

免疫因素在肝纤维化过程中的作用的研究进展

宗 蕾, 陆伦根

宗蕾, 陆伦根, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化内科, 上海市消化疾病研究所 上海市 200001
陆伦根, 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事消化疾病的基础和临床研究工作。

上海市重点学科建设项目, No. Y0205

上海市科学技术委员会基金资助项目, No. 054009618

通讯作者: 陆伦根, 上海市, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化内科. lungenlu1965@yahoo.com

电话: 021-63364118 传真: 021-63112874

收稿日期: 2006-11-16 接受日期: 2006-12-04

of immunosuppressive drugs.

Key Words: Hepatic fibrosis; Immunity; Immune cell; Cytokine; Growth factor

Zong L, Lu LG. Research progress on roles of immune factors in development of hepatic fibrosis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(3):205-210

■背景资料

肝纤维化的形成及进展涉及多种内在及外在因素, 免疫因素在这一过程中起了重要作用。

Research progress on roles of immune factors in development of hepatic fibrosis

Lei Zong, Lun-Gen Lu

Lei Zong, Lun-Gen Lu, Department of Gastroenterology, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; Shanghai Institute of Digestive Disease, Shanghai 200001, China

Supported by the Fund for the Key Subject Construction Program of Shanghai Municipality, No. Y0205 and the Science and Technology Committee Foundation of Shanghai Municipality, No. 054009618

Correspondence to: Lun-Gen Lu, Department of Gastroenterology, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; Shanghai Institute of Digestive Disease, Shanghai 200001, China. lungenlu1965@yahoo.com

Received: 2006-11-16 Accepted: 2006-12-04

摘要

肝纤维化是肝脏对各种原因所致肝损伤的创伤愈合反应, 是组织发生修复反应时细胞外基质(ECM)合成、降解与沉积不平衡而引起的病理过程。肝纤维化的形成涉及多种细胞、细胞因子及ECM的变化。其中肝星状细胞(HSCs)激活并转化为肌成纤维细胞是肝纤维化发生、发展的核心环节, 各种致肝纤维化因素均把HSCs作为最终靶细胞, 促使其转化为肌成纤维细胞而导致肝纤维化的发生。影响肝纤维化形成的因素很多, 至今尚未完全阐明。临床资料表明, 免疫抑制对肝纤维化的进程起明显的促进作用, 在HCV和HIV联合感染或肝移植需长期应用免疫抑制药物的患者, 肝纤维化进程加快。本文就免疫因素在肝纤维化形成过程中的作用的研究进展作一综述。

关键词: 肝纤维化; 免疫因素; 免疫细胞; 细胞因子; 生长因子

宗蕾, 陆伦根. 免疫因素在肝纤维化过程中的作用的研究进展. 世界华人消化杂志 2007;15(3):205-210

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/205.asp>

Abstract

Hepatic fibrosis is a wound-healing process responsive to a variety of factors, and it is also a pathological change caused by the imbalance of synthesis, degradation and deposition of extracellular matrix (ECM) during tissue repair. The changes of many cells, cytokines and ECM are involved in the formation of liver fibrosis, during which the activation of hepatic stellate cells (HSCs) as well as their transforming into myofibroblasts is the central step. Various agents take HSCs as the final target cells and stimulate them to transform into myofibroblasts. Many factors affect the formation of hepatic cirrhosis, but not every one is illuminated completely. Immune suppression accelerates the process according to clinical data. The process speeds up in patients with co-infection of hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV) and liver transplantation that needs long-term treatment

0 引言

肝纤维化是肝脏对各种原因所致肝损伤的创伤愈合反应, 是组织发生修复反应时细胞外基质(ECM)合成、降解与沉积不平衡而引起的病理过程。肝纤维化的形成涉及多种细胞、细胞因子及ECM的变化。其中肝星状细胞(HSCs)激活并转化为肌成纤维细胞是肝纤维化发生、发展的核心环节, 各种致肝纤维化因素均把HSCs作为最终靶细胞, 促使其转化为肌成纤维细胞而导致肝纤维化的发生。影响肝纤维化形成的因

■应用要点

本文就免疫因素在肝纤维化形成过程中的研究进展作一综述,但这些免疫因素尚未完全阐明,而进一步阐明这些问题,将为我们提供各种阻断肝纤维化形成和发展的方法及依据,从而有助于临床上对这类疾病进行合理有效的治疗。

素很多,至今尚未完全阐明。临床资料表明,免疫抑制对肝纤维化的进程起明显的促进作用,在HCV和HIV联合感染或肝移植需长期应用免疫抑制药物的患者,肝纤维化进程加快^[1-2]。

正常肝脏有密集多样的免疫细胞,平均含有大约10亿个,主要包括固有免疫细胞(库普弗细胞、NK细胞、NKT细胞)和获得性免疫细胞(T细胞和B细胞)等。其中淋巴细胞包括经典的T淋巴细胞、B淋巴细胞、NK细胞、NKT细胞等。NK细胞占肝内淋巴细胞的31%,B细胞占6%。T细胞占肝内淋巴细胞的63%,大多数可被激活,历经细胞周期并最终凋亡^[3]。另外,肝实质细胞也可产生多种细胞因子及补体成分,如C3、C6、C9及C1酯酶抑制剂等,启动并调节各种免疫反应。在肝纤维化形成过程中,多种免疫细胞及细胞因子发生了紊乱。

1 免疫细胞在肝纤维化形成中的作用

1.1 库普弗细胞 库普弗细胞是肝脏中的巨噬细胞,当肝脏受到各种损伤刺激后,库普弗细胞被激活,通过释放活性氧物质(ROS)和细胞因子参与炎症反应,并可激活HSCs^[4]。库普弗细胞是肝脏中TNF- α 的主要来源^[5],此外还能产生转化生长因子- β (TGF- β)及血小板源性生长因子(PDGF)。在HSCs的活化过程中,TGF- β 及PDGF是两个最重要的细胞因子。Imamura *et al*^[6]研究发现,抑制巨噬细胞的浸润,可抑制HSCs的激活,从而抑制肝纤维化的形成。Duffield *et al*^[7]研究发现,在肝损伤过程中,巨噬细胞存在两种功能类型:在损伤早期,损伤相关性巨噬细胞促进肌成纤维细胞的增生和凋亡,总起来说,使肌成纤维细胞数目增多,促进纤维增生和基质沉积;相反,在肝损伤恢复阶段,巨噬细胞促进肌成纤维细胞的凋亡,并促进基质降解。

1.2 NK细胞 NK细胞是固有免疫系统中的细胞毒细胞,其细胞膜上有识别主要组织相容性复合体-I(MHC-I)的抑制性受体及包括NKG2D(NK细胞膜上的活化型受体)在内的刺激性受体^[3]。NK细胞在招募T细胞上起关键作用,可促进T细胞的免疫应答^[8]。Radaeva *et al*^[9]研究发现:(1)NK细胞是肝纤维化发展中杀灭激活的HSCs的主要细胞,因此能改善肝纤维化;(2)NK细胞对激活的HSCs的细胞毒作用依赖于NKG2D/RAE1和TRAIL(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)的作用;(3)IFN- γ 和TLR3(toll-like receptor3)配体polyI:

C(polyinosinic-polycytidylic acid)可通过加强NK细胞对激活的HSCs的细胞毒作用抑制肝纤维化的发展。其证据有:(1)NK细胞的细胞毒作用是由其细胞膜上的刺激性受体和抑制性受体之间的平衡决定的,NKG2D是NK细胞上的刺激性受体,其配体是Rae1^[3,10-13],用NKG2D中和性抗体处理可消除NK细胞诱导的激活的HSCs的凋亡,说明Rae1和NKG2D之间的相互作用参与了NK细胞对激活的HSCs的细胞毒作用^[9];(2)用polyI:C处理可增加肝NK细胞TRAIL的表达,用中和性抗体阻断TRAIL的作用可极大抑制NK细胞对激活的HSCs的细胞毒作用,说明TRAIL在NK细胞的这一作用中起重要作用^[9];(3)polyI:C是通过IFN- γ 增强NK细胞的这一细胞毒作用的,IFN- γ 可诱导NK细胞上NKG2D和TRAIL的表达^[9]。另外,穿孔素阴性鼠与野生鼠相比,前者NK细胞对激活的HSCs的细胞毒作用只有很小程度的减轻,说明在NK细胞的这一作用中,穿孔素的作用很小。另有研究表明,FasL(死亡因子Fas配体)不参与NK细胞对激活的HSCs的细胞毒作用^[14]。

1.3 NKT细胞 NKT细胞能快速释放大量IL-4、IFN- γ ,因此NKT细胞被认为参与局部和系统的由I型促炎介质(TNF- α , IFN- γ)或II型促炎介质(IL-4, IL-10, IL-13)介导的获得性免疫反应。Leclercq *et al*^[15]通过对其他纤维化动物模型及各种慢性肝病患者的研究显示,肝脏CD4⁺NKT细胞是促纤维化细胞因子IL-4和IL-13的主要来源。CD4⁺NKT细胞的培养液中含有IL-4和IL-13,能诱导HSCs纤维蛋白原mRNA的表达及蛋白的合成^[16]。

1.4 其他细胞 Novobrantseva *et al*^[17]用CCl₄造成B细胞缺陷鼠与野生鼠急性肝损伤,6 wk后,B细胞缺陷鼠的胶原沉积明显减少,通过对血清中B细胞正常而T细胞或免疫球蛋白缺乏的鼠的分析发现,B细胞通过非抗体和T细胞依赖的途径介导肝纤维化形成。另有研究表明,调节性T细胞可分泌TGF- β ,TGF- β 能直接下调NK细胞表面的NKG2D受体,抑制NK细胞对激活的HSCs的细胞毒作用,促进肝纤维化的发展;相反,鼠调节性T细胞的减少可增强NK细胞的增殖和细胞毒作用,抑制肝纤维化的发展^[18]。Seki *et al*^[19]研究发现,肝细胞能通过Toll样受体(TLR)信号通路影响调节性T细胞的功能,从而调节抑制性T淋巴细胞的增殖能力。反过来,HSCs对肝内的免疫反应具有保护作用,能通过非典

型协同刺激因子B7-H1抑制T细胞增殖, 诱导T细胞凋亡^[20-21]. HSCs也能产生大量的免疫抑制性细胞因子TGF- β , 限制细胞毒性T细胞的反应^[22]. 另外, 炎症反应的极性对纤维化的发生也是很重要的, TH1和TH2细胞源性细胞因子占主导地位的炎症反应所诱导的基因表达是不同的: TH1细胞源性细胞因子介导快速强烈的炎症反应而很少引起纤维化, 而TH2细胞源性细胞因子则能增强前胶原 I, III及基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase-a2, MMP2), MMP9和金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs)的基因转录, 促进肝纤维化的发展^[23].

2 细胞因子和生长因子在肝纤维化形成中的作用

由介导固有免疫和获得性免疫反应的细胞产生的多种细胞因子和生长因子, 参与了肝纤维化的形成. 另外, 肝脏的其他细胞也参与了细胞因子的产生与紊乱, 如肝细胞和胆管上皮细胞可产生大量的IL-6和TNF- α . 这些因子大致可分为两类: 促增生的细胞因子(如TGF- β , IL-4, IL-13, IL-6)和生长因子(如PDGF、结缔组织生长因子CTGF), 这些可促进ECM的合成; 而促炎性细胞因子(如IFN- γ 和IFN- α)则抑制胶原基因的转录, 进而抑制ECM的合成.

2.1 TGF- β TGF- β 主要来自激活的HSCs, 此外, 库普弗细胞、肝细胞、血小板也能分泌TGF- β ^[24]. TGF- β 是激活HSCs及促进纤维化发展的最强的细胞因子, 在HSCs的激活中其受体表达增加. HSCs表达TGF- β 受体 I, II, III, TGF- β 与HSCs膜上的相应受体结合后, 主要通过细胞内Smad (Smad家族是将TGF- β 信号从细胞膜导入细胞核内的一类细胞质内介导者)通路发挥其功能^[25]. 其中Smad3在HSCs中过度表达并增加纤维连接蛋白、I型胶原沉积和加速 α -应力纤维组合^[26], 而缺乏Smad3的小鼠其HSCs对纤维原性刺激的反应能力降低, 说明Smad3在TGF- β 介导的HSCs的致纤维化作用中起促进作用. 另有研究表明, Smad4是TGF- β 激活通路中的核心分子, 而Smad7却抑制TGF- β 的信号转导, 从而阻断TGF- β 诱导的HSCs的激活及ECM的合成^[27]. TGF- β 的作用主要表现在^[28]: (1)促进HSCs合成Smad及ECM, 减少ECM降解; (2)通过上调成纤维细胞中强效促细胞有丝分裂原PDGF受体的表达, 间接促进成纤维细胞的增殖, 使ECM基因

表达得到进一步强化; (3)覆盖抑制胶原产生的细胞因子TNF- α 在胶原等基因上的反应元件, 促进胶原的产生; (4)通过抑制MMPs和促进TIMPs, 减少异常合成的ECM的降解, 从而加重ECM的沉积; (5)抑制淋巴细胞、单核细胞和NK细胞的功能. TGF- β 中TGF- β 1亚型与肝纤维化关系最密切. 分化抑制因子1(Id1)是HSCs中Smad7下游转导分化过程中重要的调节因子, 能抑制TGF- β 的信号转导^[29], 从而抑制TGF- β 所诱导的肝纤维化形成.

2.2 白细胞介素 IL-1主要由肝库普弗细胞产生和释放, 能促进HSCs、肝细胞、成纤维细胞的增殖. 另外发现, 在鼠急性肝损伤的早期, IFN- α 和IL-1 β 能上调TIMP-1的表达, 而INF- α 和IL-1 β 被抑制, 则导致急性毒性肝损伤后TIMP-1的表达下降及MMP-9增加, 减弱CCl₄介导的细胞毒作用. IL-4和IL-13, 主要由CD4⁺Th2细胞、NK细胞和树突细胞分泌, 是调节Th2细胞分化和增生的主要因子. Sugimoto *et al*^[30]研究发现, IL-4和IL-13能直接作用于HSCs, 显著激活LI90细胞系胶原的产生. LI90对IL-13比对IL-4敏感, 在血吸虫病模型中, IL-13而非IL-4是介导Th2细胞源性细胞因子刺激胶原产生和肝纤维化的主要细胞因子, 而IFN- α 和 β 几乎可完全抑制由IL-4和IL-13诱导的LI90细胞系胶原的合成. 对IL-13基因缺陷小鼠实验证实, IL-13是肝纤维化形成中的主要调节因子, 因为在这些动物模型中虽然还有其他促纤维化的强效细胞因子存在, 却均未发生肝硬化. IL-6能诱导HSCs转化为肌成纤维细胞, 促进肌成纤维细胞增生, 增加胶原和TIMP合成. IL-6在人类慢性肝病和CCl₄诱导的肝纤维化中是增加的. CCl₄诱导的肝纤维化在IL-6缺失鼠中减轻也支持IL-6的促纤维化作用. IL-6可能通过下调MMP2来发挥作用^[31]. IL-10是一种主要由Th2细胞产生、抑制Th1细胞释放细胞因子的免疫调节性细胞因子, 内源性IL-10在肝脏慢性炎症和肝纤维化发展过程中表达增加. IL-10的作用表现在: (1)通过JAK/STAT通路诱导细胞因子信号阻抑蛋白SOCS基因的表达, 阻断炎性细胞因子信号转导通路, 在急性肝损伤时加强其反馈调节, 减少肝纤维化的发生^[32-33]; (2)通过减少MMP-2, MMP-9的产生, 减少肝内胶原沉积; (3)降低TIMP-1的表达, 解除TIMP-1对MMPs尤其是MMP-1的抑制, 加速胶原蛋白降解^[34]; (4)在实验性肝纤维化大鼠, IL-10能显著抑制干预模型肝纤维化的发展, 减少IL-6, TNF- α ,

■同行评价

免疫机制参与肝纤维化发病的研究, 近年这方面进展很快, 但国内有关综述不多, 该综述写得较好, 对从事肝纤维化肝硬化研究的学者有一定的参考价值.

TGF- β 的分泌^[35], (5)减少体外培养的HSCs多种生长因子的产生, 并增加Bax的表达, 同时降低Bcl-12的表达, 对肝纤维化具有拮抗作用^[36-38].

2.3 TNF- α 库普弗细胞是TNF- α 的主要来源^[5], 并通过自分泌和旁分泌来调节库普弗细胞的激活^[39]. Su *et al*^[5]研究发现, TNFR1和TNFR2的缺失减弱了HSCs的激活, 抑制了随后胶原 α 1和TIMP-1 mRNA的表达, 说明TNF- α 能增加HSCs分泌TIMP-1, 并可通过TIMP-1的激活, 减少活化的HSCs的凋亡. Tomita *et al*^[40]研究发现, 在MCD(methionine and choline deficient)喂养鼠中, 库普弗细胞和内皮细胞中血管细胞黏附分子-1(VCAM-1), VCAM-2的表达上调, 有可能募集另外的库普弗细胞, 导致TNF- α 从库普弗细胞释放增加. 该研究显示依赖于TNF- α 而非TGF- β 的途径在MCD喂养鼠的纤维化形成中起着关键作用.

2.4 PDGF PDGF主要来自血液中的血小板、单核细胞和肝库普弗细胞、肝窦内皮细胞、肝星状细胞, 是已知的最强的促细胞有丝分裂原性生长因子. 在HSCs的激活过程中, PDGF是最重要的因子之一, PDGF使HSCs迁移到炎症受损部位, 激活HSCs的细胞外信号调节激酶ERK1/2和FAK-PI3K-Akt通路, 引起HSCs增殖并转化为肌成纤维细胞^[41], 肌成纤维细胞合成并释放大量的基质蛋白、蛋白聚糖、氨基糖等, 沉积于细胞间隙. PDGF还可上调TIMP-1, 抑制胶原酶的活性, 从而减少ECM的降解. PDGF-BB能激活NAD(P)H(非吞噬细胞源性)氧化酶, 导致ROS的产生, 这种ROS可激活p38MAPK(mitogen-activated protein kinase), 诱导HSCs的增殖^[42].

2.5 干扰素 干扰素是目前少数几个作用明确的抗纤维化性细胞因子之一, 其作用表现在: (1)基因转录水平, 表现在对胶原等ECM基因的转录抑制作用; (2)蛋白翻译水平, 表现在对胶原等ECM的转录后翻译、翻译后修饰的抑制作用; (3)细胞水平, 表现在对纤维化过程中主要的ECM产生细胞的增殖活性的影响. IFN- α/β 主要由白细胞、成纤维细胞产生. Shen *et al*^[43]发现IFN- β 能抑制体外培养的HSCs增殖以及BrdU(Bromo-2'-deoxy-Uridine)融合, 降低 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达及HSCs的数量, 并能明显抑制I型和III型胶原的生成, 从而抑制肝纤维化的进展. IFN- α/β 能诱导SOCS-1和/或SOCS-3的表达, 而SOCS-1和SOCS-3能阻断IL-4的信号转导^[44], 因此IFN- α/β 可阻断IL-4诱

导的肝纤维化作用. IFN- γ 由激活的CD4⁺, CD8⁺T细胞和NK细胞产生, 其中主要产生IFN- γ 的是CD4⁺Th1细胞, 这些细胞经抗原刺激后, 直接激活IFN- γ 的基因转录, 增加IFN- γ 的合成, 产生的IFN- γ 反过来又促进Th1细胞增殖, 同时抑制Th2细胞, 而Th2细胞能分泌刺激胶原产生和导致肝纤维化的主要细胞因子, 因此IFN- γ 可抑制肝纤维化的发展. IFN- γ 还可通过抑制HSCs的激活和阻断TGF- β 的信号转导, 减少ECM合成, 抑制肝纤维化^[45]. IFN- γ 缺陷鼠对CCl₄所致肝纤维化比野生鼠更敏感. 联合应用IFN- γ 和血管紧张素转换酶抑制剂几乎可完全阻抑肝纤维化的发展^[46].

在各种原因所致的肝纤维化形成过程中, 免疫因素起到了重要作用. 各种损伤刺激作用于肝脏, 导致免疫细胞的激活或抑制, 并产生多种细胞因子, 这些细胞及其细胞因子的紊乱, 促进或者抑制了肝纤维化的形成和发展. 但这些免疫因素尚未完全阐明, 而进一步阐明这些问题, 将为我们提供各种阻断肝纤维化形成和发展的方法及依据, 从而有助于临床上对这类疾病进行合理有效的治疗.

3 参考文献

- 1 Marcellin P, Asselah T, Boyer N. Fibrosis and disease progression in hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: S47-56
- 2 Benhamou Y, Di Martino V, Bochet M, Colombet G, Thibault V, Liou A, Katlama C, Poynard T. Factors affecting liver fibrosis in human immunodeficiency virus-and hepatitis C virus-coinfected patients: impact of protease inhibitor therapy. *Hepatology* 2001; 34: 283-287
- 3 Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 225-274
- 4 Naito M, Hasegawa G, Ebe Y, Yamamoto T. Differentiation and function of Kupffer cells. *Med Electron Microsc* 2004; 37: 16-28
- 5 Su GL. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G256-265
- 6 Imamura M, Ogawa T, Sasaguri Y, Chayama K, Ueno H. Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats. *Gastroenterology* 2005; 128: 138-146
- 7 Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S, Wu S, Lang R, Iredale JP. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest* 2005; 115: 56-65
- 8 Liu ZX, Govindarajan S, Okamoto S, Dennert G. NK cells cause liver injury and facilitate the induction of T cell-mediated immunity to a viral liver infection. *J Immunol* 2000; 164: 6480-6486
- 9 Radaeva S, Sun R, Jaruga B, Nguyen VT, Tian Z,

- Gao B. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. *Gastroenterology* 2006; 130: 435-452
- 10 Lanier LL. Natural killer cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol* 2003; 15: 308-314
- 11 Vivier E, Nunes JA, Vely F. Natural killer cell signaling pathways. *Science* 2004; 306: 1517-1519
- 12 Vivier E, Tomasello E, Paul P. Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition? *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 306-311
- 13 Ortaldo JR, Young HA. Mouse Ly49 NK receptors: balancing activation and inhibition. *Mol Immunol* 2005; 42: 445-450
- 14 Ochi M, Ohdan H, Mitsuta H, Onoe T, Tokita D, Hara H, Ishiyama K, Zhou W, Tanaka Y, Asahara T. Liver NK cells expressing TRAIL are toxic against self hepatocytes in mice. *Hepatology* 2004; 39: 1321-1331
- 15 Leclercq IA, Farrell GC, Schriemer R, Robertson GR. Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. *J Hepatol* 2002; 37: 206-213
- 16 de Lalla C, Galli G, Aldrighetti L, Romeo R, Mariani M, Monno A, Nuti S, Colombo M, Callea F, Porcelli SA, Panina-Bordignon P, Abrignani S, Casorati G, Dellabona P. Production of profibrotic cytokines by invariant NKT cells characterizes cirrhosis progression in chronic viral hepatitis. *J Immunol* 2004; 173: 1417-1425
- 17 Novobrantseva TI, Majeau GR, Amatucci A, Kogan S, Brenner I, Casola S, Shlomchik MJ, Kotliansky V, Hochman PS, Ibraghimov A. Attenuated liver fibrosis in the absence of B cells. *J Clin Invest* 2005; 115: 3072-3082
- 18 Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, Puig PE, Novault S, Escudier B, Vivier E, Lecesne A, Robert C, Blay JY, Bernard J, Caillat-Zucman S, Freitas A, Tursz T, Wagner-Ballon O, Capron C, Vainchencker W, Martin F, Zitvogel L. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med* 2005; 202: 1075-1085
- 19 Seki E, Tsutsui H, Iimuro Y, Naka T, Son G, Akira S, Kishimoto T, Nakanishi K, Fujimoto J. Contribution of Toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88 signaling to murine liver regeneration. *Hepatology* 2005; 41: 443-450
- 20 Yu MC, Chen CH, Liang X, Wang L, Gandhi CR, Fung JJ, Lu L, Qian S. Inhibition of T-cell responses by hepatic stellate cells via B7-H1-mediated T-cell apoptosis in mice. *Hepatology* 2004; 40: 1312-1321
- 21 Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 515-548
- 22 Luethviksson BR, Gunnlaugsdottir B. Transforming growth factor-beta as a regulator of site-specific T-cell inflammatory response. *Scand J Immunol* 2003; 58: 129-138
- 23 Sandler NG, Mentink-Kane MM, Cheever AW, Wynn TA. Global gene expression profiles during acute pathogen-induced pulmonary inflammation reveal divergent roles for Th1 and Th2 responses in tissue repair. *J Immunol* 2003; 171: 3655-3667
- 24 Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d793-807
- 25 Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21: 659-693
- 26 Uemura M, Swenson ES, Gaca MD, Giordano FJ, Reiss M, Wells RG. Smad2 and Smad3 play different roles in rat hepatic stellate cell function and alpha-smooth muscle actin organization. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 4214-4224
- 27 Dooley S, Hamzavi J, Breitkopf K, Wiercinska E, Said HM, Lorenzen J, Ten Dijke P, Gressner AM. Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* 2003; 125: 178-191
- 28 Ghosh AK. Factors involved in the regulation of type I collagen gene expression: implication in fibrosis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002; 227: 301-314
- 29 Wiercinska E, Wickert L, Denecke B, Said HM, Hamzavi J, Gressner AM, Thorikay M, ten Dijke P, Mertens PR, Breitkopf K, Dooley S. Id1 is a critical mediator in TGF-beta-induced transdifferentiation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 2006; 43: 1032-1041
- 30 Sugimoto R, Enjoji M, Nakamuta M, Ohta S, Kohjima M, Fukushima M, Kuniyoshi M, Arimura E, Morizono S, Kotoh K, Nawata H. Effect of IL-4 and IL-13 on collagen production in cultured LI90 human hepatic stellate cells. *Liver Int* 2005; 25: 420-428
- 31 Bansal MB, Kovalovich K, Gupta R, Li W, Agarwal A, Radbill B, Alvarez CE, Safadi R, Fiel MI, Friedman SL, Taub RA. Interleukin-6 protects hepatocytes from CCl4-mediated necrosis and apoptosis in mice by reducing MMP-2 expression. *J Hepatol* 2005; 42: 548-556
- 32 Yoshida T, Ogata H, Kamio M, Joo A, Shiraishi H, Tokunaga Y, Sata M, Nagai H, Yoshimura A. SOCS1 is a suppressor of liver fibrosis and hepatitis-induced carcinogenesis. *J Exp Med* 2004; 199: 1701-1707
- 33 Saxena NK, Titus MA, Ding X, Floyd J, Srinivasan S, Sitaraman SV, Anania FA. Leptin as a novel profibrogenic cytokine in hepatic stellate cells: mitogenesis and inhibition of apoptosis mediated by extracellular regulated kinase (Erk) and Akt phosphorylation. *FASEB J* 2004; 18: 1612-1614
- 34 Zheng WD, Zhang LJ, Shi MN, Chen ZX, Chen YX, Huang YH, Wang XZ. Expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hepatic stellate cells during rat hepatic fibrosis and its intervention by IL-10. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1753-1758
- 35 Zhang LJ, Yu JP, Li D, Huang YH, Chen ZX, Wang XZ. Effects of cytokines on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 77-81
- 36 Wang XZ, Chen ZX, Zhang LJ, Chen YX, Li D, Chen FL, Huang YH. Expression of insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor 1 receptor and its intervention by interleukin-10 in experimental hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1287-1291
- 37 Shi MN, Zheng WD, Zhang LJ, Chen ZX, Wang XZ. Effect of IL-10 on the expression of HSC growth

- factors in hepatic fibrosis rat. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4788-4793
- 38 Wang XZ, Zhang SJ, Chen YX, Chen ZX, Huang YH, Zhang LJ. Effects of platelet-derived growth factor and interleukin-10 on Fas/Fas-ligand and Bcl-2/Bax mRNA expression in rat hepatic stellate cells *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2706-2710
- 39 Kitamura K, Nakamoto Y, Akiyama M, Fujii C, Kondo T, Kobayashi K, Kaneko S, Mukaida N. Pathogenic roles of tumor necrosis factor receptor p55-mediated signals in dimethylnitrosamine-induced murine liver fibrosis. *Lab Invest* 2002; 82: 571-583
- 40 Tomita K, Tamiya G, Ando S, Ohsumi K, Chiyo T, Mizutani A, Kitamura N, Toda K, Kaneko T, Horie Y, Han JY, Kato S, Shimoda M, Oike Y, Tomizawa M, Makino S, Ohkura T, Saito H, Kumagai N, Nagata H, Ishii H, Hibi T. Tumour necrosis factor alpha signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Gut* 2006; 55: 415-424
- 41 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218
- 42 Adachi T, Togashi H, Suzuki A, Kasai S, Ito J, Sugahara K, Kawata S. NAD(P)H oxidase plays a crucial role in PDGF-induced proliferation of hepatic stellate cells. *Hepatology* 2005; 41: 1272-1281
- 43 Shen H, Zhang M, Minuk GY, Gong Y. Different effects of rat interferon alpha, beta and gamma on rat hepatic stellate cell proliferation and activation. *BMC Cell Biol* 2002; 3: 9
- 44 Fujimoto M, Naka T. Regulation of cytokine signaling by SOCS family molecules. *Trends Immunol* 2003; 24: 659-666
- 45 Ulloa L, Doody J, Massague J. Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway. *Nature* 1999; 397: 710-713
- 46 Yoshiji H, Kuriyama S, Noguchi R, Yoshii J, Ikenaka Y, Yanase K, Namisaki T, Kitade M, Yamazaki M, Tsujinoue H, Fukui H. Combination of interferon-beta and angiotensin-converting enzyme inhibitor, perindopril, attenuates the murine liver fibrosis development. *Liver Int* 2005; 25: 153-161

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中华医学会第七次全国消化系疾病学术会议征文通知

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

1 征文内容

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

2 征文要求

请提供800字左右的中文摘要一份, 摘要内容包括: 目的、方法、结果、结论, 注明作者的姓名、单位和邮政编码。并提供电脑打印稿(附软盘), 经所在的单位审查盖章后寄至中华医学会学术会务部刘亚君收(北京东四西大街42号 邮编 100710), 信封上请注明会议名称。请最好同时通过本次会议专用网站(网址: www.assimilation2007.com)邮寄电子文稿和报名。凡已在全国性学术会议上或全国公开发行的刊物上发表过的论文, 不予受理。截稿日期: 2007-02-28(以当地邮戳为准)

外源性转化生长因子 β_1 对大鼠原代肝星状细胞活化的影响

陈达凡, 李建英, 郑伟达, 陈治新, 王小众

陈达凡, 李建英, 郑伟达, 陈治新, 王小众, 福建医科大学附
属协和医院消化内科 福建省福州市 350001

陈达凡, 福建医科大学附属医院2004级硕士生, 主要从事
消化系统疾病临床和研究。

福建省科技开发计划项目, No. 2005D094

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

电话: 0591-83357896-8482

收稿日期: 2006-10-17 接受日期: 2006-11-28

Effects of exogenous transforming growth factor- β_1 on the activation of primarily cultured rat hepatic stellate cells

Da-Fan Chen, Jian-Ying Li, Wei-Da Zheng,
Zhi-Xin Chen, Xiao-Zhong Wang

Da-Fan Chen, Jian-Ying Li, Wei-Da Zheng, Zhi-Xin
Chen, Xiao-Zhong Wang, Department of Gastroenterol-
ogy, the Affiliated Union Hospital of Fujian Medical Uni-
versity, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Supported by the Science and Technology Development
Project of Fujian Province, No. 2005D094

Correspondence to: Xiao-Zhong Wang, Department of
Gastroenterology, the Affiliated Union Hospital of Fujian
Medical University, 29 Xinquan Road, Fuzhou 350001, Fu-
jian Province, China. drwangxz@pub6.fz.fj.cn

Received: 2006-10-17 Accepted: 2006-11-28

Abstract

AIM: To investigate the activation of primarily
cultured hepatic stellate cells (HSCs) at
different differentiated stages after treatment
of exogenous transforming growth factor- β_1
(TGF- β_1) and the alterations of related factors
during this process.

METHODS: HSCs were isolated from normal
rats and primarily cultured in the uncoated
plastics for 2, 3, 4, 5, 6, and 7 days. Then the cells
were incubated with 5 $\mu\text{g/L}$ exogenous TGF- β_1
for 24 hours. The morphological features of the
cells were observed under inverted microscope.
Western blot was used to detect the changes of
 α -smooth muscle actin (α -SMA) after TGF- β_1
treatment and the expression of transforming
growth factor β_1 receptor-II (T β R-II) during the
activation of HSCs.

RESULTS: During the process of *in vitro* cul-
tivation, HSCs at different differentiated stages
showed different responses to exogenous TGF- β_1
treatment. TGF- β_1 promoted the activation of
HSCs after the cells had been cultured for 2,
3, 4, and 5 days. The cells cultured for 3 days
were the most sensitive to TGF- β_1 , and the level
of α -SMA expression was increased by 78.05%.
The changes of HSC morphology and α -SMA
expression were not significant in the cells cul-
tured for 6 and 7 days. T β R-II expression was
significantly higher in HSCs cultured for 7 days
than that in ones cultured for 3 days (3.30 ± 0.83
vs 1.55 ± 0.38 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: The activation of partially-
activated HSCs can be promoted by exogenous
TGF- β_1 , while the fully-activated HSCs lose this
response. The amount of T β R-II expression is
not involved in this difference.

Key Words: Transforming growth factor- β_1 ; Liver fi-
brosis; Hepatic stellate cell; α -smooth muscle actin

Chen DF, Li JY, Zheng WD, Chen ZX, Wang XZ. Effects
of exogenous transforming growth factor- β_1 on the
activation of primarily cultured rat hepatic stellate cells.
Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(3):211-215

摘要

目的: 探讨大鼠原代肝星状细胞(HSC)体外
培养过程中, 不同时期外源性转化生长因子
 β_1 (TGF- β_1)对其活化的影响及相关因素的变化。

方法: 分离大鼠原代HSC, 于无包被的塑料培
养板上分别培养2, 3, 4, 5, 6, 7 d时予TGF- β_1
5 $\mu\text{g/L}$ 处理24 h, 倒置显微镜下观察细胞的形
态变化, 应用Western blot法检测处理前后细
胞 α -肌动蛋白(α -SMA)的变化, 及活化过程中
TGF- β_1 II型受体(T β R-II)的表达。

结果: HSC在体外培养过程中, 不同培养时间
对TGF- β_1 的刺激活化作用反应不同。TGF- β_1
处理后, 对培养2, 3, 4, 5 d HSC的活化有促进
作用, 以对培养第3天的细胞作用最明显, 其
 α -SMA表达增加78.05%, 而培养6, 7 d的HSC

■背景资料

肝纤维化是指肝
脏细胞外基质
(ECM)特别是胶
原的过度沉积, 是
继发于肝脏炎症
或损伤后组织修
复的代偿反应。肝
星状细胞(HSC)的
激活是肝纤维化
形成的中心环节,
细胞因子与激活
过程关系密切, 其
中TGF- β_1 起关键
作用。

■研究前沿

肝纤维化的发生与细胞因子的关系是研究热点,在肝纤维化治疗实验中,有不少针对TGF- β_1 或其通路蛋白的研究。

的形态和 α -SMA变化不明显。培养第7天的HSC比培养第3天的细胞T β R- II表达增高(3.30 ± 0.83 vs 1.55 ± 0.38 , $P < 0.05$)。

结论: TGF- β_1 对处部分活化状态中某阶段细胞的活化具有促进作用。完全活化的细胞对TGF- β_1 的刺激活化作用不敏感,原因与T β R- II的表达量无关。

关键词: 转化生长因子 β_1 ; 肝纤维化; 肝星状细胞; α 肌动蛋白

陈达凡, 李建英, 郑伟达, 陈治新, 王小众. 外源性转化生长因子 β_1 对大鼠原代肝星状细胞活化的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(3):211-215

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/211.asp>

0 引言

肝纤维化是指肝脏细胞外基质(ECM)特别是胶原的过度沉积,是继发于肝脏炎症或损伤后组织修复的代偿反应^[1]。肝星状细胞(HSC)的激活是肝纤维化形成的中心环节^[2-4],细胞因子与激活过程关系密切^[5],其中TGF- β_1 起关键作用^[3,6]。但HSC从静止状态转化为活化状态的动态变化过程中,细胞对外源性TGF- β_1 的刺激反应如何,鲜见系统报道。本文拟分离大鼠HSC,观察在原始培养的不同时期外源性TGF- β_1 刺激对细胞的形态、 α -SMA表达的影响,及HSC活化过程中T β R- II的变化,以探讨原始HSC体外培养活化过程中对TGF- β_1 刺激的反应及相关因素的变化。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Sprague-Dawley大鼠,体质量450-500 g,中国科学院上海实验动物中心提供,普通饲料喂养,自由进食;IV型胶原酶(209 kU/g)购自Invitrogen公司;Nycodenz购自Sigma公司;PronaseE(4000 nU/g)购自Merck公司;DNA酶I(Dnase I, 10^6 kU/g)购自北京华美生物公司;DMEM培养基干粉购自Gibco公司;胎牛血清购自奥地利PAA公司;鼠抗人结蛋白(desmin) mAb购自DAKO公司;免疫细胞化学SP染色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;人重组TGF- β_1 购自R&D公司;小鼠抗大鼠 α -肌动蛋白(α -SMA) mAb购自Sigma公司;兔抗大鼠T β R- II多克隆抗体及兔抗 β -tubulin多克隆抗体购自Santa Cruz公司;二抗均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法 大鼠HSC的分离方法参考文献[7]。细胞

分离后,应用台盼蓝染色排斥法鉴定细胞活率,desmin免疫细胞化学染色法鉴定HSC纯度。以200 mL/L胎牛血清/DMEM培养液调整细胞浓度为 2×10^8 /L,接种于无包被的6孔塑料培养板上。实验所用细胞来自同一大鼠,每项实验重复5次。细胞分6组,每组再分别设立干预组和对照组。6组干预组细胞分别对应于培养2, 3, 4, 5, 6, 7 d后加用TGF- β_1 处理。

TGF- β_1 用含1 g/L牛血清白蛋白的4 mmol/L的HCl溶液激活。TGF- β_1 加用前24 h,细胞用无血清的DMEM溶液洗涤2次后,改用20 mL/L的胎牛血清/DMEM培养液继续培养,继而按预定时间换用含5 μ g/L TGF- β_1 的20 mL/L胎牛血清/DMEM培养液培养、处理24 h后进行下游实验。

1.2.1 应用相差倒置显微镜观察细胞的形态变化 细胞分离后,每隔24 h观察其形态变化,同时进行干预组和对照组之间的比较。

1.2.2 Western blot法分析细胞 α -SMA, T β R- II及 β -tubulin的表达 按预定时间,用预冷的PBS洗涤细胞2次,直接加用适当量的细胞裂解液(50 mmol/L的Tris-HCl, pH值6.8, 100 mmol/L二硫苏糖醇, 20 g/L十二烷基硫酸钠, 100 mL/L甘油),所得溶液在沸水中煮10 min,而后离心(15 000 g)10 min,取上清即为细胞总蛋白溶液。同时测定蛋白浓度。取含8 μ g总蛋白的细胞裂解液进行100 g/L SDS-PAGE电泳,经硝酸纤维素膜转移,用含50 g/L脱脂奶粉的TBS-T溶液(TBS+1 mL/L Tween-20)封闭后,分别与 α -SMA mAb(1:400)、T β R- II多克隆抗体(1:200)、 β -tubulin多克隆抗体(1:300)室温下孵育2 h,洗涤后再分别与山羊抗小鼠二抗(1:2500)和山羊抗兔二抗(1:3000)作用,经ECL底物化学发光显影,测量胶片条带灰度值。

统计学处理 采用SPSS11.0统计分析软件进行成组 t 检验或单因素方差分析。当 $P < 0.05$ 时,认为差异有统计学意义。

2 结果

成功分离大鼠HSC,细胞活力大于90%,细胞纯度达90%-95%。

2.1 体外培养过程中HSC表型改变及TGF- β_1 对其的影响 初分离的HSC呈折光性很强的圆球形,约为肝细胞的1/3到1/4,24 h后细胞基本贴壁,胞质内含有大量高折光性的颗粒。此后细胞逐渐伸展,第3天时细胞体较大,胞质内仍含有较多高折光性的颗粒,伸出较多伪足,处部分活化状

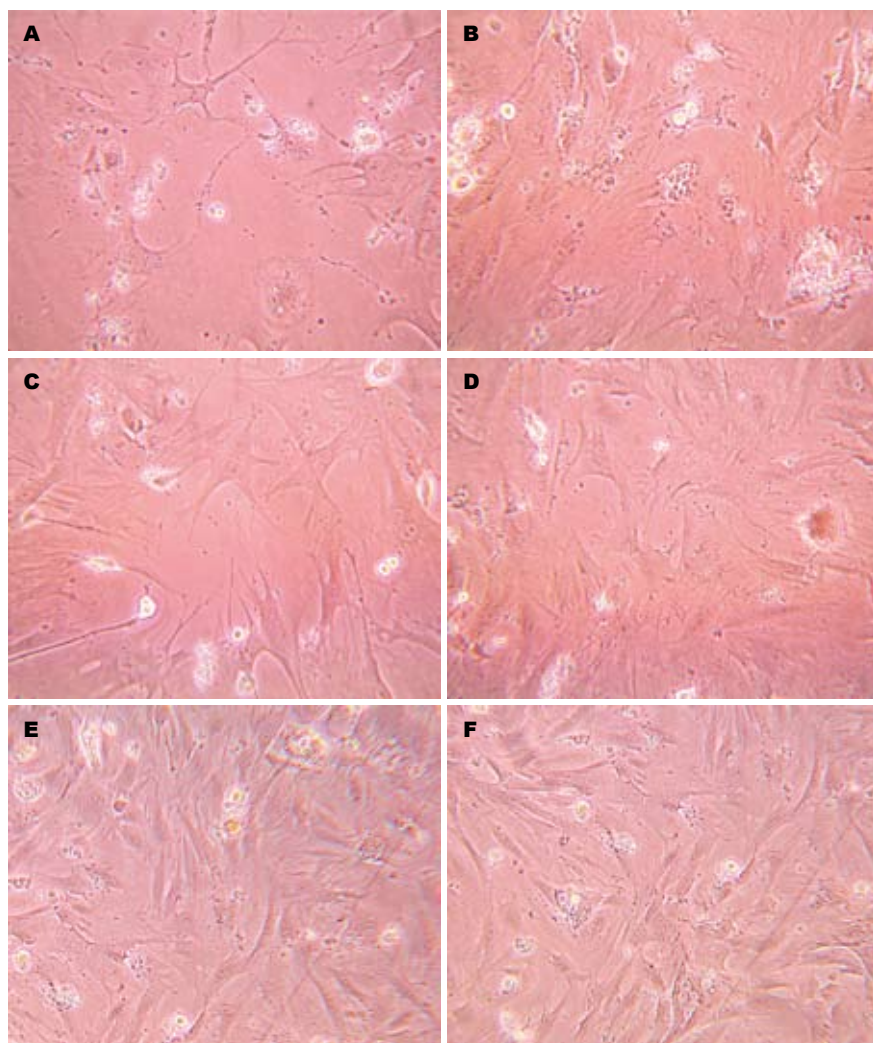


图 1 体外培养过程中HSC表型改变及TGF- β_1 的影响($\times 100$). A: 第3天对照组; B: 第3天加TGF- β_1 处理; C: 第5天对照组; D: 第5天加TGF- β_1 处理; E: 第7天对照组; F: 第7天加TGF- β_1 处理.

■应用要点

在目前的抗肝纤维化实验中,有不少针对TGF- β_1 或其通路蛋白的研究,本实验可为实验药物干预时机的选择提供参考.

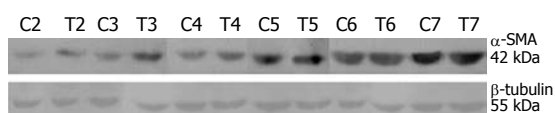


图 2 Western blot检测 α -SMA和相应 β -tubulin的表达. T2-T7: 培养第2-7天时加TGF- β_1 处理; C2-C7: 相应的对照组.

态. 第5-6天, 胞质内颗粒逐渐减少, 细胞继续伸展, 开始融合成小片状. 第7天时, 折光性的颗粒明显减少, 绝大多数的细胞呈星形、梭形, 融合成片, 呈完全活化状态. 加入TGF- β_1 后, 与对照组相比, 明显促进培养第2-5天的细胞活化, 以培养第3天的最显著, 细胞更为伸展, 折光性颗粒减少(图1).

2.2 TGF- β_1 对HSC α -SMA表达的影响 随细胞培养时间的延长, HSC的 α -SMA表达逐渐升高. 与对照组相比, TGF- β_1 促进体外培养2-5 d HSC的 α -SMA合成, 以第3天最为显著, 干预组的表达量是对照组的1.7805倍. 培养6, 7 d的HSC, 对

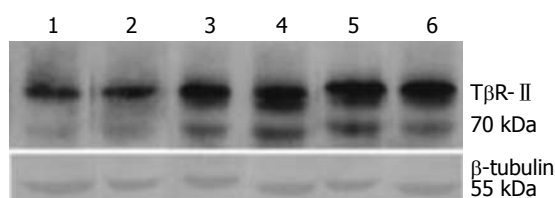


图 3 Western blot检测T β R-II和相应 β -tubulin的表达. 1-6: 第3-8天的T β R-II和相应 β -tubulin的表达.

照组和干预组 α -SMA表达无明显差异. 内参照 β -tubulin的表达基本一致(图2, 表1).

2.4 T β R-II的变化及TGF- β_1 的影响 在培养过程中, 第5, 6, 7, 8天HSC的T β R-II表达比第3, 4天高($F = 14.02$, $P < 0.05$), 但第5, 6, 7, 8天间的表达无明显差异(图3).

3 讨论

HSC的激活是肝纤维化形成的中心环节, 是指肝脏损伤时, HSC受到各种致病因子的刺激, 从静息状态转化为具有增生性、纤维原性和可收

■名词解释

HSC活化: 是指肝脏损伤时, HSC受到各种致病因子的刺激, 从静息状态转化为具有增生性、纤维原性和可收缩性的肌成纤维细胞。其中 α -SMA的表达为其激活的标志, 表达量的大小可用来衡量HSC的激活程度。

表 1 Western blot结果灰度值分析(mean $\pm$ SD, $n = 5$)

	第2天	第3天	第4天	第5天	第6天	第7天
对照组	0.83 $\pm$ 0.18	1.23 $\pm$ 0.37	1.57 $\pm$ 0.44	2.18 $\pm$ 0.29	2.90 $\pm$ 0.43	3.14 $\pm$ 0.53
干预组	1.11 $\pm$ 0.14 ^a	2.19 $\pm$ 0.49 ^b	2.25 $\pm$ 0.25 ^a	2.84 $\pm$ 0.51 ^a	3.19 $\pm$ 0.55	3.60 $\pm$ 0.39

数据以 α -SMA和 β -tubulin的灰度值比值表示。^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^b $P < 0.01$ vs 对照组。

缩性的肌成纤维细胞^[8]。静止状态的HSC在无包被的塑料培养皿上培养, 可自发激活, 7 d呈完全活化状态, 与体内肝纤维化过程相似^[2], 其中 α -SMA的表达为其激活的标志, 表达量的大小可用来衡量HSC的激活程度^[4]。TGF- β_1 在肝纤维化的大鼠中表达明显增高^[9], 他可激活HSC, 有促进HSC合成、分泌细胞外基质, 减少细胞外基质的降解, 抑制细胞增殖等作用, 以自分泌与旁分泌两种方式促进HSC活化^[10]。

实验发现, 在HSC的活化过程中, 不同阶段加入外源性TGF- β_1 刺激, 反应不同, 对处部分活化状态中某阶段的细胞促活化作用较明显, 以分离培养第3天的HSC α -SMA增殖最大, 而完全活化的细胞其活化状态变化不明显, 同时测得在体外培养中, 完全活化的HSC T β R- II的表达比部分活化的细胞(培养第3, 4天)升高。T β R- II是TGF- β_1 在HSC内信号传导过程的起始结合物, 有研究表明^[11], 刚分离的HSC T β R- II的表达很低, 而后渐升高, 这可能引起处静止及部分活化状态的细胞在某阶段对TGF- β_1 的反应渐升高。但完全活化的细胞T β R- II表达仍较高, 而对TGF- β_1 的刺激活化作用反应却下降, 因此我们考虑完全活化的HSC的反应能力下降与T β R- II的表达量无关, 其反应能力下降的可能原因如下: (1)有研究发现^[12], 应用¹²⁵I标志TGF- β_1 受体, 发现完全活化的HSC表面的TGF- β_1 I, II, III型受体均明显下降, 认为可能与细胞的内摄作用有关。(2)smads通路是TGF- β_1 刺激HSC后的主要信号传导通路^[13-14], 有学者认为完全活化的HSC smads通路的活性明显下降, 他们分别提取正常大鼠及用胆管结扎造模的肝硬化大鼠的HSC, 发现smads蛋白的表达量无明显差异, 但应用TGF- β_1 处理后, 造模组细胞smad2/3的磷酸化不明显, 而正常组却显著升高^[14]。另有学者应用TGF- β_1 体外刺激HSC后, 部分活化(培养第3天)的HSC smad4与DNA中的CAGA盒的结合明显增高, 但完全活化的HSC及其用TGF- β_1 刺激后, 均未发现smad4与CAGA盒的结合。而目前认为

smad2/3磷酸化后与smad4结合, 转位入核内, 与CAGA盒的结合在TGF- β_1 的信号传导中起重要作用^[12]。(3)完全活化的HSC内源性的TGF- β_1 表达较高, 可能致细胞表面与外源性TGF- β_1 的结合位点减少。以上几点可能引起完全活化的HSC对外界刺激的生物学应答能力下降。但TGF- β_1 亦可通过MAPK等通路影响胶原的表达^[15], 且各种细胞信号转导途径并非各自独立、互不相干, 而是纵横交错、相互影响, 构成一个复杂的细胞信号通路网络^[16], 因此在活化过程中, 是否有其他通路蛋白的表达量、活性或受体空间结构的变化和通路间的相互作用, 及不依赖于受体的调节机制, 有待进一步的研究。

目前, 在肝纤维化治疗实验中, 有不少针对抗TGF- β_1 或其通路蛋白的研究。有发现, 在肝纤维化的大鼠模型中, 抑制TGF- β_1 的合成和通路传导可明显改善肝纤维化^[17], 另外阻断TGF- β_1 的受体对肝纤维化也有逆转作用^[18]。但由于TGF- β_1 在体内的作用广泛, 包括有促进HSC活化、抑制HSC的增殖等, 对肝纤维化的进程作用不一致, 且HSC活化过程中不同阶段对TGF- β_1 刺激的应答有差异, 及活化过程和细胞外基质合成的机制亦可能有不同^[19], 因此在适当的时候减少或扩大TGF- β_1 的作用显得尤为重要, 本实验可为实验药物干预时机的选择提供参考。

4 参考文献

- 1 Friedman SL. Liver fibrosis - from bench to bedside. *J Hepatol* 2003; 38 Suppl 1: S38-53
- 2 Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275: 2247-2250
- 3 Qi Z, Atsuchi N, Ooshima A, Takeshita A, Ueno H. Blockade of type beta transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2345-2349
- 4 Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells-a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d808-826
- 5 Marra F. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d1899-1914
- 6 Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci*

- 2002; 7: d793-807
- 7 郑伟达, 王小众, 张莉娟, 史美娜. 分离肝星形细胞的简便方法. 福建医科大学学报 2004; 38: 71-73
- 8 Marra F. Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation. *J Hepatol* 1999; 31: 1120-1130
- 9 Shi MN, Huang YH, Zheng WD, Zhang LJ, Chen ZX, Wang XZ. Relationship between transforming growth factor beta1 and anti-fibrotic effect of interleukin-10. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2357-2362
- 10 Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor beta and the liver. *Hepatology* 2001; 34: 859-867
- 11 Dooley S, Delvoux B, Streckert M, Bonzel L, Stopa M, ten Dijke P, Gressner AM. Transforming growth factor beta signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during in vitro progression to myofibroblasts. TGFbeta signal transduction during transdifferentiation of hepatic stellate cells. *FEBS Lett* 2001; 502: 4-10
- 12 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
- 13 Bachem MG, Meyer D, Melchior R, Sell KM, Gressner AM. Activation of rat liver perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from myofibroblastlike cells. A potential mechanism of self perpetuation in liver fibrogenesis. *J Clin Invest* 1992; 89: 19-27
- 14 Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 753-791
- 15 Tsukada S, Westwick JK, Ikejima K, Sato N, Rippe RA. SMAD and p38 MAPK signaling pathways independently regulate alpha1(I) collagen gene expression in unstimulated and transforming growth factor-beta-stimulated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 10055-10064
- 16 吴晓玲, 曾维政, 蒋明德, 王丕龙. 肝纤维化的信号转导通路. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2223-2228
- 17 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
- 18 Jiang W, Yang CQ, Liu WB, Wang YQ, He BM, Wang JY. Blockage of transforming growth factor beta receptors prevents progression of pig serum-induced rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1634-1638
- 19 Lindert S, Wickert L, Sawitza I, Wiercinska E, Gressner AM, Dooley S, Breitkopf K. Transdifferentiation-dependent expression of alpha-SMA in hepatic stellate cells does not involve TGF-beta pathways leading to coinduction of collagen type I and thrombospondin-2. *Matrix Biol* 2005; 24: 198-207

■同行评价

HSC的激活是肝纤维化形成的中心环节, 细胞因子与其激活过程关系密切, 其中内源性TGF- β_1 起关键作用. 但HSC从静止状态转化为活化状态过程中, 对外源性TGF- β_1 的刺激反应如何, 鲜见系统报道. 本实验结果表明TGF- β_1 对部分活化状态中的HSC的活化具有促进作用, 对完全活化HSC的刺激活化作用不敏感, 原因与T β R- II 的表达量无关. 文章结构清晰, 统计分析合理.

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

全国消化及消化内镜诊断与治疗进展学术研讨会征文启事

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

1 征文内容

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

2 征文要求

应征文章按《中华消化内镜杂志》稿约要求撰写打印, 并寄3000字以内全文及500字以内的论文摘要各一份; 已投《中华消化内镜杂志》尚未发表的稿件, 请注明稿号. 应征文章经单位推荐盖章后, 寄南京市紫竹林3号《中华消化内镜杂志》编辑部卜小乐、赵在文同志收. 邮编: 210003. 信封左下脚注“征文”字样, 同时汇寄审稿费10元. 请自留底稿, 恕不退稿. 截稿日期2007-05-31. 有关会议的具体事项另行通知. 联系电话: 025-83472831, 86086091.

高胆固醇血症兔Oddi括约肌细胞钾离子通道活性的改变

张孝勇, 马进, 杜滂, 马克军, 王亚蓉, 魏经国

■背景资料

高胆固醇饮食已成为危害人类健康的十大危险因素之一。临床资料和研究表明, 胆固醇代谢紊乱是导致胆管Oddi括约肌功能紊乱(SOD)的原因之一。近年来有很多相关研究结果表明高胆固醇可引起SO痉挛, 进而引起胆囊淤胆、结石形成, 同时在高胆固醇SOD兔模型中SO细胞中Ca²⁺浓度升高, Ca²⁺跨膜转运速度降低。其原因尚不明确。

张孝勇, 杜滂, 马克军, 王亚蓉, 魏经国, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院放射科 陕西省西安市 710038
马进, 中国人民解放军第四军医大学航空航天生理学教研室 陕西省西安市 710032
张孝勇, 2004年获医学硕士学位, 现为第四军医大学博士研究生, 主要从事胆系疾病的分子病理学研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30470787
通讯作者: 魏经国, 710038, 陕西省西安市灞桥区新寺路1号, 第四军医大学唐都医院放射科。 zhang-xy@fmmu.edu.cn
电话: 029-84773135 传真: 029-84777163
收稿日期: 2006-11-01 接受日期: 2006-11-28

Changes in potassium ion channel activity of the Oddi's sphincter smooth muscle cells from hypercholesterolemic rabbits

Xiao-Yong Zhang, Jin Ma, Pang Du, Ke-Jun Ma, Ya-Rong Wang, Jing-Guo Wei

Xiao-Yong Zhang, Pang Du, Ke-Jun Ma, Ya-Rong Wang, Jing-Guo Wei, Department of Radiology, Tangdu Hospital of the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China

Jin Ma, Department of Aerospace Physiology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30470787

Correspondence to: Jing-Guo Wei, Department of Radiology, Tangdu Hospital of Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China. tdradio1@fmmu.edu.cn

Received: 2006-11-01 Accepted: 2006-11-28

Abstract

AIM: To study the changes of the contractile responses and potassium ion channel activity in sphincter of Oddi (SO) from rabbits with hypercholesterolemia (HC), and elucidate the underlying mechanisms responsible for these changes.

METHODS: A total of 24 New Zealand female rabbits were divided randomly into control group ($n = 12$) and HC group ($n = 12$). SO muscle rings were dissociated from the rabbits in both groups *in vitro*. The contractile responses of SO to potassium chloride (KCl) was observed firstly. Then the contractile responses evoked by

tetraethylammonium (TEA) and 4-aminopyridine (4-AP) were measured. Western blot was employed to examine the expression of potassium ion channels in tissues of HC and control group.

RESULTS: The contractile forces (induced by 60 mmol/L KCl) of SO tissues from HC and control group were 1.23 ± 0.08 and 1.52 ± 0.11 g, respectively. HC group showed a markedly increased contractile response ($t = 5.89$, $P < 0.05$). Compared with that in control group, the ratio of contractile responses induced by TEA (3-8 mmol/L) or 4-AP (8-18 mmol/L) to those induced by 60 mmol/L KCl was decreased significantly in HC group ($t = 2.72$, $P < 0.05$; $t = 4.71$, $P < 0.05$). Western blot indicated that the protein expression of potassium ion channels of SO tissue was significantly reduced in HC group in comparison with that in control group (0.36 ± 0.06 vs 0.84 ± 0.03 , $t = 3.18$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: The contractile response of SO to KCl increases while the activities of BK_{Ca} and K_v in SO cells decrease in HC rabbits, which might be one of the reasons why SO dysfunction is caused in the condition of HC.

Key Words: Hypercholesterolemia; Sphincter of Oddi; Contractile response; Potassium ion channel

Zhang XY, Ma J, Du P, Ma KJ, Wang YR, Wei JG. Changes in potassium ion channel activity of the Oddi's sphincter smooth muscle cells from hypercholesterolemic rabbits. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(3):216-220

摘要

目的: 研究高胆固醇血症(hypercholesterolemia, HC)兔胆管Oddi括约肌(SO)收缩反应及钾离子通道活性的变化情况, 并探讨其机制。

方法: 将24只新西兰雌兔随机分成两组, HC模型组和对照组各12只, 分别取两组SO组织制备成离体肌环, 观察SO肌环对KCl及钾离子通道阻断剂盐酸四乙铵(TEA)和4-氨基吡啶(4-AP)的收缩反应, 并采用Western blot技术,

检测两组兔SO组织中钾离子通道的表达情况。

结果: 60 mmol/L KCl所诱发的HC组和对照组SO肌环的收缩力分别为 1.23 ± 0.08 g和 1.52 ± 0.11 g, HC组的收缩反应明显高于对照组($t = 5.89, P < 0.05$)。以1 mmol/L为浓度梯度累积加入TEA, 从3 mmol/L至8 mmol/L, HC组SO肌环对TEA的相对收缩反应在各个浓度点均明显低于对照组($t = 2.72, P < 0.05$)。以2 mmol/L为浓度梯度累积加入4-AP, 从8至18 mmol/L, HC组SO肌环对4-AP的相对收缩反应在各个浓度点均较对照组显著降低($t = 4.71, P < 0.05$)。蛋白免疫印迹半定量分析显示HC组SO组织BK_{Ca}通道相对光密度为 0.36 ± 0.06 , 对照组为 0.84 ± 0.03 , HC组BK_{Ca}通道蛋白表达量明显降低($t = 3.18, P < 0.05$)。

结论: HC兔SO肌环的收缩反应增强, SO细胞BK_{Ca}及K_V通道活性降低, BK_{Ca}通道蛋白表达量降低, 这可能是导致HC兔发生SO功能紊乱的原因之一。

关键词: 高胆固醇血症; Oddi括约肌; 收缩反应; 钾离子通道

张孝勇, 马进, 杜滢, 马克军, 王亚蓉, 魏经国. 高胆固醇血症兔Oddi括约肌细胞钾离子通道活性的改变. 世界华人消化杂志 2007;15(3):216-220

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/216.asp>

0 引言

Oddi括约肌包绕于胰胆管汇合进入十二指肠处, 是独立于十二指肠壁平滑肌、具有精细分工的肌性结构, 在神经与激素的共同作用下, 产生协调的舒缩运动, 对调节胆囊充盈、控制胆汁排出及维持胆道系统正常压力具有重要作用。已经证实胆囊切除术后可诱发Oddi括约肌功能紊乱(sphincter of Oddi dysfunction, SOD), 进一步研究发现, 胆囊切除术前可能已经存在sphincter of Oddi(SO)肌动力异常^[1]。SOD是胆道疾病、胰腺疾病及胃肠道疾病发生的重要诱因^[2-4]之一。Wei *et al*^[5]研究发现, 高胆固醇血症(HC)可导致兔SOD, 但发生机制尚不清楚^[6]。本研究通过喂饲胆固醇(Ch)制作高胆固醇血症兔模型, 用灌流法在离体条件下研究了HC对SO肌环张力的影响, 并利用通道阻断剂研究了高胆固醇血症兔SO细胞钾离子通道的活性的变化, 并采用Western blot技术检测两组兔SO组织钾离子通道的表达情况的差异, 对其机制进行了初步探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 NaCl, KCl, NaHCO₃, MgCl₂, NaH₂PO₄, 葡萄糖, 二甲基亚砜(DMSO)购自西安化学试剂厂; 盐酸四乙铵(tetraethylammonium, TEA), 4-氨基吡啶(4-aminopyridine, 4-AP), BSA, DAB购自美国Sigma公司; Ch分析纯购自上海化学试剂公司; 张力换能器JZ-BK型购自中国贝科公司; 台式自动平衡记录仪XWTD464型购自上海大华仪表厂; 电子天平ACA-100型购自美国Denver公司; 解剖显微镜PM-6型购自日本Olympus公司。新西兰♀兔24只(第四军医大学实验动物中心提供), 2-3 mo, 体质量1.8-2.2 kg, 随机分为2组, 每组12只。对照组(Con)饲以标准饲料, 实验组(HC)饲以标准饲料+Ch, 每日1 g, 每周6 d, 停喂1 d, 共8 wk。高Ch血症模型判定标准: 兔血清总Ch浓度<3.0 mmol/L为正常, >10 mmol/L为达到高Ch血症标准。实验开始前将血清总Ch>3.0 mmol/L兔剔除。

1.2 方法

1.2.1 SO肌环的制备 经耳缘静脉注入约10 mL空气处死兔, 迅速分离SO段, 置于氧合Krebs液中, 在解剖显微镜下小心去除SO周围脂肪与结缔组织, 取其近心段并修剪成横径为4 mm的肌环。肌环一端藉不锈钢丝挂钩固定于肌槽底部的挂钩上, 另一端通过挂钩与肌肉张力换能器(JZ-BK型, 中国贝科公司)相连。肌槽内盛37℃ Krebs液, 并持续充以50 mL/L CO₂+950 mL/L O₂混合气。Krebs液组成(mmol/L): NaCl 115.0, KCl 5.9, NaHCO₃ 22.8, MgCl₂ 1.2, NaH₂PO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5, 葡萄糖10.0, pH = 7.4。

1.2.2 SO最适静息张力的调节 将肌环置于Krebs液中温育, 首先给予0.6 g初始前负荷, 在平衡的过程中, 通过旋钮不断调节张力, 使其稳定在初始前负荷水平, 每隔20 min换一次Krebs液。平衡60 min后以60 mmol/L KCl为激动剂, 以0.2 g为步幅逐步提高前负荷值至其产生最大收缩反应, 此时的静息张力即为最适静息张力, 随后实验均在各肌环最适静息张力下进行。

1.2.3 SO细胞钾离子通道功能的测定 首先测试肌环对60 mmol/L KCl的最大收缩反应。达到最大收缩后洗脱肌环, 再向浴槽内累积加入不同浓度(0.1-10 mmol/L)的氯化四乙铵(TEA), 记录每个累积浓度下肌环收缩产生的最大张力。再次洗脱后, 按照同样方法测试肌环对不同累积浓度(0.5-20 mmol/L)4-氨基吡啶(4-AP)的收缩反应。我们以肌环对不同累积浓度的4-AP或TEA

■应用要点

钾离子通道活性的变化将导致细胞膜电位的改变, 因此改变高胆固醇血症条件下SO细胞膜的异常极化状态, 有望为SOD的治疗提供新思路。

■同行评价

本文通过制作HC兔模型,制备SO肌环,在离体条件下发现高胆固醇血症兔SO肌环对KCl的兴奋性增加, BK_{Ca} 和 K_v 通道的活性降低, BK_{Ca} 通道蛋白表达量降低,从而证实了HC兔SO处于高张力状态的现象,并推测SOD的发生可能与高胆固醇血症条件下SO细胞 BK_{Ca} 和 K_v 通道活性降低关系密切。文章有较好的科学性、创新性、可读性,有一定学术意义。

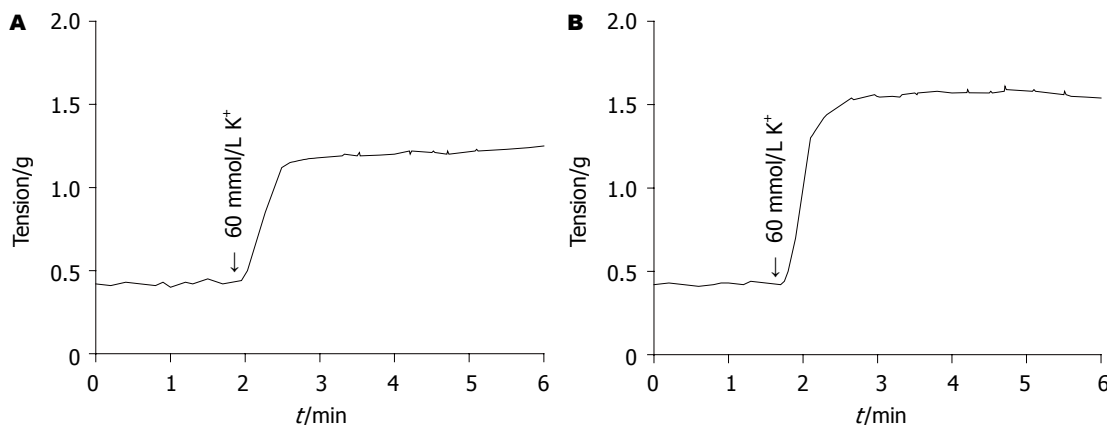


图1 对照组和HC组兔SO肌环对60 mmol/L KCl的收缩反应。A: 诱发对照组收缩曲线; B: 诱发HC组收缩曲线。

的收缩反应与同一肌环对60 mmol/L KCl的收缩反应性的比值作为反映SO钾离子通道功能的指标^[7]。由所得数据绘制累积浓度-效应曲线。

1.2.4 蛋白免疫印迹分析 以 β -actin水平作为等量蛋白上样对照, HC组及对照组SO组织以三去污裂解液提取组织细胞总蛋白, Bradford法进行蛋白定量。每孔加样120 μ g/L SDS-PAGE凝胶电泳分离, 将蛋白质电转移至硝酸纤维素膜(NC膜), 以50 μ g/L的BSA室温封闭过夜后, 用小鼠抗兔 BK_{Ca} pAb^[8]孵育膜3 h, TBST洗膜3 $\times$ 10 min, 再以1:1000稀释的HRP标记羊抗小鼠IgG室温孵育3 h, TBST洗膜3次, 用DAB显色液显色5-10 min, 观察结果。

统计学处理 检测结果均采用统计软件SPSS12.0进行数据的统计学分析。实验数据以mean $\pm$ SD表示, 两组间数据比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异显著。

2 结果

实验时HC组和对照组SO肌环湿质量分别为2.31 $\pm$ 0.09 mg与2.28 $\pm$ 0.06 mg, 两组间无明显差异($n=12$)。

2.1 SO肌环对60 mmol/L KCl的收缩反应 60 mmol/L KCl诱发的两组收缩反应曲线(图1)。对照组SO肌环的平均收缩力为1.23 $\pm$ 0.08 g, HC组为1.52 $\pm$ 0.11 g, 所诱发的收缩力HC组较对照组显著提高($t=5.89$, $P<0.05$)。

2.2 两组SO肌环对钾离子通道阻断剂TEA的收缩反应性变化 当两组SO肌环加入TEA时, 其引发的收缩力在两组间无明显差别。但经与60 mmol/L KCl的收缩反应的比值做归一化处理后, HC组SO肌环对TEA的相对收缩反应较对照组发生了明显的变化。在3 mmol/L时为65.2%

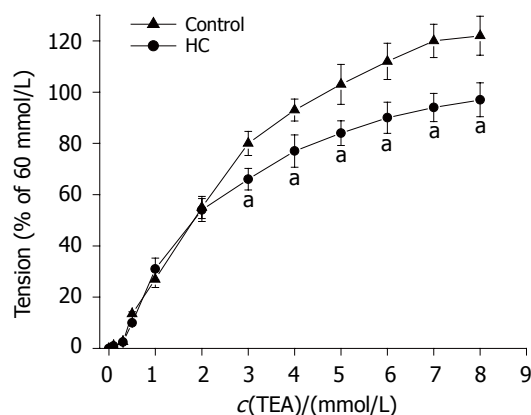


图2 两组SO肌环对TEA的相对收缩反应。^a $P<0.05$ vs 对照组。

$\pm 8.1\%$, 较对照组下调13.9%; 在4 mmol/L时为77.1 $\pm$ 6.2%, 较对照组下调16.7%; 在5 mmol/L时为84.4 $\pm$ 10.0%, 较对照组下调19.2%; 在6 mmol/L时为90.9 $\pm$ 12.6%, 较对照组下调16.6%; 在7 mmol/L时为94.3 $\pm$ 11.3%, 较对照组下调18.8%; 在8 mmol/L时为96.0 $\pm$ 9.7%, 较对照组下调14.5%。可见HC组SO肌环对TEA的相对收缩反应在上述各个浓度点均较对照组明显降低($t=2.72$, $P<0.05$, 图2)。

2.3 两组SO肌环对钾离子通道阻断剂4-AP的收缩反应性变化 SO肌环在4-AP作用下产生的张力在两组间未见显著差异。但通过两组张力与60 mmol/L KCl引发的收缩反应的比值做归一化处理后, HC组对4-AP的相对收缩反应在8 mmol/L时为17.3 $\pm$ 2.1%, 较对照降低6.8%; 在10 mmol/L时为27.3 $\pm$ 3.2%, 较对照降低18.2%; 在12 mmol/L时为45.9 $\pm$ 2.6%, 较对照降低22.1%; 在14 mmol/L时为62.5 $\pm$ 7.8%, 较对照降低20.8%; 在16 mmol/L时为75.1 $\pm$ 8.7%, 较对照降低18.5%。在18 mmol/L时为82.0 $\pm$

10.6%, 较对照降低13.3%。可见HC组肌环对4-AP的相对收缩反应在上述各个浓度点均较对照组显著降低($t = 4.71, P < 0.05$, 图3)。

2.4 蛋白免疫印迹分析 采用Western blot方法观察两组SO组织BK_{Ca}通道的表达情况, 结果显示HC组BK_{Ca}通道表达量明显降低(图4)。半定量分析显示对照组相对光密度为 0.84 ± 0.03 , HC组为 0.36 ± 0.06 , 两组间存在统计学差异($t = 3.18, P < 0.05$)。

3 讨论

在SO平滑肌细胞膜上至少有4种钾离子通道, 其中电压依赖型钾离子通道(K_v)和钙依赖型钾离子通道(BK_{Ca})的数量上占有绝对优势, 在决定细胞极化状态、调节细胞膜静息电位以及调节平滑肌张力等方面起着重要作用^[9]。TEA和4-AP分别是BK_{Ca}和K_v通道的特异性阻断剂^[10]。如果SO平滑肌细胞钾通道功能增强, 那么同样浓度的钾通道阻断剂对该通道的阻断作用就越强, 在收缩装置等其他因素近似相同的条件下就能引起该动脉更强的收缩反应。相反, 如果钾通道活性降低, 同样浓度的钾通道阻断剂对该通道的阻断作用就越弱, 诱发的收缩反应就会减小。因此本实验分别采用这两种阻断剂观察HC兔SO平滑肌细胞BK_{Ca}和K_v功能的变化。本实验采用TEA及4-AP激发的收缩反应与KCl激发的收缩反应的比值作为指标, 可排除SO平滑肌细胞数量及单个SMC内收缩蛋白数量等其他因素的影响。因此该比值反映了高胆固醇血症兔SO细胞BK_{Ca}及K_v活性的变化^[7]。

BK_{Ca}通道的主要生理作用是调节平滑肌细胞膜电位和肌张力, 即当细胞膜去极化时, 细胞外Ca²⁺内流增加, 当细胞[Ca²⁺]_i到达一定阈值时激活BK_{Ca}, 引起K⁺外流增加, 进而降低膜去极化程度, 平滑肌收缩作用减弱。早在1989年, Wilde *et al*^[11]在研究平滑肌细胞BK_{Ca}功能时就发现BK_{Ca}能直接对抗[Ca²⁺]_i升高所致的膜去极化程度, 提示此通道在调控细胞膜电位及肌张力过程中对质膜的极化状态起着负反馈调节作用。本组实验发现HC组SO肌环对TEA的相对收缩反应在各个浓度点均较对照组明显降低, 说明在HC条件下, 兔SO平滑肌细胞BK_{Ca}的活性降低。本文的收缩反应试验结果证实HC组肌环对高浓度K⁺的收缩反应较对照组明显提高, 这一现象可能是由于HC组SO肌环细胞BK_{Ca}通道对[Ca²⁺]_i的敏感性降低所致^[12]。本实验中半定量蛋

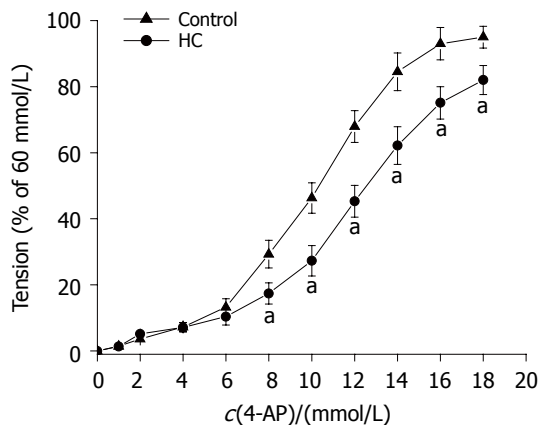


图3 两组SO肌环对4-AP的相对收缩反应。* $P < 0.05$ vs 对照组。

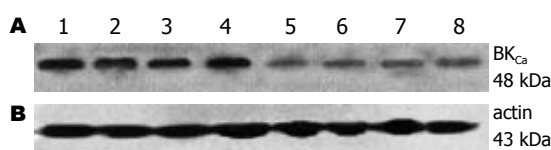


图4 Western blot检测结果。A: 两组SO组织BK_{Ca}通道蛋白表达水平; B: 内参照 β -actin表达水平; 1-4: 对照组; 5-8: HC组。

白免疫印迹分析显示HC组BK_{Ca}通道蛋白表达下调。我们认为, 由于高胆固醇导致BK_{Ca}蛋白表达量的下降导致了通道门控特点的变化^[13], 包括细胞内[Ca²⁺]_i敏感性下降的异常变化。当细胞内[Ca²⁺]_i上升时通道不能及时开放; 或者伴有开放频率的减少、对膜电位不敏感等, 致使细胞膜超极化障碍, 电压依赖性钙通道关闭不全或者不能关闭, 最后致使高胆固醇血症兔SOD模型SO细胞BK_{Ca}通道对[Ca²⁺]_i的负反馈调节作用减弱, [Ca²⁺]_i过载, 从而削弱了BK_{Ca}通道介导的SO细胞扩张的作用。

K_v的重要生理功能之一就是通过细胞膜去极化提高细胞的兴奋性, 以及通过膜超极化降低细胞的兴奋性; 同时参与SMC静息电位的形成及血管平滑肌紧张度的调节。也就是说, K_v功能降低可引起细胞去极化, 导致细胞的兴奋性提高。Fike *et al*^[14]观察到在高血压时, 兔肺动脉SMC的K_v通道的活性下降, 通道电流减小, 收缩反应提高, 血管紧张度增加。由于HC条件下平滑肌张力的变化与高血压时类似, 故我们推测HC导致SO细胞膜K_v的功能变化可能也与高血压时类似。本组实验发现, HC组SO肌环对4-AP的相对收缩反应在各浓度点均较对照组显著降低, 说明HC可致兔SO细胞K_v通道活性降低。由于K_v通道功能降低, 使SMC处于更易去极化状态, 引

起平滑肌收缩反应增强, SO应激性提高^[15]。

总之, 我们通过制作HC兔模型, 制备SO肌环, 在离体条件下发现高胆固醇血症兔SO肌环对KCl的兴奋性增加, BK_{Ca}和K_v通道的活性降低, BK_{Ca}通道蛋白表达量降低, 从而从钾离子通道功能变化的角度进一步证实了Wei *et al*^[5]观察到的HC兔SO处于高张力状态的现象, 并推测SOD的发生可能与高胆固醇血症条件下SO细胞BK_{Ca}和K_v通道活性降低关系密切。

4 参考文献

- 1 Szilvassy Z, Nagy I, Madacsy L, Hajnal F, Velosy B, Takacs T, Lonovics J. Beneficial effect of lovastatin on sphincter of Oddi dyskinesia in hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 900-902
- 2 Menees S, Elta GH. Sphincter of Oddi Dysfunction. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2005; 8: 109-115
- 3 Behar J, Corazziari E, Guelrud M, Hogan W, Sherman S, Tooouli J. Functional gallbladder and sphincter of oddi disorders. *Gastroenterology* 2006; 130: 1498-1509
- 4 Bistriz L, Bain VG. Sphincter of Oddi dysfunction: managing the patient with chronic biliary pain. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3793-3802
- 5 Wei JG, Wang YC, Du F, Yu HJ. Dynamic and ultrastructural study of sphincter of Oddi in early-stage cholelithiasis in rabbits with hypercholesterolemia. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 102-106
- 6 Wang XJ, Wei JG, Wang CM, Wang YC, Wu QZ, Xu JK, Yang XX. Effect of cholesterol liposomes on calcium mobilization in muscle cells from the rabbit sphincter of Oddi. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 144-149
- 7 Asano M, Matsunaga K, Miura M, Ito KM, Seto M, Sakurada K, Nagumo H, Sasaki Y, Ito K. Selectivity of action of staurosporine on Ca²⁺ movements and contractions in vascular smooth muscles. *Eur J Pharmacol* 1995; 294: 693-701
- 8 Wang YR, Wei JG, Sun O, Ma KJ, Zhang XY, Zhang YX, Han H. Preparation of polyclonal antiserum against beta subunit of rabbit BK channel. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2005; 21: 375-378
- 9 Horiuchi T, Dietrich HH, Tsugane S, Dacey RG Jr. Role of potassium channels in regulation of brain arteriolar tone: comparison of cerebrum versus brain stem. *Stroke* 2001; 32: 218-224
- 10 Archer SL, Huang JM, Reeve HL, Hampl V, Tolarova S, Michelakis E, Weir EK. Differential distribution of electrophysiologically distinct myocytes in conduit and resistance arteries determines their response to nitric oxide and hypoxia. *Circ Res* 1996; 78: 431-442
- 11 Wilde DW, Lee KS. Outward potassium currents in freshly isolated smooth muscle cell of dog coronary arteries. *Circ Res* 1989; 65: 1718-1734
- 12 Kim N, Chung J, Kim E, Han J. Changes in the Ca²⁺-activated K⁺ channels of the coronary artery during left ventricular hypertrophy. *Circ Res* 2003; 93: 541-547
- 13 Fu ZJ, Xie MJ, Zhang LF, Cheng HW, Ma J. Differential activation of potassium channels in cerebral and hindquarter arteries of rats during simulated microgravity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: H1505-1515
- 14 Fike CD, Kaplowitz MR, Zhang Y, Madden JA. Voltage-gated K⁺ channels at an early stage of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in newborn piglets. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 291: L1169-1176
- 15 张孝勇, 魏经国, 马进, 王莎, 马孝武, 马克军, 王亚蓉. 高胆固醇血症兔Oddi括约肌张力的变化机制. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1114-1118

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志电子杂志的开放存取出版

本刊讯 《世界华人消化杂志》采取开放存取出版方式, 自1995年起, 发表的文章可以在线免费阅读全文 (<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>). 自2003-04-15至今2006-11-27, 电子版的点击次数为13708834, 平均每天点击10409次. 总下载次数166750, 平均每天下载126次. (世界胃肠病学杂志社2007-01-28)

5-Aza-CdR对胃癌细胞系生长及Apaf-1基因异常甲基化的影响

王贺玲, 王学清, 李岩, 孙军

王贺玲, 王学清, 李岩, 孙军, 中国医科大学第二附属医院消化内科 辽宁省沈阳市 110041

王贺玲, 博士研究生, 主要从事胃癌的临床研究.

通讯作者: 李岩, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学第二附属医院消化内科. yanli0227@126.com

收稿日期: 2006-11-09 接受日期: 2006-11-28

Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on proliferation of human gastric cancer cell lines and abnormal methylation of Apaf-1 gene

He-Ling Wang, Xue-Qing Wang, Yan Li, Jun Sun

He-Ling Wang, Xue-Qing Wang, Yan Li, Jun Sun, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shengyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Yan Li, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shengyang 110004, Liaoning Province, China. yanli0227@126.com

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

Abstract

AIM: To observe the effects of 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR) on the proliferation of human gastric cancer cell lines SGC7901 and BGC823 as well as the methylation and expression of Apaf-1 gene.

METHODS: Human gastric cancer cell lines SGC7901 and BGC823 were cultured in RPMI1640 and then treated with different concentrations of 5-Aza-CdR (1×10^{-7} , 5×10^{-7} , 1×10^{-6} and 5×10^{-6} mol/L). The proliferation of the cells was detected by MTT assay and flow cytometry (FCM). The methylation of Apaf-1 gene in the two kinds of cell lines was detected by methylation-specific-polymerase chain reaction (MSP), and the expression of Apaf-1 was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot analysis.

RESULTS: 5-Aza-CdR displayed a growth inhibitory effect on SGC7901 and BGC823 cells in

a dose- and time-dependent manner after exposure to 5-Aza-CdR at different concentrations (1×10^{-7} , 5×10^{-7} , 1×10^{-6} , 5×10^{-6} mol/L) for 24, 48 and 72 hours. FCM analysis showed that the apoptosis rates in SGC7901 cells ($2.53\% \pm 1.19\%$, $5.93\% \pm 0.86\%$, $10.14\% \pm 1.51\%$) and BGC823 cells ($1.57\% \pm 0.26\%$, $4.64\% \pm 1.05\%$, $8.21\% \pm 1.46\%$) were increased significantly after exposure to 5-Aza-CdR (5×10^{-7} , 1×10^{-6} , 5×10^{-6} mol/L) for 72 hours as compared with $0.12\% \pm 0.03\%$ and $0.57\% \pm 0.03\%$ in the control cells ($P < 0.05$). The methylation and loss of Apaf-1 mRNA and protein expression were detected in SGC7901 and BGC823 cells before 5-Aza-CdR treatment. However, the methylation was reversed and Apaf-1 was re-expressed after 5-Aza-CdR treatment.

CONCLUSION: 5-Aza-CdR can inhibit the proliferation of SGC7901 and BGC823 cells through blocking cell cycles and inducing cell apoptosis, during which the reversion of Apaf-1 gene methylation plays an important role.

Key Words: 5-aza-2'-deoxycytidine; Apaf-1 gene; Gastric cancer; Methylation; Cell apoptosis; Cell proliferation

Wang HL, Wang XQ, Li Y, Sun J. Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on proliferation of human gastric cancer cell lines and abnormal methylation of Apaf-1 gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(3):221-227

摘要

目的: 观察5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR)对体外培养的胃癌SGC7901细胞和BGC823细胞增生、细胞周期和凋亡的影响及其对此两株细胞中Apaf-1基因的甲基化状态的影响.

方法: 不同浓度5-Aza-CdR处理体外培养的SGC7901细胞和BGC823细胞后, 用MTT法检测处理24, 48和72 h的细胞增殖活性; PI染色和流式细胞仪检测药物处理后72 h细胞周期分布和细胞凋亡率; MSP法检测用药前后细

■背景资料

胃癌是我国主要恶性肿瘤之一, 其发病机制并不完全清楚, 而基因的表现遗传学的改变是近年来研究的热点; Apaf-1基因是重要的抑癌基因, 是凋亡的核心, 但关于该基因与胃癌的关系的研究并未见报道.

■研究前沿

Apaf-1基因的失活存在于许多肿瘤中,他的失活机制包括缺失和启动子甲基化等,而启动子甲基化的研究属于表观遗传学的范畴,是近年来研究的热点,5-Aza-CdR是去甲基化药物,已经用于治疗白血病,对实体瘤的治疗也有大量的研究,但其作用机制仍需进一步探讨。

胞中Apaf-1基因的甲基化状态; RT-PCR法及Western blot法检测用药前后细胞中Apaf-1的mRNA及蛋白表达的变化。

结果: 1×10^{-7} , 5×10^{-7} , 1×10^{-6} 和 5×10^{-6} mol/L 5-Aza-CdR处理SGC7901和BGC823细胞24, 48, 72 h后, 细胞增生受到抑制, 有时间和剂量的依赖性。流式细胞仪分析表明, 各药物浓度处理72 h后凋亡率增加明显: SGC7901细胞 5×10^{-7} , 1×10^{-6} 和 5×10^{-6} mol/L组分别为 $2.53\% \pm 1.19\%$, $5.93\% \pm 0.86\%$, $10.14\% \pm 1.51\%$, 与对照组($0.12\% \pm 0.03\%$)相比差异显著($P < 0.05$); BGC823细胞 5×10^{-7} , 1×10^{-6} 和 5×10^{-6} mol/L组分别为 $1.57\% \pm 0.26\%$, $4.64\% \pm 1.05\%$, $8.21\% \pm 1.46\%$, 与对照组($0.57\% \pm 0.03\%$)相比差异显著($P < 0.05$)。在5-Aza-CdR处理前未检测到SGC7901细胞系及BGC823细胞系的Apaf-1基因的mRNA及蛋白表达, 经过5-Aza-CdR处理后, Apaf-1基因在SGC7901细胞系及BGC823细胞系中甲基化状态得到了逆转, Apaf-1基因的mRNA及蛋白重新表达。

结论: 5-Aza-CdR对SGC7901细胞和BGC823细胞具有增生抑制作用; Apaf-1基因的表达情况与其甲基化状态的改变有关。

关键词: 5-Aza-CdR; Apaf-1基因; 胃癌; 甲基化; 细胞凋亡; 细胞增殖

王贺玲, 王学清, 李岩, 孙军. 5-Aza-CdR对胃癌细胞系生长及Apaf-1基因异常甲基化的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(3):221-227

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/221.asp>

0 引言

胃癌是一种严重威胁人类健康的恶性肿瘤, 国内外大量的资料显示^[1-7], 胃癌的发生与其他恶性肿瘤一样是多基因、多阶段变异累积形成的病理过程, 这些基因主要是促进肿瘤发生的癌基因和抑制肿瘤发生的抑癌基因, 以及维持基因组稳定的DNA错配修复基因等。抑癌基因功能的丢失可通过多种途径, 除基因突变和杂合性丢失以外还与其启动子发生甲基化修饰有关^[8-11]。Apaf-1是已经确认的抑癌基因^[12-14], 在细胞凋亡过程中起着重要作用, 我们通过此基因在SGC7901细胞系及BGC823细胞系中的甲基化的状态以及在改变他们甲基化状态后的表达的改变及与SGC7901细胞生长状态的关系, 进一步探讨该抑癌基因的表达与其甲基化状态的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料 SGC7901细胞系、BGC823细胞系购自中国医科大学细胞生物教研室, 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR)、碘化丙啶(PI)为Sigma产品, 总RNA抽提试剂TRIzol购自Invitrogen公司, RT-PCR试剂盒购自TaKaRa公司, RPMI1640培养基为Hyclone产品, Apaf-1绵羊抗人Ab(Santa Cruz产品), Taq酶及dNTP均为TaKaRa公司产品, Wizard DNA Clean-up (Promega公司)。

1.2 方法 SGC7901胃癌细胞株在含100 mL/L新生牛血清的RPMI1640中, 37℃, 50 mL/L CO₂条件下培养。在细胞传代24 h后, 将5-Aza-CdR按 1×10^{-7} , 5×10^{-7} , 1×10^{-6} 和 5×10^{-6} mol/L的浓度配制的培养液分别加入培养瓶中, 待24, 48和72 h后分别回收细胞, 进行实验。

1.2.1 四唑盐(MTT)比色法测定5-Aza-CdR对SGC7901和BGC823增殖活性的影响 取处理前的对数生长期的细胞, 按每孔接种200 μL细胞培养液(1×10^3 个细胞/100 μL)接种于96孔板, 共接种5板, 每组6孔, 接种24 h后去上清液, 加入含5-Aza-CdR浓度分别为 1×10^{-7} , 5×10^{-7} , 1×10^{-6} , 5×10^{-6} mol/L的培养液继续放入CO₂孵箱, 在37℃, 50 mL/L CO₂及饱和湿度下继续培养, 以后在24, 48和72 h各时间点分别取一板, 每孔加入MTT溶液(5 g/L) 20 μL, 继续培养4 h, 终止培养, 去除孔内上清液, 每孔加入150 μL二甲基亚砜(DMSO), 震荡10 min, 选择570 nm波长, 在酶标仪上测定各孔光吸收值(A), 其增殖能力大小以平均吸光度(A)值分析。以未加5-Aza-CdR干预的细胞为对照组。

1.2.2 流式细胞仪(FCM)检测细胞周期 在细胞传代24 h后, 将5-Aza-CdR按 1×10^{-7} , 5×10^{-7} , 1×10^{-6} 和 5×10^{-6} mol/L的浓度配制的培养液分别加入培养瓶中, 对照组重新换普通培养液, 待72 h后分别回收细胞, 以胰酶消化法收集并4℃离心(1000 r/min, 5 min)细胞, PBS清洗3次, 700 mL/L冰乙醇固定, 用RNaseA(终浓度为0.1 g/L)消化30 min, 加入0.05 g/L碘化丙啶(PI) 250 μL, 室温避光染色30 min后上机检测。测定细胞周期及细胞凋亡率, 每组实验重复5次。

1.2.3 MSP方法检测胃癌细胞株中Apaf-1的甲基化状态 应用饱和酚-氯仿抽提各组SGC7901细胞及BGC823细胞基因组DNA, 取20 μg DNA溶于45 μL去离子水中, 加入3 mol/L的NaOH 5 μL 75℃ 15 min后, 立即放在冰上, 经新鲜配

表 1 不同浓度和不同时间5-Aza-CdR对SGC7901和BGC823细胞增殖的影响(mean ± SD)

5-Aza-CdR 浓度(mol/L)	SGC7901细胞光吸收度(A)			BGC823细胞光吸收度(A)		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
对照组	0.338 ± 0.064	0.417 ± 0.036	0.533 ± 0.073	0.332 ± 0.027	0.453 ± 0.049	0.651 ± 0.059
1 × 10 ⁻⁷	0.305 ± 0.052	0.353 ± 0.045 ^a	0.419 ± 0.022 ^a	0.296 ± 0.042	0.400 ± 0.032	0.538 ± 0.068 ^a
5 × 10 ⁻⁷	0.319 ± 0.061	0.369 ± 0.035 ^a	0.420 ± 0.031 ^a	0.294 ± 0.096	0.391 ± 0.021 ^a	0.526 ± 0.113 ^a
1 × 10 ⁻⁶	0.304 ± 0.038	0.337 ± 0.079 ^a	0.413 ± 0.029 ^a	0.307 ± 0.070	0.389 ± 0.044 ^a	0.509 ± 0.055 ^a
5 × 10 ⁻⁶	0.259 ± 0.044 ^a	0.309 ± 0.061 ^a	0.395 ± 0.039 ^a	0.276 ± 0.039 ^a	0.375 ± 0.063 ^a	0.469 ± 0.059 ^a

^aP<0.05 vs 对照组.

表 2 SGC7901, BGC823细胞在经5-Aza-CdR作用72 h后的细胞周期的变化(mean ± SD, %)

细胞	5-Aza-CdR浓度(mol/L)	G ₀ /G ₁ 期	S期	G ₂ 期	凋亡率
SGC7901	对照组	57.17 ± 2.22	37.27 ± 2.40	5.67 ± 0.70	0.12 ± 0.03
	1 × 10 ⁻⁷	57.53 ± 1.72	37.01 ± 1.12	5.46 ± 0.70	0.14 ± 0.02
	5 × 10 ⁻⁷	61.51 ± 0.87 ^a	33.35 ± 1.30	5.13 ± 0.49	2.53 ± 1.19 ^a
	1 × 10 ⁻⁶	65.91 ± 1.90 ^a	29.09 ± 1.35 ^a	5.00 ± 0.70	5.93 ± 0.86 ^a
	5 × 10 ⁻⁶	73.45 ± 2.36 ^a	21.78 ± 2.07 ^a	4.17 ± 0.91	10.14 ± 1.51 ^a
BGC823	对照组	56.83 ± 1.38	35.50 ± 0.66	7.67 ± 0.90	0.57 ± 0.03
	1 × 10 ⁻⁷	59.10 ± 2.01	34.23 ± 2.36	6.67 ± 0.93	0.07 ± 0.04
	5 × 10 ⁻⁷	62.17 ± 2.10 ^a	32.23 ± 1.86 ^a	5.60 ± 0.80	1.57 ± 0.26 ^a
	1 × 10 ⁻⁶	65.40 ± 0.98 ^a	28.87 ± 0.65 ^a	5.73 ± 1.01	4.64 ± 1.05 ^a
	5 × 10 ⁻⁶	73.53 ± 1.63 ^a	21.77 ± 2.25 ^a	4.70 ± 0.62	8.21 ± 1.46 ^a

^aP<0.05 vs 对照组.

制60 mmol/L的5 μL氢醌, 4.8 mol/L的亚硫酸钠320 μL处理, 55℃水浴过夜, 用Wizard DNA Clean-up(Promega公司)纯化回收DNA用于甲基化特异PCR分析. 甲基化特异PCR引物^[12]设计选择位于Apaf-1 cDNA启动子富含CpG(CpG表示指C, G以磷酸基连接)的49-378位碱基区域, 设计引物. 上游引物: 5'-GAGGTGTCGTAGCGGTATTC-3'. 下游引物: 5'-CGAAAATTAACGAAATAAACGTC-3' PCR反应条件: 94℃变性45 s, 61℃复性45 s, 72℃延伸60 s, 共38个循环, 扩增长度为212 bp. 非甲基化引物上游5'-ATTTGAGGTGTTGTAGTGGTATTTG-3'. 下游引物: 5'-ACCTCCAAAAATTAACAAAATAAACAT-3'. 循环条件: 94℃变性45 s, 60℃复性45 s, 72℃延伸60 s, 共38个循环. 扩增长度为221 bp.

1.2.4 半定量RT-PCR分析Apaf-1的表达 用TRIzol试剂提取各组SGC7901细胞及BGC823细胞总RNA. 用逆转录酶和Oligo(dT)₂₀引物合成cDNA. Apaf-1引物序列应用Primer3设计^[12], 包含CARD(caspase recruitment domain)功能区, 上

游引物: 5'-TTGCTGCCCTTCTCCATGAT-3'. 下游引物: 5'-TCCCAACTGAAACCCAATGC-3', 扩增长度为334 bp. 以β-actin为内参, 上游引物: 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'. 下游引物: 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3', 扩增长度为498 bp. 两对引物均加入25 μL反应体系中, PCR反应条件为94℃变性45 s, 58℃复性45 s, 72℃延伸60 s, 共35个循环. RT-PCR产物经20 g/L琼脂糖胶分离, 用Alpha Image 2000自动成像仪摄影, 用Fluorchem V 2.0 Stand Alone软件分析RT-PCR产量.

1.2.5 Western blot分析各组细胞Apaf-1蛋白表达情况 提取总蛋白, 定量. 取100 mg总蛋白变性10 min后, 以聚丙烯酰胺凝胶电泳, 蛋白电泳分离后移至PVDF膜. 50 g/L脱脂奶粉室温封闭1 h, PVDF膜置于1:250稀释的一抗(羊抗人, Apaf-1, Santa Cruz公司产品)稀释液中, 4℃过夜, 再置于1:4500稀释的二抗(抗羊, IgG-, 北京中杉金桥生物公司产品)稀释液中, 37℃孵育1 h, 化学发光, 显影, 定影.

■相关报道

Apaf-1是作用在线粒体介导的凋亡途径中的凋亡因子, Leo, Mustika *et al*通过研究认为该基因被认作是凋亡的核心, 是确切的抑癌基因, 而许多报道证实该基因在多数肿瘤中的启动子甲基化状态, 是其表达失活的主要原因.

■创新盘点

本实验在既往研究的基础上首次证实5-Aza-CdR对胃癌中高甲基化的Apaf-1基因有去甲基化的作用并使该基因的mRNA的表达和蛋白表达水平均上调,为胃癌去甲基化治疗提供了依据。

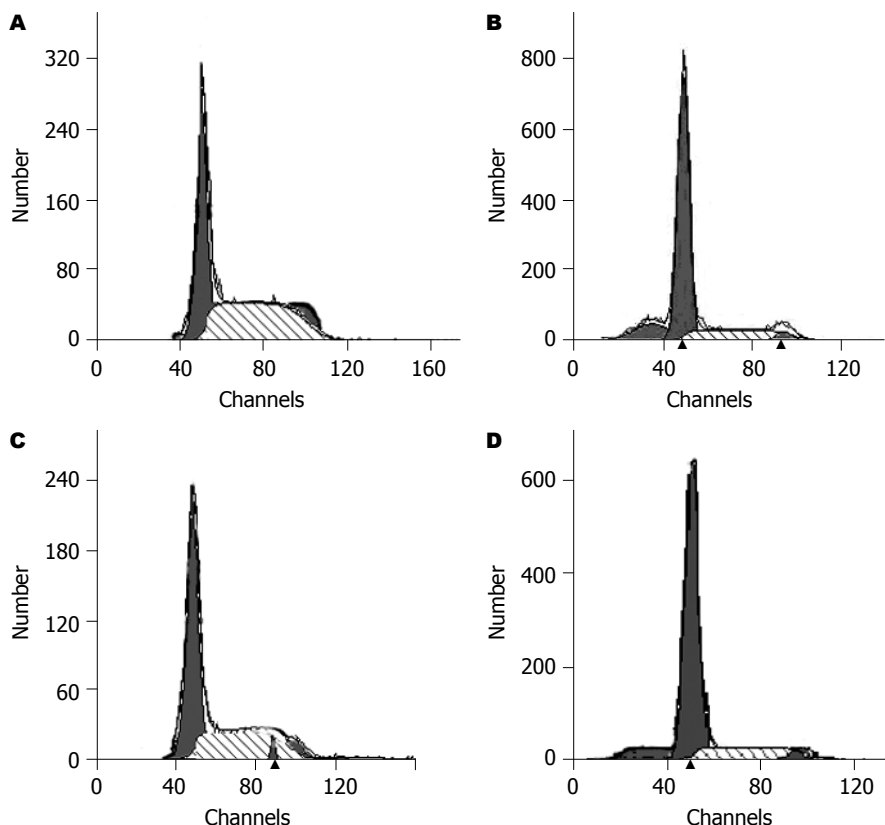


图1 SGC7901, BGC823细胞在经5-Aza-CdR作用72 h后的细胞周期及凋亡的变化. A: SGC7901细胞, 0 mol/L组; B: SGC7901细胞, 5×10^{-6} mol/L组; C: BGC823细胞, 0 mol/L组; D: BGC823细胞, 5×10^{-6} mol/L组.

统计学处理 结果以均数±标准差(mean±SD)表示, 所得数据用成组设计数据的 t 检验进行分析。

2 结果

2.1 5-Aza-CdR对细胞增殖的影响 经 1×10^{-7} , 5×10^{-7} , 1×10^{-6} 和 5×10^{-6} mol/L 4个浓度5-Aza-CdR处理48 h后, SGC7901和BGC823两株细胞的生长增殖活性均有明显抑制, 并且随浓度的增加其抑制的量效关系显著(表1)。

2.2 5-Aza-CdR对细胞周期的影响 流式细胞仪分析显示, SGC7901, BGC823细胞经药物5-Aza-CdR处理后 1×10^{-7} mol/L浓度组的 G_0/G_1 的细胞数量无明显的变化, 凋亡率略有增加, 而 5×10^{-7} , 1×10^{-6} , 5×10^{-6} mol/L组 G_0/G_1 的细胞数量逐渐增加, S期细胞数下降, 凋亡率增加明显. 根据上述结果, 考虑药物作用在 G_0/G_1 , 使细胞停滞在此期, 凋亡细胞率升高(表2, 图1)。

2.3 5-Aza-CdR对细胞中Apaf-1基因甲基化状态的改变 Apaf-1基因在SGC7901细胞系及BGC823细胞系中均为甲基化的纯合子, 而在经过5-Aza-CdR处理后, 则出现了杂合状态, 即该基因甲基化得到了逆转, 并且去甲基化的程度与时间及用药剂量均有一定的依赖性(图2-6)。

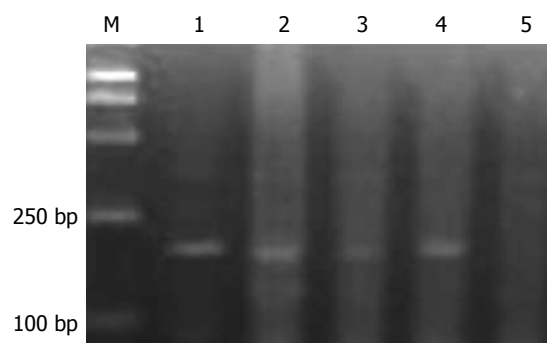


图2 SGC7901细胞在经5-Aza-CdR作用48 h后Apaf-1基因甲基化状态的改变. 1-5: 对照组, 1×10^{-7} , 5×10^{-7} , 1×10^{-6} , 5×10^{-6} mol/L; Marker: DL2000; Apaf-1甲基化条带为212 bp.

2.4 5-Aza-CdR对细胞中Apaf-1基因mRNA表达的影响 5-Aza-CdR处理前SGC7901细胞系及BGC823细胞系的Apaf-1基因的mRNA未检测到表达, 在经5-Aza-CdR处理后, Apaf-1基因mRNA重新表达, 5×10^{-7} 和 1×10^{-6} mmol/L的5-Aza-CdR处理组尤为明显, 并且在用药48, 72 h后, 该基因表达明显上升的趋势(图7)。

2.5 5-Aza-CdR对细胞中Apaf-1基因蛋白表达的影响 5-Aza-CdR处理前后SGC7901细胞系及BGC823细胞系的Apaf-1基因的蛋白表达与mRNA的表达趋势一致, 在用药前无Apaf-1基因

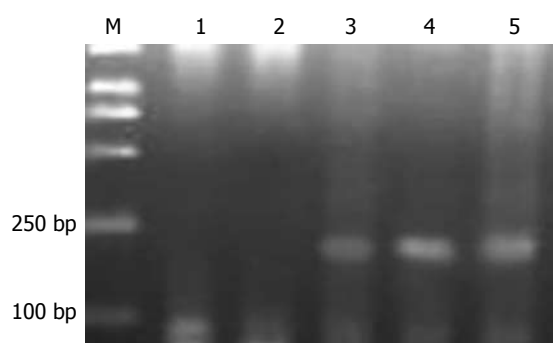


图 3 SGC7901细胞在经5-Aza-CdR 48 h作用后Apaf-1基因非甲基化状态的改变. 1-5: 对照组, 1×10^{-7} , 5×10^{-7} , 1×10^{-6} , 5×10^{-6} , Marker: DL2000; Apaf-1非甲基化条带为221 bp.

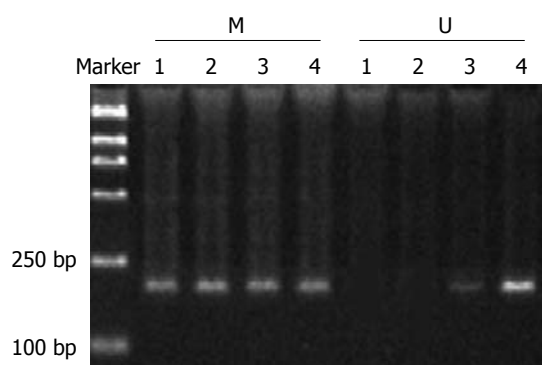


图 4 SGC7901细胞在浓度为 10^{-6} mol/L的5-Aza-CdR处理前后Apaf-1基因甲基化状态. M: 甲基化条带212 bp; U: 非甲基化条带221 bp; 1: 对照组; 2: 用药后24 h; 3: 48 h; 4: 72 h; Marker: DL2000.

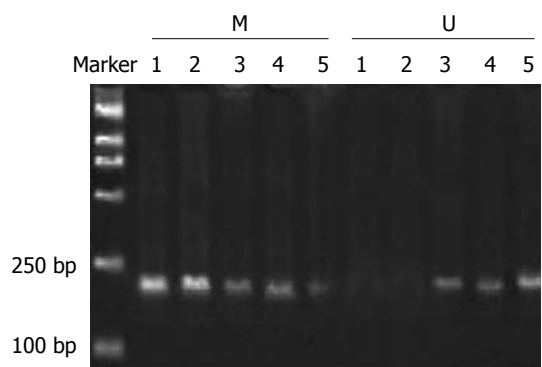


图 5 BGC823细胞在经5-Aza-CdR作用48 h后Apaf-1基因甲基化状态的改变. M: Apaf-1甲基化条带为212 bp; U: Apaf-1非甲基化条带为221 bp; 1-5: 对照组, 1×10^{-7} , 5×10^{-7} , 1×10^{-6} , 5×10^{-6} mol/L; Marker: DL2000.

蛋白的表达, 用药后, 蛋白表达明显增高, 其灰度值均上升30%以上, 而 5×10^{-7} 和 1×10^{-6} mmol/L的5-Aza-CdR处理组尤为明显, 并且在用药48和

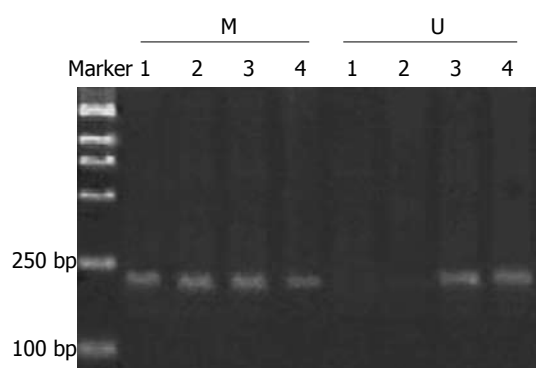


图 6 BGC823细胞在浓度为 10^{-6} mol/L的5-Aza-CdR处理前后Apaf-1基因甲基化状态. M: 甲基化条带212 bp; U: 非甲基化条带221 bp; 1: 对照组; 2: 用药后24 h; 3: 48 h; 4: 72 h; Marker: DL2000.

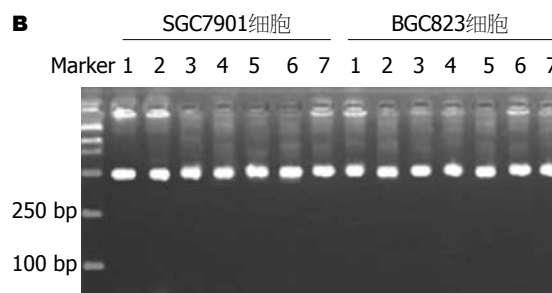
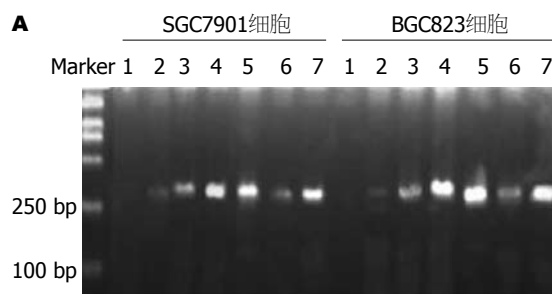


图 7 5-Aza-CdR作用SGC7901, BGC823细胞前后Apaf-1 mRNA和 β -actin mRNA的表达. A: Apaf-1 mRNA 334 bp; B: β -actin mRNA 498 bp; 1-5: 对照组, 1×10^{-7} , 5×10^{-7} , 1×10^{-6} , 5×10^{-6} mol/L的5-Aza-CdR作用48 h; 6, 7: 浓度为 1×10^{-6} 的药物作用24, 72 h.

72 h后, 该基因表达明显上升(图8).

3 讨论

因甲基化导致转录灭活的基因对DNA甲基化抑制剂非常敏感, 易重新活化^[15-20]. 理论上, 细胞基因如果仅出现高甲基化而无突变或缺失, 在去甲基化后基因能重新表达. 甲基化抑制剂是胞苷类似物5-Aza-CdR, 他的作用机制是能与DNA甲基转移酶共价结合, 降低DNA甲基转移酶的生物活性. 该药物目前已应用于白血病的治疗,

■应用要点

本实验提示可用去甲基化药物治疗实体肿瘤, 提示了5-Aza-CdR治疗胃癌的一个分子水平的药理作用, 对胃癌去甲基化治疗及今后研究提供了一定的理论依据.

■名词解释

表观遗传学: 1939年由Waddington首先提出, 目前认为表观遗传学是研究没有DNA序列变化, 可遗传的基因表达(活性)的改变。主要涉及DNA甲基化作用的改变和染色质组蛋白的修饰作用(乙酰化、甲基化、磷酸化)、基因印记等。研究表明肿瘤细胞基因组的异常甲基化, 染色质组蛋白的异常修饰及印记基因异常等表观遗传学改变同样参与细胞癌变这一过程, 并成为肿瘤细胞的一个重要特征。

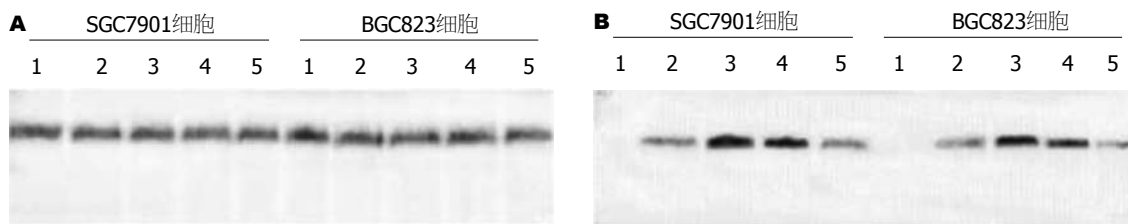


图8 SGC7901, BGC823细胞在5-Aza-CdR处理48 h后蛋白表达情况。A: β -actin蛋白表达情况; B: Apaf-1蛋白表达情况; 1-5: 对照组, 1×10^{-7} , 5×10^{-7} , 1×10^{-6} , 5×10^{-6} mol/L。

并取得了一定疗效^[21-22], 该药物对其他基因的去甲基化作用亦有多篇报道^[23-25]。本研究证实, 5-Aza-CdR对人胃癌细胞系SGC7901及BGC823有显著的增殖抑制和诱导凋亡的作用并呈浓度和时间依赖性。随着5-Aza-CdR的浓度与作用时间的增长, G_0/G_1 期细胞逐渐增加, 出现 G_0/G_1 期阻滞, 凋亡细胞显著增多。

肿瘤细胞凋亡受众多凋亡相关基因调控, 而凋亡有两条独立的途径: 一是死亡受体途径, 另一个是线粒体介导的凋亡途径。Apaf-1是作用在线粒体介导的凋亡途径中, 不同形式的细胞刺激信号促使线粒体释放细胞色素C, 后者在dATP/ATP存在的情况下结合信号接头分子Apaf-1, 启动Casp级联反应, 裂解核蛋白、细胞骨架、内质网等, 造成凋亡典型的形态学改变^[26-27]。目前, 该基因被认作是凋亡的核心, 是确切的抑癌基因^[28-30]。本实验用5-Aza-CdR作用于用MSP方法检测以证实Apaf-1存在甲基化的SGC7901细胞, BGC823细胞, 发现该药物能成功逆转Apaf-1基因启动子的甲基化状态, 使该基因得以开放, Apaf-1的mRNA和蛋白得以重新表达, 并且存在对该药物的作用时间和浓度的一定的相关性, 但是以药物浓度 5×10^{-7} mmol/L和 10^{-6} mmol/L在用药48和72 h效果最好, 并且基因的表达状况与细胞的生长状况平行。由此证明, 5-Aza-CdR能够使SGC7901细胞, BGC823细胞中Apaf-1基因去甲基化, 使基因恢复其转录活性, 从而能够发挥Apaf-1的肿瘤抑制作用。另外也证明该基因在此两株细胞中蛋白表达下降是与该基因的甲基化存在明确的关系, 而对该基因的蛋白表达调控主要存在DNA转录途径。

总之, 5-Aza-CdR抑制胃癌细胞SGC7901, BGC823增殖及诱导凋亡的机制可能与干扰细胞周期、提高Apaf-1基因表达有关。我们认为, Apaf-1基因在胃癌细胞系中的失表达与其启动子CpG岛的异常甲基化修饰有关, 5-Aza-CdR去

甲基化能恢复Apaf-1基因的功能。这也为胃癌的诊断及去甲基化治疗提供了依据。

4 参考文献

- Guzman P, Araya J, Villaseca M, Roa I, Melo A, Munoz S, Roa J. Immunohistochemical expression of the E-cadherin-catenin complex in gastric cancer. *Rev Med Chil* 2006; 134: 1002-1009
- Nakajima T, Maekita T, Oda I, Gotoda T, Yamamoto S, Umemura S, Ichinose M, Sugimura T, Ushijima T, Saito D. Higher methylation levels in gastric mucosae significantly correlate with higher risk of gastric cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 2317-2321
- Li M, Liu W, Zhu YF, Chen YL, Zhang BZ, Wang R. Correlation of COX-2 and K-ras expression to clinical outcome in gastric cancer. *Acta Oncol* 2006; 45: 1115-1119
- Tang LP, Cho CH, Hui WM, Huang C, Chu KM, Xia HH, Lam SK, Rashid A, Wong BC, Chan AO. An Inverse Correlation between Interleukin-6 and Select Gene Promoter Methylation in Patients with Gastric Cancer. *Digestion* 2006; 74: 85-90
- Ma B, Zhao JS, Ding DY. Application of proteomics in the research of discrepancy proteins in gastric cancer. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi* 2006; 9: 534-537
- Ding YB, Xia JG, Chen GY. Effect of spleen tyrosine kinase expression re-activation by inhibition of DNA methylation on oncogenesis growth of gastric cancer. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi* 2006; 9: 523-526
- Nzengue JC, Zhan WH, Wang JP, Dong WG, Lan P, He YL, Chen ZX, Cai SR. Metastasis rates of lymph nodes and distribution in advanced gastric cancer and its clinical significance. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi* 2006; 9: 506-509
- 滕玥, 戴冬秋. 胃癌表观遗传学的研究进展. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2289-2293
- 关志宇, 戴冬秋. 胃癌TIMP3基因启动子甲基化及其蛋白表达的研究. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 138-143
- 赵成海, 张宁, 卜献民, 李岩, 张海鹏. 胃癌多基因甲基化状态分析. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1004-1007
- Bender CM, Pao MM, Jones PA. Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines. *Cancer Res* 1998; 58: 95-101
- 黄带发, 富伟能, 尚超, 徐振明, 李增刚, 孙开来. 喉鳞癌Apaf-1基因表达及启动子区甲基化研究. *遗传学报* 2004; 31: 1327-1331
- Yu J, Zhang HY, Ma ZZ, Lu W, Wang YF, Zhu JD.

- Methylation profiling of twenty four genes and the concordant methylation behaviours of nineteen genes that may contribute to hepatocellular carcinogenesis. *Cell Res* 2003; 13: 319-333
- 14 Furukawa Y, Sutheesophon K, Wada T, Nishimura M, Saito Y, Ishii H, Furukawa Y. Methylation silencing of the Apaf-1 gene in acute leukemia. *Mol Cancer Res* 2005; 3: 325-334
- 15 Jones PA. DNA methylation errors and cancer. *Cancer Res* 1996; 56: 2463-2467
- 16 Okino ST, Pookot D, Li LC, Zhao H, Urakami S, Shiina H, Igawa M, Dahiya R. Epigenetic inactivation of the dioxin-responsive cytochrome P4501A1 gene in human prostate cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 7420-7428
- 17 Wu Y, Meng L, Wang H, Xu Q, Wang S, Wu S, Xi L, Zhao Y, Zhou J, Xu G, Lu Y, Ma D. Regulation of DNA methylation on the expression of the FHIT gene contributes to cervical carcinoma cell tumorigenesis. *Oncol Rep* 2006; 16: 625-629
- 18 Zhang X, Yashiro M, Ohira M, Ren J, Hirakawa K. Synergic antiproliferative effect of DNA methyltransferase inhibitor in combination with anticancer drugs in gastric carcinoma. *Cancer Sci* 2006; 97: 938-944
- 19 Zheng QH, Ma LW, Zhu WG, Zhang ZY, Tong TJ. p21Waf1/Cip1 plays a critical role in modulating senescence through changes of DNA methylation. *J Cell Biochem* 2006; 98: 1230-1248
- 20 Stresemann C, Brueckner B, Musch T, Stopper H, Lyko F. Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. *Cancer Res* 2006; 66: 2794-2800
- 21 Wijermans PW, Krulder JW, Huijgens PC, Neve P. Continuous infusion of low-dose 5-Aza-2'-deoxycytidine in elderly patients with high-risk myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 1997; 11: 1-5
- 22 Momparler RL. Epigenetic therapy of cancer with 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Semin Oncol* 2005; 32: 443-451
- 23 杨丽, 朱红音, 程中华, 陆嵘, 陈紫晖, 房静远. 人胃癌细胞肿瘤相关基因的表达与甲基化调控. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1493-1498
- 24 党艳丽, 马晓旗, 毕红梅, 郑维国, 辛小燕. 5-氮胞苷对宫颈癌细胞系DAPK1异常甲基化的影响. 西安交通大学学报(医学版) 2005; 26: 48-51
- 25 吕国丽, 文剑明, 张萌, 胥健敏, 徐若冰, 董愉. 5Aza-dc对癌细胞TIMP-3启动子去甲基化的作用. 中国病理生理杂志 2005; 21: 1763-1768
- 26 Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996; 86: 147-157
- 27 Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91: 479-489
- 28 Leo C, Richter C, Horn LC, Schutz A, Pilch H, Hockel M. Expression of Apaf-1 in cervical cancer correlates with lymph node metastasis but not with intratumoral hypoxia. *Gynecol Oncol* 2005; 97: 602-606
- 29 Mustika R, Budiyo A, Nishigori C, Ichihashi M, Ueda M. Decreased expression of Apaf-1 with progression of melanoma. *Pigment Cell Res* 2005; 18: 59-62
- 30 Shi Y. Mechanical aspects of apoptosome assembly. *Curr Opin Cell Biol* 2006; 18: 677-684

■同行评价

本文通过5-Aza-CdR对胃癌细胞系生长及Apaf-1基因异常甲基化的影响, 探讨5-Aza-CdR对胃癌细胞周期及诱导凋亡的作用, 以及Apaf-1基因表达与甲基化在致癌中的作用. 本研究思路清晰, 科学性较强, 结果可信, 有一定价值.

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志关于作者署名的声明

本刊讯 世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 第一方面是直接参与, 包括: (1)酝酿和设计实验; (2)采集数据; (3)分析/解释数据. 第二方面是文章撰写, 包括: (1)起草文章; (2)对文章的知识性内容作批评性审阅. 第三方面是工作支持, 包括: (1)统计分析; (2)获取研究经费; (3)行政、技术或材料支持; (4)指导; (5)支持性贡献. 每个人必须在第一至第三方面至少具备一条, 才能成为文章的署名作者. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者. (世界胃肠病学杂志社2007-01-08)

急性肝损伤大鼠肝脏血红素加氧酶-1/一氧化碳系统的变化及意义

吴煜, 李琳, 温韬, 李跃旗

■背景资料

血红素加氧酶(HO)是催化血红素产生一氧化碳、胆红素和铁离子的一种限速酶,其中HO-1为诱导型,又称为热休克蛋白32,可在氧化应激或其他病理因素的诱导下大量表达。研究发现,HO-1/CO体系参与机体多种组织器官的病理生理反应,并可能有重要的细胞保护作用,是近年来的研究热点。目前HO-1/CO体系在大鼠急性肝损伤过程中的动态变化尚未见报道。

吴煜, 李琳, 李跃旗, 解放军302医院门诊部 北京市 100039
温韬, 北京大学第三医院消化中心 北京市 100083
吴煜, 主治医师, 研究方向为肝病的发病机制及诊治。
通讯作者: 李跃旗, 100039, 北京市, 解放军302医院门诊部。
springmaze@gmail.com
电话: 010-66933391
收稿日期: 2006-09-08 接受日期: 2006-11-16

Changes in expression of heme oxygenase-1 and production of carbon monoxide in rats with acute liver injury induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide

Yu Wu, Lin Li, Tao Wen, Yue-Qi Li

Yu Wu, Lin Li, Yue-Qi Li, Department of infectious diseases, the 302nd Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China

Tao Wen, Research Center of Digestive Diseases, the Third Hospital of Peking University, Beijing 100083, China

Correspondence to: Yue-Qi Li, Department of Infectious Diseases, the 302nd Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China. springmaze@gmail.com

Received: 2006-09-08 Accepted: 2006-11-16

Abstract

AIM: To investigate the changes of heme oxygenase-1 (HO-1) expression and carbon monoxide (CO) production in acute liver injury induced by D-galactosamine (GalN) and Lipopolysaccharide (LPS), and explore the role of HO-1/CO system in the pathogenesis of liver injury.

METHODS: GalN (700 mg/kg body weight) and LPS (50 µg/kg body weight) were used to establish the models of acute liver injury in male rats by intraperitoneal injection. Liver injury was assessed biochemically and histologically. HO-1 activity in liver homogenate was examined at different time points following GalN/LPS treatment and the expression of HO-1 protein was determined by Western blot. The activity of super oxide dismutase (SOD) and the content of malondialdehyde (MDA) in liver tissues were

also examined at the same time.

RESULTS: Administration of GalN/LPS caused severe hepatic damage, characterized by significant elevation of serum alanine aminotransferase (ALT: 10872.5 ± 708.5 nkat/L *vs* 1043.5 ± 247.4 nkat/L, $P < 0.01$), aspartate aminotransferase (AST: 9246.8 ± 814.7 nkat/L *vs* 1278.6 ± 273.8 nkat/L, $P < 0.01$) levels and hepatic MDA content (5.06 ± 1.21 µmol/g *vs* 2.03 ± 0.59 µmol/g, $P < 0.01$) as well as a remarkable reduction of liver SOD activity (813.7 ± 168.3 nkat/mg *vs* 1248.2 ± 84.9 nkat/mg, $P < 0.01$) at 24 hours as compared with those in the control group. HO-1 activity was elevated significantly after modeling, showing a time-dependent manner from 6 to 24 hours (4.02 ± 0.74 , 5.97 ± 1.51 , 6.13 ± 1.18 µmol/g *vs* 2.86 ± 0.41 µmol/g), while expression of HO-1 protein was increased remarkably from 6 to 24 hours (24 h: 1.87 ± 0.39 *vs* 0.37 ± 0.09 , $P < 0.01$), which was demonstrated by Western blot analysis. Endogenous CO concentration in the liver of control rats remained very low but was elevated significantly after GalN/LPS treatment (6, 12, 24 h: 0.373 ± 0.112 , 0.474 ± 0.152 , 0.513 ± 0.193 µmol/g *vs* 0.172 ± 0.041 µmol/g, $P < 0.01$), which was in accordance with the changes of HO-1.

CONCLUSION: HO-1 activity and protein as well as CO production are increased significantly in rats with acute liver injury induced by GalN/LPS, suggesting that HO-1/CO system plays an important role in the pathogenesis of acute hepatic damage.

Key Words: Liver injury; Heme oxygenase-1; Carbon monoxide; D-galactosamine; Lipopolysaccharide

Wu Y, Li L, Wen T, Li YQ. Changes in expression of heme oxygenase-1 and production of carbon monoxide in rats with acute liver injury induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(3):228-233

摘要

目的: 研究急性肝损伤时大鼠肝脏HO-1/CO系

统的变化规律,探讨HO-1和内源性CO的作用机制及其病理生理意义。

方法:采用D-氨基半乳糖(GalN)和脂多糖(LPS)联合腹腔注射制备大鼠急性肝损伤模型,动态测定各时间点(3, 6, 12, 24, 36 h)大鼠肝脏HO-1活性和蛋白表达情况,测定肝脏CO浓度以及血清ALT, AST水平和肝组织SOD活性、MDA含量变化。

结果:GalN和LPS联合注射成功诱导了大鼠急性肝损伤,表现为染毒24 h时大鼠血清ALT, AST水平以及肝组织MDA浓度显著升高(10872.5 ± 708.5 nkat/L, 9246.8 ± 814.7 nkat/L, 5.06 ± 1.21 $\mu\text{mol/g}$ vs 1043.5 ± 247.4 nkat/L, 1278.6 ± 273.8 nkat/L, 2.03 ± 0.59 $\mu\text{mol/g}$, 均 $P < 0.01$), SOD活性明显下降(813.7 ± 168.3 nkat/mg vs 1248.2 ± 84.9 nkat/mg, $P < 0.01$), HE染色显示肝细胞出现严重损伤。染毒3-24 h大鼠肝脏HO-1活性明显增强, 6-24 h呈现一定的时间依赖方式(4.02 ± 0.74 , 5.97 ± 1.51 , 6.13 ± 1.18 $\mu\text{mol/g}$ vs 2.86 ± 0.41 $\mu\text{mol/g}$); Western blot测定结果亦显示, HO-1蛋白表达显著增强, 24 h时明显高于正常对照组(1.87 ± 0.39 vs 0.37 ± 0.09 , $P < 0.01$)。正常大鼠肝脏的CO浓度极低, 染毒后以时间依赖方式开始升高, 并显著高于正常对照组(0.373 ± 0.112 , 0.474 ± 0.152 , 0.513 ± 0.193 $\mu\text{mol/g}$ vs 0.172 ± 0.041 $\mu\text{mol/g}$, $P < 0.01$), 这与HO-1表达情况相一致。

结论:大鼠急性肝损伤时出现HO-1活性增加和蛋白表达持续上调以及CO浓度迅速增高,提示HO-1/CO系统参与急性肝损伤的病理生理过程,其表达增加可能对机体有重要调节作用。

关键词:肝损伤; 血红素加氧酶-1; 一氧化碳; D-氨基半乳糖; 脂多糖

吴煜, 李琳, 温韬, 李跃旗. 急性肝损伤大鼠肝脏血红素加氧酶-1/一氧化碳系统的变化及意义. 世界华人消化杂志 2007;15(3):228-233
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/228.asp>

0 引言

血红素加氧酶(heme oxygenase, HO)是催化血红素产生一氧化碳(CO)、胆红素和铁离子的一种限速酶。HO-1为诱导型,又称为热休克蛋白32(HSP32),可在氧化应激或其他病理因素的诱导下大量表达^[1-5],进而促进血红素分解代谢,使内源性CO、胆红素等生成增加。近年研究发现,HO-1/CO诱导表达参与机体多种组织器官的病

理生理反应,并可能有重要的细胞保护作用。目前关于HO-1/CO系统在急性肝损伤过程中的确切变化尚不清楚,本次研究采用D-氨基半乳糖(GalN)和脂多糖(LPS)联合腹腔注射制备大鼠急性肝损伤模型,通过研究肝脏HO-1活性、蛋白表达和内源性CO浓度变化情况,同时,结合肝功能、氧化应激等指标,拟系统探讨HO-1/CO系统在急性肝损伤发生机制中的可能作用及其病理生理意义,以期深入研究急性肝损伤的发生机制及干预等提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂Wistar大鼠,体质量250-300 g(中国科学院动物研究所提供),在恒温(25℃)、光照周期12-12 h环境中饲养1 wk后实验,实验前12 h和实验期间禁食,自由饮水。GalN、LPS、血晶素(hemin)、血红蛋白、NADPH、6-磷酸葡萄糖和6-磷酸葡萄糖脱氢酶等试剂均购自美国Sigma公司,兔抗鼠HO-1多克隆抗体购自美国Santa Cruze公司。SOD和MDA试剂盒购自南京建成生物公司。动物分组和模型制备:随机将大鼠分为正常对照组和实验组,实验组又按不同时间点分为3, 6, 12, 24, 36 h 5个亚组,每组各5只。GalN临用前溶于生理盐水,调pH值为7.2-7.4,按700 mg/kg体质量给予大鼠腹腔注射;同时配制LPS溶液,按50 $\mu\text{g/kg}$ 剂量腹腔注射以诱发大鼠肝损伤反应。在不同时间点取大鼠肝组织,部分于40 g/L甲醛溶液固定,石蜡包埋,以制备组织切片;另取部分新鲜肝组织拟测定HO-1活性和CO含量,其余肝组织立即投入液氮冻存,待制备组织匀浆;同时采集大鼠股静脉血,于3000 r/min离心10 min后留取上清-70℃冻存待测。

1.2 方法

1.2.1 大鼠肝脏HO-1活性测定 取新鲜肝组织,采用超高速离心法提取肝组织微粒体并测定蛋白浓度(Bradford法);冰浴下加入胆绿素还原酶、NADPH、6-磷酸葡萄糖、6-磷酸葡萄糖脱氢酶和血晶素,充分混匀,于37℃水浴,避光反应20 min,冰浴终止反应。然后用双波长分光光度计测定 A_{464} 和 A_{530} 的吸光度差值,最后根据公式计算HO-1活性。

1.2.2 采用Western blot测HO-1蛋白表达 用细胞裂解液制备大鼠肝组织匀浆,4℃高速离心后留取上清并进行蛋白定量;取50 μg 蛋白经SDS-PAGE电泳、转膜、封闭,然后以兔抗鼠HO-1多克隆抗体(1:500稀释)进行孵育,PBST漂洗后

■ 研发前沿

大量研究显示,HO-1/CO体系具广泛的生物学效应,参与机体各系统的病理生理反应;HO-1及其代谢产物CO、胆红素和铁离子等均可对机体产生保护作用,有利于减少细胞死亡、蛋白质氧化及脂质过氧化等。

■应用要点

通过研究HO-1/CO体系的动态变化,可初步阐明急性肝损伤发病过程中的一些分子机制,并有利于在此基础上进一步深入探讨CO、胆红素等分解产物是否具备肝保护作用,从而进一步验证前面的研究,并为临床干预等提供科学依据。

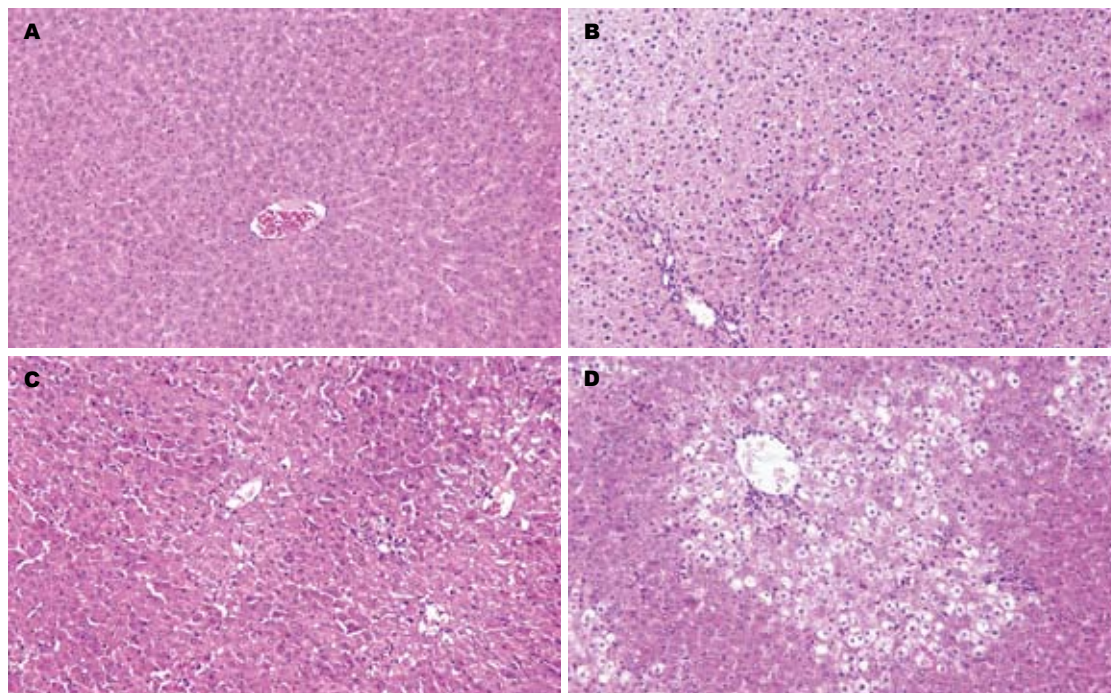


图1 GaIN/LPS染毒大鼠肝组织病理变化(H&E × 200)。A: 正常大鼠肝组织结构; B: 染毒3 h; C: 染毒12 h; D: 染毒24 h。

以辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG抗体(中山生物技术有限公司提供, 1:2000稀释)进行二抗反应。最后在暗室中以ECL发光液(Pierce公司)进行显色、曝光,并用Bio-Rad图像分析系统对所得区带进行扫描,经 β -actin校正后,比较各组的积分光密度值。

1.2.3 大鼠肝组织的CO含量测定 取新鲜肝组织,用预冷PBS缓冲液冲洗后在冰浴条件下迅速匀浆;取匀浆液加入血红蛋白溶液充分混匀,再加入连二亚硫酸钠溶液混匀后静置10 min,然后在分光光度计上测 A_{564} 和 A_{582} 的吸光度差值,最后根据公式计算CO含量。

1.2.4 肝组织超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)含量测定 SOD活性测定采用黄嘌呤氧化酶法,MDA含量测定采用硫代巴比妥酸法,具体操作参见说明书进行。

1.2.5 血清ALT, AST测定 采用全自动生化分析仪测定不同时间点大鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)变化。

1.2.6 病理学变化 以石蜡包埋的肝组织标本制备4 μ m切片,HE染色,光学显微镜下观察组织损伤情况。

统计学处理 所有数据以均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示,以SPSS统计软件进行分析处理。

2 结果

正常大鼠肝脏体积正常,呈鲜红色,表面光滑、

边缘整齐,组织切片显示肝细胞、汇管区、胆管上皮细胞等形态结构完整,未见变性、坏死以及炎性细胞浸润等。大鼠腹腔联合注射GaIN/LPS后3 h,即观察到有部分肝细胞出现胞质疏松化,嗜酸变性等;12-24 h肝损伤最为加重,表现为肝组织结构紊乱,大量肝细胞肿胀变性,肝小叶内有不同程度的细胞凋亡及坏死,汇管区可见大量炎性细胞浸润等(图1)。

2.1 大鼠血清ALT, AST水平和肝脏SOD活性, MDA浓度变化 生化指标检测结果表明,大鼠血清ALT, AST水平在给予GaIN/LPS后3 h即开始升高,24 h达高峰,36 h时仍处于高水平,和正常对照组相比差异十分显著。同时大鼠肝组织SOD活性降低,MDA含量相应升高,并随着时间延长肝损伤加重,这种变化趋势更为明显,和正常对照组相比差异亦十分显著(表1)。

2.2 肝组织中HO-1活性和蛋白变化 研究结果表明,大鼠染毒3 h后肝脏HO-1活性即开始增强,其变化呈一定的时间依赖方式,并在6-36 h内均显著高于对照组,差异有统计学意义(表2)。同时,Western blot测定结果显示,正常大鼠肝脏有HO-1蛋白表达,染毒3 h后HO-1蛋白表达开始增强,24-36 h表达至高峰,均显著高于正常对照组(图2)。

2.3 肝脏CO生成变化 在生理条件下大鼠肝脏中有CO生成,但含量极低;大鼠染毒后6-36 h内,肝脏CO生成量均明显增加,呈一定的时间依赖方

表 1 急性肝损伤大鼠血清ALT, AST水平和肝脏SOD活性、MDA浓度变化(mean ± SD, n = 5)				
分组	ALT (nkat/L)	AST (nkat/L)	SOD (nkat/mg)	MDA (μmol/g)
对照组	1043.5 ± 247.4	1278.6 ± 273.8	1248.2 ± 84.9	2.03 ± 0.59
3 h	1736.8 ± 371.2 ^b	2314.3 ± 421.8 ^b	1157.7 ± 157.6	2.57 ± 1.41
6 h	7148.5 ± 576.7 ^b	6902.6 ± 581.7 ^b	975.4 ± 173.1 ^b	4.43 ± 1.37 ^b
12 h	9754.8 ± 672.9 ^b	8746.2 ± 712.3 ^b	845.6 ± 214.7 ^b	4.87 ± 1.47 ^b
24 h	10872.5 ± 708.5 ^b	9246.8 ± 814.7 ^b	813.7 ± 168.3 ^b	5.06 ± 1.21 ^b
36 h	9024.7 ± 698.3 ^b	8142.8 ± 597.4 ^b	974.6 ± 172.8 ^b	3.89 ± 1.13 ^b

^b*P* < 0.01 vs 对照组.

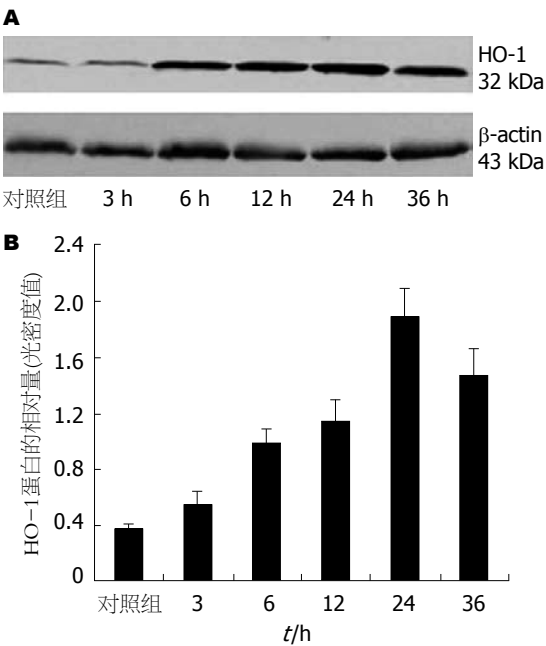


图 2 Western blot检测急性肝损伤大鼠肝脏HO-1蛋白表达变化. A: HO-1蛋白的免疫印迹图; B: HO-1蛋白表达的相对光密度值.

式, 并显著高于正常对照组, 差异有统计学意义(表2).

3 讨论

HO是一种催化血红素的起始酶和限速酶, 有着重要的生物学作用. HO在体内主要有3种同工酶形式, 即HO-1, HO-2和HO-3; 这3种酶是不同基因的表达产物, 但均能作用于血红素, 将其分解产生相同摩尔数的生物活性分子: CO、胆红素和铁离子^[1-5]. HO-1又称为热休克蛋白32, 是迄今为止发现的生物体内最容易被诱导产生的抗氧化酶; 大量研究表明, 凡能引起细胞活性氧水平增加的外来刺激, 或是导致细胞谷胱甘肽水平下降的因素, 如缺氧、高氧、重金属、内毒素等, 都可以使HO-1基因表达增加. HO-2在脑和

■同行评价
GalN/LPS联合诱导大鼠急性肝损伤与临床上病毒性肝炎的病理变化十分相似, 因此研究HO-1/CO体系在此模型中的动态变化, 将为深入探讨病毒性肝炎的损伤机制提供新的干预途径和研究思路, 并为今后临床上药物的开发应用提供重要线索. 本文设计合理, 方法较先进, 结论有意义.

表 2 急性肝损伤大鼠肝脏HO活性和CO浓度变化(mean ± SD, n = 5)		
分组	HO (μmol/g)	CO (μmol/g)
对照组	2.86 ± 0.41	0.17 ± 0.04
3 h	3.19 ± 0.88	0.23 ± 0.09
6 h	4.02 ± 0.74 ^b	0.37 ± 0.11 ^b
12 h	5.97 ± 1.51 ^b	0.47 ± 0.15 ^b
24 h	6.13 ± 1.18 ^b	0.51 ± 0.19 ^b
36 h	5.47 ± 0.69 ^b	0.48 ± 0.19 ^b

^b*P* < 0.01 vs 对照组.

前列腺中含量最高, 是生理条件下的主要存在形式; HO-3是近些年发现的另一种异构酶, 亦为组成型, 多种诱导因素均不能诱导其表达增高, 其具体生理特性还有待于进一步研究^[6-10]. 近年来, HO-1/CO系统的生理特性受到广泛关注; 研究证实, HO-1在多种疾病发生、发展过程中大量表达, 对机体可产生保护作用, 有利于减少细胞死亡、蛋白质氧化及脂质过氧化等^[11-15]. 本次实验采用GalN/LPS联合注射建立大鼠急性肝损伤模型, 探讨急性肝损伤时大鼠肝脏HO-1/CO系统的变化规律, 同时结合肝功能、氧化应激等指标, 以深入研究HO-1/CO系统在中毒性肝损伤发病中的地位及其调控机制.

目前认为, GalN/LPS联合应用所诱导的肝损伤模型与临床上病毒性肝炎的肝脏病理变化十分相似, 因此常用于研究肝损伤的发病机制和评估临床新药的疗效, 其损伤机制可能与GalN在细胞内与磷酸尿苷结合形成复合物, 致使磷酸尿苷耗竭, RNA和蛋白合成障碍, 进而导致肝细胞坏死有关^[16-17]. 研究结果显示, 大鼠给予GalN/LPS后诱导了严重的肝脏损伤, 表现为血清ALT, AST水平显著升高, 组织病理学出现典型的肝细胞坏死表现等. 大鼠肝脏HO-1活性

在染毒后6-36 h内均明显增强,显著高于正常对照组,差异有统计学意义;Western blot亦证实,肝脏HO-1蛋白表达以一定的时间依赖方式明显增加,和正常对照组相比差异十分显著,这和HO-1活性的变化趋势相一致.同时研究结果还表明,大鼠肝脏CO在GalN/LPS染毒之后生成量明显增加,与对照组相比差异显著,其变化趋势和HO-1变化一致,因而提示HO-1诱导表达可能是导致内源性CO水平升高的主要原因.

在应激状态下肝脏HO-1活性增加和蛋白表达上调,对机体可能有重要保护作用,这是因为HO-1催化血红素分解的三种产物均具有重要生理功能,如胆红素具备抗氧化功能,是有效的自由基清除剂;铁能诱导产生铁蛋白与游离的铁结合,减少氧化应激产生的自由铁,从而中和其氧化毒性;内源性CO则是一种更为重要的气体信使分子,在体内具有广泛的生物学活性^[18-22],如CO不仅可通过直接舒张血管平滑肌细胞,调节血管张力、维持血管紧张度,还能参与神经递质的传递、氧应激、血小板的激活及松弛平滑肌等^[22-25].大量生成的CO可通过自分泌或旁分泌方式扩散,在肝脏的损伤过程中发挥重要的生理效应,这将有利于提高机体防御反应,减轻肝损伤,因此是一正性因子.

目前有关HO-1/CO系统在急性肝损伤中被激活的具体机制尚不清楚,有研究认为,肝损伤时循环中细胞因子及内毒素增多可激活HO-1 mRNA翻译和蛋白表达^[26-28];此外,自由基生成增加可能也是诱导HO-1表达的另一重要因素^[29-30],这与本次研究中SOD(自由基清除剂)活性显著降低和MDA(脂质过氧化产物)含量增加的结果相吻合.

总之,HO-1/CO系统参与了大鼠急性肝损伤的病理生理过程;HO-1表达增加和CO水平升高可能有利于机体抗氧化应激作用,其确切机制和作用途径值得深入探讨.我们在以后的实验中将进一步研究HO-1抑制剂或激动剂对急性肝损伤的干预作用,以及内源性CO或胆红素的临床应用价值等,从而可为进一步探讨急性肝损伤的发病机制和临床干预等提供科学线索.

4 参考文献

- 1 Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M. Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 558-567
- 2 Zuckerbraun BS, Billiar TR. Heme oxygenase-1: a cellular Hercules. *Hepatology* 2003; 37: 742-744
- 3 田德安, 周晓黎. 实验性肝硬化大鼠小肠血红素氧合

酶的表达. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 351-354

- 4 Tosaki A, Das DK. The role of heme oxygenase signaling in various disorders. *Mol Cell Biochem* 2002; 232: 149-157
- 5 Fujii H, Takahashi T, Nakahira K, Uehara K, Shimizu H, Matsumi M, Morita K, Hirakawa M, Akagi R, Sassa S. Protective role of heme oxygenase-1 in the intestinal tissue injury in an experimental model of sepsis. *Crit Care Med* 2003; 31: 893-902
- 6 Nakahira K, Takahashi T, Shimizu H, Maeshima K, Uehara K, Fujii H, Nakatsuka H, Yokoyama M, Akagi R, Morita K. Protective role of heme oxygenase-1 induction in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 1091-1105
- 7 Sass G, Seyfried S, Parreira Soares M, Yamashita K, Kaczmarek E, Neuhuber WL, Tiegs G. Cooperative effect of biliverdin and carbon monoxide on survival of mice in immune-mediated liver injury. *Hepatology* 2004; 40: 1128-1135
- 8 Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, Tobiasch E, Bach FH, Choi AM, Soares MP. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* 2000; 192: 1015-1026
- 9 Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA, Choi AM. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 2000; 6: 422-428
- 10 Ryter SW, Otterbein LE. Carbon monoxide in biology and medicine. *Bioessays* 2004; 26: 270-280
- 11 Wen T, Guan L, Zhang YL, Zhao JY. Dynamic changes of heme oxygenase-1 and carbon monoxide production in acute liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Toxicology* 2006; 228: 51-57
- 12 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
- 13 姜柳琴, 林琳. 血红素氧合酶/一氧化碳体系在胃肠道中的作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1612-1616
- 14 Kim HS, Loughran PA, Kim PK, Billiar TR, Zuckerbraun BS. Carbon monoxide protects hepatocytes from TNF-alpha/Actinomycin D by inhibition of the caspase-8-mediated apoptotic pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 344: 1172-1178
- 15 Sass G, Soares MC, Yamashita K, Seyfried S, Zimmermann WH, Eschenhagen T, Kaczmarek E, Ritter T, Volk HD, Tiegs G. Heme oxygenase-1 and its reaction product, carbon monoxide, prevent inflammation-related apoptotic liver damage in mice. *Hepatology* 2003; 38: 909-918
- 16 Tsuchihashi S, Fondevila C, Kupiec-Weglinski JW. Heme oxygenase system in ischemia and reperfusion injury. *Ann Transplant* 2004; 9: 84-87
- 17 Zuckerbraun BS, McCloskey CA, Gallo D, Liu F, Ifedigbo E, Otterbein LE, Billiar TR. Carbon monoxide prevents multiple organ injury in a model of hemorrhagic shock and resuscitation. *Shock* 2005; 23: 527-532
- 18 Fondevila C, Shen XD, Tsuchiyashi S, Yamashita K, Csizmadia E, Lassman C, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW, Bach FH. Biliverdin therapy protects rat livers from ischemia and reperfusion injury. *Hepatology* 2004; 40: 1333-1341

- 19 Zuckerbraun BS, Billiar TR, Otterbein SL, Kim PK, Liu F, Choi AM, Bach FH, Otterbein LE. Carbon monoxide protects against liver failure through nitric oxide-induced heme oxygenase 1. *J Exp Med* 2003; 198: 1707-1716
- 20 Bak I, Varadi J, Nagy N, Vecsernyes M, Tosaki A. The role of exogenous carbon monoxide in the recovery of post-ischemic cardiac function in buffer perfused isolated rat hearts. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2005; 51: 453-459
- 21 Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, Bach FH. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol* 2003; 24: 449-455
- 22 Ryter SW, Otterbein LE, Morse D, Choi AM. Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Mol Cell Biochem* 2002; 234-235: 249-263
- 23 Hegazi RA, Rao KN, Mayle A, Sepulveda AR, Otterbein LE, Plevy SE. Carbon monoxide ameliorates chronic murine colitis through a heme oxygenase 1-dependent pathway. *J Exp Med* 2005; 202: 1703-1713
- 24 Mazzola S, Forni M, Albertini M, Bacci ML, Zannoni A, Gentilini F, Lavitrano M, Bach FH, Otterbein LE, Clement MG. Carbon monoxide pretreatment prevents respiratory derangement and ameliorates hyperacute endotoxic shock in pigs. *FASEB J* 2005; 19: 2045-2047
- 25 Nakao A, Choi AM, Murase N. Protective effect of carbon monoxide in transplantation. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 650-671
- 26 Amersi F, Shen XD, Anselmo D, Melinek J, Iyer S, Southard DJ, Katori M, Volk HD, Busuttil RW, Buelow R, Kupiec-Weglinski JW. Ex vivo exposure to carbon monoxide prevents hepatic ischemia/reperfusion injury through p38 MAP kinase pathway. *Hepatology* 2002; 35: 815-823
- 27 Park JH, Oh SM, Lim SS, Lee YS, Shin HK, Oh YS, Choe NH, Park JH, Kim JK. Induction of heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effects of the ethanol extract of *Rubus coreanus* in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351: 146-152
- 28 Farombi EO, Surh YJ. Heme oxygenase-1 as a potential therapeutic target for hepatoprotection. *J Biochem Mol Biol* 2006; 39: 479-491
- 29 Naito Y, Takagi T, Yoshikawa T. Heme oxygenase-1: a new therapeutic target for inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 1: 177-184
- 30 Tamion F, Richard V, Renet S, Thuillez C. Protective effects of heme-oxygenase expression against endotoxic shock: inhibition of tumor necrosis factor-alpha and augmentation of interleukin-10. *J Trauma* 2006; 61: 1078-1084

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

欢迎订阅 2007 年《世界华人消化杂志》

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

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

《世界华人消化杂志》2007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人员及科教人员、各大图书馆订阅。联系地址:100023,北京市2345信箱,世界胃肠病学杂志社。联系电话:010-85381901-1020;传真:010-85381893;E-mail: wjcd@wjgnet.com;网址: www.wjgnet.com.

一种结肠炎相关的结肠癌模型的复制

李宇华, 刘莉, 冯娟, 王庆伟, 孙阳, 曹蔚, 王志鹏, 张蓉, 刘振国, 梅其炳

■背景资料

结肠炎的反复发作是结肠癌形成的重要诱因之一, 结肠炎相关的结肠癌模型复制对于结肠癌机制研究以及结肠癌药物研制至关重要。

李宇华, 刘莉, 冯娟, 王庆伟, 孙阳, 曹蔚, 王志鹏, 张蓉, 刘振国, 梅其炳, 解放军第四军医大学药理学教研室 陕西省西安市 710032

李宇华, 硕士研究生, 主要从事分子药理学方面的研究。

通讯作者: 梅其炳, 710032, 陕西省西安市, 解放军第四军医大学药理学教研室. qbmei@fmmu.edu.cn

电话: 029-84774552

收稿日期: 2006-10-25 接受日期: 2006-11-28

A novel model of colitis-related colorectal cancer

Yu-Hua Li, Li Liu, Juan Feng, Qing-Wei Wang, Yang Sun, Wei Cao, Zhi-Peng Wang, Rong Zhang, Zhen-Guo Liu, Qi-Bing Mei

Yu-Hua Li, Li Liu, Juan Feng, Qing-Wei Wang, Yang Sun, Wei Cao, Zhi-Peng Wang, Rong Zhang, Zhen-Guo Liu, Qi-Bing Mei, Department of Pharmacology, School of Pharmacy, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Qi-Bing Mei, Department of Pharmacology, School of Pharmacy, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. qbmei@fmmu.edu.cn

Received: 2006-10-25 Accepted: 2006-11-28

Abstract

AIM: To duplicate a colitis-related colorectal cancer model that is cheap, simple and accessible.

METHODS: A total of 320 male ICR mice were randomly divided into 7 experimental groups (group A-G) and 1 control group. Groups A, B and C were given a single intraperitoneal injection of 1, 2-dimethylhydrazine (DMH) at the dose of 10, 15 and 20 mg/kg body weight, respectively. one week after injection, the animals in group A, B and C were treated with 20 g/L dextran sodium sulfate (DSS) in drinking water for consecutive 7 days. Group D, E and F were administered with DMH 10, 15 and 20 mg/kg body weight only, respectively. Group G was given 20 g/L DSS only. The weight and food intake of mice in each group were recorded every week. Several mice were killed to observed the progression to carcinoma of colitis in week 4, 9 and 13. All the mice were executed for observation in week 20.

RESULTS: After administered with DMH and DSS, the bloody stools appeared in 40% mice in week 4, 30% in week 9, and rectal prolapse was observed in 10% mice in week 13, 40% in week 20. Within 20 weeks, all the mice, which had been given DMH and DSS, developed colonic adenocarcinoma. The weights of spleen and colon were increased significantly, while the weight of thymus was decreased obviously in group A, B, C in comparison with those in the control group (spleen: 0.64 ± 0.03 , 0.75 ± 0.03 , 0.78 ± 0.01 g vs 0.16 ± 0.05 g, $P < 0.01$; colon: 0.93 ± 0.06 , 0.96 ± 0.02 , 0.01 ± 0.06 g vs 0.31 ± 0.06 g, $P < 0.01$; thymus: 0.027 ± 0.001 g vs 0.045 ± 0.004 g, $P < 0.05$; 0.026 ± 0.002 g vs 0.045 ± 0.004 g, $P < 0.05$; 0.016 ± 0.003 g vs 0.045 ± 0.004 g, $P < 0.01$).

CONCLUSION: DMH and DSS can effectively induce the formation of colonic cancer in ICR mice, which can well simulate the progression of colitis to carcinoma. The method used in this study is a cheap, simple and accessible.

Key Words: Colitis; Colorectal cancer; ICR mice; 1, 2-dimethylhydrazine; Dextran sodium sulfate

Li YH, Liu L, Feng J, Wang QW, Sun Y, Cao W, Wang ZP, Zhang R, Liu ZG, Mei QB. A novel model of colitis-related colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(3):234-239

摘要

目的: 建立一个成功率高、简单、易行、价廉、短期成功的结肠炎相关的结肠癌模型。

方法: 5周龄ICR ♂小鼠320只, 随机分为实验组(1-7)和阴性(8)对照组。实验1-3组分别ip 10, 15, 20 mg/kg的1, 2-二甲肼(DMH) 1wk后, 再给予小鼠饮用含20 g/L的右旋葡聚糖苷钠(DSS)饮用水1 wk。实验4-6组的小鼠仅通过ip 给予10, 15, 20 mg/kg的DMH。实验7组小鼠则只饮用含20 g/L DSS的饮用水, 第8组小鼠不给予任何处理。每周记录小鼠体质量及进食量, 在4, 9, 13 wk分别处死部分小鼠以观察小鼠的结肠炎癌变情况, 并于20 wk处死剩余小鼠。

结果: ip DMH(10, 15, 20 mg/kg) 1 wk后, 再饮用含20 g/L DSS的饮用水1 wk. 4 wk可见40%小鼠便血. 1 wk后, 便血消失. 至9 wk时, 约有30%的小鼠再次出现便血体征. 13 wk时, 约10%的小鼠出现脱肛现象. 20 wk时, 40%左右的小鼠出现脱肛现象. 在20 wk 100% ♂ ICR小鼠出现结肠腺癌, 称取脾脏、胸腺以及结肠质量, 结果发现, 脾脏、结肠质量显著增加, 胸腺质量明显减少, 与对照组小鼠相比有显著性差异(脾脏质量: 0.64 ± 0.03 , 0.75 ± 0.03 , 0.78 ± 0.01 g vs 0.16 ± 0.05 g, $P < 0.01$; 结肠质量: 0.93 ± 0.06 , 0.96 ± 0.02 , 0.01 ± 0.06 g vs 0.31 ± 0.06 g, $P < 0.01$; 胸腺质量: 0.027 ± 0.001 g vs 0.045 ± 0.004 g, $P < 0.05$; 0.026 ± 0.002 g vs 0.045 ± 0.004 g, $P < 0.05$; 0.016 ± 0.003 g vs 0.045 ± 0.004 g, $P < 0.01$).

结论: 致癌剂DMH和致炎剂DSS可诱导ICR小鼠结肠腺癌的形成, 较好的模拟了结肠炎癌变过程, 方法价廉、简便、易行.

关键词: 结肠炎; 结肠癌; ICR小鼠; 1, 2-二甲肼; 右旋葡聚糖苷钠

李宇华, 刘莉, 冯娟, 王庆伟, 孙阳, 曹蔚, 王志鹏, 张蓉, 刘振国, 梅其炳. 一种结肠炎相关的结肠癌模型的复制. 世界华人消化杂志 2007;15(3):234-239

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/234.asp>

0 引言

人类癌症的流行病学研究和许多实验室癌症动物模型研究表明, 化学致癌剂是诱导人类癌症发生的重要因素之一. 目前, 由于国人饮食结构的日渐西化: 摄入高热量、高蛋白, 低纤维的食品, 使得周围环境以及食物中所含的潜在性化学致癌剂更易诱导结肠肿瘤发生. 据报道, 上海市的结肠癌发病率、病死率均明显升高. 在众多恶性肿瘤中, 其病死率已跃居第2位. 流行病学实验表明, 结肠癌的发生、发展与结肠炎症的反复发作密切相关. 结肠炎癌变主要决定于结肠炎的发生程度、发生部位及病程长短^[1-9]. 实验表明, 20 a以上的结肠炎患者癌变率可达40%. 然而结肠炎发展为结肠癌的病理机制尚不清楚, 结肠炎相关的结肠癌动物模型尚不成熟. 2004年我国学者Wang *et al*^[10], 2005年日本学者Kohno *et al*^[11-12]采用致癌剂联合致炎剂复制了与人类的癌症发生过程相类似的结肠炎相关的结肠癌模型, 但是作者对于模型复制的发展过程尚无详细报道. 本实验室对日本学者报道的复

制结肠癌模型方法进行改良, 并对结肠癌的发生时间、发展过程作报道. 以期对结肠癌相关药物的开发评价提供相应的动物模型.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ 5周龄CD-1(ICR)小鼠320只, 购于上海斯莱克实验动物中心. 小鼠购回后饲养在第四军医大学实验动物中心. 5只一组, 饲养于代谢笼内, 给予自由饮水、饲以普通的颗粒饲料. 饲养环境: 湿度(50%±10%), 光照(12 h照明, 12 h黑暗交替), 温度(23±2℃). 适应饲养7 d后, 按照体质量被随机分为给药组和对照组. 每周记录动物摄食量及动物体质量, 观察动物的尿液. 1, 2-二甲肼(DMH)购于Sigma公司, 右旋葡聚糖苷钠(DSS), 相对分子质量为36 000-50 000, 购于美国ICN公司.

1.2 方法

1.2.1 小鼠结肠癌模型复制 320只ICR小鼠被随机分为7个给药组和1个对照组(每组40只), 实验重复3次(每次分组情况相同), 实验时间为20 wk. 其中第1次实验小鼠为80只, 后两次均为120只. 将DMH溶于生理盐水中, 使其终浓度分别为10, 15, 20 mg/kg, 用0.25 mol/L NaOH调整pH值至6.5. 实验组1, 2和3的小鼠通过ip分别给予10, 15, 20 mg/kg DMH. 1 wk后, 在这3组小鼠的饮水中添加DSS(浓度为20 g/L), 给予小鼠连续饮用7 d. 实验组4, 5, 6分别给予10, 15, 20 mg/kg剂量的DMH. 实验组7的小鼠, 仅在其饮水中添加DSS. 第8组为对照组, 不作任何处理.

1.2.2 小鼠结肠癌模型指标评价 所有小鼠按常规饲养. 分别在小鼠出现便血(给予DMH后的第4, 9周)、脱肛(第13周)体征的时间点, 于每组中随机抽取4只, 以乙醚麻醉处死. 第20周时处死全部剩余小鼠. 剪开小鼠腹腔, 在冰浴中, 截取其大肠(从肛门处到回盲部), 用生理盐水冲洗后, 测量其长度. 然后, 截取从肛门向上约3 cm处的结肠, 长度约1 cm, 浸泡于40 g/L的福尔马林固定液中24 h. 组织包蜡后切片, 以备做HE染色, 摘取所有的脏器称质量.

2 结果

2.1 大体观察 给予DMH后小鼠的摄食量无明显变化、动物自主活动及毛色正常, 接着给予DSS后, 小鼠的摄食量有所下降、动物自主活动正常. 在注射完DMH后, 约有10%的20 mg/kg DMH剂量组的小鼠(第3组2只、第4组1只)4-5 d

■应用要点

本实验旨在改进并观察联合应用癌症诱导剂1, 2-二甲肼及炎症促进剂右旋葡聚糖苷钠诱发的小鼠结肠癌模型, 从而建立一个成功率高、简单、易行、价廉、短期成功的结肠炎相关的结肠癌模型.

死于肝坏死. 约有40%给予20 g/L DSS的小鼠在饮用DSS的过程中或3-4 d后(第14-24天)出现便血, 同时体质量有所下降但无显著性差异, 1 wk后(第28-32天时), 血便消失. 至给药造模第9周(第63-70天), 约有30%的小鼠(主要是第2, 3组小鼠)再次出现血便体征. 第13周(91-96 d), 约10%的小鼠出现脱肛现象. 第20周, 40%左右的小鼠出现脱肛现象(表1).

2.2 结肠癌小鼠发生、发展过程中体质量、摄食量及尿液变化 给药后, 每只小鼠的进食量和体质量与给药前以及正常小鼠相比, 并无显著性变化. 从第13周开始, 1-3组小鼠, 其平均进食量、体质量有所下降. 但与其他组相比, 无显著性差异. 这与我们所设想的炎症、癌症将导致小鼠进食量和体质量有显著性下降并不一致. 造模全过程中, 实验组小鼠尿量与对照组相比, 无明显差异, 尿液颜色正常, 无特殊气味. 尿液中白细胞、红细胞及蛋白含量等指标也无显著性改变.

2.3 小鼠结肠癌发生、发展中脾脏、胸腺和结肠质量的变化 在不同时间点处死小鼠, 称取脾脏、胸腺以及结肠质量. 结果表明: 大约30%的小鼠肠道呈现炎症反应, 脾脏、结肠质量显著增加、胸腺质量明显减小, 与对照组小鼠相比有显著性差异($P<0.05$). 而有肠道肿瘤的小鼠(约占95%), 其脾脏和结肠重量增加更加明显($P<0.01$), 而胸腺重量显著减小($P<0.01$, 表2).

2.4 小鼠结肠癌发生率 在第20周时, 给予DMH/DSS处理的小鼠100%发生了结肠腺癌, 且一半以上的小鼠其肠道HE切片同时可以观察到结肠腺瘤的出现(第3组尤为明显), 其他实验组没有或仅少量形成癌症(表3).

2.5 小鼠结肠癌发生、发展过程中结肠病理变化 在实验的第4, 9周, 用乙醚将小鼠麻醉致死, 打开其腹腔, 肉眼观察出现便血的小鼠肠道. 结果发现, 小鼠大肠肠壁有不同程度的充血, 水肿. 小肠无明显改变. 没有出现便血体征的小鼠, 肉眼观察无明显异常. 在实验进行的第13周, 及实验结束的第20周, 处死出现脱肛体征的小鼠. 结果表明, 大肠肠壁出现小结节, 肠道皱褶减少或消失, 肠道质地坚硬. 小肠无明显改变. 未出现脱肛的小鼠, 其肠道局部也能观察得小硬结. HE切片观察, 便血小鼠肠道有不同程度的炎症表现: 渗出、白细胞浸润、黏膜溃疡或坏死等, 但在肠道并未观察到像用2, 4, 6-三硝基苯磺酸造结肠炎模型时出现的大片黏膜溃疡、坏死.

表 1 每组小鼠在不同时间出现阳性体征的动物数及发生率

分组	阳性体征(发生率)			
	血便 (3-4 wk)	血便 (9-10 wk)	脱肛 (13-14 wk)	脱肛 (20 wk)
1	21(52.5%)	12(34.3%)	4(13.3%)	20(100%)
2	25(62.5%)	21(60%)	11(36.6%)	21(100%)
3	31(77.5%)	24(68.6%)	20(66.7%)	28(100%)
4	1(2.5%)	2(5.26%)	0(0)	0(0)
5	2(5%)	6(15.6%)	0(0)	1(7.1%)
6	3(7.5%)	4(10.5%)	0(0)	2(12.5%)
7	13(32.5%)	8(21.6%)	0(0)	0(0)
8	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)

且第9周小鼠的肠道炎症表现比第4周小鼠明显, 程度也较重. 无便血的小鼠, 部分也能看到局部肠道黏膜白细胞渗出. 脱肛小鼠肠道则表现为分化较好的管状腺癌或管状腺瘤. 从处死小鼠的观察结果来看, 便血小鼠的肠道100%出现了不同程度的炎症. 脱肛小鼠的肠道100%生成了肿瘤. 给DMH/DSS造模的小鼠(第1-3组)在第20周时, 成癌率为100%(图1).

3 讨论

人类肿瘤的发生、发展与很多因素有关, 其中炎症反复发作是肿瘤形成的重要因素之一, 强有力的证据表明, 肠道炎症的反复发作明显地增加了腺癌的发生率, 但是机制却不明确, 从炎症向癌症的转变是一个复杂的过程, 炎症向癌症的转变, 其病理性变化与分子生物学变化的阐明将为结肠癌的治疗提供很有希望的靶点. 为此, 各国研究者先后建立了结肠炎、结肠癌动物模型. 尽管相关的结肠炎模型中不少易被复制, 但无论是化学诱导的或是结肠炎症相关的遗传模型都不能有效模拟人体内所发生的溃疡性结肠炎. 最常用的模型是将DSS添加到饮食或饮水中^[13-18], 在啮齿动物身上复制结肠炎相关临床症状、体征及病理学改变与模拟人类结肠炎的类似模型^[19-21]. 但是单独使用DSS, 不仅耗时间, 而且模型成功的比例并不高^[22]. 同样, 单独使用化学试剂(如: 1, 2-二甲肼, 氧化偶氮甲烷)^[22-27]或者通过移植肿瘤细胞株^[28-29]的方法复制动物结肠癌时, 也经常会遇到各种问题: 前者造模时间非常长, 通常要1 a左右的时间, 成癌率不高. 而后者则由于肿瘤细胞的移植, 使动物迅速发生结肠癌, 炎症向癌症转变这一重要过程

■同行评价
本文探讨了一种结肠炎相关的结肠癌动物模型的制作方法, 有一定的新颖性和科学性, 实验方法可靠, 结果可信, 具有一定的参考价值。

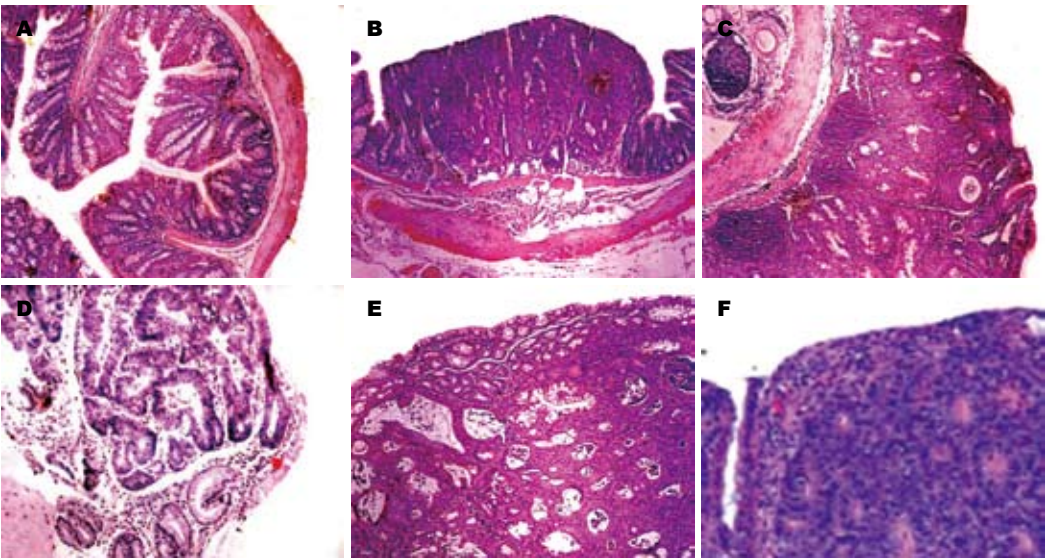


图 1 小鼠结肠癌发生、发展过程中结肠病理变化(100×)。A: 正常组; B: 第4周, 便血小鼠的肠道已出现局部炎细胞浸润; C: 第9周, 便血小鼠的肠道炎细胞浸润广泛、明显; D: 第13周, 脱肛小鼠肠道已表现出炎症向腺瘤过渡的趋势; E: 第20周(腺瘤); F: 第20周(腺瘤), 脱肛小鼠肠道已形成明显的管状腺瘤或腺癌。

表 2 20 wk时每组小鼠的体质量、脾脏、胸腺及大肠质量(mean ± SD)

分组	药物处理(n)	体质量(g)	脾脏质量(g)	胸腺质量(g)	大肠质量(g)
1	DMH 10 mg/kg→20 g/L DSS(18)	42.3 ± 2.5 ^a	0.64 ± 0.03 ^b	0.027 ± 0.001 ^a	0.932 ± 0.06 ^b
2	DMH 15 mg/kg→20 g/L DSS(14)	43.1 ± 2.8	0.75 ± 0.03 ^b	0.026 ± 0.002 ^a	0.956 ± 0.02 ^b
3	DMH 20 mg/kg→20 g/L DSS(12)	44.1 ± 3.9	0.78 ± 0.01 ^b	0.016 ± 0.003 ^b	1.008 ± 0.06 ^b
4	DMH 10 mg/kg(14)	43.9 ± 2.8	0.44 ± 0.03 ^a	0.030 ± 0.002	0.342 ± 0.07
5	DMH 15 mg/kg(16)	45.6 ± 3.5	0.42 ± 0.02 ^a	0.033 ± 0.005	0.331 ± 0.04
6	DMH 20 mg/kg(16)	43.0 ± 1.7	0.55 ± 0.07 ^a	0.029 ± 0.001 ^a	0.342 ± 0.03
7	20 g/L DSS(16)	41.9 ± 5.4 ^a	0.38 ± 0.02 ^a	0.038 ± 0.002	0.460 ± 0.06 ^a
8	对照(12)	44.8 ± 3.0	0.16 ± 0.05	0.045 ± 0.004	0.310 ± 0.07

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 对照组。

表 3 20 wk时各组小鼠成癌率

分组	药物处理	<i>n</i>	总成癌率(%)	腺癌率(%)	腺瘤率(%)
1	DMH 10 mg/kg→20 g/L DSS	18	100	100	55.6
2	DMH 15 mg/kg→20 g/L DSS	14	100	100	71.4
3	DMH 20 mg/kg→20 g/L DSS	12	100	100	91.7
4	DMH 10 mg/kg	14	0	0	0
5	DMH 15 mg/kg	16	6.25	6.25	0
6	DMH 20 mg/kg	16	12.5	12.5	0
7	20 g/L DSS	16	0	0	0
8	对照组	12	0	0	0

不能被有效观察, 难以进行机制研究。最令人遗憾的是, 一直缺少一个能观察到结肠炎癌变过程的动物模型。本文中, 通过联合使用DMH和DSS复制一种结肠炎相关的结肠癌模型。DMH是一种能在啮齿动物肠道内诱导出在体征、病理变化方面与人类结肠癌相类似的致癌剂。而

DSS则是一种能刺激结肠癌发生的炎症诱导剂。实验证明, ip DMH(10, 15, 20 mg/kg) 1 wk后, 在饮水中添加20 g/L DSS连续7 d可于20 wk内, 在♂ ICR小鼠体内诱导出100%结肠腺癌。这比单独使用DMH诱发形成结肠癌的时间缩短将近一半。在造模的第4, 第9周, 我们通过肉眼和病理切片观察发现第1-6组小鼠肠道出现不同程度的炎症变化, 并且, 第9周炎症更加明显; 造模的第13周, 可见部分小鼠约10%(主要是第3组)发生结肠癌。而在第20周时, 第1, 2, 3组小鼠100%发生结肠癌。在体征与病理变化的关联上, 我们通过HE切片观察到, 便血小鼠肠道有不同程度的炎症表现: 渗出、白细胞浸润、黏膜溃疡或坏死等。无便血的小鼠, 也有部分(60%)可见局部黏膜白细胞渗出。脱肛小鼠的肠道则表现为分化较好的管状腺癌或管状腺瘤。从处死小鼠的观察结果来看, 便血小鼠的肠道100%出现了不同程度的炎症。脱肛小鼠的肠道100%生成了肿瘤。尽管3个剂量的DMH与DSS合用均能诱发结肠癌的发生。但是由于10 mg/kg DMH剂量相对较小, 癌症程度较轻。而大剂量DMH 20 mg/kg在注射后1 wk内可见小鼠死于药物的肝脏毒性。因此本实验的结果表明, 15 mg/kg的DMH辅以20 g/L DSS能成功诱导出炎症相关性结肠癌。炎症相关的结肠癌模型的初步建立将给未来的结肠癌发生、发展机制研究, 结肠癌药物的研发, 结肠癌的预防带来重要影响。

4 参考文献

- Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001; 48: 526-535
- Minami Y, Nishino Y, Tsubono Y, Tsuji I, Hisamichi S. Increase of colon and rectal cancer incidence rates in Japan: trends in incidence rates in Miyagi Prefecture, 1959-1997. *J Epidemiol* 2006; 16: 240-248
- Lindberg J, Stenling R, Palmqvist R, Rutegard J. Efficiency of colorectal cancer surveillance in patients with ulcerative colitis: 26 years' experience in a patient cohort from a defined population area. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 1076-1080
- 段琼红, 吕美霞, 卢祖洵, 聂绍发. 大肠癌中IGF-2蛋白的表达及相关性研究. 世界华人消化杂志 2006; 14: 83-86
- 黄漾, 张国锋. 结直肠癌淋巴管生成与淋巴结转移相关检测的临床研究进展. 世界华人消化杂志 2006; 14: 207-211
- 陈静, 赵嫚, 谢强, 孙玉华, 梁健. 直肠癌手术后患者48例生存质量评定. 世界华人消化杂志 2006; 14: 819-822
- 刘敬军, 郑长青, 潘丽丽, 闻英, 胡刚正. 中西医结合治疗溃疡性结肠炎. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2806-2808
- 张炬, 夏冰, 杨桂芳, 李瑾. 溃疡性结肠炎肠黏膜组织CD8、Fas/FasL和Bcl-2/Bax的表达及关系. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1795-1798
- Ojima T, Iwahashi M, Nakamura M, Matsuda K, Nakamori M, Ueda K, Naka T, Ishida K, Primus FJ, Yamaue H. Successful cancer vaccine therapy for carcinoembryonic antigen (CEA)-expressing colon cancer using genetically modified dendritic cells that express CEA and T helper-type 1 cytokines in CEA transgenic mice. *Int J Cancer* 2007; 120: 585-593
- Wang JG, Wang DF, Lv BJ, Si JM. A novel mouse model for colitis-associated colon carcinogenesis induced by 1, 2-dimethylhydrazine and dextran sulfate sodium. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2958-2962
- Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Yamada Y, Sugie S, Mori H. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci* 2003; 94: 965-973
- Kohno H, Suzuki R, Sugie S, Tanaka T. Beta-Catenin mutations in a mouse model of inflammation-related colon carcinogenesis induced by 1, 2-dimethylhydrazine and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci* 2005; 96: 69-76
- Weitzman SA, Gordon LI. Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood* 1990; 76: 655-663
- Yeo M, Kim DK, Park HJ, Oh TY, Kim JH, Cho SW, Paik YK, Hahm KB. Loss of transgelin in repeated bouts of ulcerative colitis-induced colon carcinogenesis. *Proteomics* 2006; 6: 1158-1165
- Tanaka T, Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Takahashi M, Wakabayashi K. Colonic adenocarcinomas rapidly induced by the combined treatment with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and dextran sodium sulfate in male ICR mice possess beta-catenin gene mutations and increases immunoreactivity for beta-catenin, cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase. *Carcinogenesis* 2005; 26: 229-238
- Fujii S, Fujimori T, Kawamata H, Takeda J, Kitajima K, Omotehara F, Kaihara T, Kusaka T, Ichikawa K, Ohkura Y, Ono Y, Imura J, Yamaoka S, Sakamoto C, Ueda Y, Chiba T. Development of colonic neoplasia in p53 deficient mice with experimental colitis induced by dextran sulphate sodium. *Gut* 2004; 53: 710-716
- Liu ES, Ye YN, Shin VY, Yuen ST, Leung SY, Wong BC, Cho CH. Cigarette smoke exposure increases ulcerative colitis-associated colonic adenoma formation in mice. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1407-1413
- Cooper HS, Murthy S, Kido K, Yoshitake H, Flanagan A. Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology, B-catenin and p53 expression and the role of inflammation. *Carcinogenesis* 2000; 21: 757-768
- Clapper ML, Adrian RH, Pfeiffer GR, Kido K, Everley L, Cooper HS, Murthy S. Depletion of colonic detoxication enzyme activity in mice with dextran sulphate sodium-induced colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13: 389-396
- Korenaga D, Takesue F, Kido K, Yasuda M, Inutsuka S, Honda M, Nagahama S. Impaired antioxidant defense system of colonic tissue and cancer development in dextran sulfate sodium-

- induced colitis in mice. *J Surg Res* 2002; 102: 144-149
- 21 Tardieu D, Jaeg JP, Deloly A, Corpet DE, Cadet J, Petit CR. The COX-2 inhibitor nimesulide suppresses superoxide and 8-hydroxy-deoxyguanosine formation, and stimulates apoptosis in mucosa during early colonic inflammation in rats. *Carcinogenesis* 2000; 21: 973-976
- 22 Okayasu I, Yamada M, Mikami T, Yoshida T, Kanno J, Ohkusa T. Dysplasia and carcinoma development in a repeated dextran sulfate sodium-induced colitis model. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 1078-1083
- 23 Kinjo T, Suzui M, Morioka T, Nabandith V, Inamine M, Kaneshiro T, Arakaki J, Nishimaki T, Yoshimi N. Distribution of preneoplastic lesions and tumors, and beta-catenin gene mutations in colon carcinomas induced by 1,2-dimethylhydrazine plus dextran sulfate sodium. *J Exp Clin Cancer Res* 2006; 25: 89-95
- 24 Onose J, Imai T, Hasumura M, Ueda M, Hirose M. Rapid induction of colorectal tumors in rats initiated with 1,2-dimethylhydrazine followed by dextran sodium sulfate treatment. *Cancer Lett* 2003; 198: 145-152
- 25 Karlin DA, O'Donnell RT, Jensen WE. Effect of dioctyl sodium sulfosuccinate feeding on rat colorectal 1,2-dimethylhydrazine carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1980; 64: 791-793
- 26 Rogers AE, Nauss KM. Rodent models for carcinoma of the colon. *Dig Dis Sci* 1985; 30: 87S-102S
- 27 Nangia-Makker P, Hogan V, Honjo Y, Baccarini S, Tait L, Bresalier R, Raz A. Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude mice by oral intake of modified citrus pectin. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 1854-1862
- 28 Ran YL, Zhong X, Hu H, Yu L, Lou JN, Yang ZH. Establishment and application of engrafted tumor models with humanized tumor blood vessel. *Ai Zheng* 2006; 25: 1323-1328
- 29 van der Wilt CL, Smid K, Aherne GW, Noordhuis P, Peters GJ. Biochemical mechanisms of interferon modulation of 5-fluorouracil activity in colon cancer cells. *Eur J Cancer* 1997; 33: 471-478

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

《世界华人消化杂志》简介

《世界华人消化杂志》创刊于1993-01-15, 原刊名《新消化病学杂志》, 1999-03-25经国家科学技术部和国家新闻出版总署批准更名为《世界华人消化杂志》, 国科发财字[1999] 071号, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内外公开发行的综合性消化病学类学术期刊. 2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001071号. 《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊和中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊. 《世界华人消化杂志》发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》, 俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录. 《世界华人消化杂志》综合介绍消化病学前沿基础与临床研究的发现, 覆盖消化病学领域中经临床实验证明的技术进展. 从1993-2005《世界华人消化杂志》发表的文章可以在线<http://www.wjgnet.com>免费阅读全文. 《世界华人消化杂志》综合介绍以下内容: 消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化护理、消化医学影像、消化病理、消化预防医学、消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊. 《世界华人消化杂志》开通了<http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>在线办公系统, 实现了在线投稿和审稿等功能.

急性胆道梗阻大鼠肝细胞的死亡方式

徐 锋, 戴朝六, 贾昌俊, 许永庆, 彭松林, 顾 玺, 赵 阳

■背景资料

急性胆道梗阻往往导致不同程度的肝功能损伤甚至急性肝功能衰竭, 其损伤的确切作用机制尚不清楚。胀亡和凋亡是细胞的两种死亡方式, 但目前对急性胆道梗阻时肝细胞的死亡方式仍存在争议。

徐锋, 戴朝六, 贾昌俊, 许永庆, 彭松林, 顾玺, 赵阳, 中国医科大学盛京医院肝胆外科 辽宁省沈阳市 110004
徐锋, 2006年中国医科大学博士研究生毕业, 讲师, 主要从事肝胆疾病基础与临床研究。

通讯作者: 戴朝六, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学盛京医院肝胆外科。daicl-sy@tom.com
电话: 024-83955232

收稿日期: 2006-10-17 接受日期: 2006-11-16

Patterns of liver cell death in rats with acute bile duct obstruction

Feng Xu, Chao-Liu Dai, Chang-Jun Jia, Yong-Qing Xu, Song-Lin Peng, Xi Gu, Yang Zhao

Feng Xu, Chao-Liu Dai, Chang-Jun Jia, Yong-Qing Xu, Song-Lin Peng, Xi Gu, Yang Zhao, Department of Hepatobiliary Surgery, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Correspondence to: Professor Chao-Liu Dai, Department of Hepatobiliary Surgery, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. daicl-sy@tom.com

Received: 2006-10-17 Accepted: 2006-11-16

Abstract

AIM: To investigate the patterns of hepatic cell death in rats with acute bile duct obstruction.

METHODS: Male Wistar rats were divided randomly into bile duct ligation (BDL) group ($n = 5$) and control group ($n = 5$). The rats in BDL group underwent ligation and division of common bile duct to set up acute bile duct obstruction model according to Yoshidome's maneuver, while the rats in the control group underwent dissociation of common bile duct only. All the animals were sacrificed for sampling on day 7. Flow cytometry was used to determine the percentages of hepatocyte apoptosis and oncosis. Hematoxylin and eosin (H&E) staining and electron microscopy were used to observe hepatocyte apoptosis, oncosis and histopathological changes. An auto analyzer was used to examine the levels of serum total bilirubin (TBIL), direct bilirubin (DBIL), alkaline phosphatase (ALP), glutamyl transpeptidase (γ -GT), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and lactate dehydrogenase (LDH).

RESULTS: The percentage of liver cell oncosis or necrosis was significantly higher in BDL group than that in the control group (oncosis: $25.41\% \pm 2.18\%$ vs $6.12\% \pm 1.69\%$, $P < 0.05$; necrosis: $3.99\% \pm 1.24\%$ vs $0.79\% \pm 0.29\%$, $P < 0.05$), while the percentage of apoptosis was remarkably lower in BDL group ($2.79\% \pm 1.43\%$ vs $5.18\% \pm 1.87\%$, $P < 0.05$). Moreover, the percentage of hepatic cell oncosis was higher than that of apoptosis in BDL group ($25.41\% \pm 2.18\%$ vs $2.79\% \pm 1.43\%$, $P < 0.05$). Hepatic histopathological examination showed proliferation of bile duct and fibrous connective tissue, obvious increase of hepatic cell oncosis and liver cell cord derangement in BDL group. The levels of serum TBIL, DBIL, ALP, γ -GT, AST, ALT and LDH in BDL group were all increased as compared with those in the control group ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Oncosis is the dominant type of hepatic cell death in rats with acute bile duct obstruction, and the degree of hepatic injury has a close relationship with the oncosis or apoptosis of hepatic cells.

Key Words: Obstructive jaundice; Liver; Oncosis; Apoptosis

Xu F, Dai CL, Jia CJ, Xu YQ, Peng SL, Gu X, Zhao Y. Patterns of liver cell death in rats with acute bile duct obstruction. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(3):240-245

摘要

目的: 通过建立大鼠急性胆道梗阻模型研究梗阻性黄疸时肝细胞死亡方式。

方法: δ Wistar大鼠随机分为胆道结扎(BDL)组和对照(C)组。BDL组采用Yoshidome法建立急性胆道梗阻模型, 7 d后取材, 应用流式细胞仪检测肝细胞胀亡和凋亡的百分比, HE染色和电镜观察肝组织病理组织学改变以及肝细胞凋亡、胀亡, 并检测血清总胆红素TBIL, DBIL, ALP, γ -GT, ALT, AST和LDH水平。

结果: BDL组胀亡和坏死细胞百分比均显著高于C组(胀亡: $25.41\% \pm 2.18\%$ vs 6.12%

±1.69%; 坏死: 3.99%±1.24% *vs* 0.79%±0.29%; 均 $P<0.05$), 而凋亡百分比显著低于C组(2.79%±1.43% *vs* 5.18%±1.87%, $P<0.05$). BDL组胀亡细胞百分比显著高于凋亡(25.41%±2.18% *vs* 2.79%±1.43%, $P<0.05$). 肝病理组织学检查发现BDL组胆管增生, 纤维结缔组织明显增生, 肝细胞索排列紊乱, 胀亡增加. BDL组血清TBIL, DBIL, ALP, γ -GT, AST, ALT和LDH水平均显著高于C组($P<0.05$).

结论: 急性胆道梗阻时大鼠肝细胞死亡以胀亡为主, 其肝功能损伤程度与肝细胞胀亡、凋亡有密切关系.

关键词: 梗阻性黄疸; 肝脏; 胀亡; 凋亡

徐锋, 戴朝六, 贾昌俊, 许永庆, 彭松林, 顾玺, 赵阳. 急性胆道梗阻大鼠肝细胞的死亡方式. 世界华人消化杂志 2007;15(3):240-245

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/240.asp>

0 引言

梗阻性黄疸是外科经常遇到的临床问题, 此类患者解除胆道梗阻后往往有不同程度的肝功能不全甚至出现急性肝功能衰竭. 但目前国内外对梗阻性黄疸损伤的确切作用机制尚不完全清楚. 一般认为细胞死亡分为胀亡和凋亡, 坏死只是发生胀亡或凋亡后细胞死亡的形态学变化^[1]. 但目前对梗阻性黄疸时肝细胞死亡方式仍存在争议^[2-4], 因此, 本实验通过建立大鼠急性胆道梗阻模型, 应用流式细胞仪等技术研究梗阻性黄疸时肝细胞死亡方式, 为梗阻性黄疸的损伤机制提供新的实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar δ 大鼠, 体质量 270 ± 20 g, 中国医科大学盛京医院实验动物中心提供; 胀亡和凋亡检测试剂盒(Annexin V-FITC和PI)购自美国BD公司.

1.2 方法 将10只 δ Wistar大鼠随机分为胆管结扎组(BDL组, $n=5$)和对照组(C组, $n=5$). 参照Yoshidome *et al*^[5]报道的方法建立急性胆道梗阻模型, 稍加改动: 各组大鼠用100 g/L水合氯醛(按3 μ L/g) ip麻醉, 取正中切口入腹. BDL组3/0丝线结扎并切断胆总管, C组仅游离胆总管, 不结扎. 术后大鼠均单笼饲养, 常规进食水. 造模7 d后取材, 自腹主动脉采血3 mL, 静置20 min, 3000 r/min离心10 min, 将血清转移至塑料弹头中, 置于-20℃冰箱中保存, 待测血清胆红素和生化酶

表 1 各组血清TBIL, DBIL, ALP, γ -GT, AST, ALT和LDH水平比较(mean $\pm$ SD, $n=5$)

项目	C组	BDL组
TBIL(μ mol/L)	1.32 $\pm$ 0.22	112.86 $\pm$ 15.31 ^a
DBIL(μ mol/L)	1.08 $\pm$ 0.45	93.14 $\pm$ 15.06 ^a
ALP(nkat/L)	1105.55 $\pm$ 422.25	5324.40 $\pm$ 860.17 ^a
γ -GT(nkat/L)	11.67 $\pm$ 7.50	290.06 $\pm$ 64.18 ^a
AST(nkat/L)	1566.98 $\pm$ 260.05	7884.91 $\pm$ 1412.78 ^a
ALT(nkat/L)	746.82 $\pm$ 246.88	1550.31 $\pm$ 518.77 ^a
LDH(nkat/L)	7721.54 $\pm$ 2742.88	13182.64 $\pm$ 1901.38 ^a

^a $P<0.05$ *vs* C组.

水平; 快速夹取肝组织, 用锡箔纸包裹后置于液氮中, 再转至-80℃冰箱中保存, 待做流式细胞仪检测; 取1.0 cm $\times$ 1.0 cm $\times$ 1.0 cm大小肝组织置于40 g/L甲醛中固定, 待做病理组织学检查; 取0.2 cm $\times$ 0.2 cm $\times$ 0.2 cm大小肝组织置于25 g/L戊二醛溶液中固定, 待做电镜检查. 处死大鼠. 观察大鼠一般情况. 血清TBIL, DBIL, ALP, γ -GT, AST, ALT和LDH水平测定用Hitachi 7600全自动生化分析仪检测. 肝组织块常规石蜡包埋, 切片, HE染色, 光镜下观察肝病理组织学变化. 肝组织块常规锇酸后固定, 梯度脱水, 包埋, 聚合, 超薄切片, 柠檬酸铅-醋酸双氧铀双染色, 用Hitachi H-600型透射电镜观察肝组织超微结构改变.

1.2.1 流式细胞仪检测肝细胞胀亡和凋亡 用Medicon(BD流式细胞仪制备单细胞仪器)降解肝组织块, 50 mm Filcon滤器过滤细胞悬液, 离心, 弃上清, 加Binding Buffer缓冲液, 调节细胞浓度至 5×10^8 - 1×10^9 个/L, 加Annexin V-FITC和PI, 室温避光放置, 用美国BD-FACSCalibur型流式细胞仪测定各类细胞百分数. 结果分析: 正常细胞, Annexin V, PI均低染; 胀亡细胞, Annexin V, PI均高染; 凋亡细胞, Annexin V高染、PI低染; 坏死细胞, PI高染、Annexin V低染.

统计学处理 所有数据采用统计软件SPSS 11.5进行 t 检验分析, $P<0.05$ 被认为有统计学意义.

2 结果

BDL组体质量减轻明显, 尿呈深黄色, 胆总管明显扩张, 肝叶肿大呈淤胆样改变, 肠道淤滞(图1). 而C组体质量轻度增加, 尿不黄, 胆总管无扩张, 肝脏颜色正常、有光泽, 肠道无淤滞. 血清TBIL, DBIL, ALP, γ -GT, AST, ALT和LDH水平测定BDL组血清各项指标水平均显著高于C组($P<0.05$)(表1).

■ 研究前沿

胀亡有别于凋亡, 是目前细胞死亡方式的研究热点, 但其确切的作用机制有待进一步研究.

■相关报道

自从1995年提出胀亡概念后,陆续有相关文献报道.但对梗阻性黄疸肝细胞死亡方式仍不是很明确,有的研究认为胆道梗阻后肝细胞死亡的主要形式是细胞凋亡,但也有的研究梗阻性黄疸时肝细胞死亡的主要类型是胀亡而不是凋亡.

表 2 各组坏死、胀亡、凋亡及正常细胞的构成(mean $\pm$ SD, $n = 5$, %)

分组	坏死	胀亡	凋亡	正常
C组	0.79 $\pm$ 0.29	6.12 $\pm$ 1.69	5.18 $\pm$ 1.87	87.91 $\pm$ 3.14
BDL组	3.99 $\pm$ 1.24 ^a	25.41 $\pm$ 2.18 ^a	2.79 $\pm$ 1.43 ^a	67.81 $\pm$ 3.17

^a $P < 0.05$ vs C组.

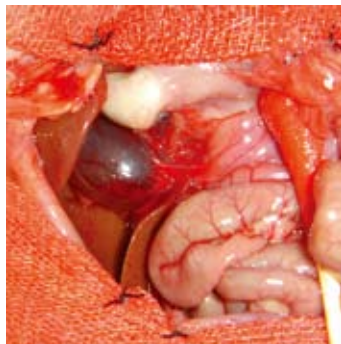


图 1 BDL组扩张的胆总管,肝脏肿胀.

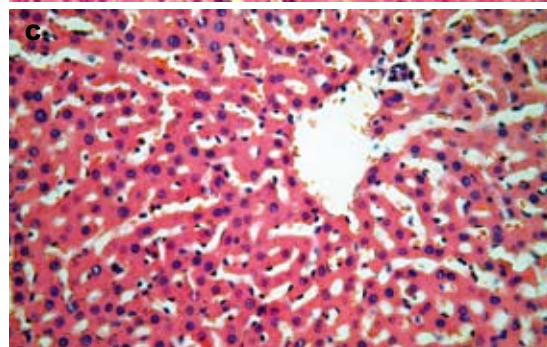
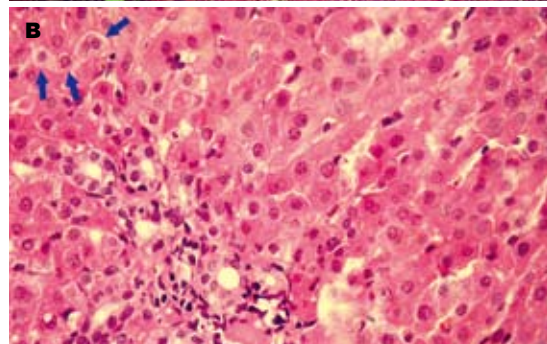
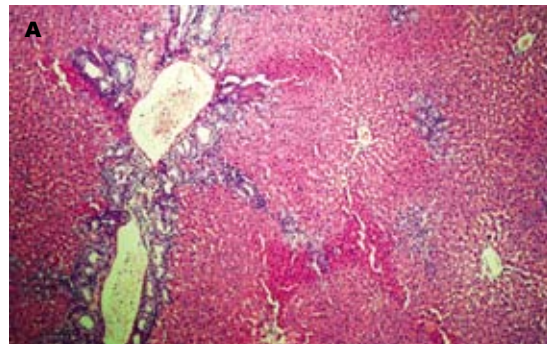


图 2 各组肝组织HE改变(HE). A: BDL组胆管增生明显,纤维结缔组织增生并向肝小叶扩展($\times 100$); B: BDL组胆管增生明显,肝窦变窄,可见大量胀亡细胞(箭头所指)($\times 400$); C: C组肝小叶结构清晰,肝细胞无肿胀,肝细胞索排列规则,肝窦较宽($\times 400$).

2.1 肝组织病理组织学检查 BDL组胆管增生明显,纤维结缔组织明显增生并向肝小叶内扩展(图2A),肝窦变窄,肝细胞胀亡明显(图2B); C组肝小叶结构清楚,肝细胞无肿胀,肝细胞索排列规则,肝窦较宽(图2C).

2.2 肝组织电镜观察 C组肝细胞核呈圆形,核膜完整,染色质分布正常,线粒体丰富、结构清晰,内质网完整,糖原颗粒丰富(图3A). BDL组可见胀亡和凋亡细胞.胀亡细胞:线粒体肿胀、嵴破坏或消失,内质网崩解、颗粒消失,染色质边集(图3B).凋亡细胞:细胞皱缩,质膜完整,胞质致密、退行性变,内质网扩张与胞膜融合,染色质密度增高呈半月形(图3C).

2.3 流式细胞仪检测肝细胞胀亡与凋亡 C组仅有少量肝细胞胀亡和凋亡. BDL组胀亡和坏死细胞百分比均显著高于C组($P < 0.05$),且BDL组胀亡细胞百分比显著高于凋亡.虽然BDL组凋亡细胞百分比低于C组,但无统计学差异($P > 0.05$)(表2,图4).

3 讨论

胀亡是细胞的另一种死亡方式^[6],日益受到国内外学者的高度关注.但目前对梗阻性黄疸时肝细胞死亡方式尤其胀亡的研究甚少,而且对其确切的死亡方式持有不同的观点: Miyoshi *et al*^[2]研究认为胆道梗阻后肝细胞死亡的主要形式是细胞凋亡,但 Fickert *et al*^[3], Gujral *et al*^[4]研究小鼠梗阻性黄疸模型时发现肝细胞死亡的主要类

型是胀亡而不是凋亡.这可能是因为胀亡和凋亡均可出现双链DNA断裂、跨膜电位减少等,因此采用TUNEL、凝胶电泳和跨膜电位等方法均不能有效地区别这两种细胞^[7].目前最佳的鉴别方法是采用形态学和AnnexinV-FITC与PI双染色并借助流式细胞仪进行鉴别.因为胀亡细胞和早期凋亡细胞两者细胞膜上磷脂对称性改变

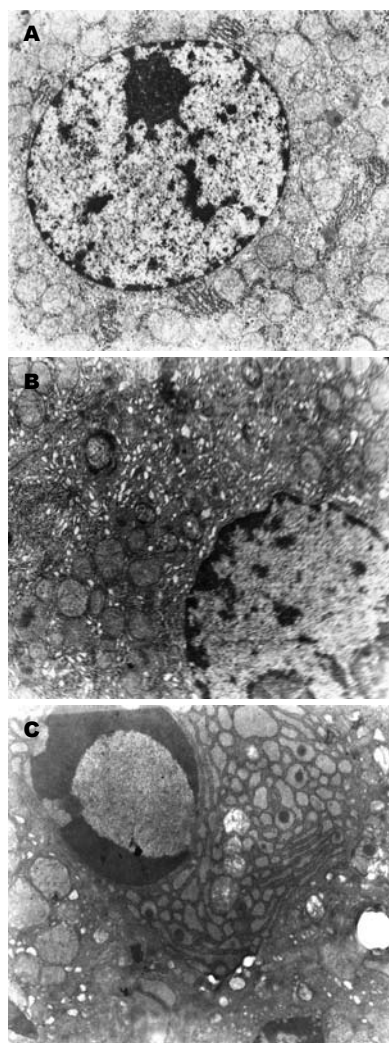


图3 肝细胞凋亡和胀亡的超微结构改变. A: C组正常肝细胞($\times 6000$); B: BDL组胀亡细胞($\times 8000$); C: BDL组凋亡细胞($\times 8000$).

使磷脂酰丝氨酸暴露于细胞膜外,可特异性结合标记有FITC的AnnexinV,因此单用此法不能特异地区别这两种细胞,而PI不能进入细胞膜完整的细胞,只能通过损伤的细胞膜结合在DNA双螺旋链之间.双染后可鉴别这两种细胞^[7].因此本实验应用流式细胞仪检测肝细胞胀亡和凋亡能准确地反映细胞死亡情况.胀亡典型特征为细胞肿胀、核溶解、胞质空泡的形成,类似细胞水变性等形态学改变.染色质分散、凝集在核膜和/或核仁周围,或聚集成团块;细胞器肿胀尤以线粒体为著^[8].胀亡是大量相邻细胞死亡,在以前的病理学文献中表现为片状坏死现象^[9].凋亡典型改变是胞质萎缩、核固缩、染色质新月形凝集和凋亡小体形成^[1].

本实验结果显示,大鼠急性胆道梗阻后血清胆红素、ALP和 γ -GT水平均显著高于对照

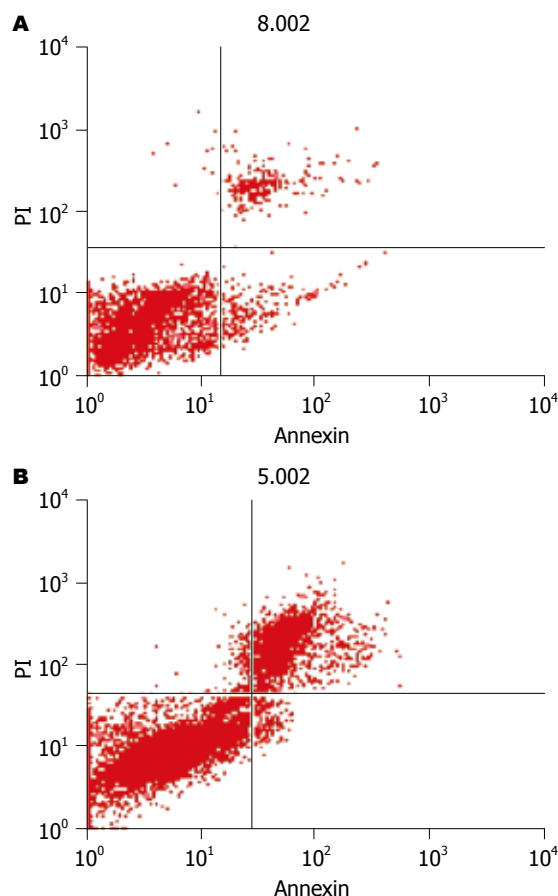


图4 各组肝细胞胀亡和凋亡流式细胞图(右上象限为胀亡细胞,右下象限为凋亡细胞,左下象限为正常细胞,左上象限为坏死细胞). A: C组; B: BDL组.

■应用要点

本研究结果将对梗阻性黄疸肝脏损伤作用机制的研究具有指导意义,提供新的研究思路 and 方向.

组,说明梗阻性黄疸模型建立成功,而且肝病组织学检查亦进一步得到证实.本研究发现急性胆道梗阻大鼠肝细胞死亡以胀亡为主,凋亡相对较少.这是因为细胞凋亡和胀亡与刺激强度、作用时间有关.刺激强度较弱、作用时间较短时以凋亡为主;反之,细胞损伤相对严重时以胀亡为主.还可能与凋亡是主动耗能过程、需要ATP,而胀亡是被动性死亡、不需要能量有关^[10].因此影响细胞ATP水平的因素可影响细胞死亡方式的选择^[11].

胆道梗阻时肝脏胆盐和胆红素堆积,破坏肝细胞能量代谢,导致ATP含量下降,引起肝细胞内钙超载,激活胀亡膜特异性受体porimin,其与配体结合后使膜通透性增加,导致细胞胀亡^[6].此外胆盐还可影响细胞膜ATP活性,损害生物膜的功能,导致细胞胀亡^[12].能量代谢障碍还可生成大量自由基(ROS),破坏细胞膜的完整性,使之通透性增加,造成肝细胞损伤.肠道内胆盐缺乏以及sIgA分泌减少导致细菌和LPS大量入血引起肠源性内毒素血症^[13-14].内毒素直接干扰

■名词解释

胀亡(oncosis): 是细胞的另一种死亡方式, 其典型特征是细胞肿胀、核溶解、胞质空泡的形成等形态学改变. 同凋亡一样, 胀亡亦可出现双链DNA断裂、跨膜电位减少等.

肝细胞能量代谢, 抑制 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATP酶活性, 此外还激活Kupffer细胞, 后者激活中性粒细胞产生大量ROS, 导致肝细胞损伤^[15]. 内毒素还可促使Kupffer细胞、内皮细胞与中性粒细胞释放白三烯、TNF- α 、白细胞介素、NO等导致肝脏微循环障碍, 引起组织损伤^[16-19]. 此外肝纤维化、微循环紊乱以及肝窦血供减少均进一步加剧肝细胞“能源危机”, 促使其胀亡^[20-22]. 因此胆道梗阻导致肝细胞能量代谢障碍, ATP产生不足, 细胞无法全部完成凋亡, 进而选择细胞胀亡, 表现在本实验中肝细胞死亡以胀亡为主且较对照组明显增加, 凋亡反而相对较少. 肝细胞凋亡增加与凋亡机制的启动有关^[23-30]. 例如胆盐中的甘氨酸鹅脱氧胆酸钠(GCDC)可通过蛋白激酶C介导肝细胞凋亡, 随着GCDC浓度增高, 细胞凋亡率增加^[28-30]. 然而, 细胞胀亡和凋亡有许多相似之处, 存在某些共同信号通路如Fas, caspases等, 但有关胀亡的具体分子机制如基因调控等还不清楚, 有待进一步研究^[11,31].

总之, 急性胆道梗阻大鼠肝细胞死亡方式以胀亡为主, 且肝功能损伤程度与肝细胞胀亡、凋亡有密切关系.

4 参考文献

- Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146: 3-15
- Miyoshi H, Rust C, Roberts PJ, Burgart LJ, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the mouse involves Fas. *Gastroenterology* 1999; 117: 669-677
- Fickert P, Trauner M, Fuchsbichler A, Zollner G, Wagner M, Marschall HU, Zatloukal K, Denk H. Oncosis represents the main type of cell death in mouse models of cholestasis. *J Hepatol* 2005; 42: 378-385
- Gujral JS, Liu J, Farhood A, Jaeschke H. Reduced oncotic necrosis in Fas receptor-deficient C57BL/6J-lpr mice after bile duct ligation. *Hepatology* 2004; 40: 998-1007
- Yoshidome H, Miyazaki M, Shimizu H, Ito H, Nakagawa K, Ambiru S, Nakajima N, Edwards MJ, Lentsch AB. Obstructive jaundice impairs hepatic sinusoidal endothelial cell function and renders liver susceptible to hepatic ischemia/reperfusion. *J Hepatol* 2000; 33: 59-67
- Ma F, Zhang C, Prasad KV, Freeman GJ, Schlossman SF. Molecular cloning of Porimin, a novel cell surface receptor mediating oncotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 9778-9783
- Van Cruchten S, Van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 2002; 31: 214-223
- Elsasser A, Suzuki K, Schaper J. Unresolved issues regarding the role of apoptosis in the pathogenesis of ischemic injury and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32: 711-724
- Kerr JF, Cooksley WG, Searle J, Halliday JW, Halliday WJ, Holder L, Roberts I, Burnett W, Powell LW. The nature of piecemeal necrosis in chronic active hepatitis. *Lancet* 1979; 2: 827-828
- Levin S. Apoptosis, necrosis, or oncosis: what is your diagnosis? A report from the Cell Death Nomenclature Committee of the Society of Toxicologic Pathologists. *Toxicol Sci* 1998; 41: 155-156
- Takeda M, Shirato I, Kobayashi M, Endou H. Hydrogen peroxide induces necrosis, apoptosis, oncosis and apoptotic oncosis of mouse terminal proximal straight tubule cells. *Nephron* 1999; 81: 234-238
- Alpini G, Ueno Y, Glaser SS, Marziani M, Phinzy JL, Francis H, Lesage G. Bile acid feeding increased proliferative activity and apical bile acid transporter expression in both small and large rat cholangiocytes. *Hepatology* 2001; 34: 868-876
- 刘俊, 张寿熙, 吕坤章, 丁显仲. 阻塞性黄疸对肠道细菌及小肠粘膜组织的影响. *中国普通外科杂志* 1998; 7: 325-327
- Margaritis VG, Filos KS, Michalaki MA, Scopa CD, Spiliopoulou I, Nikolopoulou VN, Vagianos CE. Effect of oral glutamine administration on bacterial translocation, endotoxemia, liver and ileal morphology, and apoptosis in rats with obstructive jaundice. *World J Surg* 2005; 29: 1329-1334
- Koyama K, Takagi Y, Ito K, Sato T. Experimental and clinical studies on the effect of biliary drainage in obstructive jaundice. *Am J Surg* 1981; 142: 293-299
- Sheen-Chen SM, Chau P, Harris HW. Obstructive jaundice alters Kupffer cell function independent of bacterial translocation. *J Surg Res* 1998; 80: 205-209
- Rockey D. The cellular pathogenesis of portal hypertension: stellate cell contractility, endothelin, and nitric oxide. *Hepatology* 1997; 25: 2-5
- Wei CL, Hon WM, Lee KH, Khoo HE. Temporal expression of hepatic inducible nitric oxide synthase in liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 362-367
- 涂巍, 智迎辉, 郭仁宣. 一氧化氮在大鼠梗阻性黄疸继发肝功能损伤中的作用. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 875-879
- Beno DW, Espinal R, Edelstein BM, Davis BH. Administration of prostaglandin E1 analog reduces rat hepatic and Ito cell collagen gene expression and collagen accumulation after bile duct ligation injury. *Hepatology* 1993; 17: 707-714
- Gujral JS, Farhood A, Bajt ML, Jaeschke H. Neutrophils aggravate acute liver injury during obstructive cholestasis in bile duct-ligated mice. *Hepatology* 2003; 38: 355-363
- Ito Y, Bethea NW, Baker GL, McCuskey MK, Urbaschek R, McCuskey RS. Hepatic microcirculatory dysfunction during cholestatic liver injury in rats. *Microcirculation* 2003; 10: 421-432
- Wang DS, Dou KF, Li KZ, Gao ZQ, Song ZS, Liu ZC. Hepatocellular apoptosis after hepatectomy in obstructive jaundice in rats. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2737-2741
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998; 17: 1675-1687
- Yin XM. Bid, a critical mediator for apoptosis induced by the activation of Fas/TNF-R1 death

- receptors in hepatocytes. *J Mol Med* 2000; 78: 203-211
- 26 Hatano E, Bradham CA, Stark A, Iimuro Y, Lemasters JJ, Brenner DA. The mitochondrial permeability transition augments Fas-induced apoptosis in mouse hepatocytes. *J Biol Chem* 2000; 275: 11814-11823
- 27 Sheen-Chen SM, Ho HT, Chen WJ, Eng HL. Effect of ZVAD-fmk on hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in rat. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2330-2333
- 28 王剑明, 邹倩, 邹声泉. bcl-2基因在阻塞性黄疸大鼠肝组织细胞凋亡中作用的研究. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 1035-1037
- 29 Wang JM, Wang H, Xu LN, Zou SQ. Hepatic injury in rats with obstructive jaundice: roles of the protein kinase C signal pathway and cytoprotection of fructose. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 577-581
- 30 Gonzalez B, Fisher C, Rosser BG. Glycochenodeoxycholic acid (GDCD) induced hepatocyte apoptosis is associated with early modulation of intracellular PKC activity. *Mol Cell Biochem* 2000; 207: 19-27
- 31 Gujral JS, Knight TR, Farhood A, Bajt ML, Jaeschke H. Mode of cell death after acetaminophen overdose in mice: apoptosis or oncotic necrosis? *Toxicol Sci* 2002; 67: 322-328

■同行评价

本文对急性梗阻性黄疸大鼠肝细胞死亡方式进行了初步研究,发现胆胀可能是细胞死亡的主要方式. 对研究该类病理生理机制具有一定的意义. 文章设计较合理, 数据结果可靠, 结论较科学.

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

●消息●

2007 中华肝胆胰脾外科(国际)学术论坛征文通知

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

1 征文内容

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

2 投稿要求及截稿日期

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

3 联系方式

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

血清P53抗体与原发性肝癌临床特征的关系

官泳松, 刘源, 贺庆

■背景资料

原发性肝癌的诊
断和其预后的评
价是一个在临床
上经常遇到而又
十分具有挑战性
的问题。一些研究
发现,许多恶性肿
瘤患者血清中P53
抗体水平异常增
高,可能与P53基
因突变、瘤体内
P53蛋白异常积
聚、肿瘤不良生
物学行为有关。目
前,对国人原发性
肝癌的血清P53抗
体阳性率及其与
临床特征、预后
等的关系研究尚
少。

官泳松, 刘源, 贺庆, 四川大学华西医院放射科 四川省成都市 610041

通讯作者: 官泳松, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院放射科. yongsongguan@yahoo.com

电话: 028-85421008 传真: 028-85538359

收稿日期: 2006-08-22 接受日期: 2006-11-02

Relationship between serum anti-P53 antibody and clinical characteristics of primary hepatic carcinoma

Yong-Song Guan, Yuan Liu, Qing He

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

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

yongsongguan@yahoo.com

Received: 2006-08-22 Accepted: 2006-11-02

Abstract

AIM: To analyze the level of serum anti-P53 antibody in primary hepatic carcinoma (PHC) as well as its correlation with clinical characteristics.

METHODS: The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the serum level of anti-P53 antibody in 68 patients with PHC. Univariate analysis and multivariate Logistic regression analysis were performed to investigate the correlation between the serum level of P53 antibody and clinical data, including the age, sex of patients, alcohol intake, HBsAg, KPS scores, pathological findings, differentiation degree, liver cirrhosis, pattern of tumor growth, tumor stages, vascular invasion, remote metastasis, Child class, the level of serum albumin, alpha-fetoprotein (AFP) and ferritin.

RESULTS: A total of 20 patients (29.4%) were detected positive for serum anti-P53 antibody. Univariate analysis revealed that the positive status of serum P53 antibody was associated with the degree of differentiation ($P = 0.020$),

remote metastasis ($P = 0.002$), tumor stages ($P = 0.027$) and vascular invasion ($P = 0.010$). Multivariate analysis showed that only remote metastasis was independently associated with the positive status of serum anti-P53 antibody ($OR = 4.185$, $P = 0.022$).

CONCLUSION: The positive status of serum P53 antibody may be associated with the malignant biological features and poor prognosis of PHC.

Key Words: Serum anti-P53 antibody; Primary hepatic carcinoma; Clinical characteristics; Enzyme-linked immunosorbent assay

Guan YS, Liu Y. Relationship between serum anti-P53 antibody and clinical characteristics of primary hepatic carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(3):246-253

摘要

目的: 分析原发性肝癌(primary hepatic carcinoma, PHC)患者血清P53抗体与临床特征的关系。

方法: 用ELISA法定量分析68例肝癌患者首诊时血清P53抗体,并用单因素和多因素统计方法分析与性别、年龄、饮酒史、HbsAg、KPS评分、病理诊断、肿瘤分化程度、肝硬化、肿瘤生长方式、肿瘤分期、血管侵犯、有无肝外转移、Child分级、血清白蛋白、AFP、血清铁蛋白等的相关性。

结果: 68例PHC血清P53抗体阳性率29.4% (20/68)。单因素分析显示,血清P53抗体阳性与肿瘤分化程度低($P = 0.020$)、肝外转移($P = 0.002$)、肿瘤分期晚($P = 0.027$)、血管侵犯有关($P = 0.010$)。多因素分析显示只有肝外转移与P53抗体阳性有关($OR = 4.185$, $P = 0.022$)。

结论: 血清P53抗体阳性与PHC的不良生物学特征有关。

关键词: 血清P53抗体; 原发性肝癌; 临床特征; 酶链免疫吸附法

官泳松, 刘源, 贺庆. 血清P53抗体与原发肝癌临床特征的关系. 世界华人消化杂志 2007;15(3):246-253
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/246.asp>

0 引言

肿瘤抑制基因P53的功能与肿瘤发生、生长调控、凋亡关系密切. 人类肿瘤中, P53突变是最常见的基因改变, 大约有50%的肿瘤患者出现P53基因突变^[1]. P53基因突变后表达异常的P53蛋白, 刺激机体产生自身体液免疫, 并可在患者血清中检测到P53抗体^[2-3]. 研究发现, 绝大多数恶性肿瘤患者(如食管癌、肺癌、肝癌、结直肠癌等)均检测到了血清P53抗体, 阳性率大约在7%-63%^[4-9], 并发现P53抗体与肿瘤分化低、恶性度高、远处转移、肿瘤耐药等不良生物学特征有关^[5-6,8-11]. 原发性肝癌(primary hepatic carcinoma, PHC)起病隐匿, 恶性程度高, 大部分患者发现时已是中晚期, 失去外科切除机会. 其预后与包括肝功能、瘤体大小在内的多个因素有关. 目前尚无满意的预后指标估计预后, 指导治疗. 国外已有PHC患者血清P53抗体的研究, 发现P53抗体阳性率在7%-32%^[9,12-14], 并有相互矛盾的结论, 且未探讨与临床特征之间有无关系^[15]. 故有必要对国人PHC患者血清P53抗体及与临床特征的关系作一研究.

1 材料和方法

1.1 材料 2005-06/2006-02在四川大学华西医院确诊为PHC的患者68例, 纳入标准: (1)符合PHC临床诊断标准(2001年广州标准)^[16]和/或有肝癌病理诊断依据; (2)临床病史资料完整; (3)KPS评分^[17]>60分. 排除标准: (1)已经接受介入治疗、外科手术切除、无水乙醇消融(percutaneous ethanol injection, PEI)、射频、超声聚焦刀(high intensity focus ultrasound, HIFU)等治疗的肝癌患者; (2)有严重免疫抑制或正接受免疫抑制治疗者; (3)临床病史和影像资料不完整. 主要研究仪器及设备有德国产AXIOM-ARTIS 数字减影血管造影机; 德国产Sensation 16多层螺旋CT; 德国产Sonata 1.5T MRI; -20℃冰箱; 法国PharmaCell公司血清P53抗体试剂盒; 酶标仪.

1.2 方法

1.2.1 血清P53抗体检测 血液标本抽取患者空腹静脉血液标本, 立即离心后取上清液, 存放

表 1 血清P53抗体阴性、阳性判定参考值

血清P53抗体定量值	结果判断
< 0.85 kU/L	阴性
0.85-1.15 kU/L	可疑阳性
>1.15 kU/L	阳性

于-20℃冰箱中保存、待测. 标本收集完毕后, 在24℃室温下, 应用PharmaCell公司anti-P53 ELISA试剂盒, 严格按说明书进行操作: 洗涤重组P53蛋白或质控蛋白包被的聚苯乙烯微量反应板, 将稀释的样本和质控蛋白各100 μL分别加入到相应的反应板微孔内, 20℃-25℃震荡温育1 h, 取出后吹干, 加入过氧化物酶标记的抗人IgG抗体反应液100 μL, 20℃-25℃震荡温育1 h, 再次洗涤4次后吹干, 加入酶反应底物TMB100 μL, 室温避光反应10 min, 加入100 μL H₂SO₄终止酶反应. 用酶标仪测定450 nm波长的吸光度. 根据标准曲线, 按照公式计算出血清P53抗体半定量值(kU/L), 并按照下列标准(参考值范围由试剂盒给出)确定血清P53抗体阴性、阳性(表1).

1.2.2 观察内容及指标 一般资料: 性别、年龄、饮酒史. 入院时KPS评分^[17].

实验室检查: 血清白蛋白(g/L)、肿瘤标记物(甲胎蛋白, 铁蛋白, μg/L).

影像学检查: (1)肿瘤大小: 在CT或MRI资料上找出肿瘤最大层面, 测量其长径. (2)生长方式: 按照肿瘤边缘清楚与否分为膨胀生长和浸润生长两类(图1A-B). (3)血管侵犯: 根据CT, MRI或DSA检查, 观察肿瘤有无造成门静脉(分支、主干)癌栓、下腔静脉癌栓、肝动脉门静脉瘘、肝动脉肝静脉瘘. 没有血管侵犯的, 以0级表示; 侵犯一种血管, 以1级表示; 侵犯两种血管, 以2级表示; 侵犯三种以上血管, 以3级表示(图1C-D). (4)肝硬化: 根据超声、CT、MRI检查, 按有无肝叶比例失调、肝裂增宽、肝表面结节样改变、继发门静脉高压等肝硬化表现, 分为有肝硬化和无肝硬化两类(图1E). (5)肝外转移: 根据平片、超声、CT、MRI、核素扫描等影像学检查, 观察有无肝外的淋巴结增大或肿瘤转移病灶(包括肿瘤直接侵犯临近脏器), 并分为有肝外转移和无肝外转移两类.

病理检查: (1)病理诊断: 根据穿刺活检的病理结果, 分为肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)和非肝细胞肝癌(包括胆管源性、肝细胞胆管细胞混合癌等)两类. (2)肿瘤分

■应用要点

P53抗体阳性与肿瘤分化程度低、肝外转移、肿瘤分期晚、血管侵犯等有关. 与AFP相结合, 有助与AFP<400 μg/L患者的肝癌临床诊断.

■同行评价

本文用ELISA法定量分析肝癌首诊时血清P53抗体值,并用单因素和多因素统计方法分析其与临床特征的相关性,包括性别、年龄、饮酒史、HBsAg、KPS评分、病理诊断、肿瘤分化程度、肝硬化、肿瘤生长方式、肿瘤分期、血管侵犯、有无肝外转移、Child分级、血清白蛋白、AFP、血清铁蛋白等。文章具有科学性、创新性和临床实用性。

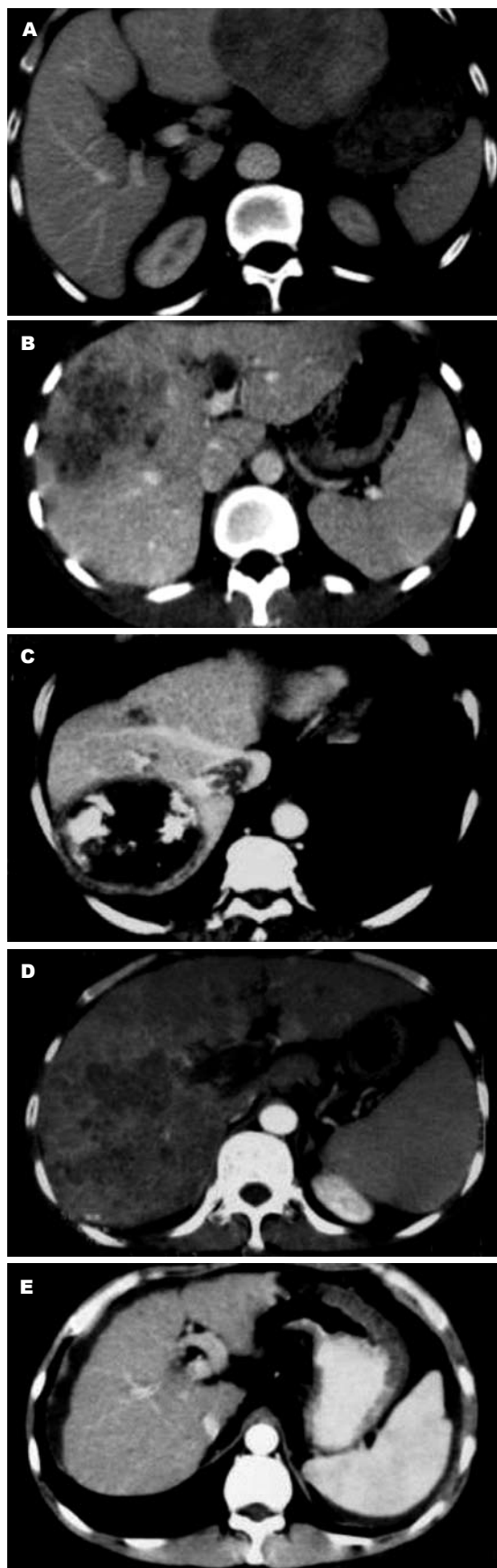


图1 PHC患者影像学检查。A: 病灶边缘清楚,为膨胀性生长;B: 病灶边缘模糊,为浸润性生长;C: 肿瘤侵犯右肝静脉和下腔静脉;D: 肿瘤侵犯门静脉;E: 肝脏体积缩小、肝裂增宽,表面呈结节状,并有腹水,为肝硬化表现。

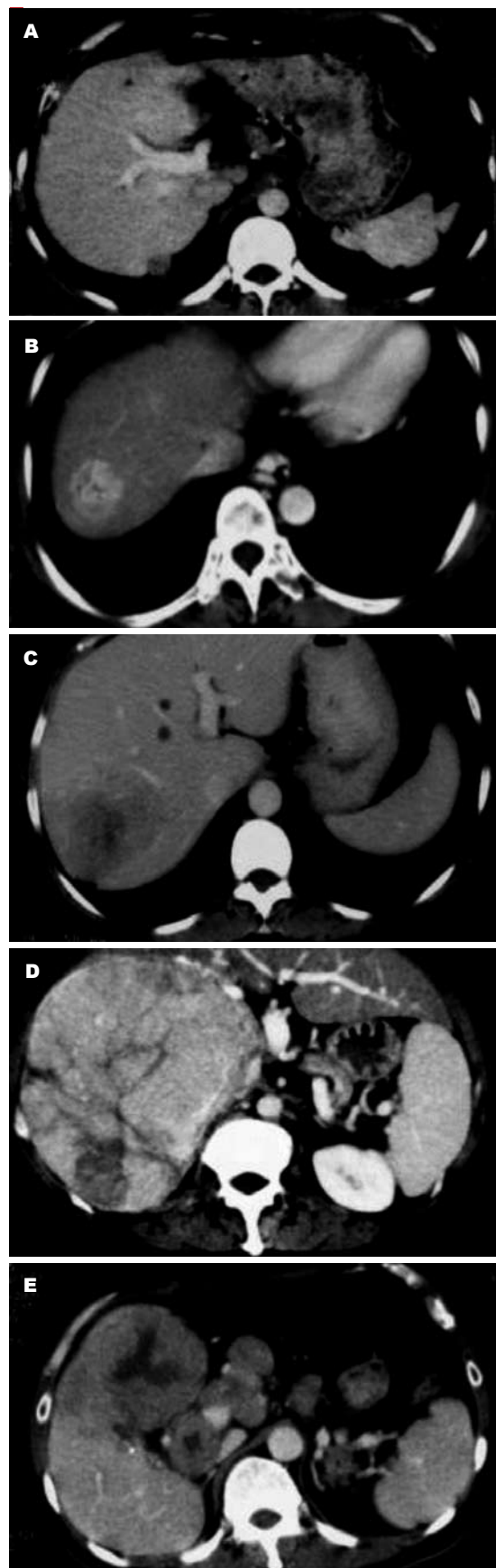


图2 不同分期的PHC患者的影像学表现。A: 单个肿瘤,长径<3cm,为Ia期;B: 单个肿瘤,瘤体长径<5cm,为Ib期;C: 肿瘤长径<10cm,在半肝,为IIa期;D: 单个肿瘤,长径>10cm,为IIb期;E: 出现腹膜后多个淋巴结转移,为IIIa期。

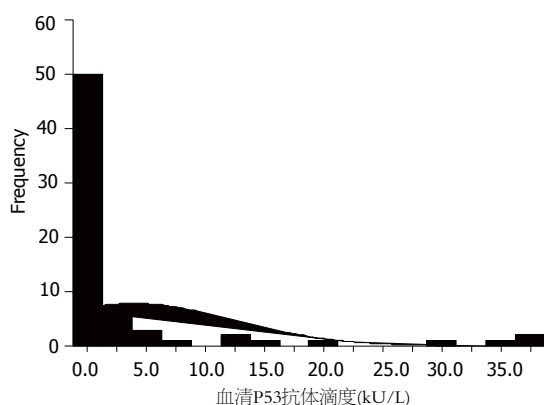


图 3 血清P53抗体滴度分布($n = 68$).

化程度: 按照Edmondson分级法, 分为高分化、中分化、低分化三类.

其他指标: (1)Child分级^[18]: 根据检验结果和临床资料将患者肝功能分为Child A、B、C三级. (2)肿瘤临床分期^[16]: 并参考“中国肝癌协作组2001年广州会议标准”, 将肝癌分为I a, I b, II a, II b, III a, III b共三期6个等级(图2).

1.2.3 资料收集 收集患者入院后例行的血常规、肝肾功能、凝血常规、肿瘤标记物等实验室检查结果. 同时抽血并离心、冷冻保存血清标本, 等待检测P53抗体. 常规行胸片、腹部增强CT扫描并根据情况行胸、腹部或全身CT、MRI、核素扫描等影像学检查. CT扫描: 介入治疗前常规采用Sensation 16多层螺旋CT扫描: 用Medrad-DP 100型高压注射器, 优维显(ultravist 300 gI/L), 剂量2 mL/kg, 流速3 mL/s, 经肘前静脉给药, 行动脉期(扫描延迟18-20 s)和门静脉期(扫描延迟时间60 s)双重扫描. 介入治疗后^[19] 4 wk复查CT, 复查参数同前. 阅片: 由2名副高级职称以上、有影像诊断和血管造影诊断经验的医生盲法分析患者的影像学资料(包括患者治疗前的胸片、CT、MRI、超声检查、核素扫描、介入治疗时的血管造影表现以及治疗后1 mo复查的影像资料). 重点按照前述观察指标评价患者影像学资料特点, 并进行肝癌的临床分期, 判定复查患者的疗效, 做好记录以备分析.

统计学处理 分析治疗前血清P53抗体水平与临床特点的关系, 包括患者性别、年龄、饮酒史、HBsAg、病理诊断、KPS评分、肿瘤分化程度、有无肝硬化、肿瘤生长方式、肿瘤长径、肝外转移、肿瘤分期、Child分级、血管侵犯、血清白蛋白、血清铁蛋白、AFP(同时按肝癌诊断标准将AFP以400 μ g/L为界值处理为二分类变量)等. 将有统计学意义的指标与血清P53

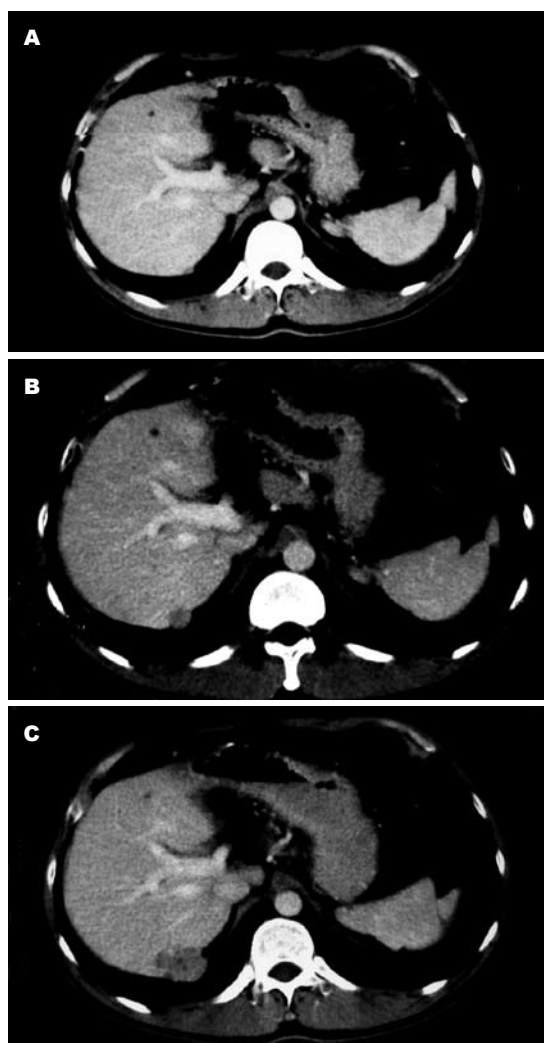


图 4 原发性肝癌患者36号的CT表现. A: 右肝后下段小结节, 血清P53抗体阳性(滴度13.509 kU/L), AFP>1210 μ g/L; B, C: CT复查示肿瘤在2 mo内明显长大.



图 5 原发性肝癌患者81号的CT表现. 血清P53抗体阴性(滴度0.93 kU/L), 肿瘤长径10.5 cm, 病理活检为中分化肝细胞肝癌.

抗体状态(阴性、阳性)作多因素Logistic回归分析. 通过单因素(秩和检验或卡方检验)及多因素Logistic回归统计分析, 明确与P53抗体阳性有关的临床特征指标.

表 2 血清P53抗体阴性和阳性者临床特征分析

	P53抗体 阴性 $n=48$	P53抗体 阳性 $n=20$	阳性率 (%)	P 值
性别				
男	41	15	26.8	0.308
女	7	5	41.7	
饮酒史				
无	36	17	32.1	0.368
有	12	3	20.0	
HbsAg				
阴性	14	7	33.3	0.638
阳性	34	13	27.7	
KPS评分				
100	20	5	20.0	0.336 ¹
90	13	8	38.1	
80	12	5	29.4	
70	1	2	66.7	
60	2	0	0	
肝硬化				
无	30	16	34.8	0.163
有	18	4	18.2	
生长方式				
膨胀	27	11	28.9	0.925
浸润	21	9	30.0	
肝外转移				
无	38	8	17.4	0.002
有	10	12	54.5	
肿瘤分期				
Ia	4	1	20.0	0.027 ¹
Ib	5	1	16.7	
IIa	13	1	7.1	
IIb	16	9	36.0	
IIIa	10	8	44.4	
IIIb	0	0		
Child分级				
A	38	17	30.9	0.541 ¹
B	8	3	27.3	
C	2	0	0	
血管侵犯				
0级	32	7	17.9	0.010 ¹
1级	10	6	37.5	
2级	5	5	50.0	
3级	1	2	66.7	
AFP				
<400 $\mu\text{g/L}$	31	10	24.4	0.263
≥ 400 $\mu\text{g/L}$	17	10	37.0	

¹Wilcoxon秩和检验; 余采用四格表卡方检验。

2 结果

2.1 血清P53抗体检测 本研究共收集75例患者血清, 排除了不符合纳入标准的7例, 共检测了68例共89份血清标本, 其中男56例(82.4%), 女12例(17.6%)。有13例患者检测了2次P53抗体, 4例患者检测了3次。患者血清P53抗体检测情况: 68例中治疗前血清P53抗体最大值37.022 kU/L, 最小值0.161 kU/L, 中位数0.798 kU/L, 抗体定量值分布见图3。按照阳性>1.15 kU/L标准判断, 29.4%(20/68)患者血清P53抗体阳性。部分患者血清P53抗体滴度及CT图片(图4-5)。

表 3 血清P53抗体阴性和阳性者临床特征均数/中位数比较分析

	P53抗体 阴性 $n=48$	P53抗体 阳性 $n=20$	P 值
年龄(岁)	51.88	49.7	0.519 ²
血清白蛋白(g/L)	36.27	34.81	0.377 ²
AFP($\mu\text{g/L}$)	86.395	490	0.162 ¹
血清铁蛋白($\mu\text{g/L}$)	422.3	373	0.389 ¹
肿瘤最大径(cm)($n=56$)	9 ($n=38$)	7 ($n=18$)	0.888 ¹

¹Wilcoxon秩和检验; ² t 检验, $P<0.05$, 双侧, 认为有意义。

表 4 血清P53抗体阴性和阳性者临床特征分析

	P53抗体 阴性 $n=19$	P53抗体 阳性 $n=11$	阳性率 (%)	P 值
病理诊断				
HCC	13	6	31.6	0.205
非HCC	6	5	45.5	
肿瘤分化程度				
高	3	1	25.0	0.020 ¹
中	12	2	14.2	
低	4	8	66.7	

¹Wilcoxon秩和检验, 余采用四格表卡方检验。

表 5 临床特征和血清P53抗体状态的多因素Logistic回归分析

	P 值	OR值	95%CI
肝外转移	0.022	4.185	1.266–13.829
血管侵犯	0.102	1.720	0.897–3.299
肿瘤分期	0.798	1.087	0.574–2.061

2.2 病例断面研究 血清P53抗体阴性和阳性两组患者临床特征见表2-4。单因素分析显示, 血清P53抗体阳性与阴性两组患者间肝外转移、分化程度、病理诊断、肿瘤分期、血管侵犯的差别有统计学意义。根据单因素统计分析结果, 将有统计学意义因素(肿瘤分化程度、病理诊断两指标因例数不够, 不纳入回归模型)纳入多因素Logistic回归模型, 进行多因素统计分析, 明确与P53抗体阳性有关的临床特征。统计结果表明: 肝外转移是与血清P53抗体阳性有关的独立因素(表5)。

3 讨论

1979年, Deleo *et al*^[20]发现了小鼠对由甲基胆蒽诱发的肿瘤所产生的针对P53蛋白的体液免疫; 也有人发现带有SV40肿瘤的动物出现针对P53蛋白的体液免疫反应。1982年, Crawford *et al*^[21]

首先在乳腺癌患者中发现并描述了P53抗体. 人类肿瘤中, P53突变是最常见的基因改变, 大约有50%的肿瘤患者出现P53基因突变, 已有1000余种P53突变被发现. 突变的P53基因表达突变的P53蛋白, 不能进行DNA修复和控制细胞分裂, 另一重要特点是突变的P53蛋白的半衰期由野生型的20 min增长到数小时之久, 并在肿瘤细胞核内积聚^[2-3]. 积聚于细胞核中的突变P53蛋白, 在细胞坏死裂解后进入体液, 导致机体对这一蛋白产生自身体液免疫, 从而产生了P53抗体. 通常, 对肿瘤组织中的P53基因测序或用免疫组化显示肿瘤细胞中突变的P53蛋白是检测肿瘤有无P53基因突变的金标准. 但基因测序技术条件要求高, 且两种方法均需要肿瘤标本, 在临床中常规应用有较大难度. 许多研究发现P53抗体出现与P53蛋白积聚以及P53基因突变有明显相关性, 因而可以相对简单地由血清中P53抗体状态推测机体有无P53基因突变^[7]. 在正常人群中, 和良性疾病中, 极少检测到P53抗体, 阳性率明显低于恶性肿瘤患者^[7,13,15,22-23]. 通常认为, P53抗体阳性与肿瘤分化低、分期晚、化疗耐药等提示肿瘤恶性生物学行为的指标有关^[5-6,9,11], 但关于P53抗体在预后分析中的价值, 研究者持有不同观点. 有认为不宜作预后指标^[24-25]; 也有人认为可用于预后判断^[7].

本研究分析了68例PHC患者(男56例, 女12例), P53抗体阳性率29.4%(20/68), 符合其他文献报道肝癌患者中的阳性率7-32%的范围^[9,12-15]. 不同研究的P53抗体阳性率差异较大, 与研究纳入患者的种族、肿瘤分期有关, 也可能与P53基因突变的部位、类型有关. 单因素分析显示血清P53抗体是否阳性与患者的性别、年龄、饮酒史、HBsAg、肝功能分级、白蛋白等均无差别, 而且与患者生活质量(KPS)评分、有无肝硬化也无明显关系. 而肿瘤分化程度、血管侵犯、肝外转移等代表肿瘤不良生物学特性的指标在P53抗体阳性、阴性两组患者间差别较大. 与前人研究相似^[6,12-13].

单因素分析显示, 病理分化程度为低分化者, P53抗体阳性率66.7%, 明显高于高分化(25.0%)和中分化(15.4%)者. 肿瘤分期晚者, P53抗体阳性率高于分期早者. 这些结果提示血清P53抗体阳性患者, 其肿瘤分化程度低, 分期晚, 恶性度高. 基础研究也发现P53基因突变率在分化较差的肝癌中更高, 在肿瘤晚期比在早期更

多地出现P53基因突变^[27-28]. 同时, 血清P53抗体阳性者, 肿瘤更容易侵犯血管($P = 0.010$), 包括门静脉、肝动脉、肝静脉、下腔静脉, 造成癌栓阻塞管腔和/或肝动脉与静脉系统之间的瘘, 因而更容易发生远处转移. Saffroy *et al*^[9]分析了130例欧洲PHC患者, 也发现P53抗体与AFP无关, 但阳性者更有可能出现血管侵犯. 但是, 突变的P53蛋白与肿瘤由原位生长到侵入血管再到远处转移这一系列过程中的作用机制, 尚未明确, 有待在分子生物学水平深入研究. P53抗体阳性、阴性患者间肿瘤长径没有明显差异(秩和检验 $P > 0.05$). 如患者5、36号, 肿瘤长径分别为1.5、3.0 cm, 而P53抗体均为阳性, 滴度高达3.180 kU/L、13.509 kU/L; 相反, 患者81号, 肿瘤长径11.0 cm, P53抗体阴性, 滴度0.930 kU/L, 但病检结果为中分化肿瘤. 说明虽然肿瘤长径大, 但分化较好, 没有出现P53抗体突变. 也有可能是P53基因的突变系少见突变, 针对常见突变进行检测的P53抗体试剂不能检测出机体针对这一少见突变产生的抗体. Bergqvist *et al*^[6]也发现肺癌患者的血清P53抗体与肿瘤分化、TNM分期有密切关系, 而与肿瘤病理类型、原发肿瘤大小、部位无关. Shiota *et al*^[13]分析86例HCC, 发现P53抗体阳性与血胆红素、和肿瘤数目有关, 与瘤体大小无关. 分析30例有病理结果的患者的肿瘤类型, HCC 19例, 6例(24%)P53抗体阳性, 胆管源性恶性肿瘤10例, 4例(40%)阳性, 肝母细胞瘤1例, P53抗体阳性, HCC与非HCC的P53抗体阳性率没有统计学意义(卡方检验, $P = 0.714$). 但数据显示在胆管源性肿瘤中, P53抗体阳性率较高, 有待今后扩大样本量, 了解有无差别, 同时也需要进一步研究HCC和胆管源性肿瘤P53基因突变热点、变异的P53蛋白构象以及各自作用机制的区别. 根据经验, 膨胀生长的肝癌, 通常分化较好, 虽然为恶性肿瘤, 但可压迫周围肝实质, 出现假包膜. 尽管前面得出肿瘤分化程度与P53抗体相关, 但分析P53抗体与肿瘤生长特性发现, 两者间无相关性. 其原因有可能为样本量太少; P53基因突变位点不同引起P53抗体检测出现差别; 判断膨胀、浸润生长, 出现的测量性偏倚. 所以, 两者间的关系有待进一步扩大样本, 分析考证. AFP是公认的PHC敏感性、特异性较高的肿瘤标志物, 但不足之处在于约有30%肝癌患者的AFP在正常范围内, 且分析AFP增高时需要排除妊娠、生殖细胞肿瘤等情况^[28]. 按照2004

年广州会议肝癌的诊断标准^[16],将患者AFP值以400 $\mu\text{g/L}$ 为界分为两组,用配对卡方检验比较AFP检出率(>400 $\mu\text{g/L}$)与P53抗体阳性率。虽然P53抗体敏感性较低,但按照现有样本和检验水准,尚不能认为AFP检出率高于P53抗体阳性率。另外,本研究 and Saffroy *et al*^[9]在分析了130例欧洲的肝癌患者后,均发现P53抗体与AFP无相关性。本研究进一步分析数据发现,在AFP小于诊断标准400 $\mu\text{g/L}$ 的41例患者中,有10例P53抗体阳性。同时,分子生物学研究也发现,P53基因的突变可能出现在肝细胞癌变过程的早期,并随肿瘤发展,逐渐升高^[28]。因此,我们可以利用P53抗体的高特异性^[7-8,11],在肝癌诊断上可以与AFP互补,有助于AFP小于400 $\mu\text{g/L}$ 患者的诊断;同时,对于AFP大于400 $\mu\text{g/L}$ 的患者,P53抗体阳性可以提高肝癌诊断的把握度。血清铁蛋白在PHC患者诊断中也有一定意义^[30-31],本研究发现血清P53抗体阳性、阴性间与铁蛋白水平无明显关系提示两者结合有助于肝癌的诊断。

对血清P53抗体与肝癌患者临床病理特征的断面研究初步提示:P53抗体阳性、阴性患者间,性别、年龄、饮酒史、HbsAg、KPS、病理诊断、肝硬化、生长方式、Child分级、血清白蛋白、肿瘤长径均无差别,而与代表肿瘤不良生物学特征的指标肿瘤分化程度、临床分期和肝外转移有关。

本研究限度受条件限制,纳入的样本例数不够多,有可能未能发现一些潜在的有意义的联系;受时间限制,没有患者随访的生存资料。有待于今后继续随访,获得生存信息,作Cox风险比分析;没有正常对照,但对本研究没有太大影响。因为许多研究证实正常人群中,极少有血清P53抗体检出;纳入对象均是华西医院介入科住院患者,有可能存在选择性偏倚。

本文得出的结论如下:(1)对68例PHC患者血清P53抗体与临床特征关系分析发现,P53抗体阳性与肿瘤分化程度低、肝外转移、肿瘤分期晚、血管侵犯等代表肿瘤不良生物学特征的指标有关;(2)血清P53抗体与AFP相结合,有助与AFP<400 $\mu\text{g/L}$ 患者的肝癌临床诊断。

总之,由于血清P53抗体检测方便、准确,特异性高,可应用于临床作为PHC的辅助诊断手段,提示肿瘤的不良生物学特征和较差的预后。有必要进一步扩大样本量深入研究血清P53抗体的临床意义。

4 参考文献

- 1 Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, Hovig E, Smith-Sorensen B, Montesano R, Harris CC. Database of P53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 3551-3555
- 2 Casey G, Lopez ME, Ramos JC, Arboleda MJ, Shaughnessy M, Karlan B, Slamon DJ. DNA sequence analysis of exons 2 through 11 and immunohistochemical staining are required to detect all known P53 alterations in human malignancies. *Oncogene* 1996; 13: 1971-1981
- 3 Dowell SP, Wilson PO, Derias NW, Lane DP, Hall PA. Clinical utility of the immunocytochemical detection of P53 protein in cytological specimens. *Cancer Res* 1994; 54: 2914-2918
- 4 Volkmann M, Sinn HP, Gargel D, Frey M, Hajjar Y, Ludwig J, Hansel S, Bastert G, Wallwiener D, Fiehn W, Zentgraf H, Huober J. Anti-P53 in breast cancer: concordance of different assay procedures and association with P53 antigen expression. *Oncology* 2002; 63: 297-305
- 5 Bergstrom S, Dreilich M, Wagenius G, Brattstrom D, Larsson A, Hesselius P, Bergqvist M. The presence of anti-P53 antibodies in sera from patients with oesophageal carcinoma: correlation to treatment, tumour volume and survival. *In Vivo* 2004; 18: 615-620
- 6 Bergqvist M, Brattstrom D, Larsson A, Hesselius P, Brodin O, Wagenius G. The role of circulating anti-P53 antibodies in patients with advanced non-small cell lung cancer and their correlation to clinical parameters and survival. *BMC Cancer* 2004; 4: 66
- 7 Chang SC, Lin JK, Lin TC, Liang WY. Genetic alteration of P53, but not overexpression of intratumoral P53 protein, or serum P53 antibody is a prognostic factor in sporadic colorectal adenocarcinoma. *Int J Oncol* 2005; 26: 65-75
- 8 Takeda A, Shimada H, Nakajima K, Yoshimura S, Suzuki T, Asano T, Ochiai T, Isono K. Serum P53 antibody as a useful marker for monitoring of treatment of superficial colorectal adenocarcinoma after endoscopic resection. *Int J Clin Oncol* 2001; 6: 45-49
- 9 Saffroy R, Lelong JC, Azoulay D, Salvucci M, Reynes M, Bismuth H, Debuire B, Lemoine A. Clinical significance of circulating anti-P53 antibodies in European patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 1999; 79: 604-610
- 10 Cioffi M, Vietri MT, Gazzerri P, Magnetta R, D'Auria A, Durante A, Nola E, Puca GA, Molinari AM. Serum anti-P53 antibodies in lung cancer: comparison with established tumor markers. *Lung Cancer* 2001; 33: 163-169
- 11 Nasif WA, Lotfy M, El-Sayed IH, El-Kenawy Ael-M, El-Shahat M, El-Hak NG. Implications of CEA and P53 overexpression in the poor prognosis of colorectal cancer. *Med Oncol* 2006; 23: 237-244
- 12 Charuruks N, Tangkijvanich P, Voravud N, Chatsantikul R, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Clinical significance of P53 antigen and anti-P53 antibodies in the sera of hepatocellular carcinoma patients. *J Gastroenterol* 2001; 36: 830-836
- 13 Shiota G, Kishimoto Y, Suyama A, Okubo M, Katayama S, Harada K, Ishida M, Hori K, Suou

- T, Kawasaki H. Prognostic significance of serum anti-P53 antibody in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1997; 27: 661-668
- 14 Tangkijvanich P, Janchai A, Charuruks N, Kullavanijaya P, Theamboonlers A, Hirsch P, Poovorawan Y. Clinical associations and prognostic significance of serum anti-P53 antibodies in Thai patients with hepatocellular carcinoma. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2000; 18: 237-243
- 15 Raedle J, Oremek G, Roth WK, Caspary WF, Zeuzem S. Anti-P53 autoantibodies in hepatitis C virus-infected patients. *Anticancer Res* 1997; 17: 3079-3081
- 16 Pascual S, Zapater P, Such J, Garcia-Herola A, Sempere L, Irurzun J, Palazon JM, Carnicer F, Perez-Mateo M. Comparison of staging systems to predict survival in hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2006; 26: 673-679
- 17 Abernethy AP, Shelby-James T, Fazekas BS, Woods D, Currow DC. The Australia-modified Karnofsky Performance Status (AKPS) scale: a revised scale for contemporary palliative care clinical practice [ISRCTN81117481]. *BMC Palliat Care* 2005; 4: 7
- 18 Cholongitas E, Senzolo M, Patch D, Shaw S, Hui C, Burroughs AK. Review article: scoring systems for assessing prognosis in critically ill adult cirrhotics. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24: 453-464
- 19 Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J, Van Glabbeke M, van Oosterom AT, Christian MC, Gwyther SG. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 205-216
- 20 DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 2420-2424
- 21 Crawford LV, Pim DC, Bulbrook RD. Detection of antibodies against the cellular protein P53 in sera from patients with breast cancer. *Int J Cancer* 1982; 30: 403-408
- 22 Neri M, Betta P, Marroni P, Filiberti R, Cafferata M, Mereu C, Ivaldi G, Montanaro F, Puntoni R, Paganuzzi M. Serum anti-P53 autoantibodies in pleural malignant mesothelioma, lung cancer and non-neoplastic lung diseases. *Lung Cancer* 2003; 39: 165-172
- 23 Shimada H, Takeda A, Arima M, Okazumi S, Matsubara H, Nabeya Y, Funami Y, Hayashi H, Gunji Y, Suzuki T, Kobayashi S, Ochiai T. Serum P53 antibody is a useful tumor marker in superficial esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2000; 89: 1677-1683
- 24 Tafuri LS, Rocha GF, Gobbi H. Cell cycle related proteins in hyperplasia of usual type in breast specimens of patients with and without breast cancer. *BMC Cell Biol* 2006; 7: 29
- 25 Chow V, Yuen AP, Lam KY, Ho WK, Wei WI. Prognostic significance of serum P53 protein and P53 antibody in patients with surgical treatment for head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2001; 23: 286-291
- 26 Vogelstein B. Cancer. A deadly inheritance. *Nature* 1990; 348: 681-682
- 27 Gusterson BA, Anbazhagan R, Warren W, Midgely C, Lane DP, O'Hare M, Stamps A, Carter R, Jayatilake H. Expression of P53 in premalignant and malignant squamous epithelium. *Oncogene* 1991; 6: 1785-1789
- 28 Kashyap R, Jain A, Nalesnik M, Carr B, Barnes J, Vargas HE, Rakela J, Fung J. Clinical significance of elevated alpha-fetoprotein in adults and children. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 1709-1713
- 29 Peng SY, Chen WJ, Lai PL, Jeng YM, Sheu JC, Hsu HC. High alpha-fetoprotein level correlates with high stage, early recurrence and poor prognosis of hepatocellular carcinoma: significance of hepatitis virus infection, age, P53 and beta-catenin mutations. *Int J Cancer* 2004; 112: 44-50
- 30 Ioannou GN, Kowdley KV. Iron, HFE mutations, and hepatocellular carcinoma: is hepatic iron a carcinogen? *Clin Gastroenterol Hepatol* 2003; 1: 246-248
- 31 Lopez JB, Balasegaram M, Timor J, Thambyrajah V. Comparison of alpha-fetoprotein with some other tumour markers in Malaysians with hepatocellular carcinoma. *Malays J Pathol* 1997; 19: 53-58

电编 李琪 编辑 张焕兰

HBV相关性肝细胞癌及肝硬化患者外周血单个核细胞质谱分析

钟白云, 范学工, 刘蔚东, 黄燕, 邹明祥

■背景资料

蛋白质组学是继基因组学之后出现的一门新兴学科, 是当今生命科学研究领域的热点。肝细胞癌(HCC)是目前全球发病率高的恶性肿瘤之一, 目前对HCC蛋白质组的研究, 国内外主要针对HCC细胞株、癌组织等进行研究。

钟白云, 范学工, 黄燕, 邹明祥, 中南大学湘雅医院感染病科 湖南省长沙市 410008

刘蔚东, 中南大学湘雅医院卫生部肝胆肠外科研究中心 湖南省长沙市 410008

钟白云, 1998年中南大学湘雅医学院硕士, 副教授, 现在中南大学湘雅医院攻读博士, 从事肝癌的早期诊断及感染与免疫的研究。

通讯作者: 范学工, 410008, 湖南省长沙市湘雅路87号, 中南大学湘雅医院感染病科. xgfan@hotmail.com

电话: 0731-4327392

收稿日期: 2006-08-22 接受日期: 2006-09-25

Mass spectrometric analysis of peripheral blood mononuclear cells in patients with hepatitis B virus associated hepatocellular carcinoma or liver cirrhosis

Bai-Yun Zhong, Xue-Gong Fan, Wei-Dong Liu, Yan Huang, Ming-Xiang Zou

Bai-Yun Zhong, Xue-Gong Fan, Yan Huang, Ming-Xiang Zou, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hu'nan Province, China

Wei-Dong Liu, National Hepatobiliary and Enteric Surgery Research Center, Ministry of Health, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hu'nan Province, China

Correspondence to: Xue-Gong Fan, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital of Central South University, 87 Xiangya Road, Changsha 410008, Hu'nan Province, China. xgfan@hotmail.com

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

Abstract

AIM: To establish two-dimensional electrophoresis (2-DE) maps of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in patients with hepatitis B virus (HBV) associated hepatocellular carcinoma (HCC) or liver cirrhosis (LC), and identify the differentially expressed proteins.

METHODS: The total proteins from PBMC in patients with HBV associated HCC ($n = 16$) or LC ($n = 12$) were separated by means of immobilized pH gradient-based 2-DE. The differentially expressed proteins were screened using PDQuest analysis software, and then identified

by peptide mass fingerprint (PMF) based on matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and database searching.

RESULTS: A well-resolved and reproducible 2-DE pattern of PBMC was obtained from patients with HBV associated HCC or LC. For HCC, the mean number of protein spots was 1186 ± 43 , with an average matching rate of 91.6%, and for LC, the mean number of protein spots was 1013 ± 41 , with an average matching rate of 90.2%. Twenty-seven differential proteins were tested by MALDI-TOF-MS, and 16 were identified. Of the 16 proteins, 13 were up-regulated in patients with HCC, including heat-shock protein 27, member RAS oncogene family (RAB14), actin, alpha 1 antitrypsin, RNA-binding protein regulatory subunit and so on. By contrast, the levels of proteins such as PDX6, HSPA8 and MnSOD were significantly reduced in HCC patients. Some of these proteins participated protein synthesis and degradation, or chaperone, or protection and detoxification, or signal transduction, while some of them were involved in metabolism or cytoskeleton construction.

CONCLUSION: A well-resolved and reproducible 2-DE pattern of PBMC from patients with HBV related HCC or LC is established, and sixteen differentially expressed proteins were characterized.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Hepatitis B virus; Leukocytes; Mononuclear cell; Liver cirrhosis; Proteome; Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry

Zhong BY, Fan XG, Liu WD, Huang Y, Zou MX. Mass spectrometric analysis of peripheral blood mononuclear cells in patients with hepatitis B virus associated hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(3):254-259

摘要

目的: 建立HBV相关性肝细胞癌(HCC)及肝硬化(LC)患者外周血单个核细胞(PBMC)的双向凝胶电泳图谱, 并识别鉴定其差异表达

的蛋白质.

方法: 利用固相pH梯度双向凝胶电泳分离HBV相关性HCC($n = 16$)及LC患者($n = 12$)PBMC的总蛋白质, 凝胶经蓝银显色后, PDQuest图像分析软件进行比较分析、识别差异表达的蛋白质, 应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)得到相应的肽质指纹图谱, 然后搜索数据库鉴定部分差异蛋白质点.

结果: 得到了分辨率较高、重复性较好的HBV相关性HCC及LC患者PBMC双向凝胶电泳图谱, HBV相关性HCC及LC患者PBMC凝胶的平均蛋白质点数分别为 1186 ± 43 及 1013 ± 41 ; 组内的平均匹配率分别为91.6%, 90.2%. 对27个差异蛋白质点进行了质谱分析, 鉴定出16个蛋白质, 在HBV相关性HCC患者PBMC中表达明显增强的有热休克蛋白(HSP)27、*ras*癌基因家族(RAB14)、肌动蛋白、 α_1 -抗胰蛋白及RNA结合蛋白调节亚基等13个蛋白点; 而PDX6、HSPA8及锰超氧化物歧化酶(MnSOD)在HCC患者PBMC中低表达. 这些差异蛋白质点包括蛋白质合成与分解、分子伴侣、解毒和DNA修复相关蛋白质、三大代谢相关酶类、细胞结构相关蛋白质以及信号传导相关蛋白质六类.

结论: 建立了分辨率高且重复性较好的HBV相关性HCC及LC患者PBMC双向凝胶电泳图谱, 并识别鉴定出了一些与HBV相关性HCC癌变相关的差异表达的蛋白质.

关键词: 肝细胞癌; 乙型肝炎病毒; 单个核细胞; 肝硬化; 蛋白质组; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱

钟白云, 范学工, 刘蔚东, 黄燕, 邹明祥. HBV相关性肝细胞癌及肝硬化患者外周血单个核细胞质谱分析. 世界华人消化杂志 2007;15(3):254-259
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/254.asp>

0 引言

肝细胞癌(HCC)是全球发病率高的恶性肿瘤之一, 乙型肝炎病毒(HBV)感染是HCC的主要致病因子之一. 目前对HCC蛋白质组的研究, 国内外主要针对HCC细胞株、癌组织等^[1-5]. 本课题组前期已对HBV相关性HCC癌组织、肝硬化组织和慢性肝炎组织等进行了蛋白质差异分析研究^[6]. 但对HCC组织进行活检是入侵性的和创伤性的研究. 外周血单个核细胞(PBMC)是机体重要的免疫细胞, 与肝炎的发生、发展及诊断相

关^[7-8], 我们推测与HBV相关性HCC的发生及发展也可能存在着某些关系. 因而采用蛋白质组学方法研究PBMC, 试图寻找HCC早期诊断的有效指标, 为HCC的早期诊断、治疗及预后监测提供科学依据.

1 材料和方法

1.1 材料 2004-12/2005-12住院患者28例, 男22例, 女6例; 年龄19-64(平均43.6)岁. 其中慢性乙型肝炎肝硬化(LC)12例, 诊断标准符合2000-09(西安)病毒性肝炎防治方案^[9], AFP阳性3例, 阴性9例. HBV相关性HCC16例, 符合原发性HCC临床分期I期标准^[10], 经病理切片证实, AFP阳性14例, 阴性2例. 所有患者均排除HAV, HCV, HDV, HEV及HIV病毒的混合或重叠感染.

2D Quant Kit定量试剂盒、尿素、硫脲、NP-40、Triton X-100、二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺及固相pH梯度干胶条(IPG strip pH3-10NL, 24 cm)等为Amersham Biosciences产品; 过硫酸铵、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、甘氨酸、硫代硫酸钠、碳酸氢铵、铁氰化钾、三氟乙酸及乙腈等为Sigma-Aldrich公司产品; 胰蛋白酶(Trypsin)为Promega公司产品; 余为国产分析纯. IPGphor等电聚焦仪、Ettan DALT垂直电泳槽及Image Scanner扫描仪(Amersham Biosciences公司); 低温高速离心机(Beckman公司); 恒温水箱(英国Grant公司); 真空冷冻干燥仪(Savant speed Vac & UVS400); Voyager-DE STR 4307 MALDI-TOF-MS质谱仪(Applied Biosystem公司). LabScan扫描软件及Data Explorer质谱分析软件(Applied Biosystem公司产品); PDQuest双向凝胶图谱分析软件(Bio-Rad公司产品); Mascot Distiller质谱信号峰识别软件及Mascot肽质量指纹图数据库查询软件(Matrixscience公司产品).

1.2 方法 每例研究对象空腹采血10 mL-15 mL, 分离PBMC, 置于-70℃. 采用Amersham Biosciences公司专门针对蛋白质组学研究的蛋白质抽提设计的2D Quant Kit定量试剂盒, 按说明操作.

1.2.1 双向凝胶电泳 第一向固相pH梯度等电聚焦; 第二向垂直SDS-PAGE电泳, 将平衡后的胶条移至PAGE分离胶上端, 在一向IPG胶条的酸性端放置双向凝胶电泳标准蛋白质, 排净气泡后用5 g/L的琼脂糖封胶^[11]. 电泳条件为: 2.5 W/胶电泳30 min, 然后以12 W/胶恒功率

■研究前沿

HCC的早期诊断、癌变机制及发现新的生物治疗靶点等是目前HCC研究热点和重点, 应用新技术去发现具有高度特异性和灵敏度的HCC早期分子标记, 对于HCC的高危人群, 尤其是慢性HBV感染者, 显得尤为迫切.

■应用要点

外周血单个核细胞(PBMC)是机体重要的免疫细胞,采用蛋白质组表达差异分析研究HCC及肝硬化患者PBMC,试图寻找HCC早期诊断有效指标,为HCC的早期诊断、治疗及预后监测提供科学依据。此种微创方法利于健康筛查。本文建立的PBMC蛋白质组表达差异分析方法,也可用于其他恶性肿瘤等疾病的研究,为寻找其诊断的分子标志、治疗及预后监测发挥作用。

表 1 HBV相关性HCC及LC病人PBMC差异表达蛋白质点

编号	序列号	蛋白质名称	标记	等电点 ¹	分子量(M _r) ¹	蛋白功能
03	gi 4758638	peroxiredoxin 6(PDX6)	↓	6.00	25 130	保护与细胞解毒
04	gi 54696638	HSP 27 protein	↑	5.98	22 830	分子伴侣
05	gi 55957331	RAB14, member RAS oncogene family	↑	5.94	20 510	信号传导
07	gi 3219762	Actin	↑	4.66	37 520	细胞骨架
08	gi 28193184	unamed protein product	↑	5.10	35 330	未明功能
09	gi 942629	Alpha 1 antitrypsin	↑	5.37	44 280	蛋白质合成与分解
10	A27077	HSPA8 protein (Fragment)	↓	5.42	71 080	分子伴侣
11	1FZAB	fibrinogen fragment d, chain B-	↑	7.66	36 330	止血与凝血
12	gi 35053	uracil DNA glycosylase(UNG)	↑	8.22	35 700	DNA修复与调节
13	gi 67464046	Chain Q, Crsytal Structure Of Human Liver GAPDH	↑	8.58	36 480	新陈代谢
17	A37378	Glutathione transferase (EC 2.5.1.18)	↑	5.43	23 570	分子伴侣
20	gi 600075	beta-actin	↑	5.26	18 090	细胞骨架
23	gi 72071136	similar to Trafficking protein particle complex subunit 1	↑	6.08	17 480	运输与结合
25	AAC12806	RNA-binding protein regulatory subunit	↑	6.33	20 500	癌基因与抑癌基因相关蛋白
26	gi 2780819	Chain B, Human Manganese Superoxide Dismutase Mutant Q143n(MnSOD)	↓	6.86	22 290	保护与细胞解毒
27	gi 32891807	biliverdin reductase B flavin reductase (NADPH)	↑	7.13	22 210	新陈代谢

¹来自数据库的理论物质的相对分子质量和等电点; ↑表示HCC组比LC组蛋白质斑点上调3倍以上; ↓表示HCC组比LC组蛋白质斑点下调3倍以上。

电泳,直至溴酚兰指示线到达凝胶底边处停止电泳。将凝胶从玻璃板上剥离下来,双蒸水清洗三次后进行蓝银显色。蓝银染色方法即为改进的传统胶体考染法(Blue silver法)^[12]。凝胶经Imagescanner扫描仪及LabScan扫描软件扫描,获取图像(分辨率为300 DPI),图像和凝胶大小比例为1:1),用PDQuest图象分析软件依次进行点检测、背景消减、标准化、匹配、建立平均凝胶、比较差异等分析。所有数据的统计分析在Excel及SPSS11.0软件上进行。

1.2.2 质谱分析 首先切割选定蛋白质点并置于1.5 mL的Eppendorf管中,超纯水反复冲洗干净后脱色,待凝胶的蓝色消褪后弃去脱色工作液,加超纯水反复冲洗至无色,再加入乙腈脱水2次,使胶块萎缩变白并黏在一起后,去掉乙腈,置于真空冷冻干燥仪中抽干;然后用胰酶37℃酶解24 h或过夜。酶解完成后,将样品萃取、脱盐、抽干浓缩及点样,室温干燥待测。将制备好的点样板放入Voyager-DE STR 4307 MALDI-TOF-MS质谱仪中进行分析,采用反射模式,正离子谱测定,离子源加速电压为20 000 V,反射电压比为1.12, N₂激光波长337 nm,脉冲宽度为3 ns,离子延迟提取100 ns,真空度4×10⁻⁷Torr,质谱

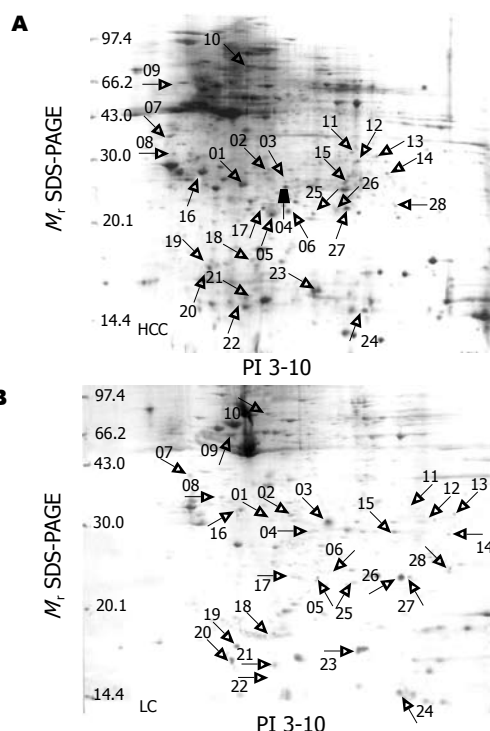


图 1 HBV相关性HCC及LC患者PBMC双向电泳图谱。水平轴为等电点方向;垂直轴为相对分子质量方向;箭头所示为差异蛋白点。

信号单次扫描累加50次,使用ACTH作为外部标准,胰蛋白酶自切降解峰(842.510, 2211.105)作为内部标准校正,获得肽质量指纹图(PMF)。

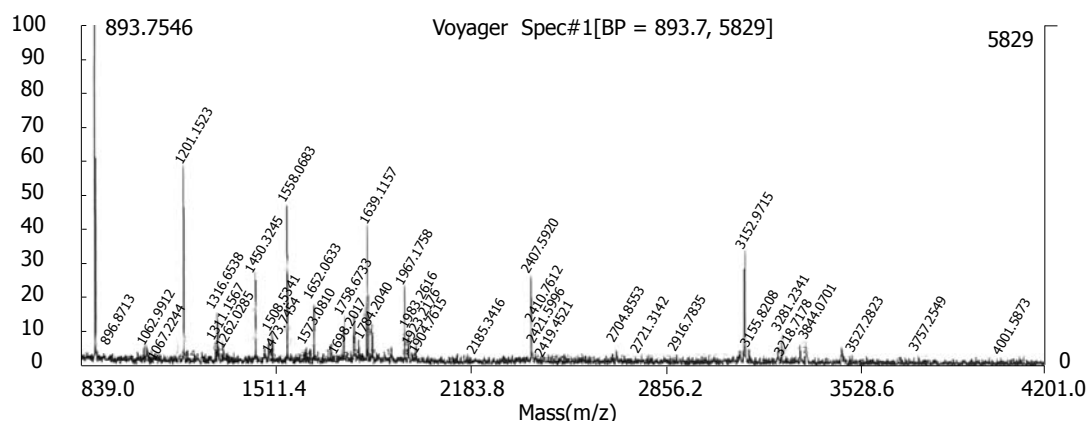


图2 HBV相关性HCC及LC患者PBMC双向电泳图谱蛋白质点05的肽质量指纹图谱. x轴为质荷比(m/z), y轴为相对强度; 峰旁标示的数字代表肽片段的单同位素峰 $[M+H]^+$ 的质量数.

■名词解释

蛋白质组: 即“proteome”, 定义为“一种基因组所表达的全部蛋白质”, 是1994年澳大利亚Macquarie大学的Wilkins和Williams *et al*在意大利的一次科学会议上首次提出的. 这个新术语很快得到了国际生物界的认可, 并成为当今生命科学领域研究的热点.

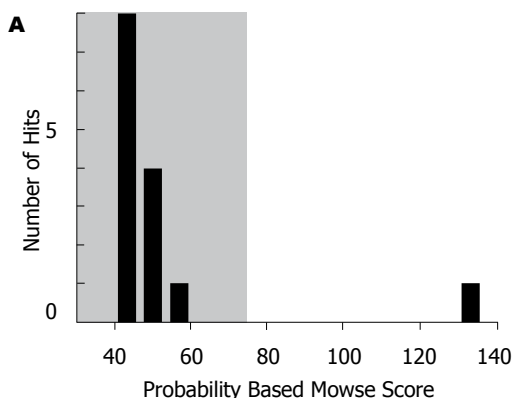


图3 05号蛋白质得分与蛋白质数据库查询到gil55957331蛋白质的匹配和序列覆盖情况. A: Mascot得分示意图: x轴为Mascot得分, y轴为匹配的个数, 得分超出阴影区表示得到阳性鉴定($P < 0.05$); B: 所鉴定RAB14蛋白质的等电点、相对分子质量、序列和通过质谱分析多肽片段得到氨基酸残基序列.

B MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

Protein View

Match to: gil55957331 Score: 136 Expect: 3.7e-09
RAB14, member ras oncogene family [homo sapiens]
Nominal mass (M_r) 20510, Calculated pI Value: 5.94
NCBI BLAST search of [gil55957331](#) against nr
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Homo sapiens](#)

Links to retrieve other entries containing this sequence from

NCBI Entrez: [gil73536235](#) from [Homo sapiens](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl(C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Number of mass Values searched: 31

Number of mass Values matched: 13

Sequence Coverage: 57%

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MATAPYNYSY IFKYIIIGDM GVGKSCLLHQ FTEK**KFMADC PHTIGVEFGT**
51 **R**IIEVSGQKI **K**LQIWDTAGQ **E**RFRAVTRSY YRGAAGALMV YDITRRSTY
101 **H**LSSWLTDAR **N**LNTNPNTVII **L**IGNKADLEA **Q**RDVITYEAK **Q**FAEENGLF
151 **L**EASAKTGEN VEDAFLEAAK KIYQNIQDGS L

获得的PMF图谱用Mascot Distiller软件识别单同位素信号峰, 获得的肽片段的质荷比(m/z)数值输入Mascot查询系统进行检索. 搜索数据库为SWISS-PROT和NCBI蛋白质数据库, 其他搜索条件为: 肽片段质量800-5 000 Da, 表观等电点的误差范围为 ± 0.5 pH, 表观相对分子质量的误差范围为 $\pm 20\%$, 肽片段质量最大允许误差为100 ppm, 允许漏切的胰酶酶切位点数为1个, 物种来源为人类(*Homo sapiens*), 离子种类选择 $[M+H]^+$ 和单同位素峰(monoisotopic), 固定修饰为半胱氨酸碘乙酰胺化(carbamidomethyl).

2 结果

2.1 HBV相关性肝细胞癌、肝硬化患者PBMC蛋白质双向电泳图谱 PBMC总蛋白质经双向凝胶电泳分离, 蓝银显色后得到背景清晰、分辨率高、重复性好2-DE图谱. HBV相关性HCC及LC患者PBMC凝胶的平均蛋白质点数分别为 1186 ± 43 及 1013 ± 41 ; 组内的平均匹配率分别为91.6%, 90.2%(图1).

2.2 差异蛋白质点的MALDI-TOF-MS肽质指纹图分析 通过PDQuest软件分析HBV相关性HCC及LC患者PBMC差异表达的蛋白质, 随机选取至少在50%的凝胶中均有相同变化及表达量相差3倍以上的差异点共27个通过胶内原位酶解进行MALDI-TOF-MS肽质量指纹图的测定, 并以胰蛋白酶自切降解峰作为内部标准校正, 获得23张PMF. 图2为蛋白质点05的肽质量指纹图谱. 利用Mascot Distiller软件搜索SWISS-PROT和NCBI蛋白质数据库, 将查询到的结果再结合双向凝胶电泳图谱上相应点的表观等电点、相对分子质量、匹配肽段的多少(4个片段以上)和覆盖率($>15\%$)等进行综合分析, 寻找与之匹配的相关蛋白质, 鉴定的蛋白质名称及相应的相对分子质量和等电点见表1. (图3为上调05号蛋白质得分及其在蛋白质数据库查询到

■同行评价

本课题以HBV相关性HCC及肝硬化患者PBMC为研究对象,对PBMC的蛋白质进行了分析鉴定,选题较新颖,文题简明、切题,摘要内容完整,研究对象明确,实验结果可靠,具有较好的科学性和创新性,一定程度上反映了我国HBV相关性HCC的蛋白质组学研究的水平。

gi|55957331蛋白质的匹配和序列覆盖情况。

3 讨论

PBMC是机体重要的免疫细胞,在多种疾病发生、发展、治疗及预后判断过程中发挥重要作用^[7,13]。HBV相关性HCC患者体内HBV与肿瘤细胞本身及其产物刺激机体,免疫细胞就会识别这些“非己”成分,产生能抵抗“非己”成分的特殊物质,从而破坏和排斥进入体内的病原体和肿瘤细胞等,以便维持人体内部环境的平衡和稳定。在此过程中可能会出现一些与HCC诊断、治疗及监测预后密切相关的分子标记, Wang *et al*^[14]从PBMC中分离自然杀伤细胞(NK)体外培养增殖用于杀伤培养的HCC细胞,探讨HCC的免疫治疗。Mou *et al*^[13]报道检测PBMC中MAGE基因mRNA水平可早期预测HCC转移及评估预后。但从蛋白质组学探索PBMC寻找HCC诊断及治疗文献罕见。血清中含高丰度的白蛋白、免疫球蛋白及补体,如何有效去除这些蛋白质,是目前血清蛋白质组学的一道屏障。PBMC较血清成份易于分离与纯化,且是重要的免疫细胞,于是我们摸索建立了重复性较好HBV相关性HCC及LC患者PBMC蛋白质表达谱。PBMC凝胶的平均蛋白质点数分别为 1186 ± 43 及 1013 ± 41 ;组内的平均匹配率分别为91.6%, 90.2%。我们采用改进的考染方法-蓝银染色法对2-DE凝胶进行显色,胶本身着色较浅、背景好,灵敏度优于传统的考染方法。蓝银染色方法的灵敏度可达1纳克/蛋白点,明显优于传统的胶体考染法。经PDQuest软件分析,随机选取27差异蛋白点进行MALDI-TOF-MS肽质量指纹图的测定,共鉴定出16个蛋白质见表1,在HBV相关性HCC患者PBMC中表达明显增强的有热休克蛋白质(HSP)27、ras癌基因家族(RAB14)、肌动蛋白(Actin)、 α_1 -抗胰蛋白酶(Alpha 1 antitrypsin)、RNA结合蛋白调节亚基(RNA-binding protein regulatory subunit)等13个蛋白点;而PDX6、HSPA8及锰超氧化物歧化酶(MnSOD)在HCC患者PBMC中低表达。

初步鉴定的差异蛋白点,根据SWISS-PROT和NCBI蛋白质数据库中提供的功能信息进行了分类:包括蛋白质合成与分解、分子伴侣、解毒和DNA修复相关蛋白质、三大代谢相关酶类、细胞结构相关蛋白质以及信号传导相关蛋白质六类。因为所鉴定的蛋白质具有不同的功能,这反映出肿瘤发生、发展机制非常复杂。其中一部分是参与基本物质代谢和能量产生的

蛋白质,这些蛋白质共同完成了一些细胞的基本生物学过程,如三羧酸循环,糖酵解等;一部分与肿瘤发生及发展密切相关^[15-16],如RNA结合蛋白调节亚基、ras癌基因家族;还有一大类蛋白质被统称为分子伴侣(chaperone)^[17-19],如参与细胞在热休克、损伤、感染等不利条件下的应激反应的HSP以及DNA修复及调节(uracil DNA glycosylase, UNG)等蛋白质;其他蛋白质的功能涉及细胞防御,抗氧化,以及信号传导等。

哺乳动物的ras基因家族有三个成员,分别是H-ras、K-ras、N-ras,各种ras基因具有相似的结构,均由4个外显子组成,分布于全长约30 kb的DNA上。他们的编码产物为相对分子质量(M_r)21 000的蛋白质,故称为P21蛋白,与恶性肿瘤相关,在传递细胞生长分化信号方面起重要作用^[20-23]。他属于三磷酸鸟苷(GTP)结合蛋白(一种细胞信息传递的耦联因子),通过GTP与二磷酸鸟苷(GDP)的相互转化来调节信息的传递^[24]。有研究表明,激活ras的表达能增强血管生长因子的表达,提示Ras蛋白在血管生成中发挥作用,抑制Ras蛋白活性能抑制依赖Ras蛋白的肿瘤细胞增殖,也能干扰血管生成^[25-26]。我们发现HBV相关性HCC的PBMC中RAB14表达明显增加,可能与HCC血管生成有关。总之要确认上述蛋白质是否为HCC相关的蛋白质,还需扩大配对样本量、纯化分选样品进行差异表达蛋白质分析,并对这些蛋白质在人类HCC发生发展中的作用进一步研究。

致谢:感谢湘雅医院卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室提供良好的实验条件。

4 参考文献

- 1 Cesaratto L, Vascotto C, D'Ambrosio C, Scaloni A, Baccarani U, Paron I, Damante G, Calligaris S, Quadrioglio F, Tiribelli C, Tell G. Overoxidation of peroxiredoxins as an immediate and sensitive marker of oxidative stress in HepG2 cells and its application to the redox effects induced by ischemia/reperfusion in human liver. *Free Radic Res* 2005; 39: 255-268
- 2 Li C, Tan YX, Zhou H, Ding SJ, Li SJ, Ma DJ, Man XB, Hong Y, Zhang L, Li L, Xia QC, Wu JR, Wang HY, Zeng R. Proteomic analysis of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma: Identification of potential tumor markers. *Proteomics* 2005; 5: 1125-1139
- 3 Kuramitsu Y, Nakamura K. Proteomic analysis of cancer tissues: shedding light on carcinogenesis and possible biomarkers. *Proteomics* 2006; 6: 5650-5661
- 4 Feng JT, Shang S, Beretta L. Proteomics for the early detection and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006; 25: 3810-3817
- 5 Lee CL, Hsiao HH, Lin CW, Wu SP, Huang SY,

- Wu CY, Wang AH, Khoo KH. Strategic shotgun proteomics approach for efficient construction of an expression map of targeted protein families in hepatoma cell lines. *Proteomics* 2003; 3: 2472-2486
- 6 龙云铸, 范学工, 李宁, 黄宇琨. 应用肝组织蛋白质组模式诊断乙型肝炎病毒相关性肝细胞癌的初步研究. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 231-233
- 7 Kurokohchi K, Masaki T, Himoto T, Deguchi A, Nakai S, Morishita A, Yoneyama H, Kimura Y, Watanabe S, Kuriyama S. Usefulness of liver infiltrating CD86-positive mononuclear cells for diagnosis of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2523-2529
- 8 Zhu CL, Yan WM, Zhu F, Zhu YF, Xi D, Tian DY, Levy G, Luo XP, Ning Q. Fibrinogen-like protein 2 fibroleukin expression and its correlation with disease progression in murine hepatitis virus type 3-induced fulminant hepatitis and in patients with severe viral hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6936-6940
- 9 中华医学会传染病与寄生虫病学分会/肝病学会. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 324-329
- 10 中国抗癌协会肝癌专业委员会. 原发性肝癌的临床诊断与分期标准. *中华肝脏病杂志* 2001; 9: 324
- 11 Zhang Y, Fan XG, Chen R, Xiao ZQ, Feng XP, Tian XF, Chen ZH. Comparative proteome analysis of untreated and *Helicobacter pylori*-treated HepG2. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3485-3489
- 12 Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 2004; 25: 1327-1333
- 13 Mou DC, Cai SL, Peng JR, Wang Y, Chen HS, Pang XW, Leng XS, Chen WF. Evaluation of MAGE-1 and MAGE-3 as tumour-specific markers to detect blood dissemination of hepatocellular carcinoma cells. *Br J Cancer* 2002; 86: 110-116
- 14 Wang FS, Liu MX, Zhang B, Shi M, Lei ZY, Sun WB, Du QY, Chen JM. Antitumor activities of human autologous cytokine-induced killer (CIK) cells against hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 464-468
- 15 Li H, Zeng Q, Weng Y, Lu D, Jiang H, Xu Z. Effects of ELF magnetic fields on protein expression profile of human breast cancer cell MCF7. *Sci China C Life Sci* 2005; 48: 506-514
- 16 Shukla S, Del Gatto-Konczak F, Breathnach R, Fisher SA. Competition of PTB with TIA proteins for binding to a U-rich cis-element determines tissue-specific splicing of the myosin phosphatase targeting subunit 1. *RNA* 2005; 11: 1725-1736
- 17 de Graauw M, Tijdens I, Cramer R, Corless S, Timms JF, van de Water B. Heat shock protein 27 is the major differentially phosphorylated protein involved in renal epithelial cellular stress response and controls focal adhesion organization and apoptosis. *J Biol Chem* 2005; 280: 29885-29898
- 18 Carta F, Demuro PP, Zanini C, Santona A, Castiglia D, D'Atri S, Ascierto PA, Napolitano M, Cossu A, Tadolini B, Turrini F, Manca A, Sini MC, Palmieri G, Rozzo AC. Analysis of candidate genes through a proteomics-based approach in primary cell lines from malignant melanomas and their metastases. *Melanoma Res* 2005; 15: 235-244
- 19 Priet S, Sire J, Querat G. Uracils as a cellular weapon against viruses and mechanisms of viral escape. *Curr HIV Res* 2006; 4: 31-42
- 20 Takahashi C, Contreras B, Iwanaga T, Takegami Y, Bakker A, Bronson RT, Noda M, Loda M, Hunt JL, Ewen ME. Nras loss induces metastatic conversion of Rb1-deficient neuroendocrine thyroid tumor. *Nat Genet* 2006; 38: 118-123
- 21 Coleman ML, Densham RM, Croft DR, Olson MF. Stability of p21Waf1/Cip1 CDK inhibitor protein is responsive to RhoA-mediated regulation of the actin cytoskeleton. *Oncogene* 2006; 25: 2708-2716
- 22 Friday BB, Adjei AA. K-ras as a target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1756: 127-144
- 23 Ota H, Tokunaga E, Chang K, Hikasa M, Iijima K, Eto M, Kozaki K, Akishita M, Ouchi Y, Kaneki M. Sirt1 inhibitor, Sirtinol, induces senescence-like growth arrest with attenuated Ras-MAPK signaling in human cancer cells. *Oncogene* 2006; 25: 176-185
- 24 Diaz R, Lue J, Mathews J, Yoon A, Ahn D, Garcia-Espana A, Leonardi P, Vargas MP, Pellicer A. Inhibition of Ras oncogenic activity by Ras protooncogenes. *Int J Cancer* 2005; 113: 241-248
- 25 Yu JL, May L, Lhotak V, Shahrzad S, Shirasawa S, Weitz JI, Coomber BL, Mackman N, Rak JW. Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood* 2005; 105: 1734-1741
- 26 Jeong S, Lee DH, Lee JI, Lee JW, Kwon KS, Kim PS, Kim HG, Shin YW, Kim YS, Kim YB. Expression of Ki-67, p53, and K-ras in chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6765-6769

电编 李琪 编辑 张焕兰

大肠癌CD24的表达及其与肿瘤细胞增殖和血管形成的关系

庄建良, 苏子剑, 潘群雄, 许荣誉, 李明珠

■背景资料

大肠癌的临床过程多变, 如果能够判定肿瘤的生物特点就能预测个体内肿瘤的发展过程。传统的预后指标已不能满足临床的要求。现在已有应用分子标记来确定预后分级, CD24是最近确定的新型预后标记基因, 与肿瘤的侵袭转移相关, 在确定肿瘤预后分级方面和早期诊断方面具有重要意义, CD24可能帮助外科医生判断肿瘤预后, 从而决定手术切除范围及辅助治疗方案。

庄建良, 潘群雄, 许荣誉, 李明珠, 福建医科大学附属泉州市第一医院肿瘤外科 福建省泉州市 362000

苏子剑, 福建医科大学2004级硕士研究生 福建省福州市 350004

庄建良, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事肿瘤的侵袭转移方面的研究。

通讯作者: 庄建良, 362000, 福建省泉州市东街256号, 福建医科大学附属泉州市第一医院肿瘤外科. zijiansue@gmail.com
电话: 0595-22277246

收稿日期: 2006-10-30 接受日期: 2006-11-11

Expression of CD24 and its relationship with angiogenesis and tumor cell proliferation in colorectal carcinoma

Jian-Liang Zhuang, Zi-Jian Su, Qun-Xiong Pan, Rong-Yu Xu, Ming-Zhu Li

Jian-Liang Zhuang, Qun-Xiong Pan, Rong-Yu Xu, Ming-Zhu Li, Department of Oncological Surgery, the First Hospital of Quanzhou City, Fujian Medical University, Quanzhou 362000, Fujian Province, China

Zi-Jian Su, Postgraduate of 2004 Class from Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Correspondence to: Jian-Liang Zhuang, Department of Oncological Surgery, the First Hospital of Quanzhou City, Fujian Medical University, 256 Dongjie Road, Quanzhou 362000, Fujian Province, China. zijiansue@gmail.com

Received: 2006-10-30 Accepted: 2006-11-11

Abstract

AIM: To investigate the expression of CD24 and its role in the angiogenesis and tumor cell proliferation in colorectal carcinoma.

METHODS: Direct immunofluorescence flow cytometry (FCM) was used to detect the expression of CD24 in 66 specimens of colorectal carcinoma and normal colorectal tissues. The expression of CD24 protein was shown by the percentage of positive cells (PPC) and mean fluorescence index (MFI). The expression of CD34 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in colorectal carcinoma were detected by immunohistochemistry. Microvessel density (MVD) was figured out according to the positive staining for CD34. The proliferation index of carcinoma cells was figured out according to the expression of PCNA.

RESULTS: The values of PPC and MFI were significantly higher in colorectal carcinoma tissue than that in the normal colorectal tissue (PPC: 90.40% vs 36.15%, $\chi^2 = 6.877$, $P < 0.001$; MFI: 18.10 vs 8.41, $\chi^2 = 6.934$, $P < 0.001$). The values of MFI and PPC were significantly correlated with tumor stages (Dukes and pTNM), lymph node metastasis and infiltration types ($P < 0.05$). The expression of PCNA was increased with the up-regulation of CD24 expression in CD24-positive cases ($P < 0.05$). There was a significant correlation between the positive rate of CD24 expression and the value of MVD in colorectal carcinoma ($r = 0.243$, $P = 0.050$). But the value of MFI had no marked correlation with that of MVD in colorectal carcinoma ($r = 0.115$, $P = 0.358$).

CONCLUSION: CD24 expression is obviously up-regulated in colorectal carcinoma, and it is correlated with the angiogenesis of tumor tissues and proliferation of tumor cells.

Key Words: Colorectal carcinoma; Flow cytometry; CD24; Microvessel density; Proliferating cell nuclear antigen

Zhuang JL, Su ZJ, Pan QX, Xu RY, Li MZ. Expression of CD24 and its relationship with angiogenesis and tumor cell proliferation in colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(3):260-265

摘要

目的: 探讨CD24在大肠癌中的表达及其与细胞增殖、血管生成的关系。

方法: 运用流式细胞术直接免疫荧光法检测66例大肠癌肿瘤组织及相应正常大肠黏膜CD24的表达量。CD24蛋白表达量以阳性率(PPC)和平均荧光强度MFI值表示。运用免疫组织化学法检测肿瘤组织CD34, PCNA的表达情况, 根据CD34的染色情况计算出大肠癌组织的微血管密度(microvessel density), 根据PCNA染色情况计算出肿瘤细PCNA标记指数。

结果: 大肠癌肿瘤组织CD24阳性率90.40% (75.10%-96.35%)明显高于相应的癌旁

组织36.15%(32.00%-53.28%)($\chi^2 = 6.877$, $P < 0.001$). 大肠癌肿瘤组织CD24蛋白MFI值18.10(11.45-25.43), 明显高于正常黏膜组织8.41(5.59-10.33)($\chi^2 = 6.934$, $P < 0.001$). 浸润型、高Dukes分期、高pTNM分期及有淋巴结转移的癌组织中CD24蛋白的平均荧光强度显著高于对应组($P < 0.05$). 浸润型、低分化、高Dukes分期、高pTNM分期及有淋巴结转移的癌组织中CD24蛋白阳性百分率显著高于对应组($P < 0.05$). 在CD24阳性表达病例中, PCNA的表达随着CD24表达强度的升高而升高($P < 0.05$). 大肠腺癌肿瘤细胞CD24阳性表达率与MVD呈正相关($r = 0.243$, $P = 0.050$). 而CD24蛋白平均荧光强度与MVD未见明显相关($r = 0.115$, $P = 0.358$).

结论: CD24在大肠腺癌中表达水平明显上调, 并与肿瘤细胞增殖、血管生成密切相关.

关键词: 大肠肿瘤; 流式细胞术; CD24; 核增殖抗原; 微血管密度

庄建良, 苏子剑, 潘群雄, 许荣誉, 李明珠. 大肠癌CD24的表达及其与肿瘤细胞增殖和血管形成的关系. 世界华人消化杂志 2007;15(3):260-265
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/260.asp>

0 引言

大肠癌是我国常见恶性肿瘤之一, 占全部癌症的6.8%, 大肠癌死亡率为3.54/10万, 占癌症死亡率的5.29%, 居第6位. 引起患者死亡的主要原因是肿瘤的侵袭与转移. 介导细胞黏附作用的细胞表面黏附分子在肿瘤浸润和转移中具有重要的地位. CD24是一种低分子质量高度糖基化的黏附分子, 主要表达在造血系统. 最近研究表明, 在造血系统肿瘤和一些器官的实体瘤表面可见CD24高表达. 有资料显示CD24在前列腺癌^[1-2]、非小细胞肺癌^[3]、鼻咽癌、原发性肝细胞癌^[4]、胆管细胞癌^[5]、麦克尔细胞癌^[6]、神经源性肿瘤^[7]、胰腺癌^[8]、胃癌^[9]、结肠癌^[10]、肾细胞癌^[11]、B细胞淋巴瘤^[12]、乳腺癌^[13-14]等肿瘤组织中表达增强, 且和肿瘤侵袭转移、复发和预后密切相关. 但对CD24在大肠癌侵袭转移中的作用, 特别是CD24与肿瘤性血管生成的关系尚未阐明^[15]. 本研究拟用直接免疫荧光法流式细胞术检测66例原发性大肠癌肿瘤组织中CD24的表达量, 运用免疫组织化学法检测肿瘤组织CD34, PCNA的表达情况, 分析他们的相互情况, 探讨CD24与大肠癌侵袭转移、肿瘤细胞增殖和

肿瘤性血管生成的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 泉州市第一医院2006-03/09大肠癌手术切除新鲜标本66例, 所有患者术前未经放疗和化疗, 所有病例均经切片病理确诊. 全部病例按WHO肿瘤分类标准(大肠癌)进行组织学分型, 区域淋巴结转移分站及TNM分期. 其中男37例, 女29例; 小于60岁25例, 大于60岁41例, 病理分型: 低分化癌25例, 中分化癌31例, 高分化癌10例; 大肠癌标本中浸透浆膜者47例, 未浸透浆膜者19例; 有淋巴结转移者29例; Dukes分期: A期18例, B期18例, C+D期30例. pTNM分期: I期14例, II期21例, III期20例, IV期11例.

流式细胞术标本包括肿瘤部位和肿瘤边缘5 cm以上的相应癌旁肠黏膜, 标本离体半小时内新鲜取材. 另取对应癌组织, 经40 g/L中性甲醛固定, 24 h内取材, 常规石蜡包埋, 4 μ m厚度连续切片.

1.2 方法

1.2.1 流式细胞术 离体半小时内选取大肠癌组织及距离癌组织约5 cm以上的正常大肠黏膜(经病理证实无癌组织残留)各1份, 眼科剪刀剪碎组织, 去除坏死组织和血块, 将剪碎组织置组织细胞分离器(DAKO Medimachine)中制备单细胞悬液, 500目尼龙网过滤, 将收集的细胞悬液离心(800 r/min)5 min $\times$ 3次, 弃上清液、沉淀, 用2 mL的PBS漂洗, 再以1500 r/min离心5 min, 弃上清液, PBS调整细胞数每管为 1×10^6 个细胞. 鼠抗人CK-FITC mAb一抗工作液购自Dakocytomation(Clone: MNF116). 鼠抗人CD24-PE mAb一抗工作液购自Caltag Laboratories(Clone: SN3). 每管中加入20 μ L鼠抗人CK-FITC mAb一抗工作液标记上皮细胞(正常黏膜管)和肿瘤细胞(肿瘤管), 并加入20 μ L特异的鼠抗人CD24-PE mAb一抗工作液, 另一管中加入阴性对照, 以20 μ L的IgG异硫氰酸荧光素(FITC)与细胞悬液反应. 避光室温反应30 min. 所用流式细胞仪为(FACSort型流式细胞仪). 用荧光微球校准流式细胞仪之后, 通过前向角散射(FSC)和侧向角散射(SSC)双参数, 建立FS(log)/SS(log)双参数直方图, 以矩形框和对角框选取有关细胞细胞群(尽量去除细胞碎片及细胞集团)建立二维点图(图1A). 以CK-FITC为纵坐标, SS(log)为横坐标, 建立双参数直方图, 圈定CK阳性的细胞群(图1B). 再建立FL2-CD24 PE单参数直方图检查CK阳性

■ 研发前沿

体外培养和动物模型已经证实, CD24对多种肿瘤的生长和转移相关的特性具有调节作用. 但对CD24在大肠癌侵袭转移中的作用, 特别是CD24与肿瘤性血管生成的关系尚未阐明.

■创新盘点

国内应用流式细胞仪对实体瘤进行分析多数采用酶消化或者手工破碎法收集单细胞悬液,易导致细胞溶解或者组织破碎不够、细胞数太少等问题,本实验采用组织细胞分散仪收集单细胞悬液,能避免以上问题,使实验数据更有说服力。同时应用低分子质量的CK(细胞角蛋白)标记单细胞悬液中的肿瘤细胞,从而使实验数据更加精确。

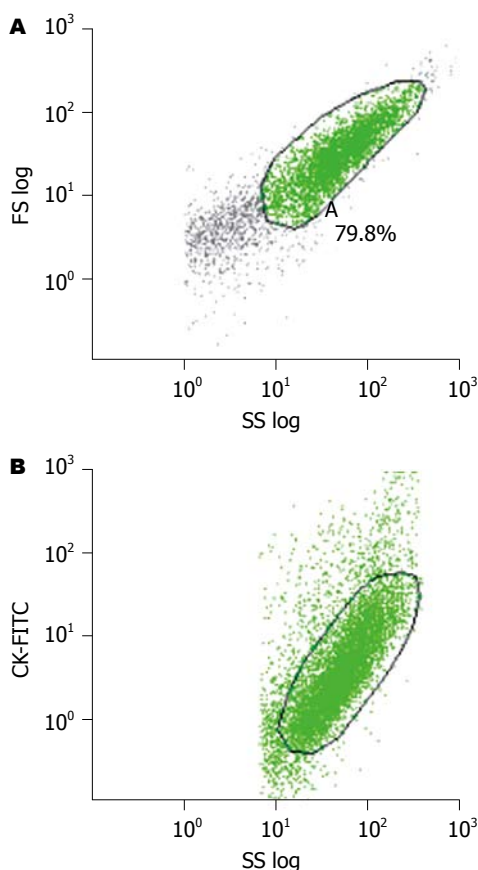


图1 双参数直方图。A: FS(log)/SS(log),以矩形框和对角框选取有关细胞细胞群(尽量去除细胞碎片及细胞集团)建立二维点图;B:以CK-FITC为纵坐标,SS(log)为横坐标,圈定CK阳性的细胞群。

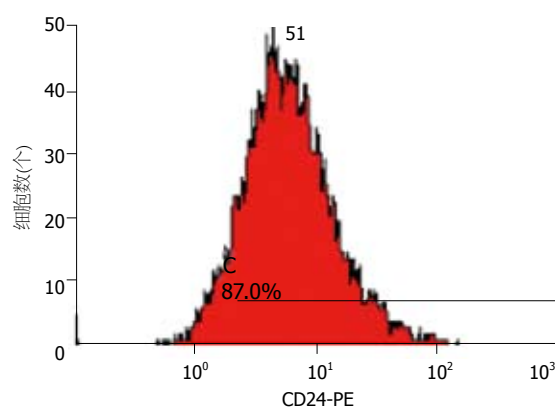


图2 FL2-CD24 PE单参数直方图(检查CK阳性的上皮细胞/肿瘤细胞CD24的表达强度)。

倍($\times 200$)镜下计数被染成棕黄色的血管数目。结果用3个200倍视野下的血管数目的平均数来表示。取其平均值作为微血管密度。分辨不清或染色模糊的细胞不计入结果。

统计学处理 正态性检验应用K-S检验法(Kolmogorov-Smirnov);方差齐性时数据用mean $\pm$ SD表示,组间比较用单因素方差分析,组间两两比较用S-N-Q检验,非正态性分布或方差不齐时数据用中位数(四分位数间距)[M(QR)]表示,采用秩和检验,组间两两比较用Nemenyi法检验。相关分析采用双变量Pearson相关分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。皆用SPSS12.0和Excell软件处理。

的上皮细胞/肿瘤细胞CD24的表达强度(图2)。依次测定每例标本中阳性细胞百分率(percentage of positive cell, PPC)和平均荧光强度值(mean fluorescence intensity, MFI)。

1.2.2 免疫荧光染色 避光室温反应后,取少量细胞悬液滴于波片上,置于荧光显微镜下(Olympus: BX-60-32FB2-A03)观察。

1.2.3 免疫组织化学染色 CD34 mAb(克隆号: QBEnd/10)、PCNA mAb(克隆号: PC10)购自福州迈新科技有限公司,操作严格按照说明书进行。用已知阳性片作阳性对照。同时用PBS代替第一抗体作阴性对照。PCNA免疫组化结果以细胞核出现棕黄色颗粒细胞为阳性细胞。随机选取5个高倍视野($\times 400$)计数阳性细胞百分率。依阳性细胞百分率判定阳性强度。阳性细胞数 $\leq 25\%$ 为“+”,26%-50%为“++”, $\geq 51\%$ 为“+++”。CD34阳性染色定位于血管内皮细胞,呈棕黄色。大肠癌组织内孤立的棕黄色血管内皮细胞或细胞簇代表一条单独的微血管。在10倍物镜下挑选微血管分布最高的区域,再在高

2 结果

2.1 免疫荧光染色结果 在免疫荧光显微镜下,可见CK-FITC阳性CD24-PE阴性的肿瘤细胞发出绿色荧光(图3A);CD24-PE阳性CK-FITC阴性的非上皮细胞发出橘红色的荧光(图3A);CD24阳性的肿瘤细胞呈CK-FITC,CD24-PE双染色,发出绿色和橘红色双色荧光(图3B-C)。染色部位均位于细胞膜。

2.2 CD24表达与大肠癌临床病理学的关系 66例大肠癌肿瘤组织CD24蛋白阳性表达率为90.40%(75.10%-96.35%),明显高于相应的癌旁组织36.15%(32.00%-53.28%), $\chi^2 = 6.877$, $P < 0.001$ 。66例大肠癌肿瘤组织CD24蛋白MFI值18.10(11.45-25.43),明显高于正常黏膜组织8.41(5.59-10.33), $\chi^2 = 6.934$, $P < 0.001$ 。浸润型、高Dukes分期、高pTNM分期及有淋巴结转移的癌组织中CD24蛋白的平均荧光强度显著高于对应组($P < 0.05$)。浸润型、低分化、高Dukes分期、高pTNM分期及有淋巴结转移的癌组织中CD24蛋白阳性百分率显著高于对应组($P < 0.05$),

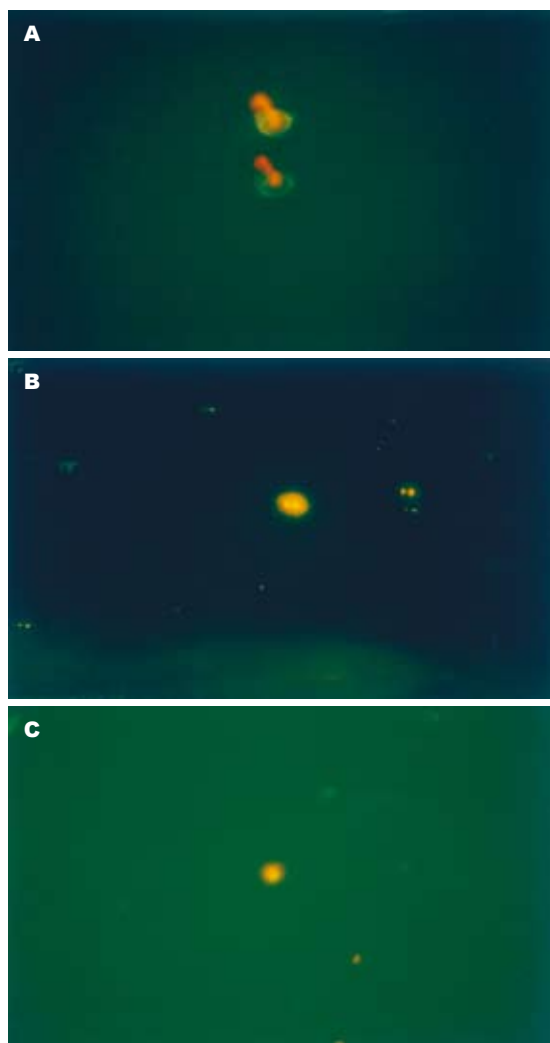


图 3 免疫荧光染色结果. A: CK-FITC阳性CD24-PE阴性的肿瘤细胞发出绿色荧光; CD24-PE阳性的非上皮细胞发出橘红色的荧光; B, C: CD24阳性的肿瘤细胞呈CK-FITC, CD24-PE双染色, 发出绿色和橘红色双色荧光.

而与大肠癌患者的性别、年龄、浸润深度无关(表1).

2.3 CD24表达与PCNA指数的关系 大肠癌CD24蛋白平均荧光强度和阳性细胞百分率与大肠癌细胞增殖指数显著相关($P < 0.05$), 并且随着CD24蛋白表达水平的增强, 细胞增殖指数也随之升高, 两者呈正相关关系(图4, 表2).

2.4 CD24表达与MVD的关系 66例大肠癌MVD在200倍视野的均数为 47.55 ± 7.86 . 随着CD24阳性细胞率的增强, MVD也升高, 两者呈正相关($r = 0.243$, $P = 0.05$). 而CD24蛋白平均荧光强度与MVD未见明显相关($r = 0.115$, $P = 0.358$).

3 讨论

CD24是一种低分子质量高度糖基化的黏附分

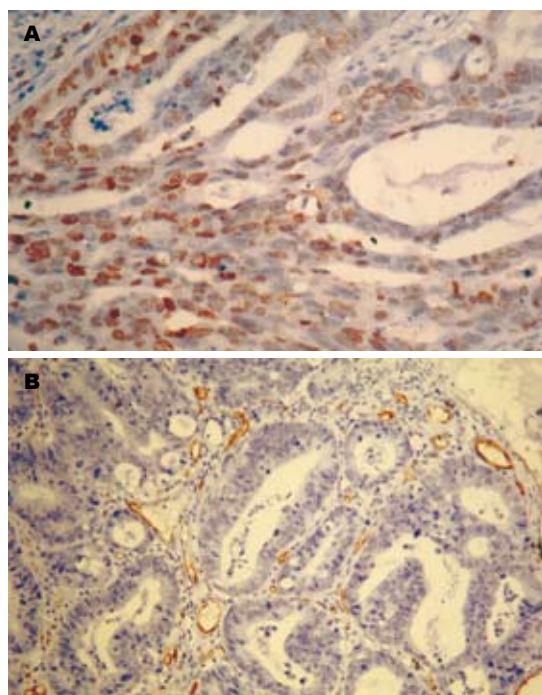


图 4 大肠癌组织免疫组织化学结果(SP). A: PCNA阳性染色定位于肿瘤细胞细胞核, 呈深棕色颗粒状沉着($\times 400$); B: CD34阳性染色定位于血管内皮细胞, 呈棕黄色($\times 200$).

子, 由27个氨基酸组成, 通过糖基磷脂酰肌醇黏附在细胞膜上^[16]. P-选择素是CD24的唯一配体, 通过低聚糖与CD24特异性结合. 在正常生理情况下, CD24能够介导单核细胞或中性粒细胞黏附于表达P-选择素的活化内皮细胞或血小板, 抗P-选择素或抗CD24抗体可阻断这种黏附作用. 在病理状态下, CD24介导癌细胞与活化血小板和内皮细胞的结合^[17]. 因此CD24/P-选择素的黏附途径, 被推测更有利于CD24阳性肿瘤细胞的浸润性和转移行为. 体外培养和动物模型已经证实CD24表达产物足以促进肿瘤的侵袭和转移^[15]. CD24明显增强P-选择素依赖的肿瘤细胞与内皮细胞黏附和肿瘤细胞在小鼠肺内迁移滞留和集落形成^[18]. 与对照组相比, CD24表达可显著增加增殖转移能力较弱的胰腺癌细胞株和乳腺癌细胞株向裸鼠肺部转移结节的数量^[18]. Senner *et al*^[19]证实CD24显著增加星形细胞瘤细胞株在小鼠纹状体内的侵袭范围. 细胞培养刮痕实验也显示, 在排除细胞增殖的影响下, 表达CD24的乳腺癌单细胞层愈合速度明显比CD24阴性的细胞快^[18]. 我们发现与正常大肠黏膜相比, 大肠癌肿瘤组织CD24蛋白阳性表达率和平均荧光强度明显增强. 浸润型、高Dukes分期、高pTNM分期、低分化及有淋巴结转移的癌组

■应用要点

国外学者应用抗CD24的mAb可以时间和剂量依赖的方式抑制表达CD24的胰腺癌细胞系和结肠癌细胞系的生长. 应用抗CD24和抗CD21特异性抗体治疗移植相关的B细胞增殖综合征已取得良好的效果. 表明应用抗CD24 mAb或者去除、降低CD24表达可能是治疗表达CD24肿瘤的一种新方案.

■名词解释

CK: 细胞角蛋白, 主要标记角化上皮、复层鳞状上皮、复层上皮、增生的角化细胞和单层上皮, 用于鳞癌(包括梭形变异), 各种腺癌(包括肾上腺癌、肝细胞癌), 移行细胞癌等上皮性肿瘤的标记。

表 1 CD24表达与大肠癌临床病理学的关系[M(Q-R)]

项目	n	肿瘤组织CD24染色	
		MFI	阳性细胞率(%)
性别			
男性	37	18.30(13.6-31.3)	91.00(80.95-97.20)
女性	29	15.20(10.0-21.9)	88.60(51.40-95.90)
年龄			
<60岁	25	15.30(10.55-20.82)	88.60(47.65-95.15)
>60岁	41	18.30(12.05-31.10)	92.30(77.90-97.15)
大体分型			
肿块型	26	17.31(11.18-23.58)	89.50(51.95-96.63)
溃疡型	30	15.20(10.15-24.38)	87.95(73.70-92.55)
浸润型	10	26.05(18.40-36.58) ^{ad}	96.35(94.48-98.35) ^f
组织学分级			
高分化	10	13.70(10.15-15.53)	77.55(48.90-89.00)
中分化	31	18.10(10.00-28.20)	91.90(65.20-96.50)
低分化	25	18.50(15.10-31.10)	92.70(80.45-97.15) ^j
Dukes分期			
A期	18	12.05(9.21-19.68)	78.05(67.50-92.05)
B期	18	15.10(10.88-18.20)	86.05(43.86-92.93)
C+D期	30	23.10(17.95-36.13) ^j	95.35(89.70-97.43) ^j
TNM分期			
I 期	14	13.50(9.89-25.60)	86.90(75.18-94.18)
II 期	21	15.10(10.50-18.10) ^k	75.10(42.65-92.60) ⁿ
III 期	20	18.52(13.50-35.43)	92.40(88.73-96.43)
IV 期	11	23.20(18.10-39.80) ^{or}	97.10(88.70-98.30)
浸润深度			
pT1	5	12.30(6.50-19.50)	75.10(73.30-86.90)
pT2	7	11.80(10.00-35.10)	80.00(75.20-99.00)
pT3	7	15.10(8.20-24.50)	91.00(50.20-92.70)
pT4	47	18.30(14.60-30.50)	92.30(77.40-97.00)
淋巴结转移			
pN0	37	15.10(10.10-18.40)	83.50(58.85-92.70)
pN1	16	18.40(13.50-23.65)	88.85(77.65-92.45)
pN2	13	35.10(20.80-42.50) ^{sv}	97.20(95.75-99.55) ^x

^a $P<0.05$ vs 肿物型; ^d $P<0.01$ vs 溃疡型; ^f $P<0.01$ vs 肿物型和溃疡型; ^k $P<0.05$ vs 高分化组; ^j $P<0.01$ vs Dukes A期和Dukes B期; ^h $P<0.05$ vs TNM III 期; ⁿ $P<0.01$ vs TNM III 期和TNM IV 期; ^o $P<0.05$ vs TNM I 期; ^r $P<0.01$ vs TNM II 期; ^s $P<0.05$ vs pN1; ^v $P<0.01$ vs pN0; ^x $P<0.01$ vs pN0和pN1。

织中CD24蛋白的表达显著高于对应组。Weichert *et al*^[10]也发现结肠癌肿瘤中有68.7%胞膜染色阳性, 84.4%胞质染色阳性, 胞质染色阳性与肿瘤临床分期(Dukes和pT分期)、淋巴结转移、远处转移和病理分级明显相关, 胞质CD24表达患者生存期明显缩短。最近Sagiv *et al*^[20]发现90.7%的结直肠癌和86.3%结直肠癌表达CD24, 从而提示CD24表达增强发生在结直肠癌肿瘤形成的早期阶段, 可能参与大肠癌的肿瘤形成过程。

表 2 PCNA表达强度与CD24表达的关系[M(Q-R)]

PCNA表 达强度	n	肿瘤组织CD24染色	
		MFI	阳性细胞率(%)
+	19	12.30(10.00-18.10)	78.40(45.00-92.70)
++	25	18.10(10.00-23.15)	92.30(66.65-96.75)
+++	22	23.50(17.15-36.53) ^b	92.40(88.62-97.43) ^d

^b $P<0.01$ vs PCNA +和PCNA ++; ^d $P<0.01$ vs PCNA +。

研究发现CD24水平与恶性肿瘤的快速生长密切相关。Baumann *et al*^[18]应用实验性动物模型发现表达有CD24的乳腺癌细胞株增殖明显比CD24阴性的细胞株增殖快。敲除CD24基因的膀胱上皮癌细胞UM-UC-3、前列腺癌细胞DU145、宫颈癌海拉(HeLa)细胞株、乳腺癌细胞MCF-7及骨肉瘤细胞SAOS-2增殖能力明显降低^[21]。我们发现大肠癌组织CD24蛋白表达水平与肿瘤细胞增殖指数显著相关, 伴随着CD24蛋白表达水平的增强, 肿瘤细胞增殖指数明显升高。提示CD24可促进肿瘤细胞生长。

我们发现, 随着大肠腺癌CD24肿瘤细胞阳性表达率的增加, MVD也升高($P=0.050$)。故提示CD24蛋白可能通过某种方式促进肿瘤性血管的生长。有关CD24与大肠癌血管生成的研究较少, 而且CD24蛋白平均荧光强度与MVD未见明显相关。因此很难对CD24在大肠癌血管生成中是否起作用下定论。这需要进一步研究。

总之, CD24参与大肠癌发生、发展, 促进肿瘤细胞生长, 可能参与大肠癌血管生成, 可通过抑制或拮抗CD24表达来抑制肿瘤生长。

4 参考文献

- 1 Kristiansen G, Pilarsky C, Wissmann C, Kaiser S, Bruemendorf T, Roepcke S, Dahl E, Hinzmann B, Specht T, Pervan J, Stephan C, Loening S, Dietel M, Rosenthal A. Expression profiling of microdissected matched prostate cancer samples reveals CD166/MEMD and CD24 as new prognostic markers for patient survival. *J Pathol* 2005; 205: 359-376
- 2 Kristiansen G, Pilarsky C, Pervan J, Sturzebecher B, Stephan C, Jung K, Loening S, Rosenthal A, Dietel M. CD24 expression is a significant predictor of PSA relapse and poor prognosis in low grade or organ confined prostate cancer. *Prostate* 2004; 58: 183-192
- 3 Kristiansen G, Schluns K, Yongwei Y, Denkert C, Dietel M, Petersen I. CD24 is an independent prognostic marker of survival in nonsmall cell lung cancer patients. *Br J Cancer* 2003; 88: 231-236
- 4 Huang LR, Hsu HC. Cloning and expression of CD24 gene in human hepatocellular carcinoma: a potential early tumor marker gene correlates with p53 mutation and tumor differentiation. *Cancer Res*

- 1995; 55: 4717-4721
- 5 Su MC, Hsu C, Kao HL, Jeng YM. CD24 expression is a prognostic factor in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Lett* 2006; 235: 34-39
- 6 Deichmann M, Kurzen H, Egner U, Altevogt P, Hartschuh W. Adhesion molecules CD171 (L1CAM) and CD24 are expressed by primary neuroendocrine carcinomas of the skin (Merkel cell carcinomas). *J Cutan Pathol* 2003; 30: 363-368
- 7 Poncet C, Frances V, Gristina R, Scheiner C, Pellissier JF, Figarella-Branger D. CD24, a glycosylphosphatidylinositol-anchored molecules is transiently expressed during the development of human central nervous system and is a marker of human neural cell lineage tumors. *Acta Neuropathol (Berl)* 1996; 91: 400-408
- 8 Jacob J, Bellach J, Grutzmann R, Alldinger I, Pilarsky C, Dietel M, Kristiansen G. Expression of CD24 in adenocarcinomas of the pancreas correlates with higher tumor grades. *Pancreatol* 2004; 4: 454-460
- 9 Jung KC, Seo JN, Kim TW, Choi YM, Oh KI, Song HH, Shin HS, Park YE. CD24 Expression in gastric adenocarcinoma is associated with tumor invasiveness. *Korean J Pathol* 2004; 38: 388-393
- 10 Weichert W, Denkert C, Burkhardt M, Gansukh T, Bellach J, Altevogt P, Dietel M, Kristiansen G. Cytoplasmic CD24 expression in colorectal cancer independently correlates with shortened patient survival. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 6574-6581
- 11 Droz D, Zachar D, Charbit L, Gogusev J, Chretien Y, Iris L. Expression of the human nephron differentiation molecules in renal cell carcinomas. *Am J Pathol* 1990; 137: 895-905
- 12 Raife TJ, Lager DJ, Kemp JD, Dick FR. Expression of CD24 (BA-1) predicts monocytic lineage in acute myeloid leukemia. *Am J Clin Pathol* 1994; 101: 296-299
- 13 Kristiansen G, Winzer KJ, Mayordomo E, Bellach J, Schluns K, Denkert C, Dahl E, Pilarsky C, Altevogt P, Gusk H, Dietel M. CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4906-4913
- 14 Surowiak P, Materna V, Gyorffy B, Matkowski R, Wojnar A, Maciejczyk A, Paluchowski P, Dziegiel P, Pudelko M, Kornafel J, Dietel M, Kristiansen G, Zabel M, Lage H. Multivariate analysis of oestrogen receptor alpha, pS2, metallothionein and CD24 expression in invasive breast cancers. *Br J Cancer* 2006; 95: 339-346
- 15 庄建良, 苏子剑, 许荣誉. CD24与肿瘤侵袭转移的关系. *国际病理科学与临床杂志* 2006; 26: 387-390
- 16 Kay R, Rosten PM, Humphries RK. CD24, a signal transducer modulating B cell activation responses, is a very short peptide with a glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor. *J Immunol* 1991; 147: 1412-1416
- 17 Aigner S, Ruppert M, Hubbe M, Sammar M, Sthoeger Z, Butcher EC, Vestweber D, Altevogt P. Heat stable antigen (mouse CD24) supports myeloid cell binding to endothelial and platelet P-selectin. *Int Immunol* 1995; 7: 1557-1565
- 18 Baumann P, Cremers N, Kroese F, Orend G, Chiquet-Ehrismann R, Uede T, Yagita H, Sleeman JP. CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 2005; 65: 10783-10793
- 19 Senner V, Sturm A, Baur I, Schrell UH, Distel L, Paulus W. CD24 promotes invasion of glioma cells *in vivo*. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58: 795-802
- 20 Sagiv E, Memeo L, Karin A, Kazanov D, Jacob-Hirsch J, Mansukhani M, Rechavi G, Hibshoosh H, Arber N. CD24 is a new oncogene, early at the multistep process of colorectal cancer carcinogenesis. *Gastroenterology* 2006; 131: 630-639
- 21 Smith SC, Oxford G, Wu Z, Nitz MD, Conaway M, Frierson HF, Hampton G, Theodorescu D. The metastasis-associated gene CD24 is regulated by Ral GTPase and is a mediator of cell proliferation and survival in human cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 1917-1922

■同行评价

本研究认为, CD24在大肠腺癌中表达水平明显上调, 并与肿瘤细胞增殖、血管形成密切相关有一定的新颖性, 创新性, 科学性较强。

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 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. (世界胃肠病学杂志社2007-01-28)

非酒精性脂肪性肝炎与细胞因子

王征, 刘东戈

■背景资料

非酒精性脂肪性肝炎(NASH)在我国和世界发达国家中的发病率有上升趋势,已引起各国学者高度重视。就其发病机制的研究涉及胰岛素抵抗、细胞因子、氧化应激等。

王征, 刘东戈, 卫生部北京医院病理科 北京市 100730
通讯作者: 王征, 100730, 北京市, 卫生部北京医院病理科.
wangzheng813@hotmail.com
电话: 010-85133881
收稿日期: 2006-09-29 接受日期: 2006-10-16

Relationship between cytokines and non-alcoholic steatohepatitis

Zheng Wang, Dong-Ge Liu

Zheng Wang, Dong-Ge Liu, Department of Pathology, Beijing Hospital, Ministry of Health, Beijing 100730, China
Correspondence to: Zheng Wang, Department of Pathology, Beijing Hospital, Ministry of Health, Beijing 100730, China. wangzheng813@hotmail.com
Received: 2006-09-29 Accepted: 2006-10-16

Abstract

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is a kind of hepatic lesion that related to metabolism and its development and progression are closely associated with cytokines. Three categories of cytokines, including Th1/Th2 cytokines, chemokines and adipocytokines, are involved in the physiopathological process of NASH. In order to elucidate the significances of cytokines in the pathogenesis, serological diagnosis, and treatment efficacy evaluation of NASH, we reviewed the documents on the relationship between cytokines and non-alcoholic steatohepatitis.

Key Words: Non-alcoholic steatohepatitis; Tumor necrosis factor- α ; Interleukin-6; Adipocytokine; Chemokine

Wang Z, Liu DG. Relationship between cytokines and non-alcoholic steatohepatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(3):266-271

摘要

非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)是一种与代谢相关的肝脏病变,其发生、发展均与细胞因子有密切的关系。参与NASH病理生理过程的细胞因子归纳起来有3类,即Th1、Th2细胞因子和趋化因子及脂肪细胞因子,本文回顾了3类细胞因子与NASH发生、发展关系的最新研究进展,从而阐明细胞因子在NASH发病机制、血清学诊断和治疗效果评价等方面的意义。

子及脂肪细胞因子,本文回顾了3类细胞因子与NASH发生、发展关系的最新研究进展,从而阐明细胞因子在NASH发病机制、血清学诊断和治疗效果评价等方面的意义。

关键词: 非酒精性脂肪性肝炎; 肿瘤坏死因子- α ; 趋化因子; 白细胞介素-6; 脂肪细胞因子

王征, 刘东戈. 非酒精性脂肪性肝炎与细胞因子. 世界华人消化杂志 2007;15(3):266-271

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/266.asp>

0 引言

非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)是无过度饮酒史,与脂质及糖代谢紊乱有关的肝脏疾病。在病理组织学上表现为:肝细胞脂肪变性;肝实质炎症反应,主要是肝腺泡三区 and 门管区混合性炎症细胞浸润、肝细胞气球样变性及Mallory小体形成;各种形式的肝纤维化^[1]。随着生活方式、行为方式的改变,NASH的发病率呈逐年升高的趋势,日本的一项流行病学调查结果显示,20 a来NASH发病率上升3-20倍^[2]。我们国家也同样存在这种情况。

细胞因子与NASH的发生、发展密切相关。参与NASH病理生理过程的细胞因子归纳起来有以下3种:(1)Th-1和Th-2细胞因子,包括TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10等;(2)趋化性细胞因子,包括CC家族的CCL2/MCP-1(CC-chemokine ligand(CCL)-2/monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1), CCL19, CCL21和RANTES. IL-8属于CXC家族的趋化因子;(3)脂肪因子也称脂肪细胞因子(adipocytokines),包括瘦素(leptin)、脂联素(adiponectin)、抵抗素(resistin)和新近发现的内脏脂肪素(visfatin)。

1 NASH与Th-1和Th-2细胞因子

人类的CD4⁺T细胞存在Th-1和Th-2两类细胞应答,Th-1细胞分泌的细胞因子为Th-1细胞因子,被称为致炎因子(proinflammatory),包括TNF- α , IL-1和IL-12. Th-2细胞分泌Th-2细胞因子,为抗

炎因子(anti-inflammatory), 有IL-4, IL-10等. 有研究证实, Th-1和Th-2细胞因子均参与NASH的发生和发展.

1.1 NASH与TNF- α 在关于NASH的发病机制研究中, 几乎每一种假说都提及TNF- α 参与: (1)胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)与TNF- α ^[3]: IR被认为是NASH重要的病因和发病机制, TNF- α 在以下3个方面参与IR的形成: 首先, TNF- α 通过JNK信号转导通路抑制肝细胞胰岛素受体底物(insulin receptor substrate, IRS)-1和-2的磷酸化, 导致肝细胞IR形成; 其次, 由于脂联素可以直接作用于肝细胞, 抑制脂肪酸的合成, 刺激脂肪酸氧化从而增强肝细胞对胰岛素的敏感, TNF- α 可以抑制脂联素的活性, 降低肝细胞对胰岛素的敏感性, 形成IR; 第三, 在IR状态下, 白色脂肪组织能释放TNF- α , 而出现TNF- α 表达增高与IR状态相互作用、相互促进的恶性循环. (2)脂质过氧化与TNF- α ^[4]: TNF- α 分为膜型及分泌型两种, 分泌型TNF- α 可以活化神经鞘磷脂酶, 抑制线粒体呼吸链电子传递, 使线粒体活性氧(ROS)升高, 产生脂质过氧化, 导致肝细胞坏死. 从另一方面ROS又可促使TNF- α 合成增加, 并形成循环, 成为NASH形成的“第二次打击”. (3)肠源性内毒素血症与TNF- α : 近一半以上的NASH患者出现肠源性内毒素血症, 发现血清中TNF- α 与血清内毒素水平升高呈显著正相关^[5]. 内毒素可以诱导单核吞噬细胞产生多量TNF- α , 参与NASH的发生、发展. (4)其他细胞因子与TNF- α : TNF- α 不仅能直接损伤肝细胞-膜型TNF- α 与肝细胞膜上受体结合, 活化Caspase-8, 进而活化Caspase-3, 导致肝细胞凋亡, 而且能活化其他细胞因子如IL-6, IL-8和一些黏附分子, 形成炎症瀑布反应, 诱发肝脏炎症.

TNF- α 生物学活性是通过两个高亲和性的受体-TNFR1和TNFR2介导而发挥作用. TNFR1在NASH患者血清中含量显著高于单纯性脂肪肝和正常组, 而且与转氨酶升高显示明显正相关^[6]. 最近的研究证实, 将TNFR1基因定向破坏后, 再用酒精, 则不能诱发小鼠的脂肪性肝炎^[7].

NASH患者TNF- α 和TNFR1血清含量和肝组织中mRNA表达水平均增高. 最新的一篇报道比较25例NASH、22例单纯性脂肪肝患者及30例正常人血清TNF- α 含量变化, NASH患者组比正常对照组和单纯性脂肪肝组均有显著增高, 而单纯性脂肪肝患者血清TNF- α 较正常对照组含量降低^[8]. 对我国人的研究资料显示, TNF- α

的水平与NASH患者肝脏炎症分级及纤维化分期呈正相关^[33]. 干预治疗, 包括节食、运动和服用Vit E后, NASH患者TNF- α 血清含量未见显著降低^[9]. 2006年另一篇文献报道, 用匹格列酮治疗NASH患者48 wk后, 对比前后肝脏穿刺病理组织学, 显示肝细胞脂肪变性程度、肝实质炎症、肝纤维化等有明显改善, 但治疗前后TNF- α 血清水平未见显著变化^[10].

动物实验和临床资料研究均证实TNF- α 与NASH发生关系密切, 但干预治疗却不能取得反证证据, 同时可以看出TNF- α 血清含量在提示NASH治疗效果方面意义有限. 在酒精性肝炎患者循环中高水平TNF- α 预示患者死亡率增加, TNFR1的血清水平反映肝细胞受损的严重程度, 那么TNF- α 及其受体能否作为诊断NASH和提示病变进展和预后的血清学指标?

1.2 NASH与IL-6 更多的证据证实, IR是NASH的诱因, 而非结果. IL-6与IR的关系密切, 在生理水平胰岛素的调节过程中, IL-6可以使IRS-1的酪氨酸磷酸化, 从而降低IRS-1与磷脂腺肌醇-3-激酶(PI-3K)底物P85的联系, 对胰岛素的水平进行生理调节. 实际上IL-6能抑制肝脏胰岛素的信号, 造成IR^[11]. 高胰岛素血症可以通过阻断线粒体的脂肪酸氧化, 导致肝脏的脂肪酸的聚集, 形成肝脂肪变性. IL-6也可能与NASH的“第一次打击”有关.

NASH患者IL-6和IL-6的受体(IL-6R)血清水平较单纯性脂肪肝和正常人均有显著升高. 有人认为, IL-6R在区别单纯性脂肪肝和NASH的鉴别诊断中有一定意义^[6]. 除此, 在干预治疗后和药物治疗后, IL-6的血清学水平随NASH肝脏组织学改善而降低或显著降低. IL-6可能可以作为NASH治疗效果的评价指标^[9-10].

1.3 NASH与IL-10 IL-10是Th-2细胞因子, 可以抑制Th-1细胞分泌致炎因子, 有抗炎作用, 可能的机制: (1)NF- κ B是体内广泛存在对氧化应激敏感的一种转录因子, 调节着关键免疫和炎症因子的表达, IL-10可以抑制NF- κ B的活性^[12]; (2)抑制TNF- α 和单核细胞趋化蛋白-2(MIP-2)的表达, 从而减轻肝内中性粒细胞浸润和肝内水肿^[13]. 感染血吸虫的野生型小鼠, 在定向破坏IL-10和IL-4两个Th-2细胞因子基因后, 肝组织出现严重的炎症反应, 而没有肝纤维化, 相反破坏IL-4和IL-12(为Th-1细胞因子)后, 则出现严重的肝纤维化, 而炎症反应很轻^[14]. IL-10虽是抗炎因子, 但在肝纤维化形成过程中有一定作用. NASH患者

■研发前沿
NASH血清学诊断是一直备受关注的课题, 目前临床上用ALT, AST的血清水平做为NASH的辅助诊断指标.

■创新盘点

有许多综述性的文章将重点放在发病机制方面, 本文重点讨论NASH患者血清学的变化.

血清IL-10的含量变化, 研究结果不明确. 有研究者发现在正常人血清中未能检测到IL-10^[6].

2 NASH与趋化因子

趋化性细胞因子家族分为CC, CXC, C和CX₃C四个亚族. 趋化性细胞因子均可与内皮细胞表面的硫酸肝素糖蛋白结合, 对黏附在血管内皮细胞上的白细胞发挥趋化作用.

2.1 IL-8 IL-8是CXC亚族趋化因子, 由单核巨噬细胞产生, 对中性粒细胞有很强趋化能力, 并使之活化. 在肝脏内由肝细胞和Kupffer细胞产生. 在酒精性肝病(AH)患者中, IL-8血清含量升高, 戒酒后6 mo IL-8血清含量仍未见下降^[15]. 但在Abiru *et al*^[6]报道的研究资料中, NASH患者IL-8的血清含量与NAFLD患者和正常人比较, 未见显著改变.

2.2 NASH和CC家族趋化因子 与NASH发生、发展可能相关的CC家族趋化因子有CCL2/MCP-1, CCL19, CCL21和RANTES. CCL-2/MCP-1在一些炎症性疾病的病理生理过程中起重要作用, 他不仅是炎症部位单核细胞重要的募集者, 而且是生理活性的激活者. CCL2/MCP-1还可以诱发氧化应激和间质降解^[16-17]. 在趋化因子受体(CCR)-2(CCL2/MCP-1的受体)基因缺陷的肥胖型小鼠, 脂肪组织中炎症细胞和巨噬细胞数量减少, 胰岛素敏感性提高, 肝纤维化明显减轻^[18]. Haukeland *et al*^[18]发现, CCL2/MCP-1的血清含量从正常人到单纯性脂肪肝再到NASH患者逐渐增高, 再经过对性别、BMI和代谢综合征多元线性回归分析后, 仍然显示各组之间的显著性差异. 提示, CCL2/MCP-1可能在从单纯性脂肪肝向NASH转变时起重要作用, 至少部分地促进了白细胞在肝组织内的聚集.

CCL19和CCL21是(CCR)-7的配体, 在多发性肌炎、哮喘和间质性肺炎等疾病中表达增加. CCL19和CCL21是淋巴细胞性趋化因子并且与树状突细胞(DC)的迁移有密切关系. 利什曼原虫感染、缺乏CCL19和CCL21分泌的plt/plt基因突变小鼠, 与野生型小鼠相比对寄生虫更加易感, 肝脏的肉芽肿反应时间延迟^[19]. 在NAFLD患者CCL19的血清含量增高, 作者认为, 对NAFLD诊断有预警的价值, 而CCL21的血清含量未见明显变化^[8].

RANTES由成纤维母细胞、T淋巴细胞、单核细胞和内皮细胞产生, 主要趋化T淋巴细胞. RANTES基因上游序列有一些顺式转录因子

激活元件, NF- κ B为其中之一. 在酒精性肝炎中, TNF- α 诱导RANTES表达, 在肝脏损伤中起关键作用. Hirano *et al*^[20]报道, 在人肝细胞系HLE, TNF- α 可以诱导RANTES基因表达增加, 而降脂类药物-苯扎贝特可以通过抑制NF- κ B的活性, 降低TNF- α 诱导的RANTES基因表达. RANTES与NASH的关系还未见明确描述.

3 NASH与脂肪细胞因子(adipocytokine)

过去几年间, 发现脂肪组织不仅具有内分泌功能, 同样具有免疫活性. 脂肪组织分泌产生的、有致炎作用或抗炎作用的蛋白产物, 称为脂肪细胞因子, 包括瘦素(leptin)、脂联素(adiponectin)、抵抗素(resistin)和新近发现的内脏脂肪素(visfatin). 脂肪组织还可以分泌TNF- α , IL-6等细胞因子. 所有这些脂肪细胞因子均直接参与肥胖相关的炎症反应(包括NASH)、IR和2型糖尿病的进展.

3.1 瘦素(leptin) 瘦素是肥胖基因的产物, 是体质量和能量消耗的调节因子. 在生理情况下, 瘦素可抑制胰岛素分泌, 同时具有抗脂肪变性作用. NASH患者会出现高瘦素血症和瘦素抵抗, 瘦素抵抗时, 其抑制胰岛素分泌的作用减弱, 出现高胰岛素血症, 高胰岛素血症又可增加脂肪组织瘦素基因表达, 加剧瘦素抵抗. 高瘦素血症可以促进巨噬细胞分泌TNF- α , IL-6及IL-12等细胞因子, 激活肝星状细胞, 也可以使肝脏Kupffer细胞及窦内皮细胞产生氧化应激, 并且可能是激活JAK-STAT信号通路, 刺激肝脏星状细胞活化, 促进肝纤维化发展. 瘦素可能是NASH发生肝纤维化的重要调节因子^[21].

NASH患者血清瘦素含量升高, 而且有报道: 瘦素是肝脂肪变性严重程度的独立标志. 虽然认为瘦素参与NASH肝纤维化发生, 但是并非预示肝脏炎症和纤维化的指标^[22-23].

3.2 NASH与adiponectin 脂联素由脂肪组织分泌, 对维持胰岛素敏感性具有一定作用^[34-37]. 脂联素的受体为adiponectin receptors I and II (adipoR I and adipoR II), 脂联素与受体结合后, 通过激活AMP激酶和PPAR- α 配体的活性而增加肌肉和肝脏的脂肪酸氧化和胰岛素的敏感性^[24]. 脂联素能促进IL-10和金属蛋白酶组织抑制因子-1(tissue inhibitor metalloproteinase-1, TIMP-1)的表达, 具有抗炎作用.

脂联素通过其增加胰岛素敏感性功能以及所具有的抗炎能力, 对NASH起全面的保护作用.

实际上, 有人认为NASH发生的原因就是脂联素的相对缺乏所致. 检测NASH患者的血清脂联素含量研究发现, NAFLD组脂联素的含量显著低于正常人^[38-40], 而NASH患者脂联素的水平又是处于NAFLD组的最低值. Targher *et al*^[25]的研究结果显示, NAFLD患者不仅脂联素水平显著低于正常组, 且经过对数回归分析后低水平的脂联素与肝脏脂肪变性和炎症坏死程度相关, 但与纤维化的程度无关. Abiru *et al*^[6]的研究结果提示, 脂联素对NASH的预警作用仅存在于女性患者.

3.3 抵抗素(resistin) 抵抗素是抵抗素样分子家族(resistin-like molecule, RELM)的成员, 其富含半胱氨酸, 包括: RELM- α , RELM- β 和RELM-g. 对啮齿类动物的研究结果提示, 抵抗素的主要作用器官首先是肝脏, 引起肝脏的IR, 其次是骨骼肌和脂肪组织. 除脂肪组织外, 人类的巨噬细胞分泌的抵抗素是循环中的主要来源, 所以也有人认为肥胖状态下, 脂肪组织中的抵抗素表达增加的原因是巨噬细胞浸润脂肪组织所致^[26]. 抵抗素与IR和糖耐量受损所致的肥胖和糖尿病有关. 抵抗素在肥胖和IR动物模型的循环中含量升高, 灌喂降脂类药物可以使其水平下降^[41-42]. 最近证明, 人类抵抗素通过激活NF- κ B的信号通路, 刺激巨噬细胞分泌致炎因子, 如TNF- α , IL-6和IL-12等, 而具有致炎因子的特性^[27]. 抵抗素与IR、糖尿病有关^[43-45], 但在T2DM患者血清中含量未见显著变化, 与NASH的关系尚待研究^[46].

3.4 内脏脂肪素(visfatin) 内脏脂肪素是新近发现的具有类胰岛素作用的脂肪细胞因子, 主要由内脏脂肪组织分泌, 能促进脂肪形成, 同时可能通过激活并结合胰岛素受体发挥降低血糖的作用^[28]. 细胞内内脏脂肪素的分泌调节机制尚不清楚, 对脂肪细胞系3T3-L1研究证实, 内脏脂肪素的释放受激素和细胞因子调节. 脂肪细胞释放内脏脂肪素的量受葡萄糖作用的量和持续强度的影响, 并且这种作用是通过激活PI3-K和AKT(protein kinase B)细胞间信号转导通路而实现的. 抑制PI3-K和AKT的活性可以降低内脏脂肪素的分泌^[29].

研究证实, 肥胖人群和T2DM患者内脏脂肪素的表达和释放增加^[46-50], 血清浓度高于正常青年人, 在减肥后其浓度有所下降^[30]. 但是也有相反的研究结果, 一组来自我国的研究资料证实: 中国人2型糖尿病和糖耐量异常患者和正常人血清含量没有显著差异, 与正常人相比肥胖

者血清内脏脂肪素的量反而有所下降^[31]. 在妊娠糖尿病患者血清中内脏脂肪素的含量下降^[32]. 与NASH的关系还未见到相关的报道, 内脏脂肪素在NASH体内和体外研究中的表现值得期待.

就其发病机制来看, 细胞因子参与非酒精性脂肪性肝炎的发生、发展, 不仅直接参与“第一次打击”-脂肪肝的形成, 而且在“第二次打击”-脂肪性肝炎、肝纤维化、肝硬化的启动、发生和进展中起重要作用. 但细胞因子作为NASH诊断的血清学标志物和预警指标方面, 还未形成完全一致的研究结果, 其中包括种族间的差异问题, 但是已经有倾向性的研究结果, 这些与NASH相关的细胞因子作为诊断指标的特异性和敏感性, 还需要更广泛、更规模化的研究予以证实.

4 参考文献

- 1 Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis: pathologic features and differential diagnosis. *Semin Diagn Pathol* 2005; 22: 330-338
- 2 Farrell GC. Non-alcoholic steatohepatitis: what is it, and why is it important in the Asia-Pacific region? *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 124-138
- 3 Tilg H, Hotamisligil GS. Nonalcoholic fatty liver disease: Cytokine-adipokine interplay and regulation of insulin resistance. *Gastroenterology* 2006; 131: 934-945
- 4 Chitturi S, George J. Hepatotoxicity of commonly used drugs: nonsteroidal anti-inflammatory drugs, antihypertensives, antidiabetic agents, anticonvulsants, lipid-lowering agents, psychotropic drugs. *Semin Liver Dis* 2002; 22: 169-183
- 5 Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, McCarthy PJ, Grose RH, Cummins AG. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2001; 48: 206-211
- 6 Abiru S, Migita K, Maeda Y, Daikoku M, Ito M, Ohata K, Nagaoka S, Matsumoto T, Takii Y, Kusumoto K, Nakamura M, Komori A, Yano K, Yatsushashi H, Eguchi K, Ishibashi H. Serum cytokine and soluble cytokine receptor levels in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 2006; 26: 39-45
- 7 Yin M, Gabele E, Wheeler MD, Connor H, Bradford BU, Dikalova A, Rusyn I, Mason R, Thurman RG. Alcohol-induced free radicals in mice: direct toxicants or signaling molecules? *Hepatology* 2001; 34: 935-942
- 8 Haukeland JW, Damas JK, Konopski Z, Loberg EM, Haaland T, Goverud I, Torjesen PA, Birkeland K, Bjoro K, Aukrust P. Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. *J Hepatol* 2006; 44: 1167-1174
- 9 Kugelmas M, Hill DB, Vivian B, Marsano L, McClain CJ. Cytokines and NASH: a pilot study of the effects of lifestyle modification and vitamin E.

■同行评价

本文总结了近年三类细胞因子与NASH发病关系的最新研究进展, 着重阐明细胞因子在NASH发病机制、血清学诊断指标和治疗效果评价等方面的意义, 有一定参考价值, 综述撰写条理清楚, 语句通顺, 可读性强.

- Hepatology* 2003; 38: 413-419
- 10 Lutchman G, Promrat K, Kleiner DE, Heller T, Ghany MG, Yanovski JA, Liang TJ, Hoofnagle JH. Changes in serum adipokine levels during pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis: relationship to histological improvement. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 1048-1052
 - 11 Kim HJ, Higashimori T, Park SY, Choi H, Dong J, Kim YJ, Noh HL, Cho YR, Cline G, Kim YB, Kim JK. Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action *in vivo*. *Diabetes* 2004; 53: 1060-1067
 - 12 Gonzalez-Quintela A, Dominguez-Santalla MJ, Perez LF, Vidal C, Lojo S, Barrio E. Influence of acute alcohol intake and alcohol withdrawal on circulating levels of IL-6, IL-8, IL-10 and IL-12. *Cytokine* 2000; 12: 1437-1440
 - 13 Diehl AM, Li ZP, Lin HZ, Yang SQ. Cytokines and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2005; 54: 303-306
 - 14 Hoffmann KF, McCarty TC, Segal DH, Chiamonte M, Hesse M, Davis EM, Cheever AW, Meltzer PS, Morse HC 3rd, Wynn TA. Disease fingerprinting with cDNA microarrays reveals distinct gene expression profiles in lethal type 1 and type 2 cytokine-mediated inflammatory reactions. *FASEB J* 2001; 15: 2545-2547
 - 15 McClain CJ, Barve S, Deaciuc I, Kugelmas M, Hill D. Cytokines in alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 205-219
 - 16 Robinson SC, Scott KA, Balkwill FR. Chemokine stimulation of monocyte matrix metalloproteinase-9 requires endogenous TNF-alpha. *Eur J Immunol* 2002; 32: 404-412
 - 17 Aukrust P, Berge RK, Ueland T, Aaser E, Damas JK, Wikeby L, Brunsvig A, Muller F, Forfang K, Froland SS, Gullestad L. Interaction between chemokines and oxidative stress: possible pathogenic role in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 485-491
 - 18 Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, Charo I, Leibel RL, Ferrante AW Jr. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* 2006; 116: 115-124
 - 19 Ato M, Maroof A, Zubairi S, Nakano H, Kakiuchi T, Kaye PM. Loss of dendritic cell migration and impaired resistance to Leishmania donovani infection in mice deficient in CCL19 and CCL21. *J Immunol* 2006; 176: 5486-5493
 - 20 Hirano F, Kobayashi A, Makino I. Inhibition of TNF-alpha-induced RANTES expression in human hepatocyte-derived cells by fibrates, the hypolipidemic drugs. *Int Immunopharmacol* 2003; 3: 225-232
 - 21 Bethanis SK, Theocharis SE. Leptin in the Field of Hepatic Fibrosis: A Pivotal or an Incidental Player? *Dig Dis Sci* 2006
 - 22 Lydatakis H, Hager IP, Kostadelou E, Mpousmpoulas S, Pappas S, Diamantis I. Non-invasive markers to predict the liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2006; 26: 864-871
 - 23 Chitturi S, Farrell G, Frost L, Kriketos A, Lin R, Fung C, Liddle C, Samarasinghe D, George J. Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity? *Hepatology* 2002; 36: 403-409
 - 24 Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003; 423: 762-769
 - 25 Targher G, Bertolini L, Rodella S, Zoppini G, Scala L, Zenari L, Falezza G. Associations between plasma adiponectin concentrations and liver histology in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 64: 679-683
 - 26 Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112: 1796-1808
 - 27 Silswal N, Singh AK, Aruna B, Mukhopadhyay S, Ghosh S, Ehtesham NZ. Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-12 in macrophages by NF-kappaB-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 334: 1092-1101
 - 28 Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S, Hiramatsu R, Matsuzawa Y, Shimomura I. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 2005; 307: 426-430
 - 29 Sautin YY, Lu M, Gaugler A, Zhang L, Gluck SL. Phosphatidylinositol 3-kinase-mediated effects of glucose on vacuolar H⁺-ATPase assembly, translocation, and acidification of intracellular compartments in renal epithelial cells. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 575-589
 - 30 Chen MP, Chung FM, Chang DM, Tsai JC, Huang HF, Shin SJ, Lee YJ. Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 295-299
 - 31 Jian WX, Luo TH, Gu YY, Zhang HL, Zheng S, Dai M, Han JF, Zhao Y, Li G, Luo M. The visfatin gene is associated with glucose and lipid metabolism in a Chinese population. *Diabet Med* 2006; 23: 967-973
 - 32 Chan TF, Chen YL, Lee CH, Chou FH, Wu LC, Jong SB, Tsai EM. Decreased plasma visfatin concentrations in women with gestational diabetes mellitus. *J Soc Gynecol Invest* 2006; 13: 364-367
 - 33 Wong VW, Hui AY, Tsang SW, Chan JL, Tse AM, Chan KF, So WY, Cheng AY, Ng WF, Wong GL, Sung JJ, Chan HL. Metabolic and adipokine profile of Chinese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 1154-1161
 - 34 Baranova A, Gowder SJ, Schlauch K, Elariny H, Collantes R, Afendy A, Ong JP, Goodman Z, Chandhoke V, Younossi ZM. Gene expression of leptin, resistin, and adiponectin in the white adipose tissue of obese patients with non-alcoholic Fatty liver disease and insulin resistance. *Obes Surg* 2006; 16: 1118-1125
 - 35 Musso G, Gambino R, Biroli G, Carello M, Faga E, Pacini G, De Micheli F, Cassader M, Durazzo M, Rizzetto M, Pagano G. Hypoadiponectinemia predicts the severity of hepatic fibrosis and

- pancreatic Beta-cell dysfunction in nondiabetic nonobese patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2438-2446
- 36 Musso G, Gambino R, Durazzo M, Biroli G, Carello M, Faga E, Pacini G, De Michieli F, Rabbione L, Premoli A, Cassader M, Pagano G. Adipokines in NASH: postprandial lipid metabolism as a link between adiponectin and liver disease. *Hepatology* 2005; 42: 1175-1183
 - 37 Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1930-1935
 - 38 Pagano C, Soardo G, Esposito W, Fallo F, Basan L, Donnini D, Federspil G, Sechi LA, Vettor R. Plasma adiponectin is decreased in nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Endocrinol* 2005; 152: 113-118
 - 39 Vuppalanchi R, Marri S, Kolwankar D, Considine RV, Chalasani N. Is adiponectin involved in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis? A preliminary human study. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 237-242
 - 40 Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology* 2004; 40: 46-54
 - 41 Zou CC, Liang L, Hong F, Fu JF, Zhao ZY. Serum adiponectin, resistin levels and non-alcoholic fatty liver disease in obese children. *Endocr J* 2005; 52: 519-524
 - 42 Filippatos TD, Kiortsis DN, Liberopoulos EN, Mikhailidis DP, Elisaf MS. A review of the metabolic effects of sibutramine. *Curr Med Res Opin* 2005; 21: 457-468
 - 43 Chanchay S, Tungtrongchitr R, Harnroongroj T, Phonrat B, Rungseesakorn O, Paksanont S, Pooudong S, Saowakontha S, Varongchayakul C. Plasma resistin, insulin concentration in non-diabetic and diabetic, overweight/obese Thai. *Int J Vitam Nutr Res* 2006; 76: 125-131
 - 44 Wasim H, Al-Daghri NM, Chetty R, McTernan PG, Barnett AH, Kumar S. Relationship of serum adiponectin and resistin to glucose intolerance and fat topography in South-Asians. *Cardiovasc Diabetol* 2006; 5: 10
 - 45 Stejskal D, Adamovska S, Bartek J, Jurakova R, Proskova J. Resistin - concentrations in persons with type 2 diabetes mellitus and in individuals with acute inflammatory disease. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2003; 147: 63-69
 - 46 Marra F, Aleffi S, Bertolani C, Petrai I, Vizzutti F. Adipokines and liver fibrosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2005; 9: 279-284
 - 47 Varma V, Yao-Borengasser A, Rasouli N, Bodles AM, Phanavanh B, Lee MJ, Starks T, Kern LM, Spencer HJ 3rd, McGehee RE Jr, Fried SK, Kern PA. Human visfatin expression: relationship to insulin sensitivity, intramyocellular lipid and inflammation. *J Clin Endocrinol Metab* 2006
 - 48 Haider DG, Holzer G, Schaller G, Weghuber D, Widhalm K, Wagner O, Kapiotis S, Wolzt M. The adipokine visfatin is markedly elevated in obese children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 43: 548-549
 - 49 Lopez-Bermejo A, Chico-Julia B, Fernandez-Balsells M, Recasens M, Esteve E, Casamitjana R, Ricart W, Fernandez-Real JM. Serum visfatin increases with progressive beta-cell deterioration. *Diabetes* 2006; 55: 2871-2875
 - 50 Wen Y, Wang HW, Wu J, Lu HL, Hu XF, Cianflone K. Effects of fatty acid regulation on visfatin gene expression in adipocytes. *Chin Med J (Engl)* 2006; 119: 1701-1708

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中国科学技术信息研究所情报方法研究中心关于 2005年世界华人消化杂志指标检索报告

本刊讯 2005年度《世界华人消化杂志》的总被引频次为2079, 位居全部1652种中国科技论文统计源期刊的第51位, 内科医学类28种期刊的第4位。2005年《世界华人消化杂志》的影响因子为0.485, 位居全部1652种中国科技论文统计源期刊的第449位, 内科医学类28种期刊的第14位。《世界华人消化杂志》的即年指标0.070, 他引率0.66, 地区分布数26, 基金论文比0.43, 国际论文比0.02, 学科影响指标0.46。(世界胃肠病学杂志社2006-10-27)

脂联素与非酒精性脂肪肝病

石胜利, 聂玉强

■背景资料

非酒精性脂肪肝病(NAFLD)是一种常见肝病, 随着生活水平的提高, 饮食结构的改变, NAFLD的发病率正在逐年增加, 是第二位常见肝病。此病的发病机制复杂, 具体机制目前尚未清楚。目前研究认为NAFLD是代谢综合征之一, 其发病与IR密切相关, IR发展的关键因素之一是低的血浆脂联素水平, 但脂联素基因是否与NAFLD有关, 目前并不清楚。

石胜利, 广山市小榄人民医院消化科 广东省中山市 528415
聂玉强, 广州医学院附属市一人民医院消化科 广东省广州市 510180

通讯作者: 石胜利, 528415, 广东省中山市, 中山市小榄人民医院消化科. shishengli2004@163.com

电话: 0760-8662120-6356

收稿日期: 2006-10-17 接受日期: 2006-11-02

Role of adiponectin in nonalcoholic fatty liver disease

Sheng-Li Shi, Yu-Qiang Nie

Sheng-Li Shi, Department of Gastroenterology, Xiaolan People's Hospital, Zhongshan 528415, Guangdong Province, China

Yu-Qiang Nie, Department of Gastroenterology, the First Municipal People's Hospital, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510180, Guangdong Province, China

Correspondence to: Sheng-Li Shi, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Xiaolan, Zhongshan 28415, Guangdong Province, China. shishengli2004@163.com

Received: 2006-10-17 Accepted: 2006-11-02

Abstract

Adiponectin, discovered recently, is kind of adipose hormone that is secreted by adipose cells, and its serum level is lower in patients with adiposity, diabetes mellitus, and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) than that in healthy individuals. Plasma adiponectin is in close correlation with the sensitivity of insulin and play an important role in insulin resistance. Meanwhile, adiponectin can inhibit the production of liver tumor necrosis factor-alpha and reduce the lipid accumulation and inflammatory reaction during liver injury. Therefore, we assessed the relationship between adiponectin and NAFLD in order to explore the role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of NAFLD.

Key Words: Adiponectin; Adiponectin Receptor; Non-alcoholic fatty liver disease; Pathogenic mechanism

Shi SL, Nie YQ. Role of adiponectin in nonalcoholic fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(3):272-275

摘要

脂联素(adiponectin, ADP)作为一种新发现

的脂肪激素, 主要是由脂肪细胞分泌的, 在肥胖者、糖尿病及非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)患者中血清ADP水平低于正常。ADP有胰岛素增敏作用, 与胰岛素抵抗相关; 能够使肝脏肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor-alpha, TNF- α)分泌下降, 减少肝中脂肪堆积和炎症介质作用, 对ADP的研究将为探讨NAFLD的发病机制及治疗方案提供新的线索。

关键词: 脂联素; 脂联素受体; 非酒精性脂肪肝; 发病机制

石胜利, 聂玉强. 脂联素与非酒精性脂肪肝病. 世界华人消化杂志 2007;15(3):272-275

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/272.asp>

0 引言

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是遗传-环境-代谢应激相关性疾病, 包括单纯性脂肪肝以及由其演变的脂肪性肝炎和脂肪性肝硬化3种类型。NAFLD是一种与肥胖、高胰岛素血症、2型糖尿病密切相关的临床病理综合征^[1], 近年来研究发现, 脂肪组织具有十分活跃的内分泌功能, 其分泌的激素和细胞因子在许多系统中发挥作用。现就脂联素在NAFLD中发生的可能作用作一综述。

1 脂联素与脂联素受体

1.1 脂联素来源、结构 脂联素亦称Acrp30, Apm1, AdipoQ及GBP28, 最早由Scherer *et al*^[2]发现, 是脂肪组织分泌的血浆蛋白质, 相对分子质量为28 kDa, 由247个氨基酸组成, 分子结构包括N-末端的信号肽、胶原重复区及C-末端的球状区。球状区脂联素(globular adiponectin, gAcrp30)具有比脂联素更为广泛而活跃的生物学作用, 球形结构域形成三聚体, 再通过胶原样结构域的相互作用形成更高级的结构。脂联素在血清中有3种不同的低聚体形式: 三聚体、六聚体和更高分子量的类型。脂联素属于可溶性防御性胶原家族的成员之一, 与VIII型胶原、X型胶

原、补体C1q及肿瘤坏死因子TNF- α 具有高度的结构同源性。脂联素是脂肪组织基因表达最丰富的蛋白质之一, 其血浆浓度为5-30 mg/L, 约占总血浆蛋白的0.1%。

1.2 脂联素受体 Yamauchi *et al*^[3]研究发现, 脂联素受体1(AdipoR1)在骨骼肌有丰富表达, 脂联素受体2(AdipoR2)主要在肝脏表达。人和鼠的AdipoR1有96.8%的同源性, AdipoR2有95.2%的同源性。鼠的AdipoR1基因编码375个氨基酸, 相对分子质量为42.4 kDa的蛋白, AdipoR2基因编码311个氨基酸, 相对分子质量为35.4 kDa的蛋白。AdipoR1和AdipoR2结构高度相关, 两者有66.7%的同源性。他们是包含7个穿膜区域的蛋白, 氨基端在细胞内部, 羧基端在细胞外部, 与G蛋白偶联受体家族的布局相反, 序列上的同源性也很低。AdipoR1的mRNA在骨骼肌含量丰富, 其表达产物是gAcrp30的高亲和受体及脂联素低亲和受体, 而AdipoR2的mRNA主要在肝脏中表达, 其表达产物是脂联素和gAcrp30的中等亲和受体。Yamauchi在对ob/ob小鼠和apoE缺陷小鼠的研究中发现, 适当降低过氧化物酶体增殖物激活受体活性能够防止脂肪细胞肥大, 降低TNF- α 、抵抗素和游离脂肪酸水平, 上调脂联素和瘦素水平, 这些变化导致肝脏、肌肉组织中甘油三酯含量下降, 改善IR。

1.3 脂联素遗传学变异 在人类编码脂联素基因定位于染色体3q27, 基因全长为16 kb, 有3个外显子, 大小从18 bp到4277 bp, 2个内含子分别为0.8 kb和12 kb, 基因的调节序列含有公认的启动子, 但不是典型的TATA(胸腺嘧啶核苷-腺嘌呤核苷-胸腺嘧啶核苷-腺嘌呤核苷)盒。目前已发现, 脂联素基因有10余个常见的单核苷酸多态性(SNPs)及一些罕见的错义突变。通过将基因组中脂联素基因完全编码区扩增并测序, Takahashi *et al*^[4]在日本人群中检测到两种变异, 外显子3的R112C突变和外显子2第94位的G/T多态性。最近, Kondo *et al*^[5]发现3个错义突变(I164T, R221S和H241P)并证实I164T和R112C突变与血浆脂联素浓度和2型糖尿病相关, 且所有携带I164T突变者均显示某种代谢综合征特征。在高加索人群中, Zietz *et al*^[6]证实了该基因外显子2的G15G和外显子3的Y111H两种变异, 其中G15G突变与2型糖尿病患者血清高总胆固醇和高低密度脂蛋白胆固醇水平有关。与脂联素基因中45位和276位为T/T基因型的受检者相比, GG基因型者患2型糖尿病的危险性显著增高, 且276位GG基因型

者具有更高的IR指数, 同时在高体质量指数受检者中276位G等位基因与低血浆脂联素水平呈线性相关。

2 脂联素在NAFLD发生、发展中的作用

脂联素与NAFLD密切相关。有文献报道脂联素与BMI、ALT负相关, 控制体质量后, 脂肪肝得到改善^[7]。姜玲玲 *et al*^[8]对43例NAFLD和配对者研究发现, NAFLD患者血浆脂联素水平低于对照组, 提示脂联素与NAFLD的发病相关, 他可能在肥胖发展为NAFLD的过程中起重要作用。Xu *et al*^[9]喂小鼠高脂、含乙醇的食物后, 血浆脂联素浓度下降, 再给予重组脂联素后, 肝肿大、脂肪变性得到改善, 炎症程度减轻, 推测脂联素抑制脂肪合成的两个关键酶: 乙酰辅酶A和脂肪酸合成酶, 抑制肝脏合成TNF- α , 促进肝脏脂肪酸氧化。因此, 脂联素可能在NAFLD治疗领域有较好前景。Vuppalachchi *et al*^[10]通过对21名非酒精性脂肪性肝炎和19名配对者研究发现, 非酒精性脂肪性肝炎患者血浆脂联素明显低于对照组(4.9 ± 2.7 g/L vs 7.3 ± 3.5 g/L, $P = 0.02$), 非酒精性脂肪性肝炎肝脏中AdipoR2的mRNA表达比正常肝脏组织高, 建议脂联素作为与NAFLD有关的候选基因做进一步研究。

3 脂联素在NAFLD发生、发展中的作用机制

3.1 脂联素对葡萄糖、脂肪代谢的影响 gAcrp30是脂联素的球形单位, 研究发现, 在培养的鼠肌肉组织中, gAcrp30可发挥其药理活性而增加游离脂肪酸的氧化^[11]。在高脂肪饮食的小鼠中, 给予gAcrp30使小鼠在不减低摄食量的情况下体质量降低, 但是完整的脂联素注射却对血浆游离脂肪酸水平和肌肉脂肪酸氧化无影响。Tomas *et al*^[12]在离体试验中证明, gAcrp30与鼠趾伸长肌培养30 min可使其AMPK活性增加2倍, 丙二酰辅酶A浓度降低30%(丙二酰辅酶A是肉碱棕榈酰转移酶抑制剂), 同时增加葡萄糖摄取量1.5倍。在活体小鼠也证实gAcrp300(75 μ g)在15-30 min可增加肌肉AMPK活性和ACC磷酸化及降低丙二酰辅酶A的含量, 但完整的脂联素与鼠趾伸长肌同培养时, AMPK活性和ACC磷酸化未见改变。相反, 在肝脏中发现脂联素能抑制糖的生成, 通过在转录水平上抑制肝糖原合成酶(葡萄糖-6-磷酸酶和磷酸烯醇丙酮酸羧基激酶)的合成。Yamauchi *et al*^[13]发现, 完整的脂联素能激活肝脏的AMPK和降低肝脏磷酸烯醇丙酮酸

■研究前沿

脂联素在调节糖脂代谢过程中发挥着重要的作用, 他能显著改善胰岛素抵抗, 增强外周组织对胰岛素的敏感性, 改善胰岛素抵抗, 可能成为治疗胰岛素抵抗相关疾病的一个极有潜力的靶点。

■应用要点

脂联素基因的研究对NAFLD发病机制有重要临床意义,血循环中的脂联素水平升高,能促进脂肪酸的氧化从而预防肝脏脂肪病变,脂联素被认为是重要的抗纤维化因子,对脂联素的研究为脂肪肝治疗提供新的思路和方法。

羧基激酶、葡萄糖-6-磷酸酶mRNA的表达,同时也发现gAcrp30和完整的脂联素均能激活肌肉的AMPK,尽管这些实验结果不尽一致,但均显示gAcrp30或完整脂联素通过使ACC磷酸化失活和降低丙二酰辅酶A含量来刺激脂肪酸的氧化,降低游离脂肪酸水平,从而改善IR。

3.2 脂联素与胰岛素 极低密度脂蛋白(VLDL)是肝脏内脂质输出的主要途径,而apB-100对肝脏VLDL形成起决定作用,故apB-100合成是肝脏脂质输出的限速步骤,而高胰岛素血症可以使apB-100合成下降,导致脂质尤其是甘油三脂在肝细胞内蓄积并发生脂肪变性。研究发现,胰岛素(浓度分别为100 nmol/L, 160 nmol/L)促进3T3-L1细胞分泌脂联素,而磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)抑制剂渥曼青霉素(wortmanin)和LY294002可阻断胰岛素刺激的脂联素分泌^[2,14]。但也有研究报道,胰岛素对脂联素基因表达有抑制作用,用胰岛素(100 nmol/L)、TNF- α (10 μ g/L)、地塞米松(100 nmol/L)处理16 h可抑制3T3-L1细胞50%-85%的ADPN的mRNA表达,胰岛素对脂联素的mRNA表达发挥时间剂量依赖性的抑制作用^[15]。

3.3 脂联素与IR 脂联素改善糖代谢和胰岛素抵抗的作用源于他能增加骨骼肌脂肪酸氧化,并抑制肝脏糖异生,使参与骨骼肌脂肪酸摄取、氧化以及能量代谢的分子:如CD36、解偶联蛋白2(UCP-2)以及脂肪酸转运蛋白1(FATP-1)的表达增加,通过磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B途径改善骨骼肌中胰岛素信号的传递,促进信号分子(骨骼肌胰岛素受体,胰岛素受体底物-1)的酪氨酸磷酸化,从而增加骨骼肌脂肪酸氧化,降低骨骼肌内甘油三酯含量。脂联素作为脂肪细胞特有的一种因子,大量的动物和人体实验发现低脂联素血浆水平与IR密切相关。Arita *et al*^[16]使用酶联免疫吸附法(ELISA)测出在肥胖患者体内脂联素的血浆水平明显低于瘦弱型对照者,这些结果表明,低脂联素的血浆水平可能与IR或糖尿病状态有关。Hotta *et al*^[17]研究中发现,糖尿病患者体内脂联素血浆水平低于非糖尿病患者,伴有冠心病患者体内脂联素血浆水平则尤其低,且不管是糖尿病患者还是非糖尿病患者减肥后若体质指数下降10%,则血浆脂联素水平将明显上升,但血浆脂联素水平并无明显的昼夜改变,这表明脂联素不能被精细的调节,需要经受长期代谢改变的调节,与IR及糖尿病的发生是一个长期过程且受多种因素的控制相

一致。Hotta *et al*^[18]用恒河猴作动物模型来分析2型糖尿病发生过程中血浆脂联素水平的变化时发现,血浆脂联素水平的下降与IR的发展相平行,即IR越严重,血浆脂联素水平越低,血浆脂联素水平与体质量、体脂质量和剩余胰岛素呈负相关,而与M-代谢率(胰岛素敏感性的一个指标)呈强正相关,提示低脂联素血症与胰岛素敏感性降低密切相关。

3.4 脂联素与 β -肾上腺素能受体激动剂 一般认为,交感神经系统兴奋性增加,儿茶酚胺分泌增多与IR发生有关。Fasshauer *et al*^[19]的研究显示,异丙肾上腺素呈剂量依赖性抑制3T3-L1细胞的脂联素mRNA表达(减少75%),浓度低至10 nmol/L即已有明显的抑制效应,而异丙肾上腺素的拮抗剂普萘洛尔或cAMP依赖的蛋白激酶A的抑制剂H-89预处理后可完全逆转异丙肾上腺素的抑制效应, G(S)蛋白激活剂霍乱毒素和腺苷酸环化酶激活剂Forskolin可模拟异丙肾上腺素的抑制效应,提示 β -肾上腺素可能通过G(S)蛋白PKA的途径抑制脂联素基因的表达。

3.5 脂联素与TNF- α 的关系 TNF是一种促炎症细胞因子,大量证据显示, TNF- α 对脂肪肝的发病及其进展均有促进作用。TNF- α 刺激体外培养的内皮细胞肝素结合-表皮生长因子(HB-EGF)的表达可被脂联素降低,进而抑制HB-EGF诱导的细胞增殖^[20]。脂联素能够抑制内皮细胞TNF- α 信号,在肥胖患者体内TNF- α 含量增加而脂肪细胞分泌脂联素减少,脂联素失去对TNF- α 信号的抑制作用,减少TNF- α 等炎症介质的作用,从而减轻肝脏炎症反应。

总之,脂联素作为一种新发现的脂肪激素,与肥胖、NAFLD有关,但其作用机制尚不明确,其能否用于治疗脂肪肝以及代谢综合征中,都有待于以后进一步研究。

4 参考文献

- 1 丁效蕙,赵景民. 非酒精性脂肪性肝炎的发病机制及治疗的研究进展. 世界华人消化杂志 2005; 13: 371-375
- 2 Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 1995; 270: 26746-26749
- 3 Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003; 423:

- 762-769
- 4 Takahashi M, Arita Y, Yamagata K, Matsukawa Y, Okutomi K, Horie M, Shimomura I, Hotta K, Kuriyama H, Kihara S, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24: 861-868
 - 5 Kondo H, Shimomura I, Matsukawa Y, Kumada M, Takahashi M, Matsuda M, Ouchi N, Kihara S, Kawamoto T, Sumitsuji S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Association of adiponectin mutation with type 2 diabetes: a candidate gene for the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 2002; 51: 2325-2328
 - 6 Zietz B, Barth N, Scholmerich J, Schmitz G, Schaffler A. Gly15Gly polymorphism within the human adipocyte-specific apM-1 gene but not Tyr111His polymorphism is associated with higher levels of cholesterol and LDL-cholesterol in caucasian patients with type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001; 109: 320-325
 - 7 Sargin H, Sargin M, Gozu H, Orcun A, Baloglu G, Ozisik M, Seker M, Uygur-Bayramicli O. Is adiponectin level a predictor of nonalcoholic fatty liver disease in nondiabetic male patients? *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5874-5877
 - 8 姜玲玲, 洪小飞, 厉有名. 血清脂联素与肥胖和非酒精性脂肪性肝病关系的研究. *中华消化杂志* 2005; 25: 238-239
 - 9 Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 2003; 112: 91-100
 - 10 Vuppalanchi R, Marri S, Kolwankar D, Considine RV, Chalasani N. Is adiponectin involved in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis? A preliminary human study. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 237-242
 - 11 Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 2005-2010
 - 12 Tomas E, Tsao TS, Saha AK, Murrey HE, Zhang Cc C, Itani SI, Lodish HF, Ruderman NB. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 16309-16313
 - 13 Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002; 8: 1288-1295
 - 14 Bogan JS, Lodish HF. Two compartments for insulin-stimulated exocytosis in 3T3-L1 adipocytes defined by endogenous ACRP30 and GLUT4. *J Cell Biol* 1999; 146: 609-620
 - 15 Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290: 1084-1089
 - 16 Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257: 79-83
 - 17 Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1595-1599
 - 18 Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeier HK, Arita Y, Hansen BC, Matsuzawa Y. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* 2001; 50: 1126-1133
 - 19 Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Adiponectin gene expression is inhibited by beta-adrenergic stimulation via protein kinase A in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett* 2001; 507: 142-146
 - 20 Matsuda M, Shimomura I, Sata M, Arita Y, Nishida M, Maeda N, Kumada M, Okamoto Y, Nagaretani H, Nishizawa H, Kishida K, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Nagai R, Funahashi T, Matsuzawa Y. Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis. *J Biol Chem* 2002; 277: 37487-37491

■同行评价

本文复习了脂肪性肝病患者血清脂联素水平及其可能作用机制的有关研究, 提供了一些有意义的信息, 符合伦理学要求, 国内未见类似综述, 具有新颖性。

电编 张敏 编辑 王晓瑜

胆管癌浸润转移途径及其机制

郑秀海, 王曙光

■背景资料

胆管癌(cholangiocarcinoma)一般指原发于左、右肝管至胆总管下端的肝外胆管癌,在远东和东南亚地区发病率较高,临床治愈率很低,近年来有发病率升高的趋势。胆管癌的浸润和转移具有其自身的特点,对胆管癌及其浸润转移途径与机制的研究具有重要的理论和临床意义。

郑秀海, 中国人民解放军第401医院肝胆外科 山东省青岛市 266071

王曙光, 第三军医大学全军肝胆外科研究所 重庆市 400038
通讯作者: 王曙光, 400038, 重庆市, 第三军医大学全军肝胆外科研究所. sgwang90@yahoo.com

电话: 023-68754181

收稿日期: 2006-09-20 接受日期: 2006-09-25

Advance in the study of invasion and metastasis of cholangiocarcinoma

Xiu-Hai Zheng, Shu-Guang Wang

Xiu-Hai Zheng, Department of Hepatobiliary Surgery, the 401st Hospital of Chinese PLA, Qingdao 266071, Shandong Province, China

Shu-Guang Wang, Hepatobiliary Surgery Institute of Chinese PLA, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Correspondence to: Shu-Guang Wang, Hepatobiliary Surgery Institute of Chinese PLA, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. sgwang90@yahoo.com

Received: 2006-09-20 Accepted: 2006-09-25

Abstract

Invasion and metastasis of cholangiocarcinoma have specific characteristics. Lymph node metastasis is one of the metastatic modes of cholangiocarcinoma, and local metastasis occurs more frequently than distal one. Due to the specific anatomic structure of bile duct and its close relation with peripheral nerves and various neuropeptides, perineural invasiveness and metastasis of cholangiocarcinoma are attracting more and more attention in recent years. Besides invasive metastasis, inoculation metastasis, lymphatic metastasis and vascular metastasis, perineural invasiveness and metastasis are important pathological features of cholangiocarcinoma. Study on the mechanism of interaction between nerve fiber and cholangiocarcinoma cells and the regulatory factors during invasion and metastasis of cholangiocarcinoma is one of the hot spots in recent years.

Key Words: Cholangiocarcinoma; Invasion; Metastasis

Zheng XH, Wang SG. Advance in the study of invasion and metastasis of cholangiocarcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(3):276-281

摘要

胆管癌的浸润和转移具有其自身的特点,经淋巴转移是胆管癌的主要转移方式之一,以局部淋巴结转移为主,较少发生远处转移。由于胆管的解剖部位的特点以及其与周围神经、包括多种神经肽的密切关系,其神经周围浸润转移途径近年来越来越受到人们的重视。除浸润转移、种植转移、淋巴道及血道转移等途径之外,经神经周围浸润和转移是胆管癌的一种重要病理特征,对胆管癌细胞与神经纤维的相互作用机制以及胆管癌神经周围浸润转移过程的调控因子的研究是近年来的研究热点之一。

关键词: 胆管癌; 浸润; 转移

郑秀海, 王曙光. 胆管癌浸润转移途径及其机制. 世界华人消化杂志 2007;15(3):276-281

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/276.asp>

0 引言

胆管癌(cholangiocarcinoma)一般指原发于左、右肝管至胆总管下端的肝外胆管癌,不包括肝内的胆管细胞癌、胆囊癌和壶腹部癌^[1]。根据肿瘤的位置,肝外胆管癌又分为上段胆管癌(肝门部胆管癌, perihilar cholangiocarcinoma)、中段胆管癌、下段胆管癌,其中,肝门部胆管癌最为常见,大约占60%-70%,位于胆总管者约占20%-30%^[2-3]。胆管癌在世界上大多数地区较为少见,在美国,胆管癌发病率为每10万人口1-2人,每年的新发病例数在2000-3000例之间^[4],但在远东和东南亚地区发病率较高^[5-6],发病率随年龄增加而增高,男性略多于女性^[7],大多数患者大于65岁^[8]。胆管癌出现症状时,通常已经进入进展期,治愈率很低,近年来临床上发病率升高的趋势^[9]。对胆管癌及其浸润转移途径与机制的研究具有重要的理论和临床意义。

1 胆管癌的临床病理及预后

胆管癌起源于胆道上皮细胞, 按其大体形态分为4型: 息肉型、结节型、硬化型、浸润型; 组织学上多表现为腺癌, 包括浸润性腺癌、黏液性腺癌及乳头状癌, 少数为鳞状腺癌及鳞癌、间质肿瘤等, 囊腺癌少见^[10]. 在局部, 胆管癌主要表现为沿胆管壁向上、下直接浸润, 而且因胆管壁薄, 故肿瘤易侵犯胆管周围组织, 常形成较坚实、增厚的灰白色纤维组织增生环, 压迫或包裹肝动脉、门静脉, 大多数胆管癌常与胆管周围结缔组织增生伴行, 很难辨认胆管癌的浸润范围, 使得根治性手术切除非常困难或不可能, 而癌组织残留是导致术后胆管癌很快复发的主要原因^[11-12].

肝门部胆管癌根据侵犯的程度分为5期(TNM分期), 0期: 原位癌; I期: 肿瘤浸润限于黏膜、肌层; II期: 局部侵犯, 可见肿瘤已侵出胆管壁; III期: 肝十二指肠淋巴结、邻近组织局部转移; IV期: 远处转移^[13]. 胆管癌在肿瘤发展上可有以下特点: (1)肿瘤体积很小, 但可以引起胆道梗阻, 沿胆管侵犯; (2)局部呈浸润性生长, 早期侵犯淋巴管、肝动脉; (3)早期侵犯肝实质; (4)生长缓慢, 远处转移较少; (5)易沿神经周围浸润转移.

胆管癌发病原因不明, 在日本, 慢性胆管炎、胆石病患者大约有10%发展为胆管癌^[14]. 其他危险因素还有: 原发性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis, PSC)^[15-16], 先天性胆总管囊肿(Caroli病)^[17], 胆管腺瘤、多发性乳头状瘤病、肝吸虫感染^[18-19], 乙肝、丙肝病毒感染^[20-21], 生活习惯如烟草、饮酒等^[22-23]. 性激素也可能影响胆管癌的发病过程^[24-25]. 近年的研究发现, k-ras, c-myc, c-neu, cerb-b2, fas, c-met, p53, bcl-2等多种基因参与了胆管癌的发生、发展过程^[26-32].

胆管癌预后不良, 目前的实验室检查对胆道系统恶性肿瘤早期诊断帮助不大. 胆汁细胞学或肿瘤组织学检查可明确病变的性质, 但阳性率不高; 影像学检查也难以发现早期肿瘤, 但可帮助明确病变的部位、大小、浸润范围及有无淋巴结和远处转移^[33]. 手术切除是唯一有效的治疗方法^[34-37], 根据手术部位的不同, 胆管癌的手术切除率从32%到51%不等, 根治性手术后3 a存活率为40%-60%^[38], 5 a生存率低于20%^[39-42]. 绝大多数胆管癌手术切除后易于复发, 资料显示, 肝门区转移者临床切除后1 a复发率73.9%, 3 a复发率100%, 平均复发时间术后

9.6 mo; 未见转移者切除术后1 a复发率13.3%, 3 a复发率71.4%, 平均复发时间术后17.5 mo, 复发的主要原因为肝及肝门区转移^[12]. 扩大手术切除和淋巴结清扫范围的治疗作用尚未能确定^[43]. 未经切除者, 只能通过PTCD或经内镜置管引流等手段缓解其临床症状, 生存期在6-12 mo之间^[44]. 胆管癌对放疗、化疗不敏感, 目前尚未有标准的治疗方案^[45].

2 肝外胆道的血管、神经及淋巴管分布

Stapleton *et al*^[46]发现, 左右肝管被来自左右肝动脉、肝段动脉、胃十二指肠动脉和副肝动脉供应的血管丛包绕, 这些血管丛与供应尾状叶的动脉关系密切, 而且联系左右叶肝脏的血液供应; 第4肝段和左肝管中部的血供常来自肝右动脉系统. Chen *et al*^[47]认为, 胆管的血液由至少7条动脉供应, 其中主要的动脉是胆囊动脉、胰十二指肠后上动脉、肝右动脉、门静脉后动脉; 动脉在胆管壁上形成3种吻合方式, 分别是形成血管网、沿着管壁纵向吻合和形成动脉环. 胆管旁的静脉系统起源于胰十二指肠上后静脉和幽门十二指肠静脉的几个小支, 在门静脉的前方沿胆总管和肝动脉向上走行, 在肝十二指肠韧带内及肝门附近形成静脉网, 并发出小支分布于肝门附近的肝段. Vellar *et al*^[48]发现肝内和肝外胆道表面均有静脉丛覆盖, 在肝总管和十二指肠上段的胆总管表面, 静脉丛引流到所谓的3点和9点边缘静脉; 较低的边缘静脉和胆管静脉丛与胰十二指肠静脉丛汇合, 接着汇入胰十二指肠后上静脉. 较高位的边缘静脉分成数支, 一些与静脉丛和门静脉相邻的分支随着左右肝管进入肝脏, 而其他分支有的直接进入或通过肝门静脉丛进入第4段肝内或尾状叶内. 在肝总管分叉以上的静脉引流直接进入尾状叶和第4段肝内.

肝十二指肠韧带内的神经丛, 分为肝前、后丛, 均发支到肝外胆道系统, 神经纤维多数随肝动脉入肝. 肝前丛的交感神经来自左腹腔神经节, 其节前纤维来自左侧交感神经干上第7-10胸神经节, 而副交感神经则直接由左迷走神经发出. 肝后丛的交感神经来自右腹腔神经节, 节前纤维来源于右侧交感神经干上第7-10胸神经节, 而副交感神经由右迷走神经发出, 穿出右腹腔神经节, 分布至肝后丛^[49-50]. 肝外胆道的淋巴通过网膜孔淋巴结, 进而引流至胰十二指肠上淋巴结^[51].

■同行评价

本文对胆管癌的浸润转移进行了详细的叙述, 阅读文献较多、材料比较丰富, 对胆管癌的研究有一定的帮助作用.

3 胆管癌的浸润、转移途径

胆管癌存在多种转移方式,经淋巴转移是胆管癌的主要转移方式之一,以局部淋巴结转移为主,较少发生远处转移.淋巴转移的方式在上段与中段相似,而下段有所不同.中、上段胆管癌的主要淋巴转移方式是沿肝总动脉、门静脉周围及胰头上方的淋巴结转移,而下段胆管癌的淋巴转移主要位于胰头周围.淋巴结转移的方式决定于胆管癌原发部位,这种淋巴结转移方式是根治性手术中进行适当淋巴清除的重要前提.胆管癌的血管浸润常见,病理学研究发现,胆管癌标本中其周围发现血管浸润者达58.3%-77.5%^[52-53],这与胆管的解剖位置密切相关.

除直接浸润转移、种植转移、淋巴道及血道转移等途径之外,神经周围组织间隙作为一个独立的肿瘤细胞转移途径在胆管癌的转移中起着重要作用.经神经周围浸润(perineural invasiveness, PNI)和转移是胆管癌的一种重要病理特征,指肿瘤沿神经浸润指肿瘤细胞包绕神经纤维,并进入神经束膜内沿其扩展的局部浸润转移现象,胆管癌细胞可通过胆管周围的神经周围间隙向近端或远端方向转移.除常见于胆管癌外,也见于胰腺癌、前列腺癌、直肠癌和头颈部鳞癌等肿瘤.对40例患者的病理学观察发现,肿瘤附近淋巴管受侵29例(72.5%),肿瘤组织内血管受侵31例(77.5%),神经周围间隙受侵33例(82.5%)^[52]. Nagakawa *et al*^[53]也在40例胆管癌病例中发现有34例神经周围浸润. Bhuiya *et al*^[54]对70例胆管癌手术标本分析发现,有81.4%的标本发现有神经周围浸润,与胆管癌的部位、肿瘤大小、有无淋巴结转移无关,其5 a生存率明显为低,有神经周围受侵犯者根治术后5 a生存率为32%,未受侵犯者为67%.神经周围浸润的方向是横向明显高于纵向浸润(52.2% *vs* 34.8%),他有别于淋巴浸润,即肝脏侧大于十二指肠侧(52.2% *vs* 39.1%),血管浸润方向与此相似(13.0% *vs* 0)^[55].神经周围间隙细胞浸润与十二指肠韧带内结缔组织转移明显相关,提示肝十二指肠韧带结缔组织的癌转移可能是通过神经周围间隙癌细胞扩散而实现^[56].研究还发现,胆管癌神经周围浸润在结节浸润型(10/10)和浸润型(24/24)胆管癌中的发生率明显高于乳头状癌(6/14)和结节状癌(17/22),常见于浸润至浆膜下层或超出浆膜下层的肿瘤,而未见于局限于黏膜层的肿瘤,神经浸润发生的频率与肿瘤

浸润的深度呈明显的相关性^[57].

4 胆管癌的浸润转移机制

一般认为肿瘤的浸润转移过程包括以下几个环节:(1)原发部位的肿瘤的生长,对周围血管、淋巴管及其他邻近组织的浸润破坏,肿瘤细胞表面表达黏附分子降低,细胞之间黏附性减小,使肿瘤细胞容易脱落,某些具有较强转移能力的肿瘤细胞逃逸;(2)肿瘤细胞进入组织间隙、血液或/和淋巴系统内转移;(3)经过与邻近组织、血液和淋巴循环中的某些免疫细胞、细胞分子相互作用,部分的肿瘤细胞生存下来;(4)得以生存的肿瘤细胞在特异的部位附着于邻近组织、血管或淋巴管的内皮细胞或基底膜;(5)突破基底膜,游出血管或淋巴管;(6)转移部位的肿瘤细胞休眠或继续生长.实际上,肿瘤细胞的浸润转移过程是十分复杂,这一过程包括了一系列的肿瘤细胞与肿瘤细胞、肿瘤细胞与宿主细胞、肿瘤细胞与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)间的相互作用,尤其是多种细胞因子的参与调节,才使某些肿瘤细胞能够发生成功的转移^[58].胆管癌的神经周围浸润和转移也具有类似的过程,对胆管癌及周围组织病理标本的三维模式立体重建图像显示,肿瘤细胞可首先浸润小血管、淋巴管、在神经纤维周围形成“卫星”灶,继而浸润神经周围.研究发现,在神经周围间隙、血管、淋巴管中,肿瘤组织与原发灶并无结构上的连续性,肿瘤细胞在脱离原发灶后可独立存活下来,形成新的克隆^[59].提示神经周围组织间隙是一个独立的肿瘤细胞转移途径.研究还发现,人胆管癌细胞能够穿过人工基质黏附并浸润神经纤维,形成包绕神经纤维的细胞团,显示人胆管癌细胞对神经纤维具有亲嗜性^[60].

胆管癌的神经周围浸润和转移机制目前尚不清楚,可能与下面的因素有关:(1)神经周围的潜在间隙有利于胆管癌细胞移动和扩散生长;(2)肿瘤细胞表面有噬神经的黏附分子存在;(3)自分泌或旁分泌激素的作用,胆管癌细胞可能通过分泌蛋白酶,降解神经束膜,侵入神经周围间隙,在某些自分泌或旁分泌激素的作用下,通过影响肿瘤细胞运动迁移能力导致肿瘤细胞嗜神经浸润(neurotropic tumor infiltration, NTI),胆管壁及其周围有丰富的内脏神经丝分布.这些神经纤维与肿瘤细胞密切接触.研究发现,与支配肿瘤起源组织的神经纤维相比,肿瘤中神经

纤维的化学性质发生明显改变^[61]. 肿瘤细胞与神经组织作用, 能够导致蛋白水解酶释放、某些化学趋化或促进因子释放以及细胞增殖^[62], 通过细胞黏附分子与神经纤维作用影响肿瘤细胞的神经周围浸润过程^[63-64]. 研究发现, 神经细胞黏附分子(NCAM)在神经周围组织有较高浓度, 能够介导细胞-细胞、细胞-基质黏附^[65-66], NCAM的表达与胆管癌的组织学分型有关, 随细胞恶性程度的增加NCAM阳性率增高^[67], 对24例胆管癌的观察发现, NCAM与胆管癌神经周围浸润显著相关^[68]. 提示当胆管癌突破生长屏障后, 癌细胞表面的NCAM可能诱导癌细胞向神经细胞移动、黏附, 在肿瘤浸润神经的过程中发挥“导航”和“停泊”作用.

肿瘤细胞与细胞外基质成分黏附的相互作用在肿瘤细胞的神经浸润和转移过程中也具有重要作用. 研究表明, 细胞外基质蛋白成分中, 如纤联蛋白(fibronectin)、层黏蛋白(laminin)、玻联蛋白(vitronectin)、血小板反应蛋白(thrombospondin)及多种胶原(collagen), 在体外直接促进肿瘤细胞的黏附与运动^[66]; 观察发现, 肿瘤细胞通过趋向作用直接向含该成分密度高的方向迁移, 且速率较对照组明显加快; 体内接近肿瘤细胞处的特异细胞外基质成分密度的局部变化同样会影响肿瘤细胞的迁移^[69-70]. 研究发现, 肿瘤细胞在与细胞外基质黏附相互作用的过程中, 能够产生并释放大蛋白水解酶, 如金属蛋白酶(metalloproteinase)、丝氨酸蛋白酶(serine protease)和半胱氨酸蛋白酶(cysteineprotease)等, 其含量随肿瘤细胞的恶性程度而增加^[71]. 通过破坏包括血管内皮、基底膜在内的各种细胞外基质结构, 肿瘤细胞得以进入血液或淋巴循环, 并到达特异部位继续生存. 一些实验结果显示, MMP-2、MMP-9表达与胆管癌发展、浸润和转移密切相关, 对该类酶的抑制可以阻断肿瘤细胞的浸润转移能力^[72]. 表皮生长因子能够通过NF- κ B路径激活MMP-9等蛋白水解酶增强胆管癌细胞的侵袭力^[73], 干扰NF- κ B的活性能够改变胆管癌细胞的生物学行为^[74]. 肿瘤细胞内不同亚群的共存或转移能力不同的细胞亚群混合, 使转移能力低的细胞也表现出较强的浸润转移能力, 其原因可能与不同亚群间的细胞外基质成分及降解酶的互补作用, 使其转移能力发生了改变有关^[75]. 胆管周围有丰富的内在及外在神经丝, 他们由分布于消化道的神经细胞(神经节)、连接神经节的神经纤维束以及众多由

神经节发出的支配肌肉、腺体和血管的神经纤维组成. 除肾上腺素能和胆碱能纤维外, 尚有丰富的含有多种消化道激素(神经肽)的肽能纤维, 研究表明, 许多胃肠肽类激素对肿瘤的生物学行为具有非常重要的调控作用, 他们通过自分泌、旁分泌及神经内分泌机制在多种消化道肿瘤的发生、发展中发挥重要作用^[76-77].

总之, 对胆管癌的浸润和转移机制的研究和深入了解是实现胆管癌早期诊断、提高其疗效的根本途径, 神经周围浸润转移途径近年来越来越受到人们的重视. 由于胆管的解剖部位的特点以及其与周围神经、包括CCK在内的神经肽的密切关系, 使包括CCK在内的神经肽与胆管癌的浸润转移的关系特别是其在胆管癌的神经周围浸润转移中的作用的研究具有重要的意义, 对于揭示胆管癌与神经纤维的相互作用机制以及胆管癌神经周围浸润转移过程的调控机制具有重要价值.

5 参考文献

- 1 黄志强. 胆管癌. 见: 吴阶平, 裘法祖. 黄家驷外科学. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 1404-1406
- 2 Nakeeb A, Pitt HA, Sohn TA, Coleman J, Abrams RA, Piantadosi S, Hruban RH, Lillemoe KD, Yeo CJ, Cameron JL. Cholangiocarcinoma. A spectrum of intrahepatic, perihilar, and distal tumors. *Ann Surg* 1996; 224: 463-473; discussion 473-475
- 3 Ahrendt SA, Pitt HA. Biliary tract. In: Townsend: Sabiston Textbook of Surgery. 16th. Philadelphia: WB Saunders Company, 2001: 1076-1111
- 4 Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin* 1999; 49: 8-31, 1
- 5 Standish RA, Davies SE. Bile duct tumours. *Current Diagnostic Pathology* 2002; 8: 160-171
- 6 Altaee MY, Johnson PJ, Farrant JM, Williams R. Etiologic and clinical characteristics of peripheral and hilar cholangiocarcinoma. *Cancer* 1991; 68: 2051-2055
- 7 Henson DE, Albores-Saavedra J, Corle D. Carcinoma of the extrahepatic bile ducts. Histologic types, stage of disease, grade, and survival rates. *Cancer* 1992; 70: 1498-1501
- 8 Carriaga MT, Henson DE. Liver, gallbladder, extrahepatic bile ducts, and pancreas. *Cancer* 1995; 75: 171-190
- 9 Patel T. Cholangiocarcinoma. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; 3: 33-42
- 10 de Groen PC, Gores GJ, LaRusso NF, Gunderson LL, Nagorney DM. Biliary tract cancers. *N Engl J Med* 1999; 341: 1368-1378
- 11 Lindell G, Hansson L, Dawiskiba S, Andersson R, Axelsson J, Ihse I. Operations for extrahepatic bile duct cancers: are the results really improving? *Eur J Surg* 2000; 166: 535-539
- 12 Popescu I, David L, Brasoveanu V, Boros M, Hrehoret D. Two-stage hepatectomy: an analysis of a single center's experience. *Magy Seb* 2006; 59: 184-189
- 13 Luca L, Mario P, Giansiro B, Maurizio F, Antonio

- M, Carlo M. Non invasive estimation of mean right atrial pressure utilizing the 2D-Echo transverse diameter of the left hepatic vein. *Int J Card Imaging* 1992; 8: 191-195
- 14 Kubo S, Kinoshita H, Hirohashi K, Hamba H. Hepatolithiasis associated with cholangiocarcinoma. *World J Surg* 1995; 19: 637-641
- 15 Kornfeld D, Ekblom A, Ihre T. Survival and risk of cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis. A population-based study. *Scand J Gastroenterol* 1997; 32: 1042-1045
- 16 Broome U, Glaumann H, Lindstrom E, Loof L, Almer S, Prytz H, Sandberg-Gertzen H, Lindgren S, Fork FT, Järnerot G, Olsson R. Natural history and outcome in 32 Swedish patients with small duct primary sclerosing cholangitis (PSC). *J Hepatol* 2002; 36: 586-589
- 17 Hewitt PM, Krige JE, Bornman PC, Terblanche J. Choledochal cyst in pregnancy: a therapeutic dilemma. *J Am Coll Surg* 1995; 181: 237-240
- 18 Watanapa P. Cholangiocarcinoma in patients with opisthorchiasis. *Br J Surg* 1996; 83: 1062-1064
- 19 Shin HR, Lee CU, Park HJ, Seol SY, Chung JM, Choi HC, Ahn YO, Shigemastu T. Hepatitis B and C virus, *Clonorchis sinensis* for the risk of liver cancer: a case-control study in Pusan, Korea. *Int J Epidemiol* 1996; 25: 933-940
- 20 Perumal V, Wang J, Thuluvath P, Choti M, Torbenson M. Hepatitis C and hepatitis B nucleic acids are present in intrahepatic cholangiocarcinomas from the United States. *Hum Pathol* 2006; 37: 1211-1216
- 21 Kobayashi M, Ikeda K, Saitoh S, Suzuki F, Tsubota A, Suzuki Y, Arase Y, Murashima N, Chayama K, Kumada H. Incidence of primary cholangiocellular carcinoma of the liver in Japanese patients with hepatitis C virus-related cirrhosis. *Cancer* 2000; 88: 2471-2477
- 22 Abdel Wahab M, Fathy O, Elghwalby N, Sultan A, Elebidy E, Abdalla T, Elshobary M, Mostafa M, Foad A, Kandeel T, Abdel Raouf A, Salah T, Abu Zeid M, Abu Elenein A, Gad Elhak N, ElFiky A, Ezzat F. Resectability and prognostic factors after resection of hilar cholangiocarcinoma. *Hepatogastroenterology* 2006; 53: 5-10
- 23 Bergquist A, Glaumann H, Persson B, Broome U. Risk factors and clinical presentation of hepatobiliary carcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis: a case-control study. *Hepatology* 1998; 27: 311-316
- 24 Chow WH, McLaughlin JK, Menck HR, Mack TM. Risk factors for extrahepatic bile duct cancers: Los Angeles County, California (USA). *Cancer Causes Control* 1994; 5: 267-272
- 25 Moerman CJ, Berns MP, Bueno de Mesquita HB, Runia S. Reproductive history and cancer of the biliary tract in women. *Int J Cancer* 1994; 57: 146-153
- 26 Tannapfel A, Benicke M, Katalinic A, Uhlmann D, Kockerling F, Hauss J, Wittekind C. Frequency of p16(INK4A) alterations and K-ras mutations in intrahepatic cholangiocarcinoma of the liver. *Gut* 2000; 47: 721-727
- 27 Que FG, Phan VA, Phan VH, Celli A, Batts K, LaRusso NF, Gores GJ. Cholangiocarcinomas express Fas ligand and disable the Fas receptor. *Hepatology* 1999; 30: 1398-1404
- 28 Terada T, Nakanuma Y, Sirica AE. Immunohistochemical demonstration of MET overexpression in human intrahepatic cholangiocarcinoma and in hepatolithiasis. *Hum Pathol* 1998; 29: 175-180
- 29 Aishima SI, Taguchi KI, Sugimachi K, Shimada M, Sugimachi K, Tsuneyoshi M. c-erbB-2 and c-Met expression relates to cholangiocarcinogenesis and progression of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Histopathology* 2002; 40: 269-278
- 30 Isa T, Tomita S, Nakachi A, Miyazato H, Shimoji H, Kusano T, Muto Y, Furukawa M. Analysis of microsatellite instability, K-ras gene mutation and p53 protein overexpression in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 604-608
- 31 Ahrendt SA, Rashid A, Chow JT, Eisenberger CF, Pitt HA, Sidransky D. p53 overexpression and K-ras gene mutations in primary sclerosing cholangitis-associated biliary tract cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2000; 7: 426-431
- 32 Taniai M, Higuchi H, Burgart LJ, Gores GJ. p16INK4a promoter mutations are frequent in primary sclerosing cholangitis (PSC) and PSC-associated cholangiocarcinoma. *Gastroenterology* 2002; 123: 1090-1098
- 33 Liu CL, Fan ST, Lo CM, Tso WK, Lam CM, Wong J. Improved operative and survival outcomes of surgical treatment for hilar cholangiocarcinoma. *Br J Surg* 2006; 93: 1488-1494
- 34 Mansfield SD, Barakat O, Charnley RM, Jaques BC, O'Suilleabhain CB, Atherton PJ, Manas D. Management of hilar cholangiocarcinoma in the North of England: pathology, treatment, and outcome. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7625-7630
- 35 Tsao JI, Nimura Y, Kamiya J, Hayakawa N, Kondo S, Nagino M, Miyachi M, Kanai M, Uesaka K, Oda K, Rossi RL, Braasch JW, Dugan JM. Management of hilar cholangiocarcinoma: comparison of an American and a Japanese experience. *Ann Surg* 2000; 232: 166-174
- 36 Nakeeb A, Pitt HA, Sohn TA, Coleman J, Abrams RA, Piantadosi S, Hruban RH, Lillemoe KD, Yeo CJ, Cameron JL. Cholangiocarcinoma. A spectrum of intrahepatic, perihilar, and distal tumors. *Ann Surg* 1996; 224: 463-473; discussion 473-475
- 37 Lee SG, Lee YJ, Park KM, Hwang S, Min PC. One hundred and eleven liver resections for hilar bile duct cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2000; 7: 135-141
- 38 Gores GJ. Cholangiocarcinoma: current concepts and insights. *Hepatology* 2003; 37: 961-969
- 39 Kakara S, Burgart LJ. Tumours of the biliary system. *Current Diagnostic Pathology* 2005; 11: 34-43
- 40 Jarnagin WR, Fong Y, DeMatteo RP, Gonen M, Burke EC, Bodniewicz BS J, Youssef BA M, Klimstra D, Blumgart LH. Staging, resectability, and outcome in 225 patients with hilar cholangiocarcinoma. *Ann Surg* 2001; 234: 507-517; discussion 517-519
- 41 Silva MA, Tekin K, Aytakin F, Bramhall SR, Buckels JA, Mirza DF. Surgery for hilar cholangiocarcinoma; a 10 year experience of a tertiary referral centre in the UK. *Eur J Surg Oncol* 2005; 31: 533-539
- 42 Reed DN Jr, Vitale GC, Martin R, Bas H, Wieman TJ, Larson GM, Edwards M, McMasters K. Bile duct carcinoma: trends in treatment in the nineties. *Am Surg* 2000; 66: 711-714; discussion 714-715
- 43 Hemming AW, Kim RD, Mekeel KL, Fujita S, Reed AI, Foley DP, Howard RJ. Portal vein resection

- for hilar cholangiocarcinoma. *Am Surg* 2006; 72: 599-604; discussion 604-605
- 44 Burke EC, Jarnagin WR, Hochwald SN, Pisters PW, Fong Y, Blumgart LH. Hilar Cholangiocarcinoma: patterns of spread, the importance of hepatic resection for curative operation, and a presurgical clinical staging system. *Ann Surg* 1998; 228: 385-394
- 45 Hejna M, Pruckmayer M, Raderer M. The role of chemotherapy and radiation in the management of biliary cancer: a review of the literature. *Eur J Cancer* 1998; 34: 977-986
- 46 Stapleton GN, Hickman R, Terblanche J. Blood supply of the right and left hepatic ducts. *Br J Surg* 1998; 85: 202-207
- 47 Chen WJ, Ying DJ, Liu ZJ, He ZP. Analysis of the arterial supply of the extrahepatic bile ducts and its clinical significance. *Clin Anat* 1999; 12: 245-249
- 48 Vellar ID. Preliminary study of the anatomy of the venous drainage of the intrahepatic and extrahepatic bile ducts and its relevance to the practice of hepatobiliary surgery. *ANZ J Surg* 2001; 71: 418-422
- 49 方驰华, 张伟, 钟世镇. 肝门部胆管癌手术相关结构的应用解剖学进展. *中华肝胆外科杂志* 2003; 9: 703-704
- 50 徐恩多. 肝外胆道的解剖和变异. 见: 黄志强. 当代胆道外科学. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1998: 19-29
- 51 王建本. 胆囊和胆管. 见: 裘法祖, 王建本, 张祐增. 腹部外科临床解剖学. 济南: 山东科学技术出版社, 2001: 179-218
- 52 王曙光, 韩本立, 陈意生, 彭志明, 贺光友. 胆管癌转移途径的病理学研究. *中华外科杂志* 1996; 34: 352-354
- 53 Nagakawa T, Mori K, Nakano T, Kadoya M, Kobayashi H, Akiyama T, Kayahara M, Ohta T, Ueno K, Higashino Y. Perineural invasion of carcinoma of the pancreas and biliary tract. *Br J Surg* 1993; 80: 619-621
- 54 Bhuiya MR, Nimura Y, Kamiya J, Kondo S, Fukata S, Hayakawa N, Shionoya S. Clinicopathologic studies on perineural invasion of bile duct carcinoma. *Ann Surg* 1992; 215: 344-349
- 55 Ogura Y, Mizumoto R, Tabata M, Matsuda S, Kusuda T. Surgical treatment of carcinoma of the hepatic duct confluence: analysis of 55 resected carcinomas. *World J Surg* 1993; 17: 85-92; discussion 92-93
- 56 Thuluvath PJ, Rai R, Venbrux AC, Yeo CJ. Cholangiocarcinoma: a review. *Gastroenterologist* 1997; 5: 306-315
- 57 Nagakawa T, Kitagawa H, Kayahara M, Ohta T, Konishi I. Spreading patterns of hilar bile duct cancer. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 2000; 101: 399-403
- 58 Ruiz P, Gunthert U. The cellular basis of metastasis. *World J Urol* 1996; 14: 141-150
- 59 王大东, 黄志强, 周宁新, 陈乐真, 戴朴. 胆管癌神经浸润转移模式的三维重建. *中华外科杂志* 2000; 38: 207-208
- 60 郑秀海, 张丰深, 马宽生, 张丽君, 王曙光. 人胆管癌细胞神经周围浸润模型的构建与初步观察. *消化外科* 2005; 4: 354-356
- 61 刘少君, 杨萍, 张世忠, 李青, 鞠躬, 刘彦仿. 脑膜瘤内的肽能神经支配. *第四军医大学学报* 1993; 14: 14-16
- 62 Yang G, Wheeler TM, Kattan MW, Scardino PT, Thompson TC. Perineural invasion of prostate carcinoma cells is associated with reduced apoptotic index. *Cancer* 1996; 78: 1267-1271
- 63 Seki H, Koyama K, Tanaka J, Sato Y, Umezawa A. Neural cell adhesion molecule and perineural invasion in gallbladder cancer. *J Surg Oncol* 1995; 58: 97-100
- 64 Albores-Saavedra J, Henson DE. Adenomyomatous hyperplasia of the gallbladder with perineural invasion. *Arch Pathol Lab Med* 1995; 119: 1173-1176
- 65 McLaughlin RB Jr, Montone KT, Wall SJ, Chalian AA, Weinstein GS, Roberts SA, Wolf PF, Weber RS. Nerve cell adhesion molecule expression in squamous cell carcinoma of the head and neck: a predictor of propensity toward perineural spread. *Laryngoscope* 1999; 109: 821-826
- 66 Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 43 Suppl: S42-51
- 67 王大东, 黄志强, 周宁新, 陈乐真. 神经细胞粘附分子在胆管癌神经浸润转移中的作用. *中华实验外科杂志* 2000; 17: 171-178
- 68 Seki H, Tanaka J, Sato Y, Kato Y, Umezawa A, Koyama K. Neural cell adhesion molecule (NCAM) and perineural invasion in bile duct cancer. *J Surg Oncol* 1993; 53: 78-83
- 69 Skubitz AP. Adhesion molecules. *Cancer Treat Res* 2002; 107: 305-329
- 70 Haroun-Bouhedja F, Lindenmeyer F, Lu H, Soria C, Jozefonvicz J, Boisson-Vidal C. *In vitro* effects of fucans on MDA-MB231 tumor cell adhesion and invasion. *Anticancer Res* 2002; 22: 2285-2292
- 71 Tannapfel A, Weinans L, Geissler F, Schutz A, Katalinic A, Kockerling F, Hauss J, Wittekind C. Mutations of p53 tumor suppressor gene, apoptosis, and proliferation in intrahepatic cholangiocellular carcinoma of the liver. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 317-324
- 72 肖梅, 周宁新, 黄志强, 吕亚莉, 陈领红, 王殿军, 常维玲. 肝门部胆管癌中MMP-2/TIMP-2比值半定量研究的临床意义. *消化外科* 2003; 2: 310-313
- 73 孔凡民, 刘小方, 李航宇, 隋春阳, 李昱骥, 张浩, 郭仁宣. EGF中介的NF- κ B及细胞外基质降解酶与胆管癌细胞侵袭相关性. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 947-952
- 74 Chen RF, Li ZH, Kong XH, Chen JS. Effect of mutated IkappaBalpha transfection on multidrug resistance in hilar cholangiocarcinoma cell lines. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 726-728
- 75 Ogasawara M, Murata J, Ayukawa K, Saimi I. Differential effect of intestinal neuropeptides on invasion and migration of colon carcinoma cells *in vitro*. *Cancer Lett* 1997; 116: 111-116
- 76 Caplin M, Khan K, Savage K, Rode J, Varro A, Michaeli D, Grimes S, Brett B, Pounder R, Dhillon A. Expression and processing of gastrin in hepatocellular carcinoma, fibrolamellar carcinoma and cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 1999; 30: 519-526
- 77 Aly A, Shulkes A, Baldwin GS. Gastrins, cholecystokinins and gastrointestinal cancer. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1704: 1-10

电编 张敏 编辑 王晓瑜

医用三氧与中药对醋氨酚犬中毒性肝炎的保护作用

霍 荻, 杨运高, 敖飞健, 戴 炜, 李莉洁, 郭亚兵

■背景资料

药物性肝炎问题日益突出, 但迄今尚无预防药物性肝炎的有效方法. 临床实践中很多情况下根据病情需要祛除病因治疗无法实现, “保肝”治疗药物并不具备预防性应用肝脏保护作用. 医用三氧具有其特殊生物药理学特点, 近年已应用于肝病治疗及免疫调节治疗. 本文尝试应用医用三氧及中药护肝方, 对急性中毒性肝衰竭犬的预防性治疗作用进行初步探索.

霍荻, 杨运高, 李莉洁, 南方医科大学中医药学院中医临床基础教研室 广东省广州市 510515
敖飞健, 戴炜, 深圳东湖医院感染内科 广东省深圳市 518020
郭亚兵, 南方医科大学南方医院感染内科 广东省广州市 510515
南方医科大学南方医院课题, No. 20050012
深圳市科技局课题, No. 200204182
通讯作者: 郭亚兵, 510515, 广东省广州市, 南方医科大学南方医院感染内科. yabing@fimmu.com
电话: 020-61641948 传真: 020-87719653
收稿日期: 2006-10-18 接受日期: 2006-11-16

Protective effect of medical ozone and Chinese medicine on acetaminophen-induced toxic hepatitis in dogs

Di Huo, Yun-Gao Yang, Fei-Jian Ao, Wei Dai, Li-Jie Li, Ya-Bing Guo

Di Huo, Yun-Gao Yang, Li-Jie Li, Department of Chinese Medicine Clinical Basis, College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Fei-Jian Ao, Wei Dai, Department of Infectious Diseases, Shenzhen Donghu Hospital, Shenzhen 518020, Guangdong Province, China

Ya-Bing Guo, Department of Infectious Diseases, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Supported by the Subject of Nanfang Hospital of Southern Medical University, No. 20050012, and the Foundation of Shenzhen Science and Technology Bureau of Guangdong Province, No. 200204182

Correspondence to: Ya-Bing Guo, Department of Infectious Diseases, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China. yabing@fimmu.com

Received: 2006-10-18 Accepted: 2006-11-16

Abstract

AIM: To investigate the protective effects of Chinese medicine Hupan recipe and medical ozone on acetaminophen-induced acute toxic hepatic failure in dogs.

METHODS: Eighteen mongrel dogs were averagely randomized into model control group, Chinese medicine (using Hupan recipe) pretreatment group and medical ozone pretreatment group. All the dogs were subcutaneously injected with acetaminophen to establish the models of acute toxic hepatic failure 15 days after

pretreatment. Blood samples were collected for the detection of liver function, prothrombin time (PT), and the levels of ammonia and blood urea nitrogen (BUN) before and 24, 48, 72, 96 hours, 7, and 14 days after injection. The pathological changes of liver tissues were observed 14 days after injection.

RESULTS: The pathological changes such as ballooning and fat-like degeneration of hepatocytes were remarkably alleviated in Chinese medicine group and medical ozone group. The levels of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TBIL), ammonia, and PT were significantly lower in Chinese medicine group and medical ozone group than those in control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and there were also notable difference between Chinese medicine group and medical ozone group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$).

CONCLUSION: Preconditioning of medical ozone and Hupan recipe can protect liver against acute injury induced by acetaminophen in dogs, and the latter is superior to the former.

Key Words: Drug-induced hepatitis; Liver failure; Medical ozone; Chinese medicine; Acetaminophen

Huo D, Yang YG, Ao FJ, Dai W, Li LJ, Guo YB. Protective effect of medical ozone and Chinese medicine on acetaminophen-induced toxic hepatitis in dogs. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(3):282-286

摘要

目的: 探讨中药护肝方与医用三氧对醋氨酚犬急性中毒性肝衰竭的预防性保护作用.

方法: 健康杂种犬18只, 随机平均分为模型对照组, 中药预处理组和医用三氧预处理组. 处理15 d后各组均进行醋氨酚皮下注射, 分别于注射前、注射后24, 48, 72, 96 h及7, 14 d抽血检测肝功能、凝血酶原时间(PT)、血氨(AMMO)、尿素氮(BUN), 观察记录全身情况, 实验狗死亡时或治疗后存活14 d时取肝组织做病理观察.

结果:与模型对照组相比, 中药组和三氧组的肝组织病理变化程度轻、病灶范围小, 肝细胞气球样变和脂肪变性明显. 三氧组与中药组谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总胆红素(TBIL)、AMMO、PT均显著低于模型对照组($P<0.05$ 或 0.01), 并且三氧组与中药组相比也有显著差异($P<0.05$ 或 0.01).

结论:中药护肝方与医用三氧的预防性给药能够有效减轻醋氨酚所致犬急性中毒性肝损害, 降低血氨和缩短PT, 且医用三氧效果优于护肝方.

关键词:药物性肝炎; 肝衰竭; 医用三氧; 中药; 醋氨酚

霍荻, 杨运高, 敖飞健, 戴炜, 李莉洁, 郭亚兵. 医用三氧与中药对醋氨酚犬中毒性肝炎的保护作用. 世界华人消化杂志 2007;15(3):282-286

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/282.asp>

0 引言

尽管药物性肝炎问题日益突出, 但迄今尚无预防药物性肝炎的有效方法. 医用三氧具有其特殊生物药理学特点, 近年已应用于肝病治疗及免疫调节治疗^[1-8]. 本文尝试应用中药护肝方及医用三氧, 对急性中毒性肝衰竭犬的预防性治疗作用进行初步探索.

1 材料和方法

1.1 材料 健康杂种犬18只, 体质量12.5-15 kg, 购自南方医院动物实验所. 动物实验遵守南方医科大学动物实验规则进行. 医用三氧由医用纯氧经过三氧发生器(德国哈斯乐Ozonosan alpha Plus 1107)制备, 是纯氧与三氧的混合气体. 本研究用三氧浓度为20 mg/L. 中药护肝方组成: 黄芪30 g, 党参20 g, 白术20 g, 生地黄15 g, 熟地黄15 g, 丹参15 g, 白花蛇舌草10 g, 板蓝根10 g, 上述药物水煎煮2次, 过滤制成1 kg/L生药药液. 醋氨酚($C_8H_9NO_2$)由德国Fluka公司生产; 二甲基亚砜(C_2H_6OS)由广州新成精细化工厂生产.

1.2 方法 健康杂种犬18只, 随机分为3组, 分别是模型对照组, 中药组和医用三氧组, 每组6只. 中药组护肝方直肠灌药, 每只犬按4.14 g/kg剂量, 1次/d, 三氧组予医用三氧直肠灌注, 每次150 mL, 1次/d, 共15 d. 然后3组犬同时进行醋氨酚皮下注射. 醋氨酚注射方法是将醋氨酚溶解于二甲基亚砜(DMSO)中配制成600 g/L的浓度^[6], 新鲜

配制使用. 用配制好的醋氨酚溶液采用多点皮下注射: 首次剂量为750 mg/kg体质量, 首次注射后9 h和24 h分别进行第2次和第3次注射, 用量均为200 mg/kg体质量. 观察犬的精神, 饮食, 行动, 大小便等. 于醋氨酚造模前及造模后24, 48, 72, 96 h, 7, 14 d抽血化验检测肝功能(ALT, AST, TBIL)、血氨(AMMO)、凝血酶原时间(PT)、尿素氮(BUN). 实验犬在实验前以及醋氨酚注射后死亡时或存活14 d时, 用肝组织活检枪取肝脏组织, 用40 g/L甲醛溶液固定, 石蜡包埋切片, 进行HE及嗜银染色, 光镜下观察.

统计学处理 用SPSS13.0版处理, 各数据以均数±标准差(mean±SD)表示, 多个样本均数间的比较用方差分析(One-Way ANOVA); 多重比较满足方差齐性要求($P>0.05$)的比较用LSD法分析, 不满足方差齐性要求($P<0.05$)的比较用Tamhane法分析.

2 结果

各组犬醋氨酚造模前精神良好, 呼吸平稳, 饮食及二便正常, 对外界刺激反应灵敏. 造模后, 各组犬均表现为不同程度的精神困倦, 巩膜黄染, 摄食量减少, 呕吐, 小便黄, 日渐消瘦; 有些犬出现烦躁, 醉酒样步态; 有些犬精神萎靡, 嗜睡, 对外界刺激反应迟钝, 伤口难以止血. 以上表现在首剂醋氨酚注射后48-72 h最为明显, 且模型对照组最为严重.

2.1 生存期比较 醋氨酚模型对照组2只犬在造模后48 h出现呼吸困难, 昏睡, 渐至昏迷, 最终分别在造模后56, 75 h左右死亡, 本组其余犬及中药组与三氧组犬造模后14 d仍存活.

2.2 生化指标分析 模型对照组ALT, AST, TBIL, PT指标在注射醋氨酚造模后24 h即升高, 72 h时达高峰; AMMO在造模后48 h达高峰; BUN在造模后24 h达高峰(表1).

与模型对照组比较: 三氧组和中药组ALT明显低于模型对照组(三氧组在造模后24, 48, 72, 96 h, 7, 14 d; 中药组造模后24, 72, 96 h, 7 d), 有显著性差异($P<0.05$ 或 0.01); 同样三氧组和中药组AST, TBIL, AMMO升高也较模型对照组低, 有显著性意义($P<0.05$ 或 0.01). 三氧组和中药组PT值在造模后48, 72, 96 h比模型对照组低, 有显著性差异; 三氧组BUN造模后24 h显示出明显低于模型对照组, 有显著性差异(表1).

三氧组与中药组相比, 造模后7, 14 d ALT

■ 研发前沿

目前对于医用三氧的基础研究主要集中在生物学与药理学特性方面, 其作用机制有一部分也只是推想, 并未得到实验证明, 在临床研究方面尚缺乏有力的循证医学证据来确定三氧治疗的真正疗效、最佳剂量和疗程.

■创新盘点

随着医用三氧生物学与药理学特性的日趋明了,医用三氧目前已应用于多种疾病的治疗,然而预防性治疗作用报道较少,仅国外有在器官缺血再灌注前应用三氧可以减轻器官损伤的报道。本研究首次应用医用三氧及中药预防性治疗药物性肝炎,并将二者疗效进行平行对比。

表 1 各组肝功能和PT, AMMO, BUN的比较 (mean $\pm$ SD, $n = 6$)

	ALT (nkat/L)	AST (nkat/L)	TBIL (μ mol/L)	PT (s)	AMMO (μ mol/L)	BUN (mmol/L)
模型对照组						
造模前	441.76 $\pm$ 150.20	522.27 $\pm$ 94.19	3.32 $\pm$ 0.44	7.30 $\pm$ 0.28	35.82 $\pm$ 7.47	3.53 $\pm$ 0.56
造模后24 h	1755.85 $\pm$ 315.40	1133.56 $\pm$ 296.56	6.45 $\pm$ 2.88	7.87 $\pm$ 0.64	76.82 $\pm$ 11.77	9.92 $\pm$ 3.29
造模后48 h	3628.56 $\pm$ 1570.81	1350.27 $\pm$ 815.00	12.72 $\pm$ 5.77	11.40 $\pm$ 1.05	118.00 $\pm$ 30.56	7.43 $\pm$ 3.77
造模后72 h	4177.50 $\pm$ 1289.76	3100.62 $\pm$ 1150.06	24.28 $\pm$ 7.70	12.74 $\pm$ 1.83	91.38 $\pm$ 26.05	4.36 $\pm$ 2.35
造模后96 h	4192.51 $\pm$ 1068.38	1541.98 $\pm$ 207.54	22.45 $\pm$ 5.12	11.00 $\pm$ 1.13	84.30 $\pm$ 11.56	3.35 $\pm$ 0.96
造模后7 d	1979.56 $\pm$ 223.38	1254.42 $\pm$ 165.20	19.28 $\pm$ 11.71	7.85 $\pm$ 0.54	71.08 $\pm$ 7.98	3.30 $\pm$ 0.81
造模后14 d	1687.84 $\pm$ 412.75	795.99 $\pm$ 158.37	15.78 $\pm$ 14.77	7.55 $\pm$ 0.31	75.20 $\pm$ 7.91	3.15 $\pm$ 1.34
中药组						
造模前	491.77 $\pm$ 50.34	536.27 $\pm$ 82.68	3.58 $\pm$ 0.29	7.35 $\pm$ 0.27	32.98 $\pm$ 5.22	3.13 $\pm$ 0.72
造模后24 h	1144.73 $\pm$ 317.90 ^b	1072.38 $\pm$ 220.54	2.95 $\pm$ 1.60 ^b	7.95 $\pm$ 0.58	65.58 $\pm$ 8.62 ^a	7.00 $\pm$ 1.39
造模后48 h	1400.28 $\pm$ 389.08	1203.07 $\pm$ 260.05	6.07 $\pm$ 2.86	9.02 $\pm$ 0.52 ^b	81.40 $\pm$ 15.13	5.53 $\pm$ 1.91
造模后72 h	1525.31 $\pm$ 503.77 ^a	950.19 $\pm$ 188.37	4.87 $\pm$ 3.25 ^a	9.02 $\pm$ 0.67 ^a	71.83 $\pm$ 15.18 ^a	4.62 $\pm$ 1.05
造模后96 h	811.33 $\pm$ 237.71 ^a	989.03 $\pm$ 259.05 ^b	6.78 $\pm$ 1.64 ^a	8.15 $\pm$ 0.86 ^a	62.07 $\pm$ 7.48 ^b	3.70 $\pm$ 0.56
造模后7 d	1169.73 $\pm$ 291.39 ^b	944.69 $\pm$ 221.88 ^a	5.93 $\pm$ 1.15	7.77 $\pm$ 0.43	59.57 $\pm$ 8.36 ^a	3.35 $\pm$ 0.44
造模后14 d	1036.37 $\pm$ 329.57	588.95 $\pm$ 131.19 ^a	6.37 $\pm$ 1.97	7.58 $\pm$ 0.31	64.28 $\pm$ 8.59 ^a	3.22 $\pm$ 1.10
三氧组						
造模前	427.92 $\pm$ 128.53	547.28 $\pm$ 183.70	3.60 $\pm$ 0.42	7.52 $\pm$ 0.39	38.43 $\pm$ 13.15	2.97 $\pm$ 0.73
造模后24 h	1178.07 $\pm$ 214.21 ^b	991.87 $\pm$ 468.26	2.22 $\pm$ 1.33 ^b	7.53 $\pm$ 0.50	47.62 $\pm$ 8.30 ^{bd}	3.22 $\pm$ 1.12 ^{ad}
造模后48 h	991.87 $\pm$ 345.90 ^a	930.69 $\pm$ 303.23	2.18 $\pm$ 1.90 ^a	7.75 $\pm$ 0.67 ^{bc}	53.48 $\pm$ 10.19 ^{ac}	3.57 $\pm$ 0.80
造模后72 h	1055.71 $\pm$ 316.23 ^a	686.30 $\pm$ 295.23 ^a	2.52 $\pm$ 1.87 ^a	7.62 $\pm$ 0.58 ^{ac}	60.12 $\pm$ 5.97 ^b	3.77 $\pm$ 0.93
造模后96 h	811.33 $\pm$ 235.21 ^a	822.33 $\pm$ 319.56 ^b	3.08 $\pm$ 1.11 ^{ad}	7.28 $\pm$ 0.12 ^a	51.48 $\pm$ 17.12 ^b	3.75 $\pm$ 0.44
造模后7 d	622.29 $\pm$ 159.37 ^{bd}	702.97 $\pm$ 207.04 ^{bc}	2.65 $\pm$ 0.79 ^d	7.28 $\pm$ 0.51	56.35 $\pm$ 8.82 ^b	2.78 $\pm$ 0.87
造模后14 d	458.43 $\pm$ 120.52 ^{ac}	466.76 $\pm$ 129.53 ^b	3.22 $\pm$ 0.84	7.32 $\pm$ 0.26	60.33 $\pm$ 3.55 ^b	2.43 $\pm$ 1.11

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 模型对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 中药组。

明显低于中药组,有显著性差异;三氧组造模后7 d时AST也明显较低;造模后96 h, 7 d, 三氧组TBIL明显较低;三氧组PT明显短于中药组(造模后48 h, 72 d);三氧组AMMO明显较低(造模后24 h, 48 h);三氧组BUN明显低有显著性意义(造模后24 h)(表1)。

2.3 肝脏形态学观察 肉眼观:正常犬肝脏呈红褐色、质软而脆。模型对照组注药造模后肝脏体积缩小,肝表面有块状瘀斑,包膜皱缩,有腹水,肠系膜静脉和胃底静脉曲张。中药组及三氧组的肝脏体积缩小不明显,瘀斑少,包膜完好。

显微镜下检查:正常犬肝小叶结构完整,肝细胞呈索状排列,形态正常。注药造模后14 d,模型对照组肝索紊乱,汇管区胆管增生,肝细胞呈弥漫性浊肿,片状坏死、嗜酸性变、肝内淤胆,部分区域肝窦扩张,充血,汇管区炎性细胞浸润。与模型对照组相比,中药组和三氧组的肝组织病理变化程度轻、病灶范围小,肝细胞气球样变和脂肪变性明显(图1)。

3 讨论

本实验采用醋氨酚多点皮下注射法建立犬急性中毒性肝衰竭模型^[6],其作用机制为过量的醋氨酚由P450混合功能氧化酶转化为N2乙酰2苯醌亚胺,苯醌亚胺可使血红蛋白氧化成三价铁的高铁血红蛋白,在此过程中,生成大量的氧自由基。同时,胺类和醌类化合物也能间接和直接产生超氧阴离子。因此认为醋氨酚犬急性中毒性肝衰竭主要为氧自由基导致^[7]。醋氨酚犬中毒主要表现为嗜睡或烦躁、摄食量减少、呕吐、黄疸、伤口出血难止等肝严重损害(肝衰竭)表现。以上表现及血液指标变化在第一次注射后48-72 h最为明显。中药组尤其是医用三氧组在该段时间血液指标显示出明确的保护作用。

医用三氧应用于疾病治疗已有近50 a历史^[8]。随着对三氧的作用机制研究积累,现已部分明确了三氧具有某些特殊的生物学与药理学特性^[1-5]:(1)增加红细胞代谢,改善微循环;(2)作为强氧化物可诱导激活组织细胞产生抗氧化酶,

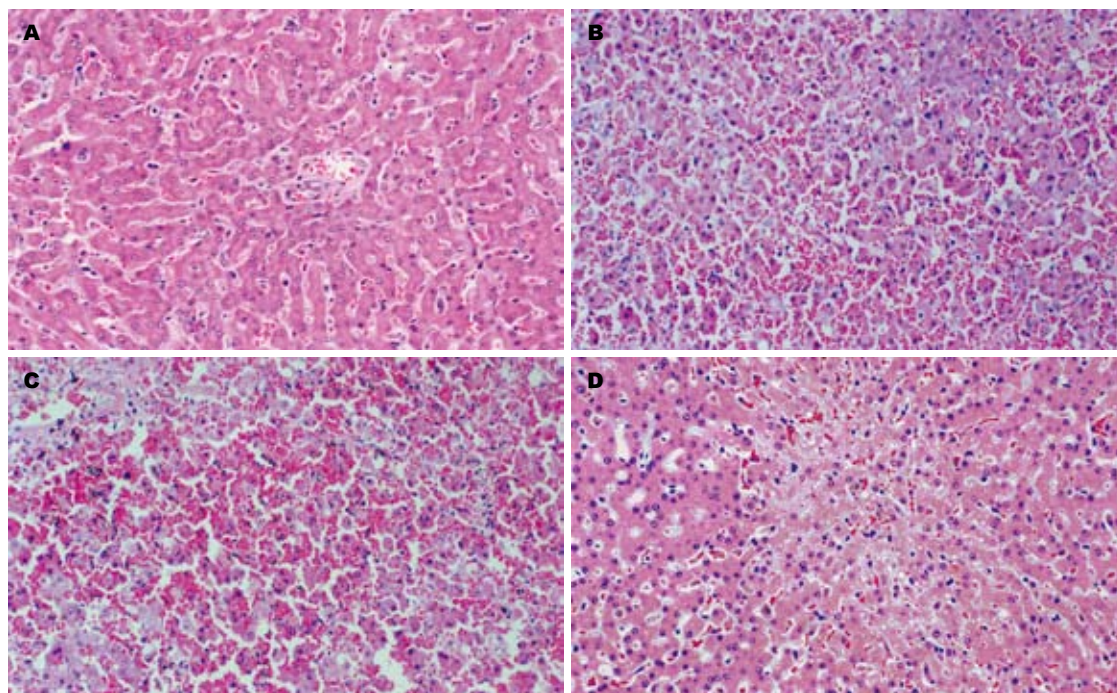


图 1 各组犬肝组织的显微镜检查(HE × 200). A: 正常犬; B: 模型对照组醋氨酚中毒犬; C: 中药组醋氨酚中毒犬; D: 三氧组醋氨酚中毒犬肝组织.

■应用要点

本研究为医用三氧及中药护肝方在临床中对药物性肝损伤的预防应用提供了实验依据. 医用三氧及中药护肝方有可能成为预防药物性肝炎的新方法. 其临床疗效有待在临床试验研究中证实.

增强组织细胞清除自由基的能力; (3)低浓度三氧具有免疫激活和调节活性. 近年医用三氧已应用于肝炎和自身免疫性疾病的治疗尝试. 本动物实验显示, 三氧能有效地减轻实验犬肝功能损害程度. 推测其作用是三氧通过直肠吸收经门脉到肝脏和肾脏等组织器官, 改善组织器官的微循环, 激活组织细胞产生抗氧化酶系统, 例如超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽-S-转移酶(GSTs)、过氧化氢酶等, 使组织细胞清除氧自由基能力增强, 抵抗醋氨酚肝肾组织毒性, 显示出减轻醋氨酚肝肾损伤作用.

护肝方是经验方, 方中甘微温之黄芪为主药, 补中益气, 党参补气生津养血, 白术补气健脾燥湿, 与黄芪相配, 加强补脾益气之功, 甘苦寒之生地黄清热凉血, 养阴生津, 甘微温之熟地黄补血滋阴, 益精填髓, 丹参活血凉血, 白花蛇舌草与板蓝根清热解毒. 八药相配, 共奏益气解毒, 凉血活血之功效, 其组方依据符合中医对肝衰竭热瘀相搏本质的认识^[9-11]. 实验显示本方对肝脏具有良好的预防性保护作用, 能够有效减轻醋氨酚所致犬急性中毒性肝衰竭的肝功能损害, 降低血氨和缩短PT.

在中药给药方式上, 本实验中药采用灌肠给药, 由于直肠静脉通过门静脉进入肝脏, 药物不经胃酸及消化酶破坏, 同时可避免药物久服

败胃的缺点^[12], 避免加重上消化道症状.

当前药物性肝炎的治疗主要是祛除病因治疗, 即停用肝损害药物, 并施以“保肝”治疗药物(多为中药提取物、中成药^[10,13-14]或还原型谷胱甘肽制剂^[15]). 但是, 临床实践中很多情况下例如肿瘤化疗、器官移植后的免疫抑制等药物, 即使出现肝损害也是不能停用这些损肝药物的. 此种情况下, 就须考虑寻找能够预防药物性肝损害的方法. 当前大量“保肝”治疗药物并不具备预防性应用肝脏保护作用. 本动物实验结果显示, 医用三氧及中药护肝方直肠灌注应用能够预防某些药物性肝损伤, 为其临床预防应用提供了实验依据. 医用三氧及中药护肝方有可能成为预防药物性肝炎的新方法. 临床疗效有待在临床试验研究中证实.

4 参考文献

- 1 Bocci V, Paulesu L. Studies on the biological effects of ozone 1. Induction of interferon gamma on human leucocytes. *Haematologica* 1990; 75: 510-515
- 2 Peralta C, Xaus C, Bartrons R, Leon OS, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Effect of ozone treatment on reactive oxygen species and adenosine production during hepatic ischemia-reperfusion. *Free Radic Res* 2000; 33: 595-605
- 3 Larini A, Bocci V. Effects of ozone on isolated peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol In Vitro* 2005; 19: 55-61
- 4 Torossian A, Ruehlmann S, Eberhart L, Middeke M, Wulf H, Bauhofer A. Pre-treatment with ozonized

■同行评价

尽管药物性肝炎问题日益突出,但迄今尚无预防药物性肝炎的有效方法。医用三氧具有其特殊生物药理学特点。本文应用中药护肝方及医用三氧对急性中毒性肝衰竭犬的预防性治疗作用。文章有较好的科学性、创新性和可读性,能较好地本领域基础研究的先进水平。

- oxygen (O₃) aggravates inflammation in septic rats. *Inflamm Res* 2004; 53 Suppl 2: S122-125
- 5 Bocci V. Ozone as a bioregulator. Pharmacology and toxicology of ozonotherapy today. *J Biol Regul Homeost Agents* 1996; 10: 31-53
- 6 赵世峰, 薛毅琰, 李新建. 醋氨酚诱发犬急性肝损害模型的建立. *中华实验外科杂志* 2000; 17: 192
- 7 程永波, 王英杰, 刘俊, 李嘉佳, 谭朝霞, 丁世涛, 雷娟. 醋氨酚对犬的多器官损伤及原因分析. *第三军医大学学报* 2004; 26: 1381-1384
- 8 何晓峰, 李彦豪. 臭氧治疗: 历史、现状与未来. *中国介入影像与治疗学* 2005; 2: 389-392
- 9 陈卫平, 刘涛, 王灿晖. 热瘀相搏是重型肝炎病理变化的关键探析. *中医医学刊* 2003; 21: 1240-1241
- 10 熊章鄂, 但自力, 唐望先, 严红梅. 中药肝炎平对CCl₄

- 诱导的肝纤维化大鼠TGFβ₁/Smad信号通路的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 152-157
- 11 毛德文, 李兴刚. 肝衰竭的中医证治浅识. *湖南中医药导报* 2003; 9: 6-7
- 12 党中勤, 武西芳, 吴秀霞. 中医多途径给药为主治疗重型肝炎46例分析. *中医医学刊* 2003; 21: 152-153
- 13 于仲青, 杨宝山, 王岩, 陈立艳, 毕蔓茹, 王福祥, 马英骥. 复方甘草酸苷对暴发性肝衰竭患者的保护作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1318-1322
- 14 杨宝山, 陈立艳, 马英骥, 毕蔓茹. 甘草酸苷对小鼠暴发性肝损伤细胞凋亡的抑制作用. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 325-329
- 15 陈尊杰, 谢汉彬, 吴少仪, 黄俊明, 郑淑芳, 黄钥藩. 促肝细胞生长素联合还原型谷胱甘肽治疗抗结核药物性肝损伤. *广东医学* 2006; 27: 1255-1256

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第十九届全国中西医结合消化会议征文通知

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

1 征文内容和要求

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

2 学习班招收对象

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

3 联系方式

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

缺血预处理对高原大鼠肝脏缺血/再灌注损伤早期的影响

朱应乾, 覃云, 王茂旭, 杜富波, 刘厚东, 李素芝

朱应乾, 王茂旭, 杜富波, 刘厚东, 李素芝, 西藏军区总医院
普通外科 西藏自治区拉萨市 850003

覃云, 西双版纳州公安边防支队机动大队 云南省西双版纳
州 666108

通讯作者: 朱应乾, 850003, 西藏自治区拉萨市娘热北路66号,
西藏军区总医院普通外科. zyqwxh@163.com

电话: 0891-6280143

收稿日期: 2006-09-11 接受日期: 2006-11-16

Influence of ischemic preconditioning on early hepatic I/R injury in rats at high altitude

Ying-Qian Zhu, Yun Qin, Mao-Xu Wang, Fu-Bo Du, Hou-Dong Liu, Su-Zhi Li

Ying-Qian Zhu, Mao-Xu Wang, Fu-Bo Du, Hou-Dong Liu, Su-Zhi Li, Department of General Surgery, General Hospital of Tibet Military Command, Lhasa 850003, Tibet Autonomous Region, China

Yun Qin, Mobile Military Unit of Xishuangbanna Public Security Frontier Defence Detachment, Xishuangbanna 666108, Yunnan Province, China

Correspondence to: Ying-Qian Zhu, Department of General Surgery, General Hospital of Tibet Military Command, 66 Niangre North Road, Lhasa 850003, Tibet Autonomous Region, China. zyqwxh@163.com

Received: 2006-09-11 Accepted: 2006-11-16

Abstract

AIM: To find out the protective effect and mechanism of ischemic preconditioning (IPC) on early hepatic ischemia-reperfusion (I/R) injury in rats at high altitude.

METHODS: A total of 45 Sprague Dawley rats were divided into the sham operation, I/R and IPC group. The rats were sacrificed 1, 3, and 6 hours after reperfusion. The level of serum alanine aminotransferase (ALT, nkat/L), malondialdehyde (MDA, mmol/L) and nitric oxide (NO, $\mu\text{mol/L}$) were detected.

RESULTS: The level of serum NO in IPC group was significantly higher than that in I/R group (1 h: 95.8 ± 10.1 vs 64.2 ± 6.8 , $P < 0.01$; 3 h: 91.2 ± 9.7 vs 69.5 ± 7.2 , $P < 0.01$; 6 h: 77.4 ± 8.6 vs 63.7 ± 6.1 , $P < 0.01$), but lower than that in sham operation group. However, the levels of serum ALT (1

h: 2257.1 ± 201.7 vs 2912.2 ± 398.4 , $P < 0.01$; 3 h: 2465.5 ± 243.4 vs 3637.4 ± 441.8 , $P < 0.01$; 2545.5 $\pm$ 223.4 vs 4027.5 $\pm$ 496.8, $P < 0.01$) and MDA (1 h: 25.1 ± 4.3 vs 38.7 ± 7.6 , $P < 0.01$; 3 h: 27.5 ± 5.4 vs 45.3 ± 8.8 , $P < 0.01$; 34.2 $\pm$ 6.7 vs 53.2 $\pm$ 10.5, $P < 0.01$) in IPC group were significantly lower than those in I/R group, while they were higher than those in sham operation group.

CONCLUSION: IPC may protect liver tissues against I/R injury in rats at high altitude, and the mechanism is associated with the improvement of microcirculation resulted from the inhibition of lipid peroxidation and increase of endogenous NO.

Key Words: Ischemic preconditioning; Ischemia-reperfusion; Hepatic injury; Rat; High altitude

Zhu YQ, Qin Y, Wang MX, Du FB, Liu HD, Li SZ. Influence of ischemic preconditioning on early hepatic I/R injury in rats at high altitude. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(3):287-289

摘要

目的: 了解在高原缺血预处理(IPC)对肝脏缺血/再灌注损伤(I/R)早期保护作用及其机制。

方法: SD大鼠45只随机分为3组: 假手术组、缺血再灌注组、缺血预处理组。各组恢复血流后分别于1, 3, 6 h取血液标本, 检测血清ALT (nkat/L)、丙二醛(MDA, mmol/L)、NO ($\mu\text{mol/L}$)的含量。

结果: 缺血预处理组NO的水平明显高于缺血再灌注组(1 h: 95.8 ± 10.1 vs 64.2 ± 6.8 , $P < 0.01$; 3 h: 91.2 ± 9.7 vs 69.5 ± 7.2 , $P < 0.01$; 6 h: 77.4 ± 8.6 vs 63.7 ± 6.1 , $P < 0.01$), 低于假手术组; 而ALT(1 h: 2257.1 ± 201.7 vs 2912.2 ± 398.4 , $P < 0.01$; 3 h: 2465.5 ± 243.4 vs 3637.4 ± 441.8 , $P < 0.01$; 2545.5 $\pm$ 223.4 vs 4027.5 $\pm$ 496.8, $P < 0.01$)、MDA(1 h: 25.1 ± 4.3 vs 38.7 ± 7.6 , $P < 0.01$; 3 h: 27.5 ± 5.4 vs 45.3 ± 8.8 , $P < 0.01$; 34.2 $\pm$ 6.7 vs 53.2 $\pm$ 10.5, $P < 0.01$)明显低于缺血再灌注组, 高于假手术组。

■背景资料

肝脏缺血再灌注损伤是常见的临床问题, 其损伤因素远超过机体自身的保护能力, 所以在临床中有必要通过外界干预来减少损伤因素或增强机体的保护能力, 从而减少肝脏缺血再灌注损伤。目前在肝脏外科手术中最简单、有效的外界干预来减少肝脏缺血再灌注损伤的方法是缺血预处理。而目前缺血预处理对肝脏再灌注损伤的保护具体机制还不十分明确, 尤其是在高原缺氧的环境下, 对肝脏缺血再灌注损伤报道较少。

■同行评价

本文通过设计在海拔为3658 m的环境下对大鼠肝脏缺血再灌注处理,了解肝脏缺血再灌注损伤早期MDA, ALT, NO的变化,初步探讨其对肝脏缺血再灌注损伤的保护作用及其机制。实验设计合理,有较高的学术价值。

结论:在高原缺氧环境下,缺血预处理对大鼠肝脏缺血再灌注损伤有明显保护作用,其机制可能与缺血与预处理抑制肝脏脂质过氧化物的产生,提高内源性NO的产生,改善肝脏的微循环有关。

关键词:缺血预处理; 缺血再灌注; 肝脏损伤; 大鼠; 高原

朱应乾, 覃云, 王茂旭, 杜富波, 刘厚东, 李素芝. 缺血预处理对高原大鼠肝脏缺血/再灌注损伤早期的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(3):287-289

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/287.asp>

0 引言

缺血再灌注损伤(I/R)是指缺血器官细胞损伤在恢复血供之后更加加重的现象。目前有大量的动物实验及少量的临床研究表明缺血预处理(IPC)对缺血/再灌注肝脏有保护作用,但其作用机制还不十分清楚。本实验旨在初步探讨高原缺氧环境下IPC对大鼠肝脏I/R的保护作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 材料 MDA, NO试剂盒(南京建成生物工程研究所)。SD大鼠购自西南民族学院实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 SD大鼠45只, 体重为180-230 g, 雌雄不拘, 在高原环境(海拔3658 m)饲养14 d后随机分成3组, 即假手术组(I组); 缺血再灌注组(II组): 持续阻断60 min, 再灌注1, 3, 6 h; 缺血预处理组(III组): 先缺血5 min, 再灌注5 min, 反复一次, 再行I/R。

1.2.2 模型制备 实验鼠术前12 h禁食、不禁水, 200 g/L乌拉坦1000 mg/kg腹腔注射麻醉, 消毒术野, 经上腹正中切口进腹, 分离肝十二指肠韧带, 充分暴露肝门部, I组不再行任何处理关腹; II组和III组用无创血管夹阻断肝左、中叶的血管胆管蒂, 造成肝实质缺血。预定阻断时间到后移去血管夹, 缝合腹壁切口。

1.2.3 标本处理及检测 在预定时间经心脏穿刺取血, 室温下静置12 h, 低温离心机3000 r/min离心10 min后取血清, 用自动生化分析仪测ALT活性; 用MDA, NO试剂盒测定MDA, NO的活性。

统计学处理 数据以mean±SD表示, 采用SPSS10.0软件对数据作单向方差分析。

2 结果

假手术组ALT的活性明显低于缺血预处理组和缺血再灌注组($P<0.01$); 缺血再灌注组明显高于缺血预处理组($P<0.01$)。假手术组MDA的活性明显低于缺血预处理组和缺血再灌注组($P<0.01$); 缺血再灌注组明显高于缺血预处理组($P<0.01$)。缺血再灌注组NO的活性明显低于缺血预处理组和假手术组($P<0.01$)(表1)。

3 讨论

肝脏I/R损伤是常见的临床问题, 其损伤因素远超过机体自身的保护能力, 所以在临床中有必要通过外界干预来减少损伤因素或增强机体的保护能力, 从而减少肝脏I/R。目前在肝脏外科手术中最简单、有效的外界干预来减少肝脏I/R损伤的方法是缺血预处理。而目前缺血预处理对肝脏再灌注损伤的保护具体机制还不十分明确, 尤其是在高原缺氧的环境下, 对肝脏缺血再灌注损伤研究报道较少。故本课题通过设计在海拔为3658 m的环境下对大鼠肝脏缺血预处理, 了解肝脏缺血再灌注损伤早期MDA, ALT, NO的变化, 初步探讨其对肝脏缺血再灌注损伤的保护作用及其机制。

研究表明, 肝脏I/R早期损伤主要是因缺氧、再灌注产生大量氧自由基^[1], 通过氧化反应直接导致肝细胞的损伤。MDA可以反映氧自由基攻击生物膜中的不饱和脂肪酸引发脂质过氧化作用而形成脂质过氧化物, 使组织细胞受损伤; 其活性与脂质过氧化损害的程度呈正相关。本实验结果证实缺血再灌注组MDA明显高于假手术组, 而缺血预处理组MDA明显低于缺血再灌注组。表明自由基是导致肝脏I/R早期损伤的重要因素; 而缺血预处理可以减少肝脏I/R时自由基的产生, 减轻自由基对肝脏的损伤。其机制可能与IPC提高内源性抗自由基酶类的活性有关。

目前越来越多的证据表明, 通过外界干预使内源性NO合成增加对肝脏I/R损伤有保护作用^[2-3]。NO是一种多效能的气体自由基, 是肝脏一个重要信号分子。NO既是肝细胞损伤的主要介质, 也是部分有效抗损伤保护因子。体内NO合成受到三种NO合成酶(NO synthase, NOS)基因亚型的调控^[4], 其中肝内最重要的有诱导型NOS和内皮细胞结构型NOS。诱导型NOS合成的NO在氧应激条件下加重损伤^[5], 有证据表明特异性的诱导型一氧化氮合成酶抑制剂具有保护作用。内皮细胞结构型NOS合成的NO能维持肝脏的微

表 1 各组不同时相ALT, MDA, NO的活性

分组	ALT (nkat/L)			MDA (mmol/L)			NO (μmol/L)		
	1 h	3 h	6 h	1 h	3 h	6 h	1 h	3 h	6 h
I 组	905.2 ± 125.0 ^b	976.9 ± 131.7 ^b	361.8 ± 113.4 ^b	8.7 ± 1.9 ^b	7.9 ± 1.6 ^b	8.4 ± 2.0 ^b	98.4 ± 10.6	96.2 ± 9.8	94.1 ± 9.3
II 组	2912.2 ± 398.4 ^d	3637.4 ± 441.8 ^d	4027.5 ± 496.8 ^d	38.7 ± 7.6 ^d	45.3 ± 8.8 ^d	53.2 ± 10.5 ^d	64.2 ± 6.8 ^f	69.5 ± 7.2 ^f	63.7 ± 6.1 ^f
III 组	2257.1 ± 201.7	2465.5 ± 243.4	2545.5 ± 223.4	25.1 ± 4.3	27.5 ± 5.4	34.2 ± 6.7	95.8 ± 10.1	91.2 ± 9.7	77.4 ± 8.6

^bP<0.01 vs II 组, III 组; ^dP<0.01 vs III 组; ^fP<0.01 vs I 组, III 组.

循环, 对肝脏I/R起到保护作用, 实验表明凡是抑制内皮型一氧化氮合成酶的物质都可以减少微循环的血流灌注、加重肝脏的损伤。

本实验结果显示缺血预处理组的ALT比缺血再灌注组明显降低, 而NO水平明显较缺血再灌注组增加, 表明在肝脏I/R早期通过缺血预处理能增加内皮细胞结构型NOS合成的NO, 起到保护作用。其机制可能通过NO扩张肝血窦, 改善肝循环; 另外通过肝脏缺血预处理后, 肝组织中腺苷含量增加, 而NO可调节腺苷的释放^[6], 通过NO的介导腺苷可以抑制白细胞黏附, 减少黏附分子表达, 干扰白细胞与血管内皮细胞的相互作用, 对肝脏缺血起保护作用^[7]。

缺血预处理是一种在肝脏外科中实用和有效的降低I/R损伤措施。但在高原缺氧条件下, 临床应用较少, 其主要原因是目前对其在缺氧环境下的机制研究较少, 具体机制还不很清楚。故有待于进一步研究, 包括在高原最适宜的缺血预处理时间。

4 参考文献

1 Sahin M, Avsar FM, Ozel H, Topaloglu S, Yilmaz B,

- Pasaoglu H, Avunduk MC, Erikoglu M, Hengirmen S. The effects of dimethyl sulfoxide on liver damage caused by ischemia-reperfusion. *Transplant Proc* 2004; 36: 2590-2592
- Park WH, Lee SK, Kim CH. A Korean herbal medicine, Panax notoginseng, prevents liver fibrosis and hepatic microvascular dysfunction in rats. *Life Sci* 2005; 76: 1675-1690
- Serracino-Inglott F, Virlos IT, Habib NA, Williamson RC, Mathie RT. Differential nitric oxide synthase expression during hepatic ischemia-reperfusion. *Am J Surg* 2003; 185: 589-595
- Thalmann S, Jayet PY, Duplain H, Turini P, Sartori C, Vollenweider P, Scherrer U. NO, a major regulator of metabolic and cardiovascular homeostasis. *Rev Med Suisse Romande* 2004; 124: 639-641
- Vodovotz Y, Kim PK, Bagci EZ, Ermentrout GB, Chow CC, Bahar I, Billiar TR. Inflammatory modulation of hepatocyte apoptosis by nitric oxide: *in vivo*, *in vitro*, and *in silico* studies. *Curr Mol Med* 2004; 4: 753-762
- McKie LD, Bass BL, Dunkin BJ, Harmon JW. Nitric oxide mediates the blood flow response to intravenous adenosine in the rabbit. *Circ Shock* 1994; 43: 103-106
- Bouma MG, van den Wildenberg FA, Buurman WA. The anti-inflammatory potential of adenosine in ischemia-reperfusion injury: established and putative beneficial actions of a retaliatory metabolite. *Shock* 1997; 8: 313-320

电编 张敏 编辑 张焕兰

糖尿病胃轻瘫的诊断及发病机制

刘云, 孙岩, 薛绮萍, 李建民

■背景资料

糖尿病是一种严重影响生活质量, 能够引起多种致命并发症的疾病, 目前在全世界范围内发病普遍。糖尿病胃轻瘫是糖尿病患者常见的并发症, 其发病机制仍不是很清楚, 目前有关诊断方法诊断标准也不统一。

刘云, 孙岩, 薛绮萍, 南京医科大学第一临床医学院老年医学科 江苏省南京市 210008

李建民, 南京医科大学细胞生物学系 江苏省南京市 210029

江苏省教委自然科学基金资助项目, No. 01KJB320009

通讯作者: 李建民, 210029, 江苏省南京市鼓楼区汉中140号, 南京医科大学细胞生物学系, jianminli@njmu.edu.cn

电话: 025-86863153 传真: 025-86204389

收稿日期: 2006-10-26 接受日期: 2006-11-16

Diagnosis and pathogenic mechanism of diabetic gastroparesis

Yun Liu, Yan Sun, Qi-Ping Xue, Jian-Min Li

Yun Liu, Yan Sun, Qi-Ping Xue, Department of Geratology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Jian-Min Li, Department of Cell Biology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by the Natural Science Foundation of Education Committee of Jiangsu Province, No. 01KJB320009

Correspondence to: Jian-Min Li, Department of Cell Biology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. jianminli@njmu.edu.cn

Received: 2006-10-26 Accepted: 2006-11-16

Abstract

AIM: To evaluate the clinical diagnosis and explore the pathogenic mechanisms of diabetic gastroparesis.

METHODS: A total of 38 in-hospital patients with diabetes were included in this study. Biochemical method and radioimmunoassay (RIA) were used to detect the levels of plasma glucoses, glycosylated hemoglobin (GHG), gastrin, motilin and glucagons. The autonomic nerve function and barium strip emptying time were used to make diagnosis of diabetic gastroparesis.

RESULTS: The levels of fast blood glucose (FBG), postprandial blood glucose (PBG) and GHG were significantly higher in diabetic patients with abnormal gastric emptying than those with normal gastric emptying (FBG: 12.53 ± 4.13 mmol/L vs 7.12 ± 1.37 mmol/L, $P < 0.01$; PBG: 19.79 ± 5.69 mmol/L vs 14.11 ± 4.21 mmol/L, $P < 0.05$; GHG: $9.73\% \pm 2.39\%$ vs $7.26\% \pm 1.96\%$, $P < 0.05$). Meanwhile, high levels of serum mo-

tilin, gastrin, and glucagons were detected in diabetic patients with abnormal gastric emptying. The occurrence rate of autonomic nerve function abnormality was 62% (13/21) in diabetic patients with abnormal gastric emptying, obviously higher than that in those with normal gastric emptying (24%, 4/17). The barium strip emptying time was significantly prolonged in patients with diabetic gastroparesis (7.93 ± 1.23 h vs 4.35 ± 1.01 h, $P < 0.001$).

CONCLUSION: Diabetic gastroparesis can be diagnosed by grading clinical symptom, examining plasma glucoses, gastrin, motilin and glucagons, evaluating autonomic nerve function and barium emptying time. Hyperglycaemia, gut hormone abnormality, neuropathy, microangiopathy, and metabolic disorder participate in the development of diabetic gastroparesis.

Key Words: Clinical symptom grading; Gut hormone; Small barium emptying experiment; Diabetic gastroparesis

Liu Y, Sun Y, Xue QP, Li JM. Diagnosis and pathogenic mechanism of diabetic gastroparesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(3):290-293

摘要

目的: 探讨糖尿病胃轻瘫的早期诊断方法并探讨其可能的发病机制。

方法: 糖尿病住院患者38例, 采用生化及放射免疫方法检测血糖、糖化血红蛋白、胃动素、胃泌素、胰高血糖素水平。以患者卧立位肱动脉收缩压变化检查植物神经功能; 并采用标准餐加服小钡条试验, 记录排空时间, 以胃排空时间 >6 h诊断为胃轻瘫。

结果: 糖尿病胃排空异常者与胃排空正常者相比其空腹血糖(12.53 ± 4.13 mmol/L vs 7.12 ± 1.37 mmol/L, $P < 0.01$)、餐后血糖(19.79 ± 5.69 mmol/L vs 14.11 ± 4.21 mmol/L, $P < 0.05$)及糖化血红蛋白($9.73\% \pm 2.39\%$ vs $7.26\% \pm 1.96\%$, $P < 0.05$)明显升高, 同时具有高水平的血清胃动素、胃泌素及胰高血糖素。糖

尿病胃排空异常者植物神经功能异常发生率为62%(13/21), 而糖尿病胃排空正常者为24%(4/17), 糖尿病胃排空异常者胃内小钡条排空时间较正常者明显延长(7.93 ± 1.23 h vs 4.35 ± 1.01 h, $P < 0.001$).

结论: 采用临床症状评分、血糖及胃肠道激素等监测及影像学检查可诊断糖尿病胃轻瘫, 糖尿病胃轻瘫与神经病变、高血糖、血清胃肠激素异常、微血管病变及代谢紊乱有关.

关键词: 症状评分; 胃肠道激素; 小钡条排空试验; 糖尿病胃轻瘫

刘云, 孙岩, 薛锦萍, 李建民. 糖尿病胃轻瘫的诊断及发病机制. 世界华人消化杂志 2007;15(3):290-293
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/290.asp>

0 引言

糖尿病是一种严重影响生活质量, 能够引起多种致命并发症的疾病, 目前在全世界范围内发病普遍. 糖尿病胃轻瘫是由于胃肠运动功能障碍所致胃排空功能受损, 他的发生不仅可明显影响患者食物的吸收和消化, 还因影响口服药物的吸收而给糖尿病的治疗带来极大的干扰^[1]. 他可能是自主神经功能障碍、胃肠激素分泌异常、高血糖、平滑肌损害以及微血管病变等因素的综合影响的结果^[2-3]. 本文对糖尿病患者作常规症状评分, 植物神经功能检查和小钡条胃排空试验及胃肠道激素水平测定, 对糖尿病胃轻瘫患者进行早期诊断并进一步探讨其发病机制.

1 材料和方法

1.1 材料 糖尿病住院患者38例, 符合WHO糖尿病诊断标准, 其中男15例, 女23例, 年龄39-75(平均 55.2 ± 11.8)岁, 糖尿病史6 mo-28 a. 所有患者均已排除胃炎、胃溃疡、胆囊炎、胆石症、胰腺炎, 排除有结肠激惹综合征或腹部外科手术史. 在患者接受检查期间, 治疗糖尿病的药物尽量不作调整, 禁服一切影响胃动力药物.

1.2 方法

1.2.1 全面体格检查及生化检查、放免检查, 包括血糖、胰岛素水平、糖化血红蛋白、胃动素、胃泌素、胰高血糖素等.

1.2.2 症状评分 分别对早饱、厌食、返酸、上腹饱胀、上腹疼痛、恶心呕吐等6个症状按强度以划分: 0分 = 无症状, 1分 = 上述任一症状可

感觉, 但不影响日常活动; 2分 = 上述任一症状明显感觉, 且已影响日常活动; 3分 = 上述任一症状已很严重, 严重影响日常生活. 依次按上述6个症状对患者评分.

1.2.3 植物神经功能检查 卧立位肱动脉收缩压改变, 正常 ≤ 10 mmHg, 临界11-29 mmHg, 异常者 ≥ 30 mmHg; 深呼吸时R-R改变, 坐位时深呼吸每分钟6次(每次呼气5 s, 吸气5 s, 测定最大和最小R-R间期, 并换算成心率, 分每分钟平均最大心率和最小心率, 计算差值. 正常 $> 15/\text{min}$, 临界11-14次/min, 异常 $\leq 10/\text{min}$).

1.2.4 胃排空试验 试验前禁食10 h, 晨7点30分进食标准餐^[4], 在15 min内进食完毕, 随即服用装有10根小钡条的胶囊(由西安杨森公司提供). 标准餐进食后1, 2, 4, 6 h仰卧位摄片记录各小时小钡条在胃内的数量(若在十二指肠内亦算在胃中). 若6 h后仍有钡条在胃内, 则不管数量多少延长到8 h为止. 记录排空时间. 观察期间不进食食物及水分[附: 标准餐: 水400 mL, 熟面食80 g, 荷包蛋50 g(1只), 花生仁20 g]. 判断标准: 胃排空时间 > 6 h为胃轻瘫.

统计学处理 全部资料均采用Access数据库与Excel分析软件进行统计学分析, 所有结果均用均数 $\pm$ 标准差表示, 采用配对 t 检验分析.

2 结果

受试糖尿病患者以上腹饱胀及早饱为胃肠道主要症状, 其中上腹饱胀的发生率为55%(21/38), 早饱为29%(11/38), 厌食为24%(9/38), 返酸为11%(4/38), 上腹疼痛为8%(3/38), 恶心呕吐为18%(7/38). 胃排空异常者与胃排空正常者相比具有病程长、血糖控制差、植物神经功能异常发生率高及症状评分高等特点(表1), 其胃排空时间明显延长. 相关激素检测结果表明胃排空异常者空腹及餐后胃泌素、胃动素及胰高血糖素水平明显升高(表2).

3 讨论

糖尿病胃轻瘫(diabetic gastroparesis)是糖尿病患者常见的并发症, 主要原因是由于糖尿病未得到良好控制及高血糖所导致的动力障碍, 表现为平滑肌的收缩力减低, 胃蠕动减弱, 胃窦无张力和排空延迟, 而幽门收缩时间延长, 临床表现为早饱、恶心、发作性呕吐、腹部不适、腹胀等症群, 主要特点是胃扩张、胃蠕动减慢和排空延迟^[3]. Kassander *et al*于1958年首先提出“糖

■应用要点

本文采用小钡条胃排空试验, 同时将症状评分、植物神经功能检查、胃肠道激素(胃动素、胃泌素、胰高血糖素)水平测定等方法结合起来作为早期确诊糖尿病合并胃动力障碍的主要方法, 具有准确、非侵入, 简单, 安全性较高的特点, 具有较好的临床指导意义, 并为今后阐明糖尿病胃轻瘫的发病机制和潜在的治疗途径提供一定的帮助.

■同行评价

本文对糖尿病患者作常规症状评分,植物神经功能检查和小钡胃排空试验及胃肠道激素水平测定,对糖尿病胃轻瘫患者进行早期诊断并进一步探讨了发病机制。文章具有较高的临床价值。

表 1 胃排空异常者与胃排空正常者各指标比较(mean ± SD)

	胃排空异常组(n = 21)	胃排空正常组(n = 17)	P值
胃排空时间(h)	7.93 ± 1.23	4.35 ± 1.01	<0.001
症状评分	11.40 ± 3.10	5.61 ± 4.30	<0.001
植物神经功能检查异常	13	4	<0.001
病程(a)	12.11 ± 10.39	4.98 ± 1.94	<0.05
年龄(岁)	58.10 ± 7.96	53.71 ± 8.67	>0.05
FBS(mmol/L)	12.53 ± 4.13	7.12 ± 1.37	<0.01
PBS(mmol/L)	19.79 ± 5.69	14.11 ± 4.21	<0.05
HbA _{1c} (%)	9.73 ± 2.39	7.26 ± 1.96	<0.05

“糖尿病胃轻瘫”这一概念并描述了其症状。据报道,糖尿病胃轻瘫发病率高30%-50%^[5-7]。然而,糖尿病胃轻瘫的发生率各家报道不一,这与各次研究中诊断标准及方法不同有关。放射性核素胃排空检查能确切检查液体和固体从胃排空的速度,具有非侵入性,不干扰正常生理、可定量、重复性好等特点^[4],但设备要求高,方法复杂,价格昂贵,难以在临床上广泛应用。本文采用标准餐加服固体小钡条在X线下行胃排空试验,同样具有准确、非侵入,定量等特点,同时既简单,又可重复进行,安全性较高,同时采用症状评分、植物神经功能检查、胃肠道激素水平测定等综合手段可作为早期确诊糖尿病合并胃动力障碍的主要方法。目前关于糖尿病胃轻瘫发病机制仍不是很清楚,主要认为与神经病变、高血糖、血清胃肠激素异常、微血管病变及代谢紊乱有关^[8-9]。本研究显示,糖尿病胃轻瘫患者早期可出现上腹部不适尤以上腹部饱胀为主,胃轻瘫的发生效率高达55%,与文献报道一致^[5-7],胃轻瘫组与胃排空正常组比较,胃轻瘫组有血糖高、病程长、年龄大等特点,研究表明,胃的运动、排空受血糖浓度的调节,1,2型糖尿病患者血糖浓度的增高与胃排空延缓之间互为因果关系,即血糖增高可以抑制胃排空速度,胃排空抑制又使血糖浓度不易控制,从而形成恶性循环。

胃肠激素在消化道内分布广泛,对胃肠运动具有重要的调节作用,糖尿病患者血浆胃肠激素发生了明显的改变,因此推断胃肠激素可能与糖尿病胃轻瘫发病有关^[10]。我们的研究表明,糖尿病胃轻瘫组与胃排空正常组比较具有更高的血浆胃动素水平及胃泌素水平,两组间差异存在显著性意义。胃动素是调节胃肠运动的主要激素,他能选择性引起消化间期移行复

表 2 两组胃肠道激素水平变化(mean ± SD, ng/L)

	胃排空异常组 (n = 21)	胃排空正常组 (n = 17)	P值
胃泌素			
空腹	123.88 ± 54.23	88.25 ± 39.10	<0.01
餐后	96.41 ± 31.50	83.52 ± 23.63	<0.01
胃动素			
空腹	409.20 ± 216.75	168.22 ± 73.51	<0.01
餐后	398.40 ± 187.30	153.11 ± 87.53	<0.01
胰高血糖素			
空腹	262.48 ± 127.19	160.15 ± 56.84	<0.01
餐后	270.60 ± 142.54	197.75 ± 72.10	<0.01

合运动(MMC)III相的强烈收缩,促进胃排空。目前,糖尿病胃轻瘫患者血浆胃动素水平变化的机制尚未明确,可能因为胃轻瘫患者由于胃排空延迟所致的胃潴留,胃壁持续扩张和松弛,加之食物中脂肪和蛋白质的刺激,使胃动素释放增加,血浆胃动素水平代偿性升高,但因患者存在胆碱能神经病变和高血糖等因素,影响了胃动素对胃内平滑肌的作用^[11-12]。研究已证明,胃轻瘫患者血浆胃动素水平增高,但在静脉内给胃动素又可使患者胃排空恢复正常,应用胃动素受体激动剂如红霉素治疗糖尿病胃轻瘫有较好的疗效^[13-14]。因此,糖尿病胃轻瘫患者血浆胃动素水平的增高是否还存在胃动素抵抗的问题,尚有待于进一步研究。

胃泌素的分泌受多种因素影响,糖尿病患者血糖较高、病程较长以及伴神经病变的患者胃泌素水平升高显著,这是因为胃泌素释放受迷走神经抑制性控制^[10,15]。Yamamoto *et al*^[16]报道促胃泌素可破坏自发和胃动素诱发的MMCIII期活动,使空腹样胃肠运动转变为餐后样运动。糖尿病胃轻瘫患者胃窦部缺乏MMCIII期运动。本研

究显示, 糖尿病胃排空胃轻瘫组植物神经功能异常较胃排空正常组明显升高, 伴有胃泌素水平的升高. 胰高血糖素不仅抑制胰岛素分泌, 引起高血糖, 加重其胃肠病变, 而且作为胃动力的抑制性激素, 不仅抑制胃肠蠕动, 还引起胃电节律紊乱, 本研究中胃排空异常组胰高血糖素明显升高.

糖尿病胃轻瘫概念提出已近半世纪了, 其研究工作取得了很大的进展, 但对于糖尿病胃轻瘫的发病机制, 仍无共识. 本研究借助临床症状评分、血糖、胰岛素及胃肠道激素监测及影像学等现代研究手段, 多学科协作研究将有助于阐明糖尿病胃轻瘫的发病机制和潜在的治疗途径.

4 参考文献

- 1 Abrahamsson H. Gastrointestinal motility disorders in patients with diabetes mellitus. *J Intern Med* 1995; 237: 403-409
- 2 杨禄红, 陆付耳, 董慧, 徐丽君, 王开富. 大黄素和黄连素对2型糖尿病大鼠胃肠动力的影响. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 608-611
- 3 吴波, 郑长青, 林连捷, 周卓. 糖尿病性胃肠病变患者血浆P物质和胃动素的水平及意义. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 367-368
- 4 陈文柳, 戴益琛, 戴禄寿. 功能性消化不良胃镜下胃动力分型研究. *中国内镜杂志* 2000; 6: 64-65
- 5 Jones KL, Russo A, Stevens JE, Wishart JM, Berry MK, Horowitz M. Predictors of delayed gastric emptying in diabetes. *Diabetes Care* 2001; 24: 1264-1269
- 6 陆广华, 滕香宇, 任颖, 范吴强, 周岷, 刘伟. 糖尿病胃动力障碍和促胃动力药的作用. *中华内分泌代谢杂志* 2003; 19: 212-215
- 7 柯美云, 蓝宇. 糖尿病胃肠并发症的动力障碍及其机制. *中华内分泌代谢杂志* 2003; 19: 164-165
- 8 王青青, 张爱珍, 徐端珩, 张楠, 王国兴. 2型糖尿病胃轻瘫与胃肠激素的相关性. *中华内分泌代谢杂志* 2004; 20: 324-325
- 9 黄颖秋, 王昕, 李颢, 刘丽. 糖尿病患者血清一氧化氮水平与食管内pH值及食管动力变化的临床意义. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 374-376
- 10 李浩旭, 秦晓民, 鲁彦, 豆兴成. 糖尿病胃轻瘫发病机制. *胃肠病学和肝病学杂志* 2003; 12: 88-90
- 11 邹钢, 邵豪, 陆泽元, 丁玉珍, 陈观榕, 傅娟. 糖尿病患者血糖与胃泌素、胃动素、生长抑素相互关系的初步探讨. *海南医学* 2005; 16: 1-2
- 12 孔维, 孙侃. 胃肠激素与糖尿病结肠功能紊乱. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 519-521
- 13 Frazee LA, Mauro LS. Erythromycin in the Treatment of Diabetic Gastroparesis. *Am J Ther* 1994; 1: 287-295
- 14 朱瑞平, 邓长生, 朱尤庆. 老年2型糖尿病患者胃液体排空与胃泌素、胃动素、生长抑素的关系. *武汉大学学报(医学版)* 2003; 24: 268-269
- 15 吴慧萍, 陆红. 糖尿病胃轻瘫患者血清生长抑素改变及意义. *实用诊断与治疗杂志* 2006; 20: 330-332
- 16 Yamamoto O, Matsunaga Y, Shiba Y, Haga N, Sano I, Itoh Z. Inhibition of motilin-induced phase III contractions by pentagastrin in Heidenhain pouch dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 271: 1471-1476

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中国学术期刊综合引证报告(2006)

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

内镜下经皮胃造瘘对老年患者生活质量的影响

许乐, 罗庆锋

■背景资料

对那些吞咽功能丧失或吞咽困难而消化道功能正常的患者, 管饲营养是一种常用的方法。传统的胃造瘘术需要麻醉及开腹放置胃造瘘管, 既增加患者痛苦也增加了手术风险。内镜下经皮胃造瘘(PEG)具有操作简单, 只需局部麻醉, 安全, 并发症少的特点。能在体质差、营养情况差、危重患者进行该项治疗, 改善患者的营养状况。PEG已在欧美、日本等国家广泛开展, 并替代外科胃造瘘。在我国PEG也正在开展。

许乐, 罗庆锋, 卫生部北京医院消化内科 北京市 100730
通讯作者: 许乐, 100730, 北京市东单大华路1号, 北京医院消化内科. xule7200@hotmail.com
电话: 010-85136143
收稿日期: 2006-10-10 接受日期: 2006-11-10

Effect of percutaneous endoscopic gastrostomy on life quality of elderly patients

Le Xu, Qing-Feng Luo

Le Xu, Qing-Feng Luo, Department of Gastroenterology, Beijing Hospital, Ministry of Health, Beijing 100730, China
Correspondence to: Le Xu, Department of gastroenterology, Beijing hospital, 1 Dahua Road, Dongdan, Beijing 100730, China. xule7200@hotmail.com
Received: 2006-10-10 Accepted: 2006-11-10

Abstract

AIM: To evaluate the safety and efficacy of percutaneous endoscopic gastrostomy (PEG) in the treatment of elderly patients with dysphagia.

METHODS: A total of 32 elderly patients dysphagia were treatment with PEG after nasogastric tube feeding, and the results were comparatively analyzed.

RESULTS: PEG was successfully performed in all of the patients under local anesthesia. Only 1 patient developed procedure-related infection which was rapidly controlled by antibiotics. PEG was more easily accepted than nasogastric tube feeding. The occurrence rates of aspiration pneumonia and reflux esophagitis (15.6% vs 46.8%, $P < 0.05$) were lower after PEG than those after nasogastric tube feeding.

CONCLUSION: PEG was safe and effective in the treatment of patients with dysphagia, and it is superior to tube feeding in decreasing aspiration pneumonia and reflux esophagitis.

Key Words: Percutaneous endoscopic gastrostomy; Elderly patient; Quality of life

Xu L, Luo QF. Effect of percutaneous endoscopic

gastrostomy on life quality of elderly patients. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(3):294-297

摘要

目的: 评价内镜下经皮胃造瘘(PEG)在老年患者的应用、安全性及对生活质量的影响。

方法: 对32例PEG老年患者进行回顾性分析, 采用同组对照的方法比较PEG与鼻胃管饲患者的影响。

结果: 32例老年患者均在局麻下成功进行了PEG, 仅1例发生造瘘口周围皮肤感染, 抗生素治疗后短期内恢复。PEG较鼻胃管饲患者更易于接受, 导管不易堵塞, 能降低吸入性肺炎及反流性食管炎(15.6% vs 46.8%, $P < 0.05$)的发生率, 提高生活质量。

结论: PEG是一种安全有效的治疗方法, 较鼻胃管饲能明显降低吸入性肺炎、反流性食管炎的发生率。

关键词: 内镜下经皮胃造瘘; 老年患者; 生活质量

许乐, 罗庆锋. 内镜下经皮胃造瘘对老年患者生活质量的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(3):294-297

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/294.asp>

0 引言

对老年患者因吞咽困难、吞咽机能丧失或吞咽机能受损至呛咳, 临床常采用鼻胃管饲以维持患者营养。内镜下经皮胃造瘘(PEG)是一种胃肠内营养的新方法。我院自2001年始共进行了42例PEG, 其中32例为老年人。本文采用同组自身对照的方法分析比较PEG与鼻胃管饲对老年患者生活质量的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 32例患者男24例, 女8例, 年龄61-82(平均74.6)岁。进行PEG的原因主要为脑血管病后遗症(16例, 50.0%)、帕金森氏病(7例, 21.8%)和神经性吞咽困难(6例, 18.7%), 其他原因见表1。所

有患者均在行PEG前已鼻胃管饲2 mo以上, 最长鼻胃管饲39 mo. PEG术前及PEG术后2 mo测体质量、查血红素、血白蛋白. 统计PEG术前2 mo内及PEG术后2 mo内发生吸入性肺炎的次数. 术后2 mo复查胃镜了解反流性食管炎及胃内情况.

1.2 方法 术前对口腔、牙齿、咽部进行广泛清洁. 准备同常规胃镜检查. 胃造瘘管采用Freka-PEG装置(通用型). 患者平卧于胃镜检查床, 上身及头部抬高15度, 胃造瘘部位定位于左锁骨中线, 剑突至脐上1/3处. 一名助手协助操作, 一名助手立于操作台床头, 监测脉搏、血压、血氧饱和度及保持气道通畅, 随时清除口腔分泌物. 胃镜插入胃腔后注气使胃充分膨胀, 使肝叶上移及横结肠下移, 确定胃壁及腹壁紧密接触后, 关闭胃镜室灯光, 通过腹壁观察胃镜灯光, 将胃镜灯光调整至拟造瘘部位后, 造瘘部位局部消毒、铺巾. 20 g/L普鲁卡因4 mL局部麻醉穿透腹壁至胃腔, 造瘘部位做皮肤切口约0.5 cm, 用套管针经腹壁穿刺入胃腔, 拔除针芯, 置入导丝进入胃腔, 通过胃镜活检孔放入息肉切除套圈, 抓住导丝连同胃镜一同拔出. 将导丝与胃造瘘管连接后, 从腹壁牵引导丝使胃造瘘管经口腔、食管进入胃腔. 再次插入胃镜至胃内观察造瘘管情况, 使胃造瘘管蘑菇头与胃壁紧密接触后, 腹壁局部消毒固定胃造瘘管, 并使造瘘管盘片与腹壁保持轻度紧张状态. 放置胃造瘘管前、后均使用抗生素预防感染. 造瘘后24 h禁食, 之后少量、多次逐渐增加喂食量. 每天局部消毒更换敷料一次直至造瘘口形成. 每次管饲后与30 mL净水冲洗导管, 保证导管畅通. 每次喂食抬高床头使患者处于半卧位或坐位. 喂食完毕后保持此姿势30-60 min, 以减少胃食管反流的发生.

统计学处理 采用同组自身对照以Student's方法进行统计分析.

2 结果

32例患者均成功进行了PEG. 1例术后出现低热($t < 38^{\circ}\text{C}$), 造瘘口周围皮肤局部红肿. 经抗生素治疗3 d内体温恢复正常. 未发生其他并发症. PEG与鼻胃管饲对患者的影响见表2. 术后2 mo平均体质量较术前略有增加, 但无统计学差异. 平均血红蛋白、血白蛋白无明显变化. 鼻胃管饲时分别有2例患者因外观形象问题、置换鼻胃管时不适而拒绝继续鼻饲. 自己拔出鼻胃管6例. PEG术后无1例发生上述情况. 本组患者术前

表 1 放置PEG的原因

诊断	n(%)
脑血管病后遗症	16(50.0%)
Parkinson's病	7(21.8%)
神经性吞咽困难	6(18.7%)
口腔肿瘤	2(6.2%)
贲门癌	1(3.1%)
总计	32(100%)

表 2 PEG与鼻胃管饲对患者的影响

	PEG	鼻胃管饲
平均体质量(kg)	67.1	65.4
平均血红蛋白(g/L)	104	102
平均血白蛋白(g/L)	37	35
吸入性肺炎(例次)	5 ^a	19
拒绝继续管饲	0	2
自己拔除导管	0	6

^a $P < 0.05$ vs 鼻胃管饲组.

表 3 鼻胃管饲失败发生情况

	PEG	鼻胃管饲
导管堵塞	0	6
导管脱落	0	1
置管失败	0	2

表 4 PEG与鼻胃管饲比较对反流性食管炎的影响

	PEG	鼻胃管饲
反流性食管炎	5(15.6%)	15(46.8%)
严重程度(I - II)	5(15.6%)	11(34.3%)
严重程度(III - IV)	0	4(12.5%)
总例数	32	32

■应用要点

传统的胃造瘘术需要麻醉及开腹放置胃造瘘管, 既增加病人痛苦也增加了手术风险. PEG具有操作简单, 只需局部麻醉, 安全, 并发症少的特点. 能在体质差、营养情况差、危重患者进行该项治疗, 改善病人的营养状况. PEG已在欧美、日本等国家广泛开展, 并替代外科胃造瘘.

2 mo内发生吸入性肺炎共19例次, 术后2 mo内发生吸入性肺炎仅5例次($P < 0.05$), 其中1例为不听劝告强行经口进食所致. 鼻胃管饲失败情况见表3. PEG对反流性食管炎的影响见表4. PEG后反流性食管炎严重程度较鼻胃管饲时减轻, 发生率明显减少($P < 0.05$).

3 讨论

对那些吞咽功能丧失或吞咽困难而消化道功能

■名词解释

内镜下经皮胃造瘘(PEG): 是一种胃肠内营养的新方法, 指在内镜下, 用套管针经腹壁穿刺入胃腔, 置入导丝, 引导胃造瘘管经口腔、食管进入胃腔, 从而形成的胃造瘘。

正常的患者, 管饲营养是一种常用的方法。传统的胃造瘘术需要麻醉及开腹放置胃造瘘管, 既增加患者痛苦也增加了手术风险。PEG具有操作简单, 只需局部麻醉, 安全, 并发症少的特点^[10-11]。能在体质差、营养情况差、危重患者进行该项治疗, 改善患者的营养状况。PEG已在欧美、日本等国家广泛开展, 并替代外科胃造瘘。在我国PEG也正在开展^[1-2]。PEG适应征广泛, 包括脑血管病后遗症、帕金森氏病、头颈部肿瘤等。总的说来主要适应征为那些吞咽困难或不能经口进食而胃肠功能良好的患者。PEG的禁忌症主要为操作中胃腔经充气后不能保证胃壁与腹壁紧密接触。其他为凝血功能障碍、腹膜炎、腹水、曾行胃大部切除术、腹壁肥胖影响穿刺及有幽门或肠梗阻的患者。

尽管鼻胃管饲仍为一种有效的管饲营养方法, 与PEG相比本组患者平均体质量在PEG术后虽略有增加但无统计学差异。血红蛋白、血白蛋白无明显变化。但鼻胃管饲影响患者的外观形象, 对患者心理造成不良影响。同时由于鼻胃管需每30 d换管1次造成患者痛苦, 易使患者拒绝继续管饲及自行拔管。PEG除可避免上述影响外, 只需每6 mo换管1次, 如护理得当, 可留置1 a以上。鼻胃管饲因管径小易发生堵塞, 本组共发生8例。而PEG导管内径粗不易发生堵塞。本组PEG无一例发生导管堵塞。鼻胃管且易发生导管脱落及置管失败。对脑血管病、长期卧床的老年患者, 吸入性肺炎致死率高达40%, 鼻胃管饲吸入性肺炎发生率为43%^[3]。本组PEG术后吸入性肺炎发生率显著降低($P<0.05$), 与文献[4,12]相符。但有文献报道, PEG并不能有效防止口腔分泌物、胃内容物反流所至的吸入性肺炎^[3]。对于吸入性肺炎的发生情况, 尚需更多临床资料加以证实。因长期鼻胃管饲影响贲门下括约肌功能, 易发生反流性食管炎。本组PEG术后反流性食管炎严重程度减轻, 发生率明显降低($P<0.05$)。PEG的并发症发生率低, 13%为轻微并发症, 仅3%发生严重并发症如胃穿孔、腹膜炎、胃出血, 死亡率1%^[5,8-9,13-15,17-18]。本组仅1例发生造瘘口周围皮肤感染, 经抗感染治疗短期内恢复。

虽然PEG是一项安全有效的治疗方法, 但在适应征的选择上有作者提出对那些基础疾病严重、预期寿命短暂的患者, PEG并不能为患者带来根本的利益^[6-7,16]。因此在决定实施PEG前应仔细分析患者的具体情况, 权衡利弊, 防止并发症的发生, 以给患者带来最大的利益。

4 参考文献

- 1 姚礼庆, 钟芸诗, 高卫东, 周平红, 何国杰, 徐美东, 张轶群, 陈巍峰. 经皮内镜胃造瘘和小肠造瘘术的临床应用价值. 中华胃肠外科杂志 2005; 8: 413-415
- 2 陈建, 王春明, 赵幼安, 李延青. 经皮内镜胃造瘘术10例临床分析. 中华消化内镜杂志 2001; 18: 298-299
- 3 Ciocon JO, Silverstone FA, Graver LM, Foley CJ. Tube feedings in elderly patients. Indications, benefits, and complications. *Arch Intern Med* 1988; 148: 429-433
- 4 Magne N, Marcy PY, Foa C, Falewee MN, Schneider M, Demard F, Bensadoun RJ. Comparison between nasogastric tube feeding and percutaneous fluoroscopic gastrostomy in advanced head and neck cancer patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2001; 258: 89-92
- 5 Nicholson FB, Korman MG, Richardson MA. Percutaneous endoscopic gastrostomy: a review of indications, complications and outcome. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 21-25
- 6 Verhoef MJ, Van Rosendaal GM. Patient outcomes related to percutaneous endoscopic gastrostomy placement. *J Clin Gastroenterol* 2001; 32: 49-53
- 7 Del Rio P, Dell'abate P, Soliani P, Arcuri MF, Ghirarduzzi A, Sianesi M. Complications of percutaneous endoscopic gastrostomy: a surgical experience. *G Chir* 2006; 27: 388-391
- 8 Radhakrishnan NV, Shenoy AH, Cartmill I, Sharma RK, George R, Foster DN, Quest L. Addition of local antiseptic spray to parenteral antibiotic regimen reduces the incidence of stomal infection following percutaneous endoscopic gastrostomy: a randomized controlled trial. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 1279-1284
- 9 Faia S, Cravo M, Claro I, Lage P, Nobre-Leitao C. High Rate of Percutaneous Endoscopic Gastrostomy Site Infections Due to Oropharyngeal Colonization. *Dig Dis Sci* 2006
- 10 Byrne KR, Fang JC. Endoscopic placement of enteral feeding catheters. *Curr Opin Gastroenterol* 2006; 22: 546-550
- 11 Ljungdahl M, Sundbom M. Complication rate lower after percutaneous endoscopic gastrostomy than after surgical gastrostomy: a prospective, randomized trial. *Surg Endosc* 2006; 20: 1248-1251
- 12 Suzuki Y, Urashima M, Ishibashi Y, Abo M, Mashiko H, Eda Y, Kusakabe T, Kawasaki N, Yanaga K. Covering the percutaneous endoscopic gastrostomy (PEG) tube prevents peristomal infection. *World J Surg* 2006; 30: 1450-1458
- 13 Dormann AJ, Wejda B, Kahl S, Huchzermeyer H, Ebert MP, Malferttheiner P. Long-term results with a new introducer method with gastropexy for percutaneous endoscopic gastrostomy. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1229-1234
- 14 Chen W, Kawahara H, Takahasi M, Matsushima A, Takase S. Marked pneumoperitoneum 3 weeks after percutaneous endoscopic gastrostomy. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 919-921
- 15 Mainie I, Loughrey A, Watson J, Tham TC. Percutaneous endoscopic gastrostomy sites infected by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: impact on outcome. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 297-300
- 16 Varnier A, Iona L, Dominutti MC, Deotto E, Bianchi L, Iengo A, Zacchini S, Di Benedetto P.

- Percutaneous endoscopic gastrostomy: complications in the short and long-term follow-up and efficacy on nutritional status. *Eura Medicophys* 2006; 42: 23-26
- 17 Douzinas EE, Tsapalos A, Dimitrakopoulos A, Diamanti-Kandarakis E, Rapis AD, Roussos C. Effect of percutaneous endoscopic gastrostomy on gastro-esophageal reflux in mechanically-ventilated patients. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 114-118
- 18 Will U, Wegener C, Graf KI, Wanzar I, Manger T, Meyer F. Differential treatment and early outcome in the interventional endoscopic management of pancreatic pseudocysts in 27 patients. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4175-4178

电编 张敏 编辑 王晓瑜

■同行评价

本文从术后吸入性肺炎及反流性食管炎的角度比较内镜下经皮胃造瘘术与传统鼻饲对老年生活质量的影响, 有较大的实用价值。

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2005 年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序表¹

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

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

急性胆源性胰腺炎内镜治疗的临床对比研究

陈晓琴, 吴静, 刘雄昌

■背景资料

急性胆源性胰腺炎(ABP)除药物治疗和/或手术治疗外,还可经内镜途径实现微创治疗。但内镜的干预不仅存在诱发或加重胰腺炎的危险,而且他能否改变ABP,尤其SABP的自然病程、降低其并发症及死亡率,目前还存在争议,主要原因是由于缺乏此方面的对比研究观察。

陈晓琴, 吴静, 兰州大学附属第一医院消化内科 甘肃省兰州市 730000

陈晓琴, 刘雄昌, 兰州市第一人民医院 甘肃省兰州市 730050
通讯作者: 陈晓琴, 730050, 甘肃省兰州市, 兰州市第一人民医院消化内科. gslztys@126.com

电话: 0931-2654135

收稿日期: 2006-09-26 接受日期: 2006-11-16

Clinical contrast study of endoscopic treatment for acute biliary pancreatitis

Xiao-Qin Chen, Jing Wu, Xiong-Chang Liu

Xiao-Qin Chen, Jing Wu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Xiao-Qin Chen, Xiong-Chang Liu, the First People's Hospital of Lanzhou City, Lanzhou 730050, Gansu Province, China

Correspondence to: Xiao-Qin Chen, the First People's Hospital of Lanzhou City, Lanzhou 730050, Gansu Province, China. gslztys@126.com

Received: 2006-09-26 Accepted: 2006-11-16

Abstract

AIM: To explore the value of endoscopic treatment for acute biliary pancreatitis (ABP).

METHODS: A total of 119 ABP (including severe ABP) patients were treated with endoscopy ($n = 40$), drugs ($n = 42$), and operation ($n = 37$), respectively. The symptoms, laboratory indexes, rates of complications and deaths as well as in-hospital time were comparatively analyzed between the three groups.

RESULTS: The rates of complications and deaths were 12.5% (5/40) and 5.0% (2/40) in endoscopic treatment group, 29.7% (11/37) and 5.4% (2/37) in surgical treatment group, and 23.8% (10/42) and 7.1% (3/42) in drug treatment group, respectively. The symptoms, laboratory indexes, rates of complications and deaths as well as in-hospital time were obviously improved in comparison with those in the other two groups ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Endoscopic treatment for ABP, especially SABP, is effective, safe, economical,

simple and convenient, with fewer complications.

Key Words: Acute biliary pancreatitis; Endoscopy; Endoscopic retrograde cholangiopancreatography; Endoscopic nasobiliary drainage; Endoscopic sphincterotomy

Chen XQ, Wu J, Liu XC. Clinical contrast study of endoscopic treatment for acute biliary pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(3):298-301

摘要

目的: 通过对比观察给予不同治疗方案的3组急性胆源性胰腺炎(ABP)患者,探讨ABP经内镜治疗的优劣。

方法: 将119例ABP(包括SABP)患者分为内镜组(40例)、药物组(42例)、手术组(37例)。对比观察3组患者治疗后症状、实验室指标恢复情况、并发症发生率、死亡率以及住院天数。

结果: 内镜组总并发症发生率12.5%(5/40),死亡率5.0%(2/40)。手术组并发症发生率29.7%(11/37),死亡率5.4%(2/37);保守组并发症发生率23.8%(10/42),死亡率7.1%(3/42)。在3组SABP中,内镜组患者在症状恢复时间、实验室指标恢复时间、及住院天数方面较手术组及保守组均明显缩短、并发症发生率较手术组及保守组均降低($P < 0.05$)。

结论: 内镜治疗ABP(尤其SABP)是一项较安全、有效、经济简便、并发症少、可重复操作的治疗措施,值得临床大力推广。

关键词: 急性胆源性胰腺炎; 内镜; 逆行胰胆管造影; 鼻胆管引流; 内镜下乳头括约肌切开术

陈晓琴, 吴静, 刘雄昌. 急性胆源性胰腺炎内镜治疗的临床对比研究. *世界华人消化杂志* 2007;15(3):298-301
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/298.asp>

0 引言

急性胆源性胰腺炎(acute biliary pancreatitis, ABP)传统治疗方法有内科综合治疗和外科手

术治疗. 近年来, 随着内镜诊疗技术的不断发展, 越来越多的ABP患者可通过内镜实现微创治疗. 本研究通过对比观察给予不同治疗方案的3组ABP患者, 进一步证实内镜治疗的优点, 同时通过相关实验室检查从机制上探讨ABP, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 我院1999-09/2005-10收治ABP 119例, 按入院先后及治疗方式的不同, 随机分为3组: 保守组42例, 男20例, 女22例, 年龄在47.96±10.62岁, 急性重症胆源性胰腺炎(severe acute biliary pancreatitis, SABP) 12例; 内镜组40例, 男18例, 女22例, 年龄在48.86±9.58岁, SABP 15例; 手术组37例, 男19例, 女18例, 年龄在48.86±9.58岁, SABP 14例. 3组研究对象平均年龄之间经 t 检验, 差异无统计学意义($P>0.05$); 在性别、病情、病程及基础病变等方面经 χ^2 检验, 差异无统计学意义($P>0.05$), 具有可比性. ABP的严重程度诊断指标参照A-PACHE-II记分法: ≤ 8 为急性轻型胆源性胰腺炎(mild acute biliary pancreatitis, MABP); >8 为SABP^[1].

1.2 方法 保守组患者给予禁食、胃肠减压、抑酸、抑酶、抗炎、补液及维持水、电解质及酸碱平衡等药物综合治疗; 内镜组患者首先给予抗炎抑酶等治疗, 然后根据具体情况选择内镜治疗时机. 首先行选择性胆管造影(ERC), 以确诊胆总管结石的存在、结石的大小、数目及具体位置. 再根据具体情况行EST/ENBD及取石. 若取石困难或病情突然恶化者及合并化脓性胆管炎者, 可先给予急诊ENBD, 待引流几日或病情稍稳定, 再行EST及取石术. 1 wk后复查B超或经鼻胆管造影, 发现残余结石, 可再次取石. 手术组给予抗炎抑酶等药物保守治疗48 h, 严密观察病情变化, 若病情无改善或加重则行手术. 分入院时、治疗后分别详细记录3组患者血和尿淀粉酶、血白细胞、血气分析、血IL-6、血IL-10、肝功能恢复时间, 腹痛、腹胀恢复时间、并发症、死亡率及住院天数.

统计学处理 所有数据用SPSS10.0统计软件处理. 所得数据计量资料用mean±SD作描述, 多组均数比较用方差分析, 计数资料用 χ^2 检验或Fisher的精确检验法.

2 结果

内镜组在48 h内治疗22例, 6例在24 h内行单纯

表 1 经内镜治疗ABP的具体方法及时间(h)

ERCP治疗	MABP	SABP	合计
EST	6	2	8
<48 h	3	1	4
>48 h	3	1	4
EST+ENBD	10	7	17
<48 h	5	4	9
>48 h	5	3	8
ENBD	9	6	15
<48 h	5	5	10
>48 h	4	1	5

ENBD, 16例在24-48 h内行EST和/或ENBD; 在48 h后治疗18例. 5例急性化脓性胆管炎合并者, 2例SABP病情急骤恶化者, 先于24 h内行ENBD, 待病情稳定后再行EST/ENBD. 总并发症发生率12.5%(5/40), 总死亡率5.0%(2/40). 15例SABP患者中, 48 h内治疗的并发症发生率(22.2%, 2/9)、死亡率(11.1%, 1/9)较48 h后(33.3%, 2/6; 16.7%, 1/6)均减少. 手术组行胆囊切除29例, 胆总管探索T管引流35例, 胰腺包膜切开引流14例, 坏死组织清除5例, 腹腔灌洗引流10例. 并发症发生率29.7%(11/37); 死亡率5.4%(2/37); 其中SABP并发症71.4%, 死亡率14.3%. 保守组并发症发生率23.8%(10/42); 死亡率7.1%(3/42), 其中SABP并发症75%, 死亡率25%. 内镜组与保守组相比, MABP白细胞恢复时间, SABP白细胞恢复时间、肝功能恢复正常时间、腹痛腹胀缓解时间、住院天数、MABP及SABP的IL-6及IL-10恢复正常时间均明显缩短($P<0.05$); 总并发症及总死亡率均降低(12.5% vs 23.8%, 5.0% vs 7.1%, $P<0.05$), 其中SABP组并发症减少($P<0.05$)、死亡率略降低, 但无统计学意义. 与手术组相比, 内镜组的白细胞恢复时间、肝功能、IL-6及IL-10恢复正常时间、住院天数、SABP的腹痛腹胀缓解时间均明显缩短($P<0.05$). 总并发症及总死亡率均降低(12.5% vs 29.7%, 5.0% vs 5.4%, $P<0.05$), SABP并发症发生率降低($P<0.05$), 死亡率略低, 但无统计学意义. 血、尿淀粉酶恢复时间3组无明显统计学意义(表1-3).

3 讨论

ABP确切发病机制目前尚不完全清楚, 多数学者较认可“胆石通过学说”, 认为胆石从胆道滚动进入十二指肠, 刺激了Oddi括约肌, 导致其

■创新盘点

以往对于ABP的治疗的讨论多数较单纯, 只涉及其中的一个或几个方面, 本文不仅对于ABP的治疗进行了对比观察, 同时通过相关实验室检查从机制上探讨, 具有较好的临床指导意义.

■应用要点

随着内镜诊疗技术及设备的迅速发展,越来越多的ABP可通过内镜实现微创治疗。本文通过对比研究,进一步探讨内镜治疗的优劣及其机制,指导临床,以提高ABP的治愈率、降低并发症、减少患者的痛苦。

表 2 3组ABP患者死亡率、并发症比较

指标	保守组		手术组		内镜组	
	MABP(30)	SABP(12)	MABP(23)	SABP(14)	MABP(25)	SABP(15)
并发症	1(3.3%)	9(75%)	1(2.7%)	10(71.4%)	1(2.5%)	4(26.7%)
死亡率	0	3(25%)	0	2(14.3%)	0	2(13.3%)

表 3 3组ABP患者症状、实验室指标恢复及住院天数比较(mean $\pm$ SD, d)

	保守组		手术组		内镜组	
	MABP(30)	SABP(12)	MABP(23)	SABP(14)	MABP(25)	SABP(15)
腹痛	5.3 $\pm$ 2.04	15.21 $\pm$ 5.56 ^b	5.8 $\pm$ 2.32	13.02 $\pm$ 2.68 ^b	5.0 $\pm$ 2.52	9.2 $\pm$ 3.41
s-AMS	4.58 $\pm$ 1.82	5.02 $\pm$ 1.52	4.06 $\pm$ 0.66	4.85 $\pm$ 1.89	3.8 $\pm$ 0.26	4.81 $\pm$ 1.04
u-AMS	6.03 $\pm$ 1.43	6.04 $\pm$ 1.02	6.4 $\pm$ 2.06	6.26 $\pm$ 1.42	5.34 $\pm$ 2.94	5.84 $\pm$ 1.35
WBC	11.25 $\pm$ 2.05 ^d	15.06 $\pm$ 2.77 ^b	10.58 $\pm$ 3.79 ^d	15.89 $\pm$ 2.37 ^b	7.96 $\pm$ 1.63	12.03 $\pm$ 2.23
血气	5.16 $\pm$ 3.69	15.89 $\pm$ 7.18	6.22 $\pm$ 3.74	16.32 $\pm$ 7.46	5.28 $\pm$ 3.32	15.66 $\pm$ 7.15
IL-6	10.75 $\pm$ 2.23 ^d	14.76 $\pm$ 3.28 ^a	11.28 $\pm$ 1.15 ^d	13.91 $\pm$ 1.52 ^a	8.98 $\pm$ 2.49	11.76 $\pm$ 3.04
IL-10	10.05 $\pm$ 1.83 ^c	14.27 $\pm$ 3.16 ^a	10.98 $\pm$ 1.06 ^d	13.56 $\pm$ 1.32 ^a	8.66 $\pm$ 2.34	11.55 $\pm$ 2.09
肝功	11.89 $\pm$ 5.03	19.33 $\pm$ 6.01 ^b	15.89 $\pm$ 8.98 ^d	20.13 $\pm$ 5.24 ^b	10.28 $\pm$ 4.46	11.69 $\pm$ 3.06
肾功	6.23 $\pm$ 5.08	14.76 $\pm$ 7.82	7.31 $\pm$ 5.28	16.14 $\pm$ 8.26	6.04 $\pm$ 4.98	14.03 $\pm$ 6.52
住院天数	16.32 $\pm$ 3.9	26.89 $\pm$ 7.23 ^a	23.05 $\pm$ 8.43	50.01 $\pm$ 9.97 ^b	17.38 $\pm$ 7.56	22.17 $\pm$ 3.45

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 内镜组。

充血、水肿、痉挛、功能紊乱,甚至逆向收缩,形成暂时性或功能性的梗阻,导致胆汁和胰液反流,或者还有十二指肠内容的反流,引发胰腺炎^[2]。另外,急性胰腺炎时病损的胰腺腺泡细胞作为抗原或炎症刺激物激活巨噬细胞等炎症细胞释放细胞因子,进而通过扳机样作用,触发炎症介质瀑布样级联反应^[3]。其中部分指标如:IL-6, IL-8, IL-10和肿瘤坏死因子等在发病早期即明显升高,与急性胰腺炎的发生、发展及严重程度具有明显的相关性。因此,可作为判断其病情轻重、估计预后的依据^[4]。本研究内镜组与保守组、手术组相比,无论MABP或SABP,其IL-6及IL-10的恢复时间均明显缩短, $P < 0.05$,说明经内镜治疗后可使病损胰腺的恢复优于保守治疗及手术治疗。

早期手术治疗ABP可尽快解除胆胰管梗阻,使胰腺炎病因迅速去除,防止进行性胰腺坏死,有利于提高生存率^[5];但由于胰腺炎发病早期是一种全身的急性反应,表现为血流动力的改变及可能的多器官功能不全,如ARF, MODS等^[6]。此时,胰腺的坏死组织与其正常组织之间无明显分界,早期手术打开胰腺被膜,不可能彻底清除胰腺坏死组织,而破坏了胰腺正常屏障,使胰

周及胰腺感染几率明显增加^[7]。张建新 *et al*^[8]研究证明,早期手术并不能改变胰腺炎的转归,不论是MABP还是SABP术后的并发症及死亡率均明显高于非手术病例。本研究结果显示,早期手术并发感染4例,胰腺脓肿2例,胰腺囊肿1例,肠梗阻1例,出血1例, DIC 2例。死亡2例,均因感染性休克并发多脏器功能衰竭。并发症发生率在SABP中均高于保守组及内镜组($P < 0.05$),因此,对于MABP以非手术为宜, SABP应采用延期与手术相结合的处理原则。

药物治疗ABP较难,即不能缓解胆道感染及由此引起的急性梗阻化脓性胆管炎,从而加重并复杂化病情,极易导致中毒性休克。本研究保守组发生并发症10例,发生率23.8%,其中SABP并发症发生率75%。ARDS 2例,胰腺脓肿1例,假性囊肿3例,感染性休克并多脏器功能衰竭3例,败血症1例。死亡3例,总死亡率7.1%。内镜治疗SABP的时机,虽然多数学者认为益尽早进行,但尚缺乏明确的标准^[9]。Soetikno *et al*^[10]总结了834例ABP治疗结果显示,早期内镜治疗组效果明显好于对照组,降低了死亡率(3% vs 18%)及胰腺炎复发率(20% vs 60%),缩短住院时间(平均9.5 d),而且未发生与操作相关的并发症。

Pezzilli *et al*^[11]对87例ABP进行ERCP治疗, 并发症发生率为6.9%, 有7例在随访中死亡, 但这与术前麻醉风险和年龄相关, 而非ERCP所致. 李珂 *et al*^[12]的临床研究表明, 48 h内行内镜治疗组无论从腹痛缓解时间, 血淀粉酶恢复正常时间, 还是平均住院天数及并发症的发生率, 其疗效均优于对照组. Acosta *et al*^[13]的研究对此得出了相同的结论.

本组SABP患者经内镜治疗后取得明显效果, 早期(48 h内)治疗后并发症发生率及死亡率较晚期(48 h后)治疗减少, 可能与本研究中SABP患者病例数较少有直接关系. MABP在48 h前后治疗效果未显示出明显优势, 但早期行EST及ENBD并未加重病情, 提示对于MABP不必急于进行内镜治疗, 但当有胆道阻塞或胆管炎时应急诊行EST或ENBD以进行胆道减压. 内镜组发生并发症5例, SABP 4例, MABP 1例, 并发症发生率为12.5%. 包括出血1例, 穿孔1例, 术后形成假性囊肿1例, 呼吸衰竭2例, 总死亡率为5.0%(2/40). 总并发症发生率较手术组(29.7%)及药物保守组(23.8%)均明显减低($P<0.05$), 其中在SABP中, 内镜组(26.7%)较手术组(71.4%)及药物保守组(75%)均明显减低($P<0.05$), 差异有统计学意义. 总死亡率较保守组(7.1%)、手术组(5.4%)均降低, 其中在SABP组死亡率较保守组与手术组相比略降低, 但无统计学意义. 由此表明, ABP(尤其SABP)患者内镜组的治疗较手术组及保守组安全; 对SABP患者进行早期ERCP干预治疗是安全有益的.

总之, 经内镜治疗ABP可清除胆道结石, 恢复胆流, 减少胆汁胰管反流, 从而使ABP(尤其

SABP)病情迅速改善并减少复发, 疗效明显优于传统常规治疗, 其操作相对外科手术较简单. 尤其对于高龄、胆总管下端炎性狭窄、一般情况差、手术风险大的患者, 不仅可防止胰腺炎复发, 而且可避免开腹手术对腹腔及胰腺的侵袭, 降低腹腔感染和胰腺炎加重等并发症的发生率.

4 参考文献

- 1 张志功, 朱化刚, 孟翔凌, 胡孔旺, 曹葆强. APACHE II、RANSON评分在重症急性胰腺炎中的应用价值. 肝胆外科杂志 2005; 13: 32-35
- 2 李兆申, 柏愚, 王洛伟. 急性胆源性胰腺炎内镜治疗进展. 国外医学·消化系疾病分册 2004; 24: 3-5
- 3 李兆申, 潘雪. 胰腺疾病的基础与临床研究进展. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2521-2524
- 4 李云. 细胞因子、免疫和急性胰腺炎. 国外医学·外科学分册 1998; 25: 135-137
- 5 姜长勇. 急性胆源性胰腺炎129例临床分析. 华人消化杂志 1998; 6: 277-278
- 6 张圣道, 张臣烈, 汤耀卿, 袁祖荣, 杨毓兴, 王建承, 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
- 7 杨光, 施维锦. 重症急性胰腺炎的手术指征和手术时机探讨. 肝胆胰外科杂志 2001; 13: 103-104
- 8 张建新, 杨家红, 王旭青. 重症胆源性胰腺炎手术时机的选择. 中国普通外科杂志 2000; 9: 213-215
- 9 鲁星燧. 急性胆源性胰腺炎内镜治疗时机与适应证选择. 中国实用外科杂志 2005; 25: 328-329
- 10 Soetikno RM, Carr-Locke DL. Endoscopic management of acute gallstone pancreatitis. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 1998; 8: 1-12
- 11 Pezzilli R, Billi P, Morselli-Labate AM, Barakat B, D'Imperio N. Anesthesiological risk and endoscopic sphincterotomy in acute biliary pancreatitis. *Pancreas* 2003; 26: 334-338
- 12 李珂, 苏杰, 张智勇. 重症急性胆源性胰腺炎内镜治疗时机探讨. 中国实用外科杂志 2005; 25: 357-358
- 13 Acosta JM, Katkhouda N, DeBian KA, Groshen SG, Tsao-Wei DD, Berne TV. Early ductal decompression versus conservative management for gallstone pancreatitis with ampullary obstruction: a prospective randomized clinical trial. *Ann Surg* 2006; 243: 33-40

电编 张敏 编辑 王晓瑜

■同行评价

内镜治疗AP的作用已有较多报道, 本文通过对比研究进一步证实内镜治疗的优点, 同时通过相关实验室检查从机制上探讨, 具有较好的临床指导意义.

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 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. (世界胃肠病学杂志社 2007-01-28)

益生菌辅助治疗重症急性胰腺炎14例

李咏梅

■背景资料

重症急性胰腺炎是最易发生肠屏障功能受损的危重症之一, 保护肠屏障功能日益受到关注, 国内外对SAP肠屏障功能的破坏机制及益生菌对肠黏膜作用进行大量动物实验研究, 证实其对肠屏障功能确有保护作用。

李咏梅, 鄂尔多斯市中心医院消化科 内蒙古自治区鄂尔多斯市 017000

通讯作者: 李咏梅, 017000, 内蒙古自治区鄂尔多斯市, 鄂尔多斯市中心医院消化科. liyongmei315@163.com
电话: 0477-8367442

收稿日期: 2006-08-27 接受日期: 2006-11-10

Adjuvant therapy for probiotics in patients with severe acute pancreatitis: an analysis of 14 cases

Yong-Mei Li

Yong-Mei Li, Department of Gastroenterology, Erdos Central Hospital, Erdos 017000, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Correspondence to: Yong-Mei Li, Department of Gastroenterology, Erdos center hospital, Erdos 017000, Inner Mongolia Autonomous Region, China. liyongmei315@163.com

Received: 2006-08-27 Accepted: 2006-11-10

Abstract

AIM: To investigate the adjuvant therapeutic effect of probiotics on patients with severe acute pancreatitis (SAP).

METHODS: A total of 25 SAP patients were divided into group A and B. Group A was treated with probiotic agent Jinshuangqi (2.0 g, tid) on the basis of traditional method. Group B served as control group, and received traditional treatment only. Some indexes including the time of abdominal pain alleviation, serum amylase restoration, and the incidence rate of complications as well as mean in-hospital time, were observed, and comparatively analyzed between the two groups.

RESULTS: In comparison with those group B, the time of abdominal pain alleviation (5.4 ± 1.3 d vs 6.9 ± 1.5 d, $P < 0.01$), serum amylase restoration (5.0 ± 1.7 d vs 6.7 ± 1.4 d, $P < 0.05$), the incidence rate of complications (57.8% vs 90.5%, $P < 0.01$), and mean in-hospital time (42 ± 5.0 d vs 49 ± 6.8 d, $P < 0.01$) were significantly decreased in group A.

CONCLUSION: Early treatment of probiotics may shorten the course, decrease the complications, and improve the prognosis of SAP.

Key Words: Severe acute pancreatitis; Probiotics; Jinshuangqi

Li YM. Adjuvant therapy for probiotics in patients with severe acute pancreatitis: an analysis of 14 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(3):302-304

摘要

目的: 探讨益生菌对重症急性胰腺炎(SAP)的辅助治疗作用。

方法: 25例SAP患者均采用保守治疗, 随机分为2组, 治疗组在传统治疗基础上给口服益生菌制剂金双歧, 观察2组患者腹痛缓解时间, 血淀粉酶下降时间, 并发症发生率及平均住院时间。

结果: 与对照组相比, 治疗组腹痛缓解时间(5.4 ± 1.3 d vs 6.9 ± 1.5 d, $P < 0.01$), 血淀粉酶恢复时间(5.0 ± 1.7 d vs 6.7 ± 1.4 d, $P < 0.05$)及并发症发生率(57.8% vs 90.5%, $P < 0.01$)显著降低, 平均住院时间(42 ± 5.0 d vs 49 ± 6.8 d, $P < 0.01$)明显缩短。

结论: 早期应用益生菌辅助治疗SAP可改善其病程及预后。

关键词: 重症急性胰腺炎; 益生菌; 金双歧

李咏梅. 益生菌辅助治疗重症急性胰腺炎14例. *世界华人消化杂志* 2007;15(3):302-304

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/302.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(SAP)发病急骤, 病情复杂, 累及脏器多, 并发症发生率高, 易出现肠道动力障碍, 肠道菌群失调, 致肠功能失调, 肠道菌群移位致多脏器功能障碍^[1]。我们通过给SAP患者胃管中注入益生菌制剂金双歧, 探讨益生菌(金双歧)对SAP的辅助治疗作用。

1 材料和方法

1.1 材料 我院2004-10/2005-12发病2 d入院的SAP患者25例, 男15例, 女10例, 年龄21-75(平均 45 ± 13)岁, APACHE II评分在8-20分之间, 随机分为益生菌治疗组($n = 14$)和对照组($n = 11$), 年龄、性别两组无显著差异($P > 0.05$).

1.2 方法 患者入院后治疗包括禁食, 持续胃肠减压, 抑制胰酶分泌, 解痉止痛, 维持水电解质平衡, 防止感染及各种并发症等常规治疗. 治疗组在上述基础上, 经胃管注入金双歧(2.0 g, 3次/d用温水20 mL溶解), 连用7 d. 对照组则经胃管注入等量温水. 观察两组患者治疗后腹痛缓解时间, 血淀粉酶恢复时间, 并发症发生率及住院天数.

统计学处理 采用SPSS8.0统计软件包, 计量资料以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 组间比较采用 t 检验, 计量资料行 χ^2 检验.

2 结果

与对照组相比, 治疗组腹痛缓解时间($t = 4.994$, $P < 0.01$), 血清淀粉酶恢复正常时间($t = 5.071$, $P < 0.01$)及平均住院天数($t = 5.496$, $P < 0.01$)均明显缩短, 并发症发生率显著降低($\chi^2 = 11.943$, $P < 0.01$), 具有统计学意义(表1).

3 讨论

肠道是人体最大的细菌及内毒素贮存库, 也是重要的免疫屏障, 肠道相关淋巴组织可分泌SIgA, 可以中和毒素病毒, 直接作用于细菌表面, 降低病原体毒力, 激活补体的C3旁路途径, 并与补体和溶菌酶协同抗菌^[2]. SAP状态下, 肠缺血和低灌注损伤, 肠上皮细胞和淋巴细胞增殖代谢受损, 肠黏膜通透性增加^[3]. IL-2等促B细胞成熟的物质减少, IgA浆细胞减少, 肠腔细菌包被率下降, 细菌内毒素清除率下降, 刺激释放大细胞因子和炎症介质, 引起肠上皮细胞凋亡过度, 进一步损伤肠黏膜屏障, 导致更多内毒素入血, 形成恶性循环^[4]. 促使急性炎症反应综合征和多器官功能衰竭发生^[5]. 而益生菌可提供肠道正常菌, 加强肠道屏障功能, 调节促炎和抗炎因子产生, 促进肠上皮细胞更新, 增加肠黏膜血流量和调节肠蠕动, 加强肠黏膜免疫系统功能^[6]. 促进肠道相关淋巴细胞的归巢及淋巴细胞的增生^[7], 刺激机体免疫反应, 调节细胞因子的产生. 增加肠上皮occludin蛋白的表达, 维持肠上皮紧密连接, 减少细菌易位, 从而对肠免疫屏障有维

表1 金双歧治疗前后结果比较

	治疗组	对照组
腹痛缓解时间(d)	5.4 ± 1.3	6.9 ± 1.5^b
血淀粉酶恢复时间(d)	5.0 ± 1.7	6.7 ± 1.4^b
并发症发生率(%)	57.8	90.5 ^b
住院天数(d)	42 ± 5.0	49 ± 6.8^b

^b $P < 0.01$ vs 治疗组.

护作用^[8]. Perdigon *et al*^[9]报道, 乳酸菌治疗的小鼠IL-2, IL-12, Bcl-2及肠道固有层细胞TNF- α 和INF- γ 的表达明显高于对照组. 而临床研究报道采用乳酸杆菌制剂治疗急性胰腺炎可减轻患者的病理评分^[10], 使感染性坏死和脓肿等并发症的发生率显著降低^[11-13]. 我们的研究也表明, 在应用金双歧治疗的SAP组患者腹痛缓解时间和血淀粉酶恢复时间明显缩短, 并发症发生率下降, 住院时间明显缩短, 提示益生菌对肠道黏膜屏障有保护作用, 对SAP可能具有重要的辅助治疗作用.

4 参考文献

- Wang X, Wang B, Wu K, Xu M, Gong Z. Growth hormone downregulated the excessive apoptosis of ileal intestinal epithelial cells in rats during the early course of acute necrotizing pancreatitis. *Pancreas* 2002; 25: 205-209
- Fujimori H, Miura S, Koseki S, Hokari R, Komoto S, Hara Y, Hachimura S, Kaminogawa S, Ishii H. Intravital observation of adhesion of lamina propria lymphocytes to microvessels of small intestine in mice. *Gastroenterology* 2002; 122: 734-744
- Chang JX, Chen S, Ma LP, Jiang LY, Chen JW, Chang RM, Wen LQ, Wu W, Jiang ZP, Huang ZT. Functional and morphological changes of the gut barrier during the restitution process after hemorrhagic shock. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5485-5491
- 张喜平, 张宇. 急性胰腺炎肠道屏障损害机制的研究进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 417-421
- Wang X, Wang B, Wu J, Wang G. Beneficial effects of growth hormone on bacterial translocation during the course of acute necrotizing pancreatitis in rats. *Pancreas* 2001; 23: 148-156
- 吴承堂, 熊德鑫, 黎洁良. 双歧杆菌合剂促进急性坏死性胰腺炎肠黏膜损伤修复的实验研究. *中国微生态学杂志* 1998; 10: 135-138
- 杨建军, 耿翔, 高志光, 秦环龙. 益生菌及肠内外营养对重症急性胰腺炎大鼠肠道黏附分子及免疫屏障的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 953-957
- 秦环龙, 苏振东, 范小兵, 杭晓敏. 益生菌对急性胰腺炎大鼠肠道微生态及紧密连接的影响. *中国临床营养杂志* 2006; 14: 82-86
- Perdigon G, Maldonado Galdeano C, Valdez JC, Medici M. Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56 Suppl 4:

■名词解释

肠道相关淋巴组织: 主要指肠固有层和上皮内淋巴细胞, 幼稚淋巴细胞接受抗原刺激增殖, 成熟, 分化为效应淋巴细胞, 发挥免疫作用.

■同行评价

本文将益生菌用于SAP患者,探讨其对SAP的辅助治疗作用,内容新颖,结论可靠,对重症急性胰腺炎的临床治疗具有重要的指导意义。

- S21-26
- 10 Muftuoglu MA, Isikgor S, Tosun S, Saglam A. Effects of probiotics on the severity of experimental acute pancreatitis. *Eur J Clin Nutr* 2006; 60: 464-468
- 11 Kecskes G, Belagyi T, Olah A. Early jejunal nutrition with combined pre- and probiotics in acute pancreatitis-prospective, randomized, double-blind investigations. *Magy Seb* 2003; 56: 3-8
- 12 Qin HL, Su ZD, Hu LG, Ding ZX, Lin QT. Effect

of early intrajejunal nutrition on pancreatic pathological features and gut barrier function in dogs with acute pancreatitis. *Clin Nutr* 2002; 21: 469-473

- 13 Olah A, Belagyi T, Issekutz A, Gamal ME, Bengmark S. Randomized clinical trial of specific lactobacillus and fibre supplement to early enteral nutrition in patients with acute pancreatitis. *Br J Surg* 2002; 89: 1103-1107

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2007 年国际会议

Meeting Canadian Digestive Diseases
Week (CDDW)
16-20 February 2007
Banff - AB
cagoffice@cag-acg.org
www.cag-acg.org/cddw/cddw2007.htm

Meeting Falk Symposium 158: Intestinal
Inflammation and Colorectal Cancer
23-24 March 2007
Sevilla
symposia@falkfoundation.de

Meeting Falk Symposium 159: IBD 2007 - Achieve-
ments in Research and Clinical Practice
4-5 May 2007
Istanbul
symposia@falkfoundation.de

Digestive Disease Week
19-24 May 2007
Washington Convention Center, Washington DC

Meeting ESGAR 2007 18th Annual Meeting and
Postgraduate Course
12-15 June 2007
Lisbon
fca@netvisao.pt

Meeting Falk Symposium 160: Pathogenesis and
Clinical Practice in Gastroenterology
15-16 June 2007
Portoroz
symposia@falkfoundation.de

Meeting ILTS 13th Annual International Congress
20-23 June 2007
Rio De Janeiro
www.ilsts.org

Meeting 9th World Congress on Gastrointestinal
Cancer
27-30 June 2007
Barcelona
meetings@imedex.com

Survivin在大肠癌组织中表达的意义及其与Bcl-2的关系

耿婉如, 李宁, 余琦, 周会芹, 许红民

耿婉如, 军医进修学院学员队 北京市 100082
李宁, 余琦, 周会芹, 许红民, 中国人民解放军总医院第二附属医院病理科 北京市 100091
通讯作者: 许红民, 100091, 北京市, 中国人民解放军总医院第二附属医院病理科. xuhongmin@yahoo.com.cn
电话: 010-66775260
收稿日期: 2006-08-09 接受日期: 2006-11-03

Significance of Survivin expression and its correlation with Bcl-2 protein expression in colorectal carcinoma

Wan-Ru Geng, Ning Li, Qi Yu, Hui-Qin Zhou,
Hong-Min Xu

Wan-Ru Geng, Postgraduate Team, Postgraduate Medical School of Chinese PLA, Beijing 100082, China
Ning Li, Qi Yu, Hui-Qin Zhou, Hong-Min Xu, Department of Pathology, the Second Affiliated Hospital of General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100091, China
Correspondence to: Hong-Min Xu, Department of Pathology, the Second Affiliated Hospital of General Hospital of PLA, Beijing 100091, China. xuhongmin@yahoo.com.cn
Received: 2006-08-09 Accepted: 2006-11-03

Abstract

AIM: To study the expression of Survivin and its correlation with expression of Bcl-2 protein in colorectal carcinoma.

METHODS: The expression of Survivin and Bcl-2 protein was evaluated by immunohistochemistry in 52 case of colorectal carcinoma. The relationship between Survivin expression and clinical indexes as well as Bcl-2 expression was analyzed.

RESULTS: Survivin was expressed in 27 of 52 (51.9%) colorectal carcinoma cases. The expression of Survivin showed no correlation with the age, sex, tumor location, size, differentiation degree, pathologic types and lymph node metastasis ($P > 0.05$). The 5-year survival rate was lower in patients with high Survivin expression than that in those with low Survivin expression (52.94% vs 83.33%, $P = 0.0304$). There was no significant relationship between Survivin and Bcl-2 expression ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Survivin expression may play a strong inhibitory role in the apoptosis of colorectal cancer cells, and the patients with high Survivin expression have an unfavorable prognosis. No correlation is found between Survivin and Bcl-2 expression.

Key Words: Colorectal carcinoma; Immunohistochemistry; Survivin; Bcl-2; Prognosis

Geng WR, Li N, Yu Q, Zhou HQ, Xu HM. Significance of Survivin expression and its correlation with Bcl-2 protein expression in colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(3):305-309

摘要

目的: 探讨凋亡抑制蛋白Survivin在大肠癌组织中表达的意义并分析其与Bcl-2的关系。

方法: 用免疫组化方法检测52例大肠癌组织中Survivin和Bcl-2的表达, 运用统计学方法分析Survivin表达与预后的关系以及Survivin在凋亡抑制机制方面与Bcl-2的关系。

结果: Survivin在大肠癌组织中表达的阳性率为51.9%(27/52), Survivin表达与患者年龄、性别、生长部位、肿瘤病理类型、大小、淋巴结转移、组织分化程度等无关($P > 0.05$)。但是Survivin高表达患者的5 a生存率明显低于Survivin低表达患者, 二者差别有统计学意义(52.94% vs 83.33%, $P = 0.0304$)。Survivin的表达与Bcl-2的表达无关($P = 0.5524$)。

结论: Survivin在大肠癌中的表达能强烈抑制凋亡, 高表达者预后较差。Survivin的表达与Bcl-2的表达无关。

关键词: 大肠癌; 免疫组化; Survivin; Bcl-2; 预后

耿婉如, 李宁, 余琦, 周会芹, 许红民. Survivin在大肠癌组织中表达的意义及其与Bcl-2的关系. *世界华人消化杂志* 2007;15(3):305-309

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/305.asp>

0 引言

对于正常细胞, 凋亡是一种生理性死亡, 他参与

■背景资料

凋亡抑制是目前肿瘤研究的一个热点。Survivin是一种凋亡抑制蛋白, 在多数人类肿瘤中表达增高。虽然关于Survivin在大肠癌中的表达已有报道, 但是主要集中在Survivin与血管形成的关系方面, 与Bcl-2的关系的报道仍较少。

■研究前沿

Survivin在肿瘤中的特殊作用,使其成为肿瘤基因治疗中的一个理想靶目标,但是, Survivin转基因模型的建立, Survivin-Knockout动物模型的建立、Survivin相关的生物学分子以及他们之间的相互关系都是目前亟待解决的问题。

细胞的各种生理、病理过程,对细胞发生、分化和维持机体稳态都有很重要的作用。此外,凋亡还能作为防御系统,通过清除变异细胞和改变基因表达阻止细胞发生转化。因此,如果凋亡被抑制,基因发生突变的细胞就会得以继续生存,并且通过突变导致肿瘤的发生和发展。凋亡抑制是目前肿瘤研究的一个热点方向。Survivin是新近发现的一种凋亡抑制蛋白,在众多人类恶性肿瘤中上调表达。国外对Survivin在肿瘤方面的研究开展较早,但是对于他在大肠癌中表达方面的研究较少,而且对于Survivin对预后表达的关系不一,具有争议性。国内对于Survivin在大肠癌的表达研究主要集中在他与血管形成的关系方面^[1-2]。本研究通过免疫组化方法检测了52例大肠癌组织中Survivin和Bcl-2的表达,结合预后调查运用统计学方法分析Survivin表达与预后的关系,并且通过与一种目前研究已经比较深入的凋亡相关蛋白Bcl-2之间的相关分析,探讨Survivin在大肠癌发生、发展、预后中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 标本均取自已经取得随访的中国人民解放军总医院第二附属医院1995-09/2000-12病例存档的石蜡标本,行常规病理切片制片后,由2位高年资病理医生进行复诊。所有患者术前未接受放疗和化疗。52例大肠癌患者中男32例,女20例,男女比例为1.6:1。患者年龄34-73(平均51.6)岁,随访结果最短5 a,最长10 a。肿瘤最大直径8 cm,最小直径1.5 cm,小于3 cm的12例,大于3 cm的40例。其中有复发或者转移的为12例,包括转移到卵巢,腹膜,脑等。术后30 d内死亡的不在本研究之列。检测一抗Survivin抗体和Bcl-2抗体均购自北京中山试剂公司。

1.2 方法 用PBS代替一抗作为阴性对照,用公司随试剂赠送的阳性片作为阳性对照。免疫组化染色前均染色复查病理类型。具体操作步骤简述如下:石蜡组织块,4 μ m切片后,放在80℃烤箱烘烤30 min,二甲苯去蜡10 min(2次),梯度酒精逐级水化。然后置于100 mL/L过氧化氢中10 min,消除组织内源性过氧化酶。微波抗原2档修复时间3 min后,冷却,加入一抗工作液,4℃过夜。室温下PBS洗3次,每次5 min。滴加二抗,37℃烤箱置30 min。PBS洗3次,每次5 min。滴加三抗,37℃烤箱置20 min后DAB显色。苏木素复染后,透明,中性树胶封片。光学显微镜下观察。

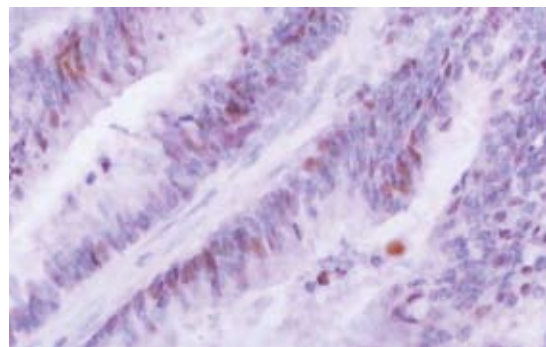


图1 Survivin蛋白的阳性表达位于细胞质($\times 40$)。

根据肿瘤细胞染色的程度定下判断标准。(-)表示没有观察到棕色的阳性细胞; (+)为阳性细胞胞质染成均匀浅黄色或胞质染成棕色的细胞 $\leq 25\%$; (++)阳性细胞胞质染成棕色 $>25\%$, 并含一些较细的棕色颗粒或胞质染成深棕色 $\leq 50\%$; (+++)阳性细胞胞质染成深棕色 $>50\%$, 并有较粗大的深棕色颗粒。在本研究中,以阳性细胞表达 $>25\%$ 为高表达组, $\leq 25\%$ 为低表达组。

统计学处理 采用SPSS10.0软件,不同组间阳性率差异用pearson χ^2 检验,等级资料秩和检验计算高中低分化组间阳性率的差异, Kaplan-Meier法比较生存情况并进行log-rank检验。以 $P \leq 0.05$ 为有统计学意义,以 $P \leq 0.01$ 为有显著统计学意义。

2 结果

2.1 Survivin在大肠癌中的表达 Survivin蛋白表达不均匀,在同一个癌组织中的不同区域和不同腺体内着色不均匀,表现为显色的有无和强弱的差异(图1)。Survivin在大肠癌中表达的阳性率为51.92%(27/52)。此外,本研究证实Survivin蛋白阳性染色主要定位于细胞质。

2.2 Survivin在大肠癌中表达与临床病理特征的关系 Survivin表达与患者的年龄、性别和肿瘤的生长部位、大小、分化程度、病理类型等均无明显关系($P > 0.05$, 表1)。

2.3 Survivin表达与Bcl-2表达的关系 在Bcl-2表达阳性的30例患者中, Survivin表达阳性患者中有14例患者表达阳性,在Bcl-2表达阴性的22例患者中, Survivin表达阳性患者中有13例,二者无明显相关性($P > 0.05$, 表1)。

2.4 Survivin蛋白表达与预后的关系 Survivin高表达患者与Survivin低表达患者的5 a生存率分别为52.94%和83.33%, $P = 0.0304$,二者比较有统

表 1 Survivin表达与临床病理特征及Bcl-2表达的关系

项目	n	阳性(n)	阳性率(%)	χ^2	P值
性别					
男	32	14	43.75	1.4565	0.2275
女	20	13	65.00		
年龄					
>60岁	15	11	73.33	2.7596	0.0967
≤60岁	37	16	43.24		
部位					
直肠	35	19	54.28	2.0952	0.1478
结肠	17	8	47.05		
肿瘤类型					
黏液癌	12	5	41.67	0.2318	0.6312
腺癌	40	22	55.00		
淋巴结转移					
有	22	15	68.18	2.9881	0.0839
无	30	12	40.00		
分化程度 ¹					
高	16	6	37.50	1.951	P>0.05
中	21	10	47.61		
低	15	11	73.33		
Bcl-2表达					
阳性	30	14	46.67	0.4091	0.5224
阴性	22	13	59.09		

¹高中低分化组两两比较的结果P值均>0.05, 无统计学意义。

计学意义($P = 0.0371$), Kplan-Meier生存曲线如图2所示。Kplan-Meier生存分析结果表明, 在52例大肠癌患者中, Survivin高表达组患者的5 a生存率明显少于低表达组($P < 0.05$)。

3 讨论

人体组织中, 细胞增殖与细胞凋亡的动态平衡维持着内环境稳定和正常的形态结构。大肠癌的发生是一个长期的多步骤多因素的变化过程, 必然涉及到变异的积累。细胞的凋亡过程受凋亡促进因子P53, Fas等和凋亡抑制因子、Bcl-2的共同调节^[3]。因此, 凋亡抑制因子的过度表达必然影响人体的稳定, 在癌症的发生、发展中起重要作用。

Survivin是新近发现的一种凋亡抑制蛋白, 在许多人类恶性肿瘤中表达上调。Survivin是1997年通过效应细胞蛋白酶受体1(effector cell protease receptor-1, EPR-1) DNA与人类基因库杂交而分离得到的。Survivin基因横跨14.7 kb, 编码含142个氨基酸、分子量为16.5 kDa的蛋白质, 是抗凋亡蛋白(inhibitor of apoptosis protein,

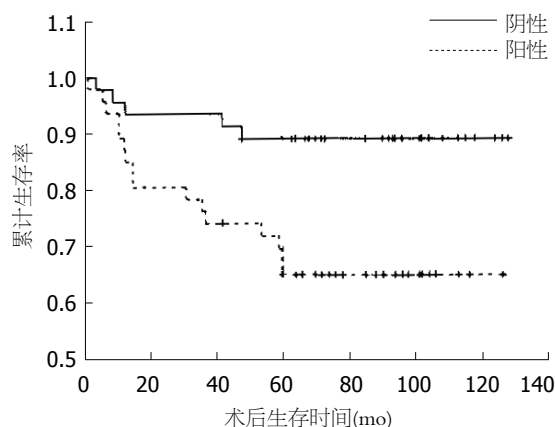


图 2 大肠癌患者Survivin高表达与低表达的Kplan-Meier生存曲线。

IAPs)家族中最小的成员^[4]。与其他IAPs相似, Survivin具有一个凋亡抑制蛋白重复序列结构和一个螺旋扩展的C端的二聚体结构, 但是缺乏锌指结构^[5]。Survivin在肿瘤中以细胞周期依赖的形式在G2/M期高表达, G1期其mRNA和蛋白水平迅速下降。其组织分布特征有明显的细胞选择性, 他在终末分化的成人组织不表达(除胸腺、生殖器等), 而在大多数肿瘤组织中表达。

本试验结果表明, Survivin和Bcl-2蛋白在52例大肠癌中表达无明显相关性($P > 0.05$), 综合文献复习, 分析二者可能是通过不同的凋亡抑制途径来调控机体, 从不同的途径实现对细胞程序性死亡的抑制。目前大多数观点认为, Survivin主要通过天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白酶(cysteine proteinases with specificity for aspartic acid residues, Caspase)直接或间接作用以实现对细胞凋亡的抑制。可能主要通过两种途径来抑制细胞凋亡: 其一是作为重要的凋亡通路的调节因子直接牢固结合并抑制凋亡终末效应器Caspase-3和Caspase-7的活性阻断各种刺激诱导的细胞凋亡过程^[6]。另外, Survivin也可通过P21间接抑制Caspase, 其机制是Survivin与细胞周期调控因子CDK形成Survivin-CDK4复合体, 使得P21从CDK4的复合体中释放出来, P21进一步与线粒体Caspase-3结合, 抑制其活性, 阻止细胞凋亡^[7]。

Bcl-2的抗凋亡机制已经基本明确, 与Survivin完全不同, 他主要通过线粒体通路来影响凋亡。Bcl-2表达使线粒体渗透性改变的多种蛋白, 对抗引起线粒体破裂的离子失衡, 从而阻断细胞色素C释放, 也可直接与Apaf-1结合, 防止caspase活化。此外, 越来越多的证据表明Bc-2

■应用要点

未来的研究工作中, 以Survivin为靶点的抗癌治疗有可能成为肿瘤治疗的一个新的突破口, 显示出良好的前景。随着Survivin和其他凋亡调节因子、癌基因、抑癌基因关系的深入研究及其调控机制的进一步阐明, 将有利于肿瘤发病机制的阐明, 并为肿瘤的诊治提供更充分的理论依据。

■名词解释

凋亡蛋白抑制因子(IAP): 是一类重要的抗细胞凋亡因子, 该家族结构的共同特点是N端含有一个或多个(目前发现最多为3个)串联的杆状病毒IAP重复序列(baculovirus IAP repeat, BIR), C端含或不含有一个环指(ring finger)结构。目前人类IAP家族已发现有8个成员, 其中Survivin是新近发现的一个IAPs家族成员。

家族除存在于线粒体膜表面外也存在于内质网膜, 能阻断多种致使内质网释放储存钙的凋亡刺激。Foyouzi-Youssefi *et al*^[8]发现, Bcl-2的表达通过增加内质网膜对钙离子通透性降低内质网腔钙浓度而减少可释放的游离钙离子。然而, 也有学者研究认为Survivin的表达与Bcl-2有关。Kawasaki *et al*^[9]采用免疫组化检测171例结肠癌中Survivin表达, 显示他与Bcl-2的表达显著相关。Survivin与Bcl-2的这种表达相关性在神经母细胞瘤、胃癌和非霍奇金淋巴瘤、乳腺癌中都有类似的结果。Kawasaki *et al*^[9]认为可能转录水平的调节可能导致了两个基因在肿瘤中的共表达。而且, Survivin与Bcl-2都被富含GC而缺少TATA的启动子所调控, 并都在增生活跃的细胞中转录, 从而推测Survivin基因与Bcl-2可能有共同的转录激活机制, 两者协同作用发挥抗凋亡效应^[10]。这种分歧说明关于Survivin抑制细胞凋亡的具体环节还不清楚, 有待于进一步的研究。此外, 有趣的是, 人们还发现在抑制凋亡的同时Survivin还可以促进细胞增殖。Giodini *et al*^[11]用Survivin的多克隆抗体通过微细胞注射法注入Hela细胞, 发现注射后的细胞出现有丝分裂纺锤体缩短, 分裂前期和中期延长, 微管聚合异常, 并有凋亡现象, 体内实验显示强制表达Survivin能稳定微管, 避免他的解聚, 从而诱导有丝分裂, 说明Survivin同时还具有促进增殖的作用。那么, 既然Survivin是正常的细胞增殖所必需的, 到底是何种机制导致他在肿瘤细胞中的上调呢? 这仍然是一个值得深入研究的问题。

关于Survivin与预后的关系观点越来越趋向一致。近年来, 国内外有许多报道已经证实了Survivin的阳性表达与非小细胞肺癌^[12]、乳腺癌^[13]、胃癌^[14]等的不良预后有显著相关性。然而, 分化较低的非霍奇金淋巴瘤并不表达Survivin^[10]。

这些研究提示, 由于Survivin的组织学分布特点及其结构特点, 他在多种恶性肿瘤都有预测预后的价值。而另外Sarela *et al*^[15]以大肠癌整体作为研究对象, 研究结果显示, Survivin mRNA和蛋白的检测对大肠癌患者的预后无明显价值, 但该作者对TNM分期中的II期大肠癌病例进一步研究, 发现Survivin阴性的大肠癌患者的5 a生存率明显高于Survivin阳性组, 提出Survivin仅对II期大肠癌患者的预后有一定预测价值。在本研究中, Survivin蛋白表达阳性患者的5 a生存率显著低于Survivin蛋白表达阴性的患者, 提示

Survivin对于大肠癌的预后有一定的预测作用。在大肠癌的诊断及预后等方面具有重要意义, 有望成为具有临床应用价值的肿瘤诊断和预后判断的标记物, 从而对临床工作发挥指导作用。

未来的研究工作中, 以Survivin为靶点的抗癌治疗有可能成为肿瘤治疗的一个新的突破口, 显示出良好的前景^[16]。Survivin反义核酸的应用在实验研究中已显示出降低内源性Survivin表达、促进细胞凋亡、促进肿瘤血管形成过程中内皮细胞的凋亡和血管的退行性改变等功能。随着Survivin和其他凋亡调节因子、癌基因、抑癌基因关系的深入研究及其调控机制的进一步阐明, 将有利于肿瘤发病机制的阐明, 并为肿瘤的诊治提供更充分的理论依据。

致谢: 衷心感谢Radu Seicean M.D, Ph.D. (Romania)慷慨的提供原文Molecular prognostic factors in rectal cancer.

4 参考文献

- 1 刘丰, 宋炯, 傅仲学, 罗小东. Survivin的表达与直肠癌细胞凋亡、血管形成及预后的关系. 中华实验外科杂志 2004; 21: 757-758
- 2 梁青春, 罗鑫. 大肠癌Survivin的表达与血管生成的关系. 实用预防医学 2005; 12: 87-91
- 3 林连捷, 郑长青. Survivin与肿瘤. 世界华人消化杂志 2003; 11: 2027-2029
- 4 都昌胡, 徐军. 凋亡蛋白抑制剂家族研究进展. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1581-1589
- 5 Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, Reed JC. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 1998; 58: 5315-5320
- 6 Miller LK. An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends Cell Biol* 1999; 9: 323-328
- 7 Suzuki A, Ito T, Kawano H, Hayashida M, Hayasaki Y, Tsutomi Y, Akahane K, Nakano T, Miura M, Shiraki K. Survivin initiates procaspase 3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death. *Oncogene* 2000; 19: 1346-1353
- 8 Foyouzi-Youssefi R, Arnaudeau S, Borner C, Kelley WL, Tschopp J, Lew DP, Demaurex N, Krause KH. Bcl-2 decreases the free Ca²⁺ concentration within the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 5723-5728
- 9 Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5071-5074
- 10 Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997; 3: 917-921
- 11 Giodini A, Kallio MJ, Wall NR, Gorbisky GJ, Tognin S, Marchisio PC, Symons M, Altieri DC. Regulation of microtubule stability and mitotic progression by

- survivin. *Cancer Res* 2002; 62: 2462-2467
- 12 O'Connor DS, Grossman D, Plescia J, Li F, Zhang H, Villa A, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13103-13107
- 13 Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 127-134
- 14 Okada E, Murai Y, Matsui K, Isizawa S, Cheng C, Masuda M, Takano Y. Survivin expression in tumor cell nuclei is predictive of a favorable prognosis in gastric cancer patients. *Cancer Lett* 2001; 163: 109-116
- 15 Sarela AI, Scott N, Ramsdale J, Markham AF, Guillou PJ. Immunohistochemical detection of the anti-apoptosis protein, survivin, predicts survival after curative resection of stage II colorectal carcinomas. *Ann Surg Oncol* 2001; 8: 305-310
- 16 陆才德, 戴德坚, 孟化. Survivin-值得关注的抗癌治疗靶. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 701-705

电编 张敏 编辑 张焕兰

■同行评价

凋亡抑制是目前肿瘤研究的一个热点. Survivin是一种凋亡抑制蛋白, 在多数人类肿瘤中表达增高. 因此, 本文选题比较热门. 虽然关于Survivin在大肠癌中的表达已有报道, 但其与Bcl-2的关系的报道仍较少. 故文章有一定的可读性. 但研究方法比较简单, 如能配合mRNA检测, 文章将会深入一些.

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2007 年协和肝脏外科新技术学习班通知

本刊讯 为了提高我国肝脏外科学临床与研究水平, 学习该领域国际先进技术和理念, 促进学术交流和学科发展, 由洛克菲勒基金会设立的CMB基金会资助, 中国医学科学院、中国协和医科大学、北京协和医院主办, 天津第一中心医院东方器官移植中心、中山大学第一附属医院器官移植中心协办, 中国医学科学院国际会议中心承办的“07年协和肝脏外科新技术学习班”将于2007-04下旬在北京市中国协和医科大学新科研教学楼举行.

培训班将邀请国内外肝脏外科领域著名专家黄洁夫教授、钟守先教授、芝加哥大学移植中心主任Michael Millis教授、瑞典Lund 大学肝外科主任Bengt Jeppsson教授、香港范上达教授、冷希圣教授、叶胜龙教授、沈中阳教授、何晓顺教授、朱继业教授、戴朝六教授等任教. 培训班除邀请国内知名专家作专题学术讲座外, 还有机会在天津第一中心医院东方器官移植中心进行临床肝移植的学习和观摩; 本培训班的另一个特点是参加培训的学员有申请CMB基金会合作课题并得到适当的基金资助的机会; 培训班将给予国家级继续教育学分10分. 我们真诚欢迎各位肝脏外科领域的同仁参加培训班, 共同促进和加强肝脏外科学的学术交流与合作, 推动我国肝脏外科学的发展.

收费标准: 培训费680元/人(含材料费和讲课费, 食宿自理)

通讯地址: 北京东城区东单三条9号中国医学科学院/中国协和医科大学国际合作处 邮编: 100730 联系人: 乔楠、蒋育红 电话: 010-65105934, 65105935, 65253447 传真: 010-65124876 E-mail: jiangyuhong@yzjg.pumc.edu.cn; dakuansun@yahoo.com.cn.

新辅助化疗治疗不能手术仅肝转移大肠癌32例

孙宏劭, 封书德

■背景资料

外科手术治疗大肠癌肝转移能够使患者生存期延长甚至治愈的临床研究已有40余年,但不幸的是仅有20%大肠癌肝转移的患者适合手术治疗,其他的患者由于转移的部位、大小和数目而不能进行手术治疗。随着化疗药物的进步,化疗有效率的提高,通过新辅助化疗,使原本不能手术的大肠癌肝转移患者赢得了手术切除的机会,从而明显延长了这部分患者的生存时间。

孙宏劭, 封书德, 武警江苏总队医院肿瘤内科 江苏省扬州市 225003

通讯作者: 孙宏劭, 225003, 江苏省扬州市运河西路272号, 武警江苏总队医院肿瘤内科. yzwjyhm@sohu.com
电话: 0514-7232421-33107

收稿日期: 2006-09-30 接受日期: 2006-10-18

Neoadjuvant chemotherapy for colorectal carcinoma with only hepatic metastasis: an analysis of 32 cases

Hong-Shao Sun, Shu-De Feng

Hong-Shao Sun, Shu-De Feng, Department of Internal Oncology, General Hospital of Jiangsu Armed Police, Yangzhou 225003, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Hong-Shao Sun, Department of Internal Oncology, General Hospital of Jiangsu Armed Police, 272 Yunhe West Road, Yangzhou 225003, Jiangsu Province, China. yzwjyhm@sohu.com

Received: 2006-09-30 Accepted: 2006-10-18

Abstract

AIM: To confirm whether neoadjuvant chemotherapy (NACT) can provide surgical treatment opportunities for colorectal carcinoma patients with only liver metastasis.

METHODS: A total of 32 colorectal carcinoma patients with liver metastasis, who could not receive surgical therapy, were treated with NACT, and then the efficacy was analyzed. The survival time was compared between patients received operation after NACT treatment and those who didn't receive.

RESULTS: The efficacy rate of NACT was 56%, and the surgical resection rate was 34%. Complete resection was achieved in 10 cases. The survival time was significantly different between the patients received operation after NACT treatment and those who didn't receive ($P < 0.05$).

CONCLUSION: NACT can provide opportunities for colorectal carcinoma patients with only liver metastasis, who can't receive surgical treatment.

Key Words: Neoadjuvant chemotherapy; Surgical treatment; Colorectal carcinoma; Liver metastasis

Sun HS, Feng SD. Neoadjuvant chemotherapy for colorectal carcinoma with only hepatic metastasis: an analysis of 32 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(3):310-312

摘要

目的: 探讨通过新辅助化疗使一些仅有肝转移不能手术的大肠癌患者,有机会通过手术来延长生存期,提高治愈率。

方法: 通过应用FOLFOX4方案进行3个疗程的新辅助化疗后来评价,外科分为完全切除、部分切除和不能切除,然后再进行手术治疗。

结果: 共有32例患者进行临床观察,化疗的有效率为56%,手术切除率为34%,其中10例完全切除。手术治疗组和非手术组间生存时间有显著差别($P < 0.05$)。

结论: 通过新辅助化疗能明显提高患者的手术切除率,延长患者的生存期。

关键词: 新辅助化疗; 大肠癌; 肝转移; 手术

孙宏劭, 封书德. 新辅助化疗治疗不能手术仅肝转移大肠癌32例. *世界华人消化杂志* 2007;15(3):310-312

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/310.asp>

0 引言

大肠癌是我国常见的恶性肿瘤之一,而肝脏又是最常见的转移部位。有文献报道1541例死于大肠癌的患者尸检发现有44%的患者有肝转移,其中20%的患者仅有肝转移^[1]。有肝转移的患者如果不治疗,生存期一般为5-12 mo^[2-3]。如果能通过手术将病灶切除,很多学者报道还有25%的5 a生存率,平均生存时间为24-42 mo^[4]。但部分仅有肝转移的患者由于病灶的大小、数量、部位等原因,不能进行手术治疗。近年来我院对32例患者,通过应用澳沙利铂,四氢叶酸钙和氟脲嘧啶(FOLFOX4)方案进行新辅助化疗,使部分

患者的病灶缩小甚至消失, 然后再进行手术治疗. 取得了较好的临床疗效, 明显提高了患者的生存时间, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 32例患者, 平均年龄58.1(28-70)岁. 所有的患者必须是大肠癌肝转移, 并排除其他部位转移灶. 外科治疗组通过对患者的B超、CT影像学资料进行分析不能进行手术切除. 其主要情况包括(1)转移灶临近或侵犯肝静脉、门静脉或下腔静脉;(2)手术切除范围需超过左或右肝的三段以上;(3)转移灶 ≥ 4 个以上. 所有患者的肝功能检查ALT ≤ 3 倍正常值, 胆红素在正常范围内, 肾功能正常. ECOG(美国东部肿瘤协作组)体力分级0-2级, 没有活动性肝炎和肝硬化(表1).

1.2 方法 所有患者均先进行3个疗程澳沙利铂、四氢叶酸钙和氟脲嘧啶(FOLFOX4)方案的新辅助化疗, 然后进行评价, 对手术后的患者继续进行该方案化疗. 所有患者新辅助化疗后必须重新分期检查进行评价, 化疗效果按WHO评定标准分为CR(肿瘤完全消失), PR(肿瘤消退50%), SD(稳定)和PR(肿瘤进展). 毒副反应按WHO标准进行评定. 并对CR+PR患者, 由外科治疗组对患者复查的B超、CT等影像学资料重新进行评估考虑有无手术的可能性. 外科治疗组将患者分为: (1)可以完全切除;(2)可以部分切除;(3)不能切除. 对所有的患者均进行随访观察其复发和生存时间, 共随访36 mo.

统计学处理 采用SPSS10.0统计软件进行分析, t 检验.

2 结果

化疗后评价CR1例, PR17例, 总有效率为56%, SD和PD为12例. 外科治疗组再对18例患者进行手术评价, 结果有12例可以行手术切除, 6例依然不能切除. 在12例手术患者中10例完全切除, 1例部分切除, 1例不能切除. 化疗后毒副反应见表2. SD(稳定)和PR(肿瘤进展)14例生存时间平均为6.7 mo(4-11 mo), 化疗有效但未做手术的6例和1例术中不能切除的生存时间平均为15.2 mo(10-20 mo), 10例手术完全切除和1例部分切除患者生存时间平均为26 mo(19-36 mo), 其中有9人复发或转移, 部位分别是肝, 肺, 结肠, 骨, 脑, 腹膜. 32例患者中有26例患者已死亡(81%). 手术治疗组中完全切除的有6例生存时间超过36 mo, 其中2例

表 1 大肠癌肝转移患者的临床病理资料

特点	n	%
性别		
女	14	44
男	18	56
ECOG体力分级		
0	22	69
1	8	25
2	2	6
不能切除原因		
个数	18	56
部位	3	9
大小	2	6
混合	9	28

表 2 化疗毒副反应(n)

症状	分级				
	0	I	II	III	IV
白细胞减少	10	10	8	4	0
恶性呕吐	8	12	10	2	0
脱发	10	10	10	2	0
腹泻	18	6	8	0	0
神经毒性	14	12	6	0	0
口腔黏膜炎	18	12	2	0	0

还无瘤生存. 手术治疗组和非手术组有显著差别($P < 0.05$).

3 讨论

外科手术治疗大肠癌肝转移能够使患者生存期延长甚至治愈的临床研究已有40余年, Adson *et al*/回顾141例手术治疗大肠癌肝转移的患者, 取得了较高的5 a生存率^[5], 但不幸的是仅有20%大肠癌肝转移的患者适合手术治疗, 其他的患者由于转移的部位、大小和数目而不能进行手术治疗.

近年来由于化学药物的进步, 尤其是含澳沙利铂方案的出现(FOLFOX4), 提高了化疗的有效率. 澳沙利铂对结直肠癌具有较高的有效率, 临床证实对很多实体瘤有抗癌活性^[6-7], 与顺铂相比, 在结构上有一个二氨基环己烷, 也是通过与DNA交联发挥作用, 其结合能力是顺铂的50倍^[8]. 细胞内的错配修复系统能更有效的识别顺铂-DNA复合物^[9], 结直肠癌细胞内相对频繁的错配修复酶改变也能够解释澳沙利铂抗癌活性高的原因. 其对胃肠癌细胞株及顺铂耐药细胞株等有显著的抑制作用^[10]. 同时一些证据表明可抑制二氢嘧啶脱氢酶(5-FU代谢过程的主要酶)的活性, 因此他和氟脲嘧啶联用具有协同作用^[11-12], 四氢叶酸钙又能增强氟脲嘧啶

■同行评价

本文探讨了新辅助化疗对于仅有肝转移不能手术的大肠癌患者的治疗效果, 表明通过新辅助化疗能明显提高患者的手术切除率, 延长患者的生存期, 研究具有一定的临床意义.

的细胞毒作用,本临床研究表明澳沙利铂,四氢叶酸钙和氟脲嘧啶方案对结直肠癌具有较高的有效率(56%),同时毒副反应也能耐受。能使部分大肠癌仅有肝转移又不能手术的患者,赢得了手术机会,延长了生存时间,提高了生存率。Adam *et al*^[13]应用新辅助化疗治疗701例大肠癌患者,提高了手术率,取得了较好的疗效。通过本临床研究主要证实,通过新辅助化疗可以使部分对化疗有反应的,仅有肝转移不能手术切除的大肠癌患者转化为能全部或部分切除。尽管手术治疗组还有很高的复发率(82%),但手术治疗组还有50%的3 a生存率,因此可以明显延长患者的生存时间。对于手术的指征有时还很难把握和界定,原本我们想对肝转移不能手术的指征进行标准化,但实际过程中很难,因此我们通过外科治疗组讨论的方式进行区分,这需要在以后的工作中不断总结提高。

4 参考文献

- 1 Weiss L, Grundmann E, Torhorst J, Hartveit F, Moberg I, Eder M, Fenoglio-Preiser CM, Napier J, Horne CH, Lopez MJ. Haematogenous metastatic patterns in colonic carcinoma: an analysis of 1541 necropsies. *J Pathol* 1986; 150: 195-203
- 2 Finan PJ, Marshall RJ, Cooper EH, Giles GR. Factors affecting survival in patients presenting with synchronous hepatic metastases from colorectal cancer: a clinical and computer analysis. *Br J Surg* 1985; 72: 373-377
- 3 Goslin R, Steele G Jr, Zamcheck N, Mayer R, MacIntyre J. Factors influencing survival in patients with hepatic metastases from adenocarcinoma of the colon or rectum. *Dis Colon Rectum* 1982; 25: 749-754
- 4 Wagner JS, Adson MA, Van Heerden JA, Adson MH, Ilstrup DM. The natural history of hepatic metastases from colorectal cancer. A comparison with resective treatment. *Ann Surg* 1984; 199: 502-508
- 5 Adson MA, van Heerden JA, Adson MH, Wagner JS, Ilstrup DM. Resection of hepatic metastases from colorectal cancer. *Arch Surg* 1984; 119: 647-651
- 6 Raymond E, Chaney SG, Taamma A, Cvitkovic E. Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies. *Ann Oncol* 1998; 9: 1053-1071
- 7 Bleiberg H. Oxaliplatin (L-OHP): a new reality in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998; 77 Suppl 4: 1-3
- 8 Jennerwein MM, Eastman A, Khokhar A. Characterization of adducts produced in DNA by isomeric 1,2-diaminocyclohexaneplatinum(II) complexes. *Chem Biol Interact* 1989; 70: 39-49
- 9 Scheeff ED, Briggs JM, Howell SB. Molecular modeling of the intrastrand guanine-guanine DNA adducts produced by cisplatin and oxaliplatin. *Mol Pharmacol* 1999; 56: 633-643
- 10 Jin ML, Chen Q, Cheng FQ, Chen W, Chen L, Pan LX, Yang YF. Oxaliplatin in combination with LV5FU2 for advanced/metastatic gastric cancer-a multicenter study. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2003; 25: 172-174
- 11 孙燕, 周际昌. 临床肿瘤内科学. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 336-348
- 12 Fischel JL, Etienne MC, Formento P, Milano G. Search for the optimal schedule for the oxaliplatin/5-fluorouracil association modulated or not by folinic acid: preclinical data. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 2529-2535
- 13 Adam R, Avisar E, Ariche A, Giachetti S, Azoulay D, Castaing D, Kunstlinger F, Levi F, Bismuth F. Five-year survival following hepatic resection after neoadjuvant therapy for nonresectable colorectal. *Ann Surg Oncol* 2001; 8: 347-353

电编 李琪 编辑 张焕兰