

# 肝硬化失代偿期外周血细胞减少成因机制

党双锁

党双锁, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科 陕西省西安市 710004

党双锁, 副教授, 博士生导师, 1987年西安医科大学医学学士, 1994年及1998年在西安医科大学相继获得医学硕士及博士学位。负责国家自然科学基金3项, 发表学术论文50余篇。现任西安交通大学医学院第二附属医院感染科主任及感染病学系主任, 多个学术期刊编委。主要从事感染病学, 专于肝病的基础与临床研究。

国家自然科学基金项目, No. 30670961

通讯作者: 党双锁, 710004, 陕西省西安市西五路157号, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科。dang212@126.com

电话: 029-83036998

收稿日期: 2007-05-18 修回日期: 2007-09-01

## Inducing peripheral blood cells for a decrease in decompensated cirrhosis

Shuang-Suo Dang

Shuang-Suo Dang, Department of Infectious Diseases, Second Affiliated Hospital of Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30670961

Correspondence to: Shuang-Suo Dang, Department of Infectious Diseases, Second Affiliated Hospital of Medical School of Xi'an Jiaotong University, 157 Xiwu Road, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China. dang212@126.com  
Received: 2007-05-18 Revised: 2007-09-01

## Abstract

Decompensated cirrhosis complicated with hypersplenism and hypocytosis are related and influence each other, with the latter being an important aggravating cause of the disease. Peripheral blood cells of some patients with cirrhosis after splenectomy not only do not increase, but actually decrease gradually. These results indicate that declining peripheral blood cells in patients with cirrhosis may be the result of factors in addition to the spleen and viral factors. Current research shows that various immune cytokine changes and hematopoietic stem cells states are likely to be involved and regulate the process of decreasing the number of peripheral blood cells in decompensated cirrhosis. It is suggested that inducing peripheral blood cells to cause a decrease in decompensated cirrhosis is worthy of more in-depth study as a potential therapy.

**Key Words:** Hepatic cirrhosis; Hypersplenism; Hemopoietic stem cells; Immune reaction

Dang SS. Inducing peripheral blood cells for a decrease in decompensated cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(27): 2861-2864

## 摘要

肝硬化失代偿期并发的脾功能亢进和血细胞减少, 互为因素, 相互影响, 是造成病情进展的重要原因。部分患者脾脏切除后, 外周血细胞不仅无增加, 反而出现进行性下降的表现, 表明在肝硬化时外周血细胞减少, 除了脾脏及病毒因素外也存有其他因素参与这一病程。各种免疫细胞因子变化、造血干细胞的状态都可能参与和调节肝硬化失代偿期外周血细胞减少这一过程。阐释肝硬化失代偿期外周血细胞减少成因机制对治疗意义重大, 值得深入研究。

**关键词:** 肝硬化; 脾功能亢进; 造血干细胞; 免疫反应

党双锁. 肝硬化失代偿期外周血细胞减少成因机制. *世界华人消化杂志* 2007;15(27):2861-2864

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2861.asp>

## 0 引言

以病毒型肝炎为主的肝病在国内呈高发状态, 决定了目前肝病晚期肝硬化的发生率居高不下。长期以来, 肝病发展到了肝硬化失代偿期, 在临床上不论是内科综合治疗、还是外科手术治疗往往只能是保肝、对症支持、保守治疗, 疗效有限, 大多预后不良。与此同时, 在肝硬化失代偿期时, 并发的脾功能亢进(hypersplenism, 简称脾亢)和血细胞减少互为因素, 相互影响, 是造成病情进展加快、加重的重要原因。因此, 在病理情况下探讨影响肝硬化所致脾亢与外周血细胞减少之间的相关因子或因素, 对于揭示中晚期肝病外周血细胞减少的成因意义重大。其研究结果为肝硬化时并发症的防治、延缓或停止肝病发生病理进程提供科学依据。

## 背景资料

肝硬化处于失代偿期时, 并发的脾功能亢进和血细胞减少互为因素, 相互影响, 是造成病情进展加快、加重的重要原因。已引起临床高度重视, 但目前对于外周血细胞减少的成因研究不多, 应予以重视。

### 相关报道

张伟辉 *et al* 对脾切除术后外周血细胞的变化进行观察发现肝炎相关性再障并不是肝炎后肝硬化患者骨髓增生不良的主要原因; 林果为 *et al* 发现乙型肝炎病毒对骨髓有一定抑制作用; Forbes *et al* 报道 91% 酒精性肝硬化患者出现外周血异常和骨髓造血组织高度分化。

## 1 肝硬化时血象的异常变化引起临床医生及学者的高度关注

肝硬化门静脉高压患者由于门静脉压力增高引起脾静脉血液回流阻力增高, 因而都有不同程度的脾肿大进而发展成脾功亢进, 脾脏的破血功能增强, 患者出现外周血细胞减少的症状。肝硬化-脾功能亢进-外周血细胞减少, 这是我们的一般认识或共识。大部分肝硬化并脾功能亢进患者在脾脏切除后, 外周血细胞即可增加; 但部分患者脾脏切除后, 外周血细胞不仅无增加, 而且出现进行性下降的表现。这种现象在国外也有报道, 据国外资料, 91% 酒精性肝硬化患者出现外周血异常和骨髓造血组织高度分化<sup>[1]</sup>。我们总结了124例肝硬化患者骨髓增生情况: 其中88例增生活跃(占70.96%); 增生一般者占19例(占15.32%); 17例增生低下, 其中红、粒、巨核三系均低下者8例(占6.45%), 粒、巨核二系低下者7例(占5.64%), 单纯粒系低下者2例(占1.61%)。结果与国外资料大体一致。国内张伟辉 *et al*<sup>[2]</sup> 对脾切除术后外周血细胞的变化进行观察发现肝炎相关性再障并不是肝炎后肝硬化患者骨髓增生不良的主要原因, 提示在肝硬化时, 除了脾脏及病毒因素外也存有其他因素参与外周血细胞减少这一过程。由此推测在肝脏与骨髓之间存在某种紧密的关联, 是何种因素在牵手两脏器值得思考, 值得探讨。

## 2 肝、脾、骨髓与造血密不可分, 动态观察造血干细胞状态对于了解外周血象变化意义重大

肝、脾、骨髓在胚胎期就与造血密切相关。胚胎时, 造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)起源于胚胎时期卵黄囊壁上的间充质细胞。随着胚体内外血循环建立, 在人胚第6周开始造血, HSC被播散到肝, 继肝造血后, 脾也表现短暂的造血功能, 人脾在生后产生全血细胞的功能基本消失, 当机体严重缺血或某些病理状态下, 脾可以恢复造血功能。HSC最后主要定居在骨髓并维持机体终身造血。以上显示肝、脾、骨髓在胚胎期就与造血密切相关, 并由HSC传导发生。这一理论提示我们, 造血细胞尤其是HSC的某种动态变化可能会对肝脏发生病理损伤所引导的脾脏与骨髓的病理变化起到某种提示作用。

CD34抗原是临床上应用最多的HSC标志物, 了解CD34<sup>+</sup>在肝硬化时的动态变化, 对于阐释肝脏、脾及骨髓间相互影响应有意义, 同时为脾功能亢进手术者提供指导意见。CD34是一种属于I型跨膜蛋白的磷酸糖蛋白, 是细胞表

面的糖蛋白, 研究发现他首先见于骨髓(BM)的一小群细胞, 随后大量研究证实他是一个非常有价值的指标, 可用来标记造血干/祖细胞, 其主要选择性表达于造血干(祖)细胞(hematopoietic stem/progenitor cell, HSC/HPC)及血管内皮细胞(EC)表面。CD34可以协助骨髓的CD34<sup>+</sup>造血干/祖细胞黏附于骨髓基质, 还可抑制造血细胞分化, 促进造血祖细胞形成, 参与细胞内信号转导等<sup>[3]</sup>, CD34<sup>+</sup>细胞群是一个异质性细胞群, 含有阶段造血祖细胞, 随干细胞的分化成熟而逐渐丢失。因此测定CD34<sup>+</sup>细胞数可作为造血干/祖细胞数量检测的可靠指标。

近年来, 随着基础医学科学的发展及干细胞研究的深入, 尤其是证实了骨髓来源细胞能形成肝细胞, 现认为肝脏中存在干细胞, 而且初步认为肝脏干细胞位于胆管系统, 包括终末胆管、所有胆上皮细胞及所谓的胆管内的基底细胞<sup>[4]</sup>。Crosby *et al*<sup>[5]</sup> 在肝硬化患者肝脏内发现CD34<sup>+</sup>细胞, 经分离进行体外培养, 这些具有造血干细胞表面标志的细胞开始分化成胆管细胞, 表达胆管细胞的表面标记CK19, 而c-kit, CD34<sup>+</sup>逐渐消失, 说明胆管上皮前体细胞也可能来源于骨髓。由此推测, 如果肝损伤是广泛的和慢性的, 肝脏干细胞、造血干细胞都很可能参与肝损伤的病理生理过程。

在临床上诊断与治疗过程当中, 我们观察发现脾功能亢进时可导致三系细胞减少, 而同时骨髓往往有代偿性增生改变, 骨髓中CD34<sup>+</sup>细胞增多。然而, 某些肝硬化脾切除患者血细胞却不能回升, 骨穿证实骨髓中CD34<sup>+</sup>细胞大多是降低的。因此, 对于肝硬化患者行骨穿, 检测骨髓中CD34<sup>+</sup>细胞的变化, 对于外科脾切除手术治疗脾功能亢进可能会有重大的指导意义。如果骨髓CD34<sup>+</sup>表达明显增高, 则切脾后血象有望恢复正常, 反之, 如骨髓CD34<sup>+</sup>细胞没有代偿性增高, 则切脾后对改善血象可能意义不大。

## 3 免疫细胞因子在失代偿期肝硬化时对外周血细胞的影响

脾脏是人体内最大的免疫器官, 也是直接连接血液循环的较大淋巴器官。他既是连通血液的过滤器, 又是制造淋巴细胞、巨噬细胞的组织。脾脏的主要功能有: 产生免疫抗体, 吞噬作用及贮积血细胞的能力。骨髓也具有明显的免疫作用。其骨髓造血微环境包括骨髓的神经成分、微血管系统与纤维、细胞外基质与骨髓基

### 创新盘点

本文提出以造血干细胞为研究靶点, 观察在肝硬化失代偿期时肝脏、脾脏、骨髓三脏器造血干细胞的变化, 同时结合探讨细胞因子的调控, 试图为阐释肝硬化外周血减少的机制提供依据。

质细胞. 造血基质细胞是造血微环境的核心成分, 他是混合型的细胞群体, 包括成纤维细胞、巨噬细胞、内皮细胞、网状细胞和载脂细胞等, 他们不仅是造血细胞生长的支架, 还可通过细胞间通信、分泌多种造血调控因子、产生细胞外基质等多种途径调控血细胞的生成. 无论哪种原因引起骨髓的病理改变, 导致骨髓造血床明显减少, 均可导致骨髓有效造血量减低, 故骨髓的异常病变是肝硬化脾功能亢进患者全血细胞下降的重要原因之一. 肝脏在人体免疫应答系统中的作用日益引起人们的重视, 已有学者提出了“肝脏是一个免疫器官”的观点. 肝脏对各种物质能区别对待, 对适合人体需要的各种营养成分及人体代谢产物常形成免疫耐受, 偶尔形成免疫应答, 则表现为对食品的过敏反应; 而对各种感染性物质, 可通过先天性免疫或获得性免疫清除感染. 在某些条件下, 也可形成免疫耐受, 如乙型肝炎的慢性感染或无症状性病毒携带者. 由此可见, 在病理情况下, 由于三个不同特性的免疫器官的互相影响, 三个脏器免疫功能的变化难免会对造血调控产生一定的影响.

近年来研究发现, 不论是在肝脏的纤维化, 脾脏的淤血性硬化、脾纤维化进程中, 还是在骨髓造血细胞的生长, 复杂的免疫网络所参与的多个环节调控中, 细胞间通信、细胞因子网络调控对其产生和发展都起到核心与关键的作用. 例如GM-CSF, SCF, IL-11, IL-6, IL-18, IFN, TNF, LIF和TGF- $\beta$ (转化生长因子 $\beta$ )等细胞因子<sup>[6]</sup>. 这些众多细胞因子中, 不少学者都给予关注与研究, 但都显得零乱不系统, 没有进行全面的分析和总结. 希望有更多的学者参与探讨.

新近发现致炎因子IL-18, 不仅参与免疫调控, 而且其过度表达可能引起免疫系统紊乱和组织器官的免疫炎性损害.

Okamura *et al*<sup>[7]</sup>对感染疮疱棒状杆菌(Pacnes)小鼠肝脏提取物用脂多糖(LPS)加强刺激, 可诱导出使IFN- $\gamma$ 高水平表达的因子, 最初把该因子称作IFN- $\gamma$ 诱导因子(IGIF), 进一步研究发现这是一种新的细胞因子, 对多种组织有免疫活性, 最后命名为白介素18(IL-18). IL-18有亲多种组织的免疫活性, 分布全身多个脏器和组织. Ushio *et al*用Northern杂交技术, 对成年人不同组织的mRNA进行分析, 发现肝脏、脾、骨骼肌等均有IL-18 mRNA的高表达, 研究证实体外IL-18最大的生物学作用之一是诱导T细胞和NK细胞产生IFN- $\gamma$ ; 在体内IL-18可增强NK

细胞和CTL的细胞毒素活性, 所以白细胞介素-18(IL-18)这个新近发现的细胞因子, 不仅是免疫细胞因子的一部分, 更重要的是其参与机体体液免疫与体液免疫反应的调控<sup>[8]</sup>, 为此近年来得到学者们高度关注. 初步研究发现, 在细菌、病毒、寄生虫和真菌感染时, 血清中可以检测到高浓度的IL-18, 说明IL-18能增强机体的抗感染能力, 但有证据表明其过度表达可能引起免疫系统紊乱和组织器官的免疫炎性损害<sup>[9]</sup>. 提示在肝脏的长期炎症环境中, 脾功能亢进、骨髓造血功能逐步下降时, IL-18可能促进病情的进展. 动态检测IL-18水平, 对于了解病情的进展可能会有很重要的价值.

TGF- $\beta$ 是一种生物活性很强的细胞因子, 主要是促进细胞外基质的再生, 调节炎症反应, 抑制免疫功能, 同时与造血也密不可分.

现已证实生理状态下脾脏能抑制TGF- $\beta$ 的表达, 而肝硬化过程中却促进其表达, 脾功能亢进时, TGF- $\beta$ 等多种物质呈过表达状态. 因此脾脏在肝硬化过程中对多个环节的调控很可能通过TGF- $\beta$ 来实现<sup>[10]</sup>. 此外, TGF- $\beta$ 不仅具有抑制树突状细胞(dendritic cell, DC)成熟并且促进CD34<sup>+</sup>前体细胞向DC分化, 增加不成熟DC产量. DC广泛分布于血液、肝、脾、淋巴结及其他非免疫器官组织中, 是目前所知功能最强的专职抗原呈递细胞(antigen presenting cell, APC), 也是唯一能刺激童贞T细胞反应的APC, 在免疫反应中起着关键的引导和调节作用. 而1, 25-二羟维生素D3则抑制DC细胞分化和成熟, 下调CD1a和CD40、CD80和MHC II表达, 并具有抑制肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )诱导DC成熟, 导致T细胞耐受的作用. 同时, TGF- $\beta$ 负调控因子可阻止细胞分化<sup>[11]</sup>, 推测TGF- $\beta$ 与抑制早期血细胞生成有关. 因此, 了解TGF- $\beta$ 在肝硬化时的动态变化, 对于揭示TGF- $\beta$ 对肝硬化的发展进程, 脾功能亢进时对血象的影响及骨髓造血状况具有临床意义.

根据以上的分析, 从解决临床实际问题出发, 选用动物模型和以临床肝硬化脾功能亢进并血细胞减少患者血清或活检组织为材料, 动态观察CD34<sup>+</sup>及细胞因子TGF- $\beta$ 和IL-18的水平变化, 通过分析, 试图从免疫学方面揭示肝硬化患者血象减少的成因, 初步了解在肝硬化失代偿期肝、脾及骨髓三个脏器相互影响的调控机制, 为终末期肝病的治疗和进展提供有效参考实验依据.

**应用要点**  
本文关注肝硬化失代偿期外周血细胞变化的成因, 将为指导脾切除术提供参考依据, 同时为干预和治疗失代偿期肝硬化提供理论基础.

# 名词解释

- 1 造血干细胞(HSC): 又称多能造血干细胞. 他是从卵黄囊全能间叶细胞分化而来的最原始的造血细胞, 是体内所有血细胞的前体, 具有高度自我更新或自我复制并进一步分化为各系祖细胞的能力.
- 2 童贞T细胞: 在骨髓内产生还没有接触过任何抗原的T淋巴细胞.

同行评价  
本文全面论述了肝硬化失代偿期外周血细胞减少成因机制, 立题新颖, 层次清楚, 论述全面, 有一定的参考价值 and 临床指导意义.

值得提出的是, 由于HBV引起骨髓再生障碍的问题虽然已经有较明确的认识<sup>[12]</sup>, 但其机制研究有待进一步深入.

#### 4 结论

失代偿期肝硬化并外周血细胞减少, 在临床治疗中最有效的治疗还是脾切除术, 通过手术不仅可以解决脾亢对血细胞的破坏, 也可以降低门静脉的压力. 但事实上一切并不完全顺应人们的愿望, 不少患者术后恢复并不理想, 部分甚至病情进一步加重. 通过动态观察骨髓、脾脏、肝脏在肝病发生发展过程中血象的变化, 探讨外周血细胞减少的成因, 及相关调控因素对其的影响, 将为阐释肝硬化病情的进展, 可对肝硬化的防治提供重要理论依据.

#### 5 参考文献

- 1 Forbes SJ, Russo FP, Rey V, Burra P, Rugge M, Wright NA, Alison MR. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterology* 2004; 126: 955-963
- 2 张伟辉, 赵松, 付英梅, 刘连新, 王晓春, 武林枫. 肝硬化门静脉高压症患者脾切除术后血细胞数减少的病因分析. *中华医学杂志* 2005; 85: 1285-1286
- 3 柏树令, 赵丹. CD34抗原的生物学特性及其临床应用. *解剖科学进展* 2005; 11: 54-56, 60
- 4 Alison MR, Golding MH, Sarraf CE. Pluripotential liver stem cells: facultative stem cells located in the

- biliary tree. *Cell Prolif* 1996; 29: 373-402
- 5 Crosby HA, Kelly DA, Strain AJ. Human hepatic stem-like cells isolated using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithelium. *Gastroenterology* 2001; 120: 534-544
- 6 冯凯, 马宽生. 继发性脾功能亢进症的治疗现状及展望. *国外医学外科学分册* 2005; 32: 183-186
- 7 Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 1995; 378: 88-91
- 8 Lin SD, Kawakami T, Ushio A, Sato A, Sato S, Iwai M, Endo R, Takikawa Y, Suzuki K. Ratio of circulating follistatin and activin A reflects the severity of acute liver injury and prognosis in patients with acute liver failure. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 374-380
- 9 Manigold T, Bocker U, Chen J, Gundt J, Traber P, Singer MV, Rossol S. Hepatitis B core antigen is a potent inducer of interleukin-18 in peripheral blood mononuclear cells of healthy controls and patients with hepatitis B infection. *J Med Virol* 2003; 71: 31-40
- 10 Brugger W, Mocklin W, Heimfeld S, Berenson RJ, Mertelsmann R, Kanz L. Ex vivo expansion of enriched peripheral blood CD34+ progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1 beta (IL-1 beta), IL-6, IL-3, interferon-gamma, and erythropoietin. *Blood* 1993; 81: 2579-2584
- 11 Shehata M, Schwarzmeier JD, Hilgarth M, Hubmann R, Duechler M, Gisslinger H. TGF-beta1 induces bone marrow reticulin fibrosis in hairy cell leukemia. *J Clin Invest* 2004; 113: 676-685
- 12 林果为, 林佩娣, 杨子文, 王倩, 方德顺. 病毒性肝炎和再生障碍性贫血发病关系的临床病学研究. *中华血液病杂志* 1994; 15: 171

编辑 程剑侠 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

#### • 审读反馈 •

### 2007年15卷26期和27期中存在的问题

世界华人消化杂志是一本办得很有特色的杂志. 为提高其质量, 该杂志坚持吸收国外优秀杂志的优点, 不断创新, 和国内中文版科技杂志相比, 其文字编辑质量比较好, 图表的安排更趋合理, 尤其是其英文摘要的文字水平在国内科技杂志中堪称一流, 尚无一能及.

当然, 这并不是说该刊已十全十美, 他还有许多需要完善和改进的地方, 如在2007年15卷26期和27期中, 还存在以下问题: 汉语表达不确切, 不符合汉语的语法规则, 特别是在引用国外文献中的观点时, 表达得不中不洋; 错字和漏字也时而可见, 如将机制写成机理, 将进食写成尽食, 将分布写成分不等; 漏字也不少, 如病理显示漏掉显, 肿瘤治疗漏掉治疗等等; 至于中文表述不规范, 则是本刊编辑中的一个通病, 如也是最重要的判断预后因素之一(应为也是判断预后的最重要因素之一); 可能通过adiponectin缓解从而改善NAFLD有关(应为与adiponectin缓解和NAFLD改善有关). (审读: 王先林教授 2007-09-25).

# 加强对自身免疫性肝病重叠综合征的认识

陈贻胜, 李新民

陈贻胜, 李新民, 福建省立医院消化内科 福建省福州市 350001

陈贻胜, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事消化系统疾病、超声内镜等的临床研究。

通讯作者: 陈贻胜, 350001, 福建省福州市东街134号, 福建省立医院消化内科. yschen@pub5.fz.fj.cn

电话: 0591-87557768

收稿日期: 2007-05-18 修回日期: 2007-08-28

## Enhancing our understanding of overlap syndrome in autoimmune liver diseases

Yi-Sheng Chen, Xin-Min Li

Yi-Sheng Chen, Xin-Min Li, Department of Digestive Internal Medicine Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, China

Correspondence to: Yi-Sheng Chen, Department of Digestive Internal Medicine Fujian Provincial Hospital, 134 Dong Street, Fuzhou 350001, Fujian Province, China. yschen@pub5.fz.fj.cn

Received: 2007-05-18 Revised: 2007-08-28

### Abstract

Recent research on autoimmune liver diseases has revealed that many of these diseases show features of more than one disease, known as overlap syndrome. Research on various aspects of overlap syndrome in autoimmune liver diseases, such as its higher incidence, unknown pathogenesis, variable clinical manifestation, diagnostic normality and stopping time of therapy, can improve to our understanding of these diseases.

**Key Words:** Primary liver cirrhosis; Autoimmune hepatitis; Primary sclerosing cholangitis; Overlap syndrome

Chen YS, Li XM. Enhancing our understanding of overlap syndrome in autoimmune liver diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(27): 2865-2868

### 摘要

随着自身免疫性肝病研究的不断深入, 发现许多自身免疫性肝病同时具有或随后表现出其他自身免疫性肝病的特征, 临床上称为自身免疫性肝病重叠综合征。由于发病率越来越高以

及本组疾病的病因不明、临床表现多样、诊断标准及治疗终点等诸多方面均有待于进一步探讨, 因而加强对本组疾病的探索具有重要的意义。

**关键词:** 原发性胆汁性肝硬化; 自身免疫性肝炎; 原发性硬化性胆管炎; 重叠综合征

陈贻胜, 李新民. 加强对自身免疫性肝病重叠综合征的认识. *世界华人消化杂志* 2007;15(27):2865-2868

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2865.asp>

### 背景资料

自身免疫性肝病是一组以异常自身免疫反应为基础的慢性肝、胆疾病综合征, 其确切发病机制不清, 且临床表现、生化、免疫及组织学变化常常交叉重叠, 给临床诊断和治疗带来了挑战, 因此, 必须提高对该病的认识。

## 0 引言

随着现代免疫、生化等实验诊断技术的不断进步和提高, 我国人群中自身免疫性肝病的检出率近年来有所增高。自身免疫性肝病是一组以异常自身免疫反应为基础的慢性肝、胆疾病综合征, 包括自身免疫性肝炎(AIH)、原发性胆汁性肝硬化(PBC)和原发性硬化性胆管炎(PSC)等, 本组疾病的确切发病机制不清, 可能涉及的因素有遗传、免疫、感染、环境等, 使问题更为复杂的是这组疾病的临床表现、生化、免疫及组织学变化常常交叉重叠, 给临床诊断和治疗带来了挑战。与此同时, 相关的文献显示近1/5的自身免疫性肝病患者具有不同于典型AIH、PBC及PSC特征的综合征, 因此提高对自身免疫性肝病重叠综合征的认识, 必将有助于提高诊断和治疗本组疾病的水平。

## 1 自身免疫性肝病的免疫机制

虽然自身免疫性肝病在病因、致病抗体、靶抗原等方面各不相同, 但其共同的特征是自身免疫调节失衡。具体表现在免疫细胞和/或细胞因子在质或量上出现异常, 即细胞免疫和/或体液免疫异常导致自身组织的损伤。无论病因如何, 抗原递呈细胞(APC)上的MHC的抗原肽和T细胞免疫受体(CTCR)结合后, 形成免疫细胞活化所必需的两个共激信号的第一信号<sup>[1-2]</sup>, 抗原递呈细胞上的跨膜蛋白B7与免疫细胞上的CD28分子结合构成免疫细胞活化的共刺激信号-第2



**相关报道**  
相关的文献显示近1/5的自身免疫性肝病患者具有不同于典型AIH、PBC及PSC特征的综合征, Floreani *et al*研究表, AIH-PSC重叠综合征发病年龄小于PSC患者, 且其发病的患者与单纯的PSC患者相比具有较高的ALT、AST和IgG水平, Joshi *et al*和Lohse *et al*的研究显示了AIH/PBC综合征的参照诊断标准。

信号, 两者共同激活细胞内信号传导通路, 促使神经钙蛋白(Calcineurin)活化在细胞因子转录中起主要作用的核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B), NF- $\kappa$ B进入细胞核结合于IL-2基因的启动子, 启动IL-2的转录及产生, IL-2反过来结合于淋巴细胞的IL-2受体, 促使淋巴细胞增殖, 同时影响其他细胞因子IL-4、IL-5、IL-6、IL-12、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 等细胞因子的产生<sup>[3]</sup>。机体的自身免疫调节失衡导致免疫损伤而引起自身免疫性肝病, 而药物通过阻断上述某一环节可抑制免疫反应的继续而起治疗作用。

## 2 常见自身免疫性肝病重叠综合征的类型和特点

临床上常见的自身免疫性肝病重叠综合征以AIH-PBC、AIH-PSC和PBC-PSC重叠者常见, 亦有文献报道上述自身免疫性肝病系自身免疫性胆管炎(AIC)的重叠综合征, 但因有关AIC的研究有限而又无明确统一的诊断标准, 大多数研究表明AIC不是一种独立的疾病, 可能是其他自身免疫性肝病的早期阶段或变异。

AIH-PBC患者一般临床症状和单纯的PBC或AIH无特殊之处, 主要有乏力、纳差、黄疸、皮肤瘙痒等非特异性症状。生化上PBC-AIH重叠综合征既有PBC胆汁淤积性生化指标(GGT、ALP)的增高, 又有AIH肝实质破坏的生化指标(AST、ALT)的增高。同时具有较高的ANA、SMA和AMA/AMA-M2抗体阳性率是PBC-AIH重叠综合征的免疫学特征。组织学上PBC-AIH重叠患者中可有PBC的小叶间胆管炎、汇管区小叶间胆管消失、汇管区周边部细小胆管增生等病理学病理变化, 也可有AIH的界面性肝炎、小叶性肝炎、玫瑰花结样改变等, 但两者的阳性率均较低<sup>[4-8]</sup>。

AIH-PSC重叠综合征主要发病于青少年, 临床上主要表现为乏力、黄疸、腹痛以及反复的胆道感染, 其一般的临床表现和PSC并无显著的差别, 但Floreani *et al*<sup>[9]</sup>近来的研究表明, AIH-PSC重叠综合征发病年龄小于PSC患者(21.4 $\pm$ 5.0岁 vs 32.3 $\pm$ 10岁), 同时AIH-PSC重叠发病的患者与单纯的PSC患者相比具有较高的ALT、AST和IgG水平, 其在生化和免疫学方面的异常接近于AIH。组织学上本病亦可出现碎屑样坏死、淋巴细胞浸润、玫瑰花结等。总之, AIH-PSC重叠综合征在临床症状、体征和影像学上的表现类似于PSC, 而其生化、免疫及组织学的改变类似于AIH<sup>[10-16]</sup>。

PBC-PSC重叠综合征临床上报道的较少, 虽然理论上两者均引起胆汁淤积性的生化改变, 但两者在发病年龄、临床表现、影像学改变、免疫学变化及组织学异常等诸多方面均有很大的不同, 因此PBC-PSC重叠综合征有待于对更多病例的进一步研究。

## 3 重叠综合征的诊断

关于自身免疫肝病重叠综合征的诊断, 目前尚没有国际或国内统一的标准, 大多数文献把本组疾病解释为自身免疫性肝病变异综合征或不完全符合AIH、PBC或PSC任一诊断标准的自身免疫性肝病。本组重叠疾病临床表现为两种类型, 一种是交叉患者在完全满足一种自身免疫性肝病诊断标准的同时存在其他自身免疫性肝病的临床、生化、免疫或组织学的部分特点, 而未达到诊断另一自身免疫性肝病标准; 另一表现形式为真正的重叠综合征患者同时或在疾病过程中的不同阶段完全符合两种自身免疫性肝病的临床、免疫或组织学诊断标准<sup>[17]</sup>。目前有关AIH/PBC综合征的研究较多, 关于PBC-AIH重叠综合征的诊断, 大多数的研究表明对PBC患者是否同时患有AIH而进行AIH评分诊断是不可行的, Joshi *et al*<sup>[18]</sup>和Lohse *et al*<sup>[4]</sup>的研究显示AIH/PBC综合征可参照如下标准进行诊断: (1)ALT $\geq$ 5 $\times$ UNL(正常值上限); (2)免疫球蛋白G(IgG) $\geq$ 2 $\times$ UNL; (3)SMA阳性和/或ANA滴度 $\geq$ 1:1000; (4)治疗前肝活检有中度到重度的汇管区周围炎和/或小叶性肝炎。PBC患者符合上述条件中的两条或两条以上诊断为PBC-AIH重叠综合征。AIH-PSC的诊断标准是相加的, 可参照如下标准进行诊断: 当患者行ERCP检查影像上符合PSC的诊断标准时, 满足以下条件可诊断AIH/PSC综合征<sup>[9]</sup>: (1)AIH诊断积分 $>$ 15分; (2)抗核抗体(ANA)或抗平滑肌抗体(ASMA)滴度 $\geq$ 1:40; (3)组织学检查有碎屑样坏死、肝细胞玫瑰花结形成以及中度到重度小叶性肝炎等AIH组织学变化。由于有关PSC-PBC重叠发病的报道少见, 虽然PSC在ERCP影像学上与PBC有很大的不同, 但两者的组织学和免疫学特征有很多相似的方面, 因此目前还没有文献报道有关PSC-PBC重叠综合征的定义或诊断标准。自身免疫性肝病重叠综合征并不少见, 诊断需综合临床、生化、自身抗体和病理组织学等指标, 但目前尚无各自重叠肝病综合征敏感性高、特异性强的诊断标准。

## 4 治疗

本组疾病的治疗非常棘手. 原则上对无症状、无黄疸的患者密切进行监测, 有症状或有黄疸者进行治疗. 早、中期患者以药物或介入治疗为主, 晚期患者需进行手术治疗.

### 4.1 药物治疗

**4.1.1 针对病因和发病机制的药物治疗** 根据自身免疫性肝病的病因和发病机制有关的假说, 治疗本组的药物包括糖皮质激素、熊去氧胆酸(UDCA)、免疫抑制剂、青霉胺、抗生素等, 治疗本组疾病的基本原则为PSC-PBC的治疗, 以UDCA为主; AIH-PSC的治疗应联合应用糖皮质激素和UDCA; AIH-PBC重叠综合征的治疗根据ALP、GGT水平的不同而区别对待. 若 $ALP < 2 UNL$ 则应用糖皮质激素试验治疗, 若 $ALP \geq 2 UNL$ 及 $GGT > 5 UNL$ 则联合应用糖皮质激素和UDCA. 总体上讲, 上述治疗可使大部分患者取得较好的近期疗效<sup>[17]</sup>.

**4.1.2 并发症的药物治疗** 由于本组疾病大多伴有胆汁淤积, 因而患者可出现皮肤瘙痒、脂溶性维生素缺乏、代谢性骨病、脂肪泻等多种并发症, 应根据轻、重、急、缓的不同对这些异常表现进行相应的处理. 脂肪泻可给予中链脂肪酸补充能量. 脂溶性维生素缺乏时应行替代治疗. 维生素A补充应从小剂量开始以防加重肝脏损伤. 补充维生素D应注意有无钙缺乏. 维生素E缺乏少见, 但一旦缺乏其引起的神经系统症状很难纠正, 因而应密切观察, 及早补充维生素D. 治疗皮肤瘙痒可根据病情和条件应用消胆胺、利福平、离子交换树脂及鸦片受体拮抗剂<sup>[19-20]</sup>. 关于代谢性骨病的治疗, 目前尚无有效的药物能明显改善本组疾病引起的骨质疏松, 女性可考虑激素替代治疗, 长期应用皮质激素治疗的患者可考虑口服维生素D和钙剂.

**4.2 内镜和放射介入治疗** 主要用于防治自身免疫性肝病的并发症, 主要是PSC与其他自身免疫性肝病重叠综合征的并发症. 根据病变的部位、范围和性质可行壶腹括约肌切开术、狭窄扩张放置支架术、网篮取石术和内镜下鼻胆管引流及灌洗术等. 内镜和放射介入治疗的目的是解除胆道梗阻, 减轻继发性损害. 虽有文献表明可以改善临床、生化和胆管影像学异常, 但对患者的生存期却无明显的影响<sup>[21-23]</sup>.

**4.3 外科治疗** 分为姑息性手术和肝移植两类手术治疗. 姑息性手术的目的在于解除胆道梗阻及治疗其他并发症, 可延长患者的生存期, 但手术

本身亦可引起并发症, 增加胆道感染机会. 同时, 广泛的手术吻合给以后的肝移植增加难度, 降低移植成功率. 因此随着肝移植技术的不断提高姑息性手术已大大地减少.

在有效的药物治疗出现以前, 肝移植是晚期慢性肝病患者的首选治疗方法. 肝移植患者的生存期超过姑息性手术患者和具有可比性非手术患者的生存期<sup>[24]</sup>. 虽然门脉高压并发症是晚期肝病患者肝移植的主要指征, 但患者出现顽固性瘙痒、严重消瘦、持续性胆红素升高等情况时, 即便肝活检证实尚未发展为肝硬化, 仍应建议患者进行肝移植.

## 5 结论

由于自身免疫性肝病的发病机制不明、起病隐匿, 加上本组疾病的发生和发展都有一个相对缓慢的过程, 给本组疾病的基础和临床研究工作带来了极大的困难. 成功建立本组疾病的实验动物模型、制订各自身免疫性肝病重叠综合征的诊断标准、探索并确立疾病的治疗终点等, 均是研究本组疾病所急需解决的问题.

由于了解上述自身免疫性肝病的免疫发病机制可知, 在信号传导通路上进行位点特异性阻断传导在理论上可终止疾病的发生. 可利用人工合成肽与T细胞免疫受体(CTCR)结合, 竞争抑制抗原递呈细胞(APC)上的MHC II类抗原与CTCR的结合, 从而阻断第1共刺激信号所引起的免疫细胞的活化. 另外, 也可阻断依赖于calcineurin活化的传导通路, 从而阻断主要细胞因子的转录.

细胞毒T淋巴细胞抗原-4(CTLA-4)与CD28结合可竞争性地抑制B7与CD28的结合, 降低第2共刺激信号的传导抑制免疫细胞的活化, 可溶性的CTLA-4已被应用于血液性疾病以减轻自身免疫反应, 不难想象对于自身免疫性肝病, 他亦有潜在的光辉前景<sup>[25]</sup>.

通过应用T细胞疫苗使某一特定表型的活化细胞毒T淋巴细胞耗尽消失, 可以阻断细胞毒T淋巴细胞所引起的免疫损伤. T细胞疫苗已被应用于鼠科动物的自身免疫性肝炎, 疫苗能防止小鼠患自身免疫性肝炎并能减轻已患病小鼠的病情<sup>[26]</sup>. 成功治疗人类自身免疫性肝病的关键是正确认识各自身免疫性肝病靶向T淋巴细胞的细胞表型.

基因治疗是目前医学研究的热点, 对于各自身免疫性肝病, 在理论上可导入特定的基因抑

**同行评价**  
本文评论了如何加强对自身免疫性肝病重叠综合征的认识, 内容丰富, 层次清楚, 有一定的科学性.

制某一调控细胞因子的过度产生, 延缓纤维化或促进肝细胞再生<sup>[27]</sup>.

## 6 参考文献

- 1 Dustin ML, Shaw AS. Costimulation: building an immunological synapse. *Science* 1999; 283: 649-650
- 2 Marchalonis JJ, Schluter SF, Edmundson AB. The T-cell receptor as immunoglobulin: paradigm regained. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 216: 303-318
- 3 Johnson PJ. Immunosuppressive drug mechanisms. In: McFarlane IG, Williams R, eds. *Molecular Basis of Autoimmune Hepatitis*. Austin, TX: RG Landes 1996: 177-191
- 4 Lohse AW, zum Buschenfelde KH, Franz B, Kanzler S, Gerken G, Dienes HP. Characterization of the overlap syndrome of primary biliary cirrhosis (PBC) and autoimmune hepatitis: evidence for it being a hepatic form of PBC in genetically susceptible individuals. *Hepatology* 1999; 29: 1078-1084
- 5 Czaja AJ. Frequency and nature of the variant syndromes of autoimmune liver disease. *Hepatology* 1998; 28: 360-365
- 6 Heathcote J. Variant syndromes of autoimmune hepatitis. *Clin Liver Dis* 2002; 6: 669-684
- 7 Joshi S, Cauch-Dudek K, Wanless IR, Lindor KD, Jorgensen R, Batts K, Heathcote EJ. Primary biliary cirrhosis with additional features of autoimmune hepatitis: response to therapy with ursodeoxycholic acid. *Hepatology* 2002; 35: 409-413
- 8 Poupon R. Autoimmune overlapping syndromes. *Clin Liver Dis* 2003; 7: 865-878
- 9 Floreani A, Rizzotto ER, Ferrara F, Carderi I, Caroli D, Blasone L, Baldo V. Clinical course and outcome of autoimmune hepatitis/primary sclerosing cholangitis overlap syndrome. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1516-1522
- 10 Takiguchi J, Ohira H, Rai T, Shishido S, Tojo J, Sato Y, Kasukawa R, Watanabe H, Funabashi Y, Kumakawa H. Autoimmune hepatitis overlapping with primary sclerosing cholangitis. *Intern Med* 2002; 41: 696-700
- 11 Muratori L, Cassani F, Pappas G, Guidi M, Mele L, Lorenza V, Lenzi M, Bianchi FB, Muratori P. The hepatic/cholestatic "overlap" syndrome: an Italian experience. *Autoimmunity* 2002; 35: 565-568
- 12 Durazzo M, Premoli A, Fagoonee S, Pellicano R. Overlap syndromes of autoimmune hepatitis: what is known so far. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 423-430
- 13 Hatzis GS, Vassiliou VA, Delladetsima JK. Overlap syndrome of primary sclerosing cholangitis and autoimmune hepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 203-206
- 14 van Buuren HR, van Hoogstraten HJE, Terkivatan T, Schalm SW, Vleggaar FP. High prevalence of autoimmune hepatitis among patients with primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 2000; 33: 543-548
- 15 Kaya M, Angulo P, Lindor KD. Overlap of autoimmune hepatitis and primary sclerosing cholangitis: an evaluation of a modified scoring system. *J Hepatol* 2000; 33: 537-542
- 16 Gregorio GV, Portmann B, Karani J, Harrison P, Donaldson PT, Vergani D, Mieli-Vergani G. Autoimmune hepatitis/sclerosing cholangitis overlap syndrome in childhood: a 16-year prospective study. *Hepatology* 2001; 33: 544-553
- 17 邱德凯, 马雄. 自身免疫性肝病基础与临床. 上海: 上海科技出版社, 2006: 311-319
- 18 Joshi S, Cauch-Dudek K, Wanless IR, Lindor KD, Jorgensen R, Batts K, Heathcote EJ. Primary biliary cirrhosis with additional features of autoimmune hepatitis: response to therapy with ursodeoxycholic acid. *Hepatology* 2002; 35: 409-413
- 19 Bachs L, Pares A, Elena M, Piera C, Rodes J. Effects of long-term rifampicin administration in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1992; 102: 2077-2080
- 20 Wolfhagen FH, Sternieri E, Hop WC, Vitale G, Bertolotti M, Van Buuren HR. Oral naltrexone treatment for cholestatic pruritus: a double-blind, placebo-controlled study. *Gastroenterology* 1997; 113: 1264-1269
- 21 May GR, Bender CE, LaRusso NF, Wiesner RH. Nonoperative dilatation of dominant strictures in primary sclerosing cholangitis. *AJR Am J Roentgenol* 1985; 145: 1061-1064
- 22 Lee JG, Schutz SM, England RE, Leung JW, Cotton PB. Endoscopic therapy of sclerosing cholangitis. *Hepatology* 1995; 21: 661-667
- 23 Stiehl A, Rudolph G, Sauer P, Benz C, Stremmel W, Walker S, Theilmann L. Efficacy of ursodeoxycholic acid treatment and endoscopic dilation of major duct stenoses in primary sclerosing cholangitis. An 8-year prospective study. *J Hepatol* 1997; 26: 560-566
- 24 Farges O, Malassagne B, Sebah M, Bismuth H. Primary sclerosing cholangitis: liver transplantation or biliary surgery. *Surgery* 1995; 117: 146-155
- 25 Guinan EC, Boussiotis VA, Neuberger D, Brennan LL, Hirano N, Nadler LM, Gribben JG. Transplantation of anergic histoincompatible bone marrow allografts. *N Engl J Med* 1999; 340: 1704-1714
- 26 Lohse AW, Dienes HP, Meyer zum Buschenfelde KH. Suppression of murine experimental autoimmune hepatitis by T-cell vaccination or immunosuppression. *Hepatology* 1998; 27: 1536-1543
- 27 Tuohy VK, Mathisen PM. T cell design for therapy in autoimmune demyelinating disease. *J Neuroimmunol* 2000; 107: 226-232

编辑 程剑侠 电编 郭海丽



# 罗格列酮对高脂饮食诱导非酒精性脂肪肝大鼠胰岛素抵抗及脂联素的影响

鄧敏, 陈旻湖, 陈洁, 陈文激, 郎江明

鄧敏, 中山大学附属第一医院消化内科 广东省广州市 510080; 广州中医药大学附属佛山中医院糖尿病治疗中心 广东省佛山市 528000  
陈旻湖, 陈洁, 陈文激, 中山大学附属第一医院消化内科 广东省广州市 510080  
郎江明, 广州中医药大学附属佛山中医院糖尿病治疗中心 广东省佛山市 528000  
鄧敏, 中山大学附属第一医院与广州中医药大学附属佛山中医院联合培养博士后, 主治医师, 讲师, 主要从事肝病及消化道肿瘤的基础与临床研究.  
国家自然科学基金, No. 30600845  
广东省卫生厅科研基金, No. B2006135  
2005年度广州中医药大学科研创新基金  
通讯作者: 鄧敏, 528000, 广东省佛山市亲仁路6号, 广州中医药大学附属佛山中医院消化内科. merryzhi@163.com  
电话: 0757-28123011  
收稿日期: 2007-05-11 修回日期: 2007-09-18

## Effect of rosiglitazone on insulin resistance and adiponectin in non-alcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in rats

Min Zhi, Min-Hu Chen, Jie Chen, Wen-Ji Chen, Jiang-Ming Lang

Min Zhi, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China; Diabetes Center, Foshan Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Foshan 528000, Guangdong Province, China

Min-Hu Chen, Jie Chen, Wen-Ji Chen, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Jiang-Ming Lang, Diabetes Center, Foshan Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Foshan 528000, Guangdong Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30600845; Science Foundation of the Health Department of Guangdong Province, No. B2006135; Science Research and Innovative Foundation of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2005

Correspondence to: Min Zhi, Department of Gastroenterology, Foshan Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 6 Qinren Road, Foshan 528000, Guangdong Province, China. merryzhi@163.com

Received: 2007-05-11 Revised: 2007-09-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of rosiglitazone

on insulin resistance and adiponectin in non-alcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in rats.

**METHODS:** Thirty Wistar rats were randomly divided into three groups of 10 rats each: model group (high-fat diet + intragastric distilled water); control group (normal diet + intragastric distilled water); and rosiglitazone group [high-fat diet + intragastric rosiglitazone, 3 mg/(kg·d)]. The levels of triglyceride (TG), total cholesterol (TC), aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT), and homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) were investigated. Histological liver sections were observed by HE and Sudan staining. Adiponectin mRNA in the liver was detected by real-time fluorescent quantitative RT-PCR. Adiponectin protein in the liver was detected by Western blotting.

**RESULTS:** There were significant differences in TG ( $1.51 \pm 0.37$  mmol/L vs  $0.98 \pm 0.51$  mmol/L,  $P < 0.01$ ), TC ( $2.74 \pm 0.65$  mmol/L vs  $1.71 \pm 0.37$  mmol/L,  $P < 0.05$ ), ALT ( $450.20 \pm 244.12$  U/L vs  $264.56 \pm 48.44$  U/L,  $P < 0.01$ ), AST ( $460.30 \pm 310.13$  U/L vs  $196.11 \pm 52.23$  U/L,  $P < 0.01$ ) and HOMA-IR ( $3.46 \pm 1.16$  vs  $1.07 \pm 0.26$ ,  $P < 0.01$ ) between the model and control groups. Rosiglitazone obviously decreased the level of TG ( $1.27 \pm 0.50$  mmol/L), ALT ( $360.26 \pm 244.37$  U/L), AST ( $300.20 \pm 233.13$  U/L) and HOMR-IR ( $1.44 \pm 0.37$ ) (all  $P < 0.05$ ). The effects were confirmed by histopathology. The mRNA ( $552.40 \pm 268.13$  vs  $215.95 \pm 135.87$ ,  $P < 0.05$ ) and protein content of adiponectin in the rosiglitazone group was higher than that in the model group.

**CONCLUSION:** High-fat diet may induce non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance, and may lead to abnormal increases in aminopherase and blood fat level. Rosiglitazone can improve the fatty liver and insulin resistance induced by high-fat diet. The mechanism may be related to adiponectin.

**Key Words:** Non-alcoholic fatty liver disease; Insulin

**背景资料**  
非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是一种肝组织学改变,与酒精性肝病(ALD)相类似,但无过量饮酒史的临床病理综合征。近年来,NAFLD的发病率不断增高,欧美及日本普通成人NAFLD的患病率为10%-30%,而肥胖者则高达57%-74%。NAFLD现已替代慢性病毒性肝炎和酒精性脂肪性肝病(ALD)成为欧美等发达国家的第一大肝病,在我国也呈快速增长趋势,是健康体检人群肝酶学异常的常见原因,更严重的是其预后不容乐观,28%的患者发生肝硬化,其中半数患者因门脉高压而需肝移植,因此积极治疗NAFLD将有深刻的社会和经济意义,亦是当今研究的热点。

## 研发前沿

目前,用于非酒精性脂肪肝治疗的药物并不多见。原因在于非酒精性脂肪肝的发病机制仍不完全清楚。最近的研究表明,几乎所有的NAFLD患者都存在周围组织和肝脏的胰岛素抵抗,而且不一定伴有糖耐量异常或肥胖,但胰岛素抵抗的严重程度却与NAFLD的病情进展相关。罗格列酮常用于糖尿病患者的胰岛素抵抗的治疗,可明显改善糖尿病患者的胰岛素抵抗。但是该药仍未用于脂肪肝患者胰岛素抵抗的治疗,究其原因,乃缺乏完善的基础研究和大规模的临床实验。因此,此方面的研究也成为近床与基础研究的热点。

resistance; Rosiglitazone; Adiponectin; Real-time fluorescent quantitative RT-PCR; Western blotting

Zhi M, Chen MH, Chen J, Chen WJ, Lang JM. Effect of rosiglitazone on insulin resistance and adiponectin in non-alcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(27): 2869-2874

## 摘要

**目的:** 探讨罗格列酮对高脂饮食所致的非酒精性脂肪肝大鼠模型胰岛素抵抗及脂联素的影响。

**方法:** 30只大鼠随机分为3组,即模型组(高脂饮食+蒸馏水ig),空白对照组(正常饲料+蒸馏水ig)和罗格列酮组[高脂饮食+罗格列酮3 mg/(kg·d)ig]。观察各组血脂、肝功、胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)的变化和各组肝组织HE染色与脂肪特异性的苏丹 染色的变化。采用实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)和免疫印迹(western blot)检测各组肝组织的脂联素水平。

**结果:** 模型组与空白对照组相比,甘油三酯(TG)( $1.51 \pm 0.37$  mmol/L vs  $0.98 \pm 0.51$  mmol/L,  $P < 0.01$ ),总胆固醇(TC)( $2.74 \pm 0.65$  mmol/L vs  $1.71 \pm 0.37$  mmol/L,  $P < 0.05$ ),ALT( $450.20 \pm 244.12$  U/L vs  $264.56 \pm 48.44$  U/L,  $P < 0.01$ ),AST( $460.30 \pm 310.13$  U/L vs  $196.11 \pm 52.23$  U/L,  $P < 0.01$ )和HOMA-IR( $3.46 \pm 1.16$  vs  $1.07 \pm 0.26$ ,  $P < 0.01$ )均显著升高。罗格列酮治疗可使TG( $1.27 \pm 0.50$  mmol/L),ALT( $360.26 \pm 244.37$  U/L),AST( $300.20 \pm 233.13$  U/L)以及HOMA-IR( $1.44 \pm 0.37$ )得到明显改善(均 $P < 0.05$ )。从组织病理学亦可得到证实。肝组织实时荧光定量PCR及免疫印迹显示罗格列酮组的Adiponectin mRNA( $552.40 \pm 268.13$  vs  $215.95 \pm 135.87$ ,  $P < 0.05$ )和蛋白表达均较模型组升高。

**结论:** 高脂饮食可诱导大鼠NAFLD和IR发生,并使肝功、血脂异常升高。罗格列酮可以改善高脂饮食大鼠的脂肪肝及IR情况,可能与Adiponectin缓解IR和NAFLD改善有关。

**关键词:** 非酒精性脂肪肝; 胰岛素抵抗; 罗格列酮; 脂联素; 实时荧光定量聚合酶链式反应; 免疫印迹

邹敏, 陈旻湖, 陈洁, 陈文激, 郎江明. 罗格列酮对高脂饮食诱导非酒精性脂肪肝大鼠胰岛素抵抗及脂联素的影响. *世界华人消化杂志* 2007;15(27):2869-2874

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2869.asp>

## 0 引言

随着人们饮食结构、生活方式的改变,日常膳食中以脂肪为代表的高热量食物成分所占比例明显增加<sup>[1-3]</sup>,使与代谢异常密切相关的非酒精性脂肪肝(non alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的发病率大幅上升,并已成为医学关注和研究的焦点<sup>[4-7]</sup>。目前NAFLD的发病机制仍未阐明,亦缺乏有效的治疗手段。已知NAFLD的发生与胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)密切相关<sup>[8-11]</sup>,而脂联素(adiponectin)与2型糖尿病的胰岛素抵抗可能有密切联系<sup>[12-15]</sup>,因此,我们通过高脂饮食诱导大鼠NAFLD,观察其胰岛素抵抗及adiponectin在肝组织中的表达情况,采用胰岛素增敏剂罗格列酮对其进行干预,观察罗格列酮对NAFLD胰岛素抵抗的治疗效果。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** ♂ Wistar大鼠30只,2级,购自中山大学医学院实验动物中心。体质量 $180 \pm 10$  g,鼠龄4-6 wk,分笼饲养在温度 $22^{\circ}\text{C}$ - $28^{\circ}\text{C}$ 动物室中,明暗各12 h(6 am-6 pm),实验前适应性饲养1 wk,天黑前投食,自由饮水。胆固醇购自上海生工生物有限公司,猪油自制。马来酸罗格列酮(roglitazone)片:葛兰素史克(天津)有限公司生产(批号: 05110012)。血糖、三酰甘油(TG)、胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白-胆固醇(LDL-C)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)测定试剂盒:北京中生生物工程高技术公司产品;RNA提取试剂盒为RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit,购于美国Qiagen公司。RealMasterMix新型荧光定量PCR试剂盒(SYBR)购于Tiangen公司。DNAEngine OPTICON™实时荧光定量PCR仪为MJ Research公司产品。蛋白分析仪为Beckman公司产品。Adiponectin mAb购于美国R&D公司,β-actin mAb购于美国Santa Cruz公司,HRP标记二抗来自武汉博士德, ECL化学发光试剂购于广州展晨公司。大鼠适应性饲养1 wk后分为空白对照组、模型组和罗格列酮组,每组10只,空白对照组喂饲普通饲料(中山大学医学院实验动物中心提供),其蛋白质、脂肪、碳水化合物提供能量分别为21%、19%和60%;模型组<sup>[16]</sup>喂饲高脂饲料(普通饲料加20%猪油和1%胆固醇,中山大学医学院实验动物中心提供),其蛋白质、脂肪、碳水化合物提供能量分别为18%、63%和19%。每

表 1 三组大鼠肝功、血脂及HOMA-IR的水平

分组	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	HOMA-IR
空白对照组	1.71 ± 0.37 <sup>a</sup>	0.98 ± 0.51 <sup>b</sup>	0.64 ± 0.15	0.17 ± 0.09 <sup>b</sup>	264.56 ± 48.44	196.11 ± 52.23	1.07 ± 0.26 <sup>b</sup>
模型组	2.74 ± 0.65	1.51 ± 0.37	0.47 ± 0.16	0.54 ± 0.23	450.20 ± 244.12 <sup>b</sup>	460.30 ± 310.13 <sup>b</sup>	3.46 ± 1.16
罗格列酮组	2.34 ± 0.41 <sup>c</sup>	1.27 ± 0.50 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.16	0.28 ± 0.09 <sup>c</sup>	360.26 ± 244.37 <sup>ac</sup>	300.20 ± 233.13 <sup>ac</sup>	1.44 ± 0.37 <sup>ac</sup>

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

天测定大鼠的摄食量, 每周测定大鼠体质量. 实验开始后, 罗格列酮组每天定时以罗格列酮3 mg/(kg·d)剂量ig. 模型组和空白对照组每日灌等量蒸馏水, 共进行8 wk.

## 1.2 方法

**1.2.1 肝功、血脂及胰岛素(INS)测定** 葡萄糖氧化酶法测定血糖; Gpo-Pap法测定TG; Chod-Pap法测定TC; Ifcc推荐法测定AST、ALT; 放免法测定INS, 均严格按药盒说明书进行检测. 胰岛素抵抗指数(HOMA-IR) = FINS × FBG/22.5.

**1.2.2 HE及苏丹 染色** 取各组大鼠肝脏同一部位固定于40 g/L中性甲醛缓冲液中, 常规切片行HE染色, 光镜下观察. 另取部分肝脏做冰冻切片, 行苏丹III染色, 光镜观察.

**1.2.3 实时荧光定量RT-PCR测定Adiponectin的基因表达** 取肝组织迅速投入液氮中保存, 按照RNeasy<sup>®</sup> Lipid Tissue Mini Kit的说明书提取总RNA,  $A_{280}/A_{260}$  比值均在1.8-2.0之间, 所提取的总RNA经琼脂糖凝胶电泳鉴定, 可见明显的28S, 18S两条区带, 且28S约为18S的2倍, 证明其完整性. -70℃保存待用. RNA先行反转录后, 以SYBR Green I 作为荧光染料, 进行实时定量RT-PCR. Adiponectin的PCR 引物: 5'-TTT CCT ACC ACA TCA CGG TGT A-3'(上游), 5'-TGC ATA GAG TCC ATT GTT GTC C-3'(下游);  $\beta$ -actin的PCR引物: 5'-CGT GCGTGA CAT TAA AGA GAA G-3'(上游), 5'-GGC ATA GAG GTC TT ACG GAT G-3'(下游). 20  $\mu$ L体系中含有Master-Mix(含SYGB, Hotstart Taq酶, dNTPs, Buffer)9  $\mu$ L, 25 mmol/L dNTPs 0.2  $\mu$ L, 25  $\mu$ mol/L的引物各0.5  $\mu$ L, 逆转录产物1  $\mu$ L. 反应条件: 94℃ 2 min; 94℃ 25 s, 58℃ 30 s, 68℃ 30 s, 40 cycles(每个循环后自动读板1次), 68℃延伸5 min, 做55℃-95℃的融解曲线分析, 12℃终止反应. 对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析特异性. 根据绘制的标准曲线得到Adiponectin及 $\beta$ -actin基因表达的相对浓度, 以Adiponectin与 $\beta$ -actin相对浓度的

比值来反映Adiponectin表达量. 每个样品做3个平行管.

**1.2.4 Western blot方法测定Adiponectin的蛋白表达** 常规方法提取组织蛋白, 各样本组织在裂解液(20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 10 g/L Triton, 0.001 g/L leupeptin和1 mmol/L PMSF, pH 7.5)中匀浆, 离心取上清. BCA法蛋白质定量. 取20  $\mu$ L样本组织蛋白, 常规SDS-PAGE电泳, 然后电转到硝酸纤维素膜上. 50 g/L脱脂奶粉封闭. 加入Adiponectin mAb(1 : 2000)或 $\beta$ -actin mAb, 4℃孵育过夜. HRP标记二抗(1 : 2000)孵育, PBST洗脱, ECL化学发光后检测目的蛋白浓度.

**统计学处理** 数据以mean ± SD表示, 组间差异显著性分析采用单因素方差分析.

## 2 结果

**2.1 肝功、血脂及HOMA-IR** 模型组的TG, TC, LDL-C, ALT, AST及HOMA-IR均较空白对照明显升高(*P*<0.05或*P*<0.01), 罗格列酮治疗后, 该组的TC与模型组并无显著性差异, 而TG, ALT, AST以及HOMR-IR得到明显改善(*P*<0.05)(表1).

**2.2 HE及苏丹 染色** 空白对照组肝小叶结构完整, 中央静脉周围有放射状排列的肝细胞索, 窦间隙均匀、清晰, 肝细胞体积较大, 呈多边形, 大圆形核居中, 胞质丰富, 汇管区清晰可辨, 无明显炎细胞浸润(图1-A1). 苏丹III染色后未见明显橙红色染色(图1-A2). 罗格列酮组HE染色可见少量小泡性脂肪变性, 未见明显肝细胞坏死和炎性细胞浸润(图1-B1). 苏丹III染色仅见少量橙红色脂肪小液泡沉积(图1-B2). 模型组肝组织HE染色可见弥漫性肝细胞大泡或小泡性的脂肪变性, 以大泡性变性为主. 肝细胞脂肪变性面积达到2/3以上, 部分肝组织在脂肪变的基础上伴有肝细胞坏死和炎性细胞浸润, 未见明显的肝纤维化(图1-C1). 苏丹III染色后, 同样可见模型组肝组织呈弥散性脂质蓄积, 肝细胞内充满较

**相关报道**  
最近的研究表明, 几乎所有的NAFLD患者都存在周围组织和肝脏的胰岛素抵抗, 而且不一定伴有糖耐量异常或肥胖, 但胰岛素抵抗的严重程度与NAFLD的病情进展相关. 此外, 胰岛素抵抗与NAFLD的预后也可能有关. Perlemuter *et al* 的研究显示, 胰岛素通过上调集落生长因子, 在NAFLD发病机制中起关键作用.



## 应用要点

本文提示,在非酒精性脂肪肝的发病过程中,胰岛素抵抗发挥重要作用,并且Adiponectin的下降可能直接或间接的促进了全身以及局部IR的发生,而罗格列酮可以改善胰岛素抵抗,其原因可能与通过增多Adiponectin从而缓解内脏组织的IR相关,因而提示罗格列酮可以用于非酒精脂肪肝的治疗。

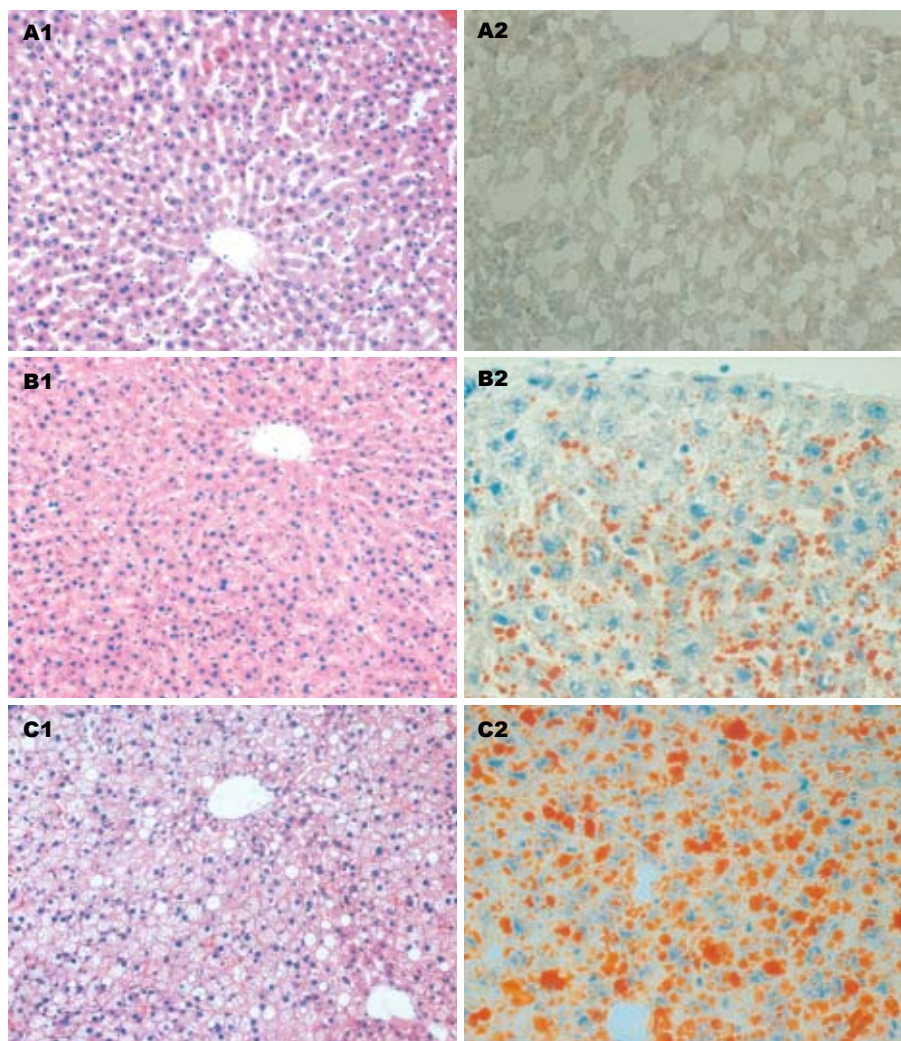


图 1 肝组织的HE( $\times 200$ )及苏丹Ⅲ染色( $\times 400$ ). A1-2:空白对照组; B1-2:罗格列酮组; C1-2:模型组.

表 2 肝组织中Adiponectin的mRNA表达

分组	相对比值
空白对照组	666.12 $\pm$ 273.45 <sup>a</sup>
模型组	215.95 $\pm$ 135.87
罗格列酮组	552.40 $\pm$ 268.13 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 模型组.

大橙红色脂肪液泡(图1-C2).

**2.3 实时荧光定量RT-PCR** 模型组Adiponectin mRNA的表达明显低于空白对照组( $P < 0.05$ ),罗格列酮治疗后,Adiponectin的表达增多( $P < 0.05$ )(表2).

**2.4 Western blot** 模型组Adiponectin的蛋白表达低于空白对照组,罗格列酮治疗后,Adiponectin的表达增多(图2).

### 3 讨论

脂肪肝是各种原因导致的肝脏脂肪蓄积过多的

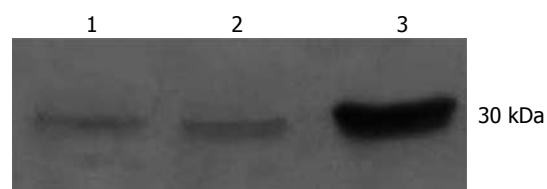


图 2 肝组织中Adiponectin蛋白的表达. 1: 模型组; 2: 罗格列酮组; 3: 空白对照组.

一种病理状态,非酒精性脂肪肝已被认为是源性肝硬化的常见原因,最常见的病因乃高脂饮食导致IR,从而诱发NAFLD的发生<sup>[17]</sup>.建立IR动物模型是研究IR机制的基础.目前IR大鼠模型主要分为3类<sup>[18-22]</sup>:遗传性肥胖模型、特殊药物模型和特殊膳食喂养模型.特殊膳食喂养法主要有高脂肪和高果糖2种饲料,其中高脂肪饲料喂养法因具有可靠性强、饲养方便且价格相对较低等优点常常被研究者采用.高脂饮食使肝脏的TG含量增加,胰岛素抑制肝糖产生的能力降低,肝糖产生和肝糖输出增加,产生IR.当

IR发生后又可加重脂肪肝, 因为IR时胰岛素抑制脂肪组织的脂解作用减弱, 造成脂质外溢增加, 使肝脏脂肪增加. 本实验采用主要为饱和脂肪酸的动物脂肪的高脂饮食饲养Wistar大鼠, 喂养8 wk后, 大鼠的体质量明显增加, 出现高胰岛素、高脂血症, 肝功异常. 肝组织病理学显示弥漫性肝细胞大泡或小泡性的脂肪变性, 以大泡性变性为主. 肝细胞脂肪变性面积达到2/3以上. 同时大鼠的HOMA-IR指数升高, 表明高脂饮食8 wk能成功诱发大鼠NAFLD合并IR.

Adiponectin是目前发现惟一的由WAT分泌的细胞因子<sup>[23-28]</sup>. 当脂肪体积增大时其分泌反而减少. Adiponectin在人体的血浆浓度为5-30 mg/L, 为其他常见激素的3倍, 且女性高于男性, 无昼夜节律的变化. Adiponectin与体质量指数、体脂百分比、血糖及空腹胰岛素水平呈负相关, 与胰岛素敏感性、高密度脂蛋白水平呈正相关. Adiponectin水平在正常人、糖调节受损(IGT)及2型糖尿病患者体内逐渐减少, 且存在显著差异, 发生2型糖尿病后脂联素进一步下降, Adiponectin水平的降低与胰岛素敏感性的下降相平行<sup>[29-32]</sup>. 本实验显示NAFLD模型大鼠IR明显, 并随IR的加重而加重. 而NAFLD组Adiponectin水平降低, 且与胰岛素敏感性的下降相平行, 提示高脂饮食导致大鼠体内脂肪细胞的增多和分泌功能失调. 其中, Adiponectin的下降可能直接或间接的促进了全身以及局部IR的发生.

噻唑烷二酮类(Thiazolidinediones, TZDs)药物的作用机制是降低脂肪细胞游离脂肪酸(FFA)和肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )的释放, 增加葡萄糖的利用, 同时提高胰岛素的敏感性, 调节血糖和FFA的水平, 能抑制脂质过氧化和TNF- $\alpha$ 的活性, 并能选择性的将脂肪从内脏转移到皮下组织. 代表性的药物有曲格列酮、罗格列酮和匹格列酮<sup>[33]</sup>. Caldwell *et al*<sup>[34]</sup>应用曲格列酮治疗非酒精性脂肪肝患者证明有确切的疗效, 但由于曲格列酮可诱导致死性的肝毒性, 已经撤出市场. Belfort *et al*<sup>[35]</sup>给糖耐量减低或2型糖尿病, 经活检证实患非酒精性脂肪性肝炎的患者在低卡路里饮食的基础上po匹格列酮每天45 mg, 共计6 mo. 患者TG、糖耐量及转氨酶明显改善, 肝脏炎症程度也明显减轻, 但是该药长期使用的安全性需要进一步临床研究. 罗格列酮是PPAR- $\gamma$ 激动剂, PPAR- $\gamma$ 在脂肪组织表达和调控的特异性最强, 对脂肪细胞的分化和参与糖、脂代谢

酶的基因有调控作用. Yamauchi *et al*<sup>[36]</sup>在动物试验中发现罗格列酮能明显减少肝脏、肌肉等非脂肪组织的脂肪堆积, 减轻IR, 与本实验的结果类似. 值得一提的是罗格列酮组大鼠体质量高于正常对照组, 但是肝湿重和肝脏在体质量中所占的比例却明显下降, 提示罗格列酮还可促使脂肪重新分布, 特别是减少内脏脂肪蓄积, 这可能是通过增多Adiponectin从而缓解肝脏等内脏组织的IR完成的.

#### 4 参考文献

- 1 Canbay A, Bechmann L, Gerken G. Lipid metabolism in the liver. *Z Gastroenterol* 2007; 45: 35-41
- 2 Savransky V, Bevans S, Nanayakkara A, Li J, Smith PL, Torbenson MS, Polotsky VY. Chronic intermittent hypoxia causes hepatitis in a mouse model of diet-induced fatty liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G871-G871
- 3 Gasbarrini G, Vero V, Miele L, Forgiione A, Hernandez AP, Greco AV, Gasbarrini A, Grieco A. Nonalcoholic fatty liver disease: defining a common problem. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2005; 9: 253-259
- 4 Yip WW, Burt AD. Alcoholic liver disease. *Semin Diagn Pathol* 2006; 23: 149-160
- 5 Cave M, Deaciuc I, Mendez C, Song Z, Joshi-Barve S, Barve S, McClain C. Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. *J Nutr Biochem* 2007; 18: 184-195
- 6 Neuschwander-Tetri BA. Fatty liver and the metabolic syndrome. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23: 193-198
- 7 Saadeh S. Nonalcoholic Fatty liver disease and obesity. *Nutr Clin Pract* 2007; 22: 1-10
- 8 Imai Y, Varela GM, Jackson MB, Graham MJ, Crooke RM, Ahima RS. Reduction of hepatosteatosis and lipid levels by an adipose differentiation-related protein antisense oligonucleotide. *Gastroenterology* 2007; 132: 1947-1954
- 9 Sakurai M, Takamura T, Ota T, Ando H, Akahori H, Kaji K, Sasaki M, Nakanuma Y, Miura K, Kaneko S. Liver steatosis, but not fibrosis, is associated with insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 2007; 42: 312-317
- 10 Raman M, Allard J. Non alcoholic fatty liver disease: a clinical approach and review. *Can J Gastroenterol* 2006; 20: 345-349
- 11 Tarantino G, Conca P, Coppola A, Vecchione R, Di Minno G. Serum concentrations of the tissue polypeptide specific antigen in patients suffering from non-alcoholic steatohepatitis. *Eur J Clin Invest* 2007; 37: 48-53
- 12 Lara-Castro C, Fu Y, Chung BH, Garvey WT. Adiponectin and the metabolic syndrome: mechanisms mediating risk for metabolic and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2007; 18: 263-270
- 13 Goralski KB, Sinal CJ. Type 2 diabetes and cardiovascular disease: getting to the fat of the matter. *Can J Physiol Pharmacol* 2007; 85: 113-132
- 14 Oh DK, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin in health and disease. *Diabetes Obes Metab* 2007; 9:

#### 名词解释

1 非酒精性脂肪性肝病(NAFLD): 是指除外酒精和其他明确的损肝因素所致的, 以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为主要特征的临床病理综合征

2 脂联素(Adiponectin): 主要由脂肪细胞分泌的一种蛋白质. 1995年首先从鼠的脂肪细胞分离出来. 相对分子质量为30 kDa, 故又名ACRP30, 是脂肪组织中最多的转录产物, 也是唯一的随体脂含量增多而减少的脂肪因子.

## 同行评价

本文探讨了罗格列酮对高脂饮食引起的NAFLD的影响, 选题较好, 实验方法恰当, 结果可靠, 图片清晰, 结论可信, 有一定的科学性和临床意义。

- 282-289
- 15 Hoteit MA, Anania FA. Treatment of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Gastroenterol Rep* 2007; 9: 47-53
- 16 Xu G, Huang X, Qiu L, Wu J, Hu Y. Mechanism study of chitosan on lipid metabolism in hyperlipidemic rats. *Asia Pac J Clin Nutr* 2007; 16 Suppl 1: 313-317
- 17 Marchesini G, Babini M. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Minerva Cardioangiol* 2006; 54: 229-239
- 18 Ota T, Takamura T, Kurita S, Matsuzawa N, Kita Y, Uno M, Akahori H, Misu H, Sakurai M, Zen Y, Nakanuma Y, Kaneko S. Insulin resistance accelerates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2007; 132: 282-293
- 19 Svegliati-Baroni G, Candelaresi C, Saccomanno S, Ferretti G, Bachetti T, Marzoni M, De Minicis S, Nobili L, Salzano R, Omenetti A, Pacetti D, Sigmund S, Benedetti A, Casini A. A model of insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis in rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  and n-3 polyunsaturated fatty acid treatment on liver injury. *Am J Pathol* 2006; 169: 846-860
- 20 Zou Y, Li J, Lu C, Wang J, Ge J, Huang Y, Zhang L, Wang Y. High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Life Sci* 2006; 79: 1100-1107
- 21 Vivekanandan P, Gobianand K, Priya S, Vijayalakshmi P, Karthikeyan S. Protective effect of picroliv against hydrazine-induced hyperlipidemia and hepatic steatosis in rats. *Drug Chem Toxicol* 2007; 30: 241-252
- 22 Sandhya VG, Rajamohan T. Beneficial effects of coconut water feeding on lipid metabolism in cholesterol-fed rats. *J Med Food* 2006; 9: 400-407
- 23 Woods SC. Role of the endocannabinoid system in regulating cardiovascular and metabolic risk factors. *Am J Med* 2007; 120: S19-25
- 24 Trayhurn P. Adipocyte biology. *Obes Rev* 2007; 8 Suppl 1: 41-44
- 25 Seematter G, Tappy L. Effect of nutritional support on glucose control. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10: 210-214
- 26 Anghel SI, Bedu E, Delucinge Vivier C, Descombes P, Desvergne B, Wahli W. Adipose tissue integrity as a prerequisite for systemic energy balance : A critical role for PPAR $\gamma$ . *J Biol Chem* 2007
- 27 Saito K, Arata S, Hosono T, Sano Y, Takahashi K, Choi-Miura NH, Nakano Y, Tobe T, Tomita M. Adiponectin plays an important role in efficient energy usage under energy shortage. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1761: 709-716
- 28 Pravdova E, Fickova M. Alcohol intake modulates hormonal activity of adipose tissue. *Endocr Regul* 2006; 40: 91-104
- 29 Derosa G, Fogari E, Cicero AF, D'Angelo A, Ciccarelli L, Piccinni MN, Pricolo F, Salvadeo SA, Gravina A, Ferrari I, Fogari R. Blood pressure control and inflammatory markers in type 2 diabetic patients treated with pioglitazone or rosiglitazone and metformin. *Hypertens Res* 2007; 30: 387-394
- 30 Wu HS, Yu JH, Li YY, Yang YS, He QJ, Lou YJ, Ji RY. Insulin-sensitizing effects of a novel  $\alpha$ -methyl- $\alpha$ -phenoxylpropionate derivative in vitro. *Acta Pharmacol Sin* 2007; 28: 417-422
- 31 Majuri A, Santaniemi M, Rautio K, Kunnari A, Vartiainen J, Ruokonen A, Kesaniemi YA, Tapanainen JS, Ukkola O, Morin-Papunen L. Rosiglitazone treatment increases plasma levels of adiponectin and decreases levels of resistin in overweight women with PCOS: a randomized placebo-controlled study. *Eur J Endocrinol* 2007; 156: 263-269
- 32 Velasquez MT, Bhatthena SJ. Role of dietary soy protein in obesity. *Int J Med Sci* 2007; 4: 72-82
- 33 Chavez-Tapia NC, Barrientos-Gutierrez T, Tellez-Avila FI, Sanchez-Avila F, Montano-Reyes MA, Uribe M. Insulin sensitizers in treatment of nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7826-7831
- 34 Caldwell SH, Hespdenheide EE, Redick JA, Iezzoni JC, Battle EH, Sheppard BL. A pilot study of a thiazolidinedione, troglitazone, in nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 519-525
- 35 Belfort R, Harrison SA, Brown K, Darland C, Finch J, Hardies J, Balas B, Gastaldelli A, Tio F, Pulcini J, Berria R, Ma JZ, Dwivedi S, Havranek R, Fincke C, DeFronzo R, Bannayan GA, Schenker S, Cusi K. A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2006; 355: 2297-2307
- 36 Yamauchi T, Waki H, Kamon J, Murakami K, Motojima K, Komeda K, Miki H, Kubota N, Terauchi Y, Tsuchida A, Tsuboyama-Kasaoka N, Yamauchi N, Ide T, Hori W, Kato S, Fukayama M, Akanuma Y, Ezaki O, Itai A, Nagai R, Kimura S, Tobe K, Kagechika H, Shudo K, Kadowaki T. Inhibition of RXR and PPAR $\gamma$  ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2001; 108: 1001-1013

编辑 何燕 电编 何基才



# 胃肠道平滑肌起搏电流产生机制的研究进展

张 扬, 韩燕飞, 许文燮

张扬, 韩燕飞, 许文燮, 上海交通大学医学院生理学教研室  
上海市 200240  
国家自然科学基金资助项目, No. 30360031  
通讯作者: 许文燮, 200240, 上海市东川路800号, 上海交通大学  
医学院生理学教研室. wenxiexu@sjtu.edu.cn  
电话: 021-34205639  
收稿日期: 2006-11-30 修回日期: 2007-09-13

## Progress of research on the mechanism of pacemaker currents generated by gastrointestinal smooth muscle

Yang Zhang, Yan-Fei Han, Wen-Xie Xu

Yang Zhang, Yan-Fei Han, Wen-Xie Xu, Department of Physiology, Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30360031  
Correspondence to: Professor Wen-Xie Xu, Department of Physiology, Medical College of Shanghai Jiaotong University, 800 Dongchuan Road, Shanghai 200240, China. wenxiexu@sjtu.edu.cn  
Received: 2006-11-30 Revised: 2007-09-13

### Abstract

More and more evidence indicates that interstitial cells of Cajal are pacemaker cells that generate slow waves and spontaneous rhythmic contractions in the gastrointestinal tract. Although research on the pacemaking mechanism has progressed rapidly, there are some differing results. This paper reviews research progress of the mechanism of pacemaker currents and their propagation.

**Key Words:** Interstitial cells of Cajal; Pacemaker currents; Non-selective cation channels; IP<sub>3</sub>-induced calcium release; Mitochondria

Zhang Y, Han YF, Xu WX. Progress of research on the mechanism of pacemaker currents generated by gastrointestinal smooth muscle. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(27): 2875-2879

### 摘要

越来越多的研究表明, Cajal间质细胞是

胃肠道平滑肌慢波电位和自发性节律性收缩活动的起搏细胞. 关于Cajal间质细胞起搏电流产生机制的研究近来进展很快, 但仍存在一些分歧. 本文就目前关于起搏电流的产生及传播机制的研究进展作一综述.

**关键词:** Cajal间质细胞; 起搏电流; 非选择性阳离子通道; IP<sub>3</sub>介导的钙释放; 线粒体

张扬, 韩燕飞, 许文燮. 胃肠道平滑肌起搏电流产生机制的研究进展. *世界华人消化杂志* 2007; 15(27): 2875-2879  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2875.asp>

### 0 引言

即使是在缺少任何刺激的情况下, 在胃肠道的许多区域内, 都可以记录到慢波和节律性的收缩活动. 因此, 慢波的存在是胃肠平滑肌自身所具有的特征性反应. 而近年的研究结果表明, 存在于胃肠道内的Cajal间质细胞(interstitial cell of Cajal, ICC)才是平滑肌慢波活动的起搏细胞<sup>[1-3]</sup>. 根据ICC在胃肠道内分布位置的不同, 可以将ICC分为以下四类<sup>[4-5]</sup>: 肌层间ICC(inter-muscular layer, ICC-MY)位于环形肌和纵形肌之间; 肌间ICC(intramuscular ICC, ICC-IM)位于肌束内; 深肌层内ICC(deep muscular plexus ICC, ICC-DMP)位于环形肌深肌层内的ICC-IM; 黏膜下ICC(submucosal ICC, ICC-SM)位于黏膜下层. ICC-MY在胃、小肠和结肠均有分布, 而ICC-DMP只存在于小肠, ICC-SM只存在于结肠, 而ICC-IM的分布却表现出较强的区域性差异.

### 1 胃肠平滑肌起搏电流起源于ICC-MY

证明在胃肠平滑肌产生节律性慢波的过程中ICC-MY起起搏细胞作用的最直接的证据由基因突变小鼠得到. 小鼠W基因表示皮毛颜色为白色的基因, 他与决定ICC发育的c-kit基因位于同一基因座. 纯合子的W<sup>v</sup>/W<sup>v</sup>突变为致死性突变, 而杂合子W/W<sup>v</sup>可以存活, 然而ICC的发育受到影响, ICC-MY发育与起搏活动有着密切关系<sup>[6]</sup>. 在W/W<sup>v</sup>小鼠的小肠ICC-MY缺失, 而ICC-

**背景资料**  
众所周知, 慢波是消化道平滑肌产生自动节律性运动的起源, 长期以来消化道纵行肌被认为是慢波的起源, 近年来的研究, 已经普遍接受Cajal间质细胞为产生自律性的起搏细胞, 但其产生起搏电流的机制还存在分歧, 本文重点综述了Cajal间质细胞起搏电流产生机制的研究进展.

### 相关报道

目前关于Cajal间质细胞的研究可以归纳为四个方面:一是胃肠动力障碍性疾病与ICC形态学和功能改变;二是Cajal间质细胞与消化道肿瘤关系的研究;三是Cajal间质细胞起搏电流产生与传播机制;Cajal间质细胞与神经传递关系研究。

IM发育正常<sup>[1]</sup>,与野生型不同,杂合子W/WV鼠的小肠记录不到慢波<sup>[1-2,7]</sup>。在豚鼠的胃窦组织原位记录表明,ICC-MY所在的区域可以记录到大幅度、长时程起搏电流,而这种起搏电流频率与相邻环行肌和纵行肌记录到的慢波频率一致<sup>[8]</sup>。在上述实验中,ICC-MY产生的起搏去极化电位,总是先于环行肌和纵行肌的慢波去极化电位。在分离的ICC-MY,可以记录到自发性的电活动,然而分离的平滑肌细胞却记录不到这种电活动<sup>[9]</sup>。上述结果表明,ICC-MY是起搏电流的启动者,而ICC-IM与相邻的肌细胞、神经元以电耦联形式存在。因此,ICC-IM可以参与神经-肌肉信息传递过程并把信息传给相邻的肌细胞<sup>[10-11]</sup>。

## 2 起搏电位的电生理学特性

在进行组织原位记录时,在ICC-MY所在的区域记录到的起搏电位由具有不同药理学特性的两时相组成。第一相,电位的快速上升期,持续时间约1 s,当细胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度降低或者应用镍离子可以使第一相消失;第二相,也可称为平台期,在胃窦部可以持续5-10 s,而在小肠仅持续1 s<sup>[12-13]</sup>。在胞内钙泵抑制剂,4-氯苯氧乙酸(CPA)、氯通道抑制剂(DIDS)、咖啡因(Caffeine)存在时,第二相消失,但他却不受胞外钙离子浓度的影响<sup>[12-14]</sup>。要想将ICC-MY产生的这种自发性活动消失,必需将这两相全部阻断才能实现<sup>[12-13]</sup>。这表明,起搏电流在生理条件下可能是由两种独立而又相互协调的机制共同产生的。在所有被检测的ICC-MY上均可记录到自发性、持续性、小幅度的去极化电位,即单位电位(unitary potential)<sup>[13-14]</sup>。组织原位记录表明,单位电位的产生是因为 $\text{Ca}^{2+}$ 从胞内钙库释放,直接激活了ICC-MY膜上的离子选择性通道<sup>[12]</sup>。在胃平滑肌,两个起搏电位之间的间隔期,单位电位发放频率逐渐增加,直至达到可以形成下一个起搏电位第一相的条件。第一相的形成,可以使ICC网络去极化,加速了单位电位的发放频率,而高频发放的单位电位构成了起搏电位的第二相。当单位电位发放频率减慢时,平台期消失。这样的步骤重复进行,起搏单位就不断的形成<sup>[14-15]</sup>。因此,可以认为单位电位低频发放构成了起搏电位的第一相,而高频发放形成了起搏电位的第二相。然而,起搏电位之间的间隔并非均一,当两个起搏电位间隔期较短时,第二个起搏电

位平台期持续时间也较短,反之,两个起搏电位间隔较长时,第二个起搏电位平台期持续时间也较长。有的研究者认为,这种现象可能是因为胞内钙库在起搏电位间隔期间需要重新充盈,而胞内钙库的充盈量又会影响到起搏电位持续时间,所以胞内钙库可释放的钙离子量与起搏电位持续时间成正比<sup>[16]</sup>。但每一个起搏电位无论他持续时间是长是短,复极化所需要的时间却是一致的。

## 3 起搏电流产生机制

尽管ICC-MY具有自发性的起搏活动已经是不争的事实,但不同的实验室对于ICC-MY的起搏机制,却给出了不同的解释。关于ICC-MY产生起搏电流的机制目前存在两种学说,分别是钙激活氯通道(calcium-activated chloride channel)学说和低钙敏感的非选择性阳离子通道(low calcium-sensitive non-selective cation channel)学说。3.1  $\text{Ca}^{2+}$ 激活 $\text{Cl}^-$ 通道学说 虽然氯通道通常通过被动扩散和容积调节起稳定可兴奋细胞膜电位的作用,然而,目前被认为在可兴奋细胞电生理特性方面起关键而特殊的作用<sup>[17]</sup>。在平滑肌细胞,尤其ICC,氯离子平衡电位比静息电位要大,说明氯通道开放可以使膜电位去极化。药理学分析表明,细胞内游离 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度增高时被激活的 $\text{Cl}^-$ 选择性通道参与起搏电流的形成过程。当胞外 $\text{Cl}^-$ 浓度降低时,平台期的电位幅度可以瞬时增加,而胞外 $\text{Cl}^-$ 浓度长时间维持在低水平时,会导致胞内 $\text{Cl}^-$ 浓度的下降,平台期会被抑制,就如同应用 $\text{Cl}^-$ 通道阻断剂后所观察到的结果一样<sup>[12,18]</sup>。在小鼠小肠新鲜分离的ICC上也证实了 $\text{Cl}^-$ 选择性通道参与起搏电流的形成过程<sup>[19]</sup>。所以,单位电位的产生可能由于胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度升高后激活了胞膜上的 $\text{Cl}^-$ 选择性通道,驱动胞内 $\text{Cl}^-$ 外流造成。胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度升高激活的 $\text{Cl}^-$ 选择性通道既参与起搏电位第一相的形成,也参与起搏电位第二相的形成。最近的研究表明,在豚鼠胃窦环行肌钙激活的氯电流参与慢波产生过程<sup>[20]</sup>。在小鼠小肠培养的ICC上通过全细胞和单通道膜片钳也观察到内向整流性氯电流(inward rectifying chloride current),并认为与起搏活动有关<sup>[21]</sup>。

虽然,支持上述观点的研究者们都认同 $\text{Ca}^{2+}$ 从 $\text{IP}_3$ 依赖性钙库的释放、线粒体以及 $\text{Ca}^{2+}$ 激活的 $\text{Cl}^-$ 选择性通道引起的内向电流均参与起搏电流的形成过程,但对于上述三者在起搏

活动中各自发挥的作用及先后的时序关系却未达成共识。

**3.2 非选择性阳离子通道学说** 主张ICC起搏电流产生与非选择性阳离子通道有关的学者们认为, ICC起搏电流是由细胞内IP<sub>3</sub>受体介导的钙库、线粒体和细胞膜非选择性阳离子通道三个要素组成的起搏单位(pacemaker unit)共同完成的。研究结果表明<sup>[22-25]</sup>, 在IP<sub>3</sub>受体基因缺失的基因突变鼠, 平滑肌的慢波活动消失; 在野生型小鼠ICC上IP<sub>3</sub>受体高表达, 在分布上与线粒体和胞膜相邻接, 应用IP<sub>3</sub>受体阻断剂可以抑制起搏电流的形成, 表明IP<sub>3</sub>受体介导的钙库参与了起搏电流的形成过程。他们认为, 当ICC-MY产生起搏电流时, 首先IP<sub>3</sub>依赖性钙库释放钙引起胞浆局部区域内Ca<sup>2+</sup>浓度升高, 胞内高钙刺激线粒体吸收Ca<sup>2+</sup>, 线粒体内Ca<sup>2+</sup>浓度的摆动频率与起搏电流的形成频率一致, 而且线粒体内Ca<sup>2+</sup>浓度的升高总是先于起搏电流的出现。当用高浓度Ca<sup>2+</sup>溶液透析入ICC胞内时, 在ICC上记录到了持续性的外向性电流, 而不是内向性的电流, 相反, 低浓度Ca<sup>2+</sup>溶液却记录到了持续性的内向非选择性非电压依赖性阳离子电流<sup>[26]</sup>。实验表明, 应用药物干预自发性的内向性电流时, 培养的ICC和完整的平滑肌组织自发电活动均消失, 而且在不同物种的胃肠平滑肌均可以得到同样的结果<sup>[22]</sup>。采用膜片钳不同钳制模式观察到, ICC单通道周期性开放频率与起搏电流形成频率一致, 并检测到单通道的电导为13.5 pS; 钙调蛋白(calmodulin)可抑制这一通道的活性, 而钙调蛋白抑制剂则可使通道的活性增强。分子生物学研究结果表明, 该通道与TRPC4类通道具有较多的共性, 都可以被胞内低Ca<sup>2+</sup>浓度所激活或被钙调蛋白抑制剂激活, 产生非选择性阳离子电流, 只是表达在HEK293细胞表面的TRPC4的单通道的电导为17.5 pS<sup>[27]</sup>。因此, 这种在ICC-MY上检测到的细胞内低钙敏感的非选择性阳离子通道的激活被认为是形成ICC起搏电流必需的通道<sup>[28-29]</sup>。值得注意的是, 肌浆网上不仅有IP<sub>3</sub>受体诱导的钙库也有Ryanodine受体诱导的钙库, 用Ryanodine受体诱导钙释放的抑制剂可以降低胞内钙离子浓度波动幅度和频率。所以, 也有学者认为, Ryanodine受体和IP<sub>3</sub>受体诱导的钙库均参与胞内钙离子浓度波动形成的起搏活动<sup>[30-31]</sup>。

上述两种离子通道的激活机制与ICC产生起搏电流的机制自然出现了一些分歧。主张低钙敏感的非选择性阳离子通道学说的学者们对

于Ca<sup>2+</sup>激活Cl<sup>-</sup>选择性通道参与起搏电流形成提出了一些疑议: (1)关于Cl<sup>-</sup>通道阻断剂, 他们认为很可能是非特异性作用。因为, 在降低胞内Ca<sup>2+</sup>浓度时, Cl<sup>-</sup>通道阻断剂也可以阻断非选择性阳离子通道的内向电流<sup>[26]</sup>。因此, 利用Cl<sup>-</sup>通道阻断剂很难正确区分非选择性阳离子电流和钙激活Cl<sup>-</sup>电流。另外, 当胞内Ca<sup>2+</sup>浓度升高时, 并没有记录到内向性的电流。(2)通过降低胞外Cl<sup>-</sup>浓度造成胞内外Cl<sup>-</sup>浓度梯度降低时引起的起搏电流幅度变化, 是支持Ca<sup>2+</sup>激活Cl<sup>-</sup>选择性通道参与起搏电流形成的证据, 他们也持反对意见。他们认为, 胞外Cl<sup>-</sup>浓度降低会使Cl<sup>-</sup>的平衡电位向0 mV靠近, 促进胞内Cl<sup>-</sup>外流, 会导致起搏电流幅度增大。迄今为止, 没有人实际测量过胞内外Cl<sup>-</sup>浓度变化对ICC起搏活动产生什么影响。因此, 认为Cl<sup>-</sup>通道在起搏电流形成中的作用还需进一步深入研究。

#### 4 起搏电流传播机制

ICC具有产生起搏活动的的能力是毋庸置疑的。ICC与平滑肌细胞之间电耦联的存在, 使得ICC产生的起搏电流可以传播到平滑肌上, 通过平滑肌细胞上存在的多种电压依赖性离子通道产生被动性兴奋, 即形成慢波, 最终引发平滑肌自发性收缩<sup>[15]</sup>。然而, 在胃肠组织慢波可以长距离传播却不会衰减, 表明慢波的传播是一种再生性的传播<sup>[33]</sup>。研究结果表明, 平滑肌细胞不存在形成慢波再生性传播所必需的相应离子通道或细胞内机制<sup>[33]</sup>。其次, 缺失了ICC网络的区域, 慢波无法传播或者传播幅度衰减<sup>[34]</sup>。这些结果表明, 慢波可以长距离传播却不会衰减的原因是因为起搏电流在ICC网络内传播的结果。在ICC网络内每一个ICC细胞都具有固有的自发性产生起搏电流的能力。因此, 起搏电流的传播可以看做是ICC网络内每一个起搏单位自发性活动的结果。由于初始起搏细胞的去极化激活了相邻ICC的起搏单位。其可能的机制为<sup>[35]</sup>: 在起搏单位的间隔期, 足够量的钙离子经电压依赖性的离子通道流入与初始起搏细胞相邻的ICC细胞, 激活了IP<sub>3</sub>依赖性的钙库, 引起钙离子释放。而IP<sub>3</sub>依赖性钙库的激活, 既可以受胞内IP<sub>3</sub>浓度变化的调节, 也可以受胞内钙离子浓度变化的调节<sup>[35]</sup>。因此, 电压依赖性钙离子的流入引起胞内钙离子浓度变化, 影响ICC网络内与初始起搏细胞相邻ICC兴奋性完成起搏电流的传播过程。然而, 这种钙离子浓度的变化只局限于起搏单位区域内, 而不会引起整个胞质内钙离子浓度的变化。在豚鼠的胃窦组织, 用荧光标记法记

**应用要点**  
本文对ICC临床和基础研究提供有价值的信息, 有助于了解Cajal间质细胞起搏电流产生和传播机制相关的基本理论和趋势。

### 创新盘点

本文的主要创新点是比较了目前关于Cajal间质细胞产生起搏电流机制的两个主要学派的观点。一是起波电流与低钙敏感的非选择性阳离子电流关系；二是Cajal间质细胞与钙敏感氯电流和内向整流性氯电流的关系。

录胞内钙离子浓度变化时,可以记录到胞内钙离子浓度波动,最先在ICC-MY胞内产生,随后ICC-IM与平滑肌细胞内的钙离子波动同时出现<sup>[36]</sup>。实验表明<sup>[37]</sup>,L-型钙离子通道抑制剂并不能完全阻断起搏波的传播,说明除了L-型钙离子通道外还存在着其他可以传播起搏波的离子通道。在狗结肠新鲜分离的ICC,小鼠小肠、结肠培养的ICC,检测到了与起搏电流传播所必需的电压依赖性钙离子通道。这种钙通道只是部分被双氢吡啶类药物抑制,因此,称双氢吡啶抵抗电压依赖性钙电流,他与平滑肌的L-型钙离子通道具有不同的动力学特点,但他的分子结构尚不清楚。目前研究对ICC参与胃肠道神经传递作用引起关注,从形态学上观察到ICC-MY分布在肌间神经丛周围主要负责产生起搏电流,而ICC-IM分布在肌层内并兴奋性和抑制性神经末梢部位分布密度很高,提示,ICC-IM在胃肠平滑肌神经传递中起重要的作用<sup>[10-11,38]</sup>。

### 5 参考文献

- 1 Ward SM, Burns AJ, Torihasi S, Sanders KM. Mutation of the proto-oncogene c-kit blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. *J Physiol* 1994; 480: 91-97
- 2 Huizinga JD, Thuneberg L, Kluppel M, Malysz J, Mikkelsen HB, Bernstein A. W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* 1995; 373: 347-349
- 3 Lee JC, Thuneberg L, Berezin I, Huizinga JD. Generation of slow waves in membrane potential is an intrinsic property of interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol* 1999; 277: G409-G423
- 4 Sanders KM. A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 1996; 111: 492-515
- 5 Sanders KM, Ordog T, Koh SD, Torihasi S, Ward SM. Development and plasticity of interstitial cells of Cajal. *Neurogastroenterol Motil* 1999; 11: 311-338
- 6 Beckett EA, Ro S, Bayguinov Y, Sanders KM, Ward SM. Kit signaling is essential for development and maintenance of interstitial cells of Cajal and electrical rhythmicity in the embryonic gastrointestinal tract. *Dev Dyn* 2007; 236: 60-72
- 7 Nakagawa T, Misawa H, Nakajima Y, Takaki M. Absence of peristalsis in the ileum of W/W(V) mutant mice that are selectively deficient in myenteric interstitial cells of Cajal. *J Smooth Muscle Res* 2005; 41: 141-151
- 8 Hirst GD, Edwards FR. Generation of slow waves in the antral region of guinea-pig stomach--a stochastic process. *J Physiol* 2001; 535: 165-180
- 9 Tokutomi N, Maeda H, Tokutomi Y, Sato D, Sugita M, Nishikawa S, Nishikawa S, Nakao J, Imamura T, Nishi K. Rhythmic Cl<sup>-</sup> current and physiological roles of the intestinal c-kit-positive cells. *Pflugers Arch* 1995; 431: 169-177
- 10 Ward SM, Sanders KM. Involvement of intramuscular interstitial cells of Cajal in neuroeffector transmission in the gastrointestinal tract. *J Physiol* 2006; 576: 675-682
- 11 Iino S, Horiguchi K. Interstitial cells of cajal are involved in neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Acta Histochem Cytochem* 2006; 39: 145-153
- 12 Kito Y, Fukuta H, Suzuki H. Components of pacemaker potentials recorded from the guinea pig stomach antrum. *Pflugers Arch* 2002; 445: 202-217
- 13 Kito Y, Suzuki H. Properties of pacemaker potentials recorded from myenteric interstitial cells of Cajal distributed in the mouse small intestine. *J Physiol* 2003; 553: 803-818
- 14 Hirst GD, Edwards FR. Generation of slow waves in the antral region of guinea-pig stomach--a stochastic process. *J Physiol* 2001; 535: 165-180
- 15 Dickens EJ, Hirst GD, Tomita T. Identification of rhythmically active cells in guinea-pig stomach. *J Physiol* 1999; 514: 515-531
- 16 Kito Y, Suzuki H. Electrophysiological properties of gastric pacemaker potentials. *J Smooth Muscle Res* 2003; 39: 163-173
- 17 Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebek AA. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* 2002; 82: 503-568
- 18 Large WA, Wang Q. Characteristics and physiological role of the Ca(2+)-activated Cl<sup>-</sup> conductance in smooth muscle. *Am J Physiol* 1996; 271: C435-C454
- 19 Ward SM, Ordog T, Koh SD, Baker SA, Jun JY, Amberg G, Monaghan K, Sanders KM. Pacemaking in interstitial cells of Cajal depends upon calcium handling by endoplasmic reticulum and mitochondria. *J Physiol* 2000; 525: 355-361
- 20 Hotta A, Kito Y, Suzuki H. The effects of flufenamic acid on spontaneous activity of smooth muscle tissue isolated from the guinea-pig stomach antrum. *J Smooth Muscle Res* 2005; 41: 207-220
- 21 Zhu Y, Mucci A, Huizinga JD. Inwardly rectifying chloride channel activity in intestinal pacemaker cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G809-G821
- 22 Sanders KM, Koh SD, Ordog T, Ward SM. Ionic conductances involved in generation and propagation of electrical slow waves in phasic gastrointestinal muscles. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16 Suppl 1: 100-105
- 23 Nakamura E, Kito Y, Fukuta H, Yanai Y, Hashitani H, Yamamoto Y, Suzuki H. Cellular mechanism of the generation of spontaneous activity in gastric muscle. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 2004; 123: 141-148
- 24 Boddy G, Bong A, Cho W, Daniel EE. ICC pacing mechanisms in intact mouse intestine differ from those in cultured or dissected intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G653-G662
- 25 Urayama K, Shimada K. Future of antibiotic therapy in various medical fields. 1. Internal medicine. c. Biliary tract infections. *Nippon Rinsho* 1984; 42: 573-575
- 26 Koh SD, Jun JY, Kim TW, Sanders KM. A Ca(2+)-inhibited non-selective cation conductance contributes to pacemaker currents in mouse interstitial cell of Cajal. *J Physiol* 2002; 540: 803-814
- 27 Walker RL, Koh SD, Sergeant GP, Sanders KM, Horowitz B. TRPC4 currents have properties similar to the pacemaker current in interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 283: C1637-C1645
- 28 Thomsen L, Robinson TL, Lee JC, Faraway LA, Hughes MJ, Andrews DW, Huizinga JD. Interstitial cells of Cajal generate a rhythmic pacemaker

- current. *Nat Med* 1998; 4: 848-851
- 29 Koh SD, Sanders KM, Ward SM. Spontaneous electrical rhythmicity in cultured interstitial cells of cajal from the murine small intestine. *J Physiol* 1998; 513: 203-213
- 30 Aoyama M, Yamada A, Wang J, Ohya S, Furuzono S, Goto T, Hotta S, Ito Y, Matsubara T, Shimokata K, Chen SR, Imaizumi Y, Nakayama S. Requirement of ryanodine receptors for pacemaker  $Ca^{2+}$  activity in ICC and HEK293 cells. *J Cell Sci* 2004; 117: 2813-2825
- 31 Liu HN, Ohya S, Wang J, Imaizumi Y, Nakayama S. Involvement of ryanodine receptors in pacemaker  $Ca^{2+}$  oscillation in murine gastric ICC. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328: 640-646
- 32 Horiguchi K, Semple GS, Sanders KM, Ward SM. Distribution of pacemaker function through the tunica muscularis of the canine gastric antrum. *J Physiol* 2001; 537: 237-250
- 33 Ordog T, Ward SM, Sanders KM. Interstitial cells of cajal generate electrical slow waves in the murine stomach. *J Physiol* 1999; 518: 257-269
- 34 Ward SM, Baker SA, de Faoite A, Sanders KM. Propagation of slow waves requires  $IP_3$  receptors and mitochondrial  $Ca^{2+}$  uptake in canine colonic muscles. *J Physiol* 2003; 549: 207-218
- 35 Hennig GW, Hirst GD, Park KJ, Smith CB, Sanders KM, Ward SM, Smith TK. Propagation of pacemaker activity in the guinea-pig antrum. *J Physiol* 2004; 556: 585-599
- 36 Kim YC, Koh SD, Sanders KM. Voltage-dependent inward currents of interstitial cells of Cajal from murine colon and small intestine. *J Physiol* 2002; 541: 797-810
- 37 Beckett EA, Takeda Y, Yanase H, Sanders KM, Ward SM. Synaptic specializations exist between enteric motor nerves and interstitial cells of Cajal in the murine stomach. *J Comp Neurol* 2005; 493: 193-206

同行评价  
本文就消化道起搏电流的产生及传播机制的研究进展做了简要综述, 内容基本完整, 逻辑性较强, 有一定的参考价值。

编辑 何燕 电编 李军亮

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

# 第三届国际微创外科论坛暨 2007 年天津市 消化内镜学年会征文通知

**本刊讯** 为了跟踪国际发展的最新态势, 加强该领域的交流与合作, 由天津市医学会主办, 天津市南开医院、天津市微创外科中心承办的“第三届国际微创外科论坛暨2007年天津市消化内镜学年会”将于2007-11-02/04在天津举办。

本次会议还将邀请澳大利亚、奥地利、日本、香港等国家和地区及国内内镜、腹腔镜领域的知名专家与会, 以专题讲座及操作演示等方式展示当前微创外科(肝胆胰胃肠)领域的最新前沿技术, 其中包括: 大会专题演讲及大会论文交流; 微创手术实况演示; 内镜操作实况演示; 世界级大师精彩手术实况演示; 国家级继续教育项目; 微创手术新技术与新器械; 微创外科手术设备与器械展示。

## 1 征文内容和要求

征文内容: 凡是与本次会议内容相关的实验研究、临床工作总结、新方法、新技术、新器械等论文, 尚未在全国性学术会议上交流和尚未在国内外正式刊物上发表过的论文。征文要求: 论文、摘要、软盘各一份, 论文字数限4000字以内, 摘要800字以内, 按“目的、方法、结果、结论”。摘要中写明: “题目、作者、单位(包括城市和邮编)。

## 2 联系方式

邹富胜, 300100, 天津市南开区三纬路122号, 天津市南开医院。注明会议论文。

# Wnt信号通路与消化道肿瘤关系的研究进展

杨升, 卢辉山

**背景资料**  
消化道肿瘤的发生、发展是一个多因素、多基因、多阶段渐进性累积的演变过程。而Wnt信号通路相关分子的异常改变与消化道肿瘤的始发有着密切关系, 因此开发针对该通路关键成分为靶标的药物, 可望使消化道肿瘤防治有一个新的突破。本文将近年来关于Wnt信号通路与消化道肿瘤的关系及其相关分子机制的研究进展作一简要的概述。

杨升, 卢辉山, 福建医科大学附属协和医院肿瘤科 福建省福州市 350001  
通讯作者: 卢辉山, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属协和医院肿瘤科. lhs801@163.com  
电话: 0591-83357896  
收稿日期: 2007-06-14 修回日期: 2007-09-13

## Progress of research on the relationship between Wnt signal transduction and digestive tract tumors

Sheng Yang, Hui-Shan Lu

Sheng Yang, Hui-Shan Lu, Department of Oncology, the Affiliated Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China  
Correspondence to: Hui-Shan Lu, Department of Oncology, the Affiliated Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China. lhs801@163.com  
Received: 2007-06-14 Revised: 2007-09-13

### Abstract

The Wnt signal transduction pathway plays an important role in controlling embryo development; its abnormal elevation is involved in many types of human tumorigenesis, and it has a close relationship with digestive tract tumors. Wnt antagonists can block Wnt signal transduction and inhibit its abnormal elevation, and therefore may provide a potential new anti-cancer therapy.

**Key Words:** Wnt signal transduction; Digestive tract tumor

Yang S, Lu HS. Progress of research on the relationship between Wnt signal transduction and digestive tract tumors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(27): 2880-2884

### 摘要

Wnt信号通路对控制胚胎发育起着重要作用, 其异常激活参与了人类多种肿瘤的发病过程, 与消化道肿瘤有着密切关系。而Wnt信号通路的拮抗剂能阻滞信号转导, 抑制Wnt2信号通路的异常激活, 可望为将来抗肿瘤治疗提供一条新的途径。

**关键词:** Wnt信号转导; 消化道肿瘤

杨升, 卢辉山. Wnt信号通路与消化道肿瘤关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2007;15(27):2880-2884  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2880.asp>

### 0 引言

细胞信号通路是当今生物医学领域最前沿、最活跃的主题之一<sup>[1]</sup>。Wnt信号通路由一系列癌基因和抑癌基因编码的蛋白质组成, 各种蛋白质之间彼此联系、相互制约。目前, 大量研究表明Wnt信号通路在胚胎发育与肿瘤发生、发展等关键的生理、病理过程中起着重要作用, 备受广大学者的关注<sup>[2-3]</sup>。本文着重就Wnt信号通路与消化道肿瘤关系的研究进展作一综述。

### 1 Wnt信号通路的来源

最早关于Wnt信号通路的了解来自对致癌病毒和果蝇发育机制的研究。Nusse *et al*用小鼠乳头瘤病毒(mouse mammary tumor virus, MMTV)诱导小鼠产生乳腺癌的过程中发现, MMTV常常固定整合于宿主染色体的特定位置, 激活这一位点的基因, 故此结合位点的基因被命名为int-1。随后发现该基因与果蝇胚胎发育基因wingless(wg)同源, wg基因突变将导致成年果蝇无翅, 遂将二者名称简并, 该基因被重新命名为Wnt。而Wnt蛋白为Wnt信号通路的启动蛋白, 此即Wnt信号通路的由来<sup>[4]</sup>。

### 2 Wnt信号通路的组成

当前认为Wnt信号通路主要由以下几种蛋白构成: Wnt家族分泌蛋白(Wnt)、特异受体卷曲蛋白(Frizzled, Frz)、辅助受体低密度脂蛋白受体相关蛋白5/6(low density lipoprotein receptor related protein5/6, LRP5/6)、散乱蛋白(Dishevelled, Dsh)、结直肠腺瘤性息肉(adenomatous polyposis coli, APC)基因产物、糖原合成酶激酶-3β(glycogen synthase kinase-3β, GSK-3β)、轴蛋白或转导蛋白(Axin or Conductin)、β-连环蛋白(β-catenin)、核内转录因子T细胞因子(T cell factor,



TCF)/淋巴样增强因子(lymphoid enhancing factor, LEF)和泛素蛋白(Ubiquitin, Ub)<sup>[5-6]</sup>.

### 3 Wnt信号通路的作用机制

Wnt- $\beta$ -catenin信号通路是常见且研究得较为透彻的Wnt信号通路, 常称之为Wnt经典或正规途径<sup>[7]</sup>. 当细胞分泌的Wnt蛋白同时与细胞跨膜受体Frz及辅助受体LRP5/6结合后, 即触发细胞内的信号转导, 活化细胞质内Dsh, Dsh的活化抑制了细胞质内 $\beta$ -catenin与Axin-APC-GSK-3 $\beta$ 等形成降解复合物, 导致 $\beta$ -catenin在细胞质内积累并转移至细胞核内, 继而与转录因子TCF/LEF相结合, 刺激Wnt信号靶基因*c-myc*、*cyclin D1*、*MMP-7*、*CD44*和*Claudin-1*等的转录, 调控细胞生长<sup>[8-9]</sup>. 在没有Wnt信号刺激的情况下,  $\beta$ -catenin与Axin-APC-GSK-3 $\beta$ 等形成降解复合物, 结合后的 $\beta$ -catenin发生磷酸化, 进而与Ub结合被泛素化降解, 从而维持细胞质内 $\beta$ -catenin的低水平状态<sup>[10]</sup>. 目前, 尽管有证据说明Wnt信号主要通过卷曲蛋白来实现, 但也有资料表明Wnt信号可通过其他蛋白起作用. 在Wnt信号通路中,  $\beta$ -catenin是正向调节因素, Axin、APC、GSK-3 $\beta$ 、Ub等则是负向调节因素, 而*c-myc*是核内受异常Wnt信号通路调控最关键的靶基因.

### 4 Wnt信号通路的分类

根据Wnt家族在体外培养的细胞系及体内的作用方式显示, Wnt作用机制有两种: 经典途径和非经典途径<sup>[11-13]</sup>. 经典Wnt途径, 即Wnt- $\beta$ -catenin-信号通路, 非经典Wnt途径, 即Wnt只与Wnt受体复合体亚基Frz作用, 而不需要LRP5/6参与, 其主要有两分支: (1)Wnt/Ca<sup>2+</sup>信号通路. 通过钙依赖性激酶、钙调蛋白和转录因子NF-AT而发挥作用; (2)Wnt/Jnk信号通路. 通过Dsh激活Jun-N末端激酶(Jnk), 并迁移入核, 调节转录因子*c-jun*、*ATF2*、*Elk1*、*DPC4*、*P53*等的活性而起作用. 现已发现一些Wnt通过经典途径发挥作用, 一些Wnt则通过非经典途径发挥作用, 而另一些Wnt既通过经典途径也通过非经典途径发挥作用, 其中非经典途径可拮抗经典途径, 但至今非经典Wnt途径在癌症中的具体作用尚不清楚<sup>[14-16]</sup>.

### 5 Wnt信号通路与消化道肿瘤的关系

Wnt信号通路是一条在生物进化过程中极为保守的通路, 从低等生物果蝇直至高等哺乳动物, 其成员都具有高度的同源性, Wnt信号通路在正

常成熟的细胞中处于关闭状态, 其主要在胚胎发育过程中被激活, 参与多种发育模式, 如在脊椎动物的胚胎发育过程中参与形成背-腹部的中轴、中枢神经系统发育等. 因此, 在早期Wnt信号通路的缺陷可导致多种生物发育缺陷, 而癌基因、抑癌基因或Wnt信号通路成分(如APC、 $\beta$ -catenin、Axin等)的突变致其不恰当的激活与肿瘤的发生、发展有关, 尤其与消化道肿瘤紧密相关<sup>[17-19]</sup>.

**5.1 结直肠癌(colorectal cancer, CRC)** 研究发现家族性腺瘤样息肉病(familial adenomatous polyposis, FAP)的APC基因突变发生率约90%-95%, 散发CRC的APC基因突变为85%以上, 而Axin突变率可达11%,  $\beta$ -catenin本身基因(CTNNB1)突变则有10%, 此外也观察到了TCF突变, 以上结果均可导致 $\beta$ -catenin稳定性增加, 引发细胞异常增殖、恶变, 最终导致CRC的发生<sup>[20-22]</sup>. Roh *et al*<sup>[23]</sup>实验显示, 特异地阻断裸鼠体内人APC突变的CRC细胞系 $\beta$ -catenin表达后, 明显抑制裸鼠体内肿瘤生长, 部分肿瘤可消失. Satoh *et al*<sup>[24]</sup>研究表明, 在结肠癌细胞中导入野生型Axin后, 可以引发部分肿瘤细胞的凋亡. 由此可见Wnt信号通路的激活在结直肠癌的发生、发展变中占据着重要地位.

**5.2 肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)** HCC占有肝脏肿瘤的75%, Kondo *et al*<sup>[25]</sup>研究发现在24%与12%-41%的HCC中可以检测到CTNNB1突变. Giles *et al*<sup>[26]</sup>实验显示HCC中, 有HCV感染的CTNNB1突变尤为普遍, 可达41%, 且CTNNB1突变同预后相关. Suzuki *et al*<sup>[27]</sup>研究表明HCC中CTNNB1突变在分化好的肿瘤组织中就出现 $\beta$ -catenin的异常表达, 认为 $\beta$ -catenin在细胞质中蓄积极可能是HCC发生的早期改变. 而Joo *et al*<sup>[28]</sup>研究发现 $\beta$ -catenin的过表达可出现于58.4%与HBV相关的HCC中, 并和肿瘤大小、组织分化程度等病理因素有关, 与其下游靶基因*c-myc*和*cyclinD1*的表达显著相关. Ishizaki *et al*<sup>[29]</sup>研究则发现HCC中 $\beta$ -catenin升高可伴随Axin突变, 产生缩短蛋白, 导致 $\beta$ -catenin的核累积. Ban *et al*<sup>[30]</sup>研究还发现在HCC中, GSK-3 $\beta$ 的活性通常是被抑制的. 长期以来, 学者们在人类的任何肿瘤中都未发现GSK-3 $\beta$ 本身的突变, 这应意味着GSK-3 $\beta$ 在细胞内Wnt信号传递中起着潜在的重要作用<sup>[31]</sup>.

**5.3 胃癌(gastric carcinoma, GC)** CTNNB1突变可使GSK-3 $\beta$ 对其编码的磷酸化位点无法起作

**相关报道**  
信号传导通路研究是整个生命科学中最活跃的热点之一, 目前Wnt信号通路已成为消化道肿瘤分子细胞生物学的研究重点, 并取得了较为迅速的进展, 但不少问题仍亟待解决, 例如, Frz受体如何传递Wnt信号? Dsh在信号传递中的确切作用? Wnt信号通路诱导的促进细胞增生和/或抑制凋亡的基因有哪些?

### 创新盘点

本文较全面、深入探讨了Wnt信号通路消化道肿瘤关系的研究进展,显示进一步探索这条古老而保守转导途径在消化道肿瘤的产生、发展中各种分子的改变和相互作用,可为消化道肿瘤的早期诊断及治疗提供良好的分子标记。

用,可致游离 $\beta$ -catenin含量在细胞质内异常的增高,产生与激活Wnt信号通路相似的作用。胃癌中存在 $\beta$ -catenin磷酸化位点突变,但发生频率并不高。Nabais *et al*<sup>[32]</sup>研究发现胃癌中 $\beta$ -catenin的异常表达似乎和病理学分型更相关, $\beta$ -catenin异常染色和弥散型胃癌有着密切联系。Saikawa *et al*<sup>[33]</sup>研究显示胃癌中Wnt信号通路靶基因cyclin D1过度表达,将反义寡核苷酸探针导入裸鼠的胃癌细胞内抑制cyclin D1后,细胞生长受明显控制,致瘤性消失。Bebb *et al*<sup>[34]</sup>研究表明胃癌中MMP-7表达增高,其中与胃癌有着密切关系的幽门螺旋杆菌亦促进了MMP-7的高度表达。因此Wnt信号通路相关基因的异常表达在胃癌的诊治中有着积极意义。

**5.4 食管癌(esophageal carcinoma, EC)** APC已被公认为是促进CRC发生发展的重要基因,其突变可抑制 $\beta$ -catenin降解,并致其蓄积,但在食管癌中APC突变少见, $\beta$ -catenin突变也极低下。Osterheld *et al*<sup>[35]</sup>研究发现部分食管腺癌患者 $\beta$ -catenin表达,预后较好,且浸润深度浅的肿瘤组织更易有 $\beta$ -catenin的异常表达,这与其他肿瘤研究结果截然不同,提示 $\beta$ -catenin在肿瘤发生、发展中作用的多样性。Nakajima *et al*<sup>[36]</sup>研究显示81例食管鳞状细胞癌中均未见Axin基因突变,但有5例患者存在Axin基因多态现象以及Axin蛋白表达减少,而Axin蛋白表达减少程度与食管鳞状细胞癌浸润深度、淋巴结转移以及淋巴系统浸润相关,与患者年龄、性别、分化程度、血管侵犯等不相关。结果提示Axin基因异常表达及表达水平与食管癌临床病理特性有关,而Axin基因表达减少可成为预测肿瘤患者预后的一个指标。

## 6 Wnt信号通路拮抗剂及其作用机制

近期Wnt信号通路在肿瘤发生发展中作用机制研究的深入,不仅为抗肿瘤药物的药理作用提供了有效的理论支持,而且促进了对已有药物的优化和新药的研发。新近实验研究发现部分药物可针对Wnt信号通路所涉及的靶位或因子发挥作用,能阻滞信号转导,产生良好的抗肿瘤效果<sup>[37-38]</sup>。

流行病学和临床研究表明非甾体类抗炎药(nonsteroidal antiinflammatory drugs, NSAIDs)是Wnt信号通路抑制剂。Dihlmann *et al*<sup>[39]</sup>实验证实阿司匹林及吲哚美辛均可通过干扰 $\beta$ -catenin/TCF复合物的功能而发挥抑瘤作用。Rice *et al*<sup>[40]</sup>

研究提示应用舒林酸(sulindac)代谢物处理结肠癌细胞株, $\beta$ -catenin可呈剂量依赖性减少,并在肿瘤细胞中观察到激酶依赖的蛋白降解和细胞凋亡。Boon *et al*<sup>[41]</sup>实验表明在体内外实验中Sulindac均可抑制肿瘤细胞 $\beta$ -catenin到细胞核的转位以及 $\beta$ -catenin/TCF的活性。丙戊酸(valproic acid, VPA)原应用于癫痫的长期治疗,但在体内、外实验中皆能抑制Wnt信号通路GSK-3 $\beta$ ,从而诱导肿瘤细胞分化<sup>[42]</sup>。内皮抑素(endostatin, ES)是血管生成抑制剂,研究发现其在Wnt信号通路中可促进 $\beta$ -catenin降解,抑制cyclin D1转录,诱导G1期阻滞和细胞凋亡<sup>[43]</sup>。Dillard *et al*<sup>[44]</sup>应用维生素A(vitamin A, Retinol)处理对全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)耐药的三种大肠癌细胞株HCT-116, WiDr和SW620,结果显示维生素A可通过调节视黄醇类X受体(retinoid X receptor, RXR)等作用促进 $\beta$ -catenin经蛋白酶体途径降解,减弱TCF/LEF活性及cyclin D1和c-myc转录,控制肿瘤细胞增殖。甲磺酸伊马替尼(格列卫, imatinib mesylate, Gleevec)是一种选择性酪氨酸激酶抑制剂,临床上可以明显缓解慢性粒细胞性白血病及控制胃肠道间质瘤。研究表明其不仅可选择地抑制血小板衍生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)受体、干细胞受体c-Kit66,增强 $\beta$ -catenin/E-cadherin结合,还可重新调整 $\beta$ -catenin在细胞核内与膜上分布,下调 $\beta$ -catenin水平,并能降低TCF/LEF活性与cyclin D1转录,影响Wnt信号传导而发挥抗癌用<sup>[45-46]</sup>。

总之,恶性肿瘤是严重危害人类健康的疾病之一,其发生、发展是一个多因素作用、多基因参与和多阶段经历才最终形成的极其复杂的生物学过程,但目前尚无非常理想的抗肿瘤药物。虽然原有药物不断改进发展,新药不断开发问世,但其疗效、安全性等仍未能达到令人满意的效果,寻找新的抗肿瘤分子靶位、提高肿瘤治疗的临床疗效愈益受到关注。Wnt信号通路在肿瘤发生、发展中起着重要作用,故继续进一步探究其各组分及相互作用机制,开发该通路特定靶点有效拮抗剂,无疑将对抗肿瘤药物的发展产生巨大的影响,有望开拓肿瘤治疗的一个新局面<sup>[47-48]</sup>。

## 7 参考文献

- 1 Heasley LE, Han SY. JNK regulation of oncogenesis. *Mol Cells* 2006; 21: 167-173
- 2 Tan LP, Ng BK, Balraj P, Lim PK, Peh SC. No difference in the occurrence of mismatch repair

- defects and APC and CTNNB1 genes mutation in a multi-racial colorectal carcinoma patient cohort. *Pathology* 2007; 39: 228-234
- 3 Bryja V, Cajanek L, Grahm A, Schulte G. Inhibition of endocytosis blocks Wnt signalling to beta-catenin by promoting dishevelled degradation. *Acta Physiol (Oxf)* 2007; 190: 55-61
- 4 Hendriks B, Reichmann E. Wnt signaling: a complex issue. *Biol Res* 2002; 35: 277-286
- 5 Luo W, Zou H, Jin L, Lin S, Li Q, Ye Z, Rui H, Lin SC. Axin contains three separable domains that confer intramolecular, homodimeric, and heterodimeric interactions involved in distinct functions. *J Biol Chem* 2005; 280: 5054-5060
- 6 Kriehoff E, Behrens J, Mayr B. Nucleo-cytoplasmic distribution of beta-catenin is regulated by retention. *J Cell Sci* 2006; 119: 1453-1463
- 7 Vincan E. Frizzled/WNT signalling: the insidious promoter of tumour growth and progression. *Front Biosci* 2004; 9: 1023-1034
- 8 Cadigan KM, Liu YI. Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci* 2006; 119: 395-402
- 9 Takahashi M, Tsunoda T, Seiki M, Nakamura Y, Furukawa Y. Identification of membrane-type matrix metalloproteinase-1 as a target of the beta-catenin/Tcf4 complex in human colorectal cancers. *Oncogene* 2002; 21: 5861-5867
- 10 Fogarty MP, Kessler JD, Wechsler-Reya RJ. Morphing into cancer: the role of developmental signaling pathways in brain tumor formation. *J Neurobiol* 2005; 64: 458-475
- 11 Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell* 2003; 5: 367-377
- 12 Yang Y. Wnts and wing: Wnt signaling in vertebrate limb development and musculoskeletal morphogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2003; 69: 305-317
- 13 Herman MA, Wu M. Noncanonical Wnt signaling pathways in *C. elegans* converge on POP-1/TCF and control cell polarity. *Front Biosci* 2004; 9: 1530-1539
- 14 Chen W, ten Berge D, Brown J, Ahn S, Hu LA, Miller WE, Caron MG, Barak LS, Nusse R, Lefkowitz RJ. Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4. *Science* 2003; 301: 1391-1394
- 15 Kanei-Ishii C, Ninomiya-Tsuji J, Tanikawa J, Nomura T, Ishitani T, Kishida S, Kokura K, Kurahashi T, Ichikawa-Iwata E, Kim Y, Matsumoto K, Ishii S. Wnt-1 signal induces phosphorylation and degradation of c-Myb protein via TAK1, HIPK2, and NLK. *Genes Dev* 2004; 18: 816-829
- 16 Yamaguchi Y, Hearing VJ, Itami S, Yoshikawa K, Katayama I. Mesenchymal-epithelial interactions in the skin: aiming for site-specific tissue regeneration. *J Dermatol Sci* 2005; 40: 1-9
- 17 Ilyas M. Wnt signalling and the mechanistic basis of tumour development. *J Pathol* 2005; 205: 130-144
- 18 McMillan M, Kahn M. Investigating Wnt signaling: a chemogenomic safari. *Drug Discov Today* 2005; 10: 1467-1474
- 19 Katoh Y, Katoh M. Hedgehog signaling pathway and gastric cancer. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 1050-1054
- 20 Webster MT, Rozycka M, Sara E, Davis E, Smalley M, Young N, Dale TC, Wooster R. Sequence variants of the axin gene in breast, colon, and other cancers: an analysis of mutations that interfere with GSK3 binding. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 28: 443-453
- 21 Fukushima H, Yamamoto H, Itoh F, Horiuchi S, Min Y, Iku S, Imai K. Frequent alterations of the beta-catenin and TCF-4 genes, but not of the APC gene, in colon cancers with high-frequency microsatellite instability. *J Exp Clin Cancer Res* 2001; 20: 553-559
- 22 Lustig B, Behrens J. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003; 129: 199-221
- 23 Roh H, Green DW, Boswell CB, Pippin JA, Drebin JA. Suppression of beta-catenin inhibits the neoplastic growth of APC-mutant colon cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61: 6563-6568
- 24 Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, Kato T, Miwa N, Nishiwaki T, Kawasoe T, Ishiguro H, Fujita M, Tokino T, Sasaki Y, Imaoka S, Murata M, Shimano T, Yamaoka Y, Nakamura Y. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet* 2000; 24: 245-250
- 25 Kondo Y, Kanai Y, Sakamoto M, Genda T, Mizokami M, Ueda R, Hirohashi S. Beta-catenin accumulation and mutation of exon 3 of the beta-catenin gene in hepatocellular carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90: 1301-1309
- 26 Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1653: 1-24
- 27 Suzuki T, Yano H, Nakashima Y, Nakashima O, Kojiro M. Beta-catenin expression in hepatocellular carcinoma: a possible participation of beta-catenin in the dedifferentiation process. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 994-1000
- 28 Joo M, Lee HK, Kang YK. Expression of beta-catenin in hepatocellular carcinoma in relation to tumor cell proliferation and cyclin D1 expression. *J Korean Med Sci* 2003; 18: 211-217
- 29 Ishizaki Y, Ikeda S, Fujimori M, Shimizu Y, Kurihara T, Itamoto T, Kikuchi A, Okajima M, Asahara T. Immunohistochemical analysis and mutational analyses of beta-catenin, Axin family and APC genes in hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol* 2004; 24: 1077-1083
- 30 Ban KC, Singh H, Krishnan R, Seow HF. GSK-3beta phosphorylation and alteration of beta-catenin in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2003; 199: 201-208
- 31 Cui J, Zhou X, Liu Y, Tang Z, Romeih M. Wnt signaling in hepatocellular carcinoma: analysis of mutation and expression of beta-catenin, T-cell factor-4 and glycogen synthase kinase 3-beta genes. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 280-287
- 32 Nabais S, Machado JC, Lopes C, Seruca R, Carneiro F, Sobrinho-Simoes M. Patterns of beta-catenin expression in gastric carcinoma: clinicopathological relevance and mutation analysis. *Int J Surg Pathol* 2003; 11: 1-9
- 33 Saikawa Y, Kubota T, Otani Y, Kitajima M, Modlin IM. Cyclin D1 antisense oligonucleotide inhibits cell growth stimulated by epidermal growth factor and induces apoptosis of gastric cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 2001; 92: 1102-1109
- 34 Bebb JR, Letley DP, Thomas RJ, Aviles F, Collins HM, Watson SA, Hand NM, Zaitoun A, Atherton

# 应用要点

当前以Wnt信号通路重要分子为靶点研发的拮抗剂在体外已显示出良好的抗癌作用,因此继续探究Wnt信号通路中相关分子在消化道肿瘤发病过程中的具体作用机制有着积极意义和广阔的应用前景。

同行评价  
本文内容新颖, 层次及条理清楚, 对Wnt信号通路的研究具有较好的指导价值.

- JC. Helicobacter pylori upregulates matrilysin (MMP-7) in epithelial cells in vivo and in vitro in a Cag dependent manner. *Gut* 2003; 52: 1408-1413
- 35 Osterheld MC, Bian YS, Bosman FT, Benhattar J, Fontollet C. Beta-catenin expression and its association with prognostic factors in adenocarcinoma developed in Barrett esophagus. *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 451-456
- 36 Nakajima M, Fukuchi M, Miyazaki T, Masuda N, Kato H, Kuwano H. Reduced expression of Axin correlates with tumour progression of oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2003; 88: 1734-1739
- 37 Jaiswal AS, Marlow BP, Gupta N, Narayan S. Beta-catenin-mediated transactivation and cell-cell adhesion pathways are important in curcumin (diferuylmethane)-induced growth arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene* 2002; 21: 8414-8427
- 38 Bordonaro M, Lazarova DL, Sartorelli AC. The activation of beta-catenin by Wnt signaling mediates the effects of histone deacetylase inhibitors. *Exp Cell Res* 2007; 313: 1652-1666
- 39 Dihlmann S, Siermann A, von Knebel Doeberitz M. The nonsteroidal anti-inflammatory drugs aspirin and indomethacin attenuate beta-catenin/TCF-4 signaling. *Oncogene* 2001; 20: 645-653
- 40 Rice PL, Kelloff J, Sullivan H, Driggers LJ, Beard KS, Kuwada S, Piazza G, Ahnen DJ. Sulindac metabolites induce caspase- and proteasome-dependent degradation of beta-catenin protein in human colon cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 885-892
- 41 Boon EM, Keller JJ, Wormhoudt TA, Giardiello FM, Offerhaus GJ, van der Neut R, Pals ST. Sulindac targets nuclear beta-catenin accumulation and Wnt signalling in adenomas of patients with familial adenomatous polyposis and in human colorectal cancer cell lines. *Br J Cancer* 2004; 90: 224-229
- 42 Bug G, Gul H, Schwarz K, Pfeifer H, Kampfmann M, Zheng X, Beissert T, Boehrer S, Hoelzer D, Ottmann OG, Ruthardt M. Valproic acid stimulates proliferation and self-renewal of hematopoietic stem cells. *Cancer Res* 2005; 65: 2537-2541
- 43 Danilkovitch-Miagkova A. Oncogenic signaling pathways activated by RON receptor tyrosine kinase. *Curr Cancer Drug Targets* 2003; 3: 31-40
- 44 Dillard AC, Lane MA. Retinol decreases beta-catenin protein levels in retinoic acid-resistant colon cancer cell lines. *Mol Carcinog* 2007; 46: 315-329
- 45 Hanai J, Gloy J, Karumanchi SA, Kale S, Tang J, Hu G, Chan B, Ramchandran R, Jha V, Sukhatme VP, Sokol S. Endostatin is a potential inhibitor of Wnt signaling. *J Cell Biol* 2002; 158: 529-539
- 46 Rao AS, Kremenevskaja N, von Wasielewski R, Jakubcaková V, Kant S, Resch J, Brabant G. Wnt/beta-catenin signaling mediates antineoplastic effects of imatinib mesylate (gleevec) in anaplastic thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 159-168
- 47 Ghosh JC, Altieri DC. Activation of p53-dependent apoptosis by acute ablation of glycogen synthase kinase-3beta in colorectal cancer cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 4580-4588
- 48 Bazzi H, Fantauzzo KA, Richardson GD, Jahoda CA, Christiano AM. The Wnt inhibitor, Dickkopf 4, is induced by canonical Wnt signaling during ectodermal appendage morphogenesis. *Dev Biol* 2007; 305: 498-507

编辑 何燕 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

## 中国学术期刊综合引证报告(2006)

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

# 肝星状细胞及相关细胞因子在肝纤维化形成中的作用

杨悦杰, 黄芬

杨悦杰, 黄芬, 中国医科大学附属盛京医院感染科 辽宁省沈阳市 110004

通讯作者: 杨悦杰, 110004, 辽宁省沈阳市, 沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院感染科.

jany4086@sina.com

电话: 024-83956981

收稿日期: 2007-04-20 修回日期: 2007-09-11

## Role of hepatic stellate cells and correlated cytokines in the formation of hepatic fibrosis

Yue-Jie Yang, Fen Huang

Yue-Jie Yang, Fen Huang, Department of Infectious Diseases, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Yue-Jie Yang, Department of Infectious Diseases, Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. jany4086@sina.com

Received: 2007-04-20 Revised: 2007-09-11

## Abstract

Hepatic fibrosis is a pathological process with excessive deposition of extracellular matrix (ECM) throughout the liver. Hepatic stellate cells (HSCs) are thought to be a major source of ECM and play a critical role in the process of hepatic fibrosis. In addition, when various pathogenic changes lead to hepatocyte damage, Kupffer's cells and liver sinus endothelial cells, among others, excrete a series of cytokines. These affect adjacent HSCs in a paracrine and autocrine manner, which influences the proliferation and inversion of HSCs and the metabolism of ECM. Therefore, there is a very close relationship between HSCs, cytokines and the course of hepatic fibrosis. Elucidating this relationship will benefit research on the role of HSCs in hepatic fibrosis.

**Key Words:** Hepatic stellate cell; Cytokine; Hepatic fibrosis

Yang YJ, Huang F. Role of hepatic stellate cells and correlated cytokines in the formation of hepatic fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(27): 2885-2890

## 摘要

肝纤维化(hepatic fibrosis)是指肝脏内弥漫性细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积的病理过程. 肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)被认为是ECM的主要来源细胞, 在肝纤维化发生发展中起着关键作用. 另外, 各种病因引起肝细胞损伤时, Kupffers细胞(KF), 肝窦内皮细胞等分泌一系列细胞因子, 通过旁分泌和自分泌方式作用于邻近的HSC, 影响其增殖, 趋化和ECM代谢. 因此, HSC及细胞因子与肝纤维化的发生发展关系极为密切, 阐明其关系, 有助于以HSC为靶点的肝纤维化方面的研究, 现就其关系分别综述如下.

**关键词:** 肝星状细胞; 细胞因子; 肝纤维化

杨悦杰, 黄芬. 肝星状细胞及相关细胞因子在肝纤维化形成中的作用. *世界华人消化杂志* 2007;15(27):2885-2890  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2885.asp>

## 背景资料

慢性肝脏疾病是一类严重危害人们健康的主要疾病. 其中肝纤维化(HF)是这个过程的中间及关键环节. 肝星状细胞(HSC)是启动整个事件的开端, 在肝纤维化过程中扮演着重要的角色. 另外, 各种细胞因子与HSC相互作用, 在HF过程中也发挥着重要作用.

## 0 引言

肝纤维化的形成机制是一个有众多因素参与复杂的病理过程, 包括外界刺激后, 引起细胞因子的释放, 细胞因子-细胞-细胞外基质相互作用, 最终使大量纤维组织沉积于肝脏. 肝纤维化实质是慢性肝病损伤修复反应, 肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)在肝纤维化过程中起核心作用. 在进展期肝纤维化中, 活化的HSC在肝损伤部位移行、增殖, 表达各种细胞外信号外转导通路蛋白, 产生大量以胶原为主的细胞外基质(ECM)成分和细胞因子, 是肝纤维化形成的中心环节. 另外, 在HSC的激活、致纤维化以及与其他细胞的相互作用的过程中, 细胞因子扮演着重要角色. HSC活化后可以合成、分泌大量的细胞因子如: TGF- $\beta$ 、PDGF、IGF-1、EGF、FGF等. 下面分别阐述HSC和细胞因子在肝纤维化形成中的作用.

## 1 肝星状细胞与肝纤维化

1.1 HSC的基本特征和功能 HSC又称Ito细胞,

研发前沿  
肝纤维化的形成机制和HSC功能调控及其复杂,但不同水平的研究都说明了HSC在肝纤维化中的关键作用,HSC的激活增殖迁移转化和凋亡的复杂网络调控途径以及潜在的生物学功能是今后研究的重点和方向。

贮脂细胞,位于Disse间隙,正常状态下,HSC主要贮存和代谢维生素A脂滴,肝受损时,HSC在多种因素下被激活,转化为肌成纤维细胞(myofibroblast, MFB)表达多种细胞因子和受体,进一步增殖,合成并分泌大量ECM,并表达 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$  smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA),具有收缩功能<sup>[1]</sup>. Gressner *et al*<sup>[2]</sup>根据已有的研究结果,提出了HSC激活的“三级级联反应模式”(1)炎症前期阶段,肝细胞受损通过释放丝裂原及旁分泌等多种环节促使HSC活化增殖。(2)炎症阶段,坏死的肝细胞,炎症细胞被吸收到局部,活化的Kupffer细胞,单核细胞以及血小板释放多种细胞因子促使HSC转化成MFB,这些细胞因子包括:转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ),血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)及表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)等。(3)炎症后期阶段,MFB增生合成TGF- $\beta$ 和PDGF等,通过自分泌和旁分泌促进本身增殖,继续产生各种ECM成分,此时,即使致病因子去除,MFB的自分泌和旁分泌仍可继续进行,肝纤维化仍可持续发展。

**1.2 HSC与ECM的合成** 目前认为,HSC是产生ECM最重要的细胞,各种原因肝损伤时,引起肝ECM合成增加,降解减少,进而造成肝内ECM不断积聚,最后导致肝纤维化甚至肝硬化。ECM主要成分包括胶原、糖蛋白、蛋白聚糖和糖胺多糖。ECM本身并非单纯作为一种组织结构存在,它具有广泛的生理功能。肝细胞的正常功能和HSC保持静止状态均有赖于Disse间隙的正常间质成分。肝纤维化时大量细胞外基质在Disse间隙沉积以胶原为主,尤以I型胶原为主,这些间质成分的改变不但激活HSC,也影响肝细胞的功能<sup>[3]</sup>。(1)胶原,HSC能产生I、III和IV型胶原,各种胶原类型在正常肝脏和纤维化肝脏中所占比例,目前尚无统一认识,肝纤维化早期,IV型胶原增多,发展至肝硬化时,I、III型胶原明显增加,以I型胶原为主。(2)糖蛋白,糖蛋白包括纤连蛋白(fibronectin, FN)、层连蛋白(laminin, LN)等,肝纤维化时,上述成分增加,FN有两种异质体EIIIA和EIIIB,肝脏损伤早期,即可出现两者表达,蛋白质水平也如此,损伤后的肝窦内皮细胞所沉积的FN加速正常HSC向MFB的转化,LN沉积是肝窦毛细血管化的改变之一,血清中LN抗原水平与肝纤维化程度之间有密切关系。(3)

蛋白聚糖和糖胺多糖,主要包括透明质酸,硫酸软骨素,硫酸角质素等。肝纤维化时,上述成分不同程度增加,糖胺多糖主要来源于HSC。近年来,核心蛋白聚糖的研究受到广泛关注,他有调节细胞黏附、迁移、增殖和胶原纤维形成的作用,对防止组织和器官纤维化有重要意义。

**1.3 HSC与ECM的降解** 参与ECM降解的胶原酶主要是基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs),激活的HSC在细胞因子的作用下,可直接或间接调控MMPs,使MMPs活性受抑制,ECM降解减少,在肝内沉积增加。Montfort *et al*分别用鼠和猪血清诱导大鼠肝硬化,结果提示正常的胶原酶/胶原比例失调,胶原降解活性相对于实际胶原含量而言明显降低。上述研究表明:肝纤维化的形成是由于细胞外基质的合成超过降解的综合作用所致。纤维化的发展还与金属蛋白酶组织抑制物(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)增加密切相关<sup>[4]</sup>,TIMPs是MMPs的专一抑制剂,可与活性的MMPs不可逆结合,抑制其对ECM的降解活性,导致肝纤维化的发展。对体外培养的HSC进行检测证实,HSC激活、转化和表现MFB表型后,表达TIMP-1 RNA迅速增加,超过了HSC间质性胶原酶表达的水平,肝内ECM降解进行性减少,过剩的间质性胶原酶逐渐积累,从而造成肝纤维化。

**1.4 HSC的凋亡** HSC凋亡是激活的HSC减少的主要途径,许多体内外调节因子或因素对这一过程进行着精密调节,主要有FasL介导的途径,神经生长因子途径,黏附分子途径,线粒体途径及活性氧途径<sup>[5]</sup>等。在酒精性肝病中肝细胞凋亡与HSC凋亡之间还存在着相互影响,相互促进的作用。DeBlesser *et al*<sup>[6]</sup>研究发现,激活的HSC可通过表达激活素A(activin A)从而诱导邻近肝实质细胞凋亡。HSC凋亡的机制有待进一步研究。

## 2 细胞因子与肝纤维化

与肝纤维化发生有关的细胞因子简称肝纤维化相关性细胞因子,根据细胞因子对HSC增殖、分化和ECM合成的影响,可将肝纤维化相关性细胞因子分为刺激因子和抑制因子两大类。刺激因子又分为(1)直接刺激因子,包括TGF- $\beta$ 、PDGF、IGF-1、EGF、FGF等,其中TGF- $\beta$ 在肝



纤维化形成中的作用最重要. 这些细胞因子主要通过增加HSC的ECM基因表达和翻译或刺激HSC增殖、分化起作用; (2)间接刺激因子, 包括TNF- $\alpha$ 、IL-4、IL-6、IL-8、PAF等, 通过促进炎症反应或作为巨噬细胞、HSC增殖和活化的刺激物, 间接促进肝纤维化形成. 抑制因子主要通过抑制HSC增殖和ECM合成而起作用, 如IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 及IL-10等, 其中 $\gamma$ -干扰素(interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )的作用最为突出. 现就国内外研究较多的细胞因子简要介绍如下.

**2.1 转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor, TGF- $\beta$ )** TGF- $\beta$ 是目前已知的重要致肝纤维化的细胞因子之一<sup>[7]</sup>. 他既可促进细胞外基质的合成, 又可抑制其降解, 在HSC激活过程中亦起重要作用<sup>[8]</sup>. 动物活体实验表明, 敲除了Smad3(TGF- $\beta$ 受体的下游转录因子)的大鼠没有发展为肝纤维化<sup>[9]</sup>. 另外, 阻断TGF- $\beta$ 1的活性能有效地抑制各种器官对损伤所产生的纤维化反应. 同样, 在转基因动物中, TGF- $\beta$ 1的表达可以增强器官的纤维化反应<sup>[10-12]</sup>. 因此, 阻断TGF- $\beta$ 1活性的试剂, 如可溶性TGF- $\beta$ 1受体等被认为可能是抗肝纤维化治疗的潜在方法<sup>[13]</sup>. TGF- $\beta$ 不仅可以促进ECM的合成, 还可以协调与纤维化相关的各种关键性蛋白的表达. 这包括下调间质胶原酶和其他基质金属蛋白酶, 上调抗蛋白酶<sup>[14]</sup>.

**2.2 血小板源生长因子** PDGF是目前已知的HSC最强的促分裂素, 以激活HSC并促进其增殖、转化为主, 也可促进其产生胶原<sup>[15]</sup>. 他的主要作用是使处于静止期的G0细胞通过转化进入G1期及S1期, 继而进行DNA复制. 研究证实, 静止的HSC无PDGF受体表达, 只有活化的HSC才表达PDGF受体. 除促使HSC增殖外, 也促使HSC向损害部位迁移, 诱导ECM合成与分泌TGF- $\beta$ 等细胞因子. PDGF是*sis*原癌基因表达产物, 由A、B两条肽链组成, 形成3种亚型, 其中PDGF-BB对促进肝纤维化形成的作用尤为突出<sup>[16]</sup>. 抑制PDGF的产生或对其作用进行拮抗是抗肝纤维化的重要途径. 对HSC体内、外研究证实选择性的以PDGF受体作为靶标, 拮抗其作用被认为是延缓肝纤维化进展方面很有价值的策略<sup>[17-19]</sup>. Borkham-Kamphorst *et al*<sup>[20-21]</sup>的研究发现, 可溶性PDGF受体可以降低I型胶原信使核糖核酸(RNA)的表达, 抑制PDGF-BB产生的自分泌, 有效抑制HSC的活化. 因而认为, 采用抗PDGF治

疗可能干预肝纤维化的过程.

**2.3 表皮生长因子** EGF是一种强烈的促多种细胞增殖的有丝分裂原, 当其与受体结合后, 可诱导受体蛋白聚合形成二聚体, 发挥一系列的生物学作用. 肝硬化时, EGF表达上调是一主要特征, 而且上调的EGF主要分布于再生的肝小叶和胆管上皮细胞, 说明硬化肝脏中肝小叶的再生可能是一个自分泌过程. EGF除了刺激肝细胞和胆管上皮细胞增殖外, 也具有促进HSC分裂增殖的能力.

**2.4 肝细胞生长因子(HGF)** HGF由非实质细胞如HSC, 窦状内皮细胞产生, 他作为肝细胞的有丝分裂蛋白和*c-Met*原癌基因产物的配体, 在刺激肝细胞增殖上起重要作用. 在mRNA水平上, HGF可下调前胶原TGF- $\beta$ 1, 并能抑制TGF- $\beta$ 1表达, 促进肝细胞再生, 抑制肝细胞凋亡<sup>[22]</sup>. HGF不但能增加沉积胶原的转移, 加速肝脏功能的正常化, 还可促进转录调节因子ets的表达, 通过其上调胶原酶I, 尿激酶原基因的表达并增强其活性, 从而促进ECM的降解. 已有的研究表明, 应用HGF转基因治疗肝硬变具有良好的应用前景, 他通过抑制TGF- $\beta$ 表达, 减少前胶原产生, 降解已形成的胶原纤维及抑制肝细胞凋亡, 刺激肝细胞再生, 从而提高生存率<sup>[23]</sup>.

**2.5 结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)** CTGF是一种36-38 kDa的新型细胞因子, 正常肝组织中仅在门管区梭状细胞中检测到少量CTGF mRNA<sup>[24]</sup>. 有研究发现, 与正常肝组织比较, 硬化的肝组织内CTGF mRNA与TGF- $\beta$  mRNA表达分别增加6.5倍和7.8倍, 二者上升水平与病理上肝硬化进展程度呈平行关系. CTGF是TGF- $\beta$ 的下游效应介质, 可以介导TGF- $\beta$ 的促细胞外基质效应. 实验研究提示, CTGF能诱导成纤维细胞增生和分泌细胞外基质, 参与调节细胞增生、分化、胚胎发育以及伤口愈合. 目前认为, HSC是CTGF的重要来源<sup>[25]</sup>, 原位杂交结果显示, CTGF mRNA在肝纤维间隔和窦状的HSC内均有高度表达, 且明显受控于HSC. 在体外研究中, 采用DNA印迹法发现, CTGF mRNA的表达在培养大鼠的HSC活化过程中逐渐升高; 蛋白质印迹法也可以证实, 经培养并已活化的HSC比刚分离的HSC分泌更多的CTGF.

**2.6 肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor ,**

**创新盘点**  
以往有单独报道肝星状细胞或细胞因子与肝纤维化形成的关系, 本文进一步从两者相互作用关系的角度阐述肝纤维化的形成机制.

**应用要点**  
肝星状细胞、相关细胞因子与肝纤维化的关系极为密切, 阐明其关系, 有助于开发以HSC为靶点的抗纤维化措施。

TNF- $\alpha$ ) TNF- $\alpha$ 主要由单核巨噬细胞、HSC、Kupffer 细胞等产生, 具有促炎症活动及细胞毒性作用. TNF- $\alpha$ 是一个重要的细胞因子, 在各种原因引起的肝脏损伤、HSC活化以及肝细胞再生过程中均发挥重要作用<sup>[26-27]</sup>. TNF- $\alpha$ 与其他细胞因子如TGF- $\beta$ 、PDGF、IL-1等形成调节网络, 对肝纤维化的启动及调控起重要作用<sup>[28]</sup>. TNF- $\alpha$ 可促进肝内纤维母细胞增殖, 并促使其向肌纤维母细胞的转化, 对纤维母细胞的胶原合成有促进作用<sup>[29]</sup>. TNF- $\alpha$ <sup>[30]</sup>是一种有免疫活性的细胞因子, 他不仅与IL-6、IL-1形成重要的炎症介质, 而且还能刺激HSC细胞的增殖, 促使HSC产生ECM. 据报道TNF $\alpha$ 能促使活化的HSC自分泌多种细胞因子如: IL-6、IL-1、EGF、ET1、TGF等, 后者活化HSC, 使其产生大量的ECM, 加重肝纤维化的进展<sup>[31-32]</sup>. 因此减少TNF- $\alpha$ 的合成或拮抗他的作用可以显著降低各种原因所致的肝脏损伤程度, 这在动物实验中得到验证<sup>[33-34]</sup>. 另外 Prosser *et al*<sup>[35]</sup>报道TNF- $\alpha$ 可以诱发细胞凋亡<sup>[36-37]</sup>. 凋亡过程进一步加重肝脏损伤, 其中有毒性的细胞因子或化学因子在损伤过程中发挥重要的调解作用<sup>[38-40]</sup>. 因此抑制凋亡的发生可以减轻肝脏损伤, 同时延缓或阻止肝纤维化的进展<sup>[41-42]</sup>.

**2.7 内皮素(endothelins, ET)** ET是一种内皮衍生的血管收缩因子, 共有3种亚型, 即ET-1、ET-2和ET-3. 作为一种旁分泌和/或自分泌激素, 其生物学效应, 首先是与靶细胞上内皮素受体结合, 然后启动一系列细胞化学过程. 肝脏内多数细胞可以表达ET受体, 包括HSC、内皮细胞和枯否细胞, 其中HSC上受体数目最多. ET及其受体在肝脏中发挥多种生物学效应. 首先, ET作为一种强烈的血管收缩因子, 在肝脏的血流调节中发挥重要作用, ET-1也可以引起肝窦的直接收缩. 其次, ET在肝脏生化反应中也具有重要作用, 可引起肝糖原分解减少, 胆汁流减少, 肝脏缺血缺氧等. 此外, ET在细胞生长和DNA合成中也具有明显作用.

**2.8 干扰素(interferon, IFN)** IFN是可溶性细胞外信号蛋白. 以前仅知他干扰病毒复制的作用, 现在他的多种作用被发现. IFN分为 I 型(IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\omega$ )和 II 型(IFN- $\gamma$ ). I 型IFN共用一种受体, II 型IFN结合另一种受体. 当机体遭受病毒感染时, 白细胞合成IFN- $\alpha$ 和IFN- $\beta$ ; 当机体遭受各种抗原及有丝分裂原(如葡萄菌肠毒素A)

刺激时, T淋巴细胞分泌IFN- $\gamma$ . 对人和动物大量实验研究证实, IFN还具有抗肝纤维化作用<sup>[43]</sup>. 一些体内试验研究证实, IFN可以抑制HSC活化, 促进HSC凋亡. 人MFB体外研究证实, IFN- $\alpha$ 或IFN- $\gamma$ 还能够降低转型HSC增殖和/或ECM成分的合成. 另外, IFN- $\gamma$ 也可以抑制大鼠HSC的增殖和活化, 同时可以抑制ECM中蛋白的合成, 包括腔隙基质蛋白(纤维连接蛋白、腱蛋白、III型胶原)和基质膜蛋白(IV型胶原、巢蛋白、层连蛋白).

**2.9 IL-10** IL-10是1989年Fiorentino *et al*发现的, 主要由Th2细胞、巨噬细胞和活化的B细胞产生. HSC活化后也具有分泌IL-10的作用, 并且其IL-10 mRNA表达明显高于静止的HSC. 在受TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 等刺激后表达进一步上升. IL-10与间质胶原酶表达呈正相关, 而与 I 型胶原mRNA呈负相关. 用IL-10抗体与HSC共同培养, 其合成胶原能力明显增强, 而用IL-10表达载体转染HSC后, 其合成胶原能力受抑制, 表明活化的HSC可通过自分泌IL-10抑制 I 型胶原转录并刺激胶原酶产生而对肝纤维化产生负调节作用<sup>[44]</sup>. 丙型肝炎的肝纤维化患者中, 随着纤维化的进展, IL-10水平逐渐下降, 提示IL-10有抗纤维化作用<sup>[45]</sup>. 持这个观点通过阻断IL-10的来源, 致使大鼠损伤模型纤维化加重. 翁山耕 *et al*<sup>[46]</sup>用ELISA方法检测ICAM-1蛋白在HSC中的表达, 结果显示: 传代培养的HSC表达ICAM-1, TNF- $\alpha$ 能明显上调HSC表达ICAM-1, 这与Hellerbrand *et al*<sup>[47]</sup>报道相符; IL-10对TNF- $\alpha$ 诱导的HSC表达ICAM-1有明显抑制作用, 并且呈量效依赖关系. IL-10抗肝纤维化的机制可能是: (1)抑制枯否细胞和炎症介质、细胞因子、氧自由基的释放. (2)调节ECM的生成. 体外试验证明IL-10可抑制成纤维细胞 I 型胶原的产生, 其机制可能是通过诱导细胞核内蛋白的合成, 阻断转录因子与胶原基因启动子结合, 而在转录水平上抑制 I 型胶原的产生, 但对组织金属抑制因子-1(TIMP-1)基因表达无影响<sup>[48]</sup>. (3)影响HSC的功能: 活化的HSC可分泌IL-10而抑制其胶原合成, 阻断或封闭HSC自分泌的IL-10可导致HSC胶原合成增加和 I 型胶原mRNA表达上升. (4)下调TGF- $\beta$ 等致肝纤维化因子产生. (5)肝细胞保护作用. IL-10对半乳糖胺/脂多糖造成的肝损伤模型具有保护作用, 可能是通过包括TNF- $\alpha$ 在内的亲炎性细胞因子的分泌而介导<sup>[49]</sup>. 有报道IL-10用于对干扰素无反应的慢性丙型肝炎患者, 可减轻肝脏的

炎症及纤维化程度, 同时患者对IL-10 sc具有良好的耐受性<sup>[50]</sup>. 在不久的将来, IL-10有望成为抗纤维化治疗的一个全新途径. 总之, IL-10作为一种负反馈调节因子, 在控制局部炎症介质的释放、NF- $\kappa$ B活性等途径阻止肝纤维化的发生、发展<sup>[51]</sup>. 目前IL-10抗纤维化作用已被公认, 但其抗纤维化具体机制及临床应用前景还需要更深入的研究和探索.

总之, 在慢性肝损害过程中, 大量细胞因子通过介导细胞-细胞间, 基质-细胞间相互作用来影响HSC, 激活并促使HSC大量合成ECM, 导致ECM过分沉积出现肝纤维化. 鉴于HSC在肝纤维化发病机制中的主导作用, 大多数抗纤维化研究都以HSC为靶标, 通过抑制炎症反应, 对抗氧化应激, 调节相关细胞因子的活性, 干扰细胞因子信号转导等途径抑制HSC增殖、活化, 诱导HSC凋亡, 而呈现良好的抗纤维化效应.

### 3 参考文献

- 1 Lee KS, Lee SJ, Park HJ, Chung JP, Han KH, Chon CY, Lee SI, Moon YM. Oxidative stress effect on the activation of hepatic stellate cells. *Yonsei Med J* 2001; 42: 1-8
- 2 Gressner AM, Polzar B, Lahme B, Mannherz HG. Induction of rat liver parenchymal cell apoptosis by hepatic myofibroblasts via transforming growth factor beta. *Hepatology* 1996; 23: 571-581
- 3 李莉娜, 贾心善. 肝脏星状细胞与细胞外基质、金属蛋白酶的研究进展. *日本医学介绍* 2002; 23: 139-141
- 4 Greenwel P, Rojkind M. Accelerated development of liver fibrosis in CCl<sub>4</sub>-treated rats by the weekly induction of acute phase response episodes: upregulation of alpha1(I) procollagen and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 mRNAs. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1361: 177-184
- 5 Wells RG. Fibrogenesis. V. TGF-beta signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G845-G850
- 6 De Bleser PJ, Niki T, Xu G, Rogiers V, Geerts A. Localization and cellular sources of activins in normal and fibrotic rat liver. *Hepatology* 1997; 26: 905-912
- 7 Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d793-d807
- 8 Dooley S, Delvoux B, Lahme B, Mangasser-Stephan K, Gressner AM. Modulation of transforming growth factor beta response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Hepatology* 2000; 31: 1094-1106
- 9 Schnabl B, Kweon YO, Frederick JP, Wang XF, Rippe RA, Brenner DA. The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation. *Hepatology* 2001; 34: 89-100
- 10 Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, Sporn MB, Thorgeirsson SS. Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 2572-2576
- 11 Kanzler S, Lohse AW, Keil A, Henninger J, Dienes HP, Schirmacher P, Rose-John S, zum Buschenfelde KH, Blessing M. TGF-beta1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis. *Am J Physiol* 1999; 276: G1059-G1068
- 12 Schnur J, Olah J, Szepesi A, Nagy P, Thorgeirsson SS. Thioacetamide-induced hepatic fibrosis in transforming growth factor beta-1 transgenic mice. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 127-133
- 13 Ueno H, Sakamoto T, Nakamura T, Qi Z, Astuchi N, Takeshita A, Shimizu K, Ohashi H. A soluble transforming growth factor beta receptor expressed in muscle prevents liver fibrogenesis and dysfunction in rats. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 33-42
- 14 Shek FW, Benyon RC. How can transforming growth factor beta be targeted usefully to combat liver fibrosis? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 123-126
- 15 Borkham-Kamphorst E, Herrmann J, Stoll D, Treptau J, Gressner AM, Weiskirchen R. Dominant-negative soluble PDGF-beta receptor inhibits hepatic stellate cell activation and attenuates liver fibrosis. *Lab Invest* 2004; 84: 766-777
- 16 Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15: 255-273
- 17 Pinzani M. PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells. *Front Biosci* 2002; 7: d1720-d1726
- 18 Beljaars L, Meijer DK, Poelstra K. Targeting hepatic stellate cells for cell-specific treatment of liver fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: e214-e222
- 19 Beljaars L, Weert B, Geerts A, Meijer DK, Poelstra K. The preferential homing of a platelet derived growth factor receptor-recognizing macromolecule to fibroblast-like cells in fibrotic tissue. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 1307-1317
- 20 Borkham-Kamphorst E, Stoll D, Gressner AM, Weiskirchen R. Inhibitory effect of soluble PDGF-beta receptor in culture-activated hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 317: 451-462
- 21 Borkham-Kamphorst E, Stoll D, Gressner AM, Weiskirchen R. Antisense strategy against PDGF B-chain proves effective in preventing experimental liver fibrogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 321: 413-423
- 22 Xue F, Takahara T, Yata Y, Kuwabara Y, Shinno E, Nonome K, Minemura M, Takahara S, Li X, Yamato E, Watanabe A. Hepatocyte growth factor gene therapy accelerates regeneration in cirrhotic mouse livers after hepatectomy. *Gut* 2003; 52: 694-700
- 23 Sato M, Kakubari M, Kawamura M, Sugimoto J, Matsumoto K, Ishii T. The decrease in total collagen fibers in the liver by hepatocyte growth factor after formation of cirrhosis induced by thioacetamide. *Biochem Pharmacol* 2000; 59: 681-690
- 24 Abou-Shady M, Friess H, Zimmermann A, di Mola FF, Guo XZ, Baer HU, Buchler MW. Connective tissue growth factor in human liver cirrhosis. *Liver* 2000; 20: 296-304
- 25 Paradis V, Dargere D, Bonvoust F, Vidaud M, Segarini P, Bedossa P. Effects and regulation of connective tissue growth factor on hepatic stellate cells. *Lab Invest* 2002; 82: 767-774
- 26 Marra F. Chemokines in liver inflammation and

同行评价  
本文叙述条理分明, 文章有一定的科学性和可读性.

- fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d1899-d1914
- 27 Diehl AM. Liver regeneration. *Front Biosci* 2002; 7: e301-e314
- 28 陈伟锋, 汪谦. 细胞因子网络与肝纤维化. *临床外科杂志* 2005; 13: 456-458
- 29 Thalheimer U, Triantos CK, Samonakis DN, Patch D, Burroughs AK. Infection, coagulation, and variceal bleeding in cirrhosis. *Gut* 2005; 54: 556-563
- 30 Andus T, Geiger T, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich PC. Action of recombinant human interleukin 6, interleukin 1 beta and tumor necrosis factor alpha on the mRNA induction of acute-phase proteins. *Eur J Immunol* 1988; 18: 739-746
- 31 Faouzi S, Lepreux S, Bedin C, Dubuisson L, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Desmouliere A, Rosenbaum J. Activation of cultured rat hepatic stellate cells by tumoral hepatocytes. *Lab Invest* 1999; 79: 485-493
- 32 Maher JJ, Lozier JS, Scott MK. Rat hepatic stellate cells produce cytokine-induced neutrophil chemoattractant in culture and in vivo. *Am J Physiol* 1998; 275: G847-G853
- 33 Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells--a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d808-d826
- 34 Diehl AM. Tumor necrosis factor and its potential role in insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 619-638
- 35 Prosser CC, Yen RD, Wu J. Molecular therapy for hepatic injury and fibrosis: where are we? *World J Gastroenterol* 2006; 12: 509-515
- 36 Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001; 104: 487-501
- 37 Gores GJ, Kaufmann SH. Is TRAIL hepatotoxic? *Hepatology* 2001; 34: 3-6
- 38 Rivero M, Crespo J, Fabrega E, Casafont F, Mayorga M, Gomez-Fleitas M, Pons-Romero F. Apoptosis mediated by the Fas system in the fulminant hepatitis by hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 2002; 9: 107-113
- 39 Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 891-902
- 40 Minagawa M, Deng Q, Liu ZX, Tsukamoto H, Dennert G. Activated natural killer T cells induce liver injury by Fas and tumor necrosis factor-alpha during alcohol consumption. *Gastroenterology* 2004; 126: 1387-1399
- 41 Realdon S, Gerotto M, Dal Pero F, Marin O, Granato A, Basso G, Muraca M, Alberti A. Proapoptotic effect of hepatitis C virus CORE protein in transiently transfected cells is enhanced by nuclear localization and is dependent on PKR activation. *J Hepatol* 2004; 40: 77-85
- 42 Jaeschke H, Gujral JS, Bajt ML. Apoptosis and necrosis in liver disease. *Liver Int* 2004; 24: 85-89
- 43 Parise ER, de Oliveira AC, Conceicao RD, Amaral AC, Leite K. Response to treatment with interferon-alpha and ribavirin in patients with chronic Hepatitis C virus genotypes 2 and 3 depends on the degree of hepatic fibrosis. *Braz J Infect Dis* 2006; 10: 78-81
- 44 Wang SC, Ohata M, Schrum L, Rippe RA, Tsukamoto H. Expression of interleukin-10 by in vitro and in vivo activated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 302-308
- 45 Louis H, Van Laethem JL, Wu W, Quertinmont E, Degraef C, Van den Berg K, Demols A, Goldman M, Le Moine O, Geerts A, Deviere J. Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Hepatology* 1998; 28: 1607-1615
- 46 翁山耕, 冷希圣, 魏玉华, 彭吉润, 杜如昱, 白介素-10抑制肝星状细胞细胞间黏附分子-1的表达. *中华消化杂志* 2001; 21: 458-460
- 47 Hellerbrand, Wang SC, Tsukamoto H, Brenner DA, Rippe RA. Expression of intracellular adhesion molecule 1 by activated hepatic stellate cells. *Hepatology* 1996; 24: 670-676
- 48 Reitamo S, Remitz A, Tamai K, Uitto J. Interleukin-10 modulates type I collagen and matrix metalloprotease gene expression in cultured human skin fibroblasts. *J Clin Invest* 1994; 94: 2489-2492
- 49 Louis H, Le Moine O, Peny MO, Gulbis B, Nisol F, Goldman M, Deviere J. Hepatoprotective role of interleukin 10 in galactosamine/lipopolysaccharide mouse liver injury. *Gastroenterology* 1997; 112: 935-942
- 50 Nelson DR, Lauwers GY, Lau JY, Davis GL. Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a pilot trial of interferon nonresponders. *Gastroenterology* 2000; 118: 655-660
- 51 Hung KS, Lee TH, Chou WY, Wu CL, Cho CL, Lu CN, Jawan B, Wang CH. Interleukin-10 gene therapy reverses thioacetamide-induced liver fibrosis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336: 324-331

编辑 程剑侠 电编 李军亮

# 基质细胞衍生因子-1/CXCR4轴与肝脏疾病

牟晓洋, 周浩锋, 雷正明

牟晓洋, 周浩锋, 雷正明, 泸州医学院附属医院肝胆外科 四川省泸州市 646000  
通讯作者: 雷正明, 646000, 四川省泸州市, 泸州医学院附属医院肝胆外科. leizhm@medmail.com.cn  
电话: 0830-3165902 传真: 0830-3165902  
收稿日期: 2007-08-03 修回日期: 2007-09-11

## Relationship between stromal cell-derived factor-1/CXC chemokine receptor 4 axis and liver disease

Xiao-Yang Mou, Hao-Feng Zhou, Zheng-Ming Lei

Xiao-Yang Mou, Hao-Feng Zhou, Zheng-Ming Lei, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Correspondence to: Dr. Zheng-Ming Lei, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. leizhm@medmail.com.cn

Received: 2007-08-03 Revised: 2007-09-11

### Abstract

The chemokine stromal-derived factor-1 (SDF-1) and CXC chemokine receptor 4 (CXCR4) axis, and its signaling transduction pathway in liver diseases, have been the focus of intense investigation worldwide. It has been demonstrated that the SDF-1/CXCR4 signaling pathway has implications for many liver diseases, including hepatic regeneration, hepatitis, cirrhosis, and liver tumor, but the exact mechanism remain unclear. Furthermore, the interaction of SDF-1 and CXCR4 promotes hepatoma cell growth, enhances tumor migration and invasion, and contributes to tumor metastasis within the tumor microenvironment. In this review, we consider the pathological characteristics and mechanism of the SDF-1/CXCR4 pathway in hepatic regeneration, hepatitis and liver tumors.

**Key Words:** Stromal cell-derived factor-1; CXC chemokine receptor 4; Liver diseases; Metastasis

Mou XY, Zhou HF, Lei ZM. Relationship between stromal cell-derived factor-1/CXC chemokine receptor 4 axis and liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(27): 2891-2896

### 摘要

基质细胞衍生因子-1(SDF-1)/CXCR4轴及其介导的细胞信号转导通路在肝脏疾病中的作用是国内外研究的热点. 研究发现SDF-1/CXCR4信号转导途径与肝脏再生、炎症、肝硬化以及肿瘤等疾病有关, 但其具体机制尚未完全清楚. 在细胞微环境中, SDF-1/CXCR4相互作用促进肝癌细胞生长, 增强肿瘤的迁移、浸润以及转移能力. 本文就SDF-1/CXCR4通路在肝再生、炎症、肿瘤疾病中的病理特征和致病机制的研究进展作一综述.

**关键词:** 基质细胞衍生因子-1/SDF-1; CXCR4; 肝脏疾病; 转移

牟晓洋, 周浩锋, 雷正明. 基质细胞衍生因子-1/CXCR4轴与肝脏疾病. *世界华人消化杂志* 2007;15(27):2891-2896

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2891.asp>

### 0 引言

趋化因子(chemokine)是一大群由机体内淋巴细胞、巨噬细胞、间质细胞等多种组织细胞分泌的低分子质量细胞因子. 根据其一级结构N端四个保守的Cys之间的相互位置及功能键的情况将其分为CC, CXC, C, CX3C家族. 趋化因子受体(chemokine receptor)是一类表达于不同类型细胞上的能与趋化因子结合的含有七个跨膜区的G蛋白耦联受体. 趋化因子是具有激活、促进相应靶细胞沿其浓度梯度定向运动的生物活性分子, 与相应的受体结合后形成复杂的生物信号传导网络系统, 参与多种生理和病理过程, 如细胞生长、分化、凋亡, 组织损伤修复, 肿瘤的生长和转移等. 一种趋化因子通常可以结合多种受体, 同一趋化因子受体也可以与一种以上的趋化因子结合. 但是基质细胞衍生因子-1(chemokine stromal-derived factor, SDF-1)例外, SDF-1具有专一性, 将CXCR4作为其唯一受体. SDF-1与其受体CXCR4形成的生物轴系统, 是少数几个具有点对点定向信号转导的趋化因子系统之一. 因此相比其他趋化因子及受体, SDF-1/CXCR4轴具有更重要生物学作用.

### 背景资料

趋化因子受体及其配体广泛参与机体各种病理生理过程, SDF-1/CXCR4轴具有点对点定向信号转导特点, 其介导的细胞信号转导通路参与肝脏炎症、免疫以及损伤修复等, 特别是肝脏肿瘤的生长和转移, 是近来的研究热点.



研发前沿  
SDF-1/CXCR4信号转导途径与肝脏再生、炎症、肝硬化以及肿瘤等疾病有关,但其具体机制尚未完全清楚.需进一步从分子生物学、基因学、蛋白组学等水平研究SDF-1/CXCR4轴调控肝脏疾病的机制.

近来研究证实SDF-1/CXCR4轴及其介导的细胞信号转导通路参与多种肝脏疾病的发生发展,主要涉及炎症、免疫、肿瘤以及损伤修复等,但其具体机制尚未完全清楚.本文主要对SDF-1/CXCR4轴在肝脏的损伤修复、炎症发展、肿瘤的浸润转移方面的研究进展进行综述.

## 1 SDF-1/CXCR4轴概述

SDF-1又称之为CXCL12,通过与其受体CXCR4间的信号传递作用维持内环境稳态,在造血、发育和免疫等方面起重要作用<sup>[1]</sup>.SDF-1是一种高度保守的趋化因子,人和鼠具有99%的同源性.CXCR4是SDF-1的唯一受体,为G蛋白偶联七次跨膜受体,可在CD34<sup>+</sup>造血干细胞、单核白细胞和多种基质细胞表达.因其配体SDF-1为CXC家族成员,故按CXC受体编号命名为CXCR4<sup>[2]</sup>.

SDF-1/CXCR4广泛地表达于多种细胞和组织中,包括免疫细胞、骨髓、脑、心、肾、肝、肺和脾等.SDF-1和CXCR4相互作用可触发产生多种细胞内信号传递,包括钙动员和磷酸化,如细胞外信号调节激酶1/2(extracellular signal-regulated kinases 1/2, ERK1/2)、黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)、磷酸肌醇-3激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)和蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)等的磷酸化<sup>[3-4]</sup>.在一些生物如斑马鱼和小鼠的进化发育过程中,SDF-1/CXCR4轴具有重要作用,CXCR4表达是生殖细胞向SDF-1表达阳性的生殖腺定向迁移的必备条件<sup>[5-6]</sup>.在人类,SDF-1/CXCR4轴参与多种生理和病理过程,其生物学作用主要有:(1)参与胚胎发育过程<sup>[7-8]</sup>;(2)调控造血干细胞迁移及归巢<sup>[9-11]</sup>;(3)介导免疫及炎症反应<sup>[1,12-13]</sup>;(4)诱导新生血管形成<sup>[14-16]</sup>;(5)介导HIV感染<sup>[17-19]</sup>;(6)调节恶性肿瘤的生长、浸润转移等<sup>[20-24]</sup>.

## 2 SDF-1/CXCR4轴与肝脏疾病的相关性

**2.1 SDF-1/CXCR4轴参与肝脏损伤的修复** 肝脏损伤时,SDF-1和CXCR4相互作用,一方面动员骨髓中造血干细胞迁移至肝实质<sup>[25]</sup>,更重要的是诱导肝脏内源性卵圆细胞的增殖.通过研究大鼠2-乙酰氨基苄加部分肝切除(2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy, 2AAF/PH)模型,发现在大范围的肝损伤模型中表达CXCR4的卵圆细胞参与修复肝损伤<sup>[26]</sup>.Mavrier *et al*<sup>[27]</sup>也通过研究2-AAF/PH模型,发现门静脉周围存在大量的卵

圆细胞,在部分肝切除术后9-14 d达到高峰,随后下降,卵圆细胞明显表达SDF-1蛋白和SDF-1 mRNA.原位杂交显示卵圆细胞也表达CXCR4 mRNA,肝内CXCR4表达水平与卵圆细胞数量平行.Zheng *et al*<sup>[28]</sup>证实了上述观点,经siRNA处理后的肝组织SDF-1表达下降,卵圆细胞活化机制受损,影响肝脏的再生修复.以上研究结果提示SDF-1/CXCR4可通过自分泌或旁分泌,促进休眠的肝干细胞活化形成卵圆细胞,或者直接刺激内源性卵圆细胞增殖,促进肝再生.

上述研究证实适宜的细胞微环境有助于卵圆细胞的增殖、分化.SDF-1/CXCR4轴参与肝脏损伤修复的机制可能为:在受损肝组织,SDF-1从肝小叶中央静脉周围至汇管区形成由高到低的浓度梯度,通过SDF-1/CXCR4信号传导途径,靠近中央静脉的表达CXCR4的卵圆细胞优先增殖修复肝脏.其具体生物学机制有待进一步研究证实.

**2.2 SDF-1/CXCR4轴介导肝脏炎症** 与炎症细胞介导的细胞毒杀伤作用是产生肝脏炎症的主要原因.Terada *et al*<sup>[29]</sup>研究75例包括正常对照组、病毒性肝炎、肝硬化、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎以及自身免疫性肝炎患者,发现SDF-1的表达出现在小叶间汇管区的胆管上皮细胞以及增生的胆小管,流式细胞分析发现大多数肝脏炎症浸润的淋巴细胞可表达CXCR4,其表达强度与受浸润的淋巴细胞数量有关,且明显高于外周血淋巴细胞.正常肝组织中胆管上皮细胞也可少量表达SDF-1,但慢性HBV和HCV感染后产生胆管增殖和肝纤维化,导致肝组织中SDF-1重新分布<sup>[30]</sup>:活化的炎性病灶的新生血管内皮SDF-1表达上调,肝脏炎症浸润的淋巴细胞表达CXCR4.除肝脏组织自身SDF-1/CXCR表达上调外,肝炎患者外周血中SDF-1表达水平显著高于正常对照组<sup>[29]</sup>,晚期肝硬化患者血浆中可显著检测到SDF-1<sup>[30]</sup>.动物实验也证实SDF-1/CXCR4轴与肝脏炎症相关,阻断SDF-1/CXCR轴则可能减轻或逆转肝脏炎症反应,Kaneko *et al*<sup>[31]</sup>研究发现刀豆素a(concanavalin A)致肝损伤模型中,鞘氨醇-1-磷酸(sphingosine-1-phosphate, S1P)受体激动剂KRP-203,优先将CXCR4表达阳性的外周血CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞作为靶细胞,阻止刀豆素a介导的肝炎发生,有效降低血清转氨酶峰值.

肝移植排斥反应产生的肝脏炎症中,局部活化的趋化因子触发部分特殊亚群的效应子与

移植物产生排斥. Goddard *et al*<sup>[32]</sup>通过免疫组织化学检测,发现CXCR4在循环系统和肝移植浸润的淋巴细胞中表达增强,但仅胆管上皮能检测到SDF-1,认为在肝移植排斥反应中SDF-1介导淋巴细胞的动员和定向分布,而CXCR4则可能涉及记忆和储存淋巴细胞。

因此SDF-1/CXCR4通路对肝脏炎症中免疫细胞的补充、储存起重要作用,其机制可能为:肝脏炎症组织中胆管上皮细胞分泌的SDF-1增加,导致SDF-1重新分布,激活SDF-1/CXCR4信号通路,动员募集CXCR4<sup>+</sup>炎症细胞,通过细胞免疫机制介导肝脏炎症。但是肝脏炎症刺激是否也强化SDF-1/CXCR4的表达和如何调节其信号传导通路,尚需进一步研究证实。

### 2.3 SDF-1/CXCR4轴与肝脏恶性肿瘤

**2.3.1 SDF-1/CXCR4轴与原发肝癌** 研究也发现多种实体肿瘤细胞中SDF-1/CXCR4表达上调. Schimanski *et al*<sup>[33]</sup>发现肝细胞癌中CXCR4表达与肿瘤的进展程度、淋巴道转移、远处播散以及3年生存率下降显著相关。有学者在肝癌细胞株Huh7检测到SDF-1和CXCR4 mRNA,认为SDF-1能识别肝癌细胞株Huh7的细胞骨架,诱导FAK酪氨酸磷酸化,激活基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)增强Huh7的迁移和浸润能力<sup>[34]</sup>。但也有研究结果表明SDF-1/CXCR4表达水平与其功能不一致,低转移潜能的肝癌细胞株HepG2可检测到CXCR4表达,但结合了SDF-1后却不能激发下游信号产生钙内流、磷酸化以及CXCR4内吞, HepG2上的CXCR4对SDF-1存在功能性无应答<sup>[35]</sup>。不同进展期的肝细胞癌、不同类型的肝细胞癌细胞株,其SDF-1/CXCR4表达可能不一致, CXCR4表达强度可能与肝细胞癌的进展程度密切相关,其蛋白表达增加可能预示癌细胞的转移能力增强。

有研究报道癌细胞能够阻止SDF-1和CXCR4结合所介导的信号传递,但确切机制尚不清楚。国内Xue *et al*<sup>[36]</sup>通过RT-PCR分析侵袭转移潜能逐渐增强的人肝癌细胞株SMMC-7721、MHCC97-L、MHCC97-H和HCCLM6趋化因子受体谱,发现随着转移潜能增加,肝癌细胞株的CXCR4表达水平逐渐降低。肝细胞癌株的体外实验研究结果与肝细胞癌的临床研究结果不一致。肿瘤细胞在动物体内的侵袭转移是个多步骤多因素的过程,所以体内肝癌原发灶以及转移灶局部微环境可能会引起肝癌细胞SDF-1/CXCR4功能性改变, SDF-1/CXCR4与原发肝癌

癌的关系值得进一步研究。

**2.3.2 SDF-1/CXCR4轴与转移性肝癌** 临床上恶性肿瘤的肝转移比较常见。研究肠癌的肝转移机制,发现正常肠黏膜、息肉至肠癌及肠癌肝转移灶CXCR4表达呈渐进性增长<sup>[37]</sup>。SDF-1/CXCR4生物学轴在非小细胞肺癌的器官特异性转移中发挥重要作用,在其转移性肝癌组织中SDF-1的表达比原发肿瘤及血清中高,且形成浓度梯度,促进肿瘤细胞的迁徙、转移<sup>[38]</sup>。Rubie *et al*<sup>[39]</sup>通过临床研究11例肝细胞癌和23例结直肠癌肝转移癌(colorectal liver metastases, CRLM)标本和癌周组织的SDF-1基因表达,与癌周组织相比,肝细胞癌中CXCR4表达无明显差异,而CRLM的CXCR4表达却显著上调。因此, SDF-1和CXCR4在CRLM中的表达相反, CXCR4在肝细胞癌和CRLM的表达也存在明显不同。在恶性肿瘤的肝转移中, SDF-1/CXCR4轴发挥着极其重要作用,其机制可能为表达CXCR4的肿瘤细胞沿SDF-1浓度梯度迁移至表达SDF-1的器官组织,形成转移灶。

**2.3.3 SDF-1/CXCR4轴参与原发性肝癌浸润转移的机制** 肿瘤细胞转移到远处,局部特定的细胞微环境能防止肿瘤细胞凋亡,并形成转移瘤<sup>[21]</sup>。研究证实SDF-1/CXCR4相互作用参与多种实体肿瘤的浸润转移,肿瘤细胞的动员、转移、归巢、增殖、扩散是一个多级联过程: (1)动员肿瘤细胞从原始肿瘤脱落,被动员的肿瘤细胞内源性SDF-1浓度下降、CXCR4表达上调<sup>[40]</sup>; (2)受趋化因子作用经血循环或淋巴道定向转移, SDF-1增加细胞的定向运动性和趋化性<sup>[41]</sup>; (3)接受趋化信号黏附于内皮组织, SDF-1增加肿瘤细胞的黏附能力<sup>[42]</sup>, CXCR4信号传递和黏附分子存在相互促进作用<sup>[43]</sup>; (4)肿瘤细胞浸润生长, SDF-1/CXCR4在浸润组织促进新生血管形成<sup>[16,44]</sup>; (5)在特定的微环境存活、增殖和扩散, SDF-1能提高肿瘤细胞的存活率,提高肿瘤细胞的增殖能力<sup>[45]</sup>。肿瘤细胞在脱离细胞外基质黏附和细胞间接触后,通过自分泌或旁分泌机制抗失巢凋亡而获得存活能力,从而得以扩散,侵袭和转移<sup>[46-47]</sup>。由此可见, SDF-1/CXCR4轴参与癌细胞播散转移的全部过程,阻断SDF-1和CXCR4间的信号传递可有效防止恶性肿瘤的转移。

不同肿瘤实体CXCR4的表达可能与肿瘤的播散和预后相关,肝癌也有类似现象<sup>[33]</sup>。有研究发现CXCR4与SDF-1结合后激活ERK1/2和PI3K信号传递途径,提高肌动蛋白聚合水平,诱导胆

**创新盘点**  
目前国内外针对SDF-1/CXCR4轴与肝脏疾病的研究甚少。本文通过介绍SDF-1/CXCR4轴信号传导通路在肝脏疾病中的双重作用,重点阐述了SDF-1/CXCR4轴依靠SDF-1蛋白表达的浓度梯度进行信号传导,参与肝脏损伤修复、炎症发展、肿瘤的浸润转移等方面的可能机制。

**应用要点**  
研究不同病理生理条件下SDF-1/CXCR4轴信号传导机制, 有助于进一步积极预防和治疗肝脏疾病。

管癌细胞的浸润侵袭<sup>[48]</sup>。肝脏恶性肿瘤细胞的转移机制可能为: 在特定的病理条件下(如创伤、手术、机体免疫力下降等), CXCR4表达增强的肿瘤细胞迁移侵袭能力增加, 易受肿瘤细胞侵犯的组织或细胞表达SDF-1也增加, 通过SDF-1/CXCR4轴作用, 表达CXCR4的肿瘤细胞倾向于沿SDF-1浓度梯度转移至SDF-1高浓度的组织或细胞, 通过自分泌或旁分泌机制抗失巢凋亡, 形成转移灶。原发性肝癌的转移特点是易侵犯门静脉分支, 癌栓经门静脉系统形成肝内播散。SDF-1/CXCR4轴在肝癌浸润转移的作用机制能否解释癌细胞进入门静脉后并不随血流离开而在门静脉局部停留、生长形成癌栓, 则需进一步研究证实。

### 3 结论

总之, SDF-1/CXCR4轴信号传导通路在肝脏疾病中可能有双重作用, 一方面增强机体自身防御能力, 不仅能动员骨髓造血干细胞、内源性卵圆细胞等修复受损肝脏, 而且募集炎症浸润的淋巴细胞, 通过细胞免疫机制介导肝脏炎症; 另一方面增强肝脏恶性肿瘤细胞的浸润侵袭能力, 导致癌细胞的转移。研究不同病理生理条件下SDF-1/CXCR4轴信号传导机制, 有助于进一步积极治疗肝脏疾病。

SDF-1和CXCR4可有效地诱导、活化、趋化免疫效应细胞, 正确调控这些免疫细胞分子生物学机制, 阻断异常的信号传导通路, 将进一步有效治疗肝炎, 促进肝再生修复, 防止肝移植后排斥反应。SDF-1/CXCR4轴如何调控肝脏肿瘤的侵袭、转移, 是否还存在肿瘤组织特异性或靶向器官特异性的其他趋化因子/趋化因子受体生物学轴, 他们与SDF-1/CXCR4轴有何联系等, 这些问题都有待于进一步研究和论证。抑制CXCR4活化的小分子化合物、小分子干扰RNA、核酶、反义核酸等将成为针对SDF-1/CXCR4轴的抗肿瘤新药研究的重点<sup>[49-50]</sup>。已证实高转移和高侵袭性的肿瘤细胞多可表达CXCR4, 将表达SDF-1的细胞作为载体, 将抗肿瘤药物、抑癌基因、放射性核素或细胞毒素与SDF-1融合, 对高表达CXCR4的肿瘤细胞的分子靶向治疗有望成为新的抗肿瘤方法。

### 4 参考文献

- 1 Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12: 121-127
- 2 Murdoch C. CXCR4: chemokine receptor

- extraordinaire. *Immunol Rev* 2000; 177: 175-184
- 3 Roland J, Murphy BJ, Ahr B, Robert-Hebmann V, Delauzun V, Nye KE, Devaux C, Biard-Piechaczyk M. Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1-mediated signaling. *Blood* 2003; 101: 399-406
- 4 Wang JF, Park IW, Groopman JE. Stromal cell-derived factor-1alpha stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C. *Blood* 2000; 95: 2505-2513
- 5 Knaut H, Werz C, Geisler R, Nusslein-Volhard C. A zebrafish homologue of the chemokine receptor Cxcr4 is a germ-cell guidance receptor. *Nature* 2003; 421: 279-282
- 6 Molyneaux KA, Zinszner H, Kunwar PS, Schaible K, Stebler J, Sunshine MJ, O'Brien W, Raz E, Littman D, Wylie C, Lehmann R. The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development* 2003; 130: 4279-4286
- 7 Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 1998; 393: 595-599
- 8 Doitsidou M, Reichman-Fried M, Stebler J, Koprunner M, Dorries J, Meyer D, Esguerra CV, Leung T, Raz E. Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. *Cell* 2002; 111: 647-659
- 9 Ratajczak MZ, Kucia M, Reza R, Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells 'hide out' in the bone marrow. *Leukemia* 2004; 18: 29-40
- 10 Alsayed Y, Ngo H, Runnels J, Leleu X, Singha UK, Pitsillides CM, Spencer JA, Kimlinger T, Ghobrial JM, Jia X, Lu G, Timm M, Kumar A, Cote D, Veilleux I, Hedin KE, Roodman GD, Witzig TE, Kung AL, Hideshima T, Anderson KC, Lin CP, Ghobrial IM. Mechanisms of regulation of CXCR4/SDF-1 (CXCL12)-dependent migration and homing in multiple myeloma. *Blood* 2007; 109: 2708-2717
- 11 Basu S, Ray NT, Atkinson SJ, Broxmeyer HE. Protein Phosphatase 2A Plays an Important Role in Stromal Cell-Derived Factor-1/CXC Chemokine Ligand 12-Mediated Migration and Adhesion of CD34+ Cells. *J Immunol* 2007; 179: 3075-3085
- 12 Petty JM, Sueblinvong V, Lenox CC, Jones CC, Cosgrove GP, Cool CD, Rai PR, Brown KK, Weiss DJ, Poynter ME, Suratt BT. Pulmonary stromal-derived factor-1 expression and effect on neutrophil recruitment during acute lung injury. *J Immunol* 2007; 178: 8148-8157
- 13 McCandless EE, Wang Q, Woerner BM, Harper JM, Klein RS. CXCL12 limits inflammation by localizing mononuclear infiltrates to the perivascular space during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2006; 177: 8053-8064
- 14 Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S, Kishimoto T, Nagasawa T. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 1998; 393: 591-594
- 15 Petit I, Jin D, Rafii S. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends Immunol* 2007; 28: 299-307
- 16 Liang Z, Brooks J, Willard M, Liang K, Yoon Y, Kang S, Shim H. CXCR4/CXCL12 axis promotes VEGF-

- mediated tumor angiogenesis through Akt signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 359: 716-722
- 17 Feng Z, Dubyak GR, Lederman MM, Weinberg A. Cutting edge: human beta defensin 3--a novel antagonist of the HIV-1 coreceptor CXCR4. *J Immunol* 2006; 177: 782-786
  - 18 Hunt PW, Harrigan PR, Huang W, Bates M, Williamson DW, McCune JM, Price RW, Spudich SS, Lampiris H, Hoh R, Leigler T, Martin JN, Deeks SG. Prevalence of CXCR4 tropism among antiretroviral-treated HIV-1-infected patients with detectable viremia. *J Infect Dis* 2006; 194: 926-930
  - 19 Kourtis AP, Ibegbu CC, Theiler R, Xu YX, Bansil P, Jamieson DJ, Lindsay M, Butera S, Duerr A. Breast milk CD4+ T cells express high levels of C chemokine receptor 5 and CXC chemokine receptor 4 and are preserved in HIV-infected mothers receiving highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2007; 195: 965-972
  - 20 Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005; 121: 335-348
  - 21 Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 2006; 107: 1761-1767
  - 22 Smith JR, Falkenhagen KM, Coupland SE, Chipps TJ, Rosenbaum JT, Brazier RM. Malignant B cells from patients with primary central nervous system lymphoma express stromal cell-derived factor-1. *Am J Clin Pathol* 2007; 127: 633-641
  - 23 Alsayed Y, Ngo H, Runnels J, Leleu X, Singha UK, Pitsillides CM, Spencer JA, Kimlinger T, Ghobrial JM, Jia X, Lu G, Timm M, Kumar A, Cote D, Veilleux I, Hedin KE, Roodman GD, Witzig TE, Kung AL, Hideshima T, Anderson KC, Lin CP, Ghobrial IM. Mechanisms of regulation of CXCR4/SDF-1 (CXCL12)-dependent migration and homing in multiple myeloma. *Blood* 2007; 109: 2708-2717
  - 24 Li H, Fan X, Houghton J. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J Cell Biochem* 2007; 101: 805-815
  - 25 Kollet O, Shviti S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, Kahn J, Spiegel A, Dar A, Samira S, Goichberg P, Kalinkovich A, Arenzana-Seisdedos F, Nagler A, Hardan I, Revel M, Shafritz DA, Lapidot T. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest* 2003; 112: 160-169
  - 26 Hatch HM, Zheng D, Jorgensen ML, Petersen BE. SDF-1alpha/CXCR4: a mechanism for hepatic oval cell activation and bone marrow stem cell recruitment to the injured liver of rats. *Cloning Stem Cells* 2002; 4: 339-351
  - 27 Mavrier P, Martin N, Couchie D, Preaux AM, Laperche Y, Zafrani ES. Expression of stromal cell-derived factor-1 and of its receptor CXCR4 in liver regeneration from oval cells in rat. *Am J Pathol* 2004; 165: 1969-1977
  - 28 Zheng D, Oh SH, Jung Y, Petersen BE. Oval cell response in 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy rat is attenuated by short interfering RNA targeted to stromal cell-derived factor-1. *Am J Pathol* 2006; 169: 2066-2074
  - 29 Terada R, Yamamoto K, Hakoda T, Shimada N, Okano N, Baba N, Ninomiya Y, Gershwin ME, Shiratori Y. Stromal cell-derived factor-1 from biliary epithelial cells recruits CXCR4-positive cells: implications for inflammatory liver diseases. *Lab Invest* 2003; 83: 665-672
  - 30 Wald O, Pappo O, Safadi R, Dagan-Berger M, Beider K, Wald H, Franitza S, Weiss I, Avniel S, Boaz P, Hanna J, Zamir G, Eid A, Mandelboim O, Spengler U, Galun E, Peled A. Involvement of the CXCL12/CXCR4 pathway in the advanced liver disease that is associated with hepatitis C virus or hepatitis B virus. *Eur J Immunol* 2004; 34: 1164-1174
  - 31 Kaneko T, Murakami T, Kawana H, Takahashi M, Yasue T, Kobayashi E. Sphingosine-1-phosphate receptor agonists suppress concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 345: 85-92
  - 32 Goddard S, Williams A, Morland C, Qin S, Gladue R, Hubscher SG, Adams DH. Differential expression of chemokines and chemokine receptors shapes the inflammatory response in rejecting human liver transplants. *Transplantation* 2001; 72: 1957-1967
  - 33 Schimanski CC, Bahre R, Gockel I, Muller A, Frerichs K, Horner V, Teufel A, Simiontonaki N, Biesterfeld S, Wehler T, Schuler M, Achenbach T, Junginger T, Galle PR, Moehler M. Dissemination of hepatocellular carcinoma is mediated via chemokine receptor CXCR4. *Br J Cancer* 2006; 95: 210-217
  - 34 Sutton A, Friand V, Brule-Donneger S, Chaigneau T, Zioli M, Sainte-Catherine O, Poire A, Saffar L, Kraemer M, Vassy J, Nahon P, Salzmann JL, Gattegno L, Charnaux N. Stromal cell-derived factor-1/chemokine (C-X-C motif) ligand 12 stimulates human hepatoma cell growth, migration, and invasion. *Mol Cancer Res* 2007; 5: 21-33
  - 35 Mitra P, De A, Ethier MF, Mimori K, Kodys K, Shibuta K, Mori M, Madison JM, Miller-Graziano C, Barnard GF. Loss of chemokine SDF-1alpha-mediated CXCR4 signalling and receptor internalization in human hepatoma cell line HepG2. *Cell Signal* 2001; 13: 311-319
  - 36 Xue TC, Chen RX, Ye SL, Sun RX, Chen J, Tang ZY. Different expressions of chemokine receptors in human hepatocellular carcinoma cell lines with different metastatic potentials. *Zhonghua Ganzang bing Zazhi* 2007; 15: 261-265
  - 37 Ottaiano A, di Palma A, Napolitano M, Pisano C, Pignata S, Tatangelo F, Botti G, Acquaviva AM, Castello G, Ascierto PA, Iaffaioli RV, Scala S. Inhibitory effects of anti-CXCR4 antibodies on human colon cancer cells. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54: 781-791
  - 38 Phillips RJ, Burdick MD, Lutz M, Belperio JA, Keane MP, Strieter RM. The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 1676-1686
  - 39 Rubie C, Frick VO, Wagner M, Weber C, Kruse B, Kempf K, Konig J, Rau B, Schilling M. Chemokine expression in hepatocellular carcinoma versus colorectal liver metastases. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6627-6633
  - 40 Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, Ponomarev T, Taichman RS, Arenzana-Seisdedos F, Fujii N, Sandbank J, Zipori D, Lapidot T. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol* 2002; 3: 687-694
  - 41 Libura J, Drukala J, Majka M, Tomescu O, Navenot

## 名词解释

失巢凋亡: 细胞与细胞外基质和其他细胞失去接触或接触不充分诱导的一种程序化细胞死亡,称为失巢凋亡(anoikis). 抗失巢凋亡作用在肿瘤扩散和转移中可能扮演一个重要角色.

同行评价  
本文内容充实, 条理清晰, 具有较强的科学性和指导意义.

- JM, Kucia M, Marquez L, Peiper SC, Barr FG, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. CXCR4-SDF-1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion, chemotaxis, and adhesion. *Blood* 2002; 100: 2597-2606
- 42 Wysoczynski M, Reca R, Ratajczak J, Kucia M, Shirvaikar N, Honczarenko M, Mills M, Wanzeck J, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Incorporation of CXCR4 into membrane lipid rafts primes homing-related responses of hematopoietic stem/progenitor cells to an SDF-1 gradient. *Blood* 2005; 105: 40-48
- 43 Ding Z, Issekutz TB, Downey GP, Waddell TK. L-selectin stimulation enhances functional expression of surface CXCR4 in lymphocytes: implications for cellular activation during adhesion and migration. *Blood* 2003; 101: 4245-4252
- 44 Neuhaus T, Stier S, Totzke G, Gruenewald E, Fronhoffs S, Sachinidis A, Vetter H, Ko YD. Stromal cell-derived factor 1alpha (SDF-1alpha) induces gene-expression of early growth response-1 (Egr-1) and VEGF in human arterial endothelial cells and enhances VEGF induced cell proliferation. *Cell Prolif* 2003; 36: 75-86
- 45 Zhou Y, Larsen PH, Hao C, Yong VW. CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival. *J Biol Chem* 2002; 277: 49481-49487
- 46 Liotta LA, Kohn E. Anoikis: cancer and the homeless cell. *Nature* 2004; 430: 973-974
- 47 Bouchard V, Demers MJ, Thibodeau S, Laquerre V, Fujita N, Tsuruo T, Beaulieu JF, Gauthier R, Vezina A, Villeneuve L, Vachon PH. Fak/Src signaling in human intestinal epithelial cell survival and anoikis: differentiation state-specific uncoupling with the PI3-K/Akt-1 and MEK/Erk pathways. *J Cell Physiol* 2007; 212: 717-728
- 48 Leelawat K, Leelawat S, Narong S, Hongeng S. Roles of the MEK1/2 and AKT pathways in CXCL12/CXCR4 induced cholangiocarcinoma cell invasion. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1561-1568
- 49 Ruffini PA, Morandi P, Cabioglu N, Altundag K, Cristofanilli M. Manipulating the chemokine-chemokine receptor network to treat cancer. *Cancer* 2007; 109: 2392-2404
- 50 Yoon Y, Liang Z, Zhang X, Choe M, Zhu A, Cho HT, Shin DM, Goodman MM, Chen ZG, Shim H. CXCR4 chemokine receptor-4 antagonist blocks both growth of primary tumor and metastasis of head and neck cancer in xenograft mouse models. *Cancer Res* 2007; 67: 7518-7524

编辑 何燕 电编 李军亮

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 欢迎订阅 2008 年《世界华人消化杂志》

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

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

《世界华人消化杂志》2008年由北京报刊发行局发行,国际标准刊号 ISSN 1009-3079,国内统一刊号 CN 14-1260/R,邮发代号82-262,出版日期每月8, 18, 28日,月价72.00,年价864元. 欢迎广大消化科医务工作者及科教人员、各大图书馆订阅. 联系地址: 100023,北京市2345信箱. 联系电话: 010-85381901-1020; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; <http://www.wjgnet.com>.



# 丙型肝炎基因型定量检测及分型检测方法的研究进展

王 静, 王露楠

王静, 中国协和医科大学 北京市 100730  
王露楠, 北京医院卫生部临床检验中心 北京市 100730  
通讯作者: 王露楠, 100730, 北京市, 北京医院卫生部临床检验中心. lunan99@yahoo.com  
电话: 010-58115053  
收稿日期: 2007-05-31 修回日期: 2007-09-18

## Research progress in hepatitis C virus quantity and genotyping assays

Jing Wang, Lu-Nan Wang

Jing Wang, Peking Union Medical College, Beijing 100730, China  
Lu-Nan Wang, National Center for Clinical Laboratories, Beijing Hospital, Beijing 100730, China  
Correspondence to: Lu-Nan Wang, National Center for Clinical Laboratories, Beijing Hospital, Beijing 100730, China. lunan99@yahoo.com  
Received: 2007-05-31 Revised: 2007-09-18

## Abstract

Hepatitis C virus is an RNA virus that can cause liver disease, including cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Since cases of HCV infection have been increasing annually, HCV infection has become a global health problem. Six different genotypes of HCV and more than 70 subtypes have been identified, and patients infected with different HCV genotypes show different responses to antiviral therapy. Therefore, determination of the HCV genotype by accurate and sensitive methods will have a significant impact on clinical therapy. This review summarizes the information about hepatitis C genotyping and global distribution, its clinical symptoms and treatment methods, genotype evidence, the relationship between the genotype and quantity, and genotyping assays.

Key Words: Hepatitis C virus; Genotype

Wang J, Wang LN. Research progress in hepatitis C virus quantity and genotyping assays. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(27): 2897-2902

## 摘要

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)是一种

RNA病毒, 可以引发各种慢性肝病, 其中包括肝硬化和肝细胞癌。全球每年HCV感染的患者数呈上升趋势, 他已成为人类亟待解决的公共卫生难题。HCV可以分为6种主要的基因型以及70多种亚型, 不同的基因型对抗病毒治疗的效果不同。如果在治疗前能通过准确灵敏的检测手段确定HCV的基因型, 将会对临床治疗有重要的意义。本文对HCV基因型全球分布、临床表症与治疗、分型依据以及基因型与定量关系进行了概述, 并重点阐述HCV基因分型的检测技术。

关键词: 丙型肝炎病毒; 基因型

王静, 王露楠. 丙型肝炎基因型定量检测及分型检测方法的研究进展. 世界华人消化杂志 2007;15(27):2897-2902  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2897.asp>

## 0 引言

HCV是单股正链RNA病毒, 全长9.6 kb. HCV病毒基因组由5'非编码区(5'UTR)、3'非编码区(3'UTR)、包膜区(E1和E2)、核心区(C)以及非结构区(NS2-NS5)组成。其中包膜区和核心区编码病毒颗粒, 非结构区在病毒复制和病毒蛋白合成中起重要作用。HCV与瘟病毒和黄病毒的基因组结构相似, 与这些病毒同属于黄病毒族病毒。

由于HCV复制所依赖的RNA聚合酶缺乏校正功能, HCV病毒常表现出高度的变异性。不同的基因结构区变异的程度也不同<sup>[1-2]</sup>。5'UTR是病毒基因组中最保守的区域, NS5A的高度可变区(the hypervariable regions, HVRs)和包膜区最不保守。HVRs的突变可引发免疫逃逸, 并与慢性感染的产生有十分重要的关系<sup>[2-3]</sup>。

## 1 HCV基因型全球分布及流行病学研究

不同地区的HCV基因型也有所不同。毒品静脉注射者一般为1a型, 该类型一般在美国和欧洲很普遍。1b型分布于世界各地是当前最主要的基因型<sup>[4]</sup>。2a和2b型在北美、欧洲和日本比较普遍, 2c型在意大利北部地区较多。3型分布于印度次大陆地区、东南亚以及印度尼西亚地区。4型

背景资料  
丙型肝炎病毒是一种RNA病毒, 能引发多种肝病。HCV根据序列间的差异可分为6种主要的基因型和一系列的亚型。不同基因型其定量检验的结果不同, 同时对治疗的效果也不同。

**相关报道**  
PCR限制性片段长度多态性方法(RFLP)和亚型特异PCR方法是较早出现的HCV基因分型检测方法,但在实验室中并没有广泛应用,目前相关的文献报道较少。

在北非和中东比较多,南非和香港分别发现5型和6型<sup>[5]</sup>。中国主要的基因亚型是1b型占66%,其次是2a型占14%,在广州和昆明地区还发现了少量的6型患者<sup>[6]</sup>。总体来看1、2和3型分布广,但是由于受到人口流动和毒品注射者增多的影响,这种地区分布不是固定不变的。

HCV基因型的地区分布为流行病学研究提供了帮助<sup>[7]</sup>。从基因型分布中我们可以跟踪到人群中HCV爆发的来源。此外,种系分析和群体遗传学的联合应用还能估算出不同基因型的存在时间和传播速率<sup>[8-9]</sup>。

## 2 HCV基因型与临床表症及治疗的关系

感染了HCV的患者通常会引发各种严重的肝病,例如肝硬化和肝细胞癌。目前主要的治疗手段是用 $\alpha$ 干扰素或者与利巴韦林联合使用。如果在治疗后期患者血清中的HCV RNA被清除并能维持6 mo,就有持续病毒学应答(the sustained viral response, SVR),说明治疗是有效的<sup>[10]</sup>。抗病毒治疗的效果受到多方面因素的影响,例如HCV基因型、病毒载量以及患者年龄、性别和肝纤维化的程度。其中HCV基因型被认为在临床治疗方面影响最大。大量的临床试验表明,当利巴韦林和 $\alpha$ 干扰素联合治疗时,1型患者的治疗效果没有2、3型的效果好<sup>[11]</sup>。联合治疗24 wk后,只有16%的1型患者对联合治疗有持续病毒学应答(SVR),而2、3型能达到70%。治疗48 wk后,1型能提高到30%,2、3型仍能保持70%左右。4、5、6型以及各种HCV亚型的治疗效果没有1-3型的明显,原因仍需进一步研究。

为什么对一些HCV基因型的治疗效果好,而另一些治疗效果却不好,目前还没有明确的理论依据。丙肝病毒复制所依赖的无校正功能的RNA聚合酶可产生不同的HCV基因型。各种HCV基因组序列不同,所编码的蛋白质结构及功能也存在差异,可能造成对 $\alpha$ 干扰素治疗敏感度的不同<sup>[12-13]</sup>。有研究指出HCV基因组的某些区域及其编码蛋白质可能对 $\alpha$ 干扰素的治疗有抑制作用,但是目前还没确定是哪个区域起作用,仍需要进一步研究。

## 3 HCV基因型的依据

自从1991年Choo *et al*发现丙型肝炎病毒并确定基因组后,陆续有大量的HCV分离株被发现,他们有不同的核酸序列。确定这些病毒株的归属对于今后的研究工作有很大的帮助。HCV由多

个区域组成,选择哪个区域作为分型依据成为问题的关键。5'UTR的序列保守,种系变化程度以及进化率都很低<sup>[14]</sup>,用于区分HCV主要基因型。但是,1型和6型在5'UTR的序列相似,需要通过其他的区域进行区分,这一点对6型经常出现的东南亚国家应该引起重视<sup>[15]</sup>。同时也有研究表明,在5'UTR序列中会发生113或116 bp缺失,缺失区域从126或129位到124位<sup>[16]</sup>。该区域部分碱基的缺失对病毒复制和蛋白合成影响不大。NS5b区域的变异大,可以很容易区分不同HCV病毒株,常作为区分亚型的主要选择区域<sup>[14-15]</sup>。1993年,Simmonds *et al*<sup>[11]</sup>选择NS5B作为分型区域,利用核酸测序方法和种系分析最终确立HCV分为6种主要基因型以及70多种亚型,这也是目前国际通用的HCV分型命名。除此以外,还有用两个以上的不同区域同时检测,使分型的范围更广,例如core与E1,5'UTR与core<sup>[17-18]</sup>。

## 4 HCV基因型与定量检测的关系

目前,评价 $\alpha$ 干扰素或利巴韦林治疗丙型肝炎效果的主要依据是临床治疗前、中、后期HCV RNA病毒载量变化。可靠的HCV定量方法对病毒监测与临床治疗起至关重要的作用。常见的HCV定量仪器按检测原理可以分为4类:(1)竞争性定量PCR,如Roche的Amplicor HCV Monitor和COBAS Amplicor HCV Monitor。(2)不依赖于PCR的信号放大检测系统,如Bayer的bDNA。(3)以及real time PCR,如Abbott的RT-PCR和Roche的RT-PCR。(4)依赖核酸序列的扩增NASBA<sup>[19]</sup>。

竞争性定量PCR是逆转录和聚合酶链反应一步完成的检测HCV RNA的方法。用已知拷贝数RNA作为内标物与患者样品用同一对引物(其中一个引物标记荧光)扩增,两模板序列大致相同,扩增效率也相同,但扩增存在竞争性。由于内标物与待测模板内切酶位点或部分序列不同,扩增后PCR两种产物可通过限制性内切酶消化PCR产物或用不同的探针进行杂交而分开。Roche Monitor是国际公认的分子诊断金标准,线性范围是从 $6 \times 10^5$  IU/L到 $8 \times 10^8$  IU/L<sup>[20]</sup>。但是不同基因型检测的灵敏度不同,2和3型的检测灵敏度分别只有1型的11%和8%<sup>[21]</sup>。Bayer的分枝DNA(bDNA)是信号放大方法,利用大量捕获探针和带有大量报告分子的信号探针放大HCV RNA的信号。该方法对HCV各种基因型的定量检测结果是可信的<sup>[22]</sup>。但也有研究表明,bDNA 1代和2代检测系统对HCV 1-3型的结果不

同<sup>[21]</sup>. bDNA-1与bDNA-2定量检测1型的效率相似(比率是1.04), 而定量检测2、3型的比率分别是0.22和0.46, 都低于预期值. bDNA的检测范围从 $6.15 \times 10^5$  IU/L到 $7.70 \times 10^9$  IU/L, 在线性范围内重复性很好, 是获得FDA批准的HCV RNA定量检测方法. Real time PCR定量检测HCV RNA有更宽的线性范围 $1 \times 10^3$  IU/L到 $1.07 \times 10^5$  IU/L, 以及完整的自动化检测系统. 他被认为是定量DNA或RNA灵敏度较高的检测手段. 但在检测不同基因型时也会有差异. 当检测HCV1-4型不同基因型时, Abbott的RT-PCR与bDNA检测1-3型的结果一致, 而Roche的RT-PCR与bDNA只有2个基因型(1型和2型)的检测结果一致. NASBA是90年代建立的一种核酸扩增技术, 最早用于HIV RNA定量检测. 与传统的PCR不同, NASBA是由一对引物引导的, 连续均一的体外特异核酸序列等温扩增的酶促反应. 他与bDNA的检测结果有很好的一致性, 并且敏感性比bDNA2.0还高出10倍. 当检测HCV1-5型以及1a和1b亚型时, 检测效率不同. 2型的检测效率最低, 1b型的最高, 两者的差别达到9.7%.

不论是同一种方法检测不同基因型, 还是不同方法检测同一基因型或亚型, 定量结果会出现不一致的情况. 像Real time RT-PCR的定量检测要经过复杂的过程, 核酸的提取、扩增和检测各环节都可能出现问题<sup>[23]</sup>. 引物或探针与模板的错配、区分不同型依赖的靶区域二级结构的差别都可能导致定量不准确. 两种不同原理的定量仪器检测同一基因型时结果不一致, 还有可能受到线性检测范围的影响. 因此, 在应用某种检测方法定量HCV RNA时, 要充分考虑到所选的检测方法以及不同基因型或亚型的影响.

## 5 早期基因分型技术

PCR限制性片段长度多态性方法(RFLP)和亚型特异PCR方法是较早出现的HCV基因分型检测方法. RFLP利用RT-PCR扩增具有不同酶切位点的各种HCV基因型, 再用3-5种不同的限制性内切酶消化PCR产物, 电泳结果与已知限制性片段数据库比较确定基因型. PCR-RFLP扩增的区域可以是5'UTR、核心区以及NS5B<sup>[24-26]</sup>. 扩增5'UTR的PCR-RFLP在检测HCV主要基因型时效果最好. 亚型特异PCR<sup>[27]</sup>其引物扩增HCV的NS5B或核心区, 扩增产物再进行电泳, 根据是否出现特异条带分析结果. 由于其扩增的是HCV

种系信息区域, 在区分亚型方面比扩增5'UTR的方法准确, 同时又比测序的方法简单快速. 但是, 每种亚型只用一对引物扩增, 若基因组突变就无法检测. 由于检测准确性低、成本高等原因, 这两种方法并没有在临床实验室中得到广泛使用.

## 6 商品化分型技术

自线性探针反向杂交技术(LiPA)是临床实验室普遍使用的分型技术之一. 他是利用RT-PCR通过生物素标记的引物扩增HCV 5'UTR, 得到生物素标记的DNA. DNA变性后, 再与固定在纤维素膜上的基因型特异探针杂交, 同时加入碱性磷酸酶和显色剂, 通过LiPA条带放射自显影就能检测HCV基因型. 检测结果与金标准有很好的-一致性. 早期的LiPA只扩增5'UTR, 不能区分1a和1b亚型、4型的亚型以及东南亚6型的变种<sup>[28-30]</sup>. 而目前新一代的LiPA(Bayer VERSANT HCV genotype 2.0)可以准确区分1型与东南亚6c-6l亚型, 并可以根据核心区的序列更准确的区分1a和1b型<sup>[18]</sup>. 该技术与之前基因分型检测结果比较其一致性很高, 是可以信赖的分型方法<sup>[31-32]</sup>. LiPA对HCV低载量患者的检测结果不好, Bayer公司的Comanor和他的同事开发了一种更敏感的转录介导扩增(TMA)-LiPA技术解决这个难题. 他把Bayer HCV TMA技术与LiPA技术联合使用<sup>[33]</sup>. 这种方法利用TMA反应中扩增RNA时产生的少量双链DNA副产物, 与生物素标记的引物退火延伸, 扩增产物再与LiPA条带杂交. TMA技术的高敏感性( $5-10 \times 10^3$  IU/L)使低载量HCV病毒也能检测, 并且研究者还证明了TMA-LiPA与LiPA在检测基因型方面有很好的一致性.

近年出现的Invader HCV是一种荧光探针与内切酶联用的基因分型检测技术. 在1 h内便可检测HCV 1-6型在5'UTR的序列变异, 但不能区分亚型<sup>[34]</sup>. 由于是新技术, 相关的文献报道较少.

实时荧光PCR是根据荧光共振能量转移的原理检测基因型<sup>[35-36]</sup>. 检测探针多是Taqman探针, 也有MGB探针等, 检测结果与LiPA一致<sup>[37-39]</sup>. 目前多数检测技术扩增的都是保守的5'UTR. 虽然可以很好的区分HCV主要基因型, 但限制了亚型的检测. Abbott公司最新上市的Abbott HCV ASR是一种多色三管Real-time RT-PCR技术<sup>[40]</sup>. 他扩增5'UTR和NS5B 2个区域, 不但可以检测HCV主要的基因型, 还能区分1型中的1a和1b亚型.

**创新盘点**  
本文从HCV基因型的角度出发, 较全面的介绍了HCV基因型的全球分布、与治疗的关系、分型依据以及与定量检测的关系, 并概述了HCV基因分型所用的检测技术.

**应用要点**  
同种方法对不同HCV基因型做定量分析时,结果可能存在偏差;不同的方法对同一HCV基因型定量时也可能产生偏差,如何正确认识这种偏差对临床检验意义重大.应用准确灵敏的方法在治疗之前有效的区分患者所属的基因型十分重要.

上述三种商品化的分子生物学检测方法各有其优缺点. LiPA的检测成本最低,但操作时间长,会有鬼带出现的情况; Abbott HCV ASR操作时间短,但检测成本高,对4型的检测缺乏特异性; Invader HCV的操作时间和检测成本居于两者之间. 因此,在检测HCV基因型时,要充分考虑不同方法的特点后再选用某种方法检测.

在血清学方法中Chiron公司的RIBA SIA检测NS4和核心区编码的抗原,可用来区分1-3型<sup>[41]</sup>. Murex公司的Murex HCV利用基因型特异抗体直接检测NS4编码的抗原表位,能区分1-6型<sup>[42]</sup>. 血清学技术污染低、方法简单,适用于大样本量的流行病筛查.

## 7 其他扩增5'UTR的分型法

此外,还有检测HCV混合基因型感染方面很突出的特异引物延伸分析法(PSEA)<sup>[43-44]</sup>,与金标准在基因型和亚型上的一致性分别达到96%和87%的变性高效液相色谱法<sup>[45]</sup>,能准确区别1-3型的单链构象多态性(SSCP)和低说服力单个特异引物(LSSP)-PCR<sup>[46]</sup>,质谱分析法等<sup>[47]</sup>.

## 8 金标准

目前对于临床实验室来说只需检测出HCV主要基因型就能为临床治疗提供充足的信息. 但是,若想进行流行病研究或亚型检测,就不能用HCV 5'UTR的分型方法,而要考虑其他的区域. 利用RT-PCR扩增HCV基因组种系信息区(NS5B、核心区或E1)并测序,测序的结果再与已知基因型序列比较是HCV基因型检测的金标准<sup>[48-49]</sup>. Bayer的TRUGENE 5'NC HCV是已商品化的测序试剂,有其专门的试剂盒、测序系统以及分析软件. 检测区域在5'UTR,区分主要基因型与LiPA有很好的一致性<sup>[50-52]</sup>,但不能准确检测亚型. NS5B区域的检测试剂还没有上市,只能作为TRUGENE 5'NC的内参照<sup>[53]</sup>.

测序检测的成本高,需要专业人员的操作,检测混合感染方面也不如其他方法好. 由于HCV种系信息区域的高度可变性,引物的结合位点也可能发生变异,引物不能与模板结合,无法进行RT-PCR和测序,可最终导致实验失败.

## 9 结论

丙型肝炎及其并发症日益受到人们的关注. HCV基因型作为重要的流行病学指标,对指导HCV临床治疗具有十分重要的意义. 早期的检测方法由于准确性和经费等问题,并没有广泛

的应用于临床实验室. 目前,常见的是一些商品化的分型试剂盒. 分子生物学的试剂盒虽然检测原理各有不同,但扩增的区域主要是5'UTR. 5'UTR具有高度保守性,可以避免由于引物结合位点序列的突变而导致实验失败. 但是由于5'UTR不具有HCV其他区域的高度异质性,扩增5'UTR的方法也只能检测HCV主要基因型,在亚型方面的检测结果就差一些. 作为临床指导治疗的指标,扩增5'UTR检测主要基因型就足够了. 血清学方法检测试剂主要用于大量流行病研究,但其在特异性、灵敏度以及准确性方面没有分子生物学方法好. 检测HCV基因型的金标准是对NS5B、核心区或是E1区测序. NS5B、核心区以及E1区都是种系信息区,异质性高,能精确检测出亚型. 但是这些区域的序列存在很大差异,有时无法顺利进行RT-PCR和测序. 最近几年,又出现了一批新技术应用于HCV基因型检测,对这些方法各项性能的研究刚刚起步,今后还需要做更多的研究工作. 总之,理想的临床检测HCV基因型的方法除了能准确区分基因型和亚型外,还应具备实验成本低、易于操作并能检测低载量HCV RNA等特点.

## 10 参考文献

- 1 Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 1993; 74 ( Pt 11): 2391-2399
- 2 Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus-15 years on. *J Gen Virol* 2004; 85: 3173-3188
- 3 Farci P, Shimoda A, Coiana A, Diaz G, Peddis G, Melpolder JC, Strazzera A, Chien DY, Munoz SJ, Balestrieri A, Purcell RH, Alter HJ. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 2000; 288: 339-344
- 4 Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 223-235
- 5 Tanaka Y, Agha S, Saady N, Kurbanov F, Orito E, Kato T, Abo-Zeid M, Khalaf M, Miyakawa Y, Mizokami M. Exponential spread of hepatitis C virus genotype 4a in Egypt. *J Mol Evol* 2004; 58: 191-195
- 6 Lu L, Nakano T, He Y, Fu Y, Hagedorn CH, Robertson BH. Hepatitis C virus genotype distribution in China: predominance of closely related subtype 1b isolates and existence of new genotype 6 variants. *J Med Virol* 2005; 75: 538-549
- 7 Bukh J, Purcell RH, Miller RH. At least 12 genotypes of hepatitis C virus predicted by sequence analysis of the putative E1 gene of isolates collected worldwide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 8234-8238
- 8 Nakano T, Lu L, Liu P, Pybus OG. Viral gene sequences reveal the variable history of hepatitis C virus infection among countries. *J Infect Dis* 2004; 190: 1098-1108
- 9 Pybus OG, Charleston MA, Gupta S, Rambaut A, Holmes EC, Harvey PH. The epidemic behavior of

- the hepatitis C virus. *Science* 2001; 292: 2323-2325
- 10 Saracco G, Olivero A, Ciancio A, Carenzi S, Rizzetto M. Therapy of chronic hepatitis C: a critical review. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2003; 3: 25-32
  - 11 McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZD, Ling MH, Cort S, Albrecht JK. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998; 339: 1485-1492
  - 12 Pawlotsky JM. Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. *Clin Liver Dis* 2003; 7: 45-66
  - 13 Pawlotsky JM. The nature of interferon-alpha resistance in hepatitis C virus infection. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16: 587-592
  - 14 Hraber PT, Fischer W, Bruno WJ, Leitner T, Kuiken C. Comparative analysis of hepatitis C virus phylogenies from coding and non-coding regions: the 5' untranslated region (UTR) fails to classify subtypes. *Virology* 2006; 3: 103
  - 15 Laperche S, Lunel F, Izopet J, Alain S, Deny P, Duverlie G, Gaudy C, Pawlotsky JM, Plantier JC, Pozzetto B, Thibault V, Tosetti F, Lefrere JJ. Comparison of hepatitis C virus NS5b and 5' noncoding gene sequencing methods in a multicenter study. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 733-739
  - 16 Revie D, Alberti MO, Braich RS, Bayles D, Prichard JG, Salahuddin SZ. Discovery of significant variants containing large deletions in the 5'UTR of human hepatitis C virus (HCV). *Virology* 2006; 3: 82
  - 17 Corbet S, Bukh J, Heinsen A, Fomsgaard A. Hepatitis C virus subtyping by a core-envelope 1-based reverse transcriptase PCR assay with sequencing and its use in determining subtype distribution among Danish patients. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1091-1100
  - 18 Noppornpanth S, Sablon E, De Nys K, Truong XL, Brouwer J, Van Brussel M, Smits SL, Poovorawan Y, Osterhaus AD, Haagmans BL. Genotyping hepatitis C viruses from Southeast Asia by a novel line probe assay that simultaneously detects core and 5' untranslated regions. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3969-3974
  - 19 Damen M, Sillekens P, Cuypers HT, Frantzen I, Melsert R. Characterization of the quantitative HCV NASBA assay. *J Virol Methods* 1999; 82: 45-54
  - 20 Caliendo AM, Valsamakis A, Zhou Y, Yen-Lieberman B, Andersen J, Young S, Ferreira-Gonzalez A, Tsongalis GJ, Pyles R, Bremer JW, Lurain NS. Multilaboratory comparison of hepatitis C virus viral load assays. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1726-1732
  - 21 Hawkins A, Davidson F, Simmonds P. Comparison of plasma virus loads among individuals infected with hepatitis C virus (HCV) genotypes 1, 2, and 3 by quantiplex HCV RNA assay versions 1 and 2, Roche Monitor assay, and an in-house limiting dilution method. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 187-192
  - 22 Elbeik T, Surtihadi J, Destree M, Gorlin J, Holodniy M, Jortani SA, Kuramoto K, Ng V, Valdes R Jr, Valsamakis A, Terrault NA. Multicenter evaluation of the performance characteristics of the bayer VERSANT HCV RNA 3.0 assay (bDNA). *J Clin Microbiol* 2004; 42: 563-569
  - 23 Sarrazin C, Gartner BC, Sizmann D, Babiak R, Mihm U, Hofmann WP, von Wagner M, Zeuzem S. Comparison of conventional PCR with real-time PCR and branched DNA-based assays for hepatitis C virus RNA quantification and clinical significance for genotypes 1 to 5. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 729-737
  - 24 Nakao T, Enomoto N, Takada N, Takada A, Date T. Typing of hepatitis C virus genomes by restriction fragment length polymorphism. *J Gen Virol* 1991; 72 (Pt 9): 2105-2112
  - 25 Pohjanpelto P, Lappalainen M, Widell A, Asikainen K, Paunio M. Hepatitis C genotypes in Finland determined by RFLP. *Clin Diagn Virol* 1996; 7: 7-16
  - 26 Buoro S, Pizzighella S, Boschetto R, Pellizzari L, Cusan M, Bonaguro R, Mengoli C, Caudai C, Padula M, Egisto Valensin P, Palu G. Typing of hepatitis C virus by a new method based on restriction fragment length polymorphism. *Intervirology* 1999; 42: 1-8
  - 27 Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, Kurai K, Akahane Y, Sugai Y, Tanaka T, Sato K, Tsuda F, Miyakawa Y. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J Gen Virol* 1992; 73 (Pt 3): 673-679
  - 28 Mellor J, Walsh EA, Prescott LE, Jarvis LM, Davidson F, Yap PL, Simmonds P. Survey of type 6 group variants of hepatitis C virus in Southeast Asia by using a core-based genotyping assay. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 417-423
  - 29 Chen Z, Weck KE. Hepatitis C virus genotyping: interrogation of the 5' untranslated region cannot accurately distinguish genotypes 1a and 1b. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3127-3134
  - 30 Zekri AR, El-Din HM, Bahnassy AA, El-Shehabi AM, El-Leethy H, Omar A, Khaled HM. TRUGENE sequencing versus INNO-LiPA for sub-genotyping of HCV genotype-4. *J Med Virol* 2005; 75: 412-420
  - 31 Nadarajah R, Khan GY, Miller SA, Brooks GF. Evaluation of a new-generation line-probe assay that detects 5' untranslated and core regions to genotype and subtype hepatitis C virus. *Am J Clin Pathol* 2007; 128: 300-304
  - 32 Ross RS, Viazov S, Roggendorf M. Genotyping of hepatitis C virus isolates by a new line probe assay using sequence information from both the 5'untranslated and the core regions. *J Virol Methods* 2007; 143: 153-160
  - 33 Comanor L, Elkin C, Leung K, Krajden M, Kronquist K, Nicolas K, Horansky E, deMedina M, Kittichai P, Sablon E, Ziermann R, Sherlock C. Successful HCV genotyping of previously failed and low viral load specimens using an HCV RNA qualitative assay based on transcription-mediated amplification in conjunction with the line probe assay. *J Clin Virol* 2003; 28: 14-26
  - 34 Germer JJ, Majewski DW, Yung B, Mitchell PS, Yao JD. Evaluation of the invader assay for genotyping hepatitis C virus. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 318-323
  - 35 Schroter M, Zollner B, Schafer P, Landt O, Lass U, Laufs R, Feucht HH. Genotyping of hepatitis C virus types 1, 2, 3, and 4 by a one-step LightCycler method using three different pairs of hybridization probes. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2046-2050
  - 36 Haverstick DM, Bullock GC, Bruns DE. Genotyping of hepatitis C virus by melting curve analysis:

## 名词解释

持续病毒学应答: 简称SVR, 即停止治疗6 mo后病毒RNA的阴性试验检测, 是判断治疗是否有效的标准。



## 同行评价

本文综述了HCV基因型的全球分布、临床表现与治疗、分型依据以及基因型与定量的关系,内容全面,层次清楚,文笔流畅,有一定的可读性和参考性。

- analytical characteristics and performance. *Clin Chem* 2004; 50: 2405-2407
- 37 Lindh M, Hannoun C. Genotyping of hepatitis C virus by Taqman real-time PCR. *J Clin Virol* 2005; 34: 108-114
- 38 Rolfe KJ, Alexander GJ, Wreghitt TG, Parmar S, Jalal H, Curran MD. A real-time Taqman method for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Virol* 2005; 34: 115-121
- 39 Moghaddam A, Reinton N, Dalgard O. A rapid real-time PCR assay for determination of hepatitis C virus genotypes 1, 2 and 3a. *J Viral Hepat* 2006; 13: 222-229
- 40 Cook L, Sullivan K, Krantz EM, Bagabag A, Jerome KR. Multiplex real-time reverse transcription-PCR assay for determination of hepatitis C virus genotypes. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4149-4156
- 41 Dixit V, Quan S, Martin P, Larson D, Brezina M, DiNello R, Sra K, Lau JY, Chien D, Kolberg J. Evaluation of a novel serotyping system for hepatitis C virus: strong correlation with standard genotyping methodologies. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2978-2983
- 42 Pawlowsky JM, Prescott L, Simmonds P, Pellet C, Laurent-Puig P, Labonne C, Darthuy F, Remire J, Duval J, Buffet C, Etienne JP, Dhumeaux D, Dussaix E. Serological determination of hepatitis C virus genotype: comparison with a standardized genotyping assay. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1734-1739
- 43 Antonishyn NA, Ast VM, McDonald RR, Chaudhary RK, Lin L, Andonov AP, Horsman GB. Rapid genotyping of hepatitis C virus by primer-specific extension analysis. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5158-5163
- 44 Hu YW, Balaskas E, Furione M, Yen PH, Kessler G, Scalia V, Chui L, Sher G. Comparison and application of a novel genotyping method, semiautomated primer-specific and mispair extension analysis, and four other genotyping assays for detection of hepatitis C virus mixed-genotype infections. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2807-2813
- 45 Liew M, Erali M, Page S, Hillyard D, Wittwer C. Hepatitis C genotyping by denaturing high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 158-163
- 46 Stamenkovic G, Guduric J, Velickovic Z, Skerl V, Krtolica K, Veljkovic E, Dimitrijevic B. Analysis of 5' non-coding region in hepatitis C virus by single-strand conformation polymorphism and low-stringency single specific primer PCR. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39: 948-952
- 47 Ilina EN, Malakhova MV, Generozov EV, Nikolaev EN, Govorun VM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (mass spectrometry) for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2810-2815
- 48 Robertson B, Myers G, Howard C, Brettin T, Bukh J, Gaschen B, Gojobori T, Maertens G, Mizokami M, Nainan O, Netesov S, Nishioka K, Shin i T, Simmonds P, Smith D, Stuyver L, Weiner A. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. *Arch Virol* 1998; 143: 2493-2503
- 49 Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Brechot C, Brouwer JT, Chan SW, Chayama K, Chen DS. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994; 19: 1321-1324
- 50 Nolte FS, Green AM, Fiebelkorn KR, Caliendo AM, Sturchio C, Grunwald A, Healy M. Clinical evaluation of two methods for genotyping hepatitis C virus based on analysis of the 5' noncoding region. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1558-1564
- 51 Haushofer AC, Berg J, Hauer R, Trubert-Exinger D, Stekel HG, Kessler HH. Genotyping of hepatitis C virus-comparison of three assays. *J Clin Virol* 2003; 27: 276-285
- 52 Tang YW, Li H, Roberto A, Warner D, Yen-Lieberman B. Detection of hepatitis C virus by a user-developed reverse transcriptase-PCR and use of amplification products for subsequent genotyping. *J Clin Virol* 2004; 31: 148-152
- 53 Sandres-Saune K, Deny P, Pasquier C, Thibaut V, Duverlie G, Izopet J. Determining hepatitis C genotype by analyzing the sequence of the NS5b region. *J Virol Methods* 2003; 109: 187-193

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## 世界华人消化杂志在线办公系统

本刊讯 自2005-12-15起,世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(<http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>),所有办公流程一律可以在线进行,包括投稿、审稿、编辑、审读,以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流。凡在在线办公系统注册的用户,将可获得世界华人消化杂志最新出版消息。

# 大肠癌转移相关蛋白差异表达的研究进展

黄龙, 秦环龙

黄龙, 秦环龙, 上海交通大学附属第六人民医院外科 上海市 200233

上海市科委基金资助项目, No. 05DJ14010

通讯作者: 秦环龙, 200233, 上海交通大学附属第六人民医院外科. hlqin@sjtu.edu.cn

电话: 021-64369181-8261

收稿日期: 2007-05-10 修回日期: 2007-09-10

## Progress in research on the differential expression of metastasis-associated proteins in colorectal cancer

Long Huang, Huan-Long Qin

Long Huang, Huan-Long Qin, Department of Surgery, the Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Supported by: Shanghai Science and Technology Commission funded projects, No. 05DJ14010

Correspondence to: Huan-Long Qin, Department of Surgery, the Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China. hlqin@sjtu.edu.cn

Received: 2007-05-10 Revised: 2007-09-10

## Abstract

Colorectal cancer metastasis is a complex and multistep process that may involve many genes. One of the hottest research topics concerning the mechanism of metastasis of colorectal cancer is to identify metastasis-associated genes and proteins. In this article, we review the differential expression of metastasis-associated proteins of colorectal cancer, colorectal cancer lymph node metastasis-associated proteins, and colorectal cancer liver metastasis-associated proteins.

**Key Words:** Colorectal cancer; Metastasis; Proteins

Huang L, Qin HL. Progress in research on the differential expression of metastasis-associated proteins in colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(27): 2903-2908

## 摘要

大肠癌转移是一个多步骤、多基因参与的复杂过程, 明确大肠癌转移相关基因和蛋白质是

现在大肠癌转移机制的研究热点. 本文从不同转移潜能大肠癌细胞差异表达蛋白、大肠癌淋巴转移相关蛋白、大肠癌肝转移相关蛋白三个方面综述大肠癌转移相关蛋白.

**关键词:** 大肠癌; 转移; 蛋白质

黄龙, 秦环龙. 大肠癌转移相关蛋白差异表达的研究进展. *世界华人消化杂志* 2007;15(27):2903-2908

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2903.asp>

## 0 引言

大肠癌是我国常见的肿瘤, 恶性程度较高, 易发生血行、淋巴转移和肝转移. 肿瘤浸润和转移不仅影响着临床疗效, 也是肿瘤复发、死亡的主要原因. 肿瘤的转移是一个多步骤、多基因参与的复杂过程. 明确大肠癌转移相关蛋白能为阐明大肠癌转移机制提供有价值的理论基础.

## 1 不同转移潜能大肠癌细胞差异表达蛋白研究进展

大肠癌转移是一个多步骤的复杂过程, 需要多种不同蛋白质表达改变的积累. 近年来, 国内外文献对不同转移潜能细胞株差异蛋白表达研究都有报道, 利用蛋白质组学研究的方法较多, 认为在不同转移潜能细胞株中确实存在不同的蛋白表达差异. 这些差异蛋白包括酶类( $\alpha$ -烯醇化酶、磷酸丙糖异构酶、羧肽酶A5、依赖细胞周期素激酶1), PGAM1(磷酸甘油酸变位酶1)、PBP(磷脂酰乙醇胺结合蛋白)、HMGB1(高迁移率族蛋白B-1)、HSP27(热休克蛋白27)、ANX I(膜联蛋白I)、MTAP(甲硫腺苷磷酸化酶)、CPOX(线粒体粪卟啉原III氧化酶)、E-FABP(表皮型脂肪酸结合酶)、PD-ECGF1(血小板源性内皮细胞生长因子)、RTKN(Rho下游靶分子)、sepin 1、COF1(切丝蛋白1)、siglecs、酪氨酸酶相关蛋白-2、translin-like蛋白、唾液酸酶结合类似免疫球蛋白凝集素11、ILKAP(整合素连接激酶相关蛋白质磷酸酶2C)、MHC I(主要组织相容性复合体I)、

## 背景资料

大肠癌转移是患者的主要致死原因, 明确大肠癌转移相关蛋白, 筛选和鉴定大肠癌转移标志物是大肠癌研究的热点之一. 近来, 随着蛋白质学技术的应用和飞速发展, 利用蛋白质组学技术查找和鉴定大肠癌转移相关蛋白已逐渐成为研究大肠癌转移的最前沿领域和热点之一.

### 创新盘点

本文从蛋白质组学技术和免疫组化技术这两个角度综述了最近发现的一些与大肠癌转移相关的蛋白质, 文章内容新颖.

PR53(蛋白磷酸酯酶2A调节亚基B53)、锌指蛋白79、载脂蛋白B-48、PAX(双链复合)转录因子和膜连蛋白A2<sup>[1-11, 15-16]</sup>等(表1).

Katayama *et al*<sup>[1]</sup>利用蛋白质组学技术分析比较了SW620和SW480的蛋白质表达谱, 结果发现,  $\alpha$ -烯醇化酶<sup>[2-3]</sup>、磷酸丙糖异构酶<sup>[4-5]</sup>、膜连蛋白A2<sup>[6-8]</sup>三种蛋白存在显著性差异表达.  $\alpha$ -烯醇化酶和磷酸丙糖异构酶在高转移潜能细胞株SW620中表达显著高于低转移潜能细胞株SW480, 而膜连蛋白A2在SW480中的表达显著高于SW620. 随后将两种肿瘤细胞分别注射入裸鼠的脾被膜下. 结果发现在注射SW620的裸鼠(A组)中, 70%出现了脾脏肿瘤, 40%的裸鼠出现了肝转移, 20%的裸鼠出现了腹腔播散, 而在SW480注射的裸鼠(B组)中则未出现肝转移和腹腔播散. Western blot法验证了A组裸鼠脾种植瘤、肝转移瘤和腹腔扩散肿瘤中3种蛋白的表达. 发现在A组裸鼠的肝转移瘤中,  $\alpha$ -烯醇化酶和磷酸丙糖异构酶的表达明显高于原位种植瘤, 而在种植瘤中膜连蛋白A2表达明显高于肝转移瘤. 提示 $\alpha$ -烯醇化酶和磷酸丙糖异构酶在大肠癌转移中起着积极的作用, 而膜连蛋白A2可能在抑制肿瘤的侵袭转移中发挥作用.

$\alpha$ -烯醇化酶不仅是糖酵解酶, 而且是低氧诱导因子1- $\alpha$ (HIF-1- $\alpha$ )的靶基因<sup>[2]</sup>. HIF-1- $\alpha$ 为一种转录因子, 他能激活编码葡萄糖载体、糖酵解酶和血管内皮生长因子(VEGF)的转录基因. 新血管生成、糖酵解增加这两个实体瘤的广泛特性被认为在肿瘤适应低氧环境过程中起着重要的作用. 而低氧分压的适应是肿瘤发生侵袭和转移的一个重要步骤.  $\alpha$ -烯醇化酶可能通过在基质复合物选择性降解过程中酶原的激活, 从而促进肿瘤的转移<sup>[3]</sup>. 磷酸丙糖异构酶是糖酵解和糖代谢的关键酶. 糖酵解是细胞生长和维持所必需的. 最近研究表明磷酸丙糖异构酶与肺腺癌的侵袭密切相关<sup>[4]</sup>.

国内学者赵亮 *et al*<sup>[22]</sup>利用蛋白质组学技术分析大肠癌细胞株SW620和SW480的蛋白质表达谱. 通过双向凝胶电泳进行蛋白分离, 经相应软件分析后选取11个差异表达蛋白质点进行质谱分析, 成功鉴定了10种蛋白质. 在这些差异蛋白中, SW620细胞株表达上调的蛋白质有PGAM1、PBP<sup>[9]</sup>、HMGB1<sup>[11]</sup>, 而HSP27<sup>[10]</sup>、ANX I<sup>[12-13]</sup>、MTAP<sup>[16-19]</sup>、CPOX和E-FABP<sup>[14-15]</sup>在SW620中表达下调, 其中PGAM1仅出现在SW620细胞株中, COF1仅出现在SW480中. 蛋

表 1 不同转移潜能细胞株差异表达蛋白比较

差异表达蛋白	高转移潜能细胞株		低转移潜能细胞株
	Sw620	LS174T	Sw480
$\alpha$ -烯醇化酶			
磷酸丙糖异构酶			
PBP			
HMGB1			
HSP27			
ANX			
MTAP			
CPOX			
E-FABP			
膜连蛋白A2			
PGAM1	M		
PD-ECGF1		M	
RTKN		M	
依赖细胞周期素激酶1		M	
septin 1		M	
siglecs		M	
酪氨酸酶相关蛋白-2		M	
translin-like蛋白		M	
唾液酸酶结合类似免		M	
疫球蛋白凝集素 11			
COF1			N
ILKAP			N
MHC			N
PR53			N
羧基酯酶A5			N
锌指蛋白79			N
载脂蛋白B-48			N
PAX转录因子			N

: 在该细胞系中表达上调; : 在该细胞系中表达下调; M: 仅在高转移细胞系中表达; N: 仅在低转移细胞系中表达.

白质印迹验证蛋白质表达水平发现SW480中COF1(切丝蛋白1)和HSP27表达下调与双向凝胶电泳分析结果一致.

另有学者<sup>[23]</sup>利用蛋白质组学技术分析鉴定了LS174T和SW480的差异表达蛋白, 结果发现仅在高转移潜能的LS174T细胞中表达的蛋白有PD-ECGF1<sup>[20-21]</sup>、RTKN<sup>[24-25]</sup>、依赖细胞周期素激酶1<sup>[26]</sup>、septin 1、siglecs、酪氨酸酶相关蛋白-2、translin-like蛋白、唾液酸酶结合类似免疫球蛋白凝集素11, 而仅在低转移潜能细胞SW480中表达的蛋白有ILKAP(整合素连接激酶相关蛋白质磷酸酶2C)<sup>[27]</sup>、MHC I、PR53、羧基酯酶A5、锌指蛋白79、载脂蛋白B-48<sup>[28-29]</sup>、PAX转录因子.

大肠侧向发育型肿瘤(CLST)与普通大肠癌

的深层侵袭高转移特性迥异, 该病变特点是沿黏膜表面浅表扩散而很少向肠壁深层直接侵犯。其细胞系LST-R1, 经体外实验证实其侵袭力相对弱于人大肠癌SW480和LOVO细胞株。国内学者童华生 *et al* 利用蛋白质组学技术分析鉴定了这3种细胞株的差异表达蛋白质, 发现 $\beta$ 半糖结合蛋白(GAL1)只表达于LST-R1细胞。已知GAL1是GALS家族成员之一。据报道, GALs在乳腺癌、前列腺癌、甲状腺癌和皮肤癌以及胃肠道肿瘤包括胃癌、肝细胞癌和大肠癌的恶性转化和转移中扮演着重要的角色<sup>[32]</sup>。GAL1在普通大肠癌中主要表达于细胞外基质, 而在LST-R1细胞中主要表达于细胞膜和细胞质, 研究者推测GAL1在LST-R1细胞表达可能抑制CLST病变的侵袭而呈浅表性扩散特性, GAL1是调整LST-R1细胞生长、黏附侵袭的重要蛋白质分子之一。

## 2 大肠癌淋巴转移相关蛋白表达差异研究进展

淋巴转移是肿瘤侵袭的前兆, 也是判断预后的最重要因素之一。当肿瘤扩散至淋巴结, 患者的5年存活率会显著下降。当大肠癌患者癌灶局限于肠壁时(I期或者II期), 5年生存率>75%, 而当出现淋巴转移时, 患者5年存活率则降至30%-60%<sup>[33]</sup>。淋巴转移与大肠癌差异蛋白表达相关性也备受学者关注, 研究方法以蛋白质组学技术和免疫组化技术为主。这些差异蛋白包括GST(谷胱甘肽S转移酶)、VEGF-C(血管内皮生长因子C)、COX-2(环氧化酶2)、钙黏蛋白、 $\beta$ -连环蛋白、CD44V6等(表2)。

**2.1 应用蛋白质组学技术分析鉴定淋巴转移蛋白表达差异** 国内学者裴海平 *et al*<sup>[34]</sup>应用蛋白质组学技术分别对有淋巴转移的大肠癌组织(转移组)、无淋巴转移的大肠癌组织(非转移组)和正常肠黏膜(对照组)进行分析鉴定, 结果确定转移组中有5种蛋白质表达高于非转移组, 分别是肝型脂肪酸结合蛋白(L-FABP)<sup>[30]</sup>、热休克蛋白27(HSP27)、谷胱甘肽S转移酶(GST)、Annexin IV、Annexin A2。其中GST在对照组、非转移组、转移组、淋巴转移灶中的表达阳性率分别为25%, 57.5%, 90%, 95%, 方差分析提示多组间比较差异有统计学意义( $P<0.01$ )。两组间比较发现, 对照组与转移组、对照组与转移灶组、转移组与非转移组、非转移组与淋巴转移灶组的GST阳性表达率差异均有统计学意义( $P<0.01$ )。提示GST的表达可能与大肠癌淋巴结转移相关。

**2.2 应用免疫组化染色方法发现的大肠癌淋巴**

表2 大肠癌原位癌、淋巴转移灶和肝转移灶差异表达蛋白

差异表达蛋白	原位癌	淋巴转移灶	肝转移灶
GST <sup>1</sup>	57.5%	95%	
VEGF-C <sup>1</sup>	68%	93.3%	
钙黏蛋白 <sup>1</sup>	45%	81%	
载脂蛋白A1 <sup>2</sup>	+		+++
$\beta$ -珠蛋白	-		++
$\beta$ -连环蛋白 <sup>1</sup>	42.0%		21.9%
CD44V6 <sup>1</sup>	20%		56%

<sup>1</sup>为免疫组化染色阳性表达率; <sup>2</sup>为免疫组化染色强度。

**转移相关差异表达蛋白** 采用免疫组织化学方法检测特异性蛋白在大肠原位癌和淋巴转移灶的表达差异, 从而帮助分析判定其与大肠癌淋巴转移的关系。与大肠癌淋巴转移相关的蛋白有: 生长因子(包括VEGF-C、VEGF-D等, 转化因子、基质溶解因子)、黏附分子(包括钙黏连蛋白、 $\alpha$ -连环蛋白、 $\beta$ -连环蛋白、细胞间黏附分子1、CD44等)、酶类(基质金属蛋白酶、组织蛋白酶、COX-2、胸腺苷酸合酶)等, 其中以VEGF和黏附分子最为多见。

研究者认为VEGF-C<sup>[31]</sup>通过刺激淋巴管增生, 改变淋巴管内皮的一些生物学活性, 激活Flt4(血管内皮细胞生长因子受体)启动淋巴管增生, 从而促进肿瘤淋巴转移<sup>[35]</sup>。Jia *et al*<sup>[36]</sup>采用免疫组化方法检测了56例大肠癌标本中的VEGF-C的表达, 发现VEGF-C阳性表达率为66.7%(37/56), VEGF-C表达阳性的病例中81.1%发生淋巴转移, 而VEGF-C表达阴性的病例中只有42.1%发生淋巴转移, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。提示VEGF-C的表达差异与大肠癌淋巴转移显著相关。Soumaoro *et al*<sup>[37]</sup>应用免疫组化方法检测了150例大肠癌标本的VEGF-C、COX-2的表达。在这些标本中, VEGF-C和COX-2在原位癌中阳性表达率分别是68%, 72.7%, 而在淋巴转移灶的阳性表达率分别为93.3%, 80%。VEGF-C和COX-2的表达相关性有显著统计学意义( $P<0.0001$ )。研究表明VEGF-C和COX-2共表达与大肠癌淋巴转移显著相关。Batistatou *et al*<sup>[38]</sup>应用免疫组化染色方法检测了78例大肠癌标本及其淋巴转移灶中钙黏蛋白的表达, 发现钙黏连蛋白表达于所有正常肠黏膜, 而在原位癌中只有45%表达, 在淋巴转移灶中阳性表达率为

**应用要点**  
大肠癌转移过程有众多的基因和蛋白参与, 筛选及鉴定与大肠癌转移密切相关的基因及其蛋白质对阐明大肠癌转移机制、大肠癌转移早期诊断、预后判断及药物治疗新靶点均有重要意义。



**名词解释**  
蛋白质组是指细胞或组织在特定空间和时间上表达的基因组编码的全部蛋白质,蛋白质组学是研究细胞内全部蛋白质的组成和动态变化的一门新兴学科。

81%,并且所有阳性表达钙黏蛋白的原位癌的淋巴转移灶均表达钙黏连蛋白,提示钙黏连蛋白在原位癌表达降低而在淋巴转移灶中重复表达可能与大肠癌的淋巴转移相关。Gu *et al*<sup>[39]</sup>应用免疫组化染色方法检测了32例大肠癌标本的CD44V6和钙黏连蛋白的表达。结果发现钙黏连蛋白在正常肠黏膜上皮中强表达,在原位大肠癌中阳性表达率降低(阳性表达率为46.9%),而在淋巴转移灶中阳性表达率显著降低,仅为20%。研究者推断钙黏连蛋白的表达差异与大肠癌淋巴转移显著相关。

### 3 大肠癌肝转移相关蛋白研究进展

肝转移仍然是大肠癌治疗失败的主要原因之一,大肠癌肝转移是一个复杂的过程。在各种蛋白作用下,癌细胞之间黏附力降低,穿过血管内皮及基底膜,进入门脉系统,最终形成肝转移灶。在这过程中,一些特异蛋白质表达差异对肝转移的发生有重要意义。这些差异表达蛋白有载脂蛋白A1、钙调节蛋白、核糖核苷酸酶6前体、甘露糖苷酶- $\alpha$ 、 $\beta$ -珠蛋白、 $\beta$ -连环蛋白、钙黏蛋白和CD44等(表2)。

**3.1 应用蛋白质组学技术分析鉴定大肠癌肝转移相关差异表达蛋白** Tachibana *et al*<sup>[40]</sup>应用蛋白质组学技术分析比较了大肠腺癌原发灶组织与其肝转移灶组织差异表达蛋白,发现载脂蛋白A1仅在肝转移灶组织中特异性表达。随后应用RT-PCR及免疫组化检测载脂蛋白A1表达发现,正常肠黏膜组织不表达载脂蛋白A1,而原发灶组织中载脂蛋白A1弱表达,表达随着肿瘤分期的提高而增强,因此提示载脂蛋白A1表达增强与大肠癌的肝转移相关。

Brunagel *et al*<sup>[41]</sup>利用蛋白质组学技术将大肠癌肝转移灶及其邻近正常肝组织、正常肝组织、正常肝细胞的所有蛋白质分离,并将4种标本与已知的大肠癌蛋白质图谱中的核基质蛋白PMF进行比较分析,发现核基质蛋白在大肠癌肝转移灶中特异性表达,而在正常肝组织和肝细胞中不表达,提示其与大肠癌肝转移相关。Roblick *et al*<sup>[42]</sup>人利用蛋白质组学技术分析比较了原位癌和肝转移癌的差异表达蛋白后发现,肝细胞癌相关抗原66表达有显著差异性,推断其为大肠癌肝转移相关蛋白。Yu *et al*<sup>[43]</sup>应用蛋白质组学技术分析比较原位癌、正常肠黏膜和大肠癌肝转移组织的蛋白质表达谱,和正常肠黏膜相对比,在原位癌和大肠癌肝转移组织的蛋白

质表达谱中,大量表达在25-40 ku范围内蛋白质点缺失,而在14-21 ku范围内蛋白质点增加。对9种差异蛋白质进行鉴定,发现其中3种仅在正常肠黏膜中表达,分别是钙调节蛋白、核糖核苷酸酶6前体、甘露糖苷酶- $\alpha$ 。 $\beta$ -珠蛋白在正常肠黏膜和大肠癌肝转移组织中表达,而在原位癌中不表达。研究者推断其可能与大肠癌肝转移相关。

**3.2 应用免疫组化方法检测大肠癌肝转移相关蛋白差异表达** 采用免疫组织化学方法检测特异性蛋白在大肠原位癌和肝转移灶的表达差异,从而分析判定其与大肠癌肝转移的关系。据报道,与大肠癌淋巴肝相关的蛋白有黏附分子(CD44、钙黏蛋白、层黏连蛋白、 $\beta$ -连环蛋白等)、生长因子(VEGF、转化生长因子)、酶(基质金属蛋白酶、组织蛋白酶、前蛋白转化酶)。

Nanashima *et al*<sup>[44]</sup>利用免疫组化染色方法分析了44例大肠癌肝转移标本及39例原位癌的钙黏蛋白和CD44的表达发现,钙黏蛋白在转移组中原位癌的阳性表达率(26%)显著低于非转移组的阳性表达率(62%),差异有统计学意义( $P<0.05$ ),而在肝转移癌中的阳性表达率为40%。所有标本的正常肠黏膜上皮均不表达CD44V6,而在转移组中的原位癌阳性表达率(56%)显著高于非转移组阳性表达率(20%),表达差异有统计学意义( $P<0.01$ ),其在肝转移癌中的阳性表达率为59%,提示这两种黏附分子与大肠癌肝转移相关。Han *et al*<sup>[45]</sup>应用免疫组化染色方法分别检测正常肠黏膜、大肠原位癌、肝转移灶中 $\beta$ -连环蛋白的表达时发现,原位癌和肝转移灶的 $\beta$ -连环蛋白阳性表达率分别为42.0%和21.9%。肝转移灶的表达率显著低于原位癌,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。提示 $\beta$ -连环蛋白与大肠癌肝转移相关。

鉴定大肠癌转移相关蛋白能为大肠癌淋巴转移、肝转移的早期诊断和治疗以及预后提供丰富的理论基础。随着研究的深入,大肠癌转移相关蛋白作用机制的明确,大肠癌转移机制也将逐步明确。

### 4 参考文献

- 1 Katayama M, Nakano H, Ishiuchi A, Wu W, Oshima R, Sakurai J, Nishikawa H, Yamaguchi S, Otsubo T. Protein pattern difference in the colon cancer cell lines examined by two-dimensional differential in-gel electrophoresis and mass spectrometry. *Surg Today* 2006; 36: 1085-1093
- 2 Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino



- R, Concordet JP, Maire P, Giallongo A. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1996; 271: 32529-32537
- 3 Minet E, Michel G, Remacle J, Michiels C. Role of HIF-1 as a transcription factor involved in embryonic development, cancer progression and apoptosis (review). *Int J Mol Med* 2000; 5: 253-259
- 4 Chen G, Gharib TG, Huang CC, Thomas DG, Shedden KA, Taylor JM, Kardia SL, Misek DE, Giordano TJ, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash SM, Beer DG. Proteomic analysis of lung adenocarcinoma: identification of a highly expressed set of proteins in tumors. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2298-2305
- 5 Montgomerie JZ, Gracy RW, Holshuh HJ, Keyser AJ, Bennett CJ, Schick DG. The 28K protein in urinary bladder, squamous metaplasia and urine is triosephosphate isomerase. *Clin Biochem* 1997; 30: 613-618
- 6 Mai J, Waisman DM, Sloane BF. Cell surface complex of cathepsin B/annexin II tetramer in malignant progression. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1477: 215-230
- 7 Hajjar KA, Acharya SS. Annexin II and regulation of cell surface fibrinolysis. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 902: 265-271
- 8 Siever DA, Erickson HP. Extracellular annexin II. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29: 1219-1223
- 9 Fu Z, Smith PC, Zhang L, Rubin MA, Dunn RL, Yao Z, Keller ET. Effects of raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 878-889
- 10 Aldrian S, Trautinger F, Frohlich I, Berger W, Micksche M, Kindas-Mugge I. Overexpression of Hsp27 affects the metastatic phenotype of human melanoma cells in vitro. *Cell Stress Chaperones* 2002; 7: 177-185
- 11 Choi YR, Kim H, Kang HJ, Kim NG, Kim JJ, Park KS, Paik YK, Kim HO, Kim H. Overexpression of high mobility group box 1 in gastrointestinal stromal tumors with KIT mutation. *Cancer Res* 2003; 63: 2188-2193
- 12 Wu W, Tang X, Hu W, Lotan R, Hong WK, Mao L. Identification and validation of metastasis-associated proteins in head and neck cancer cell lines by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Clin Exp Metastasis* 2002; 19: 319-326
- 13 Kreunin P, Urquidi V, Lubman DM, Goodison S. Identification of metastasis-associated proteins in a human tumor metastasis model using the mass-mapping technique. *Proteomics* 2004; 4: 2754-2765
- 14 Jing C, Beesley C, Foster CS, Rudland PS, Fujii H, Ono T, Chen H, Smith PH, Ke Y. Identification of the messenger RNA for human cutaneous fatty acid-binding protein as a metastasis inducer. *Cancer Res* 2000; 60: 2390-2398
- 15 Jing C, Beesley C, Foster CS, Chen H, Rudland PS, West DC, Fujii H, Smith PH, Ke Y. Human cutaneous fatty acid-binding protein induces metastasis by up-regulating the expression of vascular endothelial growth factor gene in rat Rama 37 model cells. *Cancer Res* 2001; 61: 4357-4364
- 16 Garcia-Castellano JM, Villanueva A, Healey JH, Sowers R, Cordon-Cardo C, Huvos A, Bertino JR, Meyers P, Gorlick R. Methylthioadenosine phosphorylase gene deletions are common in osteosarcoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 782-787
- 17 Kamatani N, Carson DA. Abnormal regulation of methylthioadenosine and polyamine metabolism in methylthioadenosine phosphorylase-deficient human leukemic cell lines. *Cancer Res* 1980; 40: 4178-4182
- 18 Behrmann I, Wallner S, Komyod W, Heinrich PC, Schuierer M, Buettner R, Bosserhoff AK. Characterization of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) expression in malignant melanoma. *Am J Pathol* 2003; 163: 683-690
- 19 Hustinx SR, Leoni LM, Yeo CJ, Brown PN, Goggins M, Kern SE, Hruban RH, Maitra A. Concordant loss of MTAP and p16/CDKN2A expression in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence of homozygous deletion in a noninvasive precursor lesion. *Mod Pathol* 2005; 18: 959-963
- 20 Yoshinaga K, Inoue H, Tanaka F, Mimori K, Utsunomiya T, Mori M. Platelet-derived endothelial cell growth factor mediates Rho-associated coiled-coil domain kinase messenger RNA expression and promotes cell motility. *Ann Surg Oncol* 2003; 10: 582-587
- 21 Konno S, Takebayashi Y, Higashimoto M, Katsube T, Kanzaki A, Kawahara M, Takenoshita S, Aiba M, Ogawa K. Thymidine phosphorylase expression in gastric carcinoma as a marker for metastasis. *Anticancer Res* 2003; 23: 5011-5014
- 22 赵亮, 刘莉, 王爽, 李祖国, 丁彦青. 采用蛋白质组学技术筛选大肠癌转移相关蛋白. *生物化学与生物物理进展* 2006; 33: 485-491
- 23 Ying-Tao Z, Yi-Ping G, Lu-Sheng S, Yi-Li W. Proteomic analysis of differentially expressed proteins between metastatic and non-metastatic human colorectal carcinoma cell lines. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 725-732
- 24 Liu CA, Wang MJ, Chi CW, Wu CW, Chen JY. Rho/Rhotekin-mediated NF-kappaB activation confers resistance to apoptosis. *Oncogene* 2004; 23: 8731-8742
- 25 Liu CA, Wang MJ, Chi CW, Wu CW, Chen JY. Overexpression of rho effector rhotekin confers increased survival in gastric adenocarcinoma. *J Biomed Sci* 2004; 11: 661-670
- 26 Nozoe T, Honda M, Inutsuka S, Korenaga D. p34cdc2 expression is an independent indicator for lymph node metastasis in colorectal carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003; 129: 498-502
- 27 Hannigan G, Troussard AA, Dedhar S. Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 51-63
- 28 Yu HK, Ahn JH, Lee HJ, Lee SK, Hong SW, Yoon Y, Kim JS. Expression of human apolipoprotein(a) kringle in colon cancer cells suppresses angiogenesis-dependent tumor growth and peritoneal dissemination. *J Gene Med* 2005; 7: 39-49
- 29 Yu HK, Kim JS, Lee HJ, Ahn JH, Lee SK, Hong SW, Yoon Y. Suppression of colorectal cancer liver metastasis and extension of survival by expression of apolipoprotein(a) kringle. *Cancer Res* 2004; 64: 7092-7098
- 30 Hashimoto T, Kusakabe T, Sugino T, Fukuda T, Watanabe K, Sato Y, Nashimoto A, Honma K, Kimura H, Fujii H, Suzuki T. Expression of heart-type fatty acid-binding protein in human gastric carcinoma and its association with tumor aggressiveness, metastasis and poor prognosis. *Pathobiology* 2004; 71: 267-273
- 31 Akagi K, Ikeda Y, Miyazaki M, Abe T, Kinoshita

同行评价  
本文介绍较为全面, 阐述较为严密, 引文较新, 有一定指导意义

- J, Maehara Y, Sugimachi K. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression in human colorectal cancer tissues. *Br J Cancer* 2000; 83: 887-891
- 32 Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, Paganelli R, Natoli C, Liu FT, Iacobelli S. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol* 2002; 23: 313-320
- 33 Le Voyer TE, Sigurdson ER, Hanlon AL, Mayer RJ, Macdonald JS, Catalano PJ, Haller DG. Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial INT-0089. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2912-2919
- 34 裴海平, 朱红, 曾亮, 李宜雄. 蛋白质组学技术筛选结直肠癌淋巴结转移相关蛋白的初步研究. *中华普通外科杂志* 2006; 21: 732-735
- 35 Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, Kaipainen A, Jeltsch M, Joukov V, Alitalo K. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* 1996; 122: 3829-3837
- 36 Jia YT, Li ZX, He YT, Liang W, Yang HC, Ma HJ. Expression of vascular endothelial growth factor-C and the relationship between lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3261-3263
- 37 Soumaoro LT, Uetake H, Takagi Y, Iida S, Higuchi T, Yasuno M, Enomoto M, Sugihara K. Coexpression of VEGF-C and Cox-2 in human colorectal cancer and its association with lymph node metastasis. *Dis Colon Rectum* 2006; 49: 392-398
- 38 Batistatou A, Charalabopoulos AK, Scopa CD, Nakanishi Y, Kappas A, Hirohashi S, Agnantis NJ, Charalabopoulos K. Expression patterns of dysadherin and E-cadherin in lymph node metastases of colorectal carcinoma. *Virchows Arch* 2006; 448: 763-767
- 39 Gu J, Zhu X, Ye Y, Qu J, Huang L, Li R, Yu Y, Leng X. The level of expression of adhesion molecules CD44v6 and E-cadherin in colorectal cancer and analysis of correlates with metastasis. *Zhonghua Waike Zazhi* 1999; 37: 108-109, 4
- 40 Tachibana M, Ohkura Y, Kobayashi Y, Sakamoto H, Tanaka Y, Watanabe J, Amikura K, Nishimura Y, Akagi K. Expression of apolipoprotein A1 in colonic adenocarcinoma. *Anticancer Res* 2003; 23: 4161-4167
- 41 Brunagel G, Schoen RE, Bauer AJ, Vietmeier BN, Getzenberg RH. Nuclear matrix protein alterations associated with colon cancer metastasis to the liver. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3039-3045
- 42 Roblick UJ, Hirschberg D, Habermann JK, Palmberg C, Becker S, Kruger S, Gustafsson M, Bruch HP, Franzen B, Ried T, Bergmann T, Auer G, Jornvall H. Sequential proteome alterations during genesis and progression of colon cancer. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 1246-1255
- 43 Yu B, Li SY, An P, Zhang YN, Liang ZJ, Yuan SJ, Cai HY. Comparative study of proteome between primary cancer and hepatic metastatic tumor in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2652-2656
- 44 Nanashima A, Yamaguchi H, Sawai T, Yasutake T, Tsuji T, Jibiki M, Yamaguchi E, Nakagoe T, Ayabe H. Expression of adhesion molecules in hepatic metastases of colorectal carcinoma: relationship to primary tumours and prognosis after hepatic resection. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14: 1004-1009
- 45 Han SA, Chun H, Park CM, Kang SJ, Kim SH, Sohn D, Yun SH, Lee WY. Prognostic significance of beta-catenin in colorectal cancer with liver metastasis. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2006; 18: 761-767

编辑 何燕 电编 李军亮

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

## 关于2006年度山西省期刊质量评估结果的通报

**本刊讯** 为推动期刊出版事业的繁荣和发展,中共山西省委宣传部、山西省新闻出版局、山西省科学技术厅共同组织了2006年度期刊质量评估工作。此次参评的为2005年度山西省出版的196种期刊,其中,社科期刊110种、科技期刊86种。评估结果如下:一级(优秀)期刊共88种,其中社科期刊42种,科技期刊46种,包括世界胃肠病学杂志和世界华人消化杂志;二级期刊共103种,其中社科期刊64种,科技期刊39种;三级期刊共5种,其中社科期刊4种,科技期刊1种。(中共山西省委宣传部、山西省新闻出版局、山西省科学技术厅)

# 幽门螺杆菌和溃疡性结肠炎的关系

江 勇, 吕宗舜

江勇, 吕宗舜, 天津医科大学总医院消化内科 天津市 300070  
通讯作者: 江勇, 300070, 天津市和平区鞍山道154号, 天津医科大学总医院消化内科. jiangyong-612@163.com  
电话: 022-60362949  
收稿日期: 2007-08-06 修回日期: 2007-09-17

## Relationship between *Helicobacter pylori* and ulcerative colitis

Yong Jiang, Zong-Shun Lv

Yong Jiang, Zong-Shun Lv, Department of Gastroenterology, the General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Correspondence to: Yong Jiang, Department of Gastroenterology, the General Hospital of Tianjin Medical University, 154 Anshan Road, Tianjin 300070, China. jiangyong-612@163.com

Received: 2007-08-06 Revised: 2007-09-17

## Abstract

Since Warren and Marshall first separated *Helicobacter pylori* from gastric mucus in patients with chronic gastritis in 1983, our understanding of gastrointestinal tract diseases has risen greatly. The incidence of one of the inflammatory bowel diseases, ulcerative colitis (UC), has gradually risen worldwide, particularly among young people. Twenty research centers in Europe have shown that the annual incidence of UC is 11.2/100 000, that it can occur in every age group, may be related to colon cancer, and has a long disease course and different degrees of severity. There has been a lot of research on UC and *H pylori* but little has been done on the relationship between the two. This paper summarizes the current state of related research and development.

**Key Words:** *Helicobacter pylori*; Ulcerative colitis; Pathogenesis

Jiang Y, Lv ZS. Relationship between *Helicobacter pylori* and ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(27): 2909-2913

## 摘要

自1983年Warren和Marshall从慢性胃炎患者胃

黏膜中分离出幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)以来, 人类对胃肠道疾病的认识有了革命性的变革. 溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)作为炎症性肠病(inflammatory bowel diseases, IBD)的一大类型, 近年来在国内外发病率有逐渐上升且向年轻化发展的趋势. 欧洲20个调查中心显示: UC的年发病率为11.2/100 000, 该病可发生于任何年龄的患者, 与结肠癌的发病有关, 且病程长, 病变程度轻重各异. 国内外同行对*H pylori*和UC分别做过大量的研究, 对于*H pylori*和UC的关系论述不多, 我们就有关*H pylori*和UC关系的研究现状和进展作一综述.

**关键词:** 幽门螺杆菌; 溃疡性结肠炎; 致病机制

江勇, 吕宗舜. 幽门螺杆菌和溃疡性结肠炎的关系. 世界华人消化杂志 2007;15(27):2909-2913  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2909.asp>

**背景资料**  
溃疡性结肠炎作为炎症性肠病的一大类型, 近年来逐渐成为国内外研究者研究的热点, 部分学者认为细菌的感染是引发该病的一个重要环节, 本文探讨了溃疡性结肠炎与上消化道常见致病菌幽门螺杆菌的关系.

## 0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)作为炎症性肠病(inflammatory bowel diseases, IBD)的一大类型, 近年来逐渐成为国内外研究者研究的热点. 他是一类病因不明的肠道慢性非特异性炎症, 主要发生于结肠、直肠等下消化道. 而人们对于幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)的研究大多局限于食管、胃等上消化道, 所以有关*H pylori*和UC的关系论述不多. 我们就*H pylori*和UC关系的研究现状和进展作一综述.

## 1 *H pylori*致病机制的研究进展

全世界约有50%的人患有*H pylori*相关性胃肠疾病<sup>[1]</sup>. 现已证实, *H pylori*是一种具有多种复杂致病因子的病原菌, 在胃黏膜定植后, 主要借助于致病因子发挥其致病作用, 通过毒素的直接作用及诱导炎症反应等间接作用而损害宿主组织. 其中, 尿素酶、空泡形成毒素(vacuolating cytotoxin, VacA)、细胞毒素相关蛋白(cytotoxin associated protein, CagA)、脂多糖(lipopolysacchride)等都是主要的致病因

### 相关报道

目前为止,国内对于幽门螺杆菌和溃疡性结肠炎的关系的报道不多,何晋德 *et al* 通过分析45例炎症性肠病患者(溃疡性结肠炎患者40例,克隆恩病患者5例)血清抗*H pylori*-IgG,进而认为*H pylori*感染对溃疡性结肠炎的发生可能起保护作用。

子<sup>[2]</sup>。(1) 尿素酶:所有的*H pylori*均产生尿素酶,尿素酶分解尿素产生氨(NH<sub>3</sub>),除对*H pylori*本身有保护作用外,还能直接或间接造成胃黏膜屏障的损害<sup>[3-4]</sup>。(2) 空泡形成毒素(VacA): VacA对胃上皮有直接的毒性作用,损伤上皮细胞,使胞质内形成空泡,造成胃黏膜的损伤和延缓胃上皮的修复<sup>[5-6]</sup>。(3) 细胞毒素相关蛋白(CagA)约有60%的*H pylori*具有cagA基因,至于CagA的致病机制,目前尚不清楚。有人认为CagA是VacA的标志物,是胃黏膜炎性反应的标志物,是菌株具有较强毒力的一个信号和标志<sup>[7-9]</sup>。(4) 脂多糖(lipopolysacchride, LPS): 一种高效的免疫调节剂,能抑制层粘连蛋白和嵌有脂质体的层粘连蛋白受体的结合,干扰硫酸黏蛋白合成,促进胃蛋白酶分泌,造成胃黏膜的损害<sup>[10]</sup>。

## 2 UC病因的研究进展

UC又称非特异性溃疡性结肠炎,是一种病因不明的慢性直肠和结肠炎性疾病。该病可发生于任何年龄,与结肠癌的发病有关,病程长,病变程度轻重各异。由于病因不明,临床上常常反复发作而治愈难度大,被世界卫生组织列为现代难治性疾病之一。目前普遍认为UC是免疫、遗传、环境及肠道细菌、氧自由基和一氧化氮等多因素共同作用的结果。

**2.1 免疫因素** 自身免疫异常目前已被普遍认为是UC的病因之一。大部分UC患者的病史或家族史中常合并有结节性红斑、关节炎、眼葡萄膜炎及血管炎、系统性红斑狼疮等,均提示其发病机制中可能有免疫因素的参与<sup>[11]</sup>。

**2.2 遗传因素** 流行病学调查结果显示,UC病例具有家族聚集性,提示其发病有一定的遗传因素。大多数调查发现血缘关系越近,发病率越高,兄弟姐妹间的发病率大约占40%,父母遗传子女者占32.6%<sup>[12]</sup>。

**2.3 感染因素** Isolauri *et al*<sup>[13]</sup>报道从UC患者的肠黏膜及粪便检查中都发现过类杆菌和梭状芽胞杆菌,在活动期二菌群明显增多。最近提出大肠杆菌在克隆恩病(Crohn's disease, CD)发病中有致病作用<sup>[14]</sup>。然而,至今还没有发现与UC有明确关系的致病微生物。

**2.4 氧自由基和一氧化氮的作用** UC发生时,大量的吞噬细胞被激活,耗氧量增加,在NADPH氧化酶、NADH氧化酶、黄嘌呤氧化酶、花生四烯酸作用下产生大量超氧阴离子自由基,使膜的液态性和流动性减弱,通透性增强,细胞外Ca<sup>2+</sup>内流,激活磷脂酶活性,促进膜磷脂分解,使

肠黏膜细胞受到损伤<sup>[15]</sup>。

## 3 *H pylori*和UC的关系

对于*H pylori*和UC的关系国内外同行论述不多。目前主要存在2种观点:*H pylori*的感染与UC的发生呈负相关;*H pylori*感染和UC的发生没有关系。

**3.1 *H pylori*的感染与UC的发生呈负相关** 最新研究发现了两种抗菌肽Defensins和cathelicidins,主要通过自身的杀菌和诱导免疫反应来调节肠道菌群,他们主要由小肠潘氏细胞分泌,当胃肠道感染后,致病菌释放的脂多糖和胞壁酰二肽可刺激潘氏细胞的分泌。*H pylori*的脂多糖可诱发潘氏细胞产生抗菌肽Defensins<sup>[16-22]</sup>,从而抑制其他致病菌引发炎症性肠病(inflammatory bowel diseases, IBD)。同时,基于发展中国家*H pylori*的感染率较发达国家高,而UC的患病率却比发达国家低<sup>[39]</sup>,伊朗*H pylori*的感染率高达90%,IBD的患病率相对较低<sup>[23]</sup>,有研究者认为*H pylori*的感染与UC的发生呈负相关<sup>[24-27]</sup>。

何晋德 *et al*<sup>[24]</sup>通过分析45例IBD患者(UC患者40例,CD患者5例),慢性胃炎患者45例,运用酶联免疫法检测IBD和慢性胃炎患者血清的抗*H pylori*-IgG。结果显示:UC组抗*H pylori*-IgG阳性率较对照组低(42.5% vs 65.0%,  $P < 0.05$ ),进而认为*H pylori*感染对UC的发生可能起保护作用。

Halme *et al*<sup>[28]</sup>通过研究IBD患者200例(CD患者100例,UC患者100例)和急性菌病患者100例,通过酶联免疫法测定血清中*H pylori*的IgG、IgA抗体滴度。结果显示,IBD的*H pylori*血清阳性率为15%,CD患者*H pylori*血清阳性率为13%,UC为18%,对照组的*H pylori*血清阳性率为43%,相对于对照组,IBD组的*H pylori*感染率要低,具有统计学意义( $P < 0.005$ ),且与是否用柳氮磺胺吡啶无关,这与Pearce *et al*<sup>[29]</sup>的研究结果相吻合。Pronai *et al*<sup>[30]</sup>从5260例体检者中随机挑选IBD和慢性阻塞性肺病(COPD)患者的年龄匹配对照组分别200例和210例,研究了IBD患者133例(UC患者82例,CD患者51例)和COPD患者135例,通过<sup>13</sup>C呼气试验来测定*H pylori*的有无。所有的IBD患者至少接受过5-氨基水杨酸治疗1年,44例IBD患者和所有的COPD患者均使用过甲硝唑或环丙沙星。结果显示:133例IBD患者中17例感染*H pylori*,UC的*H pylori*感染率为12.2%(10/82),CD的*H pylori*感染率为13.7%(7/51),COPD患者感染率为66.7%(90/135),UC患者年龄匹配组中*H pylori*感染率为39%(78/200),COPD患者组感染率为55%(110/210)。进而得出结论,IBD

患者 *H pylori* 感染率较低, 且与抗生素的应用无关。Tursi *et al*<sup>[31]</sup> 接诊过1例十二指肠溃疡患者, 根除 *H pylori* 后引发了CD的发生。研究者认为 *H pylori* 的根除破坏了患者的免疫平衡是该患者发病的主要原因。 *H pylori* 可以激发体内T辅助细胞(Th)系的表达, 根除 *H pylori* 后可引起Th1和Th2失衡, 使Th1占优势, 从而引起CD的发生, 也支持了 *H pylori* 感染与UC呈负相关。

**3.2 *H pylori* 的感染和UC的发生没有关系** 缠绕杆菌属主要包括 *H pylori*, *H felis*, *H muridarum*, *H bilis*, *H heilmannii*, *Hcinaedi* 和 *H hepaticus*。缠绕杆菌属16S rDNA在CD中发现, 预示着缠绕杆菌属在IBD的发生中起的作用不容小觑<sup>[32]</sup>。Bell *et al*<sup>[33]</sup> 通过研究认为UC的发生与 *H pylori* 感染无关。他们提取了30例被研究者的结肠活检组织(CD患者9例, UC患者11例, 正常者10例)。将组织置于-70℃的温度下, 提取组织基因再经PCR方法扩增。结果显示, 提取的基因扩增物与上述缠绕杆菌属特征基因的杂交均呈阴性反应。同时, 经过常规苏木精和伊红染色组织检查, 也没有发现缠绕杆菌属。故认为缠绕杆菌属在IBD的发生中不起作用, 进而说明 *H pylori* 感染和UC的发生没有关系, 但研究者指出发生阴性反应不能排除测量方法不够灵敏的可能; 组织活检未发现缠绕杆菌属, 不能排除感染密度小而被漏检的可能。el-Omar *et al*<sup>[34]</sup> 通过检测IBD患者110例(UC患者63例, CD患者47例)血清中 *H pylori* 的IgG抗体, 发现IBD患者中 *H pylori* 的IgG抗体阳性率为22%, 而对照组为52%, 两者比较有统计学意义( $P<0.002$ )。进一步研究发现, 在接受过或正在接受柳氮磺胺吡啶治疗的IBD患者 *H pylori* 的IgG抗体的阳性率明显较低, 分别是7%和10%。而只接受过偶氮水杨酸或5-氨基水杨酸, 从未接受过柳氮磺胺吡啶治疗的IBD患者 *H pylori* 的IgG抗体的阳性率基本接近对照组, 为45%, 进而推测IBD患者较低的 *H pylori* 感染率可能与使用了柳氮磺胺吡啶有关, *H pylori* 感染和UC的发生本身无明显关系。但研究者也同时发现, 单用柳氮磺胺吡啶不能根除 *H pylori*, 似与其结论相悖。Piodi *et al*<sup>[35]</sup> 通过研究IBD患者72例(UC患者40例, CD患者32例), 通过<sup>13</sup>C呼气试验来检测 *H pylori*, 也发现了相同的现象, 但他们认为起作用的是5-氨基水杨酸而不是柳氮磺胺吡啶(应用两药后 *H pylori* 感染率分别为34%、65%)。

**3.3 其他观点** 无菌小鼠不易患IBD, IBD患者及时应用抗生素治疗和隔离其粪便可减轻症状,

均支持了细菌在IBD中扮演了重要角色<sup>[19]</sup>。缠绕杆菌属与人类和动物的UC和小肠结肠炎的发生有关<sup>[36-39]</sup>。有报道称, 免疫缺陷类小鼠感染缠绕杆菌属后可引起IBD<sup>[36]</sup>。类似于人类UC症状的绢毛猴(cotton-top tamarins)模型也已建立<sup>[37]</sup>, 其临床症状包括消瘦、腹泻、直肠出血等。绢毛猴是哥伦比亚热带雨林里的灵长类动物, 曾被用于疱疹病毒、EB病毒的研究, 其发生UC病因不明, 可能是多因素促成的, 有很多资料显示其发病与物种的易感性及病原感染有关<sup>[39]</sup>。最近, 新英格兰灵长类动物研究中心发现环境因素, 包括微生物感染, 可能与该病有关。他们被置于不同环境下饲养, 一部分被隔离饲养, 一部分常态下饲养, 结果发现常态下饲养的绢毛猴易患结肠炎, 提示免疫系统紊乱和环境应激可能是病因之一<sup>[37,40]</sup>。Danese *et al*<sup>[39]</sup> 研究了绢毛猴类存在的缠绕杆菌属。他们从200只绢毛猴中选出34只确诊有非特异性肠炎者, 其年龄为2-19岁, 结果在这类绢毛猴肠道和粪便中发现了一种新的尿素酶反应阴性、梭形的微生物。分析其形态学、生物化学特性及16S rDNA系列, 认为他属于缠绕杆菌属。这种新的细菌有别于 *H pylori*, 他缺乏尿素酶活性, 不能水解碱性磷酸酶。超微结构显示, 他拥有胞质和双极鞭毛, 形态学与 *H pylori* 相似。在种系进化中, 他更接近于 *H fennelliae*。分析这些被分离出细菌的限制性内切酶多态性, 显示这些绢毛猴所感染的均系同一缠绕杆菌属<sup>[34]</sup>。最近有研究发现免疫缺陷小鼠感染 *H bilis* 或 *H hepaticus* 后, 也可患IBD。另外两种缠绕杆菌属, *H cinaedi* 和 *H fennelliae* 也被发现和人类的直肠炎、大肠炎和菌血症有关。

Streutker *et al*<sup>[41]</sup> 活检了IBD和非IBD者的黏膜组织, 从其中获取DNA, 然后经过PCR扩增技术以探测是否有缠绕杆菌属的DNA系列, 结果发现, 60例IBD患者黏膜提取的DNA中, 6例经测定为阳性。其中, 33例UC者5例阳性, 而对照组29例中没有阳性者, 具有统计学意义( $P<0.04$ ), 且提取的DNA系列经PCR扩增后与 *H pylori* 比较, 大于或等于99%的基因系列具有同源性。这一结果亦支持缠绕杆菌属可能是UC的病因之一。

CD患者中易感基因核苷酸聚合域(NOD<sub>2</sub>)的发现进一步证实了肠道菌在IBD中的作用<sup>[42-43]</sup>。NOD<sub>2</sub>为细胞内脂多糖的编码基因, 后者与肠道菌的间接免疫反应有关。同时, CD动物模型中缠绕杆菌属16S rDNA系列的发现, 也提示缠绕杆菌属可能在IBD中起重要作用<sup>[32]</sup>。 *H pylori* 属于缠绕杆菌属, 基于缠绕杆菌属与IBD的发生

**应用要点**  
有关幽门螺杆菌和溃疡性结肠炎关系的报道不多, 本文系统地总结了临床、实验中国内外研究者的研究结果, 旨在进一步揭示溃疡性结肠炎的病因, 以指导临床治疗。



同行评价  
本文对*H. pylori*和UC的基础和临床研究有重要参考意义。

有关, 以及*H. pylori*与慢性活动性胃炎、消化性溃疡、胃癌及胃淋巴瘤等上消化道疾病关系密切。有人推测*H. pylori*可能是UC的病因, 但目前尚没有确切的证据。

#### 4 结论

尽管人们对UC和*H. pylori*的关系进行过一些动物实验和临床研究, 但存在诸多问题亟待解决。目前为止, 他们之间的关系尚无定论。大多数学者认为*H. pylori*的感染与UC的发生呈负相关; 亦有学者认为, 他们之间没有明确关系, 还有人认为*H. pylori*所在的缠绕杆菌属中另一种细菌可能与UC的发生有关, 且各研究者仅仅得出了动物试验和临床研究的结果, 而对于产生这种结果的原因未做进一步阐述, 提示这一领域有大量未知因素尚须进一步的研究。

#### 5 参考文献

- Kraft C, Suerbaum S. Mutation and recombination in *Helicobacter pylori*: mechanisms and role in generating strain diversity. *Int J Med Microbiol* 2005; 295: 299-305
- 崔梅花, 胡伏莲. 幽门螺杆菌的致病因子. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 1993-1996
- Kang GB, Kim YS, Im YJ, Rho SH, Lee JH, Eom SH. Crystal structure of NH<sub>3</sub>-dependent NAD<sup>+</sup> synthetase from *Helicobacter pylori*. *Proteins* 2005; 58: 985-988
- Filipec T, Prskalo M, Ticak M, Sabaric B, Skurla B, Papa B, Colic-Cvrlje V, Naumovski-Mihalic S, Marusic M, Katicic M. The rapid urease test. *Lijec Vjesn* 2002; 124 Suppl 1: 33-36
- Con SA, Takeuchi H, Valerin AL, Con-Wong R, Con-Chin GR, Con-Chin VG, Nishioka M, Mena F, Brenes F, Yasuda N, Araki K, Sugiura T. Diversity of *Helicobacter pylori* cagA and vacA Genes in Costa Rica: Its Relationship with Atrophic Gastritis and Gastric Cancer. *Helicobacter* 2007; 12: 547-552
- Wilson KT, Crabtree JE. Immunology of *Helicobacter pylori*: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies. *Gastroenterology* 2007; 133: 288-308
- Cerezo SG, Ponce MC, Gutierrez GR. Microbiologic, serologic diagnosis, and genotypification of *Helicobacter pylori* isolated from biopsies in children and adult people. Molecular detection of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Rev Latinoam Microbiol* 2006; 48: 99-104
- Feng BS, Yao XH, Zhao GQ. Construction of the enhanced green fluorescent protein eukaryotic expression vector carrying CagA of *Helicobacter pylori*. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2007; 87: 570-572
- Tammer I, Brandt S, Hartig R, Konig W, Backert S. Activation of Abl by *Helicobacter pylori*: a novel kinase for CagA and crucial mediator of host cell scattering. *Gastroenterology* 2007; 132: 1309-1319
- Kato I, Canzian F, Plummer M, Franceschi S, van Doorn LJ, Vivas J, Lopez G, Lu Y, Gioia-Patricola L, Severson RK, Schwartz AG, Munoz N. Polymorphisms in genes related to bacterial lipopolysaccharide/peptidoglycan signaling and gastric precancerous lesions in a population at high risk for gastric cancer. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 254-261
- Neuman MG. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Transl Res* 2007; 149: 173-186
- 蚁健敏, 朱琴. 炎症性肠病的遗传学研究若干进展. *国际消化病杂志* 2006; 26: 75-77
- Isolauri E. Probiotics in human disease. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 1142S-1146S
- Oliveira AG, Rocha GA, Rocha AM, Sanna MG, Moura SB, Dani R, Marinho FP, Moreira LS, Ferrari Mde L, Castro LP, Queiroz DM. Isolation of *Helicobacter pylori* from the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. *Helicobacter* 2006; 11: 2-9
- Spek CA, Ten Kate FJ, Te Velde AA. Factor V Leiden and the etiology of inflammatory bowel disease. *Thromb Haemost* 2007; 98: 670-673
- Fellermann K, Stange DE, Schaeffeler E, Schmalzl H, Wehkamp J, Bevins CL, Reinisch W, Teml A, Schwab M, Lichter P, Radlwimmer B, Stange EF. A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *Am J Hum Genet* 2006; 79: 439-448
- Wehkamp J, Schmidt K, Herrlinger KR, Baxmann S, Behling S, Wohlschlagel C, Feller AC, Stange EF, Fellermann K. Defensin pattern in chronic gastritis: HBD-2 is differentially expressed with respect to *Helicobacter pylori* status. *J Clin Pathol* 2003; 56: 352-357
- Wehkamp J, Schmid M, Fellermann K, Stange EF. Defensin deficiency, intestinal microbes, and the clinical phenotypes of Crohn's disease. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 460-465
- Wehkamp J, Fellermann K, Herrlinger KR, Bevins CL, Stange EF. Mechanisms of disease: defensins in gastrointestinal diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005; 2: 406-415
- Fahlgren A, Hammarstrom S, Danielsson A, Hammarstrom ML. Increased expression of antimicrobial peptides and lysozyme in colonic epithelial cells of patients with ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 2003; 131: 90-101
- Ohara T, Morishita T, Suzuki H, Masaoka T, Nishizawa T, Hibi T. Investigation of the possibility of human-beta defensin 2 (hBD2) as a molecular marker of gastric mucosal inflammation. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 1320-1324
- Mars WM, Patmasiriwat P, Maity T, Huff V, Weil MM, Saunders GF. Inheritance of unequal numbers of the genes encoding the human neutrophil defensins HP-1 and HP-3. *J Biol Chem* 1995; 270: 30371-30376
- Fakheri H, Merat S, Hosseini V, Malekzadeh R. Low-dose furazolidone in triple and quadruple regimens for *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 89-93
- 何晋德, 刘玉兰, 叶辉, 张娇. 炎症性肠病患者幽门螺杆菌感染的血清学状况研究. *中华消化杂志* 2003; 23: 254-255
- Leung WK, Lin SR, Ching JY, To KF, Ng EK, Chan FK, Lau JY, Sung JJ. Factors predicting progression of gastric intestinal metaplasia: results of a randomised trial on *Helicobacter pylori* eradication. *Gut* 2004; 53: 1244-1249
- Guslandi M, Fanti L, Testoni PA. *Helicobacter pylori* seroprevalence in Crohn's disease: lack of influence by pharmacological treatment.

- Hepatogastroenterology 2002; 49: 1296-1297
- 27 Triantafyllidis JK, Gikas A, Apostolidis N, Merikas E, Mallas E, Peros G. The low prevalence of helicobacter infection in patients with inflammatory bowel disease could be attributed to previous antibiotic treatment. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1213-1214
- 28 Halme L, Rautelin H, Leidenius M, Kosunen TU. Inverse correlation between *Helicobacter pylori* infection and inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol* 1996; 49: 65-67
- 29 Pearce CB, Duncan HD, Timmis L, Green JR. Assessment of the prevalence of infection with *Helicobacter pylori* in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12: 439-443
- 20 Pronai L, Schandl L, Orosz Z, Magyar P, Tulassay Z. Lower prevalence of *Helicobacter pylori* infection in patients with inflammatory bowel disease but not with chronic obstructive pulmonary disease-antibiotic use in the history does not play a significant role. *Helicobacter* 2004; 9: 278-283
- 31 Tursi A. Onset of Crohn's disease after *Helicobacter pylori* eradication. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 1008-1009
- 32 Fox JG, Handt L, Xu S, Shen Z, Dewhirst FE, Paster BJ, Dangler CA, Lodge K, Motzel S, Klein H. Novel *Helicobacter* species isolated from rhesus monkeys with chronic idiopathic colitis. *J Med Microbiol* 2001; 50: 421-429
- 33 Bell SJ, Chisholm SA, Owen RJ, Borriello SP, Kamm MA. Evaluation of *Helicobacter* species in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 481-486
- 34 el-Omar E, Penman I, Cruikshank G, Dover S, Banerjee S, Williams C, McColl KE. Low prevalence of *Helicobacter pylori* in inflammatory bowel disease: association with sulphasalazine. *Gut* 1994; 35: 1385-1388
- 35 Piodi LP, Bardella M, Rocchia C, Cesana BM, Baldassarri A, Quatrini M. Possible protective effect of 5-aminosalicylic acid on *Helicobacter pylori* infection in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36: 22-25
- 36 Maggio-Price L, Shows D, Waggle K, Burich A, Zeng W, Escobar S, Morrissey P, Viney JL. *Helicobacter bilis* infection accelerates and *H. hepaticus* infection delays the development of colitis in multiple drug resistance-deficient (*mdr1a*<sup>-/-</sup>) mice. *Am J Pathol* 2002; 160: 739-751
- 37 Watkins PE, Warren BF, Stephens S, Ward P, Foulkes R. Treatment of ulcerative colitis in the cottontop tamarin using antibody to tumour necrosis factor alpha. *Gut* 1997; 40: 628-633
- 38 Dotan I, Mayer L. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2002; 18: 421-427
- 39 Danese S, Sans M, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev* 2004; 3: 394-400
- 40 Wood JD, Peck OC, Tefend KS, Rodriguez-M MA, Rodriguez-M JV, Hernandez-C JL, Stonerook MJ, Sharma HM. Colitis and colon cancer in cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus oedipus*) living wild in their natural habitat. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 1443-1453
- 41 Streutker CJ, Bernstein CN, Chan VL, Riddell RH, Croitoru K. Detection of species-specific *helicobacter* ribosomal DNA in intestinal biopsy samples from a population-based cohort of patients with ulcerative colitis. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 660-664
- 42 Rescigno M, Nieuwenhuis EE. The role of altered microbial signaling via mutant NODs in intestinal inflammation. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23: 21-26
- 43 Henckaerts L, Vermeire S. NOD2/CARD15 disease associations other than Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 235-241

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

## 世界华人消化杂志关于作者署名的声明

本刊讯 世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 第一方面是直接参与, 包括: (1) 酝酿和设计实验; (2) 采集数据; (3) 分析/解释数据. 第二方面是文章撰写, 包括: (1) 起草文章; (2) 对文章的知识性内容作批评性审阅. 第三方面是工作支持, 包括: (1) 统计分析; (2) 获取研究经费; (3) 行政、技术或材料支持; (4) 指导; (5) 支持性贡献. 每个人必须在第一至第三方面至少具备一条, 才能成为文章的署名作者. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

# 应用噬菌体展示技术筛选原发性肝癌血清结合蛋白

刘志英, 魏红山, 张黎颖, 成 军

**背景资料**  
肝癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一, 迄今为止, 尚没有发现行之有效的治疗方案, 肝癌的诊断和治疗是肿瘤研究领域的一个主要焦点。

刘志英, 魏红山, 张黎颖, 成军, 北京地坛医院传染病研究所北京市 100011  
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. dr\_liver@hotmail.com  
电话: 010-64211031-2358  
收稿日期: 2007-04-16 修回日期: 2007-09-13

## Screening for serum binding proteins in subjects with primary hepatocellular carcinoma using a phage display system

Zhi-Ying Liu, Hong-Shan Wei, Li-Ying Zhang, Jun Cheng

Zhi-Ying Liu, Hong-Shan Wei, Li-Ying Zhang, Jun Cheng, Institute of Infectious Disease, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China

Correspondence to: Hong-Shan Wei, Institute of Infectious Disease, Beijing Ditan Hospital, 13 Ditan Park, Anwai Street, Beijing 100011, China. dr\_liver@hotmail.com  
Received: 2007-04-16 Revised: 2007-09-13

### Abstract

**AIM:** To screen for serum binding proteins in patients with primary hepatocellular carcinoma and to investigate the tumor molecular mechanisms of the primary hepatocellular carcinoma.

**METHODS:** Serum protein of the primary hepatocellular carcinoma was used as the selective molecule and the T7 select phage display system from a human liver cDNA library was screened through adsorption, elution and amplification for 5 cycles. After polymerase chain reaction of bacteriophage plaques, the DNA fragments of the screened clones were sequenced, and the amino acid sequences of target proteins were compared with the GenBank protein sequence database using basic local alignment search tool (BLAST).

**RESULTS:** After amplification for 5 cycles, 5 positive clones were obtained from 48 randomly screened clones. The sequences of positive clones were investigated for homology. Homo sapiens nucleolar and coiled-body phosphopro-

tein 1 (NOLC1), Homo sapiens high-mobility group nucleosome binding domain 1 (HMGN1), Homo sapiens ligase I (LIG1), A-kinase anchor protein 9 isoform, and Homo sapiens small EDRK-rich factor 2 (SERF2) were identified as proteins binding to the serum protein in patients with primary hepatocellular carcinoma.

**CONCLUSION:** The current results of screening for proteins binding to serum protein in patients with primary hepatocellular carcinoma are useful for further studies of the molecular mechanisms of primary hepatocellular carcinoma.

**Key Words:** Phage display system; Primary hepatocellular carcinoma; Serum binding protein; Screen; Basic local alignment search tool

Liu ZY, Wei HS, Zhang LY, Cheng J. Screening for serum binding proteins in subjects with primary hepatocellular carcinoma using a phage display system. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(27): 2914-2917

### 摘要

**目的:** 通过筛选原发性肝癌血清蛋白结合蛋白, 探究肝癌的分子发病机制。

**方法:** 应用噬菌体展示技术, 以肝癌患者的血清作为固相筛选分子, 对T7 Select 噬菌体人肝细胞cDNA文库进行5轮“吸附-洗脱-扩增”的筛选过程, 经噬斑的聚合酶链式反应(PCR)扩增后, 对阳性PCR产物直接进行序列测定和同源性分析。

**结果:** 噬菌体经富集后, 随机挑取48个噬斑进行PCR扩增, 得到5种大小不同的PCR片断, 序列测定后经序列同源性分析, 结果发现与肝癌患者血清蛋白结合的蛋白有以下5种: 人核仁螺旋体磷酸化蛋白NOLC1, 人高度迁移基核小体结合域1(HMGN1), 人依赖ATP的DNA连接酶1(LIG1), 人小EDRK-丰富因子2(SERF2)和A-kinase anchor protein 9 isoform。

**结论:** 用噬菌体人肝cDNA文库筛选得到了肝癌血清蛋白结合蛋白, 为进一步阐明肝癌的发生及发病机制奠定了基础。

**关键词:** 噬菌体展示技术; 肝癌; 血清结合蛋白; 筛选; 基因测序

刘志英, 魏红山, 张黎颖, 成军. 应用噬菌体展示技术筛选原发性肝癌血清结合蛋白. 世界华人消化杂志 2007;15(27):2914-2917  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2914.asp

## 0 引言

原发性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 占癌症死亡率的第2位. 导致肝癌的主要因素包括HBV和HCV慢性感染, 食物中的黄曲霉毒素及嗜酒等. 多种遗传和后天因素参与了HCC的分子发病机制, 如p53抑癌基因的突变和WNT信号转导途径的激活等<sup>[1]</sup>, 肝癌的分子发病机制是当前肝癌研究的重点所在.

噬菌体展示技术是一种基因表达产物和亲和选择相结合的技术, 他以改构的噬菌体为载体, 把待选基因片段定向插入噬菌体外壳蛋白质基因区, 使外源多肽或蛋白质表达并展示于噬菌体表面, 进而通过亲和富集法表达有特异肽或蛋白质的噬菌体. cDNA 文库的表达筛选系统除利用λ噬菌体、酵母双杂交系统外, 噬菌体表面展示技术也可达到同样的目的<sup>[2-4]</sup>. 本研究中, 我们用正常人血清做筛选对照, 用人肝细胞cDNA文库对肝癌患者血清蛋白进行特异性筛选, 为研究肝癌的发生与发病机制提供了线索.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** T7Select人肝细胞cDNA 文库、受体菌BLT5615(Novagen 公司), 10份人肝癌血清标本均来自我院住院肝癌患者, 符合第4届全国肝癌学术会议制订的肝癌诊断标准; 另取10份健康人血清做正常对照, 血清经静脉采血获得.

### 1.2 方法

**1.2.1 文库扩增** 动物术前禁食12 h, 自将BLT5615接种于3 mL LB/Amp, 220 r/min, 37℃过夜; 在3 mL LB/Amp内加入振摇细菌30 μL, 将细菌浓度摇至 $A_{600} = 0.5$ , 加入1 mol/L IPTG 3 μL诱导, 37℃振摇30 min 后加入噬菌体文库5 μL; 37℃振摇1-3 h直到观察到细菌裂解; 8000 g离心10 min, 将上清移至另一无菌管中, 4℃保存.

**1.2.2 生物筛选** 分别将10份等量肝癌患者血清和健康人血清混匀后分装成100 μL/份, 贮存在-20℃冰箱内. 取混合好的肝癌血清80 μL, 加入NaHCO<sub>3</sub>(pH9.6)包被液320 μL中, 混匀, 包被24孔聚丙烯酰胺培养板, 4℃放置48 h; 加入T7

表 1 亲和筛选对噬菌体的富集

筛选次数	投入量(nfu/L)	产出量(nfu/L)	产出率(%)
1	$2 \times 10^9$	$8 \times 10^{10}$	40
2	$3 \times 10^{10}$	$6 \times 10^{10}$	2
3	$3 \times 10^{10}$	$4 \times 10^{10}$	1.3
4	$2 \times 10^{10}$	$8 \times 10^9$	0.4
5	$6 \times 10^9$	$3 \times 10^9$	0.5

Select人肝细胞 cDNA 文库250 μL, 4℃过夜. 吸弃上清液, 加入1×TBST(成分为三羟甲基氨基甲烷-HCl-吐温20, pH 7.5) 缓冲液1 mL洗液漂洗5次, 10 g/L SDS洗脱液400 μL室温孵育20 min, 反复吹打洗涤包被板, 将洗脱液移至另一无菌管中. 将洗脱噬菌体10 μL加入对数生长期的细菌培养液3 mL, 37℃振摇培养, 直到看到细菌裂解. 8000 g离心10 min, 将上清移到一新管, 4℃保存备下一轮筛选用. 再取混合后的正常血清80 μL, 加入包被液320 μL震荡混匀, 包被于24孔板4℃ 48 h后, 1×TBST洗涤5遍, 加入前一步细菌裂解液用于筛选. 上述两步生物筛选为1轮. 每轮筛选后, 均做噬斑分析. 按上述步骤重复筛选5次. 计算产出率, 产出率 = 洗脱的噬菌体数量/所用的噬菌体数量.

**1.2.3 噬斑PCR扩增及分析** 选择第5轮正常对照10<sup>-8</sup>稀释梯度的30个阳性噬斑, 进行噬菌体裂解, 裂解液进行PCR扩增, 引物序列: 5'-TTATCGGATAACCCTTTATA-3'(上游), 5'-CCCTCAAGACCCGTTTAGAG-3'(下游), 一部分PCR产物用10 g/L琼脂糖凝胶电泳. 另一部分PCR产物直接送上海生工公司进行序列测定, 序列结果发到美国国立卫生院GenBank数据库(http://www.ncbi.nlm.nih.gov), 由BLAST n软件完成.

## 2 结果

**2.1 肝细胞cDNA文库的筛选** 以肝癌患者血清为固相分子, 对人类正常肝脏噬菌体cDNA细胞文库进行5轮“包被-结合-洗脱-扩增”筛选, 噬菌体的富集结果见表1.

**2.2 目的基因的PCR扩增** 经过5轮筛选, 随机挑选30个噬斑为模板进行PCR扩增, 序列测定和同源性分析后, 得到5个与肝癌患者血清蛋白结合的蛋白(图1, 表2).

## 3 讨论

肝癌是最常见的恶性肿瘤之一, 迄今为止, 尚没有发现行之有效的治疗方案, 肝癌的诊

**相关报道**  
国内研究小组曾报道HCV NS5A反式激活蛋白, 命名为NS5ATP13, 进一步用基因表达谱芯片技术对HCV NS5ATP13的研究证实上调的基因中包括细胞生长、炎症发生、肿瘤发生的相关调节基因. 陈京龙 *et al*发现隐性肝炎患者血清中NS5ATP13的表达上调, Jin *et al*用抗癌药阿霉素做固相包被物, 用T7肝细胞cDNA文库筛选与其特异结合蛋白, 证实hNopp140的C端能与阿霉素特异结合, 提示阿霉素有可能破坏hNopp140在细胞内的功能.



## 创新盘点

本文首次将10份原发性肝癌患者的血清混合后用噬菌体展示技术筛选肝癌血清特异结合蛋白。

表 2 与肝癌患者血清蛋白结合的蛋白

同源序列编码蛋白	GenBank收录号	核苷酸位置(nt)	同源性
NOLC1	NM_004741.1	1219 - 1869	99%
LIG1	NM_000234.1	107 - 530	99%
HMGN1	NM_004965	128 - 668	100%
A - kinase anchor protein 9 isoform	NT_007933	529 - 749	99%
SERF2	NM - 001018108.1	28 - 485	100%

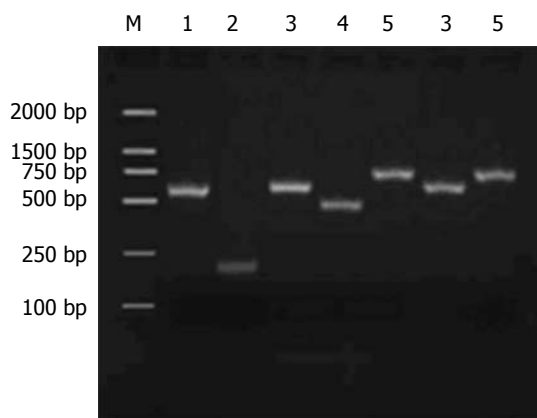


图 1 阳性噬斑裂解液PCR扩增. 1: 人DNA连接酶1(Homo sapiens ligase I, LIG1); 2: A - 激酶锚定蛋白九机构体(A - kinase anchor protein 9 isoform); 3: 人高度迁移核小体结合域1(Homo sapiens high - mobility group nucleosome binding domain 1, HMGN1); 4: 人小EDRK丰富因子(Homo sapiens small EDRK - rich factor 2, SERF2); 5: 人类核仁螺旋体磷酸化蛋白1(Homo sapiens nucleolar and coiled - body phosphoprotein 1, NOLC1).

断和治疗是肿瘤研究领域的一个主要焦点. 本研究中, 我们用正常人血清做筛选对照, 用噬菌体表面展示技术筛选了肝癌患者血清特异结合蛋白, 我们发现了包括NOLC1、HMGN1、Homo sapiens ligase I、SERF2、A-kinase anchor protein 9 isoform在内的5种肝癌血清特异结合蛋白。

有效的修复DNA的损伤是保证基因表达忠实性和防止突变而导致疾病的关键因素. HMGN1是一个核仁结合蛋白, 属于核小体结合高速迁移蛋白家族(A family of High Mobility Group Proteins that bind to Nucleosomesn, HMGN)含量丰富的蛋白, 能稳定染色质的二级结构, 可以修复紫外线诱导的染色质DNA损伤<sup>[5]</sup>. Birger *et al*<sup>[5]</sup>提出HMGN1的缺失可导致细胞增殖和生长发生紊乱, 通过打乱细胞的生长控制机制使裸鼠对一些致癌因素更为敏感并发生恶性转化. 最近研究表明, HMGN1在细胞核内是动态表达, 与细胞的新陈代谢有关. HMGN1蛋白和核仁的相互作用可改变染色质的结构, 并且能调节各种与DNA相关的包括转录的细胞核

作用<sup>[6]</sup>. 本研究中, 我们用肝癌患者血清做固相包被物, 筛选出与肝癌患者血清蛋白特异结合蛋白HMGN1, 根据已报道的HMGN1的功能, 推测肝癌患者血清里某种或某几种蛋白与核仁的HMGN1蛋白发生了特异作用, 导致了HMGN1的维护染色质结构的功能失常而导致了细胞非正常的生长和增殖作用. 该蛋白的发现为进一步研究肝癌的发病机制提供了重要的线索, 但是何种蛋白还需进一步验证和考核.

人核仁磷酸化蛋白NOLC1, 又名hNopp140, 是一个高度磷酸化的哺乳动物蛋白, 参与核仁的发生, 调节rDNA的转录<sup>[7]</sup>; 国内研究小组曾报道为HCV NS5A反式激活蛋白, 命名为NS5ATP13<sup>[8]</sup>, 进一步用基因表达谱芯片技术对HCV NS5ATP13的研究证实, 上调的基因中包括细胞生长、炎症发生、肿瘤发生的相关调节基因<sup>[9]</sup>. 陈京龙 *et al*<sup>[10]</sup>发现慢性肝炎患者血清中NS5ATP13的表达上调, Jin *et al*<sup>[11]</sup>用抗癌药阿霉素做固相包被物, 用T7肝细胞cDNA文库筛选与其特异结合蛋白, 证实hNopp140的C端能与阿霉素特异结合, 提示阿霉素有可能破坏hNopp140在细胞内的功能. 本研究中用肝癌患者血清做固相包被物, 同样用T7人肝细胞cDNA文库筛选技术, 再次发现NOLC1的C末端能与肝癌血清发生特异结合. 结合近期国内外关于该领域的研究, 提示NOLC1与肝癌的发生、发展或者治疗具有密切的关系, 但其生物学作用还有待深入的研究探讨.

在筛选出的已知功能蛋白中, 还有人DNA连接酶I(Homo sapiens ligase I, LIG1), LIG1编码DNA 连接酶 I, 其功能是参与DNA的复制和碱基修复过程, LIG1突变可导致DNA连接酶I的缺乏进而导致免疫缺陷并且能提高DNA对损伤抗原的敏感度<sup>[12]</sup>. Landi *et al*<sup>[13]</sup>报道参与DNA错配修复的LIG1的基因多态性与肺癌的发生有很强的相关性; 同时Narayan *et al*<sup>[14]</sup>用DNA微阵列的方法发现宫颈癌患者体内LIG1基因表达明显上调. 结合本研究初步筛选结果, 提示LIG1与癌

## 名词解释

噬菌体展示技术: 是一种基因表达产物和亲和选择相结合的技术, 他以改构的噬菌体为载体, 把待选基因片段定向插入噬菌体外壳蛋白质基因区, 使外源多肽或蛋白质表达并展示于噬菌体表面, 进而通过亲和富集法表达有特异肽或蛋白质的噬菌体。

细胞的增殖有着密切的联系。

此外本实验还发现了SERF2(Small EDRK-rich factor 2, 小EDRK丰富因子2)和A-kinase anchor protein 9 isoform等肝癌血清特异结合蛋白,但在肝癌发展中的具体作用还需进一步研究。

#### 4 参考文献

- 1 Hussain SP, Schwank J, Staib F, Wang XW, Harris CC. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene* 2007; 26: 2166-2176
- 2 McGregor JC, Pollock JG, Anton HC. The value of ultrasonography in the diagnosis of abdominal aortic aneurysm. *Scott Med J* 1975; 20: 133-137
- 3 Cramer R, Walter G. Selective enrichment and high-throughput screening of phage surface-displayed cDNA libraries from complex allergenic systems. *Comb Chem High Throughput Screen* 1999; 2: 63-72
- 4 Cramer R, Kodzius R. The powerful combination of phage surface display of cDNA libraries and high throughput screening. *Comb Chem High Throughput Screen* 2001; 4: 145-155
- 5 Birger Y, Catez F, Furusawa T, Lim JH, Prymakowska-Bosak M, West KL, Postnikov YV, Haines DC, Bustin M. Increased tumorigenicity and sensitivity to ionizing radiation upon loss of chromosomal protein HMGN1. *Cancer Res* 2005; 65: 6711-6718
- 6 Hill DA, Peterson CL, Imbalzano AN. Effects of HMGN1 on chromatin structure and SWI/SNF-mediated chromatin remodeling. *J Biol Chem* 2005; 280: 41777-41783
- 7 Meier UT, Blobel G. Nopp140 shuttles on tracks

- between nucleolus and cytoplasm. *Cell* 1992; 70: 127-138
- 8 党晓燕, 成军, 刘妍, 邓红, 杨倩, 王建军, 纪冬, 王春花. 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式激活基因NS5ATP13的克隆化研究. *胃肠病学和肝病杂志* 2003; 12: 260-262
- 9 张黎颖, 邓红, 成军, 党晓燕, 刘妍, 蔺淑梅, 黄燕萍, 纪冬, 吴顺华, 纪泛扑, 邵清. 应用表达谱芯片技术研究NS5ATP13的反式调节基因. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2757-2761
- 10 陈京龙, 魏红山, 刘霞, 张黎颖. 噬菌体表面展示技术筛选隐性肝炎血清蛋白结合蛋白. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3509-3512
- 11 Jin Y, Yu J, Yu YG. Identification of hNopp140 as a binding partner for doxorubicin with a phage display cloning method. *Chem Biol* 2002; 9: 157-162
- 12 Tomkinson AE, Chen L, Dong Z, Leppard JB, Levin DS, Mackey ZB, Motycka TA. Completion of base excision repair by mammalian DNA ligases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2001; 68: 151-164
- 13 Landi S, Gemignani F, Canzian F, Gaborieau V, Barale R, Landi D, Szeszenia-Dabrowska N, Zaridze D, Lissowska J, Rudnai P, Fabianova E, Mates D, Foretova L, Janout V, Bencko V, Gioia-Patricola L, Hall J, Boffetta P, Hung RJ, Brennan P. DNA repair and cell cycle control genes and the risk of young-onset lung cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 11062-11069
- 14 Narayan G, Bourdon V, Chaganti S, Arias-Pulido H, Nandula SV, Rao PH, Gissmann L, Durst M, Schneider A, Pothuri B, Mansukhani M, Basso K, Chaganti RS, Murty VV. Gene dosage alterations revealed by cDNA microarray analysis in cervical cancer: identification of candidate amplified and overexpressed genes. *Genes Chromosomes Cancer* 2007; 46: 373-384

编辑 何燕 电编 李军亮

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

### • 消息 •

## 第四届哈尔滨全国消化内镜学术会议通知

**本刊讯** 为促进消化内镜诊治技术的发展和学术交流,由中华消化内镜学会、黑龙江省医学会、黑龙江省医院、黑龙江省临床消化病研究所联合举办的第四届全国消化内镜学术会议定于2007-12-22/23在哈尔滨召开。大会将邀请国内外著名专家作消化内镜进展方面专题报告及内镜演示,并制定中华消化内镜学会消化内镜消毒指南(讨论稿)。欢迎消化届同仁积极投稿及参与,参会代表授予国家继续教育 I 类学分。

#### 1 投稿要求

论著要求800字以内摘要(目的、方法、结果、结论),电脑打印(WORD格式),网上投稿。截稿时间:2007-10-31。

#### 2 联系方式

朱春兰, 150001, 哈尔滨和平邨宾馆(中山路171号), 哈尔滨市果戈里大街405号, 黑龙江省医院, 电话: 13845048249或0451-88025055, 传真: 0451-53625617, E-mail: zhuchulan@medmail.com.cn



# 大鼠急性肠道损伤动物模型的建立

邢锐, 马高峰, 杨晓强, 武金宝, 陈学清, 张振书

**背景资料**  
肠道损伤是临床常见的综合征, 有多种表现形式, 既有急性病变, 也有慢性病变; 既可以是肠道本身病变, 也可以是全身病变的局部表现。复制不同形式的肠道损伤的动物模型, 有利于针对性地开展实验性研究。

邢锐, 广东省第二人民医院重症监护科 广东省广州市 510317  
马高峰, 杨晓强, 武金宝, 陈学清, 张振书, 南方医科大学南方医院消化科 广东省广州市 510015  
国家自然科学基金资助项目, No. 30570839  
通讯作者: 邢锐, 510317, 广东省广州市海珠区石榴岗路1号, 广东省第二人民医院. hansxr@tom.com  
电话: 020-89168298 传真: 020-89168098  
收稿日期: 2007-03-07 修回日期: 2007-09-17

## Establishment of a rat model of acute intestinal injury

Rui Xing, Gao-Feng Ma, Xiao-Qiang Yang,  
Jin-Bao Wu, Xue-Qing Chen, Zhen-Shu Zhang

Rui Xing, Department of Intensive Care Unit, the Second People's Hospital of Guangdong Province, Guangzhou 510317, China

Gao-Feng Ma, Xiao-Qiang Yang, Jin-Bao Wu, Xue-Qing Chen, Zhen-Shu Zhang, Department of Gastroenterology, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510015, Guangdong Province, China

Supported by: National Nature Science Foundation of China, No. 30570839

Correspondence to: Dr. Rui Xing, Department of Intensive Care Unit, the Second People's Hospital of Guangdong Province, 1 Shiliugang Road, Haizhu District, Guangzhou 510317, China. hansxr@tom.com

Received: 2007-03-07 Revised: 2007-09-17

## Abstract

**AIM:** To develop a model of acute intestinal injury in rats treated with 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS).

**METHODS:** Sixty-four Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups: model, mock model and control groups. TNBS (ethanol-diluted), 500 mL/L ethanol and physiological saline were administered per rectum to each of the three groups, respectively. Feces, psychosis, appetite and mortality were observed in each group. Rats were killed after 1, 3, 5, 7 and 10 d, and the colon was removed for gross observation and histopathological evaluation. By combining the pathological scores, we summarized the rule of gut pathological change of rats after TNBS treatment and evaluated the feasibility of using the model in the study of intestinal injury.

**RESULTS:** On the first day, rats in the model group had thin and bloody stools until the end of the experiment. During the study, the rats were lazy, chilled and had loss of appetite. The symptoms lasted for 7-10 d, and alleviated thereafter. Four rats died (4/34) during 7-9 d after TNBS treatment. Pathological changes in the intestine showed up on d 1, acute intestinal injury appeared on d 5, and reached a peak on d 7. In the mock model group, the rats had thin stools on d 1, which persisted for 1-2 d. Pathological changes were mild and vanished on d 3. In the control group, the rats looked normal and there was no pathological change. The pathological score reflected the pathological changes.

**CONCLUSION:** Intestinal injury emerged at the initial stage and reached a peak 7 d after treatment with TNBS. After that, the pathological changes became chronic. The first 5 d after the rats were treated with TNBS they were suitable for studying acute intestinal injury.

**Key Words:** Intestinal injury; 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid; Animal model

Xing R, Ma GF, Yang XQ, Wu JB, Chen XQ, Zhang ZS. Establishment of a rat model of acute intestinal injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(27): 2918-2922

## 摘要

**目的:** 用三硝基苯磺酸(2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS)复制大鼠急性肠道损伤的动物模型。

**方法:** SD大鼠64只随机分为制模组、制模对照组及正常对照组, 分别用TNBS(乙醇稀释)、500 mL/L乙醇及生理水灌肠; 观察各组大鼠制模后的粪便、精神状态、进食及存活情况; 分别在第1、3、5、7及10天处死大鼠, 取结肠组织, 进一步观察肠道的大体病理变化和组织病理变化; 再结合病理评分, 总结大鼠TNBS制模后肠道病理改变的规律, 评价该模型用于实验性肠道损伤研究的可行性。

**结果:** TNBS制模组在制模后第1天即表现出明显的肠道稀便和血便, 持续至实验结束; 进

食减少、懒动、畏寒,持续7-10 d后缓解;4只在制模后第7-9天死亡(4/34);制模后第1天即出现肠道病理改变,第5天出现急性肠道损伤,第7天病理改变最严重.制模对照组大鼠在制模后第1天部分出现稀便,持续1-2 d后消失;制模后第1天肠道出现轻度病理改变,3 d后病变减退;正常对照组大鼠未见异常,各组大鼠肠道病理评分与病变程度一致.

**结论:**大鼠TNBS制模后早期即表现出肠道损伤,制模后第7天病理改变达到高峰,此后向慢性炎症转化;TNBS制模后5 d内可用于急性肠道损伤的实验性研究.

**关键词:** 肠道损伤;三硝基苯磺酸;动物模型

邢锐, 马高峰, 杨晓强, 武金宝, 陈学清, 张振书. 大鼠急性肠道损伤动物模型的建立. 世界华人消化杂志 2007;15(27):2918-2922  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2918.asp>

## 0 引言

肠道损伤是临床常见的综合征,有多种表现形式,既有急性病变,也有慢性病变;既可以是肠道本身病变,也可以是全身病变的局部表现.复制不同形式的肠道损伤的动物模型,有利于针对性地开展实验性研究.我们用三硝基苯磺酸复制了大鼠肠道损伤模型,并在制模后连续观察了制模大鼠的病变过程.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 64只SD大鼠,雌雄不限,体质量130-150 g,由南方医科大学实验动物中心提供;TNBS为Sigma公司产品,购自南方医科大学试剂中心,浓度为5 g/L,与纯乙醇按1:1体积混合,配制成含500 mL/L乙醇的TNBS溶液,终浓度为2.5 g/L;Olympus BX40光学显微镜是Olympus公司产品;其他为国产分析纯.

### 1.2 方法

**1.2.1 动物分组及处理集** 60只SD大鼠随机分为3组,制模组30只,制模对照组24只,正常对照组6只;用30 g/L戊巴比妥钠ip麻醉后,上述3组大鼠分别经肛门灌肠缓慢注入1 mL的2.5 g/L TNBS、500 mL/L乙醇及生理盐水,制模后大鼠平躺,自然清醒,常规饲养.制模组和制模对照组大鼠分别于制模后第1、3、5、7天麻醉后各处死6只,制模组大鼠制模后第10天再处死6只,正常对照组大鼠制模后第1天全部处死;全部动物处死前用戊巴比妥钠麻醉.处死后剖腹观察

表 1 结肠损伤大体评分标准

大体形态	评分
粘连	
无	0
轻度	1
重度	2
溃疡及炎症	
无	0
局部充血,无溃疡	1
1处溃疡不伴充血或肠壁增厚	2
1处溃疡伴炎症	3
2处溃疡伴炎症	4
>2处溃疡和/伴炎症>1 cm	5
溃疡和/伴炎症>2 cm,病变每增加1 cm加1分	6-8

腹腔及腔管病变,并剖开肠腔,观察肠黏膜病变,进行大体病理评分;取病变最明显部位肠组织一块,甲醛固定、包埋、切片、HE染色后行病理组织学观察和评分.

**1.2.2 观察和病理评分方法** 每天记录大鼠一般情况变化,包括粪便性状、进食情况、精神状态及死亡发生情况.大体病理评分参考王皓 *et al* 标准<sup>[1]</sup>(表1);病理组织学评分参考Araki<sup>[2]</sup>及Gulpinar *et al*<sup>[3]</sup>评分标准制定,根据黏膜损伤、隐窝破坏、黏膜出血、间质水肿及炎性细胞浸润轻、中、重程度分别计1、2、3分,每个标本组织损伤评分取上述5项指标的总和.

**统计学处理** 结果以mean±SD表示,所测数据用SPSS12.0统计软件进行单因素方差分析的LSD检验,以 $P \leq 0.05$ 为有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 大鼠一般情况变化** 制模组大鼠制模后第1天即出现稀便、懒动、畏寒及进食减少,大部分出现血便,稀便和血便持续至第10天,精神状态和进食减少,7 d后逐渐改善;死亡4只,发生于制模后7-9 d,剔除下一步试验,再补充制模4只;制模对照组部分大鼠制模后第1天出现稀便,仅持续1-2 d,精神状况基本正常,1 d后进食正常,无死亡发生;正常对照组大鼠未见异常.

**2.2 大体病理观察** 制模组大鼠在制模后第1天见结肠黏膜充血;3 d出现腹腔渗出,肠腔扩张,结肠黏膜出现溃疡和糜烂,有出血病灶;5 d腹腔渗出增多,结肠黏膜出现多溃疡和出血病灶;7 d病变最严重,结肠黏膜出现大的融合性溃疡和广泛出血病灶;制模后10 d见腹腔渗出减少,部分大鼠出现腹腔粘连,大部分大鼠溃疡变小或

研发前沿  
复制稳定的动物模型是研究肠道损伤的必要条件.复制肠道损伤动物模型方法多,用TNBS灌肠方法制作炎症性肠道损伤是实验研究中应用较多和较方便的方法,广泛用于人类各种肠道病变的发病机制的研究,但TNBS诱导的肠道损伤模型制模后的系列病理变化过程的研究尚较少见报道,连续的病理变化研究有利于肠道损伤的发生机制和防治措施的研究.



### 相关报道

Yamamoto、Onori *et al* 用TNBS复制大鼠结肠损伤的模型进行IBD发病机制的分子和遗传学、非炎症部位肠道肌肉收缩功能障碍, 以及不同时间点的病理变化等研究, 提示肠损伤随着时间的增长, 大鼠肠道病理变化加重, 但有一定的时限性。本文的研究发现制模后第1天就表现出明显的肠道损伤, 并且在制模后第7天病理改变达到高峰。

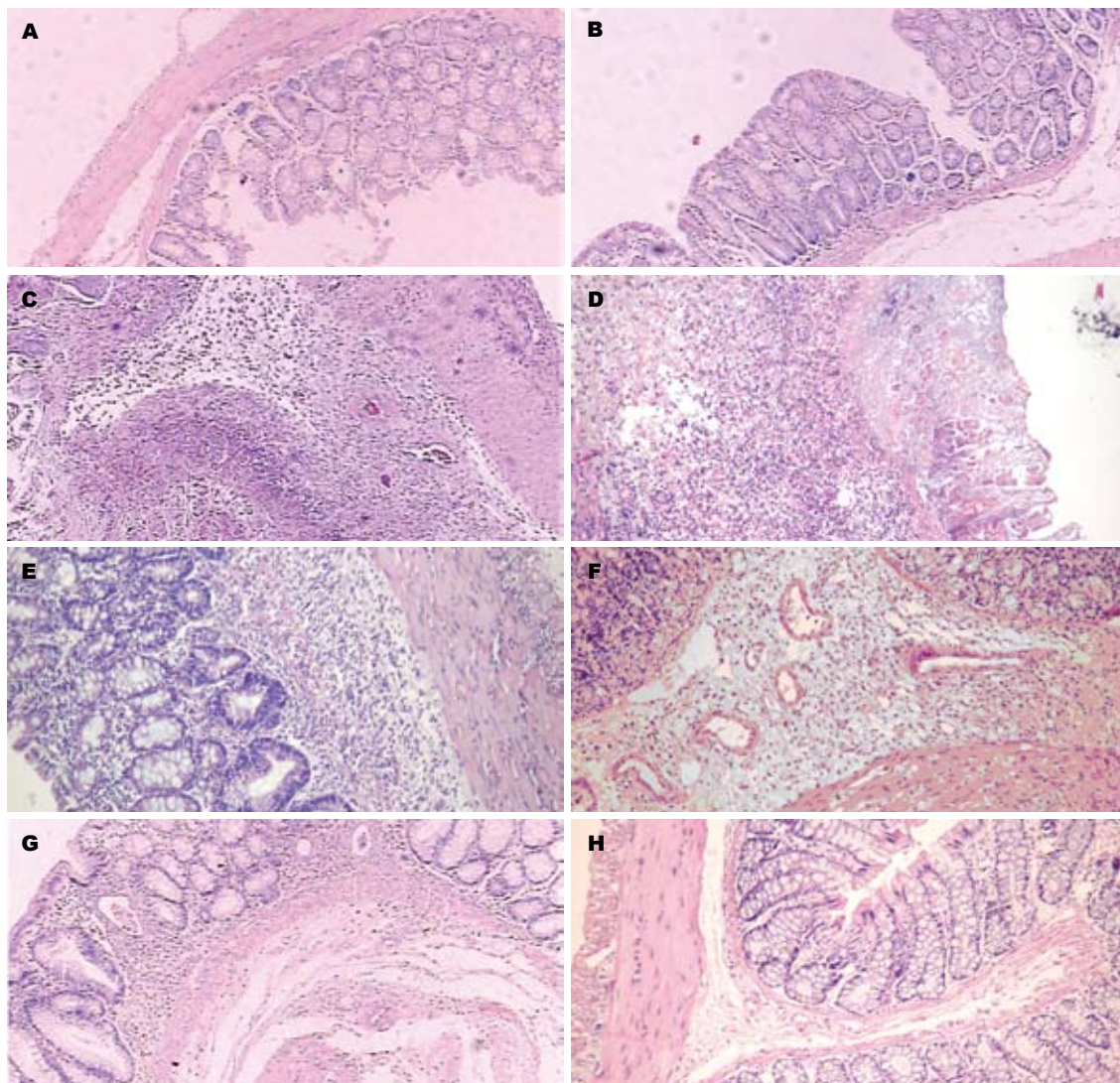


图 1 大鼠组织病理图片(IHE  $\times 100$ ). A: 制模后第1天; B: 制模后第3天; C: 制模后第5天; D: 制模后第7天; E: 制模后第10天; F: 制模对照组第1天; G: 制模对照组第3天; H: 正常对照组.

消失, 结肠黏膜充血和水肿减轻. 制模对照组大鼠腹腔未见病变, 制模后第1天出现肠黏膜轻度充血或毛细血管网消失, 未见溃疡和糜烂形成; 制模3 d后肠道病变消失. 正常对照组大鼠未见异常.

**2.3 组织病理变化** 制模组大鼠制模后第1天黏膜充血, 肠黏膜上皮中度受损, 黏膜下层见中量中性炎性细胞浸润, 轻度水肿, 未见出血病灶, 隐窝结构轻度受损(图1A); 第3天出现黏膜溃疡形成, 隐窝中度破坏, 黏膜下见中量中性粒细胞炎性细胞浸润, 黏膜下水肿明显(图1B); 第5天出现黏膜多处溃疡形成, 隐窝变浅, 有出血病灶、坏死病灶形成, 腺体破坏明显, 多处溃疡形成, 伴有黏膜缺损, 全层肠壁炎症浸润, 浆膜有炎性细胞渗出, 黏膜下水肿明显(图1C); 第7天黏膜上皮细胞广泛脱落, 溃疡加深增大,

形成融合性溃疡, 广泛黏膜出血病灶, 肠壁全层炎性细胞浸润, 水肿明显, 有脓肿形成, 隐窝破坏(图1D); 第10天黏膜上皮细胞中度受损, 隐窝破坏减轻, 肠壁全层炎性细胞浸润, 以黏膜和黏膜下层明显, 溃疡病变未加重, 出血和坏死病灶有吸收(图1E). 制模对照组大鼠第1天出现黏膜轻度损害, 黏膜下层轻度水肿, 见中性粒细胞浸润至肌层, 腺体结构未见明显异常, 无出血病灶形成(图1F); 第3天后见黏膜上皮基本完整, 隐窝结构完整, 水肿减轻, 黏膜下层炎性细胞浸润减少(图1G). 正常对照组大鼠组织病理未见明显变化(图1H).

**2.4 病理评分** 制模组大鼠大体及病理评分均在制模后第7天达到病理改变的高峰; 制模对照组大鼠病理评分仅在制模后第1天明显, 以后病理改变消退(图2A-B).

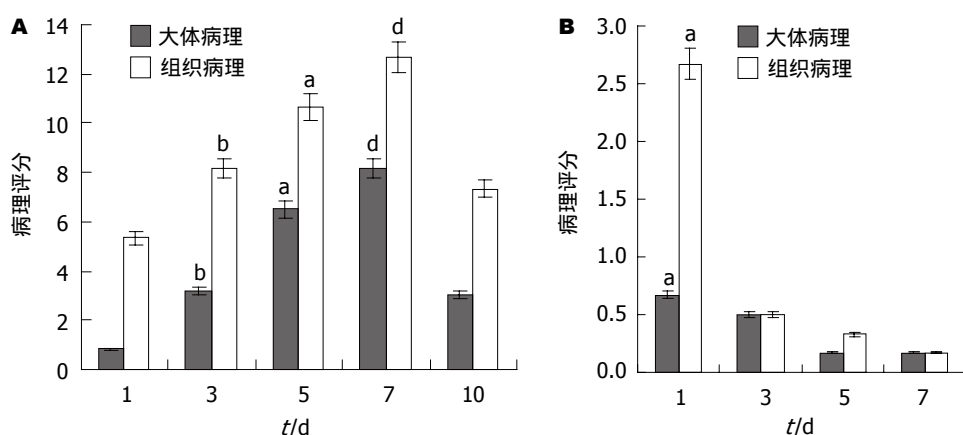


图 2 制模组和制模对照组制模后不同时间的病理评分. A: 制模组动物; B: 制模对照组. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 制模后第3天; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 制模后第1天; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 制模后第1、3、5天.

### 3 讨论

复制稳定的动物模型是研究肠损伤的必要条件. 复制肠损伤动物模型方法多, 但不同的肠损伤动物模型表现出不同的病理特点. 用TNBS灌肠方法制作炎症性肠道损伤是实验研究中应用较多和较方便的方法<sup>[4]</sup>. TNBS诱导的大鼠肠损伤模型广泛用于人类各种肠道病变发病机制的研究, 如Yamamoto用TNBS鼠结肠损伤的模型进行IBD发病机制的分子和遗传学研究<sup>[5]</sup>; Onori *et al*<sup>[6]</sup>将TNBS大鼠肠损伤动物模型用于研究非炎症部位肠道肌肉收缩功能障碍; TNBS肠损伤动物模型还用于肠道各种神经和炎症介质表达和传导的研究<sup>[7]</sup>; 用TNBS肠损伤模型进行的多个研究, 如抗氧化应激<sup>[8]</sup>、抑制过度的炎症表达<sup>[9]</sup>、调节免疫平衡等<sup>[10]</sup>也取得了效果, 所以, TNBS诱导的肠损伤模型涉及多种机制参与其中, 弄清TNBS制模后病理变化过程, 有利于从各个方面研究肠道损伤的发生机制和防治措施.

TNBS是一种弱有机弱酸, 属于半抗原类物质, 单一使用并不造成组织损害, 但与乙醇联合应用就能导致各种免疫应答, 其机制是乙醇造成黏膜损伤, 使TNBS与组织蛋白结合, 成为完全抗原, 诱导机体发生自身免疫性损伤<sup>[11]</sup>. 本研究中的病理变化过程也同样证明了这种机制, 假制模对照组大鼠病理改变程度较轻, 且仅在结肠注入乙醇后第1天有一定程度的病理改变, 此后肠道病变逐渐消失. 这个现象说明, 该模型早期结肠病变是乙醇的化学损伤所致, 而继发的肠道损伤是TNBS协同作用的结果.

从病理变化过程发现, TNBS制模后第1天就表现出明显的肠道损伤, 病理改变在第3-5天后明显加重, 并且在制模后第7天病理改变达到

高峰, 以后病理改变开始逐渐减轻, 变成慢性肠道炎症, 这与有关文献报道是一致的<sup>[12]</sup>. 因此, TNBS制模后7 d内可用于急性炎症性损伤的研究, 10 d后也可用于复制慢性结肠炎症性损伤动物模型<sup>[13]</sup>, 这在一定程度上反应了人类炎症肠病(inflammatory bowel disease, IBD)不同时期的病理改变和免疫损伤的特点<sup>[14]</sup>. 从研究中我们注意到, 在制模7 d后大鼠有一定的死亡率(4/34), 而在制模后5 d肠道急性损伤的特点已很明显, 没有动物死亡发生, 因此, 选择在制模后5 d进行急性肠道损伤的研究是适合的. 分析大鼠制模后一般表现情况, 与肠道病理变化过程是相符的.

肠道损伤的病理评分包括大体病理评分和组织病理评分, 评分方式较多, 应注意结合动物模型病变程度和特点以及实验周期的制定等多方面因素, 根据实验的具体情况, 有目的地制定有实用意义的评分标准. 我们在Araki及Gulpinar *et al*报道的评分标准基础上进行了适当修改, 目的是使评分标准能详细体现出TNBS制模后急性期肠道病理改变的特点. 在本实验模型的急性期, 不同程度的黏膜上皮层受损、肠壁全层的炎症和水肿以及出血病灶均能在评分标准中得到体现. 病理评分与肠道损伤的病理变化过程也是一致的.

从已有的文献报道和我们的实验结果可以看出, TNBS作为肠损伤的动物模型实验周期短, 方法简单, 费用低廉, 动物耐受性好, 制模成功率高.

### 4 参考文献

- 王皓, 欧阳钦, 胡仁伟. 三硝基苯磺酸结肠炎动物模型的建立. 胃肠病学 2001; 1: 7-10
- Araki Y, Andoh A, Takizawa J, Takizawa W, Fujiyama Y. Clostridium butyricum, a probiotic

**应用要点**  
通过系列病理变化过程研究发现, 制模后7 d内可用于急性炎症性损伤的研究, 10 d后可用于复制慢性结肠炎症性损伤动物模型, 但在制模7 d后大鼠有一定的死亡率, 而在制模后5 d没有动物死亡发生, 其机制尚有待于进一步研究.

## 同行评价

本文从连续系列的病理检测这个角度研究TNBS复制大鼠结肠损伤的模型,对模型在不同时间的可利用性进行评估,为肠道损伤的模型制作和实际应用提供了理论依据。本研究手段较先进,病历资料完整,立题目的明确,结论客观真实可靠,是一篇较好的科研论文。

- derivative, suppresses dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in rats. *Int J Mol Med* 2004; 13: 577-580
- 3 Gulpinar MA, Ozbeyli D, Arbak S, Yeğen BC. Acute Stress Ameliorates Colitis via Central Corticotropin-Releasing Factor and Serotonin (5-HT)-3 Receptors. *Turk J Med Sci* 2005; 35: 13-19
- 4 Selve N. Chronic intrajejunal TNBS application in TNBS-sensitized rats: a new model of chronic inflammatory bowel diseases. *Agents Actions* 1992; Spec No: C15-C17
- 5 Yamamoto S, Isuzugawa K, Takahashi Y, Murase Y, Iwata M, Arisawa T, Nakano H, Nishimura N, Yamato S, Ohta M, Ina K, Murata T, Hori M, Ozaki H, Imakawa K. Intestinal gene expression in TNBS treated mice using genechip and subtractive cDNA analysis: implications for Crohn's disease. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 2046-2053
- 6 Onori L, Aggio A, D'Alo' S, Muzi P, Cifone MG, Mellillo G, Ciccocioppo R, Taddei G, Frieri G, Latella G. Role of nitric oxide in the impairment of circular muscle contractility of distended, uninflamed mid-colon in TNBS-induced acute distal colitis in rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5677-5684
- 7 Linden DR, Foley KF, McQuoid C, Simpson J, Sharkey KA, Mawe GM. Serotonin transporter function and expression are reduced in mice with TNBS-induced colitis. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 565-574
- 8 Isozaki Y, Yoshida N, Kuroda M, Takagi T, Handa O, Kokura S, Ichikawa H, Naito Y, Okanoue T, Yoshikawa T. Effect of a novel water-soluble vitamin E derivative as a cure for TNBS-induced colitis in rats. *Int J Mol Med* 2006; 17: 497-502
- 9 Lindsay J, Van Montfrans C, Brennan F, Van Deventer S, Drillenburg P, Hodgson H, Te Velde A, Sol Rodriguez Pena M. IL-10 gene therapy prevents TNBS-induced colitis. *Gene Ther* 2002; 9: 1715-1721
- 10 Fiorucci S, Mencarelli A, Palazzetti B, Sprague AG, Distrutti E, Morelli A, Novobrantseva TI, Cirino G, Kotliansky VE, de Fougères AR. Importance of innate immunity and collagen binding integrin  $\alpha 1 \beta 1$  in TNBS-induced colitis. *Immunity* 2002; 17: 769-780
- 11 Strober W, Kelsall B, Fuss I, Marth T, Ludviksson B, Ehrhardt R, Neurath M. Reciprocal IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$  responses regulate the occurrence of mucosal inflammation. *Immunol Today* 1997; 18: 61-64
- 12 Moreels TG, De Man JG, Dick JM, Nieuwendijk RJ, De Winter BY, Lefebvre RA, Herman AG, Pelckmans PA. Effect of TNBS-induced morphological changes on pharmacological contractility of the rat ileum. *Eur J Pharmacol* 2001; 423: 211-222
- 13 Marquez E, Sanchez-Fidalgo S, Calvo JR, la de Lastra CA, Motilva V. Acutely administered melatonin is beneficial while chronic melatonin treatment aggravates the evolution of TNBS-induced colitis. *J Pineal Res* 2006; 40: 48-55
- 14 Neurath M, Fuss I, Strober W. TNBS-colitis. *Int Rev Immunol* 2000; 19: 51-62

编辑 程剑侠 电编 李军亮

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## 中华医学会第五届消化内镜学分会青年委员会成立大会暨第三届学会研讨会通知

**本刊讯** 由中华医学会消化内镜学分会主办,江西省医学会消化内镜专业委员会、南昌大学第一附属医院承办的中华医学会第五届消化内镜学分会青年委员会成立大会暨第三届学术研讨会将于2007-11-02/04在江西南昌举行。届时将邀请美国、香港等国家和地区的国际著名消化内镜专家及国内知名消化内镜专家莅临大会。

## 1 会议内容

中华医学会第五届消化内镜学分会青年委员会成立大会; 青年内镜医师培训讲座; 消化内镜新进展讲座; 青年委员专题讲座。

## 2 联系方式

徐萍, 330006, 江西省南昌市永外正街17号, 南昌大学第一附属医院消化科。电话: 0791-8692506或0791-8692540, E-mail: yfyxp@yahoo.com.cn。



# 外源性一氧化碳对小肠缺血再灌注大鼠血中碳氧血红蛋白的影响

韩宁, 陈卫民

韩宁, 陈卫民, 中国医科大学附属盛京医院麻醉科 辽宁省沈阳市 110004

通讯作者: 韩宁, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院麻醉科. hann@cmu2h.com

电话: 024-83955027

收稿日期: 2007-04-14 修回日期: 2007-09-15

## Effect of exogenous carbon monoxide on carboxyhemoglobin blood concentration during intestinal ischemia/reperfusion in rats

Ning Han, Wei-Min Chen

Ning Han, Wei-Min Chen, Department of Anesthesiology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Ning Han, Department of Anesthesiology, Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. hann@cmu2h.com

Received: 2007-04-14 Revised: 2007-09-15

### Abstract

**AIM:** To evaluate the safety of exogenous carbon monoxide inhaled during intestinal ischemia/reperfusion (IR) in rats, and to monitor its effect on carboxyhemoglobin (COHb) blood concentration.

**METHODS:** Thirty-two male Wistar rats weighing 220-260 g were randomly divided into four groups of eight rats each: group , sham operation (control group); group , small intestinal IR; group , 100  $\mu\text{L/L}$  carbon monoxide (CO) inhalation; and group , 250  $\mu\text{L/L}$  CO inhalation. Superior mesenteric artery (SMA) was isolated and clamped for 60 min, followed by 120 min reperfusion. In groups and , different doses of CO were continuously inhaled from the time of the SMA being clamped to the end of the experiment. In groups and , air was inhaled instead of CO. Blood samples were taken before the SMA was clamped, at 15 min before ischemia ( $T_1$ ), 1 h ( $T_2$ ) after ischemia, and 1 h ( $T_3$ )

and 2 h ( $T_4$ ) after reperfusion, for determination of COHb blood concentrations.

**RESULTS:** The COHb blood concentration increased significantly after CO inhalation in groups and when compared with group at  $T_2$ ,  $T_3$  and  $T_4$  ( $4.1\% \pm 1.3\%$  and  $10.1\% \pm 3.0\%$  vs  $1.0\% \pm 0.2\%$ ;  $5.8\% \pm 1.1\%$  and  $13.1\% \pm 2.8\%$  vs  $1.2\% \pm 0.3\%$ ;  $6.8\% \pm 1.2\%$  and  $13.3\% \pm 3.1\%$  vs  $1.1\% \pm 0.2\%$ ;  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** It is safe to inhale 100  $\mu\text{L/L}$  and 250  $\mu\text{L/L}$  CO during intestinal IR in rats.

**Key Words:** Small intestine; Reperfusion injury; Carboxyhemoglobin; Carbon monoxide

Han N, Chen WM. Effect of exogenous carbon monoxide on carboxyhemoglobin blood concentration during intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(27): 2923-2926

### 摘要

**目的:** 通过检测大鼠血中碳氧血红蛋白(COHb)浓度的变化, 探讨小肠缺血再灌注过程中外源性应用不同浓度一氧化碳的安全性。

**方法:**  $\delta$  Wistar大鼠32只, 随机分为假手术对照组(组)、小肠缺血再灌注组(组)及缺血时吸入浓度分别为100、250  $\mu\text{L/L}$ 一氧化碳(CO)的、组;制作小肠缺血再灌注模型。分别于缺血前15 min( $T_1$ ), 缺血后1 h( $T_2$ ), 再灌注后1 h( $T_3$ )、2 h( $T_4$ )取动脉血测定COHb浓度。

**结果:** 组及组缺血再灌注前后各时点COHb浓度无明显差异, 、组缺血后的 $T_2$ ( $4.1\% \pm 1.3\%$ ,  $10.1\% \pm 3.0\%$  vs  $1.0\% \pm 0.2\%$ )、 $T_3$ ( $5.8\% \pm 1.1\%$ ,  $13.1\% \pm 2.8\%$  vs  $1.2\% \pm 0.3\%$ )、 $T_4$ ( $6.8\% \pm 1.2\%$ ,  $13.3\% \pm 3.1\%$  vs  $1.1\% \pm 0.2\%$ )时点与组相应时点比较, COHb浓度升高( $P < 0.05$ )。

**结论:** 大鼠小肠缺血再灌注过程中外源性应用100  $\mu\text{L/L}$ 和250  $\mu\text{L/L}$ 的CO均是安全的。

### 背景资料

过去一直被认为是毒性气体的一氧化碳(CO)现被发现其作为细胞信使在人体各种生理和病理过程中发挥着重要调节作用。而作为内源性CO补充的外源性CO的应用问题开始越来越受到人们的关注。

### 应用要点

本文通过检测大鼠小肠缺血再灌注过程中给予外源性CO时血中碳氧血红蛋白(COHb)的变化,确定外源性CO应用于此病理生理过程的安全性,为进一步研究外源性CO防治IIR所致多器官损伤的作用提供可行性依据。

**关键词:** 小肠;再灌注损伤;碳氧血红蛋白;一氧化碳

韩宁, 陈卫民. 外源性一氧化碳对小肠缺血再灌注大鼠血中碳氧血红蛋白的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(27):2923-2926  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2923.asp>

## 0 引言

研究发现,过去一直被认为是毒性气体的一氧化碳(CO, carbon monoxide)作为细胞信使在人体各种生理和病理过程中发挥着重要调节作用<sup>[1-4]</sup>. 本文通过复制大鼠小肠缺血再灌注(IIR, intestinal ischemia-reperfusion)模型,检测IIR过程中给予外源性CO时血中碳氧血红蛋白(COHb)的变化,确定外源性CO应用于此病理生理过程的安全性,为进一步研究外源性CO防治IIR所致多器官损伤的作用提供可行性依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 实验动物健康♂ Wistar大鼠32只,体重220-260 g;由中国医科大学实验动物中心提供. 实验试剂和药品:标准一氧化碳气体(大连大特气体有限公司提供,钢瓶号:982910/9200219,压力:9.0 MPa,浓度:250×10<sup>-6</sup>/100×10<sup>-6</sup>,空气平衡);乌拉坦(200 g/L). 实验器材: CIBA-CORNING238型血气分析仪, Detax压力监测仪, B-D微量输液泵和B-D动静脉留置套管针(美国),大鼠气管插管和带单向活瓣T型管(自制);小动物手术器械等。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物分组** 大鼠实验前禁食12 h,自由饮水. 随机分为假手术对照组(I组)、小肠缺血再灌注组(II组)及吸入浓度分别为100 μL/L、250 μL/L一氧化碳的III、IV组. 每组8只。

**1.2.2 动物模型制作** 采用肠系膜上动脉(Superior Mesenteric Artery, SMA)夹闭-开放方式复制IIR模型<sup>[2]</sup>. 大鼠ip乌拉坦(1.0 g/kg)麻醉,开放股静脉持续微泵输注乳酸钠林格氏液(10 mL/kg·h). 行颈动脉置管(用于测定动脉压及采血),气管切开插管后接带单向活瓣T型管(活瓣能保证吸入气为所需气体,呼出气进入大气),保留自主呼吸. 常规消毒后取腹正中切口3-4 cm,游离SMA,血压平稳10 min后用显微手术用无损伤动脉夹关闭SMA起始部,造成肠缺血;缝合切口,60 min后经原切口入腹腔,去除动脉夹,恢复小肠血供120 min即为IIR模型. I组除不阻断SMA外,操作与其他组相同. III、IV组于缺血前10 min开始时分别吸入相应

浓度的CO. 再灌注时为防止血压急剧下降,快速补充乳酸钠林格氏液1-2 mL/次。

**1.2.3 观察指标和检测方法** 实验中连续监测大鼠动脉压(MAP)变化,分别于缺血前15 min(T<sub>1</sub>),缺血后1 h(T<sub>2</sub>),再灌注后1 h(T<sub>3</sub>)、2 h(T<sub>4</sub>)记录MAP值. II、III、IV组分别于T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>时点取颈动脉血0.3 mL; I组于相应时点取血. 以血气分析仪测定血气值及血中COHb值。

**统计学处理** 本实验所有数据以均数±标准差(mean±SD)表示. 采用SPSS13.0专业统计软件对数据进行单因素方差分析和t检验. P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 动物基础情况** 各组动物体质量、基础血气值、基础血红蛋白值(Hb)均在正常范围内,组间无显著性差别(P>0.05,表1)。

**2.2 各组动物MAP的变化** II、III、IV组同I组相应时点比较,再灌注后的T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>时点MAP下降显著(P<0.01); III、IV组同II组相应时点比较,CO吸入后的T<sub>2</sub>、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>时点MAP变化无明显差异(P>0.05)(表2)。

**2.3 各组动物血中COHb的变化** I组各时点、II组缺血及再灌注前后各时点COHb浓度无明显差异(P>0.05). III、IV组缺血后(即吸入CO后)的T<sub>2</sub>、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>时点与II组相应时点比较,COHb浓度升高(P<0.05),且IV组升高更显著(P<0.01). 与本组缺血前的T<sub>1</sub>时点相比,III组COHb浓度升高(P<0.05); IV组COHb浓度升高显著(P<0.01)(表2)。

## 3 讨论

CO无色、无味、无刺激性,过去一直被认为是一种毒性气体分子,因此对他的研究多局限在毒理学领域. 其中毒机制是: CO与人体红细胞内Hb分子的原卟啉的亚铁复合物发生紧密而可逆的结合,形成COHb,妨碍Hb与O<sub>2</sub>的结合与解离,从而造成组织缺氧. 神经系统由于对缺氧最敏感且耐受最差,因此毒性伤害发生最早也最重. 判断CO对生物体产生的毒性伤害程度有许多生理学、神经学和病理学指标,而测定血中COHb浓度是其中最重要和最直接的方法之一. 研究显示: 当人体血中COHb超过10%时,可引起头痛、头晕、心悸、呕吐等轻度中毒症状;超过50%时,可出现持续昏迷、各种反射消失,甚至死亡<sup>[5]</sup>. 与导致大鼠神经行为改变和脑血管损伤相对应的最低COHb阈值是15%-20%<sup>[6]</sup>. 而随着

同行评价  
本文设计合理, 思路清晰, 论证有据, 对临床有一定的指导意义和参考价值。

表 1 各组动物基础情况( $n = 8$ , mean  $\pm$  SD)

分组	体质量(g)	pH	PaO <sub>2</sub> (mmHg)	PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	Hb(g/L)
I组	240 $\pm$ 13	7.2 $\pm$ 0.1	55.2 $\pm$ 3.8	44.5 $\pm$ 5.5	133 $\pm$ 16
II组	236 $\pm$ 15	7.2 $\pm$ 0.1	53.6 $\pm$ 4.0	42.6 $\pm$ 6.3	122 $\pm$ 17
III组	238 $\pm$ 16	7.2 $\pm$ 0.1	56.3 $\pm$ 2.6	46.2 $\pm$ 5.3	132 $\pm$ 10
IV组	237 $\pm$ 15	7.2 $\pm$ 0.0	54.6 $\pm$ 3.0	43.7 $\pm$ 5.4	131 $\pm$ 19

表 2 各组动物MAP变化和各时点COHb值情况( $n = 8$ , mean  $\pm$  SD)

分组	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>
MAP(mmHg)				
I组	115 $\pm$ 15	95 $\pm$ 12	90 $\pm$ 7	83 $\pm$ 8
II组	120 $\pm$ 9	91 $\pm$ 10	72 $\pm$ 9 <sup>f</sup>	65 $\pm$ 8 <sup>f</sup>
III组	118 $\pm$ 7	92 $\pm$ 7	71 $\pm$ 6 <sup>f</sup>	68 $\pm$ 5 <sup>f</sup>
IV组	121 $\pm$ 8	102 $\pm$ 13	78 $\pm$ 6 <sup>f</sup>	72 $\pm$ 4 <sup>f</sup>
COHb(%)				
I组	1.3 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.3	1.3 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.6
II组	1.1 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.2
III组	0.9 $\pm$ 0.3	4.1 $\pm$ 1.3 <sup>ac</sup>	5.8 $\pm$ 1.1 <sup>ac</sup>	6.8 $\pm$ 1.2 <sup>ac</sup>
IV组	0.9 $\pm$ 0.2	10.1 $\pm$ 3.0 <sup>bd</sup>	13.1 $\pm$ 2.8 <sup>bd</sup>	13.3 $\pm$ 3.1 <sup>bd</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs II组相应时点; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 本组T<sub>1</sub>时点, <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs I组相应时点。

近年对细胞间信使分子研究的深入, 发现哺乳动物在生理条件下体内普遍存在内源性CO分子, 他们大多由血红素氧合酶(HO)催化血红素降解时产生<sup>[7-8]</sup>, 部分能结合和激活可溶性鸟苷酸环化酶(SGC), 通过调节环磷酸鸟苷(cGMP)的生成起到细胞信使的作用<sup>[7]</sup>。

越来越多的研究发现, CO作为一种细胞信使分子在生物体内具有舒张血管和支气管平滑肌、抑制血小板聚集、抑制炎症反应、抗凋亡、抗增殖等多种生理学作用, 在神经、呼吸、循环等生理过程和抑制急性肺损伤、脏器缺血再灌注损伤、器官移植排斥反应等病理过程中发挥着重要调节作用<sup>[9-11]</sup>。由于在严重病理生理过程中内源性CO的产生有限, 不能达到对机体组织的保护作用, 于是作为内源性CO补充的外源性CO的应用问题开始受到人们的关注。有关“外源性应用CO能否在不引起毒性反应的情况下抑制部分严重病理生理过程的发生和发展”这一课题已经成为危重症治疗领域研究的热点之一。如Otterbein研究发现, CO可明显提高大鼠对高氧性肺损伤的耐受性: 吸入24 h高浓度氧的大鼠全部死亡, 而同时吸入CO的大鼠全部存活; 吸入CO能明显减轻高氧所致的胸腔积液、肺水肿、PMN在肺中的扣留及肺泡支气管灌洗液中蛋白含量, 使肺细胞凋亡指数下降, 未发现任何副作用<sup>[12]</sup>。Neto和Nakao *et al*给接受肾

和小肠移植的大鼠从移植前1 h开始至移植IR后24 h连续吸入CO, 与未吸入CO组相比, 围移植期吸入CO可使移植器官减轻IR损伤、改善移植器官功能、发挥抗排斥效应并提高存活率<sup>[13-14]</sup>。在鼠心脏移植模型中, 连续2 d吸入一定浓度的CO, 其抑制排斥反应的作用可持续达50 d。

本研究对外源性CO应用在大鼠IIR过程中的安全性进行了探索。IIR是机体遭受严重创伤、大手术、烧伤和感染等打击后最早发生的病理生理过程之一, 可以导致肠道屏障功能不全, 引起大量原存在于肠腔内的细菌和内毒素发生移位, 严重时可激发全身性炎症反应(SIRS)的形成, 并最终导致多器官功能衰竭(MODS)<sup>[15]</sup>。为避免对大鼠产生毒性作用, 本实验选择的外源性CO的浓度极低, 是CO大鼠半数致死剂量(LD50: 1807  $\mu$ L/L/4 h)的1/20-1/7, 是用于测定人肺弥散功能所用CO浓度(3000  $\mu$ L/L)的1/12, 甚至低于吸烟时接触的CO浓度(400  $\mu$ L/L)。实验结果显示: 在整个IIR过程中, 大鼠吸入100  $\mu$ L/L和250  $\mu$ L/L的CO, 对MAP没有明显影响。吸入100  $\mu$ L/L CO时, 血内COHb升高; 当吸入250  $\mu$ L/L CO时, 血内COHb虽升高明显, 但最高也仅达到13.3%, 没有超过引起大鼠神经行为改变和脑血管损伤的最低阈值。Otterbein *et al*<sup>[12]</sup>的研究也认为正常大鼠持续接受 $\leq 250$   $\mu$ L/L的CO并不能引起不良反应的发生。本研究在大鼠IIR前后测定

的血中COHb结果表明,我们选择的两种浓度的CO均可以安全地应用在大鼠IIR过程中,不会产生毒性作用。至于外源性应用100  $\mu$ L/L、250  $\mu$ L/L CO是否能在大鼠IIR过程中对多器官损伤起到防治作用且防治程度有何不同,还有待于进一步研究。

血中COHb浓度的变化表明,大鼠IIR过程中吸入浓度为100  $\mu$ L/L和250  $\mu$ L/L的CO均是安全的。这为进一步研究外源性CO防治IIR所致多器官损伤的作用奠定了安全性基础。

#### 4 参考文献

- 1 Kim HP, Ryter SW, Choi AM. CO as a cellular signaling molecule. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006; 46: 411-449
- 2 Wu L, Wang R. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacol Rev* 2005; 57: 585-630
- 3 Farrugia G, Miller SM, Rich A, Liu X, Maines MD, Rae JL, Szurszewski JH. Distribution of heme oxygenase and effects of exogenous carbon monoxide in canine jejunum. *Am J Physiol* 1998; 274: G350-G358
- 4 Ryter SW, Otterbein LE. Carbon monoxide in biology and medicine. *Bioessays* 2004; 26: 270-280
- 5 李温仁, 倪国坛. 高压氧医学. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 1998: 463-480
- 6 Kanu A, Whitfield J, Leffler CW. Carbon monoxide contributes to hypotension-induced cerebrovascular vasodilation in piglets. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H2409-H2414
- 7 Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M. Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 558-567
- 8 Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37: 517-554
- 9 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: 900-903
- 10 丁学琴, 刘贵明, 王俊科, 盛卓人, 孙新艳. 吸入一氧化碳对急性缺氧性肺动脉高压及缺氧性肺损伤的影响. *中华麻醉学杂志* 2003; 23: 361-364
- 11 Kohmoto J, Nakao A, Kaizu T, Tsung A, Ikeda A, Tomiyama K, Billiar TR, Choi AM, Murase N, McCurry KR. Low-dose carbon monoxide inhalation prevents ischemia/reperfusion injury of transplanted rat lung grafts. *Surgery* 2006; 140: 179-185
- 12 Otterbein LE, Mantell LL, Choi AM. Carbon monoxide provides protection against hyperoxic lung injury. *Am J Physiol* 1999; 276: L688-L694
- 13 Neto JS, Nakao A, Kimizuka K, Romanosky AJ, Stolz DB, Uchiyama T, Nalesnik MA, Otterbein LE, Murase N. Protection of transplant-induced renal ischemia-reperfusion injury with carbon monoxide. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287: F979-F989
- 14 Nakao A, Kimizuka K, Stolz DB, Neto JS, Kaizu T, Choi AM, Uchiyama T, Zuckerbraun BS, Nalesnik MA, Otterbein LE, Murase N. Carbon monoxide inhalation protects rat intestinal grafts from ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol* 2003; 163: 1587-1598
- 15 Koike K, Moore FA, Moore EE, Poggetti RS, Tuder RM, Banerjee A. Endotoxin after gut ischemia/reperfusion causes irreversible lung injury. *J Surg Res* 1992; 52: 656-662

编辑 程剑侠 电编 李军亮

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

## 世界华人消化杂志的同行评价

本刊讯 《世界华人消化杂志》对所有文章进行在线同行评价,采用匿名方式。通常每篇文章邀请2-3位专家审阅,至少2人通过方可录用,否则退稿。每期最后一页致谢本期所有审稿人(含退稿)。文章等级评定: A级、B级、C级、D级、E级、不清楚。其中A和B属于很好, C和D不算太好, E是很差, 还有一部分是不清楚。

# T7 RNA聚合酶催化的荧光扩增技术检测人CEA

朱自满, 李世拥, 安萍, 白雪, 于波

朱自满, 李世拥, 安萍, 白雪, 于波, 北京军区总医院全军普通外科中心 100700

国家自然科学基金资助项目, No. 30471700

通讯作者: 于波, 100700, 北京市东城区南门仓五号, 北京军区总医院全军普通外科中心. yubo66@126.com

电话: 010-66721188

收稿日期: 2007-05-31 修回日期: 2007-09-13

## Detection of human carcinoma-embryonic antigen using fluorescent amplification catalyzed by T7 polymerase technique

Zi-Man Zhu, Shi-Yong Li, Ping An, Xue Bai, Bo Yu

Zi-Man Zhu, Shi-Yong Li, Ping An, Xue Bai, Bo Yu, the Chinese PLA Center of General Surgery, Beijing General Military Hospital, Beijing 100700, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30471700

Correspondence to: Dr. Bo Yu, the Chinese PLA Center of General Surgery, Beijing General Military Hospital, 5 South Door Cang, East Cheng District, Beijing 100700, China. yubo66@126.com

Received: 2007-05-31 Revised: 2007-09-13

## Abstract

**AIM:** To establish a new method for the detection of human carcinoma-embryonic antigen (CEA) using fluorescent amplification catalyzed by T7 polymerase technique (FACTT).

**METHODS:** Avidin was used to bridge biotinylated detection antibody and biotinylated DNA. T7 RNA polymerase was added to perform RNA amplification. RNA products were quantified by adding the RNA intercalating dye RiboGreen. CEA was determined by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

**RESULTS:** The detection limit of FACTT for human CEA was  $2 \times 10^{-3}$  mg/L, which was 125 times more sensitive than ELISA (0.25 mg/L), which was performed in parallel.

**CONCLUSION:** The FACTT has a higher sensitivity than sandwiched ELISA for the detection of human CEA, and may be a powerful and very

sensitive tool for early stage clinical diagnosis.

**Key Words:** T7 RNA polymerase; Fluorescent amplification; Carcinoma-embryonic antigen; Enzyme-linked immunosorbent assay

Zhu ZM, Li SY, An P, Bai X, Yu B. Detection of human carcinoma-embryonic antigen using fluorescent amplification catalyzed by T7 polymerase technique. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(27): 2927-2930

## 摘要

**目的:** 建立检测人癌胚抗原(CEA)的T7 RNA聚合酶催化的荧光扩增技术(fluorescent amplification catalyzed by T7 polymerase technique, FACTT).

**方法:** 以亲和素作为连接分子, 连接生物素化的检测抗体和生物素化的DNA, 加入T7RNA聚合酶进行转录扩增反应, 对生成的RNA产物进行荧光检测, 并同时夹心酶联免疫吸附剂测定(ELISA)方法检测人CEA.

**结果:** 成功的建立了检测人CEA的T7 RNA聚合酶催化的荧光扩增技术, 其检测CEA的灵敏度达 $2 \times 10^{-3}$  mg/L, 比夹心ELISA 方法灵敏度(0.25 mg/L)高125倍.

**结论:** T7 RNA聚合酶催化的荧光扩增技术较夹心ELISA方法具有更高的敏感性, 有可能作为一种新的检测方法用于临床的早期诊断.

**关键词:** T7 RNA聚合酶; 荧光扩增技术; 癌胚抗原; 酶联免疫吸附剂测定

朱自满, 李世拥, 安萍, 白雪, 于波. T7 RNA聚合酶催化的荧光扩增技术检测人CEA. 世界华人消化杂志 2007;15(27):2927-2930

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2927.asp>

## 0 引言

T7 RNA聚合酶催化的荧光扩增技术(fluorescent amplification catalyzed by T7 polymerase technique, FACTT)是由Zhang *et al*<sup>[1]</sup>建立的一种新的抗原检测方法. 他将抗原抗体的反应的特

## 背景资料

CEA(癌胚抗原)是一种糖蛋白, 是由Gold(戈德)和Freedman(弗里德曼)在结肠癌患者和内胚层(胃肠道)的上皮肿瘤中首次发现的, FACTT即T7 RNA聚合酶催化的荧光扩增技术, 原理与免疫PCR相似, 目前临床上均使用酶联免疫吸附试验检测肿瘤标志物.



### 名词解释

FACTT: T7 RNA聚合酶催化的荧光扩增技术, 是一种新的抗原检测方法, 他将抗原抗体反应的特异性、T7RNA聚合酶的线性扩增能力及荧光检测的敏感性结合在一起, 较ELISA具有更高的敏感度。

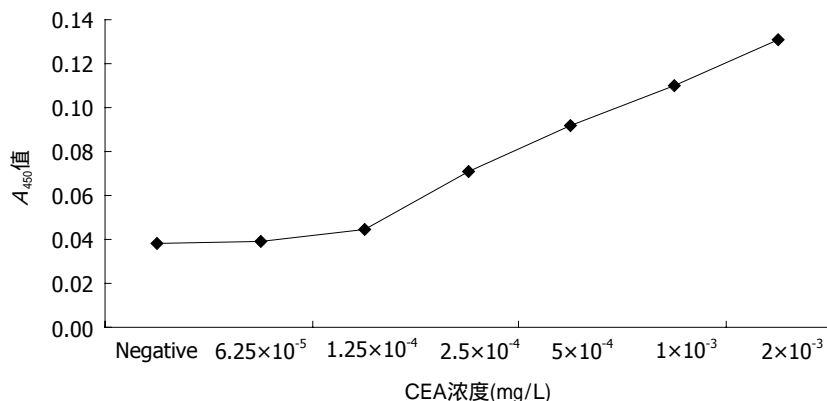


图1 双夹心ELISA方法检测人CEA的结果。

异性、T7 RNA聚合酶的线性扩增能力以及荧光检测的敏感性结合在一起, 提高了对抗原检测的敏感性, 而且整个实验过程均在室温下进行, 而免疫PCR则需要不断改变反应体系的温度, 所以本实验的重复性更好。目前临床上均使用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测肿瘤标志物, 检测极限范围大多在0.01-50 mg/L之间<sup>[2]</sup>。本研究通过建立检测人CEA的T7 RNA聚合酶催化的荧光扩增方法, 并与夹心ELISA方法比较其灵敏度, 为进一步使用该方法检测其他肿瘤标志物奠定基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** CEA捕获抗体、检测抗体、生物素化抗体及CEA标准品, CEA夹心ELISA检测试剂盒均购自Canag公司; 亲和素、生物素, RiboGreen购自Invitrogen公司, DNA模板pGEM<sup>®</sup>购自Promega公司(含有T7启动子及T7终止子), NTP、T7 RNA polymerase plus购自Ambion公司。引物序列: F: 5'CTCTTCGCTATTACGCCAGG 3'; R: 5'CAATACGCAACCGCCTC3', 由鼎国公司合成, 其中上游引物5'端碱基上带有生物素标记。荧光连续测读仪Thermo Ascent公司。

**1.2 方法** 生物素化DNA指示分子的构建按文献报道进行<sup>[3-5]</sup>。根据DNA的核苷酸序列用DNA Star软件设计1对引物, 其中上游引物的5'端碱基上带有生物素标记。以pGEM<sup>®</sup>为模板进行PCR扩增, 扩增产物回收后纯化并定量测定, 保存在-20℃。夹心ELISA方法严格按照说明书进行操作。FACTT方法检测人CEA按文献进行<sup>[1]</sup>。取96孔板一块, 每孔加60 μL捕获抗体(用碳酸盐-碳酸氢盐包被缓冲液稀释成5 mg/L)4℃过夜。加10 g/L酪蛋白封闭液, 22℃ 1 h。加20 μL待检抗原(包括对照品, 位于1 mL/L的FBS中)22℃孵育1 h。加20 μL稀释的生物素化检测抗体(180 mg/

L)22℃孵育1 h。加5 mg/L链亲和素22℃孵育1 h。加500 mg/L生物素化DNA(扩增模块)22℃孵育1 h。洗板液PBST(含1 mL/L Tween20的PBS)洗板6次, 在每次结合孵育后。洗板后, 每孔加20 μL反应混合液, 组成: 60 U T7RNA聚合酶(ambion), 1.25 μmol NTP, 1×T7缓冲液。37℃孵育3 h。加入RNase抑制剂, 加20 μL RiboGreen(1:200稀释, 按说明书进行)。在荧光光谱仪上测量(激发波长485 nm, 发射波长535 nm)。

## 2 结果

**2.1 双抗夹心ELISA 法检测人CEA的结果** 取2 mg/L的人CEA标准品, 以稀释液倍比稀释后得系列稀释度的待测品, 浓度分别是2 mg/L、1 mg/L、0.5 mg/L、0.25 mg/L、0.125 mg/L、0.0625 mg/L, 每个浓度设3个复孔。检测极限的判定: 大于阴性对照组的平均A值加上其3倍的标准差所对应的浓度值。结果双抗夹心ELISA法最低可检测出0.25 mg/L的人CEA(图1)。

**2.2 FACTT方法检测人CEA的敏感度** 取2 mg/L的人CEA标准品, 以稀释液作10倍系列稀释后获得系列稀释度的待测品, 浓度分别是2 mg/L、0.2 mg/L、2×10<sup>-2</sup> mg/L、2×10<sup>-3</sup> mg/L、2×10<sup>-4</sup> mg/L、2×10<sup>-5</sup> mg/L, 每个浓度设3个复孔。检测极限的判定: 大于阴性对照组的平均A值加上其3倍的标准差所对应的浓度值。FACTT方法最低可检测出2×10<sup>-3</sup> mg/L的人CEA(图2)。

## 3 讨论

FACTT(fluorescent amplification catalyzed by T7 polymerase technique), 即T7 RNA聚合酶催化的荧光扩增技术<sup>[1]</sup>, 原理与免疫PCR相似<sup>[6]</sup>, 只是用T7 RNA聚合酶代替免疫PCR中的Taq聚合酶, 终产物为RNA分子。通过1个对DNA和检测抗体具双重活性的连接分子, 使作为标志物的DNA分



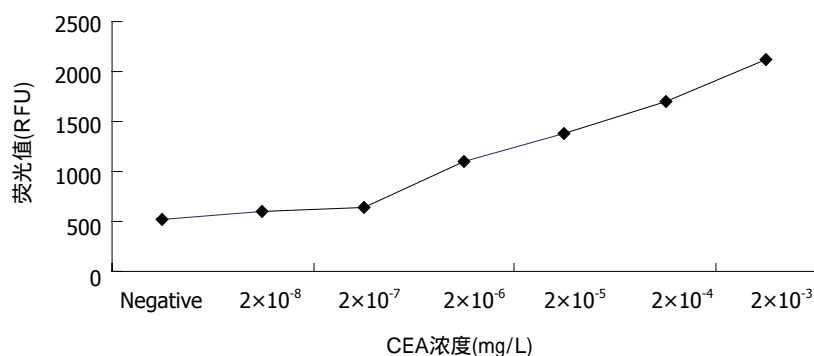


图 2 FACTT方法检测人CEA结果.

**同行评价**  
本文阐述了T7 RNA聚合酶催化的荧光扩增技术较ELISA方法具有更高的敏感性, 可用于临床的早期诊断, 方法成熟, 分析有据, 有一定的可读性和应用性.

子特异地结合到抗原-抗体复合物, 作为标志物的DNA分子含有T7启动子及T7终止子<sup>[7-8]</sup>, 随后加入的T7 RNA聚合酶以DNA标志物为模板生成线性的RNA, 线性RNA产物的存在标明DNA标志物分子特异地与抗原-抗体复合物发生了连接, 进而证明抗原的存在; 而RNA产物的定量分析可间接反映被测抗原的浓度. FACTT实验体系的基本组成包括待检测抗原、一对抗体(针对待检测抗原不同表位的捕获抗体及检测抗体)、连接分子、DNA指示分子、T7 RNA聚合酶和RNA荧光检测染料<sup>[9]</sup>.

CEA(癌胚抗原)是一种糖蛋白, 是由Gold(戈德)和Freedman(弗里德曼)在结肠癌患者和内胚层(胃肠道)的上皮肿瘤中首次发现的<sup>[10-11]</sup>. 免疫学检测发现体内存在许多CEA样的分子. 所以本实验采用针对人CEA的一对mAb, 可克服这些交叉反应性CEA样分子的干扰, 其中检测mAb针对Gold抗原决定簇IV, 捕捉mAb针对Gold抗原决定簇V<sup>[12]</sup>.

FACTT中作为标志物的DNA分子应包含有T7启动子及T7终止子, 而且长度应足够, 还要保证DNA分子的纯度, 不选用待检测样品中可能存在的DNA分子. 本研究选用含有T7启动子及T7终止子的pGEM<sup>®</sup>线性载体作为DNA模板, 根据其序列设计一对引物, 其中上游引物的5'端生物素化, 进行PCR获得大量生物化的DNA指示分子, 纯化并定量后使用, 实验结果表明所产生的生物化DNA完全能满足实验的需要. 确定了生物化DNA及生物化抗体的最佳浓度.

FACTT的终产物是通过T7 RNA聚合酶扩增的RNA分子, Ribogreen荧光染料能特异性地检测线性RNA分子, 不与游离的核糖核酸分子结合, 因此能极大地提高检测RNA分子的灵敏度<sup>[9]</sup>.

我们建立了检测人CEA的T7 RNA聚合酶催化的荧光扩增方法, 实验中采用亲和素作连接分子, 生物素化抗体和生物素化DNA分子是以

游离的方式加入, 使亲和素与生物素结合, 冲洗后, 再加入生物素化的DNA. 结果表明, FACTT方法可检测到 $2 \times 10^{-3}$  mg/L的人CEA, 比夹心ELISA检测方法灵敏度高125倍.

FACTT是新近发展的一种免疫检测技术, 他提高了ELISA检测的灵敏度, 可以检测出ELISA测不出的抗原物质, 而且FACTT均在室温下进行, 反应条件温和, 有别于免疫PCR, 需要改变反应的条件, 所以FACTT的重复性更好.

FACTT作为一种新的检测抗原方法, 虽然具有灵敏度高的优点, 但是操作步骤较多, 洗板次数频繁, 而且实验的最终产物为RNA. 由于RNA酶的无处不在, 所以RNA容易受到污染而降解. 为了避免RNA酶的污染, 实验操作要严谨, 注意实验环境及所有使用液体的无RNA酶处理, 可以避免或减少终产物RNA分子的降解. 如果将检测抗体与DNA分子预结合成复合物或者直接连接, 则可以大大减少实验步骤, 节约实验时间, 减少污染的机会, 将有助于临床大规模使用.

#### 4 参考文献

- 1 Zhang H, Cheng X, Richter M, Greene MI. A sensitive and high-throughput assay to detect low-abundance proteins in serum. *Nat Med* 2006; 12: 473-477
- 2 Porstmann T, Kiessig ST. Enzyme immunoassay techniques. An overview. *J Immunol Methods* 1992; 150: 5-21
- 3 Allen RC, Rogelj S, Cordova SE, Kieft TL. An immuno-PCR method for detecting *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *J Immunol Methods* 2006; 308: 109-115
- 4 Tian P, Mandrell R. Detection of norovirus capsid proteins in faecal and food samples by a real time immuno-PCR method. *J Appl Microbiol* 2006; 100: 564-574
- 5 Guo YC, Zhou YF, Zhang XE, Zhang ZP, Qiao YM, Bi LJ, Wen JK, Liang MF, Zhang JB. Phage display mediated immuno-PCR. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: e62
- 6 Sano T, Smith CL, Cantor CR. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science* 1992; 258:

- 120-122
- 7 Butler ET, Chamberlin MJ. Bacteriophage SP6-specific RNA polymerase. I. Isolation and characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 1982; 257: 5772-5778
- 8 Melton DA, Krieg PA, Rebagliati MR, Maniatis T, Zinn K, Green MR. Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res* 1984; 12: 7035-7056
- 9 Jones LJ, Yue ST, Cheung CY, Singer VL. RNA quantitation by fluorescence-based solution assay: RiboGreen reagent characterization. *Anal Biochem* 1998; 265: 368-374
- 10 Gold P, Freedman SO. Freedman, Demonstration of Tumor-Specific Antigens in Human Colonic Carcinomata by Immunological Tolerance and Absorption Techniques. *J Exp Med* 1965; 121: 439-462
- 11 Gold P, Freedman SO. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* 1965; 122: 467-481
- 12 Hammarstrom S, Shively JE, Paxton RJ, Beatty BG, Larsson A, Ghosh R, Bormer O, Buchegger F, Mach JP, Burtin P. Antigenic sites in carcinoembryonic antigen. *Cancer Res* 1989; 49: 4852-4858

编辑 程剑侠 电编 李军亮

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

## 第二届北京国际消化疾病高峰论坛在京举行



图 1 北京国际消化疾病高峰论坛会场。



图 2 GUT主编Robin Spiller教授(右)和WJG科学编辑长有德博士(左)。



图 3 GUT副主编William Grady教授(左)和WJG科学编辑长有德博士(右)。

**本刊讯** 第二届北京国际消化疾病高峰论坛于2007-09-21/23在北京昆仑饭店举行(图1), 作为消化疾病的国际性期刊, *World Journal of Gastroenterology(WJG)*应邀参加了此次会议, 并与GUT主编Robin Spiller教授(图2)、副主编William Grady教授(图3)亲切合影, 并赠送了最新出版的*WJG*期刊。

本届论坛由中国医学论坛报社、北京大学医学部消化疾病研究中心、英国医学杂志集团以及GUT杂志社共同主办, 是继2005年“首届北京国际消化疾病高峰论坛”成功举办后的第二次东西方消化领域的高层学术交流。GUT主编Robin Spiller教授、北京大学医学部第三医院消化科周丽雅教授等18位消化疾病领域的著名中外专家, 就炎性肠病、功能性肠病、脂肪肝与肝纤维化、门静脉高压与肝硬化、病毒性肝炎、Barrett食管与非糜烂性反流病(NERD)、幽门螺杆菌(*H pylori*)与胃癌、结直肠癌、胰腺炎及其遗传学消化疾病, 分为9个热点主题, 中西方专家两两组合进行报告, 然后面对面交流和讨论, 指出面临的新问题, 预测消化疾病的发展和演化趋势, 并分析和比较消化疾病发病特点与发展变化趋势在中国与西方国家的异同。

参加论坛的代表500多位中, 部分特邀发言专家任职*WJG*编委。

从本届国际性消化疾病大会可以看出, *WJG*作为消化疾病学领域的国际性唯一一本周刊, 栏目设置和刊登内容紧密跟踪消化疾病国际研究前沿, 论坛的9个主题都是*WJG*长期以来和最新关注的重点和热点。报告专家报道和述评了各自及其他相关研究组发表的最新研究成果, 其中*WJG*发表论文被国内外专家引用4篇, 显示了*WJG*作为消化疾病领域的国际性和发表论文的高质量。

*WJG*以本届国际性消化疾病论坛为窗口, 及时动态的跟踪消化疾病研究的难点和重点, 将最前沿的科研成果吸引到*WJG*以第一时间发表, 同时, 也适时调整设置栏目, 适应消化疾病发展的新特点、新趋势。(科学编辑: 长有德 2007-09-25)

## 榄香烯联合化疗治疗荷瘤小鼠

邹大伟, 巴 静, 吉阳涛, 路 平

邹大伟, 巴静, 吉阳涛, 中国医科大学附属第一医院检验科  
辽宁省沈阳市 110001  
路平, 中国医科大学附属第一医院肿瘤科 辽宁省沈阳市  
110001

辽宁省教育厅高等学校科研基金资助项目, No. 2004D182  
通讯作者: 路平, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号,  
中国医科大学附属第一医院肿瘤科. jyt00@163.com  
电话: 024-83282242

收稿日期: 2007-04-13 修回日期: 2007-09-11

### Therapeutic effects of elemene and chemotherapy in tumor-bearing mice

Da-Wei Zou, Jing Ba, Yang-Tao Ji, Ping Lu

Da-Wei Zou, Jing Ba, Yang-Tao Ji, Clinical Laboratory,  
the First Affiliated Hospital, China Medical University,  
Shenyang 110001, China

Ping Lu, Department of Oncology, the First Affiliated Hos-  
pital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaon-  
ing Province, China

Supported by: the Key Project of the Education Depart-  
ment of Liaoning Province, No. 2004D182

Correspondence to: Ping Lu, Department of Oncology,  
The First Affiliated Hospital, China Medical University, 155  
Nanjing North Street, Heping District, Shenyang 110001,  
Liaoning Province, China. jyt00@163.com

Received: 2007-04-13 Revised: 2007-09-11

### Abstract

**AIM:** To explore a potential treatment for carcinoma by observing the therapeutic effects of elemene and chemotherapy in tumor-bearing mice (LT).

**METHODS:** Pharmaceuticals were injected into the centers of tumors in tumor-bearing mice, and the expression of the multidrug resistance gene (mdr1) was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction. The rate of inhibition of tumor growth, the pathology of the tumor and mortality were noted.

**RESULTS:** The expression levels of mdr1 in chemotherapy (C), elemene (E) and chemotherapy+elemene (CE) groups were 100%, 16.67% and 8.33% of the levels in the tumor-bearing (LT) group, respectively, and there was statistical significance between the E (or CE)

and LT groups ( $P < 0.05$ ). The rates of inhibition of tumor growth in mice in groups C, E and CE were 24.3%, 29.7%, and 39.5%, respectively, and there was statistical significance when compared with LT mice,  $P < 0.05$ . The mortality of mice in groups C, E and CE was 20%, 10%, and 10%, respectively, and there was statistical significance when compared with LT mice (40%) ( $P < 0.05$ ). Tumor necrosis was outstanding in CE mice, and these mice were more energetic than the mice in other groups.

**CONCLUSION:** Elemene can reduce the expres-  
sion of the mdr1 gene and is effective in killing  
tumors. Further, it is more effective when com-  
bined with a chemotherapeutic agent.

**Key Words:** Carcinoma; Elemene; Multidrug resist-  
ance gene 1; Mice; Combination therapy

Zou DW, Ba J, Ji YT, Lu P. Therapeutic effects of elemene  
and chemotherapy in tumor-bearing mice. *Shijie Huaren  
Xiaohua Zazhi* 2007; 15(27): 2931-2933

### 摘要

**目的:** 观察榄香烯结合化疗药对荷瘤小鼠的  
治疗作用, 为临床肿瘤的治疗提供理论依据。

**方法:** 构建荷瘤小鼠动物模型, 肿瘤内注射给  
药, 用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)方法  
测其多药耐药基因(multidrug resistance gene,  
mdr1)的表达, 同时观察抑瘤率、肿瘤坏死情  
况和小鼠死亡率。

**结果:** 荷瘤组(LT)、化疗组(C)、榄香烯组  
(E)、化疗药+榄香烯组(CE)的mdr1的表达  
分别为(100%、100%、16.67%、8.33%), 其  
中E、CE与LT组的mdr1比较有显著性差  
异( $P < 0.05$ ); C、E、CE组抑瘤率(24.3%、  
29.7%、39.5%)和死亡率(20%、10%、10%)  
分别与LT组(0、40%)比较有显著性差异  
( $P < 0.05$ )。病理显示, CE组肿瘤坏死明显, 大体  
见肿瘤腐肉状, 色晦暗, 质软, 小鼠生存活跃。

**结论:** 榄香烯可降低mdr1的表达并有良好的抗  
肿瘤的作用, 与化疗药合用抗肿瘤作用更佳。

**背景资料**  
从BB1生物碱中  
寻找逆转耐药作  
用强、特异性高  
而毒副作用小的  
药物很有希望, 其  
中榄香烯的抗肿  
瘤效果和机制是  
目前研究的热点。

### 相关报道

目前部分报道提示: 榄香烯可防止肿瘤细胞从S期进入G2, M期, 并诱导其凋亡, 而其逆转mdr1作用尚存在争议. 部分学者认为榄香烯与肿瘤细胞mdr1表达关系不大, 而有些学者证实榄香烯在阿霉素较高浓度情况下有逆转mdr1作用.

关键词: 肝癌; 榄香烯; 多药耐药基因; 小鼠; 联合治疗

邹大伟, 巴静, 吉阳涛, 路平. 榄香烯联合化疗治疗荷瘤小鼠. 世界华人消化杂志 2007;15(27):2931-2933  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2931.asp>

## 0 引言

癌细胞的多药耐药(multidrug resistance, MDR)影响了肿瘤化疗的进行, 研究证实中药可以应用于逆转多药耐药<sup>[1-3]</sup>. 目前部分研究报道榄香烯可能具有抗肿瘤作用<sup>[4-6]</sup>, 为进一步证实这一论点, 本研究采用肿瘤内注射给药, 观察4组荷瘤小鼠的多药耐药基因(mdr1)的表达率、抑瘤率、肿瘤的病理及死亡率, 探讨榄香烯的抗肿瘤效果.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** Balb/c纯系小鼠, 鼠龄6-8 wk, 体质量18-20 g, 雌雄各半; 小鼠腹水型肝癌低转移株Hca-A2/p由大连医科大学病理教研室提供. mdr1引物、内参引物、mRNA提取及反转录试剂, 均由宝生物公司合成; 榄香烯由大连金港制药有限公司生产, 阿霉素、丝裂霉素由浙江海正制药公司生产.

**1.2 方法** 取传代7 d Hca-A<sub>2</sub>/p的Balb/c小鼠腹水, 分离肿瘤细胞, 加入Hank's液稀释成 $5 \times 10^{10}$ 个细胞/L, 取100只纯系Balb/c小鼠于右前肢皮下每只接种0.2 mL, 合 $1 \times 10^6$ 个细胞/只, 第6天肉眼可见肿瘤生长良好, 随机取肿瘤组织镜下观察, 证实为原肝癌细胞株细胞, 荷瘤小鼠80只随机均分为4组, 当日开始用1 mL注射器予肿瘤中心注射药物, 药液均为0.5 mL. 荷瘤组(LT)用生理盐水0.5 mL; 化疗组(C)用Mitomycinum C 0.025 mg, Adriamycin 0.125 mg; 榄香烯组(E)Elemene 0.5 mL; 化疗药+榄香烯组(CE)Mitomycinum C 0.025 mg, Adriamycin 0.125 mg+Elemene 0.5 mL. 分别在第6、10、13、18、23天给药, 第28天制取标本. 按用药后24 h为第7天, 以次类推, 记录各组小鼠死亡的日期及数量. 脱颈处死后, 每只小鼠称质量及切取全瘤称质量, 取0.5 cm<sup>3</sup>肿块备测mdr1, 其余部分浸泡于140 g/L甲醛液中, 抑瘤率按下式计算: 抑瘤率(%) = (对照组平均瘤质量-治疗组平均瘤质量)/(对照组平均瘤质量)×100%. 放大镜下摄片, 分析病理变化. 随机取各组存活小鼠12只测mdr1 mRNA的表达情况; RNA的提取、cDNA的合成、PCR扩增及电泳PCR产物均按试剂说明书进行. 通过扫描计算机

表 1 各组mdr1表达情况(n)

分组	-	+	++	阳性率(%)
LT	0	4	8	100 <sup>ac</sup>
C	0	2	10	100 <sup>ac</sup>
E	11	1	1	16.67
CE	11	1	0	8.33

<sup>a</sup>P<0.05 vs E组; <sup>c</sup>P<0.05 vs CE组.

处理得出各标本mdr1/control cDNA比值, 结合电泳中荧光条带强弱, 将mdr1/control cDNA比值分为: (1)mdr1/control cDNA<0.1以(-)表示; (2)比值在0.1-1之间可见mdr1阳性带但较弱用(+)表示; (3)比值在1.0以上用(++)表示.

**统计学处理** 计量资料采用 $t$ 检验和计数资料采用 $\chi^2$ 检验, 在软件SPSS12.0上进行.

## 2 结果

**2.1 各组mdr1表达情况** 瘤株Hca-A<sub>2</sub>/p的mdr1的自然表达率占100%. 榄香烯单独或其和化疗药同时应用, 瘤株的mdr1表达率均有明显的降低(表1).

**2.2 各方案用药后肿瘤组织病理学改变** 荷瘤组(LT)肿瘤细胞密集成团, 间质甚少, 癌细胞异形性明显, 核大, 核胞比例失调, 深染, 染色质不均, 核分裂多见, 可见病理性核分裂像, 未见明显肿瘤细胞坏死. E组、C组镜下可癌细胞不同程度的变性、坏死. CE组: 大体见肿瘤色晦暗, 呈腐肉状, 镜下见癌细胞数量明显减少、变性、坏死, 胞质肿胀红染、疏松, 出现大小不等的空泡, 胞核肿胀、溶解、裂解、碎裂、固缩, 大量细胞核消失, 少量中性粒细胞坏死.

**2.3 各方案的抑瘤率及死亡率** E组、C组、CE组的抑瘤率分别为24.3%, 29.7%, 39.5%. 用药后LT组、C组、E组、CE组死亡率分别为40%, 20%, 10%, 10%.

## 3 讨论

多药耐药的形是肿瘤细胞免受药物攻击的最有效防御机制, 其形成机制很复杂, 其中以mdr1及其编码蛋白pgp高表达的研究最为重要<sup>[7]</sup>. pgp为单向药物能量依赖外排泵, 他可将肿瘤细胞内的化疗药物排出细胞外, 致细胞内药物浓度下降, 因而肿瘤细胞耐药, 也就影响了临床肿瘤化疗的进行. 近几年, 中药应用于逆转多药耐药, 因为他的药理作用广泛, 副作用小, 从中药中筛选MDR逆转剂有广阔前景.



潘启超 *et al*<sup>[8]</sup>研究了11种具有钙阻滞作用的中药单体,发现对长春新碱天然耐药的BCL-7402细胞株,大多数中药单体都有类似钙通道阻滞剂维拉帕米的体外细胞毒增效作用;还研究了属双苄基异喹啉(BBI)生物碱的中药单体,例如粉防己碱、蝙蝠葛碱等具有较好的耐药逆转作用.结果提示从BBI生物碱中寻找逆转耐药作用强、特异性高而毒副作用小的药物是很有希望的,其中榄香烯的作用尤其得到了肯定.榄香烯是从中药莪术中提取的抗癌药,临床观察其对恶性肿瘤有较好的疗效和较小的副作用,对肿瘤细胞的DNA, RNA和蛋白的合成均有明显的抑制作用,防止肿瘤细胞从S期进入G<sub>2</sub>, M期,降低肿瘤的分裂增值,并诱导其凋亡,而其逆转mdr1作用尚存在争议<sup>[9-11]</sup>.

王宝成 *et al*<sup>[12]</sup>采用肝癌细胞株BEL-7402对榄香烯能否促进mdr1的产生以及对产生MDR肿瘤细胞的生长抑制作用进行了研究,发现榄香烯与肿瘤细胞mdr1表达关系不大,对已产生MDR肿瘤细胞仍有抑制作用,未能使敏感株诱发mdr1的高表达.而有些学者用化疗药与榄香烯合用作用于K562及K562/DoM证实榄香烯在阿霉素较高浓度情况下有逆转mdr1作用,且有浓度和时间依赖性.对此矛盾的结论,本实验LT组的mdr1 mRNA表达率为100%.榄香烯单独在体内应用测其mdr1 mRNA表达率为16.67%与LT组100%有显著差异,提示榄香烯单独应用即可诱使mdr1逆转,而CE组的mdr1与C组比较有显著的差异,进一步证实榄香烯有逆转mdr1的作用.另外观察E组的抑瘤率24.3%、死亡率10%这两个指标与LT组比较都有明显差异,与离体细胞培养结论相一致,证明榄香烯单独应用就有良好的抗肿瘤作用.从病理上看,C组、E组、CE组肿瘤都有坏死情况,但CE组肿瘤坏死的严重和CE组的抑瘤率较C组、E组有差别,提示榄香烯和化疗药联合应用抗肿瘤的效果好.部分文章报道低浓度榄香烯促进肝癌细胞凋亡,高浓度加速肝癌细胞坏死.总之,榄香烯和化疗药联合应用可能有良好的抗肿瘤作用,其具体机制尚需进一步的临床研究证实<sup>[13-15]</sup>.

#### 4 参考文献

- 1 Zubor P, Lasabova Z, Hatok J, Stanclova A, Danko J. A polymorphism C3435T of the MDR-1 gene

- associated with smoking or high body mass index increases the risk of sporadic breast cancer in women. *Oncol Rep* 2007; 18: 211-217
- 2 Trnkova Z, Bedrlíkova R, Markova J, Michalova K, Stockbauer P, Schwarz J. Semiquantitative RT-PCR evaluation of the MDR1 gene expression in patients with acute myeloid leukemia. *Neoplasma* 2007; 54: 383-390
- 3 Vache C, Camares O, Cardoso-Ferreira MC, Dastugue B, Creveaux I, Vauray C, Bamdad M. A potential genomic biomarker for the detection of polycyclic aromatic hydrocarbon pollutants: multidrug resistance gene 49 in *Drosophila melanogaster*. *Environ Toxicol Chem* 2007; 26: 1418-1424
- 4 Xu L, Tao S, Wang X, Yu Z, Wang M, Chen D, Jing Y, Dong J. The synthesis and anti-proliferative effects of beta-elemene derivatives with mTOR inhibition activity. *Bioorg Med Chem* 2006; 14: 5351-5356
- 5 Tao L, Zhou L, Zheng L, Yao M. Elemene displays anti-cancer ability on laryngeal cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 58: 24-34
- 6 Peng X, Zhao Y, Liang X, Wu L, Cui S, Guo A, Wang W. Assessing the quality of RCTs on the effect of beta-elemene, one ingredient of a Chinese herb, against malignant tumors. *Contemp Clin Trials* 2006; 27: 70-82
- 7 Manov I, Bashenko Y, Hirsh M, Iancu TC. Involvement of the multidrug resistance P-glycoprotein in acetaminophen-induced toxicity in hepatoma-derived HepG2 and Hep3B cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006; 99: 213-224
- 8 潘启超, 田晖. 多种中药单体逆转肿瘤多药耐药性. 科学通报 1995; 40: 1901-1904
- 9 Foote CJ, Greer W, Kiberd B, Fraser A, Lawen J, Nashan B, Belitsky P. Polymorphisms of multidrug resistance gene (MDR1) and cyclosporine absorption in de novo renal transplant patients. *Transplantation* 2007; 83: 1380-1384
- 10 Buda G, Maggini V, Galimberti S, Martino A, Giuliani N, Morabito F, Genestreti G, Iacopino P, Rizzoli V, Barale R, Rossi AM, Petrini M. MDR1 polymorphism influences the outcome of multiple myeloma patients. *Br J Haematol* 2007; 137: 454-456
- 11 Wu L, Xu X, Shen J, Xie H, Yu S, Liang T, Wang W, Shen Y, Zhang M, Zheng S. MDR1 gene polymorphisms and risk of recurrence in patients with hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *J Surg Oncol* 2007; 96: 62-68
- 12 王宝成, 郭军, 狄剑时, 师秋丽. 榄香烯乳剂与肿瘤多药耐药的基础研究. 中国肿瘤临床 1996; 23: 143-146
- 13 Zhang WX, Chen B, Zhang W, Chen N, Yu ZC, Cai WM. Effect of MDR1 gene polymorphism on progression of end-stage renal disease. *Acta Pharmacol Sin* 2007; 28: 579-583
- 14 Nakaichi M, Takeshita Y, Okuda M, Nakamoto Y, Itamoto K, Une S, Sasaki N, Kadosawa T, Takahashi T, Taura Y. Expression of the MDR1 gene and P-glycoprotein in canine mast cell tumor cell lines. *J Vet Med Sci* 2007; 69: 111-115
- 15 Wang XS, Yang W, Tao SJ, Li K, Li M, Dong JH, Wang MW. Effect of delta-elemene on HeLa cell lines by apoptosis induction. *Yakugaku Zasshi* 2006; 126: 979-990

**应用要点**  
榄香烯和化疗药联合应用可能在临床上会取得良好的抗肿瘤效果.

**同行评价**  
本文研究了榄香烯联合化疗对荷瘤小鼠抗肿瘤作用,设计简单,内容易懂,有一定的临床意义.

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

# 布鲁氏菌自杀载体的改建及其在突变株构建中的应用

王玉飞, 陈泽良, 乔凤, 汪舟佳, 杜昕颖, 苑锡铜, 黄留玉

**背景资料**  
布鲁氏菌危害严重, 在世界各地都有广泛流行。一直以来, 致病机制研究都是布鲁氏菌研究的重点, 而突变株的构建是致病机制研究的前提。

王玉飞, 陈泽良, 乔凤, 汪舟佳, 杜昕颖, 苑锡铜, 黄留玉, 军事医学科学院疾病预防控制中心 北京市 100071  
国家自然科学基金资助项目, No. 30600024  
通讯作者: 黄留玉, 100071, 北京市丰台区小屯路109号, 疾病预防控制中心传染病控制中心. huangliuyuly@163.com  
电话: 010-66933356  
收稿日期: 2007-05-08 修回日期: 2007-09-13

## Development of a new suicide plasmid and its application to *Brucella* mutant construction

Yu-Fei Wang, Ze-Liang Chen, Feng Qiao, Zhou-Jia Wang, Xin-Ying Du, Xi-Tong Yuan, Liu-Yu Huang

Yu-Fei Wang, Ze-Liang Chen, Feng Qiao, Zhou-Jia Wang, Xin-Ying Du, Xi-Tong Yuan, Liu-Yu Huang, Institute of Disease Control and Prevention, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30600024  
Correspondence to: Liu-Yu Huang, Department of Infectious Disease Control, Institute of Disease Control and Prevention, 109 Xiaotun Road, Fengtai District, Beijing 100071, China. huangliuyuly@163.com  
Received: 2007-05-08 Revised: 2007-09-13

## Abstract

**AIM:** To develop a new suicide plasmid, pUC19-SacB, for *Brucella* mutant construction.

**METHODS:** The counter-selection gene *sacB*, released from plasmid pKOBEG-SacB by digestion with *Nde* I, was inserted into the same site of plasmid pUC19 to produce pUC19-SacB. This plasmid was then applied to the construction of a *Brucella* mutant. DNA sequencing and sucrose selection were used.

**RESULTS:** The counter-selection gene *sacB* was successfully released from pKOBEG-SacB and cloned into pUC19 to produce pUC19-SacB. Using DNA sequencing and sucrose selection, the pUC19-SacB plasmid was shown to have counter-selection capability. Using pUC19-SacB, we successfully constructed an unmarked deletion mutant of the *VirB* operon, showing that this plasmid can be efficiently used to modify the *Brucella* chromosome.

**CONCLUSION:** The successfully constructed new suicide plasmid pUC19-SacB can be used to construct a *Brucella* unmarked mutant.

**Key Words:** *Brucella*; Counter-selection; Suicide plasmid

Wang YF, Chen ZL, Qiao F, Wang ZJ, Du XY, Yuan XT, Huang LY. Development of a new suicide plasmid and its application to *Brucella* mutant construction. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(27): 2934-2937

## 摘要

目的: 改建布鲁氏菌自杀载体。

方法: 用 *Nde* 将 pKOBEG-SacB 质粒中的反向筛选基因 *sacB* 切下来, 与同样酶切处理的 pUC19 质粒连接, 得到 pUC19-SacB, 经测序和蔗糖筛选实验证实。

结果: 成功将 *sacB* 从 pKOBEG-SacB 中切下来并插入到 pUC19 质粒中, 构建得到了 pUC19-SacB。测序和蔗糖筛选实验证实, 插入的 *sacB* 基因具有较好的反筛功能。我们利用该质粒, 成功的构建了布鲁氏菌型分泌系统的突变株, 改建的载体能高效的应用于布鲁氏菌染色体的精确修饰。

结论: 构建了一个新的自杀质粒 pUC19-SacB, 该质粒能用于布鲁氏菌无痕缺失突变株的构建。

关键词: 布鲁氏菌; 反向筛选; 自杀载体

王玉飞, 陈泽良, 乔凤, 汪舟佳, 杜昕颖, 苑锡铜, 黄留玉. 布鲁氏菌自杀载体的改建及其在突变株构建中的应用. 世界华人消化杂志 2007;15(27):2934-2937  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2934.asp>

## 0 引言

布鲁氏菌病(Brucellosis)是由布鲁氏菌(*Brucella*)引起的一种人畜共患病, 在世界各地都有广泛流行<sup>[1]</sup>。在我国, 布鲁氏菌病曾在一段时间内得到了较好的控制, 人间和畜间布鲁氏菌病的发



病率下降到了一个较低的水平。但是, 由于没有较好的监测畜间疫情并及时采取控制措施, 近年来, 布鲁氏菌病在我国有重新抬头的趋势。一直以来, 致病机制研究都是布鲁氏菌研究的重点和热点<sup>[2]</sup>。目前, 病原菌的致病机制研究主要是通过失活或缺失特定的基因, 然后分析突变株各种表型的变化, 从而解析目标基因的功能<sup>[3]</sup>。因此, 突变株的构建是致病机制研究的前提。在以往的研究中, 常以克隆载体pUC19等作为自杀载体来构建布鲁氏菌的插入失活突变株, 而精确的缺失则是采用经典的自杀载体构建的, 如pCVD442等<sup>[4]</sup>。但是, 由于这类载体的分子操作需要在特殊的宿主菌中进行, 并且克隆的效率较低, 突变株的构建往往比较困难, 已成为后基因组时代大规模功能研究的一个限速步骤<sup>[5-6]</sup>。为了进一步提高布鲁氏菌突变株的构建效率, 我们对布鲁氏菌的常用自杀载体pUC19质粒进行了改建, 在其中插入反向筛选基因*sacB*, 得到pUC19-SacB。并且, 利用该质粒成功的构建IV型分泌系统编码基因*virB*的无痕缺失突变株。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 布鲁氏菌*B. melitensis* 55009购自中国药品生物制品鉴定所, DH5 $\alpha$ 和pUC19质粒及pKOBEG-SacB质粒均为本室保存<sup>[7]</sup>。DNA胶回收试剂盒及质粒提取试剂盒购自Promega公司, 各种限制性内切酶均购自TaKaRa公司, T4 DNA连接酶购自NEB公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 自杀质粒pUC19-SacB的改建** pKOBEG-SacB质粒用*Nde* I 进行酶切后, 胶回收*sacB*片段, 与同样酶切处理的pUC19质粒连接, 得到pUC19-SacB。对质粒进行PCR和酶切鉴定, 并送Invitrogen公司进行测序。测序正确后, 为进一步验证*sacB*基因的有效性, 将携带有pUC19-SacB质粒的DH5 $\alpha$ 在无抗性培养基中培养4 h, 稀释后分别等量涂布含有氨苄青霉素和含有50 g/L蔗糖的平板。比较两块平板上的克隆数, 如果蔗糖平板上的克隆数远远低于抗性板, 则说明*sacB*基因是有效的。

### 1.2.2 利用pUC19-SacB载体构建 IV型分泌系统缺失突变株

**1.2.2.1 缺失引物的设计** 设计两对缺失引物分别用于扩增IV型分泌系统启动子的上游和下游片段, 并通过融合PCR将这两个片段融合在一起, 从而得到缺失启动子区域511bp(-510-+1)的缺失

突变盒。此外, 设计一对引物PRO-F和PRO-R用于确定启动子的缺失; 一对引物针对31 kDa蛋白基因, 用于鉴定布鲁氏菌; 一对引物针对pUC19-SacB质粒上的*sacB*基因, 用于确定质粒的消除。设计的引物见表1。

**1.2.2.2 缺失突变载体的构建** 用IVB-N-F和IVB-N-R扩增IV型分泌系统启动子的上游片段, 用IVB-C-F和IVB-C-R扩增下游片段, 切胶回收PCR产物, 等量混合, 稀释后作为第二轮PCR反应的模板。第二轮扩增的引物为IVB-N-F和IVB-C-R, 扩增产物切胶回收, 得到缺失突变盒IVB-NC。用*Hind*III和*Eco*R I 对IVB-NC进行双酶切, 然后与构建好的自杀载体pUC19-SacB质粒连接, 得到缺失突变载体pUCSacB-IVB。

**1.2.2.3 缺失突变体的构建与鉴定** 将0.8  $\mu$ g pUCSacB-IVB质粒与100  $\mu$ L布鲁氏菌感受态细胞充分混合以后, 预冷10 min, 随后将混合物加入冷却的电击杯狭缝中, 电击转化参数为1.8 KV/cm, 400  $\Omega$ 。电击以后, 迅速向电击杯中加入1 mL SOC培养基, 转移至试管中37 $^{\circ}$ C振摇20 h, 随后涂含100 mg/L氨苄青霉素的TSA平板, 37 $^{\circ}$ C培养3-4 d, 对长出的抗性克隆进行菌落PCR鉴定。PCR鉴定的靶标基因包括布鲁氏菌特异的31 kDa蛋白的基因、质粒DNA的*sacB*基因和突变盒的IVB片段, 并用PRO-F和PRO-R鉴定启动子的缺失情况。四者均能扩增出预期大小的片段即为阳性重组克隆。为获得无痕缺失突变体, 将重组克隆转接至无抗性的TSB液体培养基中, 培养5 h后进行倍比稀释, 涂布蔗糖平板, 37 $^{\circ}$ C培养3-4 d, 随机挑取16个蔗糖抗性克隆, 用上述4对引物进行鉴定。*sacB*基因扩增结果为阴性, 而其余3对引物均能扩出预期大小片段的克隆即为我们所需的无痕缺失突变体。

## 2 结果

**2.1 自杀质粒pUC19-SacB的构建** 为了提高布鲁氏菌遗传操作的效率, 我们对pUC19质粒进行了改建, 在该质粒中插入一个反向筛选基因, 使其能用于染色体的精确修饰。用*Nde* I 内切酶从pKOBEG-SacB质粒中切下*sacB*基因, 胶回收后与同样酶切处理的pUC19质粒连接, 转入大肠杆菌DH5 $\alpha$ 中, PCR、酶切鉴定以及测序结果表明*sacB*正确插入到了pUC19质粒中, 我们成功的构建了自杀载体pUC19-SacB。图1是改建得到的pUC19-SacB的质粒图谱。

**2.2 SacB反向筛选效率分析** 观察氨苄青霉素

**相关报道**  
克隆载体pUC19主要用于布鲁氏菌插入突变株的构建, 而精确的缺失则是采用经典的自杀载体来构建的, 如pCVD442等。但是, 这类载体的分子操作比较困难。

**应用要点**  
 为了提高布鲁氏菌遗传操作的效率, 本文对pUC19质粒进行了改建, 在该质粒中插入一个反向筛选基因, 使其能用于染色体的精确修饰。

表 1 本研究设计的引物及序列

引物名	引物序列(5'-3')
IVB-N-F	CTGCGAAGCTTGCAAATTCCTCGTCCGGTTCG
IVB-N-R	GAGGACAAGGAATGGCACCACGACGCAGGACGAAAGGAC
IVB-C-F	GTCCTTTCCGTCCTGCGTCGTGGTGCCATTCTTGTCTC
IVB-C-R	CGACCGGAATTCGAAGCCGCCCGTAAAGTTGC
PRO-F	GAGCGGCTGGAAGTCAAAC
PRO-R	GACCAACCGCCACCAACGAC
31KD-F	GGCGGCAAGTTCAAGCATC
31KD-R	GGTCGGTGTAGAGGTATTCC
sacB-F	TCGCATTATCCGAACCATCC
sacB-R	CACCCAGTCCCAGACGAAGC

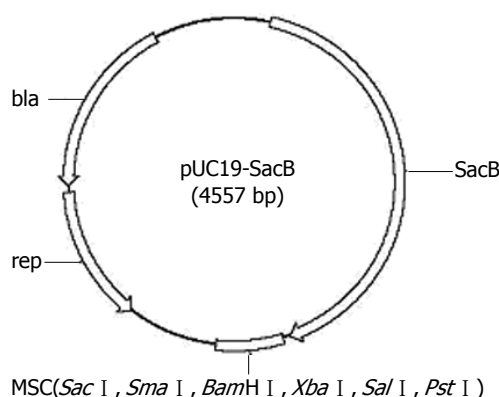


图 1 pUC19-SacB质粒图谱.

平板和蔗糖平板上的克隆数, 发现蔗糖平板上的克隆数远远低于抗性平板的克隆数, 大约为0.01%(图2), 表明改建的pUC19-SacB质粒中的sacB基因具有非常高的反向筛选能力.

**2.3 pUC19-SacB在布鲁氏菌无痕缺失突变株构建中的应用** 为了验证pUC19-SacB自杀质粒的功能, 我们利用pUC19-SacB成功的构建了布鲁氏菌IV型分泌系统编码基因*virB*的无痕缺失突变株. 按照材料方法中描述的步骤, 我们构建了*virB*的缺失突变载体, 将其通过电转化导入布鲁氏菌中, 经过两轮筛选, 成功的筛选到了*virB*启动子缺失的无痕缺失突变株. PCR和DNA测序结果证实, *virB*无痕缺失突变株构建正确.

### 3 讨论

布鲁氏菌是一个比较特殊的胞内寄生菌, 他没有质粒, 而且大多其他来源的质粒也不能在布鲁氏菌中复制. 据此推理, 很多质粒都可作为自杀载体来构建布鲁氏菌的突变株. pUC19是一种常见的克隆载体, 主要用于布鲁氏菌插入突变株的构建<sup>[8]</sup>. 虽然其重组效率较高, 但是插

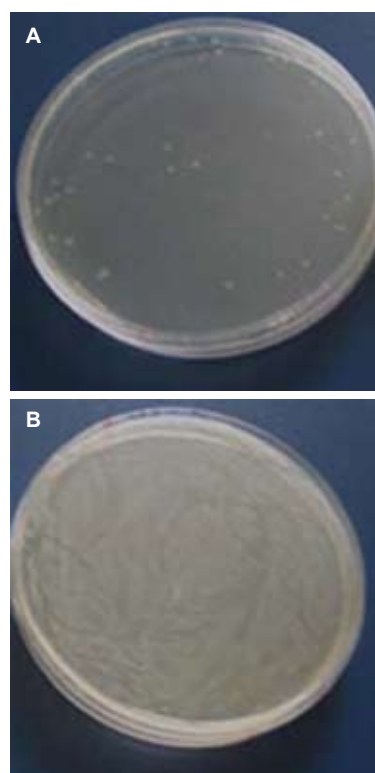


图 2 50 g/L蔗糖平板(A)和氨苄青霉素平板(B).

入失活的策略不能用于分析染色体特定区域的功能, 特别是分析操纵子中的个别基因的功能, 因为插入的外源载体序列会影响基因其他部分的功能, 从而不能确定表型的变化是否真实<sup>[9-10]</sup>. 对于这类情况, 需要缺失目的基因编码框的一部分, 并且不能带有载体序列, 即必须构建无痕缺失突变株. 一般来说, 细菌无痕缺失突变株的构建主要是利用带有反向筛选基因的自杀质粒来实现的<sup>[11]</sup>. 我们在前期的研究中采用经典的自杀质粒来构建无痕缺失突变株. 但是, 这些自杀载体存在一定的不足, 如: 分子操作需要在特殊的宿主菌中进行、重组的效率较

低, 因此, 布鲁氏菌无痕缺失突变株的构建往往比较困难. *sacB*作为反向筛选基因, 在革兰氏阴性菌突变株的构建中应用非常广泛. 表达该蛋白的革兰氏阴性菌在含有蔗糖的培养基中生长时, 会将蔗糖分解为对细菌有毒的产物, 从而杀死表达该蛋白的细菌. 因此, *sacB*作为反筛基因常与抗性基因等正向筛选基因联合, 用于构建细菌的无痕缺失突变株<sup>[12]</sup>. pEX18Gm是一种含有反向筛选基因*sacB*的克隆载体<sup>[13]</sup>, 在前期的研究中, 我们利用该载体作为自杀载体成功的构建了布鲁氏菌的突变株. 但是, 我们在应用该载体时发现了一些问题, 利用蔗糖抗性消除质粒得到的无痕缺失突变株由于一些不清楚的原因在体外培养一段时间后部分克隆又丢失了蔗糖抗性. 为此, 在本研究中, 我们对布鲁氏菌常用质粒pUC19进行了改建, 在该质粒中插入一个反向筛选基因*sacB*, 构建了pUC19-SacB. 蔗糖敏感性实验证实构建的载体反向筛选效率很高. 我们利用改建的载体, 成功的构建了*virB*无痕缺失突变株, 这不仅证实了pUC19-SacB自杀质粒的功能, 也为深入研究*VirB*操纵子的功能奠定了基础. 此外, 利用改建的载体, 我们还构建了多个其他基因的无痕缺失突变株, 包括双组分系统BvrR/BvrS的突变株和*Omp25*基因的突变株. 这些突变株的稳定性较好, 没有发生蔗糖抗性丢失的情况. 试验结果表明, pUC19-SacB不仅保持了pUC19的高效重组效率, 而且反筛效率也很高, 是一个非常高效的自杀质粒, 可以为布鲁氏菌基因功能的研究提供了一个有力的分析工具. 有了快速高效的构建突变株的方法, 必将大大加速布鲁氏菌基因功能研究的步伐.

#### 4 参考文献

1 Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E.

- Brucellosis. *N Engl J Med* 2005; 352: 2325-2336
- 2 Cutler SJ, Whatmore AM, Commander NJ. Brucellosis-new aspects of an old disease. *J Appl Microbiol* 2005; 98: 1270-1281
- 3 Baek SH, Rajashekara G, Splitter GA, Shapleigh JP. Denitrification genes regulate *Brucella* virulence in mice. *J Bacteriol* 2004; 186: 6025-6031
- 4 Ekaza E, Teyssier J, Ouahrani-Bettache S, Liautard JP, Kohler S. Characterization of *Brucella suis* clpB and clpAB mutants and participation of the genes in stress responses. *J Bacteriol* 2001; 183: 2677-2681
- 5 Burkhardt S, Jimenez de Bagues MP, Liautard JP, Kohler S. Analysis of the behavior of *eryC* mutants of *Brucella suis* attenuated in macrophages. *Infect Immun* 2005; 73: 6782-6790
- 6 Michaux-Charachon S, Jumas-Bilak E, Allardet-Servent A, Bourg G, Boschirolu ML, Ramuz M, O'Callaghan D. The *Brucella* genome at the beginning of the post-genomic era. *Vet Microbiol* 2002; 90: 581-585
- 7 Derbise A, Lesic B, Dacheux D, Ghigo JM, Carniel E. A rapid and simple method for inactivating chromosomal genes in *Yersinia*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; 38: 113-116
- 8 den Hartigh AB, Sun YH, Sondervan D, Heuvelmans N, Reinders MO, Ficht TA, Tsois RM. Differential requirements for *VirB1* and *VirB2* during *Brucella abortus* infection. *Infect Immun* 2004; 72: 5143-5149
- 9 Boschirolu ML, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V, Michaux-Charachon S, Bourg G, Allardet-Servent A, Cazeville C, Liautard JP, Ramuz M, O'Callaghan D. The *Brucella suis virB* operon is induced intracellularly in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 1544-1549
- 10 Ortiz-Martin I, Macho AP, Lambersten L, Ramos C, Beuzon CR. Suicide vectors for antibiotic marker exchange and rapid generation of multiple knockout mutants by allelic exchange in Gram-negative bacteria. *J Microbiol Methods* 2006; 67: 395-407
- 11 Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ, Schweizer HP. A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* 1998; 212: 77-86
- 12 Reytrat JM, Pelicic V, Gicquel B, Rappuoli R. Counterselectable markers: untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. *Infect Immun* 1998; 66: 4011-4017
- 13 Choi KH, Schweizer HP. An improved method for rapid generation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* deletion mutants. *BMC Microbiol* 2005; 5: 30

同行评价  
本文构建pUC19-SacB载体, 并证实其反向筛选效率很高, 且利用其构建布鲁氏菌的突变株. 技术方法先进, 有一定的参考价值和指导意义.

编辑 程剑侠 电编 李军亮

# Dieulafoy病的诊断与治疗13例

于向阳, 邹常林, 赵卫川, 周振理

**背景资料**  
Dieulafoy病是消化道出血的少见病因, 特点为发病急骤、出血部位隐匿, 常因休克危及生命, 此病可以发生于消化道的任何部位, 甚至于呼吸道, 而最多见于胃的近端1/3, 本病的病理基础主要是滋养此部位的动脉在进入浆膜后, 以异常粗大的直径直抵黏膜下, 并形成高压力的突起及扩张, 故此病又常称为“恒径动脉破裂”。

于向阳, 天津医科大学博士研究生 天津市 300070  
于向阳, 邹常林, 周振理, 天津市南开医院消化外科 天津市 300100  
赵卫川, 天津市南开医院内镜中心 天津市 300100  
通讯作者: 于向阳, 300100, 天津市南开区三纬路122号, 天津市南开医院消化外科. yxynankai@126.com  
电话: 022-27420297 传真: 022-27022268-3535  
收稿日期: 2007-05-24 修回日期: 2007-09-14

## Diagnosis and treatment of Dieulafoy's lesion: an analysis of 13 cases

Xiang-Yang Yu, Chang-Lin Zou, Wei-Chuan Zhao, Zhen-Li Zhou

Xiang-Yang Yu, Chang-Lin Zou, Zhen-Li Zhou, Department of Digestive Surgery, Nankai Hospital of Tianjin City, Tianjin 300100, China  
Wei-Chuan Zhao, Endoscopic Center of Nankai Hospital of Tianjin City, Tianjin 300100, China  
Correspondence to: Xiang-Yang Yu, Department of Digestive Surgery, Nankai Hospital of Tianjin City, 122 Sanwei Road, Nankai District, Tianjin 300100, China. yxynankai@126.com  
Received: 2007-05-24 Revised: 2007-09-14

## Abstract

**AIM:** To explore the clinical features, diagnosis and treatment of Dieulafoy's lesion.

**METHODS:** Thirteen cases of Dieulafoy's lesion were reviewed and analyzed on the basis of clinical features, diagnosis, treatment and effect.

**RESULTS:** In this series, 6 cases showed hematemesis, 2 showed melena and 5 showed both symptoms. All cases underwent endoscopic examination after being hospitalized; 11 cases received a positive diagnosis by endoscopy (11/13, 85%), the success rate of first endoscopic therapy was 91% (10/11), and 4 cases were treated by laparotomic surgery (4/13, 31%). Among them, definitive surgery was performed under the guidance of endoscopic hemoclippling in 2 patients who failed to be treated by endoscopy. In another 2 cases, diagnosis was missed by endoscopy and definite diagnosis was made only following exploratory operation or on the basis of pathology after the operation. None of 10 patients showed recrudescence by follow-up study.

**CONCLUSION:** It is necessary to understand the clinical pattern and pathological characteristics of Dieulafoy's lesion in order to improve the diagnosis rate. Endoscopic therapy is the first-choice method for diagnosis, with good security, validity and long-term results.

**Key Words:** Dieulafoy's lesion; Diagnosis and treatment; Endoscope; Operation

Yu XY, Zou CL, Zhao WC, Zhou ZL. Diagnosis and treatment of Dieulafoy's lesion: an analysis of 13 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(27): 2938-2941

## 摘要

**目的:** 探讨Dieulafoy病的临床特点、诊断及治疗。

**方法:** 回顾性分析总结13例Dieulafoy病的临床特点、诊断与治疗方法及疗效。

**结果:** 13例患者临床表现为单纯呕血者6例, 呕血伴黑便者5例, 单纯黑便者2例, 所有病例入院后均行内镜检查; 其中11例经内镜确诊(11/13, 85%), 首次内镜治疗成功率为91%(10/11)。4例经手术治疗(4/13, 31%), 其中2例内镜治疗失败者在内镜钛夹指引下实施确定性手术, 另2例内镜漏诊者靠手术探查或术后病理确诊。10例随访患者无1例复发。

**结论:** 掌握本病的临床表现和病理特征是提高诊断率, 减少误诊和漏诊的关键; 内镜为该病诊断和治疗的首选方法, 具有良好的安全性、有效性和远期效果。

**关键词:** Dieulafoy病; 诊断和治疗; 内镜; 手术

于向阳, 邹常林, 赵卫川, 周振理. Dieulafoy病的诊断与治疗13例. *世界华人消化杂志* 2007; 15(27): 2938-2941  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2938.asp>

## 0 引言

Dieulafoy病(Dieulafoy' Lesion, DL)是消化道大出血的少见病因, 近年来由于诊断技术的提高, 这一疾病的报道逐渐增多。其特点为发病急骤、

出血量大且迅猛, 常迅速出现休克而危及生命, 采用内外科各种治疗措施后, 仍有较高的复发率. 并且因其缺乏特异性病史, 出血病灶小, 部位隐匿, 给诊断带来困难, 临床上误诊或漏诊的现象并不少见. 国外报道DL约占急性非静脉曲张上消化道出血(acute non-variceal upper gastrointestinal bleeding)病因的0.3%-6.7%<sup>[1]</sup>. 我院近10年来共收治DL 13例, 结合国内外文献分析如下.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 13例患者中男11例, 女2例, 男女比例为5.5:1; 年龄25-72(平均56.8)岁. 本组病例临床表现单纯呕血者6例, 呕血伴黑便者5例, 单纯黑便者2例, 伴有上腹部不适者7例, 伴有失血性休克者5例. 发病前3例有饮酒史, 2例有服用NSAIDs药物史.

## 1.2 方法

**1.2.1 内镜及血管造影** 13例患者中有11例在入院24 h之内行内镜检查, 2例在处理休克后入院48 h内行内镜检查; 共11例经内镜确诊, 其中8例为1次检查确诊, 3例为两次检查确诊. 治疗上采用高频电凝、微波射频、氩气刀、套扎止血等, 并可以同时应用止血钛夹或局部喷洒凝血酶. 9例患者经内镜治疗成功. 1例患者因症状仅表现为黑便, 行血管造影发现出血部位, 先后经栓塞术、电凝+钛夹止血均未奏效, 中转手术; 1例经氩气刀+钛夹止血2 d后再发出血, 中转手术; 另外2例内镜检查漏诊, 后经术中探查或术后病理确诊.

**1.2.2 手术** 共4例患者行手术治疗. 2例为内镜治疗无效后, 术中于胃前壁进胃镜或胆道镜探查, 在钛夹指引下胃楔形切除术. 有2例患者术前内镜检查未发现出血部位, 靠手术探查及术后病理确诊. 其中1例内镜见胃内大量暗红色血液及血凝块, 十二指肠内为少量咖啡样液体, 反复冲洗均未发现出血灶, 并且患者有出血性休克表现, 故手术探查. 术中打开胃前壁后, 发现胃体有新鲜血块, 冲洗血块后发现汗渗样出血点, 周围黏膜正常, 予以胃大部切除, 术后病理确诊; 另1例术中探查未发现出血灶, 因合并十二指肠球溃疡, 故行胃大部切除术, 毕I式吻合, 术后1 wk再发出血, 经非手术止血未奏效, 不得不再次手术, 切除原吻合口及部分胃, 改行毕II式吻合, 术后病理诊断为胃DL.

## 2 结果

全部13例患者的病变位于胃底、胃体上、中、下、胃窦部、十二指肠球、十二指肠降部各

5、2、2、1、1、1、1例. 其中8例位于距贲门齿状线6 cm以内. 10例患者胃内有大量暗红色液体及血凝块, 另3例胃内只有少量咖啡色液体或暗红色液体残留. 病灶均为孤立圆形或椭圆形黏膜糜烂或浅表小溃疡, 直径2-6 mm. 病灶可见血管裸露者5例, 见活动性搏动样喷血者4例, 有新鲜血块覆盖者2例, 另外1例手术中发现汗渗样出血灶, 1例仅靠术后病理诊断确诊. 本组13例患者全部治愈出院, 无1例死亡. 其中11例经内镜确诊(11/13, 85%), 首次内镜治疗成功率为91%(10/11), 4例经手术治疗(4/13, 31%). 除3例失访, 其余患者随访9个月到8年, 无1例复发.

## 3 讨论

该病最早由Gallard于1884年描述, 他报道了2例“胃黏膜下粟粒样动脉瘤”, 14年后法国外科医生Georges Dieulafoy报道了3例继往无症状的男性患者发生的致命性上消化道出血, 并将其命名为“单纯性溃疡”(exulceratio simplex). 以后许多作者相继命名为曲张动脉瘤、黏膜下动脉畸形、胃黏膜下动脉硬化、胃黏膜下微小动脉瘤、Gallard-Dieulafoy溃疡、胃黏膜下恒径动脉破裂等. 近年来随着对该病病理生理改变的深入认识, 以上命名已被摒弃, 因Dieulafoy报道此病时的资料较翔实、准确, 故将这种病命名为Dieulafoy病. 现该命名现已被广泛接受, 甚至还将胃外的十二指肠、空肠及结肠, 甚至是呼吸道的类似病变并发出血者亦归为DL<sup>[2]</sup>.

胃周动脉(大多数发生于胃左动脉)分支进入浆膜和肌层后, 缺乏逐渐变细的过程, 而以异常粗大的直径直抵黏膜下, 血管口径恒定这一变异就是该病的病理基础, 称之为“恒径动脉”(Caliber-persistent artery)<sup>[3]</sup>. DL的61%-82%发生于胃, 而98%发生于胃近端1/3(距贲门6 cm范围内), 并且主要分布于胃小弯侧, 这可能与该区域的血供直接由胃左/右动脉供应有关<sup>[4]</sup>. 该动脉直径约比正常的黏膜肌层血管粗10倍, 加之其从黏膜下折返, 形成垂直祥, 故在黏膜下形成高压力的锐角状血管突起. 该血管搏动的结果一方面使表面黏膜受压, 形成急性压迫性溃疡, 血管裸露; 另一方面使折返顶部血管继发性扩张. 动脉破裂出现之前即可因压迫性溃疡出现慢性失血, 动脉破裂后出血量大, 故多表现为呕血. 由于血压下降或血栓形成, 出血可暂时停止, 原来裸露的血管可“潜入”黏膜下, 导致胃镜检查甚至手术时漏诊, 这也是其诊断困难的重要原因. 本组便有1例患者内镜及两次手术术中

**相关报道**  
以往此病的诊断和治疗基本借助于手术, 而国外近年来的相关文献报道大多数集中在内镜对于此病的诊断和治疗效果的探讨上. 目前的观点认为, 内镜具有的安全性、高确诊率、可靠的疗效以及满意的随访, 低复发率而成为Dieulafoy病诊断和治疗方面的首选, 从而改变了过去几乎完全依靠手术的局面.



### 应用要点

本文通过13例Dieulafoy病的总结发现内镜在诊断和治疗中发挥了重要作用,其中一小部分病例病变隐匿致漏诊或内镜治疗无效者,仍需手术探查或切除,即使内镜无法解决的出血也可以对之后的手术提供良好的指引,降低切除的盲目性。

均未发现出血灶,所庆幸的是第2次手术将病灶切除。一些情况,如NSAIDs药物、阿司匹林、酗酒可能是导致出血的诱因,但目前仍缺乏具有说服力的证据<sup>[4]</sup>。DL的病理表现有如下特点:(1)胃和肠黏膜局限性浅表性缺损糜烂伴基底部纤维素样坏死;(2)缺损糜烂的基底部有一较大动脉环,动脉壁增厚,黏膜下可见扭曲增生的动脉,动脉无瘤样扩张,也无动脉炎存在;(3)与黏膜下动脉伴行的静脉管壁也增粗,静脉管壁内膜下纤维素沉着;(4)Verhoeff弹力纤维染色,病灶处裸露的动脉壁变薄,部分区域弹力纤维消失<sup>[5-6]</sup>。由于病理上常见动脉硬化表现,故可能是该病常见于中老年男性的原因之一。

DL的临床特点为复发性、突发性、无痛性、凶险的消化道大出血伴有低血压。可以发生于任何年龄段,多见于中老年男性,少有前驱症状、溃疡病史或家族史;出血呈周期性变化。DL仍具有较高的死亡率,国外报道在20%左右,主要与合并症及患者年龄有关<sup>[7]</sup>。

临床诊断主要依靠内镜,血管造影和手术探查,在上世纪90年代之前,本病只靠手术探查,但往往因病灶隐匿,手术时处于出血静止期及术者对DL缺少认识而致漏诊或误诊。随着对本病的深入研究及内镜诊断水平的提高,内镜已经成为DL诊断和治疗的标准手段<sup>[8]</sup>。至今没有临床研究表明急症内镜检查会增加患者的死亡率,而其对于严重出血的快速准确定位作用已获得公认<sup>[9]</sup>。内镜检查的成败关键取决于检查者对本病的认识及操作技术。胃镜检查可见浅表溃疡和裸露、迂曲、异常粗大的黏膜下血管,血管直径1-2 mm,偶见搏动,出血期呈喷射状出血,静止期呈息肉样突起,此为附着的血凝块。我们对上消化道出血(UGIB)胃镜检查的体会包括:(1)只要无严重禁忌症,应尽早行胃镜检查;(2)检查过程中尽量多变换体位移动黏液湖,减少漏诊机会;(3)检查过程中留意残留血液的颜色变化;(4)对小的血凝块反复冲洗,并观察是否存在浅表溃疡,从而发现静止期出血灶;(5)对于活动的喷射样出血由于视野不清晰,急于止血往往适得其反,应首先喷洒凝血酶或局部注射去甲肾上腺素使之形成血凝块或减少出血量,然后再采用准确的高频电凝、钛夹、氩气刀或套扎;(6)对于出血快,治疗失败,并且呈周期性静止者,应在出血灶放置钛夹,尽快手术,并在钛夹指示下行局部胃切除。近10年国外多主张行血管造影以明确诊断,但该技术条件要求较高。手术优点在于明确诊断后即可行有效彻

底的治疗。

诊断主要依靠病史、临床表现和上述辅助检查。对于能排除门脉高压的消化道出血,应警惕DL。上消化道大出血有“静脉曲张性出血”和“非静脉曲张性出血”两种方式,DL是一种酷似静脉曲张的非静脉曲张性的出血性疾病。该病还应与溃疡病急性大出血鉴别。

DL的治疗最主要依靠内镜与手术,单纯药物治疗只能作为辅助手段。(1)内镜止血:随着内镜检查和治疗的广泛开展,内镜止血是目前首选的治疗方法,国外学者认为内镜治疗不但安全、有效,并且完全可以达到永久止血目的,首次治疗的成功率可在90%以上,并具有良好的长期预后<sup>[10-11]</sup>。主要包括注射疗法、电凝止血、激光凝血和套扎止血等方法,单用或全用均有效,各种治疗方法尚未发现有疗效及安全性方面的差别<sup>[12]</sup>,但Chung *et al*<sup>[13]</sup>认为套扎和止血夹等机械止血方法较之注射疗法具更高的有效性和更低的复发率。我们认为内镜治疗即使不成功,也对随后的剖腹手术有指导意义,本组有2例患者手术时在内镜放置的钛夹指引下很快找到出血灶并实施确定性手术,大大缩短了手术时间,避免了出血灶的漏诊及相对盲目的胃切除。(2)手术治疗:手术是治疗DL的可靠方法,特别对诊断不明确的患者尤其重要。上世纪80年代以前,许多学者曾认为这是唯一的治疗方法,而目前主张对内镜治疗无效者再选择此方式。术式有胃大部切除术、胃窦切除术、胃局部楔形切除或广泛切除术和血管缝扎术。手术时应切开胃壁检查全胃黏膜面,特别注意贲门下6 cm范围内的区域,对可疑部位要反复擦试并注意黏膜面的表浅溃疡。手术死亡的重要原因是在于没有明确出血部位时,盲目行胃大部切除术且未能止血所致。DL的本质是异常血管行径畸形血管破裂,故血管缝扎也是一种简便有效的方法。胃底或胃体的病灶可行胃楔形切除,位于胃窦则可行胃窦切除术。最近国外先后报道应用术中胃镜定位下腹腔镜胃楔形切除术,以及术前内镜染色剂或金属夹定位后行腹腔镜胃楔形切除术<sup>[14]</sup>,这标志着该病的手术治疗逐渐向着精确定位和微创发展。(3)血管造影栓塞:该方法应用于内镜治疗失败者;出血部位特殊,内镜治疗困难者;无手术耐受力者。造影血管栓塞治疗较内镜治疗再出血率高,且检测设备要求条件高,诊断率却不高,故限制了其临床的应用。目前国内外尚无DL的大宗血管造影栓塞治疗病例报导,其安全性、有效性还有待于更多的研究做出评

价, 但是其作为最终选择手术之前的一项微创手段具有良好的临床前景<sup>[15]</sup>.

#### 4 参考文献

- Contardo C. Upper gastrointestinal bleeding related to Dieulafoy lesion. *Rev Gastroenterol Peru* 2000; 20: 422-429
- Fockens P, Tytgat GN. Dieulafoy's disease. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 1996; 6: 739-752
- Eidus LB, Rasuli P, Manion D, Heringer R. Caliber-persistent artery of the stomach (Dieulafoy's vascular malformation). *Gastroenterology* 1990; 99: 1507-1510
- Schmulewitz N, Baillie J. Dieulafoy lesions: a review of 6 years of experience at a tertiary referral center. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1688-1694
- Juler GL, Labitzke HG, Lamb R, Allen R. The pathogenesis of Dieulafoy's gastric erosion. *Am J Gastroenterol* 1984; 79: 195-200
- 时淑舫, 张长淮, 黄受方. Dieulafoy's病5例临床及病理观察. *临床和实验医学杂志* 2003; 2: 234-235
- Walmsley RS, Lee YT, Sung JJ. Dieulafoy's lesion: a case series study. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3574-3577
- Linhares MM, Filho BH, Schraibman V, Goitia-Duran MB, Grande JC, Sato NY, Lourenco LG, Lopes-Filho GD. Dieulafoy lesion: endoscopic and surgical management. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2006; 16: 1-3
- Arasradnam RP, Donnelly MT. Acute endoscopic intervention in non-variceal upper gastrointestinal bleeding. *Postgrad Med J* 2005; 81: 92-98
- Romaozinho JM, Pontes JM, Lérias C, Ferreira M, Freitas D. Dieulafoy's lesion: management and long-term outcome. *Endoscopy* 2004; 36: 416-420
- Ljubicic N. Efficacy of endoscopic clipping and long-term follow-up of bleeding Dieulafoy's lesions in the upper gastrointestinal tract. *Hepatogastroenterology* 2006; 53: 224-227
- Park CH, Joo YE, Kim HS, Choi SK, Rew JS, Kim SJ. A prospective, randomized trial of endoscopic band ligation versus endoscopic hemoclip placement for bleeding gastric Dieulafoy's lesions. *Endoscopy* 2004; 36: 677-681
- Chung IK, Kim EJ, Lee MS, Kim HS, Park SH, Lee MH, Kim SJ, Cho MS. Bleeding Dieulafoy's lesions and the choice of endoscopic method: comparing the hemostatic efficacy of mechanical and injection methods. *Gastrointest Endosc* 2000; 52: 721-724
- Alva S, Abir F, Tran DD. Laparoscopic gastric wedge resection for Dieulafoy's disease following preoperative endoscopic localization with India ink and endoscopic clips. *JSLs* 2006; 10: 244-246
- Alshumrani G, Almuaikel M. Angiographic findings and endovascular embolization in Dieulafoy disease: a case report and literature review. *Diagn Interv Radiol* 2006; 12: 151-154

**同行评价**  
本文总结了内镜在Dieulafoy病的诊断与治疗中发挥的重要作用, 论资料较齐全, 讨论分析全面, 细致, 有一定的临床指导意义。

编辑 程剑侠 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

### • 消息 •

## 2007 年国际会议

Meeting Falk Workshop: Mechanisms of Intestinal Inflammation  
10 October 2007  
Dresden  
symposia@falkfoundation.de

Meeting APDW 2007 - Asian Pacific Digestive Disease Week 2007  
15-18 October 2007  
Kobe  
apdw@convention.co.jp

Meeting Falk Symposium 161: Future Perspectives in Gastroenterology  
11-12 October 2007  
Dresden  
symposia@falkfoundation.de

15th United European Gastroenterology Week, UEGW  
27-31 October 2007  
Le Palais des Congrès de Paris, Paris, France

American College of Gastroenterology Annual Scientific Meeting  
12-17 October 2007  
Pennsylvania Convention Center  
Philadelphia, PA

Meeting The Liver Meeting® 2007 - 57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases  
2-6 November 2007  
Boston - MA  
www.aasld.org

## 两种方法检测胃液潜血的比较

黄彩英, 胡海军, 辛颖

**背景资料**  
检测胃液潜血是临床上判断上消化道是否出血的一种有效方法。在检验工作中, 常用的胶体金法和化学法存在着较大的差异, 胶体金法阳性率低于化学法。

黄彩英, 胡海军, 辛颖, 本溪钢铁集团公司总医院检验科 辽宁省本溪市 117000  
通讯作者: 黄彩英, 117000, 辽宁省本溪市人民路29号, 本溪钢铁集团公司总医院检验科. wei75@21cn.com  
电话: 0414-2215196  
收稿日期: 2007-07-21 修回日期: 2007-09-17

### Comparison between two methods for examining occult blood in human gastric juice

Cai-Ying Huang, Hai-Jun Hu, Ying Xin

Cai-Ying Huang, Hai-Jun Hu, Ying Xin, Department of Laboratory, General Hospital, Bengang Iron and Steel Corporation, Benxi 117000, Liaoning Province, China  
Correspondence to: Cai-Ying Huang, Department of Laboratory, General Hospital, Bengang Iron and Steel Corporation, 29 People's Road, Benxi 117000, Liaoning Province, China. wei75@21cn.com  
Received: 2007-07-21 Revised: 2007-09-17

### Abstract

**AIM:** To explore the relationship and differences between the one step fecal occult Blood Test and 2-aminotoluene assay to detect occult blood in gastric juice from patients who did not consume a meal.

**METHODS:** Fifty-eight samples of gastric juice were collected from gastric catheterization patients who had fasted for at least 24 h (parenteral nutrition), and who had not consumed meat, Vitamin C or iron for 3 d. The one step fecal occult Blood Test and 2-aminotoluene assay were used to examine occult blood in human gastric juice.

**RESULTS:** The positive rate for the one step fecal occult Blood Test was 53.4% and 75.9% for the 2-aminotoluene assay. This difference was significant ( $P < 0.005$ ).

**CONCLUSION:** The positive rate for the one step fecal occult Blood Test is lower than that for the 2-aminotoluene assay from the patients who have fasted.

**Key Words:** One step fecal occult blood test; 2-Ami-

notoluene; Gastric juice; Occult blood

Huang CY, Hu HJ, Xin Y. Comparison between two methods for examining occult blood in human gastric juice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(27): 2942-2944

### 摘要

**目的:** 探讨胶体金法和邻甲苯胺法检测空腹患者胃液潜血的差异。

**方法:** 收集58例大于24 h未进饮食(为肠外营养)、3 d内未吃肉类食品、未服用Vc、铁剂等影响邻甲苯胺法检测药物的胃插管患者的胃液标本, 用胶体金法和邻甲苯胺法同时检测潜血。

**结果:** 胶体金法有31例阳性, 阳性率为53.4%, 邻甲苯胺法有44例阳性, 阳性率为75.9%, 两者有显著性差异( $P < 0.005$ )。

**结论:** 邻甲苯胺法检测空腹患者胃液潜血优于胶体金法。

**关键词:** 胶体金法; 邻甲苯胺法; 胃液; 潜血

黄彩英, 胡海军, 辛颖. 两种方法检测胃液潜血的比较. 世界华人消化杂志 2007;15(27):2942-2944

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2942.asp>

### 0 引言

临床上对于消化道快速和大量出血的患者常通过体征就可以判断是否有出血, 然而对于慢性和少量出血则不容易判断, 常需通过检测呕吐物、胃液以及大便潜血来判断。若能取到患者的胃液直接做潜血检查对于疾病的诊断和疗效具有重要意义, 而且会使检测结果更直接和快捷。目前常用的检测潜血方法是胶体金法和化学法。不同的方法受不同的因素影响, 所以在检测结果上也存在不一致。为了探讨这两种方法在检测胃液潜血时有无差异, 现将近2年收集的我院住院患者的胃液标本58例, 同时用胶体金法和邻甲苯胺法检测的结果报告如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 58例标本均来自我院内科和外科病房的患者进行胃肠减压时经插管引流出的胃液。留取标本时患者均大于24 h未进饮食, 为肠外营养, 3 d内未吃肉类食品, 未服用Vc、铁剂等影响邻甲苯胺法的检测药物。且标本无肉眼可见的新鲜血液并通过适当处理可以用胶体金法直接层析者。胶体金是万华普曼生物有限公司生产; 0.15 L/L邻甲苯胺冰乙酸液为新配制试剂。

**1.2 方法** 胃液用无菌小玻璃瓶收集。胶体金法将胶体金试纸下端直接插入混匀胃液中, 用竹签不时刮去吸附在胶体金试纸条上的黏稠物。阳性者直接报阳性, 阴性者做5、10、20、40、稀释80倍后再检测, 阳性者报阳性, 阴性报阴性。邻甲苯胺法用无菌棉签中上2/3直接蘸取混匀后的胃液标本, 旋转滴加邻甲苯胺冰乙酸液2-3滴, 再与旋转中滴加30 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2-3滴, 立即变蓝黑、黑褐、蓝褐及滴加试剂10 s后变蓝均记录为阳性, 滴加试剂2 min后仍然不变色记录为阴性。

**统计学处理** 采用 $\chi^2$ 检验,  $P < 0.05$ 为有统计学差异。

## 2 结果

胶体金法有31例阳性, 阳性率: 53.4%(31/58); 邻甲苯胺法有44例阳性, 阳性率: 75.9%(44/58)。共同阳性31例, 阳性符合率: 70.5%(31/44); 共同阴性14例, 阴性符合率: 51.9%(14/27)。胶体金法阳性率低于邻甲苯胺法( $\chi^2 = 11.08$ ,  $P < 0.005$ )(表1)。

## 3 讨论

不同的方法存在着不同的影响因素, 致使检测结果也存在差异。邻甲苯胺法在化学法中灵敏度较高, 能检测到1 mg/L的Hb, 但较胶体金法灵敏度0.2 mg/L低<sup>[1]</sup>。化学法试验设计原理基本相同。Hb中的亚铁血红素有类似过氧化物酶的活性, 邻甲苯胺作为一种供氢(电子)体, 本身无色, 亚铁血红素能催化邻甲苯胺等药物脱氢, 其分子结构中出现了色基而显色<sup>[2]</sup>。所以外源性食物如含有血红蛋白、肌红蛋白, 其他血红素均可使试验呈阳性。肉和绿叶蔬菜、铁剂也可以使邻甲苯胺法检测结果出现假阳性, Vc等还原性药物可使结果假阴性<sup>[1]</sup>。本检测中对留取标本的患者严格询问饮食及服药史, 均为24 h以上未进

表 1 两种方法检测胃液潜血结果(n)

胶体金法	邻甲苯胺法		合计
	+	-	
+	31	0	31
-	13	14	27
合计	44	14	58

饮食, 3 d内未吃肉类食品, 未服用Vc、铁剂等, 排除了这方面的影响。否则, 胶体金法检测空腹胃液潜血阳性率低于邻甲苯胺法可能是邻甲苯胺法对结果造成的假阳性。

胶体金法是胶体金试纸条利用其下端的吸水材料吸收水和Hb抗原后, 利用毛细现象向上扩散溶解了胶体金标记的mAb Hb(抗人Hb抗体)并与之结合, 利用毛细现象向上与测试区的固相Hb抗体结合(夹心法), 此时胶体金聚集呈红色线条。胶体金法自应用临床以来, 因其利用的mAb针对的是人Hb抗原, 对人Hb有高度专一性, 此法不受饮食限制及药物干扰, 特异性强<sup>[3]</sup>。检测下限可达到0.2 mg/L, 灵敏度高<sup>[4]</sup>, 被临床越来越多地应用, 特别是检测下消化道出血, 在大肠癌普查中也起着重要的作用<sup>[4]</sup>。然而胶体金法也存在着一定的不足, 检测上消化道潜血约40%-50%不能检出。因为(1)Hb经过消化酶降解变性或消化殆尽已不具有原来的免疫原性; (2)过量出血而致使反应体系中抗原过剩出现带现象; (3)患者Hb抗原与mAb不匹配<sup>[1]</sup>。在检测上消化道出血时胶体金法阳性率低于化学法; 在检测下消化道出血时胶体金法敏感度高于化学法<sup>[5]</sup>。

在检测胃液潜血时胶体金法阳性率低于化学法, 也有相关的报道<sup>[6]</sup>。其原因可能是(1)黏液的影响。胃液内有黏液成份, 空腹时黏液大量存在。黏液黏附并堵塞了胶体金条的纤维膜分子筛使其毛细作用减弱, Hb抗原无法进入抗体区, 可造成假阴性<sup>[7]</sup>。表现为检测过程中层析缓慢, 有的甚至难以层析。另外黏液是碱性的具有吸附和保护胃黏膜的作用, 也可吸附RBC保护其不被胃液中的盐酸破坏, 这样真正游离在胃液中的Hb抗原就会减少, 加之盐酸的破坏作用就可造成假阴性。而这对化学法没有影响。正常空腹胃液为无色或略带乳白色。在试验中有9例为咖啡色, 胶体金法阴性, 稀释后仍为阴

**创新盘点**  
胶体金法阳性率低于化学法时, 常把其归为是化学法受到饮食及药物影响造成的假阳性, 本文去除了饮食及药物的因素, 胶体金法阳性率仍低于化学法。胶体金法检测胃液潜血时存在假阴性。

**应用要点**  
胶体金法是目前检测潜血最常用的方法, 然而在检测胃液潜血时, 存在大量假阴性, 所以在胶体金法检测胃液潜血阴性时应用其他方法复查, 当两种方法结果不符时, 应与临床联系, 以便做出正确判断。

同行评价  
本文总结出邻甲  
苯胺法检测空腹  
患者胃液潜血优  
于胶体金法, 选题  
实用, 语言通俗,  
有较强的临床意  
义和参考价值.

性, 化学法为强阳性. (2)盐酸的影响. 健康成人平均每日胃液分泌量为1000-1500 mL, 盐酸浓度约40 mmol/L, 十二指肠溃疡患者平均每日胃液分泌量往往超2000 mL, 盐酸浓度约为40-80 mmol/L. 空腹时胃液呈酸性, 正常胃液pH值为0.9-1.8<sup>[1]</sup>. 日常工作中胃液pH集中在1-3范围内, Hb经胃酸作用后, 结构被破坏, mAb无法识别, 可产生假阴性<sup>[8]</sup>. 经过用盐酸作用Hb实验, 当盐酸浓度为10-40 mmol/L, Hb浓度(与盐酸作用后的浓度)≤200 mg/L时均为阴性. 然而盐酸对化学法则不产生影响<sup>[7]</sup>. 这也是胶体金法产生假阴性的一个重要原因. (3)另外因潜血试纸中mAb Hb的量是一定的, 因而有一定的线性范围, 当上消化道大量出血时, Hb浓度远远大于抗体浓度可出现带现象, 造成假阴性<sup>[9]</sup>. 在本试验中均对胶体金法阴性标本做了适当稀释, 58例标本中未发现抗原过剩现象. 这可能是在选取试验标本时去除了肉眼可见新鲜血液标本的缘故. (4)还有患者的Hb与mAb不匹配也是造成胶体金法检测结果假阴性的一个原因<sup>[1]</sup>, 本次试验对27例胶体金法检测结果阴性的患者均抽取了用EDTA-K<sub>2</sub>抗凝的全血, 适当稀释后用胶体金法检测均阳性, 说明这27例患者的Hb抗原与mAb相匹配.

以上可以看出用胶体金法检测胃液潜血时, 当结果阴性时应当再用其他方法检测. 目前由于胶体金法特异性强, 灵敏度高(体外试验), 方便快捷无污染, 大有取代其他方法的趋势, 在一些医院只用一种试剂, 然而对于潜血实验国内

外尚无统一公认的推荐方法, 无法达到实验室的标准化<sup>[1]</sup>, 不同方法都有不同的影响因素, 因此建议化验室发出检验报告的同时标出检测方法, 以便于临床参考, 临床医生也应了解一些检测方法的影响因素.

本文旨在讨论胶体金法和化学法在检测胃液时的差异, 对于在非空腹状态下的胃液及呕吐物潜血鉴别也有一定参考的意义. 另外还有一些检测潜血的方法, 如酶联免疫吸附试验、免疫乳胶凝集试验、免疫化学法、便潜血自动分析仪等. 这些方法在检测便潜血方面都有了相应的研究和报告, 但在胃液潜血方面的检测在国内还未发现相关报道, 有待于进一步的研究和探讨.

#### 4 参考文献

- 1 寇丽筠, 陈宏础. 临床基础检验学. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 144, 209
- 2 孙玉国, 张倩, 张延芳. 粪便隐血试验原理的再认识. 国外医学临床生物化学与检验学分册 2004; 25: 499
- 3 曹兴建, 顾爱霞, 张金业, 顾可梁. 胶体金试纸条检测隐血方法的评价. 临床检验杂志 1996; 14: 321-322
- 4 刘集鸿, 许岸高, 余志金, 钟旭辉, 钟选芳, 徐永成, 甘爱华. 免疫胶体金便隐血试验在大肠癌普查中应用. 中国肿瘤 2007; 16: 219-220
- 5 叶应抚, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程. 第3版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 310-311
- 6 吴乾虎. 胃液潜血检验与临床. 标记免疫分析与临床 2005; 12: 52-53
- 7 高茂馗, 束国防. 免疫法和化学法测定隐血的比较. 临床检验杂志 2004; 22: 69
- 8 杨明, 丛玉隆. 不同便潜血试验检测消化道出血的临床价值. 白求恩医学院学报 2003; 1: 152-153
- 9 王莉. 胶体金试纸与联苯胺法检测隐血的比较. 临床检验杂志 2002; 20: 144-145

编辑 程剑侠 电编 何基才



# 中药治疗重症急性胰腺炎的规律

张敏, 朱德增

张敏, 朱德增, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院  
中医科 上海市 200433  
通讯作者: 朱德增, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医  
大学附属长海医院中医科. zyxzd@163.com  
电话: 021-25070884  
收稿日期: 2007-04-27 修回日期: 2007-09-17

## Guidelines for the treatment of severe acute pancreatitis with Chinese herbal medicines

Min Zhang, De-Zeng Zhu

Min Zhang, De-Zeng Zhu, Department of Traditional Chinese Medicine, Changhai Hospital Affiliated to Second Military Medical University of the Chinese PLA, Shanghai 200433, China

Correspondence to: De-Zeng Zhu, Department of Traditional Chinese Medicine, Changhai Hospital Affiliated to Second Military Medical University of the Chinese PLA, Shanghai 200433, China. zyxzd@163.com  
Received: 2007-04-27 Revised: 2007-09-17

## Abstract

**AIM:** To study the rules in the treatment of severe acute pancreatitis (SAP) with Chinese herbal drugs.

**METHODS:** We reviewed all articles on the use of herbal medicine in SAP published in key journals between 1970 and 2006, and 83 herbal formulations fit to screening standards were selected for evaluation. The status of herb use in the treatment of SAP is discussed by evaluation of their mean effective rate and efficiency.

**RESULTS:** The important methods for curing SAP were purgation, regulating vital energy, eradicating phlegmonosis, and promoting blood flowing. The most frequently used substance is dahuang, which appears in all herbal formulas studied. The mean effective power of herbs used for the treatment of SAP was 89.12%, and its main mode of administration was *via* nasal feeding with retained herbal formulas. The average course of treatment was 8.7 days. The curative effect of herbs was mainly to improve symptoms.

**CONCLUSION:** The main methods of TCM to cure SAP are purgation, regulating vital energy, eradicating phlegmonosis, and promoting blood flow. Herbal use is effective in treating SAP, but more normalization about the performance of herbs is needed.

**Key Words:** Severe acute pancreatitis; Traditional Chinese Medicine; Purgation; Therapeutic effect evaluation

Zhang M, Zhu DZ. Guidelines for the treatment of severe acute pancreatitis with Chinese herbal medicines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(27): 2945-2948

## 摘要

**目的:** 总结中药复方治疗重症急性胰腺炎(SAP)的用药经验和特点, 探讨其用药规律, 并评价其疗效。

**方法:** 收集1970-2006年核心期刊中治疗重症急性胰腺炎的临床研究文献, 共入选复方83首, 再对出现频率较高的中药进行分析; 通过总结有效率及疗效评价指标等探讨中医药治疗SAP现状。

**结果:** 目前治疗SAP以泻下、理气、清热、活血为主。应用最多的是大黄, 应用频率达到100%。中医药在治疗重症胰腺炎方面, 效果是肯定的, 平均有效率89.12%; 固定方剂鼻饲为主, 随证加减占39.66%; 平均疗程8.7 d; 治疗效果以症状改善为主。

**结论:** 泻下法是治疗重症急性胰腺炎的主要方法, 理气、清热、活血常与其联合应用。中药治疗SAP效果肯定, 但需规范化。

**关键词:** 重症急性胰腺炎; 中药治疗; 泻下法; 疗效评价

张敏, 朱德增. 中药治疗重症急性胰腺炎的规律. 世界华人消化杂志 2007;15(27):2945-2948  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2945.asp>

## 0 引言

急性胰腺炎(AP), 现代中医学上属“胰瘕”范

**背景资料**  
急性胰腺炎是临床常见的急腹症之一, 尽管近年来在国内外学者的共同努力下, 有关胰腺炎的基础及临床研究取得了较大进展, 其病死率及并发症发生率明显下降, 但其病因复杂, 发病机制至今未完全阐明。中西医结合治疗重症急性胰腺炎明确写入指南。经实践证明, 中医药可避免发生严重的并发症, 治疗效果远胜于单纯西药。中医药治疗胰腺炎以固定方剂为主, 此种状况似乎有悖于中医辨证施治的特点, 但从另一方面体现出SAP临床用药的规律性和可行性, 适用于SAP的固定方剂便于临床重复和推广。

**应用要点**  
本文通过对中药治疗疗程、用药途径及疗效评价指标等情况的分析,有助于找到能够科学说明中药效果的指标,筛选有效中药,中医药治疗SAP将会进一步规范。

畴,因酗酒或暴食,或情志刺激,或继发于胆石、蛔厥等病之后,湿热邪毒壅积于胰所致。以急起上腹剧痛,伴恶心呕吐,发热,尿血淀粉酶增高为主要表现的内脏瘁病类疾病<sup>[1]</sup>。在临床上,AP可根据程度不同分为轻型和重型<sup>[2]</sup>。重症急性胰腺炎(SAP)病程凶险,其发病率占急性胰腺炎发病人群的20%-30%<sup>[3]</sup>,死亡率为14%-30%<sup>[4]</sup>。中医药在SAP的治疗过程中,起着举足轻重的作用。但目前治疗方剂庞杂,限制其进一步推广应用。我们拟通过对相关文献总结分析,找出用药规律,分析用药特点,更好指导临床用药。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集1970-2006年核心期刊中治疗重症急性胰腺炎的临床研究文献。入选标准是:(1)针对重症急性胰腺炎的中药治疗;(2)重症急性胰腺炎诊断标准必须符合指南规定<sup>[5]</sup>;(3)所应用的方剂均是复方;(4)筛选中药为主方中药物,随症加减用药不入选;(5)所选方剂均是SAP急性反应期(自发病至2 wk左右,常可有休克、呼衰、肾衰、脑病等主要并发症)<sup>[5]</sup>用药。

**1.2 方法** 以“重症胰腺炎、中西医结合疗法、保守治疗、急症、中医药疗法”等作为关键词、自由词,利用CDM光盘,重庆维普、清华同方、万方数据等资料数据库,检索了236篇,对其进行进一步筛选。所涉及中药的分类、功效均根据雷载权主编的《中药学》(第六版教材)进行归纳,对出现频率较高的中药进行量化处理。总结中药治疗SAP的有效率,计算其平均有效率。分析目前临床治疗SAP过程中应用中药的方式、疗程、治疗效果等状况。

## 2 结果

通过筛选,共入选方剂83首,应用中药79味。(1)应用频次最多的前20位中药见表1。目前治疗重症急性胰腺炎所用中药以泻下、理气、清热、活血类为主。大黄应用最多,频率达到100%。其次是芒硝、柴胡、厚朴等;(2)83首方剂均证明有疗效,最低为79%,最高为100%,平均有效率89.12%;(3)从方剂应用情况来看,大部分为固定处方,随证加减占39.66%;(4)19首方剂明确提出控制大便次数,最少1次/d,最多10次/d,平均控制至4.3次/d。39首方剂在应用中提出疗程,最短7 d,最长21 d,平均8.7 d;(5)56首方剂指明用药方式。临床上应用中药治疗SAP首选胃管内注入,使用频率69.64%;其次是鼻饲和灌肠合用,

使用频率23.21%;单用灌肠频率5.36%;腹腔盥洗目前只见1例报道;(6)58首方剂(69.90%)明确提出中药治疗SAP疗效评价指标。其中,应用腹痛指标58.62%,其次是淀粉酶占53.45%,治愈率占41.38%,腹胀占37.93%,腹部压痛、呕吐、发热分别占29.31%、27.59%、27.59%;APACHII评分、Rasson评分客观指标使用率均低。

## 3 讨论

重症急性胰腺炎急性期最常见的系统并发症是肺功能不全,急性肾衰竭和休克。急性呼吸窘迫综合征是AP最严重的呼吸系统并发症,死亡率超过60%<sup>[6]</sup>。肾衰竭的发病机制复杂,死亡率超过50%<sup>[7]</sup>。休克提示预后不良<sup>[8]</sup>,一旦休克发生,水肿型胰腺炎将转变为坏死型胰腺炎<sup>[9]</sup>。因此治疗关键是使患者度过急性期,降低死亡率。目前,中药治疗SAP降低死亡率的文献报道不多,患者的观察例数及治疗措施的差异性,起到一定影响作用,所以,大规模固定方剂的临床试验有待于进一步开展。

目前,国内研究较透彻且普遍得以应用的中药复方是清胰汤和柴苓承气汤。清胰汤系南开医科大学吴咸中院士在20世纪70年代根据急性胰腺炎的证候辨证施治而创设的方剂;柴苓承气汤是巫协宁教授取小柴胡汤中几位药合大承气汤而成,其临床效果及作用机制研究较透彻<sup>[10-12]</sup>。实验研究表明,泻下理气法治疗急性胰腺炎,可增强胃肠道运动功能;改善腹腔脏器血供和毛细血管通透性,改善微循环;保护肠道屏障功能,减少内毒素吸收,防治细菌移位;抑制细胞因子和炎性介质的产生和活性,控制全身炎症反应,保护组织器官;菌毒并治。清热法的作用是增强腹腔脏器血液量,改善微循环;抗内毒素、保护组织器官;利胆、利胰,降低胰酶活性;保护胰腺细胞,维护其正常功能。活血法则可增强肠壁和腹腔脏器血供,改善微循环,改善血液流变性,抗炎、促进腹膜炎吸收,抑酶及抗氧化作用<sup>[13]</sup>。对大黄在重症急性胰腺炎治疗中的作用机制的研究颇多。大黄素是从大黄中提纯的蒽醌类衍生物,可抑制厌氧菌感染,抑制胰酶活性、导泻、解除Oddi括约肌痉挛,保护肠黏膜屏障,防止细菌移位,清除氧自由基,降低血浆内毒素水平,有效抑制血管活性物质如二十碳烯酸类的异常代谢而改善微循环、抗凝、抗血栓等,还可干预凋亡调控基因,诱导胰腺腺泡细胞凋亡,从而避免或减少胰酶及炎症

**同行评价**  
本文分析了中医药治疗SAP的应用规律, 数据可靠, 方法可信, 对临床有一定的参考价值 and 指导意义.

表 1 治疗重症急性胰腺炎前20位中药使用情况

中药	使用 次数(n)	使用 频率(%)	药物 类别	平均 剂量(g)
大黄	83	100.00	泻下药	15.57
芒硝	54	65.06	泻下药	13.56
柴胡	47	56.63	发散风热药	13.84
厚朴	44	53.01	化湿药	13.85
黄芩	41	49.40	清热燥湿药	12.36
木香	38	45.78	理气药	11.35
枳实	35	42.17	理气药	13.00
白芍	34	40.96	补血药	15.91
延胡索	25	30.12	活血止痛药	12.09
栀子	23	27.71	清热泻火药	13.24
赤芍	22	26.51	清热凉血药	12.76
公英	21	25.30	清热解毒药	27.13
黄连	20	24.10	清热燥湿药	13.67
桃仁	19	22.89	活血调经药	11.40
丹皮	19	22.89	清热凉血药	13.21
元胡	18	21.69	活血止痛药	13.82
银花	18	21.69	清热解毒药	21.50
甘草	16	19.28	补气药	6.75
丹参	14	16.87	活血调经药	18.00
连翘	14	16.87	清热解毒药	16.62

介质释放, 阻断发病环节; 通过诱导细胞因子基因表达增强, 调控细胞增殖和分化, 刺激多种细胞外基质成分合成, 增加胰腺组织DNA合成和蛋白含量, 加速胰腺组织的再生和修复<sup>[14]</sup>. 楼恺娴 *et al*<sup>[14]</sup>, 袁耀宗 *et al*<sup>[15]</sup>发现, SAP大鼠经大黄素治疗后血清淀粉酶显著下降, 胰腺细胞转化生长因子β1(TGFβ1)和表皮生长因子(EGF)mRNA表达均较非治疗组显著增强, 总蛋白质、DNA合成明显增加; 胰腺细胞凋亡指数显著高于未治疗组, 凋亡调控基因Bak mRNA的表达与未治疗组之间差异无显著性, 而Bax mRNA的表达显著高于未治疗组. 尚东 *et al*<sup>[16]</sup>发现大黄素能够诱导、促进SIRS患者外周血中性粒细胞(PMN)的凋亡, 对PMN凋亡的延迟具有调节作用. 满晓华 *et al*<sup>[17]</sup>通过动物实验发现, 大黄素可抑制胰腺内IκBs/NF-κB信号转导通路活化, 从而抑制炎症细胞因子和黏附分子基因表达, 发挥其对SAP的治疗作用. 陆宏伟 *et al*<sup>[18]</sup>发现重症急性胰腺炎肺组织caspase-1表达水平的增强可引起血清IL-113、IL-18水平升高, 并加重肺组织的损伤, 大黄对重症急性胰腺炎肺组织caspase-1的表达水平具有抑制作用. 由此可见, 把中药在SAP中的治疗作用看作单纯的泻下通便是很不全面的, 通便只是其效果之一. 只有完全纠正这一错误观念, 才能对中药作用做出客观评价, 以进一步推广其临床应用.

中医药治疗重症急性胰腺炎的平均有效率89.12%, 效果肯定. 可能由于有效率评价方式不一致, 造成其数值相差很大. 从临床用药经验看, 单纯灌肠以通大便为主, 药物有效成分吸收少, 适用于合并剧烈呕吐或肠麻痹严重长时间未解大便者. 鼻饲和灌肠同用, 效果明显, 但患者往往排便次数过多. 腹腔盥洗报道不多, 但应用前景广泛, 值得进一步探讨研究. 应用疗程平均8.7 d, 这与SAP急性反应期时段相吻合, 同时也符合中药起效时间慢, 作用时间长的特点. 明确提出评价指标的文章数目不多(69.90%), 其真实性及科学性值得怀疑, 从另一方面也反映出中医药治疗SAP临床试验质量尚低<sup>[19]</sup>, 主观指标占多数, 说服力度小. 血清淀粉酶的水平及升高的程度与胰腺的损伤程度和AP的严重程度没有相关性<sup>[20-22]</sup>, 而这类指标在中医药临床试验中还在广泛应用, 值得我们注意.

通过对中药治疗SAP的初步分析, 我们发现, 虽然各方剂不尽相同, 但治则基本统一, 即以清热泻下, 理气活血为主. 据此, 为了方便临

床应用, 筛选几味中药制成固定复方制剂, 应用前景广泛. 当然, 具体方药的选择不能仅凭总结结果推断, 但可以在此基础上, 通过临床验证, 找到疗效显著的方剂. 中医药治疗SAP效果是肯定的, 其主要作用机制及实验研究有了一定进展<sup>[23]</sup>. 但如何设计科学可行的临床试验仍是目前需要解决的问题. 通过对中药治疗疗程、用药途径及疗效评价指标等情况的分析, 我们期待找到能够科学说明中药效果的指标, 同时期待中医药治疗SAP能够进一步规范.

4 参考文献

1 国家技术监督局. 中华人民共和国国家标准中医临床诊疗术语. 北京: 中国标准出版社, 1997: 1  
2 Bradley EL 3rd. A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, Ga, September 11 through 13, 1992. *Arch Surg* 1993; 128: 586-590  
3 Balthazar EJ. Acute pancreatitis: assessment of severity with clinical and CT evaluation. *Radiology* 2002; 223: 603-613  
4 de Beaux AC, Palmer KR, Carter DC. Factors influencing morbidity and mortality in acute pancreatitis; an analysis of 279 cases. *Gut* 1995; 37: 121-126  
5 张圣道. 重症急性胰腺炎诊治草案(2000年杭州会议). *胰腺病学* 2001; 1: 46-48  
6 Interiano B, Stuard ID, Hyde RW. Acute respiratory distress syndrome in pancreatitis. *Ann Intern Med*

- 1972; 77: 923-926
- 7 Werner MH, Hayes DF, Lucas CE, Rosenberg IK. Renal vasoconstriction in association with acute pancreatitis. *Am J Surg* 1974; 127: 185-190
- 8 Ranson JH, Rifkind KM, Turner JW. Prognostic signs and nonoperative peritoneal lavage in acute pancreatitis. *Surg Gynecol Obstet* 1976; 143: 209-219
- 9 Kyogoku T, Manabe T, Tobe T. Role of ischemia in acute pancreatitis. Hemorrhagic shock converts edematous pancreatitis to hemorrhagic pancreatitis in rats. *Dig Dis Sci* 1992; 37: 1409-1417
- 10 薛平, 黄宗文, 郭佳, 赵健蕾, 李永红, 王忠朝. 早期应用柴芩承气汤治疗胆源性重症急性胰腺炎的临床研究. *中西医结合学报* 2005; 3: 263-265
- 11 唐文富, 万美华, 朱林, 陈光远, 夏庆, 黄熙. 生长抑素联合中药对急性胰腺炎患者免疫功能的影响及临床疗效. *中西医结合学报* 2005; 3: 103-107
- 12 朱林, 唐文富, 任平, 黄熙. 直肠肛门测压的临床意义及其研究策略. *中西医结合学报* 2005; 3: 240-241
- 13 张肇达, 严律南, 刘续宝. 急性胰腺炎. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 131-136
- 14 楼恺娴, 龚自华, 袁耀宗, 涂水平, 翟祖康, 徐家裕. 大黄素对急性胰腺炎胰腺组织TGF $\beta_1$ 表达的影响. *中国中西医结合杂志* 2001; 21: 433-436
- 15 袁耀宗, 楼恺娴, 龚自华, 涂水平, 翟祖康, 徐家裕. 大黄素治疗急性胰腺炎胰腺EGF基因的变化. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 127-130
- 16 尚东, 王宝枝, 毕伟, 陈海龙, 齐清会, 关凤林. 大黄素对全身炎症反应综合征时中性粒细胞凋亡异常治疗的研究. *中国急救医学* 2006; 26: 581-583
- 17 满晓华, 李兆申, 屠振兴, 贾一韬, 龚燕芳. 大黄素对急性胰腺炎大鼠胰腺核因子- $\kappa$ B活化的影响. *中华消化杂志* 2005; 25: 586-589
- 18 陆宏伟, 杨正安, 刘红梅, 柏玲. 重症急性胰腺炎肺组织caspase-1表达的意义及大黄对其影响. *中国急救医学* 2006; 26: 597-599
- 19 魏晓, 朱德增. 中医药治疗急性胰腺炎临床试验的质量评价. *胰腺病学* 2006; 6: 39-41
- 20 Sternby B, O'Brien JF, Zinsmeister AR, DiMagno EP. What is the best biochemical test to diagnose acute pancreatitis? A prospective clinical study. *Mayo Clin Proc* 1996; 71: 1138-1144
- 21 Clavien PA, Robert J, Meyer P, Borst F, Hauser H, Herrmann F, Dunand V, Rohner A. Acute pancreatitis and normoamylasemia. Not an uncommon combination. *Ann Surg* 1989; 210: 614-620
- 22 Triester SL, Kowdley KV. Prognostic factors in acute pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 2002; 34: 167-176
- 23 张喜平, 王英. 中药治疗急性胰腺炎的主要机制与作用的实验研究进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 412-416

编辑 程剑侠 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

# 2007 全国早期胃癌及消化病进展研讨会征文通知

本刊讯 由中华医学会消化内镜学会主办, 中华消化内镜学会胃病学组、浙江省消化内镜学会、温州医学院、上海市胃肠肿瘤重点学科承办的2007全国早期胃癌及消化病进展研讨会将于2007-11-16/18在浙江省温州市举行. 邀请国内外专家作专题讲演及内镜操作演示.

## 1 征文内容和要求

(1)有关早期胃癌及消化病进展; (2)胃癌及消化病诊疗的最新技术及研究成果. 投稿截止日期: 2007-10-10.

## 2 联系方式

夏宣平, 325000, 浙江省温州市学院西路109号, 温州医学院附属第二医院消化内科; 贾国葆, 325000, 浙江省温州市温州医学院附属第一医院消化内科. Email: feyxh@163.com或xxpsummer@yahoo.com.cn.

# Seldinger置管法腹腔引流术治疗重症胰腺炎20例

郑琦涵, 陆洁, 李雪飞, 邹静蓉

郑琦涵, 陆洁, 李雪飞, 邹静蓉, 江苏大学附属武进医院急诊科 江苏省常州市 213002

通讯作者: 郑琦涵, 213002, 江苏省常州市, 江苏大学附属武进医院急诊科. zqh@163.com

电话: 0519-5336190-1122 传真: 0411-83631284

收稿日期: 2007-06-19 修回日期: 2007-09-13

## Drainage of an abscess cavity using the Seldinger technique for the treatment of 20 cases of severe acute pancreatitis

Qi-Han Zheng, Jie Lu, Xue-Fei Li, Jing-Rong Zou

Qi-Han Zheng, Jie Lu, Xue-Fei Li, Jing-Rong Zou, Department of Emergency, Wujin Hospital Affiliated to Jiangsu University, Changzhou 213002, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Qi-Han Zheng, Department of Emergency, Wujin Hospital Affiliated to Jiangsu University, Changzhou 213002, Jiangsu Province, China. zqh@163.com

Received: 2007-06-19 Revised: 2007-09-13

## Abstract

**AIM:** To evaluate the efficacy of drainage of an abscess cavity using the Seldinger technique for the treatment of severe acute pancreatitis.

**METHODS:** Twenty patients diagnosed with severe acute pancreatitis were treated by drainage of the abscess cavity using the Seldinger technique.

**RESULTS:** Symptoms in 17 patients were alleviated after 2 to 8 d; the amylase levels in blood and urine decreased to normal levels in these patients. One patient died, while the other two left the hospital due to financial reasons. The death rate was 5.89%.

**CONCLUSION:** Drainage of abscess cavities using the Seldinger technique is an effective non-surgical treatment for severe acute pancreatitis.

**Key Words:** Seldinger technique; Non-surgery; Drainage of abscess cavity; Severe acute pancreatitis

Zheng QH, Lu J, Li XF, Zou JR. Drainage of an abscess cavity using the Seldinger technique for the treatment

of 20 cases of severe acute pancreatitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(27): 2949-2950

## 摘要

**目的:** 探讨Seldinger置管法腹腔引流术治疗重症胰腺炎的疗效。

**方法:** 用中心静脉导管Seldinger置管法腹腔引流术治疗非胆源性重症胰腺炎20例。

**结果:** 20例患者未经手术, 17例患者2-8 d后腹部症状减轻, 血尿淀粉酶下降至正常, 病情好转, 1例患者死亡, 2例患者因住院经费问题自动出院, 死亡率为5.89%。

**结论:** Seldinger置管法腹腔引流术可作为重症胰腺炎非手术引流方法。

**关键词:** Seldinger置管法; 非手术; 腹腔引流术; 重症胰腺炎

郑琦涵, 陆洁, 李雪飞, 邹静蓉. Seldinger置管法腹腔引流术治疗重症胰腺炎20例. 世界华人消化杂志 2007; 15(27):2949-2950

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2949.asp>

## 0 引言

急性重型胰腺炎, 起病急、病情重、并发症多, 常引起多脏器功能障碍综合征(MODS)及多脏器功能衰竭(MOF), 死亡率高达40%-70%, 早期以保守治疗为主, 必要时手术引流加坏死组织清除及腹腔减压<sup>[1-2]</sup>. 传统保守治疗具有无手术创伤的优点, 但不能起到引流坏死组织及腹腔减压的作用; 而外科手术治疗有引流坏死组织及腹腔减压的作用, 但手术创伤大, 特别是年老体弱患者不能耐受, 术后并发症多, 死亡率高<sup>[3-5]</sup>. 而Seldinger置管法腹腔引流术在保守治疗的基础上起到引流清除部分坏死组织的作用, 及腹腔减压作用, 创伤小, 具有一定优点. 我科运用Seldinger置管法腹腔引流术治疗20例重症急性胰腺炎疗效如下。

## 背景资料

重症急性胰腺炎传统保守治疗具有无手术创伤的优点, 但不能起到引流坏死组织及腹腔减压的作用; 而外科手术治疗有引流坏死组织及腹腔减压的作用, 但手术创伤大, 特别是年老体弱患者不能耐受. 而Seldinger置管法腹腔引流术相对弥补了两者的不足。



**应用要点**  
Seldinger置管法腹腔引流术起到一定引流清除部分坏死组织及腹腔减压的作用,具有创伤小,方法简单灵活,在B超定位引导穿刺中应注意防止损伤腹腔脏器及血管,引流中应保持引流管通畅,定时冲洗,防止引流管堵塞。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 自2003-01/2006-10运用Seldinger置管法腹腔引流术治疗20例重症胰腺炎患者,年龄30-68岁,男7例,女13例,体质量偏胖,发病1-2 d,根据病史,体征,血淀粉酶, B超, CT确诊为非胆源性重症急性胰腺炎,住ICU 第1 天时APACHE II 评分>7分。

**1.2 方法** 患者均常规以禁食,胃肠减压,解痉,抗感染,营养、脏器支持治疗,及生长抑素6 mg 24 h持续静脉泵入,通过B超探到腹腔积液并定位引导,床旁腹部常规消毒、铺巾,以2%利多卡因局部麻醉,用美国ARROW生产带侧孔(0.32 英寸)中心静脉导管,先以穿刺针穿刺进入腹腔积液处,穿刺时应注意防止损伤腹腔脏器,再放入导丝到达积液位置,拔出穿刺针,再顺导丝放入导管于积液位置,固定导管接引流袋,引流液做常规检查、细菌培养、药敏、淀粉酶测定。如果多个部位积液可放置多根引流管。根据病情可用生理盐水反复冲洗腹腔并引流。若有脓肿,巨大假性囊肿,经床旁B超定位引导,以同样方法穿刺置管引流,积液做细菌培养、药敏,指导抗生素使用。

## 2 结果

17例患者经常规治疗及腹腔引流术后2-8 d,共引流出淡血性腹腔液100-2000 mL,腹部症状减轻,血尿淀粉酶下降至正常,再转普通病房治疗,最后康复出院。1例患者死亡。2例患者因住院经费问题自动出院。死亡率为5.89%。

## 3 讨论

重症急性胰腺炎时,胰腺和胰周组织广泛充血,水肿,甚至出血,坏死,并在腹腔和腹膜后渗出大量的液体。大量胰酶及有毒物质被腹膜吸收入血后可导致心、脑、肺、肝、肾等器官的损害,引起多器官功能障碍综合征。胰酶的外溢,酶原的被激活,毛细血管通透性增加,组织水肿,腹腔内及腹膜后间隙大量渗出,富含大量炎症介质,肠壁水肿,肠管积液,腹腔高压,引起腹腔室隔综合征<sup>[6]</sup>。所以腹腔减压、坏死组织引流是非常重要的,不仅减轻腹胀,而且减少毒素的吸收,减少炎症介质和细胞因子对机体的损害,从而可有效减轻机体的全身炎症反应<sup>[7]</sup>。但是外科手术进行腹腔减压、坏死组织引流,对机体创伤大,特别是年老体弱患者不

能耐受手术,术后并发症多,死亡率高<sup>[8-10]</sup>。而传统的保守治疗不能起到引流坏死组织及腹腔减压的作用。Seldinger置管腹腔引流法相对弥补了两者的不足,通过B超引导定位进行腹腔减压引流,起到了一定疗效,而且具有创伤小,方法简单的特点,尤其适用于年老体弱患者。近年来,国内外也相继报道了采用超声引导和CT引导经皮引流方法治疗胰腺周围积液或积脓、胰腺假性囊肿<sup>[11]</sup>,具有良好的效果<sup>[12-14]</sup>。所以,重症急性胰腺炎患者早期常规以禁食,胃肠减压,解痉,抑制胰酶分泌,抗感染,营养、脏器支持治疗,通过B超定位,用中心静脉导管以Seldinger置管法放置引流管引流,起到一定引流清除部分坏死组织及腹腔减压的作用,具有创伤小,方法简单灵活,根据病情变化必要时仍可以行外科手术治疗,是介于内科保守治疗和外科手术治疗之间较好的治疗方法,特别是对于年老体弱不能耐受手术的患者更具有实际应用价值<sup>[15-16]</sup>。

## 4 参考文献

- 1 张圣道, 张臣烈, 汤耀卿, 袁祖荣, 杨毓兴, 王建成, 何建蓉. 急性坏死性胰腺炎全病程演变及治疗对策. 中华外科杂志 1997; 35: 156-157
- 2 张圣道. 急性坏死性胰腺炎的外科治疗. 肝胆胰外科杂志 1996; 8: 141-142
- 3 余建新. 重症急性胰腺炎的治疗方式选择. 南华大学学报 2004; 32: 202-203
- 4 许力. 重症急性胰腺炎64例治疗体会. 皖南医学院学报 2006; 25: 274-276
- 5 韩明瑞. 25例重症急性胰腺炎保守治疗探讨. 中国综合临床 2003; 19: 935-936
- 6 吴在德, 吴肇汉, 郑树, 安洪. 外科学. 第6版. 北京: 人民卫生出版社 2004: 60
- 7 梁居雄, 王军, 俞伟, 孙早喜. 暴发性胰腺炎时腹腔室隔综合征的治疗进展. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1203-1205
- 8 徐玲素, 刘芳, 周晓萍. 老年急性胰腺炎62例临床特征分析. 西部医学 2006; 18: 320-321
- 9 沈樑, 梁柳森, 陈熙文. 老年人重症急性胰腺炎的临床特点与治疗探讨. 河北医学 2006; 12: 397-399
- 10 任在跃, 张盛, 刘爱民, 吴涛. 老年人急性胰腺炎23例临床分析. 重庆医学 2006; 35: 842-843
- 11 陈焕伟, 崔伟珍, 王军华, 苏树英, 甄作均. 超声引导经皮引流治疗胰腺假性囊肿. 中国微创外科杂志 2004; 4: 235-236
- 12 陈焕伟, 甄作均, 崔伟珍, 周立新, 苏树英. 非手术治疗暴发性急性胰腺炎1例报告. 中国普通外科杂志 2004; 13: 790
- 13 谢树民, 刘蓓. 腹腔穿刺置管引流治疗老年高龄急性重症胰腺炎3例. 临床医学 2007; 27: 9-10
- 14 张家宾, 陈亚敏. 腹腔穿刺置管引流在重症急性胰腺炎中的应用. 腹部外科 2001; 14: 113
- 15 郑冰生, 纪孝良. 重症急性胰腺炎45例治疗体会. 局解手术学杂志 2007; 16: 107
- 16 潘永传. 非手术与手术治疗重症急性胰腺炎的对比分析. 广东医学院学报 2005; 23: 267-269

编辑 程剑侠 电编 李军亮

**同行评价**  
据本文有较强的临床应用价值和指导意义。

## 螺旋CT诊断老年大肠癌162例

朱东, 刘小方, 梁丕霞, 徐有青

朱东, 刘小方, 梁丕霞, 徐有青, 首都医科大学附属北京天坛医院消化内科 100050

通讯作者: 朱东, 100050, 北京市崇文区天坛西里6号, 首都医科大学附属北京天坛医院消化内科. huangsh@ndrc.gov.com

电话: 010-67096556

收稿日期: 2007-05-31 修回日期: 2007-09-11

### Diagnostic value of spiral CT for detecting colon carcinoma in senile patients: an analysis of 162 cases

Dong Zhu, Xiao-Fang Liu, Pi-Xia Liang, You-Qing Xu

Dong Zhu, Xiao-Fang Liu, Pi-Xia Liang, You-Qing Xu, Department of Gastroenterology, Beijing Tiantan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100050, China

Correspondence to: Dong Zhu, Department of Gastroenterology, Beijing Tiantan Hospital Affiliated to Capital Medical University, 6 Tiantan Xili, Chongwen District, Beijing 100050, China. huangsh@ndrc.gov.com

Received: 2007-05-31 Revised: 2007-09-11

### Abstract

**AIM:** To evaluate the diagnostic value of spiral CT for detecting colon carcinoma in senile patients.

**METHODS:** One hundred and sixty-two senile colon cancer patients were confirmed by operation and histological examination. All of them received spiral CT or colonoscopy examination. The diagnostic value of spiral CT was compared with that of colonoscopy.

**RESULTS:** All patients received spiral CT scan and 75.3% of the patients received colonoscopy examination. A total of 40 patients did not finish the colonoscopy examination; 27 of these (16.67%) were intolerant of colonoscopy examination because of coronary heart disease and hypertension. The accuracy rate of spiral CT in the diagnosis of colon carcinoma was 80.86%, which was significantly higher than that of colonoscopy examination (70.37%,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Spiral CT is a safe, painless and convenient method for detecting colon cancer

and its metastasis. It is more suitable for the diagnosis of colon carcinoma in senile patients.

**Key Words:** Spiral CT; Senile patients; Colon carcinoma

Zhu D, Liu XF, Liang PX, Xu YQ. Diagnostic value of spiral CT for detecting colon carcinoma in senile patients: an analysis of 162 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(27): 2951-2954

### 摘要

目的: 探讨螺旋CT对老年大肠癌的诊断价值。

方法: 分析经外科手术加病理检查证实的162例老年大肠癌患者的螺旋CT扫描图像, 比较螺旋CT检查与结肠镜检查对老年人结肠癌的诊断符合率。

结果: CT检查受检率100%, 电子肠镜受检率75.3%, 40例患者未能完成结肠镜检查, 其中包括冠心病、高血压病27例(16.67%), CT检查对老年大肠癌的诊断检出率为80.86%, 与电子结肠镜(70.37%)比较有显著提高( $P < 0.05$ )。

结论: 螺旋CT检查不仅能发现病变, 还能确定病变侵犯范围及转移情况, 且无痛苦, 对老年患者更安全、方便易行, 可作为老年大肠癌诊断的常规手段。

**关键词:** 螺旋CT; 老年患者; 结肠癌

朱东, 刘小方, 梁丕霞, 徐有青. 螺旋CT诊断老年大肠癌162例. 世界华人消化杂志 2007;15(27):2951-2954

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2951.asp>

### 0 引言

目前大肠癌的诊断仍以结肠镜检查为主, 但由于痛苦大, 并发症多, 使一部分患者特别是老年人不愿意接受或不能耐受大肠镜检查; 既往有腹部和盆腔病变, 会使结肠镜检查操作困难; 另外, 老年人多合并心、脑血管病, 结肠镜检查则存在一定风险。螺旋CT无痛苦, 容易被接受, 适合于老年患者大肠癌的诊断, 但螺旋CT对结肠

### 背景资料

结肠癌是消化道最常见恶性肿瘤之一, 主要诊断方法有结肠气钡双重造影、结肠镜检查及CT检查。结肠气钡双重造影常因肠道内粪块、肠道重叠影响结果, 且不能做活检, 对于早期癌诊断效果不佳; 本文对结肠镜检查与CT检查进行了比较研究, 如前所述, 两者具有互补性, 尤其对于老年人、心肺功能不全者, CT检查更具优势。

**相关报道**  
MSCT具有检查快速、简便、辐射低、组织结构分辨率高、无创的特点,已应用到结肠癌的筛查。

表 1 螺旋CT与结肠镜检查的病变部位和检出率比较 $n(\%)$ 

	乙状结肠	降结肠	横结肠	升结肠	回盲部	合计	检出率
CT	53(40.46)	36(27.48)	21(16.03)	12(9.16)	9(6.87)	131	80.86% <sup>a</sup>
肠镜	42(36.84)	31(27.19)	21(18.42)	12(10.53)	8(7.02)	114	70.37%

<sup>a</sup> $P<0.05$ .

癌的诊断价值仍有待于评价<sup>[1]</sup>。本文总结了我院1998-02/2006-08期间经病理检查证实为结肠癌的老年患者162例,与结肠镜检查结果对比,观察螺旋CT对结肠癌的诊断价值。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 1998-02/2006-08期间经病理检查证实为结肠癌的老年结肠癌患者162例,男95例,女67例,年龄60-84(平均69.7)岁,临床表现有腹痛、腹泻、便血、贫血、腹部包块、排便习惯及大便秘性状改变等。病程1-360 d。

**1.2 方法** 162例患者均进行螺旋CT检查,其中133例进行了CT增强扫描;122例完成结肠镜检查,110例完成手术切除。CT检查扫描前12 h禁食水,检查前20 min口服30 g/L泛影葡胺750 mL。应用东芝XpressGX螺旋CT扫描,层厚10 mm,层距10 mm, pitch为1,对重点区域加3-5 mm薄层扫描,增强扫描应用非离子性造影剂(碘佛醇)80-100 mL,应用高压注射器以2 mL/s速度经肘前iv。扫描条件为120 kV, 160 MAS。扫描范围从膈顶至耻骨联合上。应用Olympus CF240电子肠镜,术前常规清洁肠道准备,应用330 g/L硫酸镁200 mL或200 g/L甘露醇250 mL导泻,有肠梗阻征象患者应用生理盐水灌肠。其中有47例行无痛结肠镜检查,127例进行了生命体征监护。

**统计学处理** CT检查与结肠镜检查的符合率比较应用 $\chi^2$ 检验。

## 2 结果

40例患者未能完成结肠镜检查,合并冠心病、高血压病27例(16.67%),既往有慢性腹部或盆腔疾病而不能耐受检查者9例(5.56%),肠道准备不充分者2例(1.23%),其他原因2例(1.23%)。

**2.1 CT结果** 162例老年患者均进行CT平扫检查,受检率100%,其中133例进行增强扫描,诊断结肠癌131例,检出率为80.86%。乙状结肠53例,降结肠36例,横结肠21例,升结肠12例,回盲部9例(表1)。病变长度3-15(平均5.6) cm,环形或半环形增厚119例,厚约0.6-2.4(平均1.8) cm,密度均

匀,CT值30-50 HU,增强后均匀强化,CT值50-60 HU;分叶状肿块突向肠腔内外116例,肿块大小约1.0-9.5(平均4.3) cm,密度不均匀,CT值20-46 HU,增强后不均匀强化,CT值30-61 HU;局部或广泛僵硬74例;浆膜面毛糙、条索状影116例;肠腔不同程度狭窄102例,肠梗阻征象(病变近端扩张,肠腔积气、积液)76例。与邻近组织器官粘连、侵犯107例,腹腔淋巴结肿大91例,其中76例经手术后病理检查证实为淋巴结转移,CT显示腹腔大血管和肠系膜血管旁及腹膜后淋巴结肿大,其结节影部分相互融合,大小1.0-4.5(平均2.0) cm。腹腔积液39例,远处转移18例(表2)。

**2.2 肠镜结果** 162例老年患者中,有122例完成肠镜检查,受检率75.3%,其中病理检查诊断结肠癌114例,检出率占总人数的70.37%。乙状结肠42例,降结肠31例,横结肠21例,升结肠12例,回盲部8例(表1)。69例患者(56.56%)完成病变长度描述,3-10(平均4.6) cm。7例早期癌(6.14%)表现为隆起型和浅表隆起形。107例进展期癌(93.86%),其中隆起型59例(55.14%),溃疡型39例(36.45%),浸润型5例(4.67%),胶样型4例(3.74%)。

## 3 讨论

老年人大肠癌发病率高,其早期无特异性表现,就诊时多为中晚期癌,故对老年人大肠癌的诊断应特别重视。目前对于大肠癌的诊断主要是以结肠镜检查为主,他是结肠癌诊断首选方法<sup>[2-3]</sup>。但由于个体差异,如年龄、体质、合并其他疾病,以及既往有腹部或盆腔病变手术史等,使得一部分老年人不能耐受结肠镜检查,甚至不能到达回盲部;Mcfarland和Fenlon *et al*报道10%-35%的结肠镜检查达不到盲肠<sup>[4-6]</sup>。特别是老年人心肺功能差,多存在慢性疾病,使内镜操作存在较大风险。本文通过对162例老年结肠癌的CT扫描与结肠镜检查结果进行比较,对CT诊断老年大肠癌的价值进行了探讨。

本文162例老年结肠癌CT扫描受检率100%,

诊断检出率80.86%; 结肠镜受检率75.3%, 检出率70.37%, 二者比较( $P<0.05$ )有显著性差异。本文认为, 虽然结肠镜检查是诊断结肠癌最主要的方法, 但在老年人这一特定人群中, 存在很多不利因素, 如心肺功能不全、各种原因所致操作困难等, 使该检查有明显局限性。研究表明, 螺旋CT对老年患者大肠癌诊断的检出率优于结肠镜检查, 同时他又不受上述不利因素影响, 安全、无痛苦, 易于操作。结肠镜检查虽然能够直观描述病变, 能获得明确病理结果, 但他对于肿瘤突破浆膜向外直接侵犯情况以及淋巴结、肝脏等转移情况均不能很好显示。而CT检查能够发现和显示病变的部位、大小和形态, 有学者报道CT显示肿瘤部位的准确率为100%<sup>[7-8]</sup>, 增强扫描时变换不同体位可以消除因肠道清洁不佳所致误诊和漏诊<sup>[9-10]</sup>, 并且能够显示病变的外侵范围和转移情况, 有助于肿瘤分期、确定临床治疗方案、判断预后, 在老年结肠癌诊断中具有重要意义。

本研究认为螺旋CT具有以下优点: (1)诊断部位明确, 与内镜比较无显著性差异; (2)可以准确描述病变肠管长度。有学者认为与结肠癌病灶相邻肠段可因黏膜下水肿, 炎症等出现肠壁增厚<sup>[11]</sup>, 而按传统CT诊断标准, 肠壁增厚的肠段即为癌组织所在部位<sup>[12]</sup>。本文根据肠壁厚度, 测得病变长度平均5.6 cm, 手术证实病变长度与之相同。而结肠镜观察病变长度平均仅为4.6 cm, 表明CT在描述结肠癌病变长度方面优于内镜; (3)可以准确描述肠壁的浸润深度。富含血管的肿瘤, 其内部血管横断面面积增大, 可导致血管内阻力下降, 血流灌注增加<sup>[13]</sup>, 因此肿瘤组织早期强化程度高, 增强后更易鉴别癌组织的浸润。正常结肠壁厚度一般不超过0.5 cm, 超过0.5 cm为可疑, 超过1.0 cm则可确定异常<sup>[14]</sup>。本研究发现: 病变肠壁环形或半环形增厚占73.46%, 平均厚度1.8 cm, 突向肠腔内外肿块占71.60%, 增强扫描后肿块密度不均匀, 边界不清呈毛刺状, 这对病变的判断具有重要意义; (4)螺旋CT所见浆膜面毛糙影占71.6%, 病变与邻近组织器官粘连占66.05%, 经CT增强扫描其强化程度与原发灶相同或相近, CT值相差5 HU以内, 据此判断癌组织局部外侵具有重要意义; (5)螺旋CT诊断淋巴结转移的敏感性和特异性有显著提高。有学者认为CT对淋巴结转移的敏感性很低可能与使用的标准有关<sup>[15]</sup>, 通常认为CT测得淋巴结短径超过0.6 cm为增大<sup>[16]</sup>, 而本

表 2 CT检查结肠癌肠壁浸润及转移情况

CT表现	n(%)
肠壁环形或半环形增厚	119(73.46)
分叶状肿块	116(71.60)
浆膜面毛糙条索影	116(71.60)
肠壁僵硬	74(45.68)
肠腔狭窄	102(62.96)
肠梗阻征象	76(46.91)
与邻近组织器官粘连	107(66.05)
淋巴结肿大	91(56.17)
腹腔积液	39(24.07)
远处转移	18(11.11)

文淋巴结转移检出率为62.96%, 据此认为多层螺旋CT对老年结肠癌患者淋巴结转移的敏感性和特异性有显著提高, 并可避免普通CT检查时肠道运动伪影对淋巴结显示的影响, 提高了检出率。

总之, 本文总结了162例老年结肠癌的螺旋CT检查结果, 并与结肠镜检查比较, 认为螺旋CT对结肠癌的检出率高。其中, 肠壁增厚, 增强扫描后密度呈不均匀肿块影, 肠管周围浸润, 淋巴结及远处转移可作为结肠癌特征性的CT表现; 肠壁僵硬、肠腔狭窄、肠梗阻及腹水可作为结肠癌诊断的间接征象, 对确定诊断有较大参考价值。同时, CT检查安全、方便、无痛苦, 这些优点使得螺旋CT检查更适合对老年人结肠癌的诊断。

#### 4 参考文献

- 王茜, 马祥兴, 张晓明. 螺旋CT仿真结肠内镜的临床应用研究. 中国医学影像技术 2002; 18: 328-330
- 叶任高, 陆再英. 内科学. 第5版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 435-439
- 陈灏珠. 实用内科学. 第12版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1810-1818
- Fenlon HM, Ferrucci JT. Virtual colonoscopy: what will the issues be? *AJR Am J Roentgenol* 1997; 169: 453-458
- 郑芝田, 林三仁. 胃肠病学. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 857-870
- McFarland EG, Brink JA. Helical CT colonography (virtual colonoscopy): the challenge that exists between advancing technology and generalizability. *AJR Am J Roentgenol* 1999; 173: 549-559
- 杜渭清, 宦怡, 张劲松, 黄海东. 螺旋CT诊断结肠癌30例. 世界华人消化杂志 1999; 7: 1009-1010
- 杨亚英, 包颜明, 王筱莉, 杨俊涛, 吴岩. 结肠癌的诊断及CT表现. 实用放射学杂志 1999; 15: 211-213
- Yee J, Kumar NN, Hung RK, Akerkar GA, Kumar PR, Wall SD. Comparison of supine and prone scanning separately and in combination at CT colonography. *Radiology* 2003; 226: 653-661
- Morrin MM, Farrell RJ, Kruskal JB, Reynolds K,

#### 应用要点

CT及其后处理技术的发展, 使得CT仿真结肠镜(CTVC)技术得以实现, 他同时具有MSCT高分辨二维轴位图象及模拟真实内窥镜像的三维虚拟肠腔图象。随着磁共振结肠成像(MRC)技术和后续3DMRC技术的发展, 并且不断更新和完善, 临床将会获得更加理想的结肠癌检查方法。



同行评价  
本文探讨了螺旋CT对老年人患者大肠癌的诊断价值, 研究目的明确, 样本量大, 实验设计合理可靠, 统计学处理方法使用恰当, 得出的结论较可靠, 有一定的实用价值。

- McGee JB, Raptopoulos V. Utility of intravenously administered contrast material at CT colonography. *Radiology* 2000; 217: 765-771
- 11 Jang HJ, Lim HK, Park CK, Kim SH, Park JM, Choi YL. Segmental wall thickening in the colonic loop distal to colonic carcinoma at CT: importance and histopathologic correlation. *Radiology* 2000; 216: 712-717
- 12 Harvey CJ, Amin Z, Hare CM, Gillams AR, Novelli MR, Boulos PB, Lees WR. Helical CT pneumocolon to assess colonic tumors: radiologic-pathologic correlation. *AJR Am J Roentgenol* 1998; 170: 1439-1443
- 13 Delorme S, Knopp MV. Non-invasive vascular imaging: assessing tumour vascularity. *Eur Radiol* 1998; 8: 517-527
- 14 曹丹庆, 蔡祖龙. 全身CT诊断学. 北京: 人民军医出版社, 1996: 515-516
- 15 周述岭, 王中秋, 李苏建. 34例盲、升结肠癌的CT分期. *实用放射学杂志* 2001; 17: 197-199
- 16 Einstein DM, Singer AA, Chilcote WA, Desai RK. Abdominal lymphadenopathy: spectrum of CT findings. *Radiographics* 1991; 11: 457-472

编辑 何燕 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

## 2007 年国家继续学习教育项目 “ 小肠疾病诊治进展及双气囊小肠镜临床应用 ” 讲习班通知

本刊讯 经国家继续医学教育委员会批准, 由南昌大学医学院第三附属医院(南昌市第一医院)主办、《世界华人消化杂志》协办的2007年国家继续医学教育项目“小肠疾病诊治进展及双气囊小肠镜临床应用”学习班[项目编号: 2007-03-03-045(国)]定于2007-11-14/17在英雄城南昌举办。

### 1 授课内容

本讲习班采取理论讲授与操作演示相结合的方式进行, 届时将邀请全国著名消化专家、上海交通大学附属瑞金医院消化科主任、博士生导师吴云林教授与会授课, 青年专家、国内双气囊小肠镜技术第一人钟捷教授进行操作演示, 并请江西省消化学会主任委员、南昌大学一附院副院长吕农华教授作专题演讲。讲习班重点介绍小肠疾病诊治的历史、现状及最新进展, 传授双气囊电子小肠镜操作技术及诊治知识。学员可亲身体验双气囊电子小肠镜操作技巧, 接受专家手把手教导。学习结束将授予国家I类继续教育学分8分。

### 2 联系方式

叶华曦, 330008, 江西省南昌市象山北路128号南昌市第一医院消化内科; 付峻林, 330008, 南昌大学第三附属医院消化内科; 电话: 0791-8862387 8862213/13576061294(付峻林); E-mail: fusuolin@163.com.

### 3 收费标准

讲习班会务费、资料费共计400元, 住宿费80-100元/天, 交通费自理。报到日期: 2007-11-14



# 单纯性肥胖者进餐前后自主神经功能的变化特征

常丽丽, 姚树坤, 任锡玲, 高富贵, 周晓娜, 张淑梅, 刘润

常丽丽, 周晓娜, 张淑梅, 刘润, 石家庄市第一医院消化内科  
河北省石家庄市 050011

姚树坤, 卫生部中日友好医院 北京市 100029

任锡玲, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省石家庄市  
050051

高富贵, 河北省卫生厅卫生监督局 河北省石家庄市 050071

河北省科学技术厅2006河北省科学技术研究与发展指导计  
划资助项目, No. 062761896.

通讯作者: 高富贵, 050071, 河北省石家庄市, 河北省卫生厅卫  
生监督局. guifugao@163.com

收稿日期: 2007-06-14 修回日期: 2007-09-17

## Characteristics of autonomic nervous activity before and after meals in subjects with obesity

Li-Li Chang, Shu-Kun Yao, Xi-Ling Ren, Fu-Gui Gao,  
Xiao-Na Zhou, Shu-Mei Zhang, Run Liu

Li-Li Chang, Xiao-Na Zhou, Shu-Mei Zhang, Run Liu,  
Department of Gastroenterology, the First Hospital of Shiji-  
azhuang City, Shijiazhuang 050011, Hebei Province, China  
Shu-Kun Yao, Hygiene Administration China-Japan  
Friendship Hospital, Beijing 100029, China

Xi-Ling Ren, Department of Gastroenterology, the Sec-  
ond Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang  
050051, Hebei Province, China

Fu-Gui Gao, Hebei Province Hygiene Hall Sanitary Super-  
vision Bureau, Shijiazhuang 050071, Hebei Province, China  
Supported by: Hebei Province Science and Technology  
Hall 2006 Development and Guide Plan, No. 062761896

Correspondence to: Fu-Gui Gao, Hebei Province Hygiene  
Hall Sanitary Supervision Bureau, Shijiazhuang 050071,  
Hebei Province, China. guifugao@163.com

Received: 2007-06-14 Revised: 2007-09-17

## Abstract

**AIM:** To observe the characteristics of autonomic nervous activity before and after meals in individuals with obesity, and to discuss the relationship between autonomic nervous activity and gastric motility.

**METHODS:** One hundred and two subjects with obesity and 49 controls were studied with 24-hours dynamic electrocardiography, and the electrocardiograms were recorded 1 hour before and after meals. Heart rate variability was analyzed.

**RESULTS:** Before a meal, SDNN index, RMSSD,

high frequency power (HF) and ultra-low frequency power (ULF) in subjects with obesity were higher than those in control subjects ( $87.31 \pm 15.64$  ms,  $82.50 \pm 67.19$  ms,  $31\ 168.60 \pm 6361.00$  ms<sup>2</sup>,  $22\ 814.17 \pm 4083.90$  ms<sup>2</sup> vs  $79.38 \pm 12.28$  ms,  $56.04 \pm 10.15$  ms,  $12\ 999.4 \pm 5995.00$  ms<sup>2</sup>,  $16\ 595.75 \pm 5615.09$  ms<sup>2</sup>,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and L/H was lower in subjects with obesity than in the controls ( $0.65 \pm 0.43$  vs  $0.99 \pm 0.42$ ,  $P < 0.01$ ). After a meal, RMSSD and HF were higher in subjects with obesity than in the controls ( $87.90 \pm 57.21$  ms,  $36\ 158.56 \pm 6361.00$  ms<sup>2</sup> vs  $39.25 \pm 11.15$  ms,  $6570.50 \pm 5995.80$  ms<sup>2</sup>,  $P < 0.01$ ). SDNNindex, ULF and low-frequency power (LF)/HF were lower in the subjects with obesity than in the controls ( $79.59 \pm 32.54$  ms,  $14\ 135.7 \pm 8083.90$  ms<sup>2</sup>,  $0.63 \pm 0.34$  vs  $141.67 \pm 10.28$  ms,  $22\ 785.63 \pm 9615.20$  ms<sup>2</sup>,  $1.11 \pm 0.32$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with before meals, SDNNindex, ULF and LF/HF after meals increased significantly in the controls ( $P < 0.01$ ), and RMSSD and HF decreased markedly ( $P < 0.01$ ). In subjects with obesity, after meals, SDNNindex and ULF decreased, and RMSSD and HF increased significantly ( $P < 0.01$ ); LF/HF did not differ between before and after meals ( $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** In fasting and post-prandial states, people with obesity have abnormal autonomic nervous activity. This may be one mechanism of hypermotility in obesity.

**Key Words:** Obesity; Autonomic nervous activity; Heart rate variability; Electrocardiography

Chang LL, Yao SK, Ren XL, Gao FG, Zhou XN, Zhang SM, Liu R. Characteristics of autonomic nervous activity before and after meals in subjects with obesity. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(27): 2955-2957

## 摘要

**目的:** 观察单纯性肥胖者进餐前后自主神经活动特征, 探讨其与肥胖者胃动力异常的关系。

**方法:** 采用十二导联动态心电图记录仪, 记录102例单纯性肥胖者和49例正常体重健康志愿者, 餐前和餐后1 h心电图信号, 进行心率变异分析。

**背景资料**  
肥胖的患病率不断升高, 已成为当前最广泛的严重威胁人类健康的疾病之一。其发病机制的研究及防治工作已经受到高度重视。胃动力异常在肥胖形成中可能起重要作用, 而胃动力由神经、体液和肌电活动调控。交感神经抑制胃运动, 迷走神经促进胃运动。肥胖者可能存在自主神经功能异常。

### 应用要点

本文观察了肥胖者餐前和餐后自主神经功能变化特征,探讨了肥胖者自主神经功能变化与胃动力的关系,为开发药物、针灸治疗肥胖提供科学依据。

结果:餐前肥胖组RR间期标准差的平均值(SDNNindex)和RR间期差值的均方根(RMSSD)、高频功率(HF)、超低频功率(ULF)显著高于对照组( $87.31 \pm 15.64$  ms,  $82.50 \pm 67.19$  ms,  $31\ 168.60 \pm 6361.00$  ms<sup>2</sup>,  $22\ 814.17 \pm 4083.90$  ms<sup>2</sup> vs  $79.38 \pm 12.28$  ms,  $56.04 \pm 10.15$  ms,  $12\ 999.4 \pm 5995.00$  ms<sup>2</sup>,  $16\ 595.75 \pm 5615.09$  ms<sup>2</sup>,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), L/H显著低于对照组( $0.65 \pm 0.43$  vs  $0.99 \pm 0.42$ ,  $P < 0.01$ );餐后肥胖组RMSSD, HF显著高于对照组( $87.90 \pm 57.21$  ms,  $36\ 158.56 \pm 6361.00$  ms<sup>2</sup> vs  $39.25 \pm 11.15$  ms,  $6570.50 \pm 5995.80$  ms<sup>2</sup>,  $P < 0.01$ ), SDNNindex, ULF, LF/HF显著低于对照组( $79.59 \pm 32.54$  ms,  $14135.7 \pm 8083.90$  ms<sup>2</sup>,  $0.63 \pm 0.34$  vs  $141.67 \pm 10.28$  ms,  $22\ 785.63 \pm 9615.20$  ms<sup>2</sup>,  $1.11 \pm 0.32$ ,  $P < 0.01$ );对照组餐后SDNNindex, ULF较餐前升高, RMSSD, HF较餐前降低, LF/HF餐后较餐前升高;肥胖组SDNNindex, ULF较餐前降低, RMSSD, HF较餐前升高; LF/HF餐后和餐前无差异( $P > 0.05$ )。

结论:单纯性肥胖者餐前餐后均存在自主神经活动异常,自主神经活动异常可能是导致肥胖者胃动力亢进的主要原因之一。

关键词:单纯性肥胖;自主神经;心率变异;心电图记录仪

常丽丽,姚树坤,任锡玲,高富贵,周晓娜,张淑梅,刘润.单纯性肥胖者进餐前后自主神经功能的变化特征.世界华人消化杂志2007;15(27):2955-2957

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2955.asp>

## 0 引言

目前全球超过10亿的成人和10%的儿童属于超重和肥胖。每年与肥胖相关的死亡人数在11.2-28万之间。肥胖问题已成为亟需解决的严重影响人类健康的重大医学问题和社会问题。肥胖与胃排空过速或胃动力亢进有关<sup>[1-2]</sup>。而胃运动受自主神经调控,且自主神经对食物摄入、产热、能量消耗有双向调节作用。本研究观察了单纯性肥胖者进餐前后1 h自主神经活动变化特征,探讨了其与肥胖者胃动力的关系。

## 1 材料和方法

1.1 材料 单纯性肥胖者(体质指数BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>)102例,男53例,女49例,平均年龄( $27.8 \pm 8.4$ )岁, BMI为( $32.2 \pm 1.6$ ) kg/m<sup>2</sup>为肥胖组。正常体质量(BMI 18-24.9 kg/m<sup>2</sup>)健康志愿者49例为对照组,男25例,女24例,平均年龄( $25.6 \pm 8.2$ )

岁, BMI为( $22.3 \pm 2.6$ ) kg/m<sup>2</sup>。所有受试对象年龄 $\geq 18$ 岁,没有胃肠道疾病史,没有消化道手术史,无高血压及冠心病,哮喘、呼吸暂停综合征,无吸烟及饮酒史。受试者未曾应用任何药物。排除(1)继发于神经-内分泌-代谢紊乱基础上的多种疾病中伴肥胖症:下丘脑病;垂体病;胰岛疾病;甲状腺功能减退症;肾上腺皮质功能亢进症;性腺功能低下症;其他:水钠贮留性肥胖症等,除外糖尿病胃轻瘫,除外功能性消化不良。(2)女性受试者在妊娠期、哺乳期。

1.2 方法 禁食12 h,采用美国PI(Preideal Instruments)公司生产的十二导联动态心电图记录仪,记录受试者餐前静息状态心电信号1 h,进餐(康师傅方便面127 g:碳水化合物88 g,脂肪25 g,蛋白质14 g,总热量633 kcal)后静卧,再记录心电信号1 h,观察下列指标:(1)时域指标:每5 min正常R-R间期的标准差(SDNN,单位ms)、平均值(SDNNindex,单位ms)、差值的均方根(RMSSD,单位ms)。(2)频域指标:高频功率(HF,单位ms<sup>2</sup>)、超低频功率(ULF,单位ms<sup>2</sup>)、低频功率(LF,单位ms<sup>2</sup>)、低频功率/高频功率比值(LF/HF)。

统计学处理 计量资料数据以mean  $\pm$  SD表示,采用STATA 8.0软件,两个样本均数间比较采用 $t$ 检验,方差不齐采用 $t'$ 检验。

## 2 结果

2.1 餐前和餐后心率变异参数比较 餐前肥胖组SDNN, SDNNindex, RMSSD, ULF, LF, HF显著高于对照组, LF/HF肥胖组显著低于对照组;餐后肥胖组SDNN, RMSSD, LF, HF显著高于对照组, SDNN index, ULF显著低于对照组, LF/HF肥胖组显著低于对照组(表1)。

2.2 餐后与餐前HRV参数变化规律 正常体质量组SDNNindex, ULF餐后较餐前显著增高, SDNN, RMSSD, LF, HF餐后较餐前显著降低, LF/HF餐后较餐前显著增高;肥胖组SDNN, SDNNindex, ULF餐后较餐前显著降低, RMSSD, LF, HF餐后较餐前显著增高,餐后与餐前LF/HF无显著差异,  $P > 0.05$ 。

## 3 讨论

WHO公布BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>即为肥胖<sup>[3]</sup>,胃动力亢进或胃排空加快在肥胖形成中可能起重要作用。胃肠动力受自主神经影响。交感神经兴奋抑制胃肠蠕动,迷走神经兴奋促进胃肠蠕动。心率变异系统能够反映患者的自主神经活动情况<sup>[4-7]</sup>。SDNNindex, ULF反映交感神经活性, RMSSD,

表 1 肥胖组与对照组餐前餐后HRV参数比较(mean ± SD)

参数	对照组(n = 49)	肥胖组(n = 102)
<b>餐前</b>		
SDNN	112.38 ± 22.61	133.71 ± 46.75 <sup>a</sup>
SDNNindex	79.38 ± 12.28	87.31 ± 15.64 <sup>a</sup>
RMSSD	56.04 ± 10.15	82.50 ± 67.19 <sup>b</sup>
ULF	16 595.75 ± 5615.09	22 814.17 ± 4083.90 <sup>b</sup>
LF	12 915.88 ± 54.70	20 286.80 ± 6717.30 <sup>b</sup>
HF	12 999.4 ± 5995.00	31 168.60 ± 6361.00 <sup>b</sup>
L/H	0.99 ± 0.42	0.65 ± 0.43 <sup>b</sup>
<b>餐后</b>		
SDNN	82.75 ± 20.86	100.11 ± 45.75 <sup>a</sup>
SDNNindex	141.67 ± 10.28	79.59 ± 32.54 <sup>b</sup>
RMSSD	39.25 ± 11.15	87.90 ± 57.21 <sup>b</sup>
ULF	22 785.63 ± 9615.20	14 135.7 ± 8083.90 <sup>b</sup>
LF	7332.75 ± 5454.70	22 868.3 ± 6717.30 <sup>b</sup>
HF	6570.50 ± 5995.80	36 158.56 ± 6361.00 <sup>b</sup>
L/H	1.11 ± 0.32	0.63 ± 0.34 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 对照组.

HF反映迷走神经活性, SDNN, LF反映迷走和交感的综合效应; L/H反映迷走和交感神经的平衡功能. 国内外有关肥胖者自主神经功能活动与胃动力相关性的研究极少, 有文献报道肥胖者与非肥胖者相比, 存在交感神经活性减弱<sup>[8-10]</sup>, 迷走神经活性增强<sup>[11]</sup>. 也有相反报道肥胖者存在交感神经活性增强, 迷走神经活性减弱<sup>[12-17]</sup>. 考虑这些矛盾报道与肥胖者病例入选标准不一有关, 如肥胖者是否为青少年或儿童; 处于肥胖发展期还是静止期, 是否伴有功能性消化不良, 是否伴发高血压、糖尿病、心脑血管疾病、呼吸暂停综合征以及是否有饮酒或吸烟嗜好等<sup>[5,7]</sup>.

本研究入选标准剔除上述人群, 结果发现餐前1 h肥胖组SDNN, SDNNindex, RMSSD, ULF, LF, HF显著高于对照组, LF/HF肥胖组显著低于对照组, 说明空腹状态肥胖组迷走神经功能和交感神经功能均较正常体质者活跃, 但以迷走神经功能变化更明显. 餐后1 h肥胖组SDNN, RMSSD, LF, HF显著高于对照组, SDNNindex, ULF, LF/HF肥胖组显著低于对照组, 说明餐后肥胖组迷走神经功能较正常体质者亢进, 交感神经功能减弱, 导致肥胖者进食量增大, 胃排空加快, 胃动力亢进, 产热减少, 能量消耗减少, 脂肪堆积.

正常体质者SDNNindex, ULF餐后较餐前显著增高, RMSSD, LF, HF餐后较餐前显著降低, LF/HF餐后较餐前增高, P<0.01; 肥胖组SDNNindex, ULF餐后较餐前显著降低, RMSSD, LF, HF餐后较餐前增高, 餐后与餐前LF/HF无显

著差异, P>0.05. 进餐后, 正常体质者交感神经活性增加, 迷走神经活性降低; 而肥胖者这种节律发生紊乱, 交感神经活性降低, 迷走神经活性增强, 提示自主神经功能紊乱可能是导致肥胖者食欲增强, 胃动力亢进的重要因素.

肥胖形成非单一因素所致, 自主神经功能异常可能仅是肥胖形成的其中一个环节, 亦有可能是肥胖导致交感和迷走神经活动异常. 二者的确切关系有待进一步研究探讨.

## 4 参考文献

- Lee JS. Obesity and gastrointestinal motility. *Korean J Gastroenterol* 2006; 48: 89-96
- Wisen O, Hellstrom PM. Gastrointestinal motility in obesity. *J Intern Med* 1995; 237: 411-418
- 叶任高, 路再英. 内科学. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 834
- Liatis S, Tentolouris N, Katsilambros N. Cardiac autonomic nervous system activity in obesity. *Pediatr Endocrinol Rev* 2004; 1 Suppl 3: 476-483
- 陈志云, 袁华萍, 麻新梅, 马利. 动态心电图心率变异性的临床应用价值. *中国病案* 2004; 5: 46-47
- 朱宗耀, 潘祖英, 陈勇. 肠易激综合征与心率变异性的关系. *临床荟萃* 2004; 19: 545-546
- 吴金彦, 王国付, 钦光跃. 睡眠呼吸暂停/低通气综合征患者心率变异的临床观察. *心脑血管病防治* 2004; 4: 36-38
- 王国祥, 李长宏. 内脏脂肪型肥胖症与运动疗法. *中国临床康复* 2004; 8: 7524-7525
- 朱晓松, 劭黎. 交感神经系统在控制肥胖中有重要作用. *生理科学进展* 2002; 33: 369
- Matsumoto T, Miyawaki T, Ue H, Kanda T, Zenji C, Moritani T. Autonomic responsiveness to acute cold exposure in obese and non-obese young women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999; 23: 793-800
- 王晓燕, 李敬苗. 针刺对单纯性肥胖症患者体表胃电图影响的研究. *中国美容医学* 2006; 15: 570-572
- Tentolouris N, Tsigos C, Perea D, Koukou E, Kyriaki D, Kitsou E, Daskas S, Daifotis Z, Makrilakis K, Raptis SA, Katsilambros N. Differential effects of high-fat and high-carbohydrate isoenergetic meals on cardiac autonomic nervous system activity in lean and obese women. *Metabolism* 2003; 52: 1426-1432
- Facchini M, Malfatto G, Sala L, Silvestri G, Fontana P, LaFortuna C, Sartorio A. Changes of autonomic cardiac profile after a 3-week integrated body weight reduction program in severely obese patients. *J Endocrinol Invest* 2003; 26: 138-142
- Rabbia F, Silke B, Conterno A, Grosso T, De Vito B, Rabbone I, Chiandussi L, Veglio F. Assessment of cardiac autonomic modulation during adolescent obesity. *Obes Res* 2003; 11: 541-548
- Zahorska-Markiewicz B, Kuagowska E, Kucio C, Klin M. Heart rate variability in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1993; 17: 21-23
- Friederich HC, Schild S, Schellberg D, Quenter A, Bode C, Herzog W, Zipfel S. Cardiac parasympathetic regulation in obese women with binge eating disorder. *Int J Obes (Lond)* 2006; 30: 534-542
- Martini G, Riva P, Rabbia F, Molini V, Ferrero GB, Cerutti F, Carra R, Veglio F. Heart rate variability in childhood obesity. *Clin Auton Res* 2001; 11: 87-91

## 名词解释

单纯性肥胖症: 是指没有发生明显的神经系统、内分泌系统疾病, 而是机体摄入的热量超过了消耗的能量, 造成体内脂肪堆积过多, 体质量增加或脂肪分布异常的一种常见的代谢性疾病.

## 同行评价

本文探讨了单纯性肥胖者进餐前后自主神经活动与肥胖者胃动力异常的关系, 立题新颖, 分析合理, 有相当的学术价值和可读性.

编辑 程剑侠 电编 马文华