[2]。据国外1 246例淋巴瘤的病例分析, 淋巴结外的淋巴组织发生淋巴瘤多见于胃肠道, 其中NHL占13%-25%; HL仅占2%; 侵及部位以小肠最多, 其次为胃, 结肠很少受累^[3]。胃肠淋巴瘤^[1]是发生于胃肠道淋巴组织的恶性肿瘤, 亦称恶性淋巴瘤。胃肠道淋巴组织作为黏膜相关淋巴组织的一部分, 与外周淋巴结有很大不同。与发生在淋巴结的恶性淋巴瘤一样, 胃肠恶性淋巴瘤亦分为HL和NHL。胃肠道的NHL亦分为原发性胃肠淋

淋巴瘤和继发性胃肠淋巴瘤。前者起源于胃肠道淋巴组织,后者是其它部位淋巴瘤累及胃肠道的结果。原发性胃恶性淋巴瘤的诊断^[4]仍采用Dawson提出的5条标准:(1)无表浅淋巴结肿大;(2)白细胞总数及分类均正常;(3)X线胸片中未见纵隔有肿大的淋巴结;(4)手术中除胃及周围区域淋巴结累及外,无其它肉眼可见的侵犯;(5)肝脾正常。胃恶性淋巴瘤术前确诊率低,误诊率较高,近些年来多有文章报道,分析其主要原因可能有:(1)本病的临床症状缺乏特征性,早期症状不明显,晚期症状与胃溃疡、胃癌相似,如有上腹隐痛、食欲不振、嗝气、消瘦等^[4];(2)胃肠淋巴瘤起源于胃肠道淋巴组织,对发生于黏膜下的淋巴瘤,过于表浅的内镜下活检常为阴性^[1];(3)胃镜检查常见表现有多发性溃疡结节、息肉样突起、腔内肿块、带有堤状隆起的大溃疡以及因淋巴瘤浸润而形成的黏膜皱襞粗大和弥漫性的增厚等,临床有时与胃溃疡、胃癌在胃镜表现上不易鉴别^[1];(4)有时与胃癌在大体标本中,甚至在病理组织学上的鉴别亦发生困难^[1];(5)临床医生对本病的胃镜等表现缺乏必要的了解,警惕性不高。本病X线钡餐检查诊断胃恶性淋巴瘤者仅18%,胃镜检查对病变部位进行合适部位及适当深度取材,活检阳性率可达76%以上^[4]。本例患者首发上腹部胀痛20 d,伴嗝气、反酸、消瘦来院就诊,第一次胃镜检查示“复合性溃疡;胃窦多发结节隆起样病变;性质待查”,活检病理黏膜慢性浅表性炎。

之后B超及CT示恶性肿瘤不排除,随后进行第二次胃镜检查同时再结合查体有浅表淋巴结肿大故考虑“胃癌”再多处取活检,病理仍示黏膜慢性浅表性炎。考虑胃恶性淋巴瘤可能,故决定进行右侧腹股沟一肿大淋巴结局部手术切取活检,病理结果明确B细胞恶性淋巴瘤,诊断明确,予CHOP方案化疗效果明显。分析本例患者有浅表淋巴结肿大,考虑继发性胃恶性淋巴瘤诊断,本例临床上极易误诊为胃癌伴淋巴结转移。如果本例无浅表淋巴结肿大,且医院的病理诊断水平有限或临床医生的主观认识不够、思路单一,则明确诊断很困难,有可能需剖腹探查明确。总结经验,若临床遇到上腹痛、嗝气、消瘦等,而胃镜下所见有多发性溃疡结节、不规则大溃疡、苔污秽和/或见黏膜多发结节隆起样病变等,反复活检病理未发现肿瘤细胞,应注意排除恶性淋巴瘤的可能,注意内镜下活检取材及选择必要的相关检查明确,如超声内镜等。临床医生应提高对本病的认识,尽量避免诊断思路过于单一。

3 参考文献

- 1 陈杰. 胃肠淋巴瘤. 方圻. 现代内科学. 上卷. 第1版. 北京:人民军医出版社, 1998: 1963-1969
- 2 谢毅. 淋巴瘤. 叶任高, 陆再英主编. 内科学. 第6版. 北京:人民卫生出版社, 2004: 619-630
- 3 丁训杰, 应韶旭. 淋巴瘤. 陈灏珠. 实用内科学. 下册. 第11版. 北京:人民卫生出版社, 2002: 2186-2198
- 4 张希德. 胃部其他肿瘤. 陈灏珠. 实用内科学. 下册. 第11版. 北京:人民卫生出版社, 2002: 1762-1763

■同行评价

有实际临床价值,临床医生应如文中所述加强对本病认识,提高警惕。

电编 李琪 编辑 管鑫妍

世界华人消化杂志投稿须知

《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。

1 投稿总则

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

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

述6 000字以内, 研究快报4 000字以内, 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。

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} , Vd, $T_{1/2}$ 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(M大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用分子质量, 其单位是ku, “原子量”应改为相对原子质量, 即Ar(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 $37.6 \pm 1.2^\circ\text{C}$, 45.6 ± 24 岁, $56.4 \pm 0.5 \text{ d}$. $3.56 \pm 0.27 \text{ pg/ml}$ 应为 $3.56 \pm 0.27 \text{ ng/L}$, $131.6 \pm 0.4 \text{ mmol/L}$, $t = 28.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $\times 10^{12}/\text{L}$, WBC数用 $\times 10^9/\text{L}$, 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 $1 \times 10^{-3} \text{ g}$ 与 $5 \times 10^{-7} \text{ g}$ 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字的文句中, 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 χ^2 ; (4)样本的相关系数用英文小写r; (5)自由度用希文小写v; (6)样本数用英文小写n; (7)概率用英文斜体大写P. 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 统计学显著性用^aP<0.05, ^bP<0.01(P>0.05不注). 如同一表中另有一套P值, 则^cP<0.05, ^dP<0.01; 第三套为^eP<0.05, ^fP<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

《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.

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。

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)。

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, 太原消化病防治中心。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 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. wcjd@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;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.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

《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.

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。

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 gastroenterology. *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、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿寄回给作者自行修改. 当原稿退还作者修改时, 作者必须于1 mo内将修改后的稿件及软盘寄回编辑部; 逾期寄回的, 作重新投稿处理.

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

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

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

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

世界华人消化杂志作者、读者、编委反馈信息

编者按 世界华人消化杂志自创刊已有14 a历史, 目前已经发展成为旬刊。2006年本刊开辟了“海宁信箱”专栏, 旨在促使形成作者、读者、编者互动的局面, 适应我国消化病事业的飞速发展, 创办高质量的学术期刊, 进一步活跃学术界。本专栏面向作者、读者、以及编委征集反馈信息, 希望借用大家的力量来引导杂志向更高的质量迈进。反馈信息包括对杂志的总体评价、事实纠错、文字更正、解释说明, 编辑部会如实地将这些信息以公开或匿名的方式刊登在每期的固定位置。反馈信息可以通过Email发送至h.n.zhang@wjgnet.com, 也可以发送手机短信至13910684938。

1 反馈信息

1.1 新版世界华人消化杂志与读者见面了。接到杂志时, 对其内容编排及栏目结构的印象颇为深刻, 对《世界华人消化杂志》不断进取、大胆尝试、方便读者、改革求新的办刊精神深受感动。褒扬之词此不赘述, 谨对相关栏目提几点建议。(1)有的文章背景资料介绍欠深入, 只是正文前言的重复。加入背景资料的初衷就是使读者对论文所在领域的背景和进展情况有必要的了解, 这样可助更好地理解正文, 认识所读文章的意义、研究水平和深度。(2)相关报道只重复列出了参考文献中的2-3篇论文的作者、题名及出处, 与参考文献完全相同。若能对相关报道原文的摘要进行简要介绍则更完美, 圈圈点点、

三言两语, 虽占据少许空间, 却更能使读者了解正文。(3)建议在研发前沿栏目中加入研究未能解决的问题或以后相关热点研究等内容, 对读者进一步理解本研究的未来发展趋向有一定的指导; 若版面允许可另辟栏目, 如未来研究、热点研究等。(姚希贤, 蒋树林, 河北医科大学附属第二医院)

1.2 世界华人消化杂志2006年第4期: (1)基础研究方面论文质量较好; (2)临床经验方面有两篇文章质量不高, 其一¹²⁵I Ni-Ti支架的治疗效果与护理关系不大, 文题让人难以理解, 其二埃索美拉唑根除*H Pylori*治疗对照组选择不当, 文章说明不了什么问题; (3)综述部分尚可, 但有两篇作者达7人, 建议按照国际惯例不要超过三人; (4)国际会议通知最好在正文中体现, 不应列在目录中; (5)建议将部分以患者作为研究对象的“临床基础研究”文章列入临床研究中。(王小众 教授, 福建医科大学附属协和医院消化内科)

编辑回应

首先, 对所有关注和支持本刊的读者、作者、以及编委表示衷心感谢, 对他们的批评我们一定虚心接受。我们保证在以后的工作中一定加强监督、规范工作流程, 不断提高杂志的质量。其次, 有了这些高度敬业、严肃对待学术的读者、作者、以及编委, 我们有信心将本刊进一步推向更高的发展领域。

2006年, 《世界华人消化杂志》在线办公系统将正式开通, 从投稿到出版所有环节一律在网上实现, 将会大大缩短从投稿到出版的时间。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 <http://www.wjgnet.com/wcjd/index.jsp>

致谢世界华人消化杂志编委

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

白爱平 主治医师
中山大学附属第一医院消化内科

陈红松 副研究员
北京大学人民医院、北京大学肝病研究所

陈凇 教授
中国人民解放军总医院 普通外科

陈卫昌 教授
苏州大学附属第一医院消化内科

陈耀凯 副教授
重庆第三军医大学西南医院全军感染病研究所

崔云甫 教授
哈尔滨医科大学第二附属医院普外一科

党双锁 副教授
西安交通大学第二医院感染科

董蕾 教授
西安交通大学第二附属医院消化内科

戈之铮 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

龚国忠 教授
中南大学湘雅二医院肝病研究中心

韩天权 教授
上海交通大学医学院附属瑞金医院外科、上海消化外科研究所

李国威 教授
西安交通大学医学院第二附属医院普通外科

李涛 主治医师
北京大学人民医院肝胆外科

李延青 教授
山东大学齐鲁医院消化科

刘杞 教授
重庆医科大学病毒性肝炎研究所

吕宁 主任医师
中国医学科学院肿瘤医院

马大烈 教授
上海第二军医大学长海医院病理科

潘秀珍 教授
福建省立医院消化研究室

秦环龙 教授
上海交通大学附属第六人民医院外科

沈薇 教授
重庆医科大学附属第二医院消化内科

施瑞华 教授
南京医科大学第一附属医院消化科

谭学瑞 教授
汕大医学院第一附属医院 院长室

唐文富 主治医师
四川大学华西医院中西医结合科

屠红 副研究员
上海市肿瘤研究所分子诊断室

万军 教授
解放军总医院南楼老年消化科

王春友 教授
华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科中心

王效民 教授
厦门大学附属中山医院

王学美 研究员
北京大学第一医院中西医结合研究室

王苑本 教授
中国人民解放军二七一医院消化内科

肖恩华 教授
中南大学湘雅二医院放射教研室

张绪清 副教授
第三军医大学附属西南医院全军感染病研究所

张学 教授
中国协和医科大学基础医学院医学遗传学系