

中医药治疗功能性胃肠病大有可为

张声生, 杨 静

张声生, 杨静, 首都医科大学附属北京中医医院消化中心 北京市 100010

张声生, 教授, 主任医师, 医学博士, 主要从事中西医结合消化病临床与实验研究。

国家中医药管理局消化重点学科及北京市中医消化特色诊疗中心项目, No. 国中医药2001-38

通讯作者: 张声生, 100010, 北京市东城区美术馆后街23号, 首都医科大学附属北京中医医院消化中心, zss2000@sohu.com
电话: 010-52176634 传真: 010-52176720

收稿日期: 2007-07-13 修回日期: 2007-09-13

There is a large room for traditional Chinese medicine in treatment of functional gastrointestinal disorders

Sheng-Sheng Zhang, Jing Yang

Sheng-Sheng Zhang, Jing Yang, Center of Digestive Disease, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100010, China

Supported by: the Key Digestive Disease Specialty of Integrated Traditional and Western Medicine granted by State Administration of Traditional Chinese Medicine and Beijing Characteristic Diagnosis and Treatment Center of Digestive Diseases of Integrated Traditional and Western Medicine, No. 2001-38

Correspondence to: Professor Sheng-Sheng Zhang, Center of Digestive Disease, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital University of Medical Sciences, 23 Art Gallery Back Street, Dongcheng District, Beijing 100010, China. zss2000@sohu.com

Received: 2007-07-13 Revised: 2007-09-13

Abstract

Functional gastrointestinal disorders (FGIDs) are the most common diseases in gastroenterology clinics. The incidence rate of FGIDs is 34.6% according to a Western epidemiological survey. FGID is of extensive concern to the domestic and international medical science field because of its high incidence rate among the common populations, affecting the living quality of sufferers to different extents, and also because of the high expenses of diagnosis and treatment. Until now, the pathogenesis of FGIDs remains unclear. Disorders of gastrointestinal motility (DGIMs), organ hypersensitivity, brain-gut interactions, mucosal inflammation and immune, psychological and social factors are

generally accepted as the causes of FGIDs.

At present, there is no satisfactory treatment in Western medicine, merely symptomatic treatments and combination therapy. In traditional Chinese medicine (TCM), the cause of FGIDs is closely connected with the functional disorder of the liver and spleen. The basic pathogenesis is stagnation of liver qi and dysfunction of the spleen in transportation. A holistic view and syndrome differentiation have been applied to the treatment of FGIDs to regulate organ function and achieve balance of yin and yang, which is the healthy condition of the body. A lot of clinical researches have shown that the curative effect of TCM in FGIDs treatment is significant.

Key Words: Functional gastrointestinal disorders; Traditional Chinese medicine

Zhang SS, Yang J. There is a large room for traditional Chinese medicine in treatment of functional gastrointestinal disorders. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(33): 3457-3461

摘要

功能性胃肠病(FGIDs)是消化门诊最常见的疾病, 西方国家流行病学调查显示其发病率为34.6%。FGIDs因在普通人群中发病率高、不同程度地影响患者的生活质量及诊治的费效比高而受到国内外医学界的广泛关注。FGIDs的病因和发病机制尚不完全清楚, 目前一般认为其病因主要有胃肠运动异常、内脏敏感性增高、脑肠互动、黏膜炎症与免疫及心理社会因素等。西医目前尚缺乏疗效满意的治疗方案, 主要采用对症治疗和综合治疗。中医认为本病的发生与肝、脾两脏功能失调关系最为密切, 基本病机为肝气郁结和脾失健运, 治疗上运用中医的整体观、辨证论治, 综合调理脏腑功能, 使机体达到“阴平阳秘”的健康状态。大量的临床研究显示, 中医药在FGIDs的治疗上具有较好的效果。

关键词: 功能性胃肠病; 中医药治疗

■背景资料

功能性胃肠病(FGIDs)在普通人群中发病率高, 严重影响了患者的生活质量。但是, 由于FGIDs的病因和发病机制尚不完全清楚, 目前西医尚缺乏疗效满意的治疗方案。而中医从整体出发, 辨证论治, 调节脏腑气血阴阳, 在FGIDs的治疗上, 体现出了明显的优势。

■研发前沿
大量临床研究证实中医药治疗FGIDs疗效显著。目前仍需加强基础理论与实验研究力度,运用现代科技手段深入探讨中医药治疗FGIDs的机制,使中医药的疗效能为国内外医学界所接受。

张声生, 杨静. 中医药治疗功能性胃肠病大有可为. 世界华人消化杂志 2007;15(33): 3457-3461
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3457.asp>

0 引言

功能性胃肠病(functional gastrointestinal disorders, FGIDs)是一组以胃肠功能障碍为主的全身性疾病,主要表现为腹痛、腹胀、恶心、早饱、呕吐、腹泻及排便困难等。国外有文献报道FGIDs的患病率为34.6%,就诊率为62.1%^[1]。国内流行病学调查显示^[2],功能性消化不良(FD)患病率为19.8%,肠易激综合征(IRS)患病率为8.3%,功能性腹胀患病率为11.0%,功能性腹泻患病率为4.1%,功能性便秘患病率为10.1%。FGIDs因在普通人群中发病率高,不同程度地影响患者的生活质量及诊治的费效比高而受到国内外医学界的广泛关注。由于FGIDs的病因和发病机制尚不完全清楚,西医目前尚缺乏疗效满意的治疗方案。而中医以其独特的理论体系,能够对本病的病因病机做出详细阐述,并谨守病机,辨证论治,使失调的脏腑气血阴阳恢复平衡。大量的临床研究表明,中医药在FGIDs的治疗上具有较好的效果,体现出了明显的优势。

1 西医学在FGIDs方面的研究概况

在1999年国际罗马会议上,胃肠病学者对1990年提出的Rome I标准进行修改完善,并确立了普遍认同的Rome II标准^[3]。之后,各国胃肠病学专家根据Rome II标准颁布后FGIDs神经胃肠病学领域的研究进展及临床应用后的反馈结果,对Rome II标准作了较大的修改^[4],于2006年颁布了Rome III标准。根据最新颁布的Rome III标准,按不同的部位将功能性胃肠病分为功能性食管疾病、功能性胃十二指肠疾病、功能性肠道疾病、功能性胆道和Oddi括约肌功能障碍、功能性肛门直肠疾病及新生儿/婴幼儿、儿童和青少年功能性疾病^[5]。临床实践中可见多种FGIDs症状间重叠与并存,如患者有上腹不适、饱胀等FD的表现,又有腹痛、腹胀和便秘或腹泻等便秘型或腹泻型IRS的表现,有的表现为胃食管反流病(GERD)与FD或IRS的重叠表现^[6]。国外报道,约有1/3-2/3的IRS患者合并有FD症状^[7]。这些疾病的发生部位不同,症状不同,但可能有共同的发病机制,如胃肠动力异常,内脏感觉过敏、脑肠轴作用、黏膜炎症与免疫及精神心理因素等。随着对心理生物医学模式认识的

深入,人们逐渐认识到中枢在FGIDs发病中的重要性,神经胃肠病学成为近年来研究的重点。目前认为,FGIDs表现出的动力和感觉功能的障碍,是基于异常的神经胃肠病学基础,即胃肠动力与感知的神经网络调节系统的异常,包括神经递质的基础。消化道感染和炎症与FGIDs发病的密切关系构成了脑-肠轴调节中的周围环节,同时各种原因引起的心理生理异常是FGIDs脑-肠轴调节重要的中枢环节^[8]。

在治疗上,西医主要以对症治疗为主,常选用促动力剂、内脏感觉调节剂、抗焦虑剂和抗抑郁剂以及心理治疗等。常用的促胃肠动力药有甲氧氯普胺、多潘立酮、莫沙必利等。多潘立酮为外周多巴胺受体阻滞剂,通过拮抗胃肠道多巴胺受体,特异性地作用于上消化道,可显著增强胃蠕动,促进胃排空,增加胃窦收缩次数,协调胃与十二指肠运动^[9]。莫沙必利为选择性5-HT₄受体激动剂,特异性作用于上消化道,促进上消化道运动,因其无多巴胺D₂受体拮抗作用,故具有更好的作用选择性^[10]。目前研究较多的内脏感觉调节剂有5-羟色胺类制剂和阿片肽受体等。选择性5-羟色胺能制剂能够改善胃的容受性受损和结肠转运减慢,以及内脏敏感性增高等病理状态,同时具有改善胃肠动力和调节内脏感觉两种疗效。对FD、IRS及功能性便秘等有较好疗效。阿片肽受体广泛存在于胃肠黏膜和黏膜下,参与内脏感觉传出和传入信号的整合。该受体的激动可阻断胃肠道传出神经,抑制结肠等内脏的神经反射,减少周围有害刺激对中枢的作用,减轻痛觉,同时不会产生药物依赖^[11]。随着生物-心理-社会模式的转变,人们逐渐认识到精神心理因素在FGIDs的发病中起到的重要作用,抗焦虑、抗抑郁药物、心理治疗等综合治疗的临床意义得到了肯定^[12-13]。

尽管西医在FGIDs的发病机制及治疗上有了一定的研究进展,但目前仍无法完全阐述清楚其发病机制,并缺乏明显有效的治疗方案。有些西药由于存在严重的不良反应,限制了其在临床的应用,如西沙必利有并发心律失常及QT间期延长的危险^[14];近期,选择性5-HT₄受体激动剂替加色罗因在治疗中存在增加心血管缺血事件的风险,而被暂停在美国、加拿大以及我国的生产、销售和使用。因此,寻找一个安全有效的治疗FGIDs的方案是目前亟待解决的问题,而中医药在这方面将会有所作为。

2 中医对FGIDs病因病机及证候学的研究

早在《内经》中对该症状群就有类似的记载, 如《素问·六元正经大论》说: “木郁之发……民病胃脘当心而痛, 上支两胁, 膈咽不通, 食欲不下”; 《灵枢·胀论》中说: “胃胀者, 腹满, 胃脘痛, 鼻闻焦臭, 妨于食, 大便难”。现代中医认为FGIDs应分别归于胃脘痛、嘈杂、痞满、返酸、呕吐、泄泻、便秘等病范畴。程彬彬^[15]认为, FGIDs的病因总不外乎中医所说的内因、外因、不内外因3种。内因即患者的体质因素, 以先天禀赋为主, 受后天调摄和疾病的影响; 外因是指气候、环境、病原微生物等因素; 不内外因则是饮食起居失宜、情志过度、劳逸不均等社会、心理因素。外因和不内外因常协同作用于内因而导致发病, 其病机总属肝胆疏泄功能失常和/或脾胃运化功能失常。卜平 *et al*^[16,18]和时乐 *et al*^[17]分别对FD、IBS以及FD与IBS重叠复合型患者进行证候及病因病机分析, 结果显示FGIDs的发病与中医六淫风、寒、暑、湿、燥、火均有关, 其中与寒冷关系最为密切, 饮食因素中与脂餐、寒冷饮食关系最为密切, 其次为海鲜或辛辣食物, 精神因素主要与忧郁多虑有关。从证候病机分布看, 与脾关系最为密切, 其次为肝, 再次是肾, 从而提出本病的病机关键是脾虚, 补益脾胃应贯穿本病整个治疗过程。我们查阅了1990-2006-09IBS腹泻型有关辨证分型、论治的文章共725篇。选择文献报道病例数大于30例的相关文献145篇, 对其辨证分型进行统计。结果显示, IBS腹泻型的中医辨证分型有肝气郁结(滞)、肝脾不和(调)、肝郁脾虚、脾虚湿盛等25个证型, 其中以肝郁脾虚、脾胃虚弱、肝气郁结(滞)、肝脾不和(调)、脾虚湿盛等5个证候类型出现的频率最多, 占总病例数的80.561%^[19]。可见肝脾两脏功能失调在IBS腹泻型的发病中起了关键作用。

3 FGIDs的中医药治疗策略

中医药治疗FGIDs总是基于整体观念和辨证施治的原则, 强调针对不同病因病机, 因时、因地、因人制宜, 主要体现在以下几个方面。

3.1 健运脾胃, 升清降浊 FGIDs的发病机制之一是胃肠动力异常, 而中医认为胃肠的运动与脾胃的气机升降有直接的相关性。叶天士云: “脾宜升则健, 胃宜降则和”, 是指脾主运化水谷精微, 胃主受纳腐熟水谷, 二者互为表里, 一纳一动, 一升一降, 相互合作, 密切配合, 共同完成饮

食水谷的消化, 及营养的输布。赵荣莱^[20]认为气之在人, 贵在调和, 阴阳二气应调和, 升与降、出与入应协调一致。若阴阳偏胜, 气机逆乱, 就会致病。脾主升清, 胃主降浊, 脾胃升降, 不失其常则安, 若清气不升反降为泄, 如肠易激综合征、功能性腹泻。浊气不降反逆, 为胀, 为吐, 为噎, 为便秘, 如功能性消化不良、功能性呕吐、功能性便秘。若“升降之气, 上下不得交通”, 咽膈之间, 气不出入, 胸膈满闷, 甚或噎塞者, 为食管病。气结两胁胀痛, 为胆胰病。若腹满胀痛, 为功能性腹痛、腹胀。因此在治疗FGIDs时, 提出升脾、降胃、通利气机、顺气和中、通降镇逆等法。对阳气不升、浊气不降、气滞不行、湿浊阻滞、脘腹胀满难已者, 推荐升清阳、行气滞、化湿泄浊法。对胃阴不足、胃气不降者, 给予养胃阴, 即所谓“津液来复, 使之通降”。白长川 *et al*^[21-23]认为脾胃虚弱, 气机升降失常是FD的主要病机。脾虚气滞为其主要证型, 在临床上依据和胃降逆法的治则组方, 自拟和胃汤(党参、白术各15 g, 炒莱菔子25 g, 陈皮、川朴、枳实各20 g, 柴胡、炒白芍、姜半夏各15 g, 炙甘草10 g)治疗FD。通过临床及动物实验研究证明, 该方对胃排空及胃肠激素的分泌具有明显作用, 提示中药通过整体调节作用, 来影响体液的神经递质和胃肠激素的调节作用。胡珂 *et al*^[24]采用调理脾胃升降中药治疗FD, 取得了良好的临床疗效, 同时还对治疗前后空腹血浆胃动素进行了比较。结果显示调理脾胃升降中药能明显改善FD患者血浆胃动素过低状况。从1994年至今, 我们在对FD的研究中发现属脾虚气滞型者居多, 外邪侵袭、饮食所伤、劳倦思虑、情志不畅等原因均可拂郁气机, 损伤脾胃, 致使脾胃升降失司, 进而导致胃肠功能紊乱, 出现一系列症状。脾虚气滞为基本病机, 健脾理气为基本治法。根据以上理论, 我们研制出院内制剂健脾消胀冲剂, 并对本方治疗脾虚气滞型FD进行了的双盲、双模拟、随机、平行对照的多中心临床研究。结果证明健脾消胀冲剂治疗FD脾虚气滞型患者, 其症状均比治疗前明显好转, 治疗后的胃排空率也比治疗前明显改善, 与西药莫沙必利比较无明显差异^[25]。

3.2 疏肝解郁, 调和肝脾 现代医学非常重视精神心理因素与功能性疾病的关系, 特别是与胃肠功能性疾病之间的关系。随着PET和fMRI技术的应用, 许多研究发现IBS患者肠道痛觉感受与大脑皮质的区域活动有关, 为IBS脑肠

■相关报道
相关的报道有很多, 卜平 *et al*分别对FD、IBS以及FD与IBS重叠复合型患者进行证候及病因病机分析, 结果显示FGIDs的发病与感受外邪、饮食不节、情志失调等有关; 从证候病机分布看, 与脾关系最为密切, 提出本病的病机关键是脾虚。

■应用要点

目前认为FGIDs的发病是多因素作用的结果,而用于本病的西药多只针对单一因素起作用,疗效有限。而中药在“整体观念,辨证论治”原则指导下,通过复方加减,综合调理脏腑功能,使机体达到阴平阳秘的状态,中医药应成为治疗FGIDs的主要治疗手段。

相互作用提供了客观证据^[26-27]。这些与中医理论情志致病极其相似。中医早就发现了肝与脾之间的乘克关系。张仲景指出“见肝之病,知肝传脾,当先实脾”。清代叶天士在《临证指南医案》中强调:“肝为起病之源,胃为传病之所”,情志不畅,肝气郁结,失其疏泄之职,乘脾犯胃,除有精神情志异常外,常出现纳呆、嗳气、腹胀、脘腹痛、腹泻等消化不良症状。凌江红^[28]对中医“肝主疏泄”与脑肠肽的相关性进行了理论探讨,认为中医肝主疏泄理论与西医脑肠肽理论可以说在某种程度上是异曲同工,殊途同归的,二者均注重有机整体,相互关照,中医“肝主疏泄”的功能可能是调节脑肠肽的核心。周福生 *et al*^[29]提出心胃相关理论,强调心神与胃肠功能之间相互影响的关系。周教授认为心主神明,乃精神所舍,人体的各种情志活动,都是心神活动的组成部分,即情志发于心而应于五脏。胃肠道的活动受心神的制约与调控,情绪波动则影响心,而思虑过度则劳其神,心神失调则伤其脾也碍其胃,导致脾胃纳运功能异常,出现纳呆、腹胀、便溏或便秘等症状,故主张用调神和胃法治疗FGIDs。张正利 *et al*^[30]通过手工检索结合使用中国生物医学数据库、中国学术期刊光盘检索系统,对1981年以来中医药治疗IBS文献进行收集分析,共检出文献254篇。在其中的80篇有关辨证论治的文献中,直接言明应用调和肝脾治法,如疏肝健脾、扶脾抑肝、理气健脾等35篇;而间接应用该法,如健脾行气化湿、健脾行气温中及调理脾肾中用疏肝健脾药物的有18篇。可见围绕肝脾不和治疗IBS确实是基本治法。

3.3 寒温并用 辛开苦降 FGIDs病程较长,病势缠绵,反复发作,症状复杂多变。有些患者表现为胸脘痞闷,心烦口苦等上焦有热之证,同时又存在腹胀肠鸣,绞痛泄利等下焦虚寒之证。此为寒热错杂,虚实互见,如《灵枢·师传》中所说:“胃中寒,肠中热,则胀而且泄;胃中热,肠中寒,则疾饥,小腹痛胀”。究其病因,多由苦寒药物损伤脾阳,或素体脾胃虚弱,正气抗邪无力,于是热由外陷而寒自内生,寒热错杂于中焦,脾胃升降因而失和,从而出现一系列气机逆乱,阴阳不和之临床见症。如胃失和降而见恶心呕吐,脾不升清而有腹泻肠鸣;上下阴阳不能交通又见上热下寒证,寒热互结心下更见心下痞满之症等^[31]。中医治疗此类病证常采用辛开苦降之法,即将辛热(温)和苦寒(凉)两种药性截然相反的药物配伍使用,同

组一方,以起到平调寒热,燮理阴阳,调畅气机的作用^[32]。辛开苦降法之代表方剂当首推《伤寒论》中的半夏泻心汤,全方由半夏、黄芩、干姜、人参、黄连、大枣、甘草七味中药组成,具有寒热互用以和其阴阳、苦辛并进以调其升降、补泻兼施以固其虚实的配伍特点^[33]。胡雄丽 *et al*^[34]通过临床及实验研究探讨半夏泻心汤治疗功能性消化不良(寒热错杂型)的临床疗效及患者空腹血浆胃动素(MTL)的影响,观察到半夏泻心汤在取得疗效的同时亦有效提高了血浆MTL的浓度,提示半夏泻心汤改善胃肠紊乱的机制可能是通过提高患者血浆MTL水平而促进胃的运动增强。除半夏泻心汤外,还有生姜泻心汤、乌梅丸等亦可用于治疗FGIDs之证属寒热错杂者^[35]。

此外,FGIDs病程较长,病势缠绵,病久伤肾,引起脾肾两虚,或肝火灼阴,阴津暗耗,或入络伤血,气滞血瘀。故根据患者的病情变化,在治疗上还兼以温阳补肾、益气养阴或活血化瘀等法^[36-38]。正如张仲景所说:“观其脉证,知犯何逆,随证治之”。

总之,目前认为FGIDs的发病与胃肠动力异常,内脏感觉过敏、脑肠轴作用、黏膜炎症与免疫及精神心理因素等有关,是多因素作用的结果。而用于本病的西药多只针对单一因素起作用,疗效远不能令人满意。而中药在“整体观念,辨证论治”原则指导下,可通过复方加减,综合调理脏腑功能,使机体达到“阴平阳秘”的健康状态。此外,FGIDs症状复杂多变,每个FGIDs患者之间的症状又各不相同,因此,在治疗中十分强调个体化及综合治疗的原则。中医的辨证论治体现了个体化原则,而整体观念在综合治疗中得到了充分发挥。在临证遣方用药之时,紧守这两大原则,常能获得满意疗效。

笔者认为,中医药治疗FGIDs具有明显的特色和优势,但在许多方面也还面临着不少问题。首先,目前FGIDs的中医病名和辨证分型混乱,疗效判定标准尚不统一,难以进行客观的疗效评价,故急需进行多中心合作的较大规模的流行病学调查,探讨FGIDs的证候规律,建立统一的辨证分型标准及疗效判定标准。其次,现有中医药治疗FGIDs的文献报道多为临床总结或经验介绍,而严格设计的随机双盲研究相对较少,进行设计严谨的大样本前瞻性研究,并加强远期疗效和复发率的动态观察研究是我们下一步研究的主要方面之一。再次,基础

理论与实验研究力度明显不够, 缺乏中医病证的客观化指标研究与深入的药理药效学研究, 因此还需运用现代科技手段深入探讨中医药治疗FGIDs的机制, 使中医药的疗效能为国内外医学界所接受. 我们相信, 随着研究的进一步深入, 中医药在治疗FGIDs上将会发挥更大的作用.

4 参考文献

- Koloski NA, Talley NJ, Boyce PM. Epidemiology and health care seeking in the functional GI disorders: a population-based study. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2290-2299
- 平丽, 李瑜元, 聂玉强, 贾林. 功能性胃肠病患病情况调查. *实用医学杂志* 2003; 19: 424-426
- Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome II process. *Gut* 1999; 45 Suppl 2: II1-II5
- Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology* 2006; 130: 1377-1390
- 罗马委员会. 功能性胃肠病罗马III诊断标准. *胃肠病学* 2006; 11: 761-765
- 柯美云, 宋志强. 功能性胃肠病症状重叠的新思考. *胃肠病学* 2006; 11: 449-450
- Cremonini F, Talley NJ. Review article: the overlap between functional dyspepsia and irritable bowel syndrome-a tale of one or two disorders? *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 7: 40-49
- 柯美云, 方秀才. 功能性胃肠病研究进展与罗马III. *胃肠病学* 2006; 11: 709-712
- 上海多潘立酮多中心临床研究协作组. 多潘立酮片治疗功能性消化不良的临床研究. *中华消化杂志* 2003; 23: 220-222
- Mine Y, Yoshikawa T, Oku S, Nagai R, Yoshida N, Hosoki K. Comparison of effect of mosapride citrate and existing 5-HT₄ receptor agonists on gastrointestinal motility in vivo and in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 283: 1000-1008
- 肖英莲, 陈旻湖. 功能性胃肠病的药物治疗进展. *中国处方药* 2005; 11: 41-43
- Jackson JL, O'Malley PG, Tomkins G, Balden E, Santoro J, Kroenke K. Treatment of functional gastrointestinal disorders with antidepressant medications: a meta-analysis. *Am J Med* 2000; 108: 65-72
- 唐艳萍, 姚宏昌, 李方儒, 马桂凤, 崔莉红, 刘东颖. 功能性消化不良患者心身综合治疗的临床研究. *中华消化杂志* 2002; 22: 247-249
- 刘新光. 功能性胃肠疾病的药物治疗. *中国实用内科杂志* 2005; 25: 277-280
- 程彬彬, 谢昌仁. 对功能性胃肠病的辨治特色. *光明中医* 2007; 22: 17-19
- 卜平. 功能性消化不良证候病机分析. *江苏中医药* 2007; 39: 1-2
- 时乐, 卜平, 郑新梅, 张瑜, 李瑶瑶, 徐敏. 211例肠易激综合征证候病机的研究. *中医研究* 2005; 18: 24-26
- 卜平, 时乐, 徐敏, 张妮娜. 72例功能性胃肠病复合证候病机研究. *中医杂志* 2005; 46: 451-453
- 吴兵, 张声生. 肠易激综合征腹泻型的证候学研究进展. *北京中医* 2007; 26: 312-324
- 赵荣荣. 脾胃升降与功能性胃肠病. *北京中医* 2007; 26: 90-92
- 白长川, 李吉彦, 丛振日, 张文辉, 马超, 吴非, 王庆莉, 李翌萌. 和胃汤对FD患者的胃排空疗效观察. *中国中医基础医学杂志* 2004; 10: 46-47
- 白长川, 马超, 李吉彦. 和胃汤对功能性消化不良患者胃动素和胃泌素的影响. *中国中西医结合消化杂志* 2003; 11: 373-374
- 白长川, 李传勋, 李吉彦, 丛振日. 和胃煎剂对小鼠胃排空的影响及机制实验研究. *中国中医基础医学杂志* 2004; 10: 42-43
- 胡珂, 张小萍, 何承志. 中药调理脾胃升降治疗功能性消化不良的临床研究. *实用中西医结合临床* 2006; 6: 23-24
- 刘汶, 张声生, 唐博祥, 陈明, 于东元, 王力, 李唯, 胡锦丽, 刘金城, 孙晓红, 张秀兰, 王雪萍, 孙涛, 肖海娟, 张知非, 王伟, 曲瑞瑶, 李乾构, 柯美云. 健脾消胀冲剂治疗功能性消化不良多中心临床研究. *北京中医药大学学报(中医临床版)* 2006; 13: 3-5
- Ringel Y, Drossman DA, Turkington TG, Bradshaw B, Hawk TC, Bangdiwala S, Coleman RE, Whitehead WE. Regional brain activation in response to rectal distension in patients with irritable bowel syndrome and the effect of a history of abuse. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 1774-1781
- Mertz H, Morgan V, Tanner G, Pickens D, Price R, Shyr Y, Kessler R. Regional cerebral activation in irritable bowel syndrome and control subjects with painful and nonpainful rectal distention. *Gastroenterology* 2000; 118: 842-848
- 凌江红. 肝主疏泄与脑肠肽的相关性. *中国中西医结合消化杂志* 2003; 11: 233-234
- 周福生, 张庆宏, 黄志新, 吴文江. 浅论心胃相关理论与胃肠功能性疾病的相关性. *贵阳中医学院学报* 2004; 26: 8-9
- 张正利, 蔡淦. 20年来中医药治疗肠易激综合征回顾分析. *中医杂志* 2001; 42: 373-375
- 陈业农, 俞丽华, 唐巍, 郑景辉, 王键. 辛开苦降法与临床脾胃病证治特点辨析. *中医药临床杂志* 2007; 19: 70-71
- 马玉芳, 龙一梅, 李遇春. 辛开苦降法探析. *浙江中医杂志* 2006; 41: 66-68
- 邓中甲. 方剂学. 第1版. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 88-89
- 胡雄丽, 朱迪, 周虹, 熊湘平. 半夏泻心汤治疗寒热错杂型功能性消化不良的临床研究. *湖南中医学院学报* 2006; 26: 40-41
- 牛久旺. 生姜泻心汤加减治疗肠易激综合征34例. *中国中医急症* 2005; 14: 99
- 严光俊, 桂壮. 活血化瘀法治疗功能性消化不良临床观察. *湖北中医杂志* 2002; 24: 20
- 刘维庆. 知柏地黄丸加味治疗肠易激综合征23例. *江西中医药* 2004; 5: 51
- 吴华清, 姚保泰. 温补脾肾法治疗腹泄型肠易激综合征疗效观察. *山东中医药大学学报* 2006; 30: 367-368

■同行评价
本文内容全面, 行文流畅, 有一定的可读性和参考价值.

编辑 何燕 电编 李军亮

中国辽宁地区人群幽门螺杆菌感染菌株与相关性胃疾病的关系

宫月华, 柳云恩, 孙丽萍, 董楠楠, 袁媛

■背景资料
有证据表明, *H. pylori* 不同分离株间存在巨大的遗传变异, 这些遗传学的差别影响毒力因子的功能和抗原性, 对于产生不同的临床结局具有重要作用。因此研究 *H. pylori* 的毒力相关基因对于揭示其致病机制具有非常重要的意义。

宫月华, 柳云恩, 孙丽萍, 董楠楠, 袁媛, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所第三研究室 辽宁省沈阳市 110001
宫月华, 2003年毕业于中国医科大学肿瘤学硕士, 助理研究员, 主要从事消化道胃癌病因、早期诊断及综合防治研究。
国家十五科技攻关基金资助项目, No. 2004BA703B04-2
国家自然科学基金资助项目, No. 30572131
通讯作者: 袁媛, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所第三研究室。
yyuan@mail.cmu.edu.cn
电话: 024-83282153 传真: 024-83282292
收稿日期: 2007-04-10 修回日期: 2007-10-10

Relationship between *Helicobacter pylori* infection and associated gastric diseases in Liaoning Province of China

Yue-Hua Gong, Yun-En Liu, Li-Ping Sun, Nan-Nan Dong, Yuan Yuan

Yue-Hua Gong, Yun-En Liu, Li-Ping Sun, Nan-Nan Dong, Yuan Yuan, the Third Department of Cancer Institute of the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Supported by: the National Key Technologies R&D Program of China during the 10th Five-Year Plan Period, No. 2004BA703B04-2 and National Natural Science Foundation of China, No. 30572131
Correspondence to: Professor Yuan Yuan, Cancer Institute of the First Affiliated Hospital of China Medical University, 155 Nanjing North Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. yyuan@mail.cmu.edu.cn
Received: 2007-04-10 Revised: 2007-10-10

Abstract

AIM: To explore the relationship between *Helicobacter pylori* infection and associated gastric diseases.

METHODS: Gastric biopsies were taken from 491 subjects, which were divided into supreficial gastritis (GS), atrophic gastritis (GA), gastric ulcer (GU) and gastric cancer (GC) groups, and 222 *H. pylori* strains isolated from these patients were studied by PCR for differences in their genotypes *cagA*, *vacA*, and *iceA*. Three biopsies were taken for pathological diagnosis, from the

gastric antrum, corpus and angularis, respectively.

RESULTS: The *H. pylori* m2 infection rate in GA, GU and GC groups was 43.1%, 18.2% and 17.9%, respectively, and there was a statistical difference ($P = 0.015$ and $P = 0.020$). Twenty-two s1m2 subtype strains (44.9%) were found in GA group and there was a statistical difference compared with GU and GC groups ($P = 0.039$) but not with GS group ($P = 0.067$).

CONCLUSION: There is a positive relationship between infection with *H. pylori* s1m2 strain and GA.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Associated gastritis; Atrophic gastritis; Polymerase chain reaction

Gong YH, Liu YE, Sun LP, Dong NN, Yuan Y. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and associated gastric diseases in Liaoning Province of China. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(33): 3462-3467

摘要

目的: 探讨中国辽宁地区人群 *H. pylori* 致病基因的疾病相关性, 为揭示 *H. pylori* 的致病机制及监测 *H. pylori* 相关性胃疾病的高危人群提供线索。

方法: 选取胃黏膜活检标本491例, 分组浅表性胃炎(GS)、萎缩性胃炎(GA)、溃疡(GU)、胃癌(GC), 在微需氧的条件下, 培养出 *H. pylori* 222例, 并用标准的酚-氯仿方法提取菌种DNA后经聚合酶链反应及琼脂糖凝胶电泳对 *cagA*, *vacA*, *iceA* 基因亚型进行检测。同时取胃窦、体、角黏膜各1块, 经石蜡切片, HE染色, 行组织病理学诊断。

结果: GA组感染m2(43.1%)亚型菌株构成比最高, 与GU(18.2%)和GC(17.9%)组相比差异有统计学意义($P = 0.015$, $P = 0.020$), 与GS(30.00%)组相比差异没有统计学意义($P = 0.084$)。在GA组中, 感染s1m2亚型菌株有22例

(44.9%), 与本组病例中其他基因亚型相比差别均有统计学意义, 与GU、GC组感染s1m2亚型菌株相比差别有统计学意义($P = 0.039$), 与GS组相比差别没有统计学意义($P = 0.067$).

结论: 中国辽宁地区人群感染s1m2型菌株与萎缩性胃炎发生有关.

关键词: 幽门螺杆菌; 相关性胃疾病; 萎缩性胃炎; 聚合酶链反应

官月华, 柳云恩, 孙丽萍, 董楠楠, 袁媛. 中国辽宁地区人群幽门螺杆菌感染菌株与相关性胃疾病的关系. 世界华人消化杂志 2007;15(33): 3462-3467
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3462.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)在人的胃内定植, 是引起慢性胃炎的主要原因, 并与消化性溃疡、胃癌、B淋巴细胞相关性淋巴瘤的发生密切相关^[1]. 研究表明, 通常*H pylori*感染者发生浅表性胃炎很普遍, 但只有少数感染者会出现严重的临床结局, 如消化性溃疡、萎缩性胃炎、胃癌等. 这与环境因素, 宿主特性及*H pylori*致病因子的存在密切相关. DNA指纹图和限制性片段长度多态等方法研究表明, 在*H pylori*不同分离株间存在巨大的遗传变异, 其遗传异质性大于多种细菌^[2-3]. 有证据表明, 这些遗传学的差别影响毒力因子的功能和抗原性, 对于产生不同的临床结局具有重要作用^[4]. 特别是*H pylori*致病相关基因: 如*cagA*, *vacA*和*iceA*等的差异, 与感染的临床结局密切相关^[5-6].

H pylori *cag*毒力基因岛(*cagPAI*)大约由30几个基因构成, 毒素相关基因A(*cytotoxin-associated gene A*, *cagA*)位于致病岛的5'端, 编码分子质量为120-140 kDa蛋白质. 空泡毒素基因(*vaculating toxin gene A*, *vacA*)编码产物为空泡毒素, 是*H pylori*诱导体外胃上皮细胞产生空泡的主要毒素, 其基因包括信号区(s区)和中间区(m区). *vacA*基因的s区编码信号肽, 具有s1和s2两个不同的等位基因. s1又分为s1a, s1b, s1c. *vacA*基因的m区具有两个不同的等位基因, 分别为m1和m2, 其中前者又包括m1a, m1b, m1c; 后者包括m2a, m2b. 在西方国家的研究表明, *vacA*和*cagA*的出现与消化性溃疡密切相关, 然而在亚洲国家却未发现二者有相关性. 这种东西方之间的差异可能是由于不同地区感染的*H pylori*菌株基因结构的差异造成的. 感染*cagA*⁺菌株的

患者更容易发生消化性溃疡, 萎缩性胃炎及胃癌等^[7-10]. 在欧美一些地区, 特殊的*vacA* s1m1基因型菌株是致病性的标志, 这样的菌株在体外产毒活性高, 在体内可以引起严重的上皮细胞损伤^[11]. *vacA*和*cagA*基因全球分布的这种差异可能反应了不同地区报道的*vacA*和*cagA*基因型与临床结局关系的差别. 与上皮细胞接触而产生的基因(*induced by contact with epithelium*, *iceA*)有两个主要的等位基因变异, *iceA1*和*iceA2*^[12]. 这些变异的功能目前尚不清楚, 但*iceA1*基因与编码限制性内切酶的nlaIII具有同源性^[13]. 当细菌与胃上皮细胞接触时*iceA1*表达上调, 与消化性溃疡的发生有关^[12]. *iceA2*基因的功能目前尚不清楚.

中国辽宁地区*H pylori* *cagA*和*vacA*、*iceA*基因亚型菌株感染与胃疾病的关系如何至今尚无报道. 本研究拟通过了解中国辽宁地区*H pylori*致病基因型的分布, 探讨该地区细菌致病基因的疾病相关性, 为揭示*H pylori*的致病机制及监测*H pylori*相关性胃疾病的高危人群提供线索.

1 材料和方法

1.1 材料 选取1999-2004年在庄河地区接受胃镜普查患者活检标本355例, 男174例, 女181例, 年龄21-79(平均年龄49.33)岁. 沈阳临床胃镜活检标本136例, 男69例, 女67例, 年龄25-78(平均48.61)岁. 取新鲜胃黏膜4块, 其中3块(胃窦、体、角各1块)进行病理组织学检查, 另1块(胃窦)进行*H pylori*培养. 采用脑心浸液琼脂培养基(BHI agar, 美国Difco公司)培养, 其中包含70 g/L的脱纤维羊血, 4 g/L的添加剂(美国BD公司), 8 mg/L两性霉素B(美国Sigma公司), 5 mg/L磺胺增效剂(美国Sigma公司), 6 mg/L万古霉素(美国礼来公司).

1.2 方法

1.2.1 *H pylori*培养及阳性菌落的判定: 采用脑心浸液琼脂培养基培养, 放入37℃, 含50 mL/L O₂, 100 mL/L CO₂, 850 mL/L N₂, 相对湿度95%的培养箱中, 培养3-6 d后观察结果. 阳性菌落的判定通过培养基上生长的典型菌落, 革兰染色, *H pylori*通用型引物ureB检测出现阳性条带. 将收集到的菌落, 放入新鲜胃黏膜保存液中500 μL(胰蛋白酶消化的酱油肉汤粉末7.5 g+甘油50 mL+ddH₂O 200 mL), 吹打混匀, -70℃保存.

1.2.2 DNA的提取: 菌种离心, 10 000 g, 5 min, 弃上清, 加入318 μL TE缓冲液, 吹打均匀, 加入

■研发前沿
已有研究发现, 不同地区人群感染的*H pylori*菌株存在差异, 而*H pylori*致病相关基因如*cagA*, *vacA*和*iceA*等的差异, 与感染的临床结局密切相关. 本文探讨了中国辽宁地区*H pylori* *cagA*、*vacA*和*iceA*基因亚型菌株感染与胃疾病的关系, 为进一步揭示*H pylori*的致病机制及地域性特征提供线索和帮助.

■相关报道

西方国家的研究表明, *vacA* 和 *cagA* 的出现与消化性溃疡密切相关, 然而在亚洲国家却未发现二者有相关性. 这种东西方之间的差异可能是由于不同地区感染的 *H pylori* 菌株基因结构的差异造成的. *vacA* 和 *cagA* 基因全球分布的这种差异可能反应了不同地区报道的 *vacA* 和 *cagA* 基因型与临床结局关系的差别.

表 1 用于扩增 *H pylori* *cagA*, *vacA*, *iceA* 基因的PCR引物序列

扩增的基因序列	引物	引物序列(5'-3')	PCR产物的长度(bp)
<i>cagA</i>	CAGAF	GGCAATGGTGGTCTGGAGCTAGGC	324
	CAGAR	GGAAATCTTTAATCTCAGTTTCGG	
<i>vacA</i> s1和s2	VA1-F	ATGGAAATACAACAAACACAC	259/286
	VA1-R	CTGCTTGAATGCGCCAAAC	
m1a	VA3-F	GGTCAAAATGCGGTCATGG	290
	VA3-R	CCATTGGTACCTGTAGAAAC	
m1b	VAm-F3	GGCCCCAATGCAGTCATGGAT	291
	VAm-R3	GCTGTTAGTGCTAAAGAAGCAT	
m2	VA4-F	GGAGCCCCAGGAAACATTG	352
	VA4-R	CATAACTAGCGCCTTGAC	
<i>iceA1</i>	IceA1F	GTGTTTTTAACCAAAGTATC	247
	IceA1R	CTATAGCCASTYTCTTTGCA	
<i>iceA2</i>	IceA2F	GTTGGGTATATCACAATTTAT	229/334
	IceA2R	TTRCCCTATTTTCTAGTAGGT	

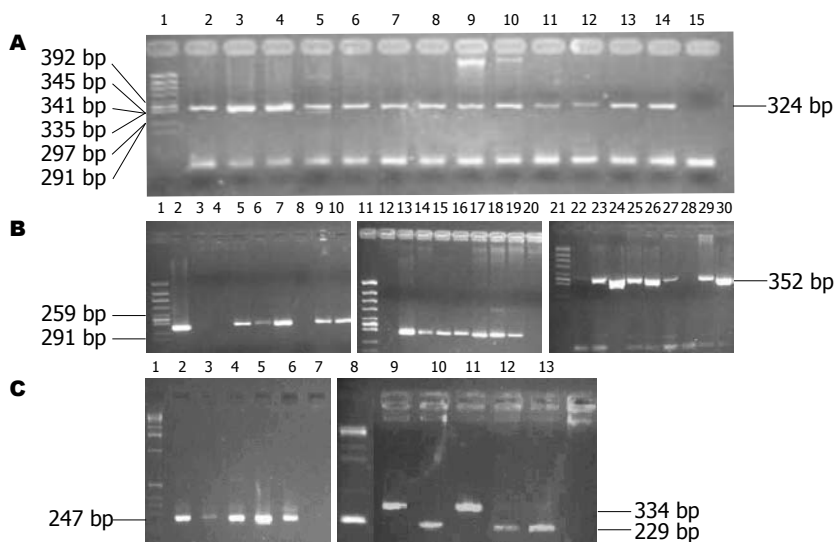


图 1 基因PCR产物琼脂糖凝胶电泳. A: *cagA*; 1: DNA分子质量标准; 2-14: *cagA* 阳性; 15: 阴性; B: *vacA* s, *vacA* m1b, *vacA* m2; 1: DNA分子质量标准; 2, 5, 6, 7, 9, 10: s1 (259 bp) 阳性; 3, 4, 8: s1 阴性; 11: DNA分子质量标准; 13-19: m1b (291 bp) 阳性; 12, 20: m1b (291 bp) 阴性; 21: DNA分子质量标准; 23-27, 29, 30: m2 (352 bp) 阳性; 22, 28: m2 阴性; C: *iceA*; 1, 8: DNA分子质量标准; 2, 3, 4, 5, 6: A1 (247 bp); 9, 10, 11, 12, 13: A2 (229或334 bp).

10% SDS 80 μ L, 20 g/L的蛋白酶K 2 μ L, 混匀. 55-60 $^{\circ}$ C, 水浴过夜, 加入等体积的酚: 氯仿: 异戊醇(25: 24: 1), 混匀, 离心10 000 g, 10 min. 吸取上层水相, 再加入等体积的氯仿: 异戊醇(24: 1), 重复以上两步一次. 吸上层水相, 加1/10体积3 mol乙酸钠轻摇. 加入2.5倍体积的预冷无水乙醇, -30 $^{\circ}$ C放置30 min或-20 $^{\circ}$ C 2 h; 10 000 g 15 min, 倒去上清, 或用无菌细玻璃棒搅缠出DNA, 700 mL/L乙醇洗2次. 待乙醇蒸干后重新溶于50-100 μ L TE缓冲液中.

1.2.3 *cagA*、*vacA*、*iceA*的聚合酶链反应: *H pylori*完整的DNA经琼脂糖凝胶电泳分析, 溴化乙锭染色观察. 聚合酶链反应体系为20 μ L. 其中包括10 pmol的引物, 0.5 μ L的基因组DNA, 4种dNTP各2.5 mmol/L, 2.5 U Taq聚合酶(大连宝

生物公司). 表1列出了PCR反应的引物序列及其预期片段大小. 其反应条件如下: *cagA*: 94 $^{\circ}$ C 1 min, 50 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 5 min; *vacA*: 94 $^{\circ}$ C 1 min, 52 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 5 min; *iceA*: 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 5 min. 扩增产物经20 g/L琼脂糖凝胶电泳分析, 紫外凝胶成像系统观察, 照相.

统计学处理 采用SPSS软件包进行 χ^2 或Fisher精确检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义.

2 结果

491例胃黏膜共培养出 *H pylori* 222例, 其中, 来自浅表性胃炎(GS)患者110例, 萎缩性胃炎(GA)51例, 溃疡(GU)33例, 胃癌(GC)28例.

2.1 *cagA*基因与胃疾病的关系 利用*cagA* 5'端

表 2 *H. pylori* 不同基因亚型在同一疾病中的分布 $n(\%)$

基因型	GS	GA	GU	GC	Total
<i>cagA</i> ⁺	103(93.6)	50(98.0)	33(100)	28(100)	214(96.4)
-	7(6.4)	1(2.0)	0(0)	0(0)	8(3.6)
<i>vacA</i> s1	101(91.8)	49(96.1)	28(84.8)	28(100)	206(92.8)
s2	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
m1b	23(20.9)	6(11.8)	4(12.1)	2(7.1)	35(15.8)
m2	33(30.0)	22(43.1) ^a	6(18.2) ^a	5(17.9) ^a	66(29.7)
m1bm2	50(45.4)	16(31.4)	17(51.5)	17(60.7)	100(45.0)
m ⁻	4(3.6)	7(13.7)	6(18.2)	4(14.3)	21(9.4)
s1m1b	19(18.8)	6(12.2)	2(7.1)	3(10.7)	30(14.6)
s1m2	30(29.7)	22(44.9) ^a	6(21.4)	6(21.4)	64(31.1)
s1m1bm2	48(47.5) ^a	14(28.6)	14(50.0) ^a	17(60.7) ^a	93(45.2)
s1m ⁻	4(4.0)	7(14.3)	6(21.4)	2(7.2)	19(9.2)
<i>iceA</i>					
A1	14(12.7)	9(17.6)	2(6.1)	2(7.1)	27(12.2)
A2	11(10.0)	2(3.9)	1(3.0)	4(14.3)	18(8.1)
A1A2	83(75.4)	40(78.4)	30(90.9)	21(75.0)	174(78.4)
A ⁻	2(1.8)	0(0)	0(0)	1(3.6)	3(1.4)

^a $P < 0.05$.

保守区域PCR引物(表1)对*cagA*基因进行检测(图1A). 在GS, GA, GU, GC中, *cagA*⁺菌株分别有103例(93.6%), 50例(98.0%), 33例(100%), 28例(100%). 在各类疾病组中都占有优势, 与同种疾病间*cagA*⁻菌株相比差异有统计学意义($P < 0.05$). *cagA*⁺菌株在各疾病组间分布差异没有统计学意义($P > 0.05$)(表2).

2.2 *vacA*基因与胃疾病的关系 利用特异性PCR引物对*vacA*基因s区进行检测(图1B), 在GS, GA, GU, GC中, *vacA* s1菌株分别有101(91.8%), 49(96.1%), 28(84.85%), 28(100%)例, 在各类胃疾病中均占优势, 未检出有*vacA* s2菌株(表2). *vacA* s1菌株在各疾病组间分布差异没有统计学意义($P > 0.05$). 本组病例检出的*vacA* m等位基因亚型有m1, m2, m1m2混合型及m⁻. GA组感染m2(43.1%)亚型菌株构成比最高, 与GU(18.2%)和GC(17.9%)组相比差异有统计学意义($P = 0.015$, $P = 0.020$), 与GS(30.0%)组相比差异没有统计学意义($P = 0.084$). 根据对*vacA* s区和m区的分析, 共检测到*vacA* s1m1b, *vacA* s1m2, *vacA* s1m1bm2, *vacA* s1m⁻等几种基因型组合. 在GS, GU, GC组中均以感染*vacA* s1m1bm2亚型组合菌株为最高, 其中GS 48例(47.5%)、GU 14例(50.0%)、GC 17例(60.7%), 与同种疾病中其他基因型组合相比差别有统计学意义($P < 0.05$), 与GA组中*vacA* s1m1bm2亚型组合相比差别有统计学意义. 在GA组中感染s1m2亚型菌株有22例(44.9%), 与本组病例中其他基因亚型相比差

别均有统计学意义($P < 0.05$), 与GU、GC组感染s1m2亚型菌株相比差别有统计学意义($P = 0.039$), 与GS组相比差别没有统计学意义($P = 0.067$).

2.3 *iceA*基因与胃疾病的关系 利用特异性引物对*iceA1*, *iceA2*等位基因进行检测(图1C). 在222例菌株中*iceA*基因亚型在同一疾病组以及同一基因亚型在不同疾病组中分布差异均没有统计学意义($P > 0.05$).

3 讨论

*H. pylori*感染的普遍性高, 且容易作为一个重要的致病因子引发消化系统的疾病. 感染*H. pylori*的个体是否发病, 一方面与宿主基因易感性和环境因素有关^[14-15], 另一方面与所感染*H. pylori*菌株的型别(即存在不同毒力的*H. pylori*菌株)有关. 在感染了*H. pylori*的人群中大约只有15%的人发病^[15], 因而对*H. pylori*的检测特别是菌株型别的检测就尤为重要. 依据*cagA*和*vacA*基因存在与否^[16], 分为I型和II型. I型可以产生*cagA*和*vacA*毒素, 而II型不产生任何毒素. 在本研究中, *cagA*和*vacA*基因的检出率分别为96.4%, 92.8%, 因此本地区感染的菌株多数为具有产毒能力的I型. 研究发现, 产毒素*H. pylori*在体内可以诱导更多的炎症细胞浸润, 在体外可以引起更强烈的自由基爆发, 而且活性氧代谢产物与萎缩及DNA突变的发生有关^[17]. 如果*H. pylori*在胃内长期定植, *cagA*⁺/*vacA*s1型菌株与*cagA*⁻

■创新盘点

本文结果发现, 在GA组中感染*vacA* s1m2亚型菌株有22例(44.9%), 与本组病例中其他基因亚型相比差别均有统计学意义, 与GU、GC组感染s1m2亚型菌株相比差别有统计学意义($P = 0.039$), 与GS组相比差别没有统计学意义. 结果提示中国辽宁地区人群感染*vacA* s1m2型菌株与萎缩性胃炎发生有关.

■应用要点

本研究通过了解中国辽宁地区 *H pylori* 致病基因型的分布, 探讨该地区细菌致病基因的疾病相关性, 为揭示 *H pylori* 的致病机制及监测 *H pylori* 相关性胃疾病的高危人群提供线索。

*vacAs*2型菌株相比将更易引起多中心萎缩、肠化, 甚至DNA损伤。而多中心萎缩以及肠化都是肠型胃癌发生过程中重要的胃黏膜改变^[17]。推测有可能这一型菌株能够提高胃上皮中活性氧对DNA的损伤作用或提高了胃上皮细胞的增殖而与胃癌变过程相关^[18]。

本研究中, 未发现 *cagA*, *iceA* 在不同疾病组中存在差别, 可能是由于不同地区感染的 *H pylori* 菌株基因结构的差异造成的^[19]。而在GA中感染 *vacAs*1m2型菌株构成比为44.9%, 与其他疾病组相比差别有统计学意义, 与GA中感染其他类型构成比相比差别有统计学意义。 *vacA* 基因编码的蛋白质, 是 *H pylori* 的一种重要致病因子, 也是 *H pylori* 毒力分型的标志, 与 *H pylori* 感染者的临床发病有着密切的关系。 *vacA* 基因编码空泡毒素(*vacA*)可以诱导真核细胞发生空泡变性^[15]。在体外, s1m1型 *H pylori* 菌株产生的毒性水平最高, s1m2型产生低于中等程度的毒性, s2m2型无毒性, 而基因型为s2m1的菌株尚未发现^[11]。完整的毒素活性部分与s1信号肽出现有关, 但据报道s1信号肽与m2中间区组合后对Hela少有或几乎没有毒素活性。Pagliaccia *et al*^[20]利用 *vacA* 基因敲除菌株95-54的粗提取物和高纯化s1m2型蛋白作用于Hela细胞均未见有毒素活性。然而在Hela细胞内表达此种毒素蛋白或是在细胞外作用于其他细胞系时可见毒素活性, 在原代培养的胃上皮细胞中也可以检测到毒素活性, 由此可见m2型毒素在体内是有活性的。产生这种差别最可能的原因是在靶细胞表面存在与不同中间区结合的特异性受体。Yahiro *et al*^[21]曾经指出m1和m2可以与细胞表面不同的受体结合。Fox *et al*^[22]则认为s1m2型与十二指肠溃疡的发生有关。土耳其Caner *et al*^[23]研究发现 *vacA* s1m2主要存在于慢性胃炎和十二指肠溃疡患者中。台湾Chang *et al*研究发现, 与感染 *cagA*(-)*vacA*(-)基因型菌株相比, 感染 *cagA vacA* s1/m2型菌株与胃、十二指肠疾病的发生有关^[24]。也有学者报道空泡毒素的产生与萎缩性胃炎的发展有关。Cover *et al*^[25]研究表明, 在没有其他 *H pylori* 因子存在的情况下, 纯化的 *vacA* 毒素就可以诱导胃上皮细胞发生凋亡。Phadnis *et al*^[26]发现 *VacA* 片段能够插入线粒体膜诱导细胞色素C的释放, 激活由caspase-3介导的细胞凋亡。由细菌诱导的凋亡可以导致胃腺体的大量萎缩, 继而发生肠化、不典型增生、胃癌^[27]。Karita *et al*^[28]研究发现细胞内 *vacA* 蛋白的表达是

预测 *H pylori* 相关性GA是否发展为GC的有利指标。GA通常伴有胃壁细胞减少和发生GC的风险提高。Oh *et al*^[29]利用缺少壁细胞的转基因小鼠研究发现, 壁细胞的缺失有利于来自GA患者 *H pylori* 在胃干细胞的黏附、进入和定植, 并且在GA的发展过程中, *H pylori* 相关的金属摄取利用途径、外膜蛋白、毒力因子等结构都可能会发生改变。在GA中感染s1m2型菌株与上述改变有何关系尚待进一步研究。我们推测, 在GA的发展过程中, 胃上皮细胞可能发生了某些结构改变, 具有了更多与m2型毒素结合的位点, 或者对与疾病发生有关的菌株进行了适应性选择, 更有利于毒素与细胞间的相互作用, 感染s1m2型菌株与萎缩性胃炎发生有关。有关感染不同型别的 *vacA* 毒素诱导胃上皮细胞凋亡、促进腺体萎缩有无差别目前尚不明确。本研究中观察到的s1m2型与GA关系的确切机制尚有待进一步研究。

4 参考文献

- 1 Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 720-741
- 2 Akopyants NS, Jiang Q, Taylor DE, Berg DE. Corrected identity of isolates of *Helicobacter pylori* reference strain NCTC11637. *Helicobacter* 1997; 2: 48-52
- 3 Marshall DG, Coleman DC, Sullivan DJ, Xia H, O'Morain CA, Smyth CJ. Genomic DNA fingerprinting of clinical isolates of *Helicobacter pylori* using short oligonucleotide probes containing repetitive sequences. *J Appl Bacteriol* 1996; 81: 509-517
- 4 Wu CC, Chou PY, Hu CT, Liu ZC, Lin CY, Tseng YH, Lin NT. Clinical Relevance of the *vacA*, *iceA*, *cagA*, and *flaA* genes of *Helicobacter pylori* strains isolated in Eastern Taiwan. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2913-2915
- 5 Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashima K, Graham DY. Relationship between *Helicobacter pylori* *iceA*, *cagA*, and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2274-2279
- 6 Linpisarn S, Suwan W, Lertprasertsuk N, Koosirirat C, Steger HF, Prommuangyong K, Phornphutkul K. *Helicobacter pylori* *cagA*, *vacA* and *iceA* genotypes in northern Thai patients with gastric disease. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2007; 38: 356-362
- 7 Mattar R, Marques SB, Monteiro Mdo S, Dos Santos AF, Iriya K, Carrilho FJ. *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island genes: clinical relevance for peptic ulcer disease development in Brazil. *J Med Microbiol* 2007; 56: 9-14
- 8 Handa O, Naito Y, Yoshikawa T. *CagA* protein of *Helicobacter pylori*: a hijacker of gastric epithelial cell signaling. *Biochem Pharmacol* 2007; 73: 1697-1702
- 9 Schneller J, Gupta R, Mustafa J, Villanueva R, Straus EW, Raffaniello RD. *Helicobacter pylori* infection is associated with a high incidence of intestinal metaplasia in the gastric mucosa of patients at inner-city hospitals in New York. *Dig Dis Sci* 2006;

- 51: 1801-1809
- 10 郭晓临, 王立娥, 王兰, 董明, 袁媛. 胃癌高发区高危人群血清HpcagA毒素相关蛋白检测的意义. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 595-596
- 11 van Doorn LJ, Figueiredo C, Rossau R, Jannes G, van Asbroek M, Sousa JC, Carneiro F, Quint WG. Typing of *Helicobacter pylori* vacA gene and detection of cagA gene by PCR and reverse hybridization. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1271-1276
- 12 Peek RM Jr, Thompson SA, Donahue JP, Tham KT, Atherton JC, Blaser MJ, Miller GG. Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacter pylori* gene, iceA, that is associated with clinical outcome. *Proc Assoc Am Physicians* 1998; 110: 531-544
- 13 Gong YH, Wang Y, Yuan Y. Distribution of *Helicobacter pylori* in north China. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3523-3527
- 14 Ruggiero P, Rossi G, Tombola F, Pancotto L, Lauretti L, Del Giudice G, Zoratti M. Red wine and green tea reduce H pylori- or VacA-induced gastritis in a mouse model. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 349-354
- 15 Cover TL, Blaser MJ. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 1992; 267: 10570-10575
- 16 Xiang Z, Censini S, Bayeli PF, Telford JL, Figura N, Rappuoli R, Covacci A. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun* 1995; 63: 94-98
- 17 Blaser MJ. Intrastrain differences in *Helicobacter pylori*: a key question in mucosal damage? *Ann Med* 1995; 27: 559-563
- 18 Yang KC, Chu A, Liao CS, Lin YM, Wang GM. Evaluation of the role of H pylori infection in pathogenesis of gastric cancer by immunoblot assay. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7029-7032
- 19 Ito S, Azuma T, Murakita H, Hirai M, Miyaji H, Ito Y, Ohtaki Y, Yamazaki Y, Kuriyama M, Keida Y, Kohli Y. Profile of *Helicobacter pylori* cytotoxin derived from two areas of Japan with different prevalence of atrophic gastritis. *Gut* 1996; 39: 800-806
- 20 Pagliaccia C, de Bernard M, Lupetti P, Ji X, Burrioni D, Cover TL, Papini E, Rappuoli R, Telford JL, Reytrat JM. The m2 form of the *Helicobacter pylori* cytotoxin has cell type-specific vacuolating activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 10212-10217
- 21 Yahiro K, Niidome T, Hatakeyama T, Aoyagi H, Kurazono H, Padilla PI, Wada A, Hirayama T. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin binds to the 140-kDa protein in human gastric cancer cell lines, AZ-521 and AGS. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 238: 629-632
- 22 Fox JG, Correa P, Taylor NS, Thompson N, Fontham E, Janney F, Sobhan M, Ruiz B, Hunter F. High prevalence and persistence of cytotoxin-positive *Helicobacter pylori* strains in a population with high prevalence of atrophic gastritis. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 1554-1560
- 23 Caner V, Yilmaz M, Yonecti N, Zencir S, Karagenc N, Kaleli I, Bagci H. H pylori iceA alleles are disease-specific virulence factors. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2581-2585
- 24 Aknin J, Seguin P, Ouchchane M, Lucht F, Brunon J, Barral X. Takayasu's disease and post-traumatic scalp necrosis. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 1991; 92: 101-104
- 25 Cover TL, Krishna US, Israel DA, Peek RM Jr. Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cancer Res* 2003; 63: 951-957
- 26 Phadnis SH, Ilver D, Janzon L, Normark S, Westblom TU. Pathological significance and molecular characterization of the vacuolating toxin gene of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1994; 62: 1557-1565
- 27 Correa P, Miller MJ. Carcinogenesis, apoptosis and cell proliferation. *Br Med Bull* 1998; 54: 151-162
- 28 Karita M, Teramukai S, Matsumoto S, Shibuta H. Intracellular VacA is a valuable marker to predict whether *Helicobacter pylori* induces progressive atrophic gastritis that is associated with the development of gastric cancer. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 56-64
- 29 Oh JD, Kling-Backhed H, Giannakis M, Xu J, Fulton RS, Fulton LA, Cordum HS, Wang C, Elliott G, Edwards J, Mardis ER, Engstrand LG, Gordon JI. The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis *Helicobacter pylori* strain: evolution during disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 9999-10004

■同行评价
本文设计合理, 数据可信, 具有很强的学术价值。

编辑 程剑侠 电编 李军亮

Galectin-3在CCl₄致肝损伤及对GRP78调控的作用

张 鸿, 具英花, 刘晓湘, 平贺紘一, 方秀斌

■背景资料

近年来, 大量对于Galectins的研究结果表明, Galectin-1-14的功能和作用逐渐被研究者所认识, 并且在此基础上发现了Galectin-15. 本研究结果提示, Galectin-3参与了肝细胞在生理和病理过程中对GRP78蛋白表达的调节. 上调Mic和Mt中GRP78蛋白的表达可能是Galectin-3在CCl₄对肝细胞损伤中发挥保护作用的一个途径.

张鸿, 具英花, 刘晓湘, 方秀斌, 中国医科大学基础医学院神经生物学教研室 辽宁省沈阳市 110001

平贺紘一, 日本富山医科药科大学医学部生化讲座 日本富山 930-0194

张鸿, 1987年中国医科大学本科毕业, 1996年中国医科大学硕士研究生毕业, 2006年中国医科大学博士研究生毕业, 讲师, 主要从事肝损伤与修复机制研究.

通讯作者: 方秀斌, 110001, 辽宁省沈阳市和平区北二马路92号, 中国医科大学基础医学院神经生物学教研室.

xbfang@mail.cmu.edu.cn

电话: 024-23256666-5512

收稿日期: 2007-01-29 修回日期: 2007-10-17

Role of galectin-3 in CCl₄-induced hepatic damage and in modulation of GRP78 in mice

Hong Zhang, Ying-Hua Ju, Xiao-Xiang Liu, Koichi Hiraga, Xiu-Bin Fang

Hong Zhang, Ying-Hua Ju, Xiao-Xiang Liu, Xiu-Bin Fang, Department of Neurobiology, Basic Medical College, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Koichi Hiraga, Department of Biochemistry, School of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama 930-0194, Japan

Correspondence to: Dr. Xiu-Bin Fang, Department of Neurobiology, Basic Medical College, China Medical University, 92 Beier Road, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. xbfang@mail.cmu.edu.cn

Received: 2007-01-29 Revised: 2007-10-17

Abstract

AIM: To evaluate the role of galectin-3 in CCl₄-induced liver damage and in modulation of Glucose regulated protein 78 (GRP78) in mice.

METHODS: Ten-week-old, Gal-3 (-/-) and Gal-3 (+/+) ICR male mice were treated with CCl₄ (8 mL/kg) by lavage. Mice were killed at 0, 10, 24, 48 and 72 h after CCl₄ administration. Pathological changes in the liver, serum activity of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), and expression of GRP78 protein in different parts of the liver were examined.

RESULTS: Pathological changes induced by CCl₄ in the liver of Gal-3 (-/-) mice were earlier and more serious than those in Gal-3 (+/+) mice. Serum activity of ALT in Gal-3 (-/-) mice was

higher than that in Gal-3 (+/+) mice at 10 and 24 h after treatment with CCl₄ (1860 ± 191 U/L vs 1356 ± 177 U/L, $t = 6.12$, $P < 0.01$; 2789 ± 236 U/L vs 2468 ± 221 U/L, $t = 3.14$, $P < 0.01$). In the control experiment, the expression of GRP78 protein in the Mic part of the liver cells of Gal-3 (+/+) mice was higher than that in Gal-3 (-/-) mice (140.9 ± 21.1 vs 76.1 ± 9.5, $t = 8.86$, $P < 0.01$). Twenty-four hours after CCl₄ administration, the expression of GRP78 protein in both the Mt and Mic parts of the liver cells of Gal-3 (+/+) mice was significantly up-regulated, compared with that in Gal-3 (-/-) mice (Mt, 127.0 ± 18.8 vs 49.1 ± 6.3, $P < 0.01$; Mic, 166.5 ± 23.4 vs 87.7 ± 11.6, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Galectin-3 seems to protect mouse liver from CCl₄-induced damage, which may be attributed to the up-regulation of GRP78 protein.

Key Words: Galectin-3; CCl₄; Hepatic damage; Glucose regulated protein 78

Zhang H, Ju YH, Liu XX, Koichi H, Fang XB. Role of galectin-3 in CCl₄-induced hepatic damage and in modulation of GRP78 in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(33): 3468-3473

摘要

目的: 探讨Galectin-3对CCl₄致急性肝损伤时GRP78的调控作用.

方法: 选择ICR系的 δ Galectin-3基因敲除型[Gal-3(-/-)]和其野生型[Gal(+/+)]小鼠, 一次灌胃给予CCl₄, 观察给药后10, 24, 48和72 h的肝组织病理改变和检测其血清谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)活性, 并检测肝细胞不同细胞组分中的GRP78蛋白表达.

结果: 与Gal(+/+)型鼠比较, CCl₄对Gal-3(-/-)型鼠的肝组织病理损伤出现时间早、损伤程度重. Gal-3(-/-)型鼠在CCl₄灌胃后10和24 h的血清ALT活性(1860 ± 191 U/L vs 1356 ± 177 U/L, $t = 6.12$, $P < 0.01$; 2789 ± 236 U/L vs 2468 ± 221 U/L, $t = 3.14$, $P < 0.01$)及CCl₄灌胃后10 h的血

清AST活性(946 ± 89 vs 623 ± 73 U/L, $t = 8.87$, $P < 0.01$)与Gal(+/-)型鼠比较显著升高. 对照组中Gal-3(+/-)型鼠的微粒体组分(Mic)中的GRP78蛋白表达显著高于Gal-3(-/-)型鼠(140.9 ± 21.1 vs 76.1 ± 9.5 , $t = 8.86$, $P < 0.01$). 在CCl₄ig后24 h, Gal-3(+/-)型鼠的肝细胞线粒体组分(Mt)和Mic中的GRP78蛋白表达明显升高, 并显著高于Gal-3(-/-)型鼠(Mt: 127.0 ± 18.8 vs 49.1 ± 6.3 , $P < 0.01$; Mic: 166.5 ± 23.4 vs 87.7 ± 11.6 , $P < 0.01$).

结论: Galectin-3蛋白在CCl₄致急性肝损伤中可能具有一定的保护作用. 上调Mic和Mt中的GRP78蛋白表达可能是Galectin-3在CCl₄对肝细胞损伤中发挥保护作用的一个途径.

关键词: Galectin-3; 四氯化碳; 肝损伤; 葡萄糖调节蛋白78

张鸿, 具英花, 刘晓湘, 平贺絃一, 方秀斌. Galectin-3在CCl₄致肝损伤及对GRP78调控的作用. 世界华人消化杂志 2007;15(33): 3468-3473

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3468.asp>

0 引言

Galectins是半乳糖苷结合性动物外源性凝集素家族成员, 具有高度保守性, 广泛分布于所有的活性有机体. 目前, 在其家族中已经识别了14个成员, 根据发现的先后次序编为1-14. Galectin-3(分子量31 kDa)是Galectins家族的最重要成员之一, 他有两个结构域, 氨基末端有高度保守的酪氨酸-、脯氨酸-、多甘氨酸残基^[1]. Galectin-3是一种早期快反应基因. 研究发现, Galectin-3具有促进细胞增生和抑制细胞凋亡的功能^[2]. 平贺 *et al* 研究发现^[3-4], 在CCl₄诱导急性肝损伤24 h与72 h后, 肝细胞匀浆中发现了一种30 kDa的高表达蛋白, 经免疫印迹确定为Galectin-3. CCl₄是公认的急性肝损伤性毒物, 那么, Galectin-3在CCl₄损伤肝组织中的意义如何? 是否对损伤的肝组织具有保护作用? 目前, 尚无相关的研究报道.

葡萄糖调节蛋白78(glucose regulated protein, GRP78)被认为是Hsp70家族的成员之一, 是一类高度保守的应激蛋白. 作为一种分子伴侣, 他主要参与蛋白质的折叠和转运^[5]. 近年来研究表明, 许多应激条件都可以诱导其表达上调, 以维持内质网的稳定, 具有保护细胞、减缓其损伤的作用^[6]. 那么, 在CCl₄急性肝损伤中, 是否有GRP78蛋白表达的上调? Galectin-3与对GRP78蛋白表达的调节是否有关? 由于人

们对GRP78和Galectin-3关注的时间较短, 研究资料很少. 本研究中, 我们选择Galectin-3基因敲除型[Gal-3(-/-)]和其野生型[Gal-3(+/-)]小鼠, 对Galectin-3在CCl₄致急性肝组织损伤中的作用、GRP78在CCl₄致应激损伤中的表达及Galectin-3与GRP78的关系进行探讨, 为揭示Galectin-3在CCl₄致急性肝损伤中的作用及其可能的机制提供实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 野生型[Gal-3(+/-)]ICR ♂ 健康小鼠, 10周龄, 由日本国立肿瘤研究所提供. Galectin-3基因敲除型[Gal-3(-/-)]ICR ♂ 健康小鼠, 10周龄, 由日本富山医科药科大学化学第一研究室提供.

1.2 方法 将Gal-3(+/-)和Gal-3(-/-)型小鼠各50只, 分别随机分成0, 10, 24, 48, 72 h组, 每组10只. 进食标准颗粒饲料, 自由饮水. 染毒前禁食12 h, 将CCl₄与食用橄榄油按1:1混合, 制备染毒液. 按8 mL/kg的剂量给小鼠一次性灌胃染毒. 染毒后, 实验动物常规饲养.

1.2.1 小鼠肝组织病理切片制备及观察: 在CCl₄灌胃后的0, 10, 24, 48, 72 h, 分别将各组小鼠乙醚麻醉, 心脏取血后, 断头处死. 迅速取出肝脏, 用生理盐水将血液洗去, 用小剪刀将小鼠肝脏切成1 cm×1 cm×0.3 cm的小块, 并立即用100 mL的中性福尔马林固定32 h. 按常规方法进行肝组织的石蜡包埋, 用切片机制成5 μm厚的组织切片, 并对组织切片进行常规的HE染色.

1.2.2 小鼠肝细胞组分的分离和GRP78蛋白表达的检测: 将对照组和CCl₄灌胃后24 h的小鼠, 乙醚麻醉后断头处死, 迅速取肝脏, 置于小平皿中(以下操作均在4℃下进行), 用小剪刀将肝组织剪成小块, 称质量后转移到棒型组织研磨管中, 按9 mL/g加入0.25 mol/L蔗糖缓冲液, 经电动研杆研磨制成匀浆, 并经纱布过滤. 此滤液为肝细胞研磨液(HO), 将HO转移到离心管中, 4℃, 6000 g离心10 min(CS100GX, 日本日立公司), 沉淀即为细胞核组分(Nuc). 取上清, 4℃, 8000 g离心10 min, 沉淀即为线粒体组分(Mt); 取上清, 4℃, 105 000 g超速离心60 min, 沉淀即为微粒体组分(Mic). 上清部分为细胞质组分(Cyt).

分别对小鼠肝细胞HO, Nuc, Mt, Mic和Cyt进行蛋白定量(BCA蛋白质定量检测试剂, PIERCE公司). 按蛋白均衡各组分上样体积为5-20 μL, 进行SDS-PAGE电泳(3000xi Bio-Rad). 电泳后在电转移槽中将PAGE凝胶中的

■同行评价
本文的科学性较强, 创新性好, 实验结果满意, 对基础和临床研究都有一定的参考意义.

表 1 肝细胞不同组分中GRP78蛋白表达印迹检测结果(mean $\pm$ SD, $n = 10$)

动物分组	平均光密度值			
	Mt		Mic	
	0 h	24 h	0 h	24 h
Gal-3(+/+)	42.4 $\pm$ 5.3	127.0 $\pm$ 18.8 ^{b,d}	140.9 $\pm$ 21.1 ^d	166.5 $\pm$ 23.4 ^b
Gal-3(-/-)	36.5 $\pm$ 5.4	49.1 $\pm$ 6.3	76.1 $\pm$ 9.5	87.7 $\pm$ 11.6

^b $P < 0.01$ vs Gal-3(+/+)0 h, Gal-3(-/-)24 h; ^d $P < 0.01$ vs Gal-3(-/-)0 h.

蛋白质转移至硝酸纤维素膜, 用含50 g/L牛奶TBST封闭1 h, 将转印膜加入一抗(抗GRP78抗体, Santa Cruz), 室温孵育1 h, 用TBST液洗膜5 min $\times$ 3次. 将转印膜加入二抗温孵育1 h, 除去抗体孵育液, 用TBST液洗膜10 min $\times$ 3次. 加入ECL蛋白印迹检测分析试剂(Amersham Biosciences), 在化学冷光影像分析仪(LAS-1000plus, 日本富士公司)中反应30 min, 化学发光显影、摄影记录. 将免疫蛋白印迹显影图扫描, 再利用ChemImager5500 V2.03图像分析软件对实验结果进行分析, 用平均光密度值代表蛋白含量.

1.2.3 血清中ALT, AST酶活性检测: 将取出的血液室温下放置, 析出血清后, 2000 r/min离心10 min, 分离血清. 用Infinity TM ALT试剂和Infinity TM AST(Sigma, St. Louis, MO, USA)分别检测小鼠血清中ALT, AST酶活性.

统计学处理 实验数据用mean $\pm$ SD表示, 将相同时间组的Gal-3(-/-)型小鼠和Gal-3(+/-)型小鼠的检测结果进行 t 检验.

2 结果

2.1 CCl₄致Gal-3(-/-)型和Gal-3(+/-)型小鼠肝组织损伤的病理学观察比较 在CCl₄灌胃后10 h, Gal-3(-/-)型小鼠的肝组织病理切片中出现明显的病理损伤改变. 主要表现为肝细胞索排列紊乱, 肝窦受压变窄, 以肝小叶中央静脉为中心的大片脂肪变性, 变性的肝细胞胞质明显空亮, 细胞核受压, 偏向一侧(图1A). 高倍镜可见细胞基质中有大量的小空泡, 并可见少量增生(图1B). 但Gal-3(+/-)型小鼠的肝组织病理切片却未见明显的病理损伤改变.

在CCl₄灌胃后24 h, Gal-3(-/-)型小鼠肝组织病理损伤进一步加重, 在以肝小叶中央静脉为中心的大片严重脂肪变性基础上, 出现点片状的肝细胞坏死, 并可见无结构的均质粉染的细胞轮廓, 可见核碎裂、核溶解和核消失(图1C). Gal-3(+/-)型小鼠的肝组织病理损伤轻微, 以肝

细胞的脂肪变性为主, 并主要集中在肝小叶的周边部. 其病理改变显著轻于Gal-3(-/-)型小鼠在CCl₄灌胃后10 h的病理改变(图1D).

在CCl₄染毒后48 h, Gal-3(-/-)型小鼠的肝组织病理切片中, 肝小叶轮廓消失, 出现大片的肝细胞坏死(图1E). Gal-3(+/-)型小鼠虽表现肝索紊乱, 但肝小叶轮廓还很清晰, 肝细胞脂肪变性明显, 并可见较多的代偿增生(图1F).

在CCl₄染毒后72 h, Gal-3(+/-)型小鼠的肝细胞坏死、变性严重, 肝细胞可见明显肿胀, 肝索变宽, 部分肝窦狭小或消失, 但仍可见肝小叶轮廓(图1G). Gal-3(-/-)型小鼠的肝索解离, 肝细胞溶解, 出现大片肝组织坏死, 肝窦明显扩张、充血、甚至出血(图1H).

2.2 CCl₄染毒后不同时间Gal-3(+/-)和Gal-3(-/-)型小鼠血清ALT和AST活性的比较 CCl₄灌胃后10和24 h, Gal-3(-/-)型小鼠血清ALT活性比Gal-3(+/-)型小鼠显著升高(1860 $\pm$ 191 U/L vs 1356 $\pm$ 177 U/L, $t = 6.12$, $P < 0.01$; 2789 $\pm$ 236 U/L vs 2468 $\pm$ 221 U/L, $t = 3.14$, $P < 0.01$). 在其他时间, Gal-3(-/-)型小鼠血清ALT活性与Gal-3(+/-)型小鼠比较未见显著差异. 在Gal-3(-/-)型小鼠, 其血清ALT活性在CCl₄灌胃后24 h达到高峰, 其均值为2789 $\pm$ 236 U/L, 随后下降, 在72 h时下降到518 $\pm$ 71 U/L(图2).

图2显示, CCl₄灌胃后10 h, Gal-3(-/-)型小鼠的血清AST活性比Gal-3(+/-)型小鼠显著升高(946 $\pm$ 89 vs 623 $\pm$ 73 U/L, $t = 8.87$, $P < 0.01$). 在其他时间, Gal-3(-/-)型小鼠的血清AST活性与Gal-3(+/-)型小鼠比较未见显著差异. 在Gal-3(-/-)型小鼠, 其血清AST活性在CCl₄灌胃后48 h达到高峰, 其均值为1957 $\pm$ 185 U/L, 随后下降, 在72 h时下降到521 $\pm$ 68 U/L.

2.3 Gal-3(+/-)和Gal-3(-/-)型小鼠肝细胞中GRP78蛋白表达的比较 在CCl₄灌胃后24 h, Gal-3(+/-)型小鼠的肝细胞Mt和Mic中GRP78蛋白表达明显升高, 并显著高于Gal-3(-/-)型小鼠

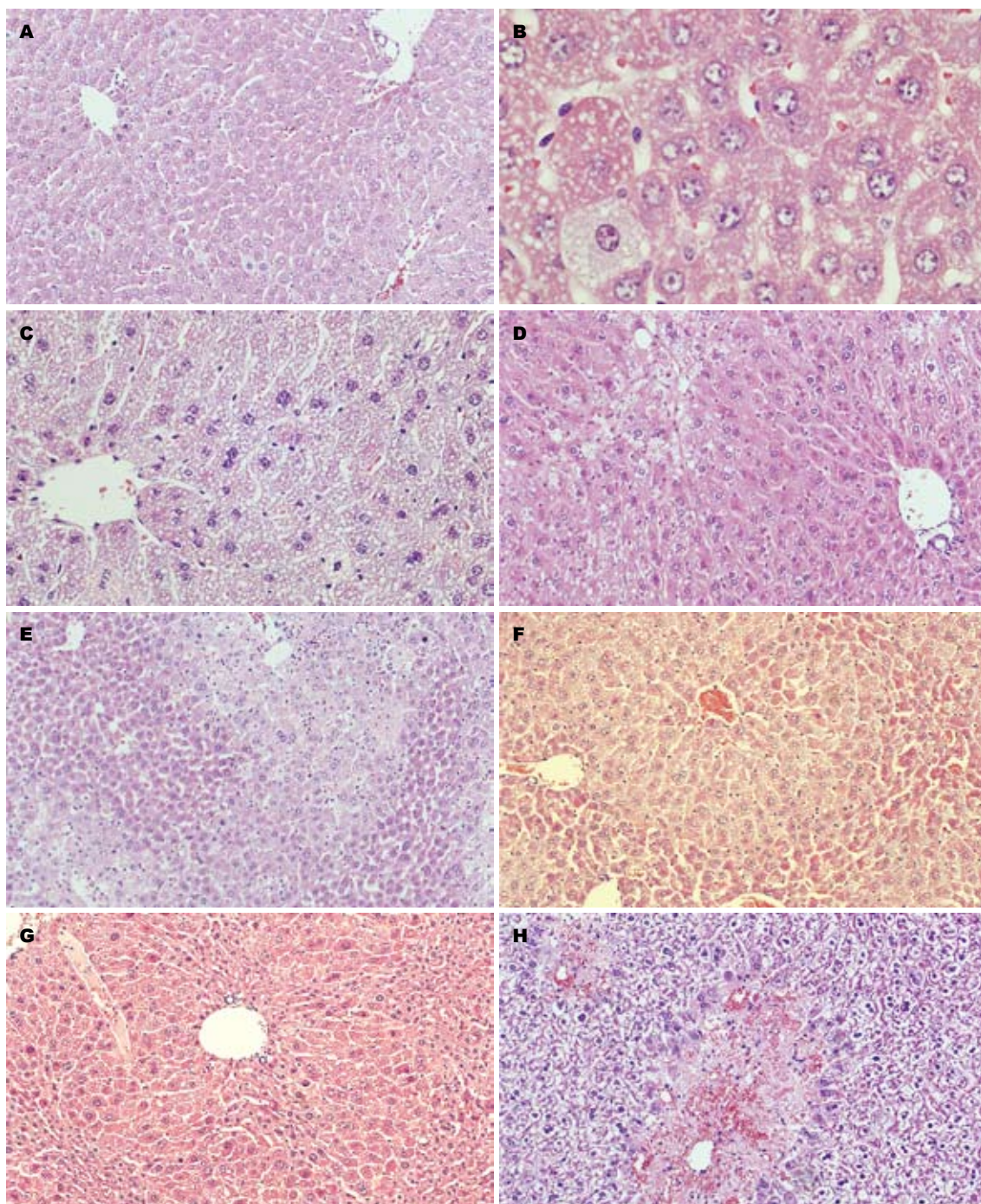


图 1 CCl₄灌胃后各组鼠肝组织病理切片观察(HE). A: 10 h, Gal-3(-/-)($\times 100$); B: 10 h, Gal-3(-/-)($\times 400$); C: 24 h, Gal-3(-/-)($\times 200$); D: 24 h, Gal-3(+/-)($\times 100$); E: 48 h, Gal-3(-/-)($\times 100$); F: 48 h, Gal-3(+/-)($\times 100$); G: 72 h, Gal-3(+/-)($\times 100$); H: 72 h, Gal-3(-/-)($\times 100$).

(图3, 表1). 其余组分中, Gal-3(+/-)与Gal-3(-/-)型小鼠GRP78蛋白的表达无明显差异.

3 讨论

肝脏是物质代谢的中心. 当肝功能受到损害时, 物质的代谢过程受到阻碍, 致使肝脏中甘油三酯、胆固醇等代谢障碍, 导致肝细胞中脂肪含量发生异常, 灵敏地反映肝细胞受损的程度. 本

实验的病理观察和血清ALT和AST活性检测结果证实, 在CCl₄引起的急性肝损伤中, Gal-3(-/-)型小鼠的肝组织损伤比其野生型小鼠出现的时间早、损伤的程度重. 这提示, Galectin-3可能在CCl₄致肝损伤的早期具有保护肝细胞, 减缓其损伤的作用.

目前研究结果显示, CCl₄的肝毒性是一个多因素综合作用的过程, 损伤机制涉及脂质过

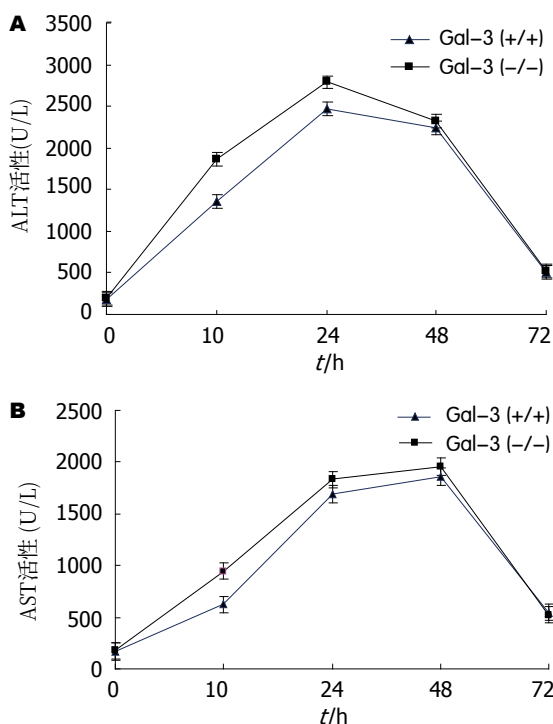


图2 Gal-3(+/+)与Gal-3(-/-)型小鼠CCl₄灌胃后血清ALT和AST活性的变化。A: ALT; B: AST。

氧化、共价结合、活性醛类、核酸低甲基化及Ca²⁺超载等因素^[7]。自由基被认为是CCl₄肝毒性的始动机制。研究证明,进入机体的CCl₄在肝细胞的P450酶系统的作用下,将CCl₄转化为CCl₃·和Cl·自由基。CCl₃·能和氨基酸、核苷酸、脂肪酸、蛋白质、核酸、脂类等多种有重要生理作用的生物分子反应。在有氧的条件下,CCl₃·能与氧反应生成过氧化自由基CCl₃OO·,这是一个比CCl₃·活性更高、半衰期更短、更易使不饱和脂肪酸发生氧化反应的自由基。不饱和磷脂被CCl₃OO·过氧化后,氧化反应能启动一系列的连锁反应,直到多不饱和脂肪酸完全饱和为止,同时生成醛类、羰基化合物和烃类,即脂质过氧化物。活性醛类可大量灭活氨基酸或巯基,从而抑制酶活性、破坏DNA结构、阻滞蛋白质合成与分泌等。由于活性醛类比CCl₃·,CCl₃OO·等自由基的活性小,所以其毒作用持续时间更长,并可把毒性效应传到其他的组织细胞。有研究显示,CCl₄处理后6 h活性醛类开始出现,24 h达到峰值,36到72 h后消失^[8]。这和本研究中的实验动物肝病理损伤变化相吻合,进一步提示CCl₄对肝组织的损伤机制与其诱导自由基产生的氧化应激有关。

GRP78作为分子伴侣,是促进正常生长状态下细胞蛋白质成熟、维系细胞机能和生命的关键性调节物质。在生理情况下,GRP78在内质网膜上通过与新生多肽以非共价键形式短暂地结

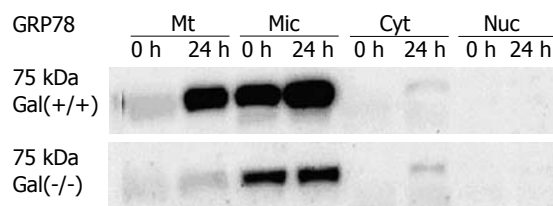


图3 CCl₄诱导肝损伤细胞中各组蛋白表达印迹检测结果。

合,随后松开,从而促进蛋白质的正确折叠和装配,并协助蛋白质跨内质网膜转运到正确的位置。同时,GRP78又是一种钙结合蛋白,在应激反应时,其基因的转录活性可提高10-25倍,表达量显著增高,从而维持了内质网的钙稳态及内环境的稳定^[9-10]。另外,GRP78能转移内质网腔内的错误折叠蛋白,保持细胞在应激状态下蛋白质合成的继续。GRP78还能降低细胞对杀伤性T细胞的敏感性,阻止细胞凋亡^[11]。因此,近年来研究认为,细胞受刺激时GRP78呈高表达反应,可能是细胞的一种重要的防御机制,该机制对细胞有保护作用,从而可延长在各种不利因素刺激下的细胞生存期^[12]。

本研究结果显示,在正常生理条件下, Gal-3(+/+)型小鼠肝细胞的Mic中有GRP78蛋白的高表达,但Gal-3(-/-)型小鼠的肝细胞Mic中GRP78蛋白表达水平显著降低,提示Galectin-3蛋白的缺失可干扰GRP78蛋白的正常表达。另一方面,CCl₄灌胃24 h后, Gal-3(+/+)型小鼠肝细胞Mic和Mt的中GRP78蛋白表达均明显上调,表明在CCl₄引起的肝细胞应激损伤中,机体上调了GRP78蛋白的表达。但在Gal-3(-/-)型鼠肝细胞的Mic和Mt中的GRP78蛋白表达却没有明显的变化。该研究结果揭示, Galectin-3参与肝细胞在生理和病理过程中对GRP78蛋白表达的调节。上调Mic和Mt中的GRP78蛋白表达可能是Galectin-3在CCl₄对肝细胞损伤中发挥保护作用的一个途径。

现已证明,作为一个多功能蛋白, Galectin-3参与机体的各种生理和病理过程。随着对Galectin-3各方面功能的研究不断深入,人们将进一步弄清Galectin-3在各种病理生理反应中的机制,使其在疾病的预防和治疗中发挥重要作用^[13]。

4 参考文献

- Cooper DN. Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572: 209-231
- 黎联, 艾中明. Galectins对细胞生长和凋亡的调节. *中国误诊学杂志* 2003; 3: 1169-1172
- Morigasaki S, Li F, Kawai A, Yamazaki K, Sikdar D,

- Hibino Y, Hiraga K. Interaction of albumin mRNA with proteins from rat liver with CCl₄-induced injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 273: 261-266
- 4 Yamazaki K, Kawai A, Kawaguchi M, Hibino Y, Li F, Sasahara M, Tsukada K, Hiraga K. Simultaneous induction of galectin-3 phosphorylated on tyrosine residue, p21(WAF1/Cip1/Sdi1), and the proliferating cell nuclear antigen at a distinctive period of repair of hepatocytes injured by CCl₄. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280: 1077-1084
- 5 Ortiz C, Cardemil L. Heat-shock responses in two leguminous plants: a comparative study. *J Exp Bot* 2001; 52: 1711-1719
- 6 Lee AS. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci* 2001; 26: 504-510
- 7 Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol* 2003; 33: 105-136
- 8 许永乐, 蔡大勇, 唐朝枢. CCl₄导致肝硬化和门脉高压的机制. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 235-238
- 9 Yang GH, Li S, Pestka JJ. Down-regulation of the endoplasmic reticulum chaperone GRP78/BiP by vomitoxin (Deoxynivalenol). *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; 162: 207-217
- 10 Yang Y, Turner RS, Gaut JR. The chaperone BiP/GRP78 binds to amyloid precursor protein and decreases Abeta40 and Abeta42 secretion. *J Biol Chem* 1998; 273: 25552-25555
- 11 Liberman E, Fong YL, Selby MJ, Choo QL, Cousens L, Houghton M, Yen TS. Activation of the grp78 and grp94 promoters by hepatitis C virus E2 envelope protein. *J Virol* 1999; 73: 3718-3722
- 12 张莹, 孙黎光. GRP78的研究进展. *国外医学·生理、病理科学与临床分册* 2005; 25: 251-253
- 13 Leffler H. Galectins structure and function--a synopsis. *Results Probl Cell Differ* 2001; 33: 57-83

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

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

• 消息 •

欢迎订阅 2008 年《世界华人消化杂志》

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

《世界华人消化杂志》报道消化疾病的评论及临床和基础研究,包括消化肿瘤学、消化感染病学、消化内科学、消化外科学、消化内镜学、消化影像学、消化介入治疗学、消化中医药、中西医结合学、消化基础研究、消化病理学、消化循证医学等内容。

《世界华人消化杂志》2008年由北京报刊发行局发行,国际标准刊号 ISSN 1009-3079,国内统一刊号 CN 14-1260/R,邮发代号82-262,出版日期每月8, 18, 28日,月价72.00,年价864元。欢迎广大消化科医务工作者及科教人员、各大图书馆订阅。联系地址: 100023,北京市2345信箱。联系电话: 010-85381901-638; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; <http://www.wjgnet.com>。

hAFP增强子调控的肝癌特异性基因治疗载体的构建及活性测定

马晓娟, 匡安仁, 黄蕤

■背景资料

肝细胞癌是人类最常见、死亡率最高的恶性肿瘤之一, 全世界每年大约有100万人死于肝癌, 亚洲和非洲是高发区。由于HCC的发生发展过程与慢性肝病, 特别是乙型或丙型肝炎造成的肝硬化密切相关, 因此大多数HCC患者在发现病变的初期即丧失了手术的机会, 即便是接受了手术或介入治疗的患者, 也因为肝功能的问题不能很好的恢复。近年来尽管在预防、早期诊断和综合治疗方面出现了很多新的方案, 但是肝癌发病率仍逐年增长, 患者生存率并无明显改善, 也没能从根本上解决肝癌的转移和复发。随着肿瘤生物治疗技术的不断发展, 肝癌的基因治疗成为研究热点。

马晓娟, 匡安仁, 黄蕤, 四川大学华西医院核医学科 四川省成都市 610041

马晓娟, 1997年东南大学医学院本科, 主治医师, 主要从事分子核医学研究工作。

国家自然科学基金资助项目, No. 30670585

通讯作者: 匡安仁, 610041, 四川省成都市外南国学巷37号, 四川大学华西医院核医学科. kuanganren@263.net

电话: 028-85422696 传真: 028-85422696

收稿日期: 2007-08-16 修回日期: 2007-11-02

Construction of the alpha-fetoprotein enhancer controlled gene therapy vector specific for hepatocellular carcinoma and identification of its activity

Xiao-Juan Ma, An-Ren Kuang, Rui Huang

Xiao-Juan Ma, An-Ren Kuang, Rui Huang, Department of Nuclear Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30670585

Correspondence to: Dr. An-Ren Kuang, Department of Nuclear Medicine, West China Hospital, Sichuan University, 37 Wainanguoxue Lane, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. kuanganren@263.net

Received: 2007-08-16 Revised: 2007-11-02

Abstract

AIM: To construct a gene-modified hepatocellular carcinoma (HCC)-specific luciferase expression vector regulated by alpha fetoprotein (AFP) promoter and enhancer, and to evaluate the effects.

METHODS: The minimal essential DNA fragment of the AFP gene promoter and enhancer was amplified through PCR from the genome of HepG2 cells. It was then cloned into the plasmid pGL-3 after the AFP promoter was combined with a 0.4- or 1.0-kb enhancer region, to construct the recombinant plasmids APSE-Luc and APLE-Luc. These two plasmids were transfected into HepG2, SMMC7721 and Hela cells. Fluorescence was detected in order to evaluate the luciferase expression and specificity.

RESULTS: By restriction digestion and sequence analysis, we confirmed that the length, position, and orientation of inserted genes of the AFP promoter and enhancer were all correct. The recombinant vector APSE-Luc/APLE-Luc was successfully constructed. The expression of luciferase in HepG2 cells transfected with APLE-Luc was significantly higher than that in SMMC7721 and Hela cells, and also higher than that in cells transfected with the APSE-Luc plasmid.

CONCLUSION: AFP enhancer, especially the 1.0-kb enhancer, can specifically accelerate the expression of target genes within cells that are positive for AFP.

Key Words: Alpha fetoprotein; Promoter; Enhancer; Clone; Polymerase chain reaction; Vector; Hepatocellular carcinoma

Ma XJ, Kuang AR, Huang R. Construction of the alpha-fetoprotein enhancer controlled gene therapy vector specific for hepatocellular carcinoma and identification of its activity. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(33): 3474-3478

摘要

目的: 构建新型AFP顺式作用元件调控的基因表达载体, 检测该调控元件的特异性和活性表达。

方法: 设计含有特定酶切位点的引物, 采用PCR法从HepG2细胞中克隆AFP启动子及增强子基因亚区片段。启动子与增强子长、短片段分别与含有报告基因荧光素酶基因的载体pGL-3的多克隆位点连接, 构建不同长度hAFP增强子调控的肝癌特异性Luciferase表达载体APSE-Luc/APLE-Luc。经测序, PCR及酶切鉴定各重组体。用脂质体法将表达载体转染表达或不表达AFP的肿瘤细胞系进行荧光强度及特异性表达测定。

结果: 成功地将AFP基因启动子、增强子克隆到报告基因载体pGL-3的多克隆位点, 构建

成为不同长度hAFP增强子调控的肝癌特异性Luciferase表达载体APSE-Luc/APLE-Luc, 酶切鉴定和DNA序列分析无误. 转染APLE-Luc质粒的细胞中Luciferase表达量明显高于转染APSE-Luc质粒的细胞, 其在HepG2细胞中的表达明显高于SMMC7721细胞及Hela细胞.

结论: 成功构建AFP启动子与增强子联合调控载体APSE-Luc/APLE-Luc. AFP增强子能够特异性地增强目的基因在AFP阳性细胞中表达, 并且不同的亚区活性不同, 长片段的活性明显高于短片段.

关键词: 甲胎蛋白; 启动子; 增强子; 克隆; 聚合酶链式反应; 载体; 肝癌

马晓娟, 匡安仁, 黄蕤. hAFP增强子调控的肝癌特异性基因治疗载体的构建及活性测定. 世界华人消化杂志 2007;15(33): 3474-3478

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3474.asp>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球最常见的恶性肿瘤之一, 是在我国癌症患者病死率最高的疾病之一^[1]. 手术、放化疗及介入等常规治疗疗效均不理想, 不能从根本上改善患者的预后^[2]. 利用基因工程的手段, 对肝癌进行基因治疗, 是肝癌治疗的热点^[3-6]. 目前利用AFP转录调控序列驱动目的基因表达是肝癌靶向治疗的主要手段^[4-10]. 已有文献报道, 应用甲胎蛋白基因转录顺式作用元件调控抗肿瘤基因, 能特异性杀伤肝癌细胞^[11-16]. 我们克隆了缩短的AFP基因启动子和增强子, 将其连接到含有荧光素酶(Luciferase)报告基因的载体(pGL-3), 构建了重组真核表达载体APSE-Luc及APPLE-Luc, 并对其活性及特异性进行了检测.

1 材料和方法

1.1 材料 内切酶*Bgl* II、*Kpn* I、*Hind* III购自TaKaRa公司, 1640、TRIzol购自Invitrogen公司, 小牛血清购自杭州四季青公司, T4连接酶、质粒提取试剂盒Plasmid mini kit、凝胶回收试剂盒Gel Extraction Kit、PCR试剂盒购自Promega公司, Tris、琼脂糖、胰蛋白胨、酵母提取物、耗材等购自华美生物工程公司或三博远志生物技术公司. 人NIS基因由四川大学华西医院核医学科黄蕤博士合成^[17], 大肠杆菌JM109、人肝癌细胞系HepG2、SMMC7721细胞、人宫颈癌细胞系Hela细胞由四川大学华西医院传染科惠赠.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 在研究中分实验组(AFP阳性肝癌细胞系HepG2)及对照组(AFP阴性肝癌细胞系SMMC7721). 3株人宫颈癌细胞(Hela)在含100 mL/L小牛血清的1640培养基中, 于37℃, 50 mL/L CO₂, 饱和湿度下培养.

1.2.2 AFP启动子及增强子长、短片段的克隆: 根据人AFP基因图谱设计引物, 启动子正向引物5'-GAAGATCTTCTGAGGAGAATATTTGTTA-3', 反向引物5'-CCAAGCTTGGTGTATTGGCAGTGGTGG-3'; 增强子长片段正向引物5'-GGTACCCTGTCTGCAAGCTTATGATTCCT-3', 短片段正向引物5'-GGTACCCCCACACGTATAGCTCAACTGC-3', 长、短片段共用反向引物5'-AGATCTTGGCCTGGATAAAGCTGAGTGG-3', 并在上、下游引物5'端分别加入限制性内切酶*Bgl* II和*Kpn* I(启动子)、*Bgl* II和*Hind* III(增强子)位点. 按照Omega公司Tissue DNA Kits试剂盒操作说明抽提HepG2细胞基因组DNA, 以此为模板进行PCR扩增, 并将产物纯化后进行测序.

1.2.3 APSE-Luc及APPLE-Luc表达载体构建: 使用Gel Extraction Kit凝胶回收试剂盒回收PCR产物AFP启动子、增强子基因片段cDNA, 按照启动子-增强子(长/短)顺序连接后, 在T4连接酶作用下分别连接至pGL-3载体上, 16℃过夜. 连接产物转化感受态大肠杆菌JM109, 挑取克隆, 以180 r/min、37℃摇菌过夜, Plasmid kit质粒提取试剂盒提取质粒. 新构建重组真核表达载体APSE-Luc及APPLE-Luc, 进行酶切、电泳测定.

1.2.4 脂质体转染: 转染前1 d, 在6孔培养板内以2×10⁶接种细胞, 每种细胞做3个复孔, 共3个6孔培养板. 待细胞生长到70%-80%密度时, 以含3-4 μg APSE-Luc/APLE-Luc、1 μL LP2000和500 μL无血清的1640培养基进行混合转染, 3-6 h后用1 mL含100 mL/L小牛血清的1640培养基取代.

1.2.5 荧光强度检测(虫荧光素酶及海肾荧光素酶活性分析): 转染48 h后使用1×PBS清洗培养细胞, 加入适量1×lysis buffer, 将细胞转入微量离心管置冰上, 离心后将细胞裂解液置于检测管中并将管放入检测仪中检测荧光强度, 用于评价重组质粒APSE-Luc/APLE-Luc在肿瘤细胞中的表达.

2 结果

2.1 PCR结果 PCR克隆的AFP启动子cDNA共268 bp, 增强子长片段cDNA含986 bp, 短片段420 bp. PCR产物进行20 g/L琼脂糖凝胶电泳分别可见

■研发前沿
如何实现治疗基因的靶向性表达是肿瘤基因治疗领域中的一个热点领域. 甲胎蛋白在多数原发性肝细胞癌(HCC)患者血清中明显升高, 因此AFP可作为一种特异性肿瘤标志物应用于肝癌的基因靶向治疗. 甲胎蛋白启动子目前已广泛应用于肝癌的靶向性基因治疗中, 但组织特异性启动子的活性通常都较低, 因此单独的启动子启动活性太低达不到基因治疗的要求. 对AFP的许多调控元件已有较多研究, 这些调控序列较长, 包含了几乎所有的顺式和反式作用元件. 大多数基因治疗载体容量有限, 无法容纳AFP基因全部5'-端序列(约7.6 kb), DNA片段太长也不易操作, 同时其专一性不好.

■相关报道

已有文献报道, 300 bp的人AFP启动子序列已足以在人、大鼠细胞中启动目的基因的表达。利用含这种启动子的逆转录病毒载体在AFP阳性的肝癌细胞株中取得了特异表达自杀基因的效果。Cao *et al* 的系列研究结果显示, 在表达或不表达AFP的HCC细胞内AFP增强子都可明显提高启动子的活性, 使转染基因的表达增强4-8倍, 同时明显抑制转染基因在非HCC细胞的表达, AFP增强子的增强作用与抑制作用相结合, 使转染基因在HCC细胞的表达为非HCC细胞的32-152倍。

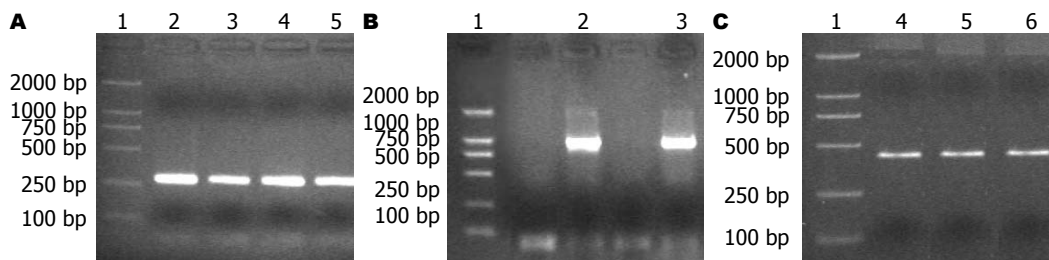


图1 PCR扩增AFP启动子和增强子基因。A: 启动子基因; B: 增强子基因Lenh; C: 增强子基因Senh; 1: Marker2000; A2-5: AFP启动子(268 bp); B2-3: AFP长片段增强子Lenh(1000 bp); C4-6: AFP短片段增强子Senh(420 bp)。

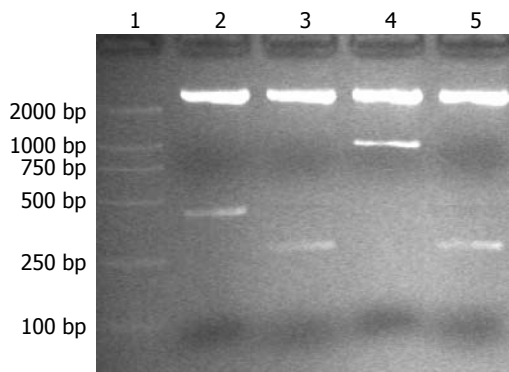


图2 pAPSE-Luc和pAPLE-Luc双酶切。1: Marker2000; 2: *Kpn* I 与 *Bgl* II 双酶切APSE-Luc质粒; 3: *Bgl* II 与 *Hind* III 双酶切APSE-Luc质粒; 4: *Kpn* I 与 *Bgl* II 双酶切APLE-Luc质粒; 5: *Bgl* II 与 *Hind* III 双酶切APSE-Luc质粒。

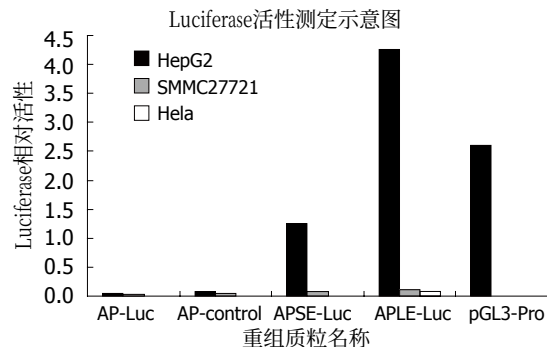


图3 AFP启动子、增强子功能检测结果。AP-Luc: AFP启动子插入pGL-3 basic载体构建的重组质粒; AP-Control: AFP启动子插入pGL3-Enhancer载体构建的重组质粒; APSE-Luc和APLE-Luc质粒: 重组真核表达载体APSE-Luc及APLE-Luc质粒; pGL3-Pro: pGL3-Promoter载体质粒。

到一条清晰的300 bp、400 bp及1000 bp左右条带, 符合预期结果(图1)。

2.2 重组质粒APSE-Luc和APLE-Luc双酶切电泳鉴定 连接产物转化感受态大肠杆菌JM109, 培养挑取克隆, 提取质粒APSE-Luc和APLE-Luc, 分别进行 *Bgl* II + *Kpn* I (启动子)、*Bgl* II + *Hind* III (增强子) 双酶切, 20 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定可见到0.3 kb(Promoter)、420 bp(Senh)及1.0 kb (Lenh)片段(图2)。

2.3 AFP启动子、增强子功能检测 分别将APSE-Luc和APLE-Luc质粒转染HepG2细胞、SMMC2721和Hela细胞, 对细胞荧光表达量进行虫荧光素酶及海肾荧光素酶活性分析。结果(图3)显示, 转染APLE-Luc质粒的HepG2细胞中的荧光强度明显高于转染APSE-Luc质粒的HepG2、SMMC2721和Hela细胞, 表明AFP启动子与增强子联合调控, 可特异性地启动并增强其下游的Luc基因在AFP阳性的肝癌细胞中高效表达, 长片段的增强子作用尤为显著。

3 讨论

目的基因的靶向性表达对肝癌的治疗极重要。基因治疗中利用细胞或组织特异性启动子能够

使目的基因在特定的靶细胞中表达^[18-19], 最大程度地减少对正常组织的毒副作用。AFP作为特异性的肿瘤标志物, 其启动子能够被用来驱动治疗基因的表达^[20-21]。利用AFP在肝癌组织中特异性高表达的特性, 可将目的基因置于AFP基因调控序列下方, 使目的基因仅在肝癌细胞表达, 提高基因治疗的特异性和靶向性。Kunitomi *et al*^[22]将白喉毒素片段A的基因(DTA)连接在AFP启动子下游, 然后直接注射到肝癌组织中, 结果肝癌细胞中DTA基因大量表达, 肿瘤细胞死亡, 而AFP阴性癌细胞和正常肝脏细胞不受影响。

对AFP的许多调控元件已有较多研究, 这些调控序列较长, 包含了几乎所有的顺式和反式作用元件, 目的是发挥最大的转录启动活性^[14,23]。大多数基因治疗载体容量有限, 无法容纳AFP基因全部5'-端序列(约7.6 kb), DNA片段太长也不易操作。另外, 若采用AFP基因全部5'-端序列作为调控序列, 除启动子外还有许多正、负调控元件, 专一性不好, 用其调控抗肿瘤基因的转录有可能杀伤肝脏再生时出现的有分化功能的干细胞, 因为后者也产生AFP, 从而影响肝脏的再生功能。Ido *et al*^[25]证实, 300 bp的人AFP启动子序

列已足以在人、大鼠细胞中启动目的基因的表达. 利用含这种启动子的逆转录病毒载体在AFP阳性的肝癌细胞株中取得了特异表达自杀基因的效果, 但是组织特异性启动子的活性通常都较低, 若仅采用0.3 kb的启动子则启动活性太低达不到基因治疗的要求. 为了解决这一问题, Ido *et al*^[24]将人类VEGF基因5'-端具有增强子活性的缺氧反应性元件(hypoxia-responsive element, HRE)克隆到AFP启动子的上游, 联合调控自杀基因(HSV-tk)的表达, 可明显增强AFP启动子的活性, 在体内和体外实验中杀伤AFP低表达的肝脏肿瘤.

由于AFP的表达很大程度上依赖于增强子的活性^[24], 一些研究者试图利用增强子的功能来增强转染基因的表达^[26-29]. Kanai *et al*^[12]将AFP基因的启动子和增强子同时与自杀基因胞嘧啶脱氨酶(CD)基因融合, 转染肝癌细胞, 使CD基因在肝癌组织特异性高效表达, 将无毒的5-氟胞嘧啶(5-FC)代谢为5-氟尿嘧啶, 杀伤肝癌细胞. Cao *et al*^[30-31]的系列研究结果显示, 在表达或不表达AFP的HCC细胞内AFP增强子都可明显提高启动子的活性, 使转染基因的表达增强4-8倍, 同时明显抑制转染基因在非HCC细胞的表达. AFP增强子的增强作用与抑制作用相结合, 使转染基因在HCC细胞的表达为非HCC细胞的32-152倍.

AFP完整的增强子序列含2.0 kb碱基(-5.1/-3.1), 含有两个亚区: 0.3 kb的增强子A(-4.0/-3.7)和0.4 kb的增强子B(-3.7/-3.3). 基于Akio *et al*^[23]的研究思路, 我们克隆了最小的AFP启动子(0.3 kb)和不同长度的增强子(0.4 kb/1.0 kb)序列, 再分别将增强子与启动子连接, 作为肝癌特异性顺式调控元件, 试图寻找能够保持正常活性、便于分子克隆操作的小片段顺式调控元件. 实验证明, 重组的肝癌基因治疗表达载体, 能够特异性的在AFP阳性肝癌细胞HepG2中发挥转录活性, 调控目的基因的表达, 在低表达AFP的SMMC-7721细胞和不表达AFP的HeLa细胞中则启动活性极低. 同时还证实, 1.0 kb增强子的调控活性要明显高于0.4 kb增强子, 其转录活性、特异性都很好的保存下来, 在其下游克隆抗肿瘤基因, 可对AFP阳性肝癌进行基因治疗.

总之, 本研究构建的hAFP增强子调控的肝癌特异性基因治疗载体APSE-Luc和APLE-Luc, 为肝癌的基因靶向治疗提供了新的思路和有力工具, 增加了转染基因靶向治疗肝癌应用于临

床的可行性.

4 参考文献

- Levin B, Amos C. Therapy of unresectable hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 1995; 332: 1294-1296
- Li Y, Yu DC, Chen Y, Amin P, Zhang H, Nguyen N, Henderson DR. A hepatocellular carcinoma-specific adenovirus variant, CV890, eliminates distant human liver tumors in combination with doxorubicin. *Cancer Res* 2001; 61: 6428-6436
- Kaneko S, Hallenbeck P, Kotani T, Nakabayashi H, McGarrity G, Tamaoki T, Anderson WF, Chiang YL. Adenovirus-mediated gene therapy of hepatocellular carcinoma using cancer-specific gene expression. *Cancer Res* 1995; 55: 5283-5287
- Schmitz V, Qian C, Ruiz J, Sangro B, Melero I, Mazzolini G, Narvaiza I, Prieto J. Gene therapy for liver diseases: recent strategies for treatment of viral hepatitis and liver malignancies. *Gut* 2002; 50: 130-135
- Lu SY, Sui YF, Li ZS, Pan CE, Ye J, Wang WY. Construction of a regulable gene therapy vector targeting for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 688-691
- Shibata T, Giaccia AJ, Brown JM. Development of a hypoxia-responsive vector for tumor-specific gene therapy. *Gene Ther* 2000; 7: 493-498
- Ling CQ, Li B, Zhang C, Zhu DZ, Huang XQ, Gu W, Li SX. Inhibitory effect of recombinant adenovirus carrying melittin gene on hepatocellular carcinoma. *Ann Oncol* 2005; 16: 109-115
- Sa Cunha A, Bonte E, Dubois S, Chretien Y, Eraiser T, Degott C, Brechot C, Tran PL. Inhibition of rat hepatocellular carcinoma tumor growth after multiple infusions of recombinant Ad.AFPtk followed by ganciclovir treatment. *J Hepatol* 2002; 37: 222-230
- Takahashi M, Sato T, Sagawa T, Lu Y, Sato Y, Iyama S, Yamada Y, Fukaura J, Takahashi S, Miyanishi K, Yamashita T, Sasaki K, Kogawa K, Hamada H, Kato J, Niitsu Y. E1B-55K-deleted adenovirus expressing E1A-13S by AFP-enhancer/promoter is capable of highly specific replication in AFP-producing hepatocellular carcinoma and eradication of established tumor. *Mol Ther* 2002; 5: 627-634
- Kim J, Lee B, Kim JS, Yun CO, Kim JH, Lee YJ, Joo CH, Lee H. Antitumoral effects of recombinant adenovirus YKL-1001, conditionally replicating in alpha-fetoprotein-producing human liver cancer cells. *Cancer Lett* 2002; 180: 23-32
- Dachs GU, Dougherty GJ, Stratford IJ, Chaplin DJ. Targeting gene therapy to cancer: a review. *Oncol Res* 1997; 9: 313-325
- Kanai F. Transcriptional targeted gene therapy for hepatocellular carcinoma by adenovirus vector. *Mol Biotechnol* 2001; 18: 243-250
- Su H, Chang JC, Xu SM, Kan YW. Selective killing of AFP-positive hepatocellular carcinoma cells by adeno-associated virus transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Hum Gene Ther* 1996; 7: 463-470
- Sakai M, Morinaga T, Urano Y, Watanabe K, Wegmann TG, Tamaoki T. The human alpha-fetoprotein gene. Sequence organization and the 5' flanking region. *J Biol Chem* 1985; 260: 5055-5060
- Li MS, Li PF, Chen Q, Du GG, Li G. Alpha-

■应用要点

本文提示, AFP增强子能够明显提高启动子的启动活性, 1.0 kb增强子的调控活性要明显高于0.4 kb增强子, 其转录活性、特异性都很好的保存下来. AFP增强子与启动子联合调控抗肿瘤基因的表达, 对AFP阳性肝癌的基因治疗具有重要意义.

■同行评价

本文目的明确, 思路清晰, 结论合乎逻辑, 对于进一步开展该领域的研究提供了可行的思路。

- fetoprotein stimulated the expression of some oncogenes in human hepatocellular carcinoma Bel 7402 cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 819-824
- 16 Ren XW, Liang M, Meng X, Ye X, Ma H, Zhao Y, Guo J, Cai N, Chen HZ, Ye SL, Hu F. A tumor-specific conditionally replicative adenovirus vector expressing TRAIL for gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther* 2006; 13: 159-168
- 17 黄蕊, 匡安仁, 余海放, 马超, 唐恭顺. 携带人NIS基因的重组腺病毒的构建. *生物医学工程学杂志* 2005; 22: 765-768
- 18 Tomizawa M, Yu L, Wada A, Tamaoki T, Kadomatsu K, Muramatsu T, Matsubara S, Watanabe K, Ebara M, Saisho H, Sakiyama S, Tagawa M. A promoter region of the midkine gene that is frequently expressed in human hepatocellular carcinoma can activate a suicide gene as effectively as the alpha-fetoprotein promoter. *Br J Cancer* 2003; 89: 1086-1090
- 19 Guan M, Rodriguez-Madoz JR, Alzuguren P, Gomar C, Kramer MG, Kochanek S, Prieto J, Smerdou C, Qian C. Increased efficacy and safety in the treatment of experimental liver cancer with a novel adenovirus-alphavirus hybrid vector. *Cancer Res* 2006; 66: 1620-1629
- 20 Meng WS, Butterfield LH, Ribas A, Disette VB, Heller JB, Miranda GA, Glaspy JA, McBride WH, Economou JS. alpha-Fetoprotein-specific tumor immunity induced by plasmid prime-adenovirus boost genetic vaccination. *Cancer Res* 2001; 61: 8782-8786
- 21 Gorog D, Regoly-Merei J, Paku S, Kopper L, Nagy P. Alpha-fetoprotein expression is a potential prognostic marker in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5015-5018
- 22 Kunitomi M, Takayama E, Suzuki S, Yasuda T, Tsutsui K, Nagaike K, Hiroi S, Tadakuma T. Selective inhibition of hepatoma cells using diphtheria toxin A under the control of the promoter/enhancer region of the human alpha-fetoprotein gene. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91: 343-350
- 23 Watanabe K, Saito A, Tamaoki T. Cell-specific enhancer activity in a far upstream region of the human alpha-fetoprotein gene. *J Biol Chem* 1987; 262: 4812-4818
- 24 Ido A, Nakata K, Kato Y, Nakao K, Murata K, Fujita M, Ishii N, Tamaoki T, Shiku H, Nagataki S. Gene therapy for hepatoma cells using a retrovirus vector carrying herpes simplex virus thymidine kinase gene under the control of human alpha-fetoprotein gene promoter. *Cancer Res* 1995; 55: 3105-3109
- 25 Ido A, Uto H, Moriuchi A, Nagata K, Onaga Y, Onaga M, Hori T, Hirono S, Hayashi K, Tamaoki T, Tsubouchi H. Gene therapy targeting for hepatocellular carcinoma: selective and enhanced suicide gene expression regulated by a hypoxia-inducible enhancer linked to a human alpha-fetoprotein promoter. *Cancer Res* 2001; 61: 3016-3021
- 26 Tan EH, Hooi SC, Laban M, Wong E, Ponniah S, Wee A, Wang ND. CCAAT/enhancer binding protein alpha knock-in mice exhibit early liver glycogen storage and reduced susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2005; 65: 10330-10337
- 27 Huang X, Zhang W, Wakimoto H, Hamada H, Cao X. Adenovirus-mediated tissue-specific cytosine deaminase gene therapy for human hepatocellular carcinoma with different AFP expression levels. *J Exp Ther Oncol* 2002; 2: 100-106
- 28 Pin RH, Reinblatt M, Fong Y. Utilizing alpha-fetoprotein expression to enhance oncolytic viral therapy in hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 2004; 240: 659-665; discussion 665-666
- 29 Takikawa H, Mafune K, Hamada H, Nettelbeck DM, Muller R, Makuuchi M, Kaminishi M. An advanced strategy of enhanced specific gene expression for hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2003; 22: 1051-1056
- 30 Cao G, Kuriyama S, Tsujinoue H, Chen Q, Mitoro A, Qi Z. A novel approach for inducing enhanced and selective transgene expression in hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer* 2000; 87: 247-252
- 31 Cao G, Kuriyama S, Gao J, Nakatani T, Chen Q, Yoshiji H, Zhao L, Kojima H, Dong Y, Fukui H, Hou J. Gene therapy for hepatocellular carcinoma based on tumour-selective suicide gene expression using the alpha-fetoprotein (AFP) enhancer and a housekeeping gene promoter. *Eur J Cancer* 2001; 37: 140-147

编辑 程剑侠 电编 何基才

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

● 消息 ●

世界华人消化杂志在线办公系统

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

大鼠30%小体积肝移植模型三种切肝方法的比较

姚爱华, 浦立勇, 李相成, 姜超, 马跃峰, 刘现忠, 仲跻魏, 王学浩

姚爱华, 浦立勇, 李相成, 姜超, 马跃峰, 刘现忠, 仲跻魏, 王学浩, 南京医科大学第一附属医院肝脏移植中心 江苏省南京市 210029

姚爱华, 1999年上海医科大学毕业, 2007年南京医科大学普外科博士, 主治医师, 主要从事肝脏移植, 活体肝移植术后损伤与再生、移植免疫等方面研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30671992

通讯作者: 王学浩, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院肝脏移植中心, 中国活体肝移植研究所。wangxuehao1941@hotmail.com

电话: 025-83718836-6450 传真: 025-83672106

收稿日期: 2007-06-16 修回日期: 2007-09-30

Different methods of liver lobe resection for a rat model of 30% small-for-size liver transplantation

Ai-Hua Yao, Li-Yong Pu, Xiang-Cheng Li, Chao Jiang, Yue-Feng Ma, Xian-Zhong Liu, Ji-Wei Zhong, Xue-Hao Wang

Ai-Hua Yao, Li-Yong Pu, Xiang-Cheng Li, Chao Jiang, Yue-Feng Ma, Xian-Zhong Liu, Ji-Wei Zhong, Xue-Hao Wang, Liver Transplantation Center, Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30671992

Correspondence to: Prof. Xue-Hao Wang, Liver Transplantation Center, the Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. wangxuehao1941@hotmail.com

Received: 2007-06-16 Revised: 2007-09-30

Abstract

AIM: To explore an effective and viable way to establish a 30% small-for-size liver transplantation model in rats.

METHODS: Animals were divided into the following groups: group I ($n = 28$), 30% liver transplantation using a median lobe graft; group II ($n = 15$), 30% liver transplantation using right lobe and right median lobe graft; and group III ($n = 36$), 30% liver transplantation using a median lobe graft, with an improved technique of lobe resection. Male Lewis rats were used as donors and recipients, and the grafts were implanted according to Kamada's two-cuff method. Seven-day survival and technical complications, in-

cluding bleeding, IVC or portal vein stricture, and bile leakage, were compared between the groups.

RESULTS: Compared to group I, the time for liver lobe reduction in group II (11 ± 3 min vs 13 ± 2 min, $P = 0.0305$) was shorter, with fewer IVC strictures ($0/15$ vs $8/28$, $P = 0.036$), but more bile leakages ($4/15$ vs $0/28$, $P = 0.011$). After improvement of the lobe resection method, the incidence of IVC strictures was significantly decreased when comparing group III with group I ($1/36$ vs $8/28$, $P < 0.01$). Other complications showed no significant difference. There were no significant differences in the 7-d survival rate between the three groups (group I, 33%, 5/15; group II, 50%, 6/12; and group III, 60%, 9/15), although group III had more survivors at 7 d after liver transplantation.

CONCLUSION: With improved method of lobe resection, a more effective and viable 30% small-for-size rat liver transplantation model with a median lobe graft can be established.

Key Words: Liver transplantation; Small-for-size; Rat; Liver resection

Yao AH, Pu LY, Li XC, Jiang C, Ma YF, Liu XZ, Zhong JW, Wang XH. Different methods of liver lobe resection for a rat model of 30% small-for-size liver transplantation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(33): 3479-3483

摘要

目的: 探讨不同肝叶选取和切肝方法对小体积肝移植术后生存率的影响, 以建立理想的成功率高的大鼠30%小体积肝移植模型。

方法: 采用以Kamada的“二袖套法”非动脉化大鼠原位肝移植模型为基础, 建立大鼠30%小体积肝移植模型。实验分为3组: I组: 中叶供肝的30%小体积肝移植组($n = 28$); II组: 右中叶和右叶供肝的30%小体积肝移植组($n = 15$); III组: 改进切肝方法的30%中叶供肝小肝移植组($n = 36$)。观察3组术后并发症和7 d生存率。

■背景资料

大鼠小体积肝移植模型是活体肝移植实验研究的常用模型, 但目前术后存活率较低, 供肝的切肝技术是术后死亡的重要原因之一。

■应用要点

本文作者在对大鼠肝脏解剖深入研究的基础上,进一步改进切肝技术,建立了更理想可靠的大鼠30%小体积肝移植模型,具有较强的实用性和指导价值,可以减少后来研究者摸索的艰辛。

结果: II组切肝时间和术后肝后下腔静脉狭窄的发生率明显低于I组(11 ± 3 min vs 13 ± 2 min, $P = 0.0305$; $0/15$ vs $8/28$, $P = 0.036$), 但胆漏的发生率高于I组($4/15$ vs $0/28$, $P = 0.011$)。III组肝后下腔静脉狭窄的发生率明显低于I组($1/36$ vs $8/28$, $P = 0.008$), 其他并发症发生率各组间无明显差别。术后7 d生存率I (33%)、II (50%)、III (60%)组间无统计学差别。

结论: 采用中叶供肝、改进切肝技术可以建立具有更稳定的大鼠30%小体积肝移植模型。

关键词: 肝移植; 小体积; 大鼠; 肝切除

姚爱华, 浦立勇, 李相成, 姜超, 马跃峰, 刘现忠, 仲跻魏, 王学浩. 大鼠30%小体积肝移植模型三种切肝方法的比较. 世界华人消化杂志 2007;15(33): 3479-3483

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3479.asp>

0 引言

随着活体肝移植特别是成人间活体肝移植开展的越来越多, 小体积肝移植的概念也愈来愈被人们认识和重视^[1-3]. 与全肝移植相比, 小体积肝移植后的死亡率和并发症的发生率高^[4]. 目前认为, 有关移植损伤的机制, 除了移植物体积过小、肝细胞数量不足, 导致不能满足机体代谢和合成的需要外, 移植物的缺血再灌注损伤、冷保存损伤和门静脉高灌注也是小肝移植损伤的重要原因^[5-7]. 但其确切的分子机制, 目前尚不清楚. 建立与临床上情况相似的小体积肝移植动物模型是开展上述研究的基础. 大鼠小体积肝移植模型是目前实验研究中应用最多的动物模型. 但是目前报道的大鼠小体积肝移植术后生存率较低^[5,8], 外科技术, 特别是供肝切肝方法, 是很重要的原因之一. 我们采用以Kamada *et al*^[9]的“二袖套法”非动脉化大鼠原位肝移植模型为基础的“二袖套法”非动脉化大鼠原位肝移植模型为基础, 以梁廷波 *et al*^[10]的体内法切取供肝, 在对大鼠肝脏解剖深入研究的基础上, 进一步改进技术, 探讨了不同肝叶选取和切肝方法对小体积肝移植术后生存率的影响, 建立了更为稳定可靠的大鼠小体积肝移植模型。

1 材料和方法

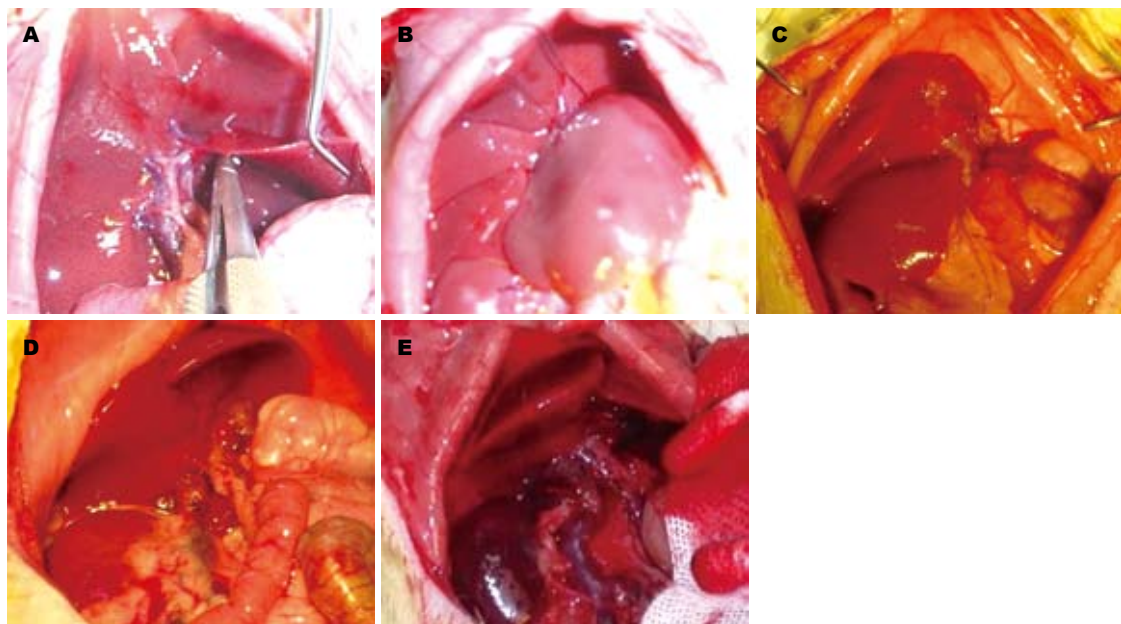
1.1 材料 供、受体采用雄性Lewis大鼠8-14 wk龄, 体质量230-380 g, 购于北京维通利华实验动物有限公司, 饲养于江苏省实验动物中心清洁级实验室. 术前动物不禁水、食. 供体体质量低

于受体10-30 g, 使供肝质量占受体全肝质量的30%左右. 显微手术器械一套, 自制血管套管(7F, 5F, 为动脉穿刺套管的外鞘制成, 套管体长2 mm, 柄长1.5-2 mm), 硬膜外导管制成胆管支架管(长5 mm, 外径0.7-1 mm). 手术为非显微镜下操作。

1.2 方法

1.2.1 分组: I组($n = 28$): 中叶供肝的30%小体积肝移植组. 取大鼠供体体质量低于受体10-20 g. 切除尾叶、左叶、右叶和三角叶, 仅保留中叶作为供肝. II组($n = 15$): 右中叶和右叶供肝的30%小体积肝移植组. 取大鼠体质量相差20-30 g大鼠分别作为供、受体, 体质量轻者为供体. 切除尾叶、左叶、左中叶和三角叶, 以右中叶和右叶作为供肝. III组($n = 36$): 改进切肝方法的30%中叶供肝小肝移植组. 供受体和供肝选取同I组, 但改进右叶的切肝方法. 观察3组供肝切取时间、术后断面出血、肝下下腔静脉狭窄, 供肝灌注情况、胆漏、7 d生存率、腹腔感染等。

1.2.2 手术: 供体受体均乙醚开放吸入麻醉, 受体手术麻醉前15-30 min sc阿托品0.03 mg. 供体肝素化, 采用肝素50-100 U自腰静脉注入. (1)常规方法中叶供肝的30%小体积供肝切取. a. 尾叶: 以5-0丝线直接自最细的蒂部结扎切除即可. b. 左叶: 以7-0prolene线在缝扎左叶近基部3 mm处部分肝组织(图1A), 可见左叶右侧约1/3的肝脏发白(图1B). 在线结远端剪开部分发白肝组织作为结扎线的位置和沟槽, 左叶根部带线过沟槽打结, 切除结扎线远端肝组织. c. 三角叶的切除也是自根部直接结扎, 收紧结扎线时保证肝实质的切割, 只扎管道组织, 以免收紧结扎线后肝下下腔静脉的缩窄. d. 右叶切除: 先分离右叶的胆管(动脉伴行于胆管表面)和门静脉右支, 分别结扎切断, 带线从根部结扎, 收线方法与结扎三角叶相同. (2)右中叶和右叶供肝的30%小体积供肝切取. 尾叶和三角叶的切除同中叶供肝的30%小体积供肝切取, 左叶直接带线自根部结扎即可. 左中叶: 用边缝边切的方法, 自镰状韧带向右1 mm分3-4次缝扎切除左中叶. 若断面有渗血, 可行“8”字缝合止血(图1C). (3)改进切肝方法的30%中叶供肝切取. 尾叶和三角叶的切除与I组相同. 左叶切除: 左叶右缘近基部3 mm处缝扎、远端剪开同I组. 另外, 左叶根部的左侧以显微镊轻夹一3-4 mm长的压痕, 左叶根部带线过沟槽和压痕打结, 切除结扎线远端肝组织. 右叶切除: 分离切断右叶的门脉三联管结构同



■同行评价
本文研究具有一定的创新性和科学意义, 实验分组明确, 方法可行, 采用的统计学方法准确, 论述清楚, 结果可信, 有一定参考价值.

图1 小体积肝移植手术过程. A: 供肝左叶切除, 缝扎门静脉左叶支; B: 门静脉左叶支缝扎后, 左叶表面出现血供分界; C: 保留右中叶和右叶的肝切除; D: 中叶作为供肝的肝切除; E: 小体积肝移植供肝切除后肝后下腔静脉狭窄(远端扩张).

表1 大鼠30%小体积供肝术后并发症比较

供肝构成	n	断面出血	肝后下腔静脉狭窄	相邻肝叶血供障碍	胆漏	感染	切肝时间	7 d生存率
I组: 中叶	28	1	8	0	0	3	13±2	33%, 5/15
II组: 右中+右叶	15	3	0 ^a	1	4 ^a	3	11±3 ^a	50%, 6/12
III组: 中叶, 技术改进	36	2	1 ^b	0	0	-	-	60%, 9/15

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs I组.

I组. 以7-0无损伤线自右叶基底部、右叶和三角叶交界缘靠中上部缝扎一针, 以缝扎右叶的肝静脉, 远端剪开, 带线自根部结扎余下的右叶(图1D). 供肝的灌注用悬吊输液法行重力灌注, 灌注及保存均采用0-4℃林格液, 供肝的游离、修剪、套管安装、受体肝切除及供肝植入均同全肝移植^[5].

统计学处理 数据用统计软件SPSS13.0软件进行统计学处理. 率的比较用Fisher精确检验, 切肝时间比较, 因方差不齐, 用Satterthwaite t' 检验. 检验水准 $\alpha = 0.05$.

2 结果

与中叶供肝组(I组)相比, 右中+右叶供肝组(II组)肝后下腔静脉狭窄(图1E)的发生率明显降低($P = 0.036$, 表1), 切肝时间缩短($P = 0.0305$), 但胆漏的发生率明显增加($P = 0.011$), 其他并发症的发生率两组相比无明显差别. 7 d生存率III组高于II组, 但无统计学差别. 肝后下腔静脉狭窄

的发生率在右叶切除技术改进组(III组)明显下降($P = 0.008$), 7 d生存率高于I组, 但统计学未显示差别.

3 讨论

自1973年Lee *et al*^[11]成功建立大鼠原位肝移植(rat orthotopic liver transplantation, ROLT)模型和1983年Kamada *et al*^[9]首先报道采用“二袖套”法进行静脉系统重建以来, 经过数十年的发展, ROLT模型已成为肝移植基础研究运用最广泛的动物模型. 其他根据研究需要建立的各种术式的肝移植模型几乎都是以为基础的改进^[12-13]. 随着活体肝移植的开展, 各种不同体积大鼠肝移植模型亦因研究需要而产生. 部分肝移植物的类型按供肝质量与受体的肝质量之比多取以下几种: 70%供肝: 切除左叶, 保留其余各叶作供肝^[14]; 60%供肝: 以中叶、右叶和三角叶做供肝^[15]; 50%供肝: 以肝右叶和肝中叶^[9]或以右中叶、右叶和三角叶为供肝^[16]; 40%供

肝: 取中叶即可^[17]; 20%供肝: 右叶和三角叶供肝^[18]; 和30%供肝^[5]等。一般认为, 50%体积以下的移植物为小体积肝移植物, 30%以下的为超小体积的肝移植物。根据以往文献^[5,19]和我们的实验结果, 30%体积的肝脏可以由中叶供肝、右中+右叶供肝或右叶+三角叶+尾叶作供肝。

我们曾分析了15只体质量为200-378 g的Lewis大鼠体质量、肝质量及各叶所占比例, 得出以下结论: (1)建立50%体积的小肝移植时, 取供受体体质量相等或供体稍轻于受体(10 g)左右; (2)30%体积的供肝若以中叶做为供肝, 受体比供体小15-20 g左右, 若以右中+右叶作供肝, 供体应比受体轻20-40 g。

小体积供肝的(减体积)肝叶切除分为体内法和体外法两种, 前者即供体原位切除部分肝叶, 余下的肝叶冷灌注后, 切下作为供肝(原位减体积); 后者指先切下供体全肝, 在冷保存状态下离体肝叶切除(离体减体积)。梁廷波 *et al*^[10]比较了两种供肝切去方法, 认为体内法便于操作, 术后并发症低, 存活率大大提高, 明显优于体外法。我们在对大鼠解剖进一步深入研究的基础上, 也采用体内法切肝, 对小体积供肝切取手术技巧与细节处理作了探索与改进: (1)大鼠肝脏分为6个叶: 左叶、中叶、右叶、三角叶和2个尾叶, 其中中叶又分为左中叶和右中叶(图2)。大鼠门静脉分出左支、右支、中叶支和尾叶支, 右支进一步分支供应右叶和三角叶, 各胆管和肝动脉分支与门静脉支伴行。中叶支进入右中叶; 左支进入左叶后, 在距基部约2-3 mm的左叶实质内分出中叶的左侧半(左中叶)门静脉支, 在左叶肝切除时如直接带线结扎左叶基部很容易扎闭中叶左侧半的血供; 且左叶的肝静脉较宽, 占据左叶基部的外侧2/3, 如果结扎左叶太靠近根部, 很容易造成左中叶的静脉回流受阻。右叶基部较宽, 与三角叶及尾叶共同包绕肝后下腔静脉, 右叶的肝静脉于其根部中部汇入下腔静脉, 且进入下腔静脉的部位比较表浅。三角叶基部较宽。尾叶基部窄细呈蒂状。(2)因为中叶根部在下腔静脉的前方和两侧包绕下腔静脉, 且左叶肝静脉多与左中叶的肝静脉合并后汇入下腔静脉, 故中叶切除较切其他叶费时、容易造成下腔静脉的狭窄, 且残留失活肝组织多。因此一般较少采用右叶+三角叶+尾叶作供肝。与中叶作供肝相比, 用右中+右叶作供肝的好处是: 左叶切除省时省力, 直接结扎即可; 不需要切右叶,

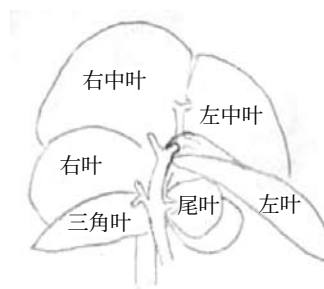


图2 大鼠肝脏解剖分叶示意图。门静脉左支进入左叶后, 在距基部约2-3 mm的左叶实质内分出中叶的左侧半(左中叶)门静脉支。

因而省去了分离结扎右肝的门脉三联结构; 只要尾叶结扎不是太靠近根部, 不存在肝后下腔缩窄的问题。但是, 因为左中叶切除后存在大的断面, 增加了胆漏、腹腔感染的发生率, 作为动物模型, 可能会影响实验结果的可比性。要克服这些缺点, 需要进一步改进技术。中叶做供肝的缺点是切除左叶和右叶比较麻烦, 方法不当, 容易造成邻近肝叶的血供障碍和肝后下腔静脉缩窄; 但好处有: 为完整肝叶, 无大的残肝断面, 不会形成胆漏。

我们在改进切肝技巧后, 获得了较为理想的30%小体积供肝。我们的经验是: (1)左叶切除: 大鼠门静脉左支进入左叶后, 在距基部约2-3 mm的左叶实质内分出中叶的左侧半(左中叶)门静脉支, 故直接带线结扎左叶基部很容易扎闭中叶左侧半的血供。我们的做法是, 以7-0 prolene线在缝扎左叶近基部3 mm处部分肝组织(图2)(保留经左叶走向中叶外侧半的门静脉支), 可见左叶右侧约1/3的肝脏发白。在线结远端剪开部分发白肝组织作为结扎线的位置和沟槽, 左叶根部的左侧以显微镊轻夹一3-4 mm长的压痕(部分肝实质碎裂, 但不致引起大的出血), 左叶根部带线过沟槽和压痕打结, 打结时缓缓用力, 并以棉签轻压左叶根部, 以免结扎线滑向根部影响中叶左侧半的静脉回流。此法不会影响中叶血供, 稳妥可靠, 不出血。(2)右叶切除: 先分离右叶的胆管(动脉伴行于胆管表面)和门静脉右支, 分别结扎切断, 可见右叶和肝后下腔稍事分离。如不先分离切断右叶的门脉三联结构, 直接带线结扎, 结蒂组织结束包绕肝后下腔静脉, 可造成该处下腔静脉的狭窄。以7-0无损伤线自右叶基底部、右叶和三角叶交界缘靠中上缝扎一针, 以缝扎右叶的肝静脉, 远端剪开, 带线自根部结扎余下的右叶, 断面若渗血可缝扎止血。采用分步缝扎法可以有效防止直接带线结扎造成的下腔静脉的狭窄或结扎线远离根部使残留失活肝组织过多的情况。

总之, 大鼠30%小体积肝移植有数种不同的肝叶选取方法, 经过一定的技术训练和切肝方法的改进均可以建立稳定的模型. 我们总结前人经验, 进一步改进切肝方法, 并注重一些手术细节的处理, 建立了更稳定可靠的大鼠小体积肝移植模型.

4 参考文献

- 1 Lee HH, Joh JW, Lee KW, Kim SJ, Lee DS, Park JH, Choi SH, Heo JS, Hyon WS, Kwak MS, Lee SK. Small-for-size graft in adult living-donor liver transplantation. *Transplant Proc* 2004; 36: 2274-2276
- 2 Moon DB, Lee SG. Adult-to-adult living donor liver transplantation at the Asan Medical Center. *Yonsei Med J* 2004; 45: 1162-1168
- 3 Shimada M, Ijichi H, Yonemura Y, Harada N, Shiotani S, Ninomiya M, Yoshizumi T, Soejima Y, Suehiro T, Maehara Y. Is graft size a major risk factor in living-donor adult liver transplantation? *Transpl Int* 2004; 17: 310-316
- 4 Sugawara Y, Makuuchi M. Small-for-size graft problems in adult-to-adult living-donor liver transplantation. *Transplantation* 2003; 75: S20-22
- 5 Man K, Lo CM, Ng IO, Wong YC, Qin LF, Fan ST, Wong J. Liver transplantation in rats using small-for-size grafts: a study of hemodynamic and morphological changes. *Arch Surg* 2001; 136: 280-285
- 6 Nakatsuka H, Sato Y, Yamamoto S, Hirano K, Kobayashi T, Takeishi T, Hatakeyama K. Analysis of liver injury following adult small-for-size grafts in liver transplantation. *Transplant Proc* 2003; 35: 80-81
- 7 Tanaka K, Ogura Y. "Small-for-size graft" and "small-for-size syndrome" in living donor liver transplantation. *Yonsei Med J* 2004; 45: 1089-1094
- 8 Guo L, Haga S, Enosawa S, Naruse K, Harihara Y, Sugawara Y, Irani K, Makuuchi M, Ozaki M. Improved hepatic regeneration with reduced injury by redox factor-1 in a rat small-sized liver transplant model. *Am J Transplant* 2004; 4: 879-887
- 9 Kamada N, Calne RY. A surgical experience with five hundred thirty liver transplants in the rat. *Surgery* 1983; 93: 64-69
- 10 梁廷波, 郑树森, 徐骁, 范上达. 两种不同方法的大鼠小体积肝移植模型建立的比较. *中华肝胆外科杂志* 2004; 10: 320-322
- 11 Lee S, Charters AC, Chandler JG, Orloff MJ. A technique for orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation* 1973; 16: 664-669
- 12 Kashfi A, Mehrabi A, Pahlavan PS, Schemmer P, Gutt CN, Friess H, Gebhard MM, Schmidt J, Buchler MW, Kraus TW. A review of various techniques of orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplant Proc* 2005; 37: 185-188
- 13 Spiegel HU, Palmes D. Surgical techniques of orthotopic rat liver transplantation. *J Invest Surg* 1998; 11: 83-96
- 14 Foss A, Zoucas E, Steinbauer F, Ding JW, Andersson R, Ahren B. Function of reduced-size liver transplant in the rat. *Res Exp Med (Berl)* 1997; 197: 91-99
- 15 Franco-Gou R, Peralta C, Massip-Salcedo M, Xaus C, Serafin A, Rosello-Catafau J. Protection of reduced-size liver for transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4: 1408-1420
- 16 Liang T, Xu S, Yu J, Shen K, Li D, Zheng S. Activation pattern of mitogen-activated protein kinases in early phase of different size liver isografts in rats. *Liver Transpl* 2005; 11: 1527-1532
- 17 Man K, Lee TK, Liang TB, Lo CM, Fung PC, Tsui SH, Li XL, Ng KT, Fan ST. FK 409 ameliorates small-for-size liver graft injury by attenuation of portal hypertension and down-regulation of Egr-1 pathway. *Ann Surg* 2004; 240: 159-168
- 18 Tanaka H, Hashizume K, Enosawa S, Suzuki S. Successful transplantation of a 20% partial liver graft in rats: a technical innovation. *J Surg Res* 2003; 110: 409-412
- 19 Xia R, Emond JC. Orthotopic partial liver transplantation in the rat: a model of 70% hepatectomy and reduced size liver transplantation. *Transplantation* 1993; 56: 1041-1043

编辑 何燕 电编 马文华

RNAi沉默Polo-like kinase-1基因表达对胰腺癌细胞增殖的影响

张尤历, 范钰, 吴莺, 张宇川, 张炜

■背景资料
研究发现, PLK1基因高表达在许多恶性肿瘤发生发展中具有重要的作用, 但该基因在胰腺癌中研究报道较少。

张尤历, 范钰, 吴莺, 张宇川, 张炜, 江苏大学附属医院消化科 江苏省镇江市 212001

张尤历, 医学博士, 主任医师, 副教授, 主要从事消化系统疾病基础与临床研究。

通讯作者: 范钰, 212001, 江苏省镇江市, 江苏大学附属医院消化科. yufanzh99@sina.com

电话: 0511-85026370 传真: 0511-85026387

收稿日期: 2007-07-14 修回日期: 2007-11-02

Effects of polo-like kinase-1 gene silence by RNA interference on proliferation of human pancreatic cancer cells

You-Li Zhang, Yu Fan, Ying Wu, Yu-Chuan Zhang, Wei Zhang

You-Li Zhang, Yu Fan, Ying Wu, Yu-Chuan Zhang, Wei Zhang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Yu Fan, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China. yufanzh99@sina.com

Received: 2007-07-14 Revised: 2007-11-02

Abstract

AIM: To investigate the role of polo-like kinase-1 (PLK1) in human pancreatic cancer cells.

METHODS: After MiaPaCa-2 pancreatic cancer cells were transfected with small interfering RNA (siRNA) against PLK1, real-time RT-PCR and Western blotting were used to examine PLK1 gene expression in all cancer cells. The proliferation and growth of cancer cells *in vivo* and *in vitro* were studied. Apoptosis of cancer cells was evaluated by terminal uridine deoxynucleotidyl nick end labeling (TUNEL) and agarose gel electrophoresis, respectively.

RESULTS: Expression of PLK1 in MiaPaCa-2 cancer cells transfected with siRNA was down-regulated significantly. Transfection of PLK1 siRNA resulted in significant inhibition of pancreatic cancer cells *in vivo* and *in vitro*. The results from TUNEL and DNA ladder analysis showed cancer cells exhibited marked apoptosis,

in a time- and dose-dependent manner ($r = 0.875$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: RNA interference PLK1 can inhibit proliferation through inducing apoptosis of human pancreatic cancer cells.

Key Words: Pancreatic carcinoma; Polo-like kinase 1; RNA interference; Small interfering RNA; Cell proliferation; Apoptosis; Real time-reverse transcription-polymerase chain reaction; Western blotting

Zhang YL, Fan Y, Wu Y, Zhang YC, Zhang W. Effects of polo-like kinase-1 gene silence by RNA interference on proliferation of human pancreatic cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(33): 3484-3488

摘要

目的: 探讨polo-like kinase-1(PLK1)基因在胰腺癌细胞中的作用。

方法: 采用PLK1小干扰核糖核酸分子(small interfering RNA, siRNA)转染人胰腺癌MiaPaCa-2细胞后, 分别采用实时定量PCR和Western blot检测PLK1基因mRNA和蛋白表达水平, 观察PLK1 siRNA转染对胰腺癌细胞体内增殖的影响。于转染不同时间后收集细胞, 分别采用琼脂糖凝胶电泳和TUNEL方法检测胰腺癌细胞凋亡情况。

结果: 胰腺癌MiaPaCa-2细胞经siRNA转染处理后, PLK1 mRNA和蛋白表达水平明显下降($P < 0.05$)。PLK1基因siRNA可明显抑制癌细胞体外生长($P < 0.05$)和体内裸鼠模型增殖($P < 0.05$)。细胞凋亡检测发现, DNA电泳出现明显的梯度图谱, 且与浓度相关($r = 0.836$, $P < 0.05$)。TUNEL结果显示, 转染组癌细胞凋亡指数明显增加, 且呈时间和浓度依赖性($r = 0.875$, $P < 0.05$)。

结论: PLK1 siRNA转染可明显抑制胰腺癌细胞增殖, 其机制可能与诱导细胞凋亡有关。

关键词: 胰腺肿瘤; PLK1; RNA干扰; 小干扰RNA;

增殖; 凋亡; 实时定量PCR; 免疫印迹

张尤历, 范钰, 吴莺, 张宇川, 张伟. RNAi沉默Polo-like kinase-1基因表达对胰腺癌细胞增殖的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(33): 3484-3488

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3484.asp>

0 引言

Polo激酶家族包括人polo-like kinase(PLK)1, Snk, Fnk, *Xenopus laevis* Plx1, 果蝇*Drosophila polo*, 酵母PLO1和出芽酵母Cdc5^[1-4]. 在低级动物中, 该家族成员能控制中心小体功能, 染色体分离和胞质移动^[5-8]. PLK1是哺乳类该基因家族的重要成员之一. 研究发现, PLK1在有丝分裂指数增高的细胞和组织中如恶性肿瘤中表达增高^[9-13]. 已经发现, 非小细胞肺癌, 鳞状上皮细胞癌, 食管癌, 黑色素瘤, 口咽癌, 乳腺癌, 结直肠癌, 子宫内膜癌^[14-21]等实体瘤中PLK1呈高表达. 前期研究发现, 采用针对PLK1基因的反义寡核苷酸可明显抑制大肠癌细胞增殖^[22], 提示PLK1在许多实体瘤的发生发展中具有重要的作用. 但PLK1在胰腺癌中研究得较少. 我们借助于RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术, 采用针对PLK1设计合成的小干扰核糖核酸分子(small interfering RNA, siRNA)转染处理胰腺癌细胞, 观察了其对细胞增殖和凋亡的影响, 借此了解PLK1在胰腺癌形成中的可能作用.

1 材料和方法

1.1 材料 人胰腺癌细胞系MiaPaCa-2购自中国科学院上海生物化学和细胞生物学研究所. PLK1 siRNA反义链序列: CAGGAUCCUCAGCCUCCUCTT, 目标位点1253-1273, 与已知人类基因组序列无重复. 无关siRNA(scr siRNA)序列: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'. PLK1抗体, 购自Santa Cruz公司. TRIzol, RNase inhibitor, 逆转录酶SSRT II, Taq酶和转染试剂Oligofectamine购自Invitrogen公司. DNA抽提试剂盒, 购自上海申能博彩公司. Balb/c裸鼠, ♀ 15只, 4 wk, 质量14-18 g, 购自中国科学院上海生物化学研究所, 于无特殊病原体条件(SPF)下饲养.

1.2 方法 胰腺癌细胞系在含100 mL/L胎牛血清的RBMI 1640培养液, 37℃ 50 mL/L CO₂, 饱和湿度环境的条件下连续培养. 转染前1 d, 将1.0 × 10⁸/L对数期生长的细胞接种于24孔培养板, 1 mL/well, 培养过夜, 次日进行转染. 基本操作按

照说明书进行. 细胞分为空白对照组(Con-A): 未经任何处理的癌细胞; 空载对照组(Con-B): 即脂质体对照组; scr siRNA组: 培养液中含50 nmol/L的已用脂质体包埋的scr siRNA; siRNA组: 培养液中含不同浓度的已用脂质体包埋的PLK1 siRNA. 转染后于不同时间采用胰酶消化收取细胞, 进行以下试验.

1.2.1 PLK1基因检测: 采用荧光实时定量PCR检测. 应用TRIzol抽提细胞总RNA, 取总RNA 1 μg, 以Oligo dT为引物逆转录合成cDNA第一链. 以此cDNA链2 μL为模板进行PCR扩增, 荧光实时定量PCR检测步骤文献进行^[23]. PLK1引物序列为: 上游: 5'-CAAGCTCATCTTGTGCCCACT-3'; 下游: 5'-GAGAAAGGGCTGCCAGGC-3'. FAM探针: 5'-CCGCTTCTCGTCGATGTAGGTCACG-3'-TAMRA. 以GAPDH为内参. PCR反应条件为: 95℃, 预变性3 min, 95℃, 30 s; 52℃, 45 s; 72℃, 45 s; 35个循环后72℃再延伸7 min. 另外, 提取各实验组细胞总蛋白, 蛋白定量后, 以β-actin为内参照, 进行常规Western blot检测.

1.2.2 细胞增殖检测: 转染48 h后, 收集经转染的癌细胞, 常规进行MTT试验, 观测PLK1 siRNA对胰腺癌细胞增殖的影响. 另外, 转染48 h后, 收集转染的癌细胞, 以1 × PBS洗涤, 重悬. 将4-6周龄的裸鼠动物随机分为2组, 每组5只. 在裸鼠背部皮下注射细胞, 10⁶/只. 将裸鼠置于SPF级培养环境下饲养, 每天检查1次. 观察动物情况, 注意可触及到的肿瘤, 计数肿瘤质量.

1.2.3 细胞凋亡检测: 转染48 h后, 收集细胞, 采用DNA抽提试剂盒抽提DNA, 无水乙醇沉淀. 行25℃琼脂糖凝胶电泳, 电压60 V, 2 h. 另外, 根据文献^[22]方法, 进行TUNEL检测. 凋亡指数(apoptosis index, AI)计算按以下公式进行: 凋亡细胞/细胞总数 × 100%.

统计学处理 采用SPSS 10.0软件分析. $P < 0.05$ 为有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异显著.

2 结果

2.1 siRNA对胰腺癌细胞PLK1的抑制 PLK1 siRNA转染胰腺癌MiaPaCa-2细胞后, PLK1基因mRNA和蛋白水平明显下调($P < 0.05$, 图1A-B).

2.2 siRNA转染对胰腺癌细胞体外增殖的影响 MTT结果显示, siRNA转染组癌细胞生长明显受到抑制, 且呈浓度依赖性($P < 0.05$, 图2).

2.3 RNAi沉默PLK1基因表达抑制了裸鼠肿瘤增殖 大肠癌裸鼠模型对照组在12 d后, 5只均出

■研发前沿
RNAi技术已广泛用于基因治疗的研究, 具有广阔的应用前景. 但以PLK1基因为靶点, 采用siRNA治疗胰腺癌的报道较少.

■创新盘点

本文针对PLK1基因特点,设计并用化学方法合成siRNA,转染胰腺癌细胞株,观察其对癌细胞增殖和凋亡的影响。

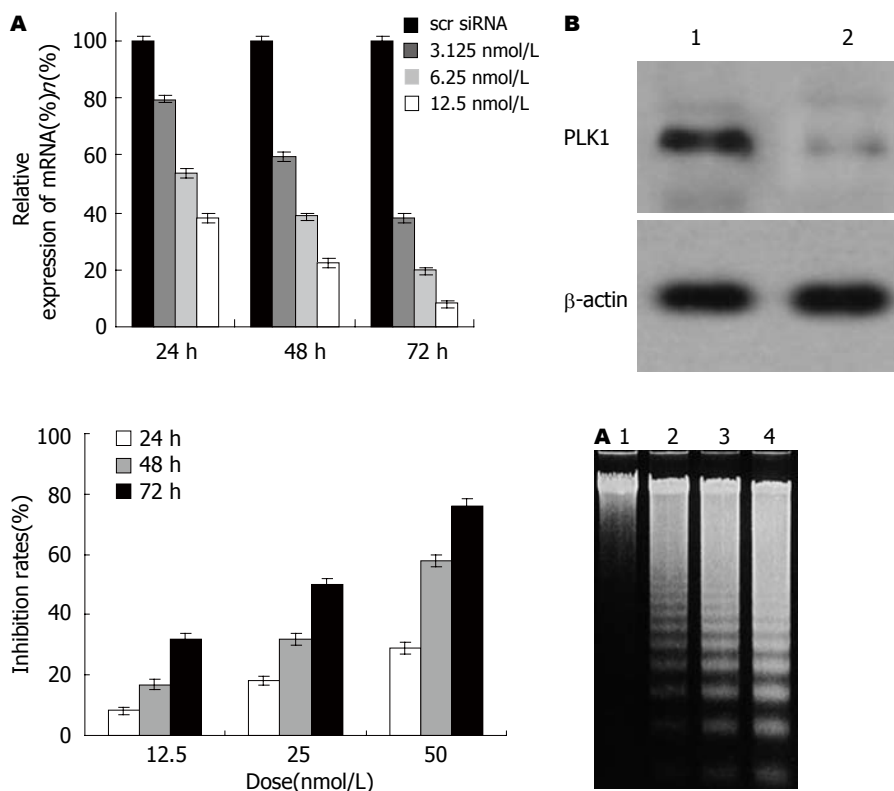


图 1 A: siRNA对胰腺癌MiaPaCa-2细胞PLK1 mRNA的抑制(%); B: siRNA对胰腺癌MiaPaCa-2细胞PLK1蛋白的抑制(48 h), 1: scr siRNA; 2: PLK1 siRNA.

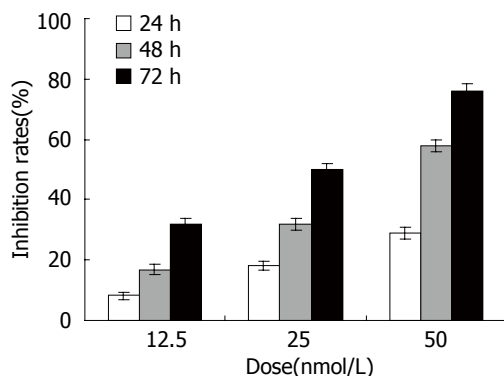


图 2 PLK1 siRNA转染对胰腺癌MiaPaCa-2细胞增殖的影响。

现可见的肿瘤。于5 wk后处死裸鼠,分离裸鼠肿瘤组织,计算肿瘤质量,发现对照组肿瘤质量在45-210 mg,而转染组在5 wk时无肿瘤出现,说明PLK1 siRNA转染明显抑制了裸鼠肿瘤生长,提示PLK1 siRNA对癌细胞发挥了强烈的体内抑瘤效应。

2.4 siRNA对胰腺癌细胞凋亡的影响 琼脂糖凝胶电泳结果发现,转染组出现明显的DNA梯状图谱,且与浓度相关(图3A)。TUNEL结果显示,转染组AI增加,且呈浓度依赖性($P < 0.05$,图3B),提示PLK1 siRNA转染可诱导胰腺癌MiaPaCa-2细胞凋亡。

3 讨论

越来越多的证据表明,PLK1基因高表达在许多实体瘤发生发展中具有重要的作用^[14-21,24-28]。目前,已经有许多学者^[23,29-31]针对PLK1基因采用反义寡核苷酸或者RNAi技术对恶性肿瘤进行研究,并已取得了很多重要的成果。但目前在胰腺癌中PLK1基因研究较少,尚不清楚该基因在胰腺癌细胞中的可能作用和机制。在基因治疗领域中,RNAi相关技术早已引起了广泛的注意。RNAi是近年来发现的一种调节mRNA的生物学现象,能够使基因表达的mRNA被相应的双

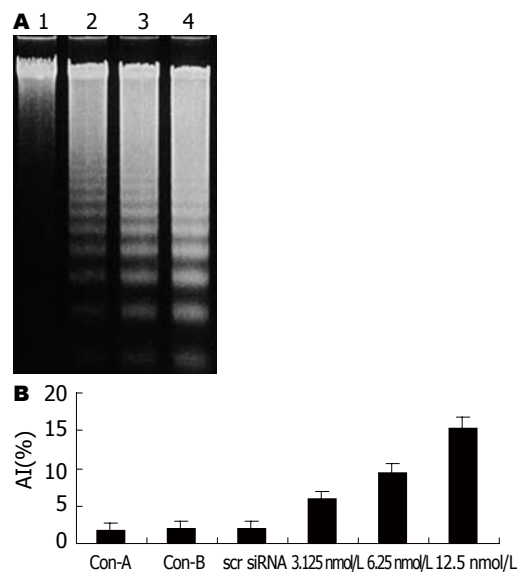


图 3 siRNA对胰腺癌细胞凋亡的影响。A: 琼脂糖凝胶电泳检测结果(48 h), 1: Con-A; 2-4: siRNA(3.125, 6.25, 12.5 nmol/L); B: TUNEL结果。

链RNA分子敲除,其效果要远强于正义和反义RNA^[32]。人工化学合成的siRNA也可以在哺乳动物细胞中直接触发RNAi而抑制特定基因的表达^[33]。作为一种简单、有效的代替基因敲除的工具,RNAi和siRNA相关技术的应用不但加快了功能基因组学领域的研究步伐,也推动了疾病基因治疗的研究,在抵御病毒感染、抑制突变基因表达以及筛选药物作用靶点等方面有广阔的应用前景。我们针对PLK1 mRNA特点,设计并采用化学方法合成PLK1 siRNA,以其转染胰腺癌MiaPaCa-2细胞后,分别采用定量PCR和Western blot检测PLK1 mRNA和蛋白水平。结果发现浓度为3.125 nmol/L的PLK1 siRNA转染即可明显下调胰腺癌MiaPaCa-2细胞PLK1基因表达水平,提示了siRNA的高效性,也说明我们所设计的siRNA可作为研究PLK1基因功能的有力工具。

下调PLK1基因表达后,我们分别在体内外

检测了PLK1 siRNA的抑制胰腺癌细胞增殖的效应。结果发现, PLK1 siRNA可明显抑制胰腺癌细胞在体外增殖和裸鼠肿瘤生长。说明该siRNA发挥了有效地体内抑瘤效应。我们尝试从细胞凋亡角度探讨了PLK1 siRNA发挥抑瘤效应的可能机制。细胞转染不同时间后, 收集细胞, 分别采用琼脂糖凝胶电泳和TUNEL方法检测各组细胞凋亡情况。结果发现, 转染组DNA电泳出现明显的梯度图谱。TUNEL检测发现, 转染组凋亡指数明显高于对照组。以上结果提示, 采用siRNA下调胰腺癌细胞PLK1表达后, 可诱导细胞凋亡。

总之, 本研究提示, PLK1基因异常表达可能在胰腺癌细胞增殖中起重要的作用, 而以RNAi技术下调PLK1表达, 可有效地抑制胰腺癌细胞恶性增殖, 其机制与诱导凋亡有关。

4 参考文献

- Golsteyn RM, Lane HA, Mundt KE, Arnaud L, Nigg EA. The family of polo-like kinases. *Prog Cell Cycle Res* 1996; 2: 107-114
- Mayor T, Meraldi P, Stierhof YD, Nigg EA, Fry AM. Protein kinases in control of the centrosome cycle. *FEBS Lett* 1999; 452: 92-95
- Nigg EA. Polo-like kinases: positive regulators of cell division from start to finish. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 776-783
- Dai W, Huang X, Ruan Q. Polo-like kinases in cell cycle checkpoint control. *Front Biosci* 2003; 8: d1128-d1133
- Martin BT, Strebhardt K. Polo-like kinase 1: target and regulator of transcriptional control. *Cell Cycle* 2006; 5: 2881-2885
- Toyoshima-Morimoto F, Taniguchi E, Shinya N, Iwamatsu A, Nishida E. Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase. *Nature* 2001; 410: 215-220
- Yuan J, Eckerdt F, Bereiter-Hahn J, Kurunci-Csacsko E, Kaufmann M, Strebhardt K. Cooperative phosphorylation including the activity of polo-like kinase 1 regulates the subcellular localization of cyclin B1. *Oncogene* 2002; 21: 8282-8292
- Qian YW, Erikson E, Taieb FE, Maller JL. The polo-like kinase Plx1 is required for activation of the phosphatase Cdc25C and cyclin B-Cdc2 in *Xenopus* oocytes. *Mol Biol Cell* 2001; 12: 1791-1799
- van de Weerd BC, Medema RH. Polo-like kinases: a team in control of the division. *Cell Cycle* 2006; 5: 853-864
- Takai N, Hamanaka R, Yoshimatsu J, Miyakawa I. Polo-like kinases (Plks) and cancer. *Oncogene* 2005; 24: 287-291
- Eckerdt F, Yuan J, Strebhardt K. Polo-like kinases and oncogenesis. *Oncogene* 2005; 24: 267-276
- Liu J, Maller JL. *Xenopus* Polo-like kinase Plx1: a multifunctional mitotic kinase. *Oncogene* 2005; 24: 238-247
- Holtrich U, Wolf G, Bräuninger A, Karn T, Böhme B, Rübsamen-Waigmann H, Strebhardt K. Induction and down-regulation of PLK, a human serine/threonine kinase expressed in proliferating cells and tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 1736-1740
- Wolf G, Elez R, Doermer A, Holtrich U, Ackermann H, Stutte HJ, Altmannsberger HM, Rübsamen-Waigmann H, Strebhardt K. Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 1997; 14: 543-549
- Knecht R, Elez R, Oechler M, Solbach C, von Ilberg C, Strebhardt K. Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 1999; 59: 2794-2797
- Tokumitsu Y, Mori M, Tanaka S, Akazawa K, Nakano S, Niho Y. Prognostic significance of polo-like kinase expression in esophageal carcinoma. *Int J Oncol* 1999; 15: 687-692
- Kneisel L, Strebhardt K, Bernd A, Wolter M, Binder A, Kaufmann R. Expression of polo-like kinase (PLK1) in thin melanomas: a novel marker of metastatic disease. *J Cutan Pathol* 2002; 29: 354-358
- Takahashi T, Sano B, Nagata T, Kato H, Sugiyama Y, Kunieda K, Kimura M, Okano Y, Saji S. Polo-like kinase 1 (PLK1) is overexpressed in primary colorectal cancers. *Cancer Sci* 2003; 94: 148-152
- Wolf G, Hildenbrand R, Schwar C, Grobholz R, Kaufmann M, Stutte HJ, Strebhardt K, Bleyl U. Polo-like kinase: a novel marker of proliferation: correlation with estrogen-receptor expression in human breast cancer. *Pathol Res Pract* 2000; 196: 753-759
- Macmillan JC, Hudson JW, Bull S, Dennis JW, Swallow CJ. Comparative expression of the mitotic regulators SAK and PLK in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2001; 8: 729-740
- Takai N, Miyazaki T, Fujisawa K, Nasu K, Hamanaka R, Miyakawa I. Polo-like kinase (PLK) expression in endometrial carcinoma. *Cancer Lett* 2001; 169: 41-49
- Fan Y, Zheng S, Xu ZF, Ding JY. Apoptosis induction with polo-like kinase-1 antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide of colon cancer cell line SW480. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4596-4599
- 范钰, 郑树, 丁佳逸. 脂质体介导的cripto反义寡核苷酸抑制结肠癌细胞端粒酶活性. *中国病理生理杂志* 2006; 22: 762-765
- Weichert W, Denkert C, Schmidt M, Gekeler V, Wolf G, Köbel M, Dietel M, Hauptmann S. Polo-like kinase isoform expression is a prognostic factor in ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 2004; 90: 815-821
- Yamada S, Ohira M, Horie H, Ando K, Takayasu H, Suzuki Y, Sugano S, Hirata T, Goto T, Matsunaga T, Hiyama E, Hayashi Y, Ando H, Suita S, Kaneko M, Sasaki F, Hashizume K, Ohnuma N, Nakagawara A. Expression profiling and differential screening between hepatoblastomas and the corresponding normal livers: identification of high expression of the PLK1 oncogene as a poor-prognostic indicator of hepatoblastomas. *Oncogene* 2004; 23: 5901-5911
- Mito K, Kashima K, Kikuchi H, Daa T, Nakayama I, Yokoyama S. Expression of Polo-Like Kinase (PLK1) in non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2005; 46: 225-231
- Weichert W, Kristiansen G, Winzer KJ, Schmidt M, Gekeler V, Noske A, Müller BM, Niesporek S, Dietel M, Denkert C. Polo-like kinase isoforms in breast cancer: expression patterns and prognostic implications. *Virchows Arch* 2005; 446: 442-450
- Kanaji S, Saito H, Tsujitani S, Matsumoto S, Tatebe S,

■应用要点
研究证明, 本研究所设计的siRNA具有高效性, 可用于PLK1高表达的恶性肿瘤的治疗, 具有重要的潜在的实用价值。

■同行评价

本文思路清晰, 表述简洁, 明了, 有一定的科学意义和潜在的应用价值.

- Kondo A, Ozaki M, Ito H, Ikeguchi M. Expression of polo-like kinase 1 (PLK1) protein predicts the survival of patients with gastric carcinoma. *Oncology* 2006; 70: 126-133
- 29 Liu X, Erikson RL. Polo-like kinase (Plk)1 depletion induces apoptosis in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 5789-5794
- 30 Reagan-Shaw S, Ahmad N. Silencing of polo-like kinase (Plk) 1 via siRNA causes induction of apoptosis and impairment of mitosis machinery in human prostate cancer cells: implications for the treatment of prostate cancer. *FASEB J* 2005; 19: 611-613
- 31 Strebhardt K, Ullrich A. Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 321-330
- 32 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-811
- 33 Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 2001; 15: 188-200

编辑 程剑侠 电编 何基才

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

• 消息 •

世界华人消化杂志个性化服务订购活动

本刊讯 为了满足读者的多样化需求, 解决一些作者因为资金不足而导致订阅印刷版的困难, 自2007年开始, 世界华人消化杂志(WCJD), 推出以下个性化服务策略来为广大读者服务.

1 精彩专家述评专辑印刷版杂志

WCJD旬刊的服务方式: (1)每月8, 18, 28日通过E-mail发送精彩专家述评PDF; (2)2007年底将精彩专家述评专辑一本挂号邮寄用户收. 定价: 50元/年.

2 WCJD电子杂志

WCJD旬刊的服务方式: (1)每月8, 18, 28日通过E-mail提醒PDF电子杂志(1-36期). 定价: 180元/年.

3 WCJD网络版杂志

WCJD旬刊的服务方式: (1)每月8, 18, 28日通过E-mail提醒网络版杂志(1-36期). 定价: 160元/年.

4 WCJD印刷版杂志

WCJD印刷版1-36期. 定价: 864元/年.

5 订购信息

邮政编码, 姓名, 地址, 部门, 机构名称, E-mail, 手机号.

6 汇款的方式

邮局汇款: 世界胃肠病学杂志社收, 100023, 北京市2345信箱. 附言注明订购的内容.

银行汇款: 户名: 北京百世登生物医学科技有限公司; 开户银行: 中国工商银行北京商务中心区支行国贸大厦分理处; 账号: 0200041609020180741. 附言注明: 订购的内容和发票的抬头.

总之, WCJD将尽自己的最大努力, 满足广大读者的需求, 同时欢迎更多个性化服务的意见和建议E-mail发至: h.n.zhang@wjgnet.com. 谢谢! (世界胃肠病学杂志社 2007-09-30).

超分子铂类药物西茜铂体内外对消化系肿瘤的抑制作用

王士勇, 杨振君, 于环, 杨云锋, 张晖, 王敬尊

王士勇, 于环, 杨云锋, 张晖, 中国医科大学附属第四医院生物治疗科 辽宁省沈阳市 110032

杨振君, 中国医科大学附属第二医院信息科 辽宁省沈阳市 110004

王敬尊, 北京三思维尔高科技开发有限公司 北京市 100005
王士勇, 博士、博士后, 副教授, 主要从事肿瘤生物治疗和干细胞移植。

教育部归国博士启动课题, No. 2004-527, No. 2004-231

通讯作者: 王士勇, 110032, 辽宁省沈阳市于洪区崇山东路4号, 中国医科大学附属第四医院生物治疗科和中心实验室。

sywang66@yahoo.com

电话: 024-62043763 传真: 024-62571119

收稿日期: 2007-06-29 修回日期: 2007-09-24

Inhibitory effects of supramolecular platinum compound CCP on digestive tumors

Shi-Yong Wang, Zhen-Jun Yang, Huan Yu, Yun-Feng Yang, Hui Zhang, Jing-Zun Wang

Shi-Yong Wang, Huan Yu, Yun-Feng Yang, Hui Zhang, Department of Cancer Biotherapy, Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, Liaoning Province, China

Zhen-Jun Yang, Department of Communication, Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Jing-Zun Wang, Beijing Sansiweier Explore Limited Company, Beijing 100005, China

Supported by: the Scientific Research Foundation for Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry, No. 2004-527 and No. 2004-231

Correspondence to: Dr. Shi-Yong Wang, Department of Cancer Biotherapy, Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, 4 Chongshan East Road, Yuhong District, Shenyang 110032, Liaoning Province, China. sywang66@yahoo.com

Received: 2007-06-29 Revised: 2007-09-24

Abstract

AIM: To investigate *in vivo* and *in vitro* inhibitory effects of a supramolecular drug-platinum compound CCP on digestive tumors.

METHODS: Six digestive tumor cell lines, hepatocellular carcinoma (BEL7402), gastric carcinoma (MG803 and SG7901), pancreatic carcinoma (BXCP-3 and JF305), and colon carcinoma (CX-1), were used to test the IC_{50} of CCP and carboplatin. H22-bearing Kunming mice and JF305-bearing nude mice were treated intraperitoneally with CCP at 10, 15 or 20 mg/kg. Mice

were treated with glucose as a negative control and carboplatin as a positive control. HE staining was used to detect tumor necrosis, and CD34 antibody was used to demonstrate differences in microvasculature in tumors.

RESULTS: The IC_{50} of CCP was only 33% - 50% of that of carboplatin. The IC_{50} of both CCP and carboplatin was > 240 mg/L in lung embryo fibroblasts. In H22-bearing Kunming mice, the inhibitory rate for 20, 15 and 10 mg/kg CCP was 56.1% - 67.0%, 46.9% - 54.8% and 42.4% - 44.3%, respectively, and the inhibitory rate for CBP was 50.3% - 51.3%. Tumor weight in the CCP group was lower than that in the control group ($t > 2.91$, $P < 0.01$). In the CCP 20 mg/kg group, the inhibitory rate for CCP was higher and the tumor weight was lower than those in the carboplatin group ($t = 2.39$, $P < 0.05$). In JF305-bearing nude mice, the inhibitory rate for 20 and 15 mg/kg CCP was 61.4% - 73.4% and 51.4% - 54.0%, respectively, and the inhibitory rate for carboplatin was 37.1%-42.0%. Tumor weight was significantly lower than that in the control groups ($t > 2.28$, $P < 0.05$). However, the inhibitory rate of 10 mg/kg CCP was 17.6% - 22.6%, which was not different from that in the glucose group ($t = 1.70$). The microvascular growth in JF305-bearing nude mice showed more necrosis in the CCP group with HE staining. Immunohistochemical staining with anti-CD34 antibody suggested more microvascular formation in the glucose group, but it was more clearly inhibited in the CCP group.

CONCLUSION: CCP has a greater ability to inhibit digestive tumor growth than carboplatin.

Key Words: Digestive system tumor; CCP; Carboplatin

Wang SY, Yang ZJ, Yu H, Yang YF, Zhang H, Wang JZ. Inhibitory effects of supramolecular platinum compound CCP on digestive tumors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(33): 3489-3494

摘要

目的: 评价超分子药物西茜铂实验性治疗消化系肿瘤的效果。

■背景资料

铂类配合物是临床上广泛应用的抗肿瘤药物, 其中最常用的有顺铂、卡铂、奥沙利铂。这些药物均有一定的毒副作用, 抗肿瘤谱窄, 易产生耐药性; 而且, 分子量小, 仅能识别2-3个碱基, 特异性不高, 易损伤正常细胞的DNA。另外, 他们与靶分子的结合作用弱, 与DNA单加合后, 会引起DNA结构的改变, 从而导致药效的降低。因此, 研究与经典铂类配合物结构不同的非经典的配合物, 克服现有的铂类配合物的缺点, 增加疗效, 是目前研究的重点和热点。

■研发前沿

目前研究铂类配合物的重点和热点是对现有的经典结构的改造,如将单核的铂类配合物改为双核或多核,增加特异性和疗效;增加空间阻位,防止耐药性的发生;引入新的极性离子,增加可溶性;增加脂溶性,来改变用途,等等。以此达到高效、低毒、水溶性好、选择性高、与顺铂无交叉耐药性、可口服的新型铂类。

方法: 用细胞培养方法测定西茜铂和卡铂对肝癌(BEL7402),胰腺癌(BXCP-3, JF305),胃癌(MG803, SG7901)和结肠癌(CX-1) 6株消化系统癌细胞株和一株人胚胎肺成纤维细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)。建立肝癌H22昆明鼠模型和人胰腺癌JF305裸鼠模型,腹腔注射高(20 mg/kg)、中(15 mg/kg)、低(10 mg/kg)剂量西茜铂,测定其在动物体内的抑瘤作用,注射葡萄糖注射液作为阴性对照,注射20 mg/kg卡铂作为阳性对照。HE染色判断肿瘤组织的坏死,CD34抗体免疫组化染色观察肿瘤组织中微血管的生长状况。

结果: 西茜铂对6株肿瘤细胞的IC₅₀值明显低于卡铂,约为后者1/3至1/2。但2种药物对人胚胎肺成纤维细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)均大于240 mg/L。在肝癌H22荷瘤昆明小鼠,腹腔注射高、中、低剂量西茜铂的抑瘤率分别为56.1%-67.0%, 46.9%-54.8%和42.4%-44.3%,卡铂的抑瘤率是50.3%-51.3%。西茜铂和卡铂治疗组的瘤质量与葡萄糖组相比,明显降低($t > 2.91$, $P < 0.01$)。20 mg/kg西茜铂的抑瘤率高于相同剂量卡铂的抑瘤率,瘤质量均值也明显轻于卡铂组($t = 2.39$, $P < 0.05$)。在接种人胰腺癌JF305裸鼠,高、中、低剂量西茜铂组的抑瘤率分别为61.4%-73.4%, 51.4%-54.0%和17.6%-22.6%,卡铂的抑瘤率是37.1%-42.0%。中、高剂量的抑瘤率明显高于卡铂组,瘤质量明显低于葡萄糖组和卡铂组($t > 2.28$, $P < 0.05$)。经HE染色后,在接种人胰腺癌JF305裸鼠,西茜铂治疗组的瘤组织见大片出血性坏死。CD34抗体免疫组化染色在葡萄糖组可见有大量的微血管形成,而西茜铂治疗组仅有少数微血管生成,微血管生成受到抑制。

结论: 超分子药物西茜铂对消化系统肿瘤有明显的抑制作用,其作用明显高于卡铂。

关键词: 消化系统; 肿瘤; 西茜铂; 卡铂

王士勇, 杨振君, 于环, 杨云锋, 张晖, 王敬尊. 超分子铂类药物西茜铂体内对消化系统肿瘤的抑制作用. 世界华人消化杂志 2007; 15(33): 3489-3494

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3489.asp>

0 引言

自70年代顺铂上市以来,人们合成了数以千计的铂类配合物,并进行了抗肿瘤活性的研究,大约有30多个铂类配合物进入了临床实验治疗阶段。最近,基于对肿瘤细胞耐铂类配合物机制的深入了解,人们不再局限于顺铂和卡铂

的经典分子结构,设计出多种非经典结构的药物,具有代表性的种类如下:能口服的四价铂类配合物、具有空间阻位且与顺铂无交叉耐药的ZD0473、抗癌机制不同的反式铂类配合物JM335、多核配合物BBR3464和含有铂硫键的thioplaitin等^[1-8]。国内学者也合成了多种新型的铂类配合物,并进行了结构和药效学等方面的研究^[9-11]。本文研究所用的西茜铂(CCP)是我国学者自主合成的新型铂类配合物(专利号CN01823848.3),具有超分子结构。本文研究了CCP对消化系统肿瘤的药效学,也是该药临床前研究的部分内容。

1 材料和方法

1.1 材料 CCP由北京三思维尔高科技开发有限公司王敬尊教授提供,原浓度为15.2 mg/mL。卡铂(Carboplatin, CBP)为山东齐鲁制药厂产品,批号为0202007,粉末状,使用时用5%的葡萄糖溶液溶解。四氮唑兰(MTT)为Sigma产品,兔抗人CD34 mAb和免疫组化染色试剂盒购自福州迈新公司。6株人传代消化系统癌细胞株为肝癌(BEL7402)、胃癌(MG803和SGC7901)、胰腺癌(JF305和BXCP-3)、结肠癌(CX-1),为中国医科大学各实验室保存的细胞株。人胚胎肺成纤维细胞(WI83)购自上海中科院细胞库。用RPMI1640完全培养液(含100 g/L小牛血清、100 kU/L青霉素和100 mg/L链霉素),在37℃、50 mL/L CO₂条件下培养,2.5 g/L胰酶消化、传代。18-22 g昆明鼠和5-6 wk的BALB/c(nu/nu)裸鼠,购自中国医科大学动物中心,饲养于中国医科大学动物中心动物层流系统中。

1.2 方法

1.2.1 体外实验: 取对数生长期细胞,用0.25%胰酶消化成单细胞,调整细胞密度为 $1 \times 10^8 - 8 \times 10^8$ /L,于96孔培养板,每孔加入100 μL,培养4 h,再加入480, 240, 120, 60, 30, 15和7.5 mg/L的卡铂或CCP,每浓度至少设3个复孔。每块培养板设12孔溶剂和3孔空白对照组,继续培养64 h,离心去上清,加入5 g/L MTT溶液200 μL,继续培养4 h。再离心去上清, PBS洗2次,加入200 μL二甲亚砜,振荡10 min,充分溶解。用酶标仪测定吸光度值,检测波长为570 nm,参比波长为450 nm。每株癌细胞的药敏实验重复3-4次。

1.2.2 荷瘤鼠模型的建立及实验: (1)每次实验取昆明鼠60只,于右腋皮下接种4倍稀释的小鼠肝

表 1 CCP体外抗消化系肿瘤细胞的IC₅₀ (mean ± SD, mg/L)

药物	肝癌 BEL7402	胰腺癌 BXCP-3	胰腺癌 JF305	胃癌 MG803	结肠癌 CX-1	胃癌 SG7901	人胚肺 WI38
CCP	32.0±5.2	11.8±1.5	26.6±8.7	50.5±24.5	31.3±1.0	25.8±6.6	>240
CBP	52.0±16.1	27.8±14.6	47.2±20.4	83.2±21.5	44.5±4.3	72.3±41.1	>240
CBP/CCP	1.6	2.4	1.4	1.6	1.4	2.7	1.0

癌(H22)腹水瘤细胞悬液, 0.2 mL/只. 于接种后次日随机分组、称质量、给药. 用50 g/L的葡萄糖溶液稀释CCP注射液, 按高、中、低三个剂量组分别给予20, 15, 10 mg/kg ip, 每日1次, 连续7-10 d. 阳性对照组卡铂浓度为20 mg/kg, 使用方法和天数同CCP. 阴性对照组给5%葡萄糖注射液. 于停药后次日处死动物, 分别称鼠质量和瘤质量, 按照下列公式计算抑瘤率, 抑瘤率^[12] = (1-实验组平均瘤质量/对照组平均瘤质量)×100%. 实验重复3次, 均为独立实验. (2)每次实验取裸鼠40-50只, 于右腋皮下接种培养的人胰腺癌JF305细胞株, 接种细胞数为5×10⁵-2×10⁶/只. 待腋下出现可明显判定的瘤体时(约2 wk), 将动物随机分为5组, 每组8只, 称质量, 次日给药. 给药浓度、方法、抑瘤率计算等同昆明鼠实验.

1.2.3 肿瘤组织HE染色、免疫组织化学染色和结果判定: 常规中性甲醛溶液固定, 梯度酒精脱水, 石蜡包埋、切片、脱蜡等. 采用迈新公司二步法试剂盒检测CD34, 具体方法按照说明书和文献[13]进行. DAB显色, 苏木素衬染. 结果判定: 棕色着色为阳性, 先在100倍视野下选取5个微血管密集区, 400倍显微镜下3个以上的成堆细胞判定为微血管, 计数微血管数.

统计学处理 数据用mean±SD表示. 将药物浓度及其抑制率用MicroCal Origin软件作图, 并用该软件中的四参数Logistic程序拟合CCP对肿瘤细胞生长的抑制曲线, 求出半数抑制浓度(IC₅₀). 各组抑瘤率以百分数直接比较, 各组间肿瘤平均瘤质量行 t 检验, $P<0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 体外实验结果 CCP对6株肿瘤细胞的IC₅₀值明显低于卡铂, 约为后者1/3至1/2(表1). 当换算成微摩尔浓度表示时(具体值未给出), 差异更为明显; 但CCP和卡铂对人胚肺成纤维细胞的IC₅₀值均在240 mg/L以上.

2.2 CCP对荷肝癌H22昆明鼠的抑瘤作用 表2是三次独立实验中的一次结果. 综合3次结果,

ip CCP给肝癌H22荷瘤昆明小鼠具有明确的抗肿瘤作用, 高、中、低剂量的抑瘤率分别为56.1%-67.0%、46.9%-54.8%和42.4%-44.3%. 抑瘤率随着药物浓度的增加而增加, 卡铂的抑瘤率是50.3%-51.3%. CCP和卡铂治疗后的瘤质量与葡萄糖组相比, 明显降低($t>2.91$, $P<0.01$). 而且20 mg/kg CCP的抑瘤率高于相同剂量卡铂的抑瘤率, 瘤质量均值也明显轻于卡铂组($t = 2.39$, $P<0.05$). 实验组与葡萄糖对照组相比, 体质量有所减轻, 以高剂量组较为明显, 但仍符合体内抗肿瘤实验规程要求, 实验过程中无动物死亡.

2.3 CCP对荷胰腺癌JF305裸鼠的抑瘤作用 表2给出了2次独立实验的一次结果. 高、中、低剂量组的抑瘤率分别为61.4%-73.4%, 51.4%-54.0%和17.6%-22.6%. 抑瘤率随着药物浓度的增加而增加, 卡铂的抑瘤率是37.1%-42.0%. 中、高剂量的抑瘤率明显高于卡铂组, 瘤质量明显低于葡萄糖组和卡铂组, 经统计学处理均有显著性差异($t>2.28$, $P<0.05$). 低剂量治疗组的瘤质量与葡萄糖组相比, 没有统计学差异($t = 1.70$, $P>0.05$). 经HE染色后, 治疗组的瘤组织见大片出血性坏死, 抗CD34免疫组化染色在葡萄糖组可见有大量的微血管形成, 而治疗组仅有少数微血管(图1-2).

3 讨论

在我国, 消化系肿瘤是常见的肿瘤, 铂类药物是治疗消化系肿瘤的常用药. 在结肠癌, 以奥沙利铂或伊力替康联合5氟尿嘧啶和醛氢四氢叶酸的化疗方案, 再加上抗表皮生长因子受体mAb抗体治疗, 疗效有明显的提高^[14-15]. 在胃癌, 奥沙利铂联合5氟尿嘧啶和醛氢四氢叶酸的化疗方案成为最常用临床治疗方案^[16]. 胰腺癌的治疗仍然是以健择联合铂类药物为主^[17-18], 食道癌、肝癌缺乏有效的化疗药物^[19-21]. 总体上来说, 消化系肿瘤的疗效有待于进一步提高^[22-23], 研制更为适合消化系肿瘤的药物和方案是当务之急.

铂类抗癌药物的研制最为活跃. CCP是一种

■创新盘点

CCP是我国学者自行合成的超分子铂类配合物, 已经申请专利. CCP是一种笼状结构, 以卡铂作为主体分子, 以柠檬酸作为客体分子, 即以柠檬酸的3个-COOH中的2个结合成分子内氢键, 生成超分子的CCP, 以第三个COOH增加分子的极性, 进而增加可溶性. 同时, 这种结构起到保护中心铂原子的作用. 整个分子将增加稳定性、溶解性、极性、特异性和增加对肿瘤的毒性. 本文是关于CCP的体外和动物体内的药理学研究.

■应用要点

CCP的研究已经得到国家科技部“863”创新药物重大专项资助。本文是有关药效学研究的部分内容。经研究已明确, CCP在动物体外和体内均有杀伤肿瘤细胞的作用, 疗效高于卡铂, 副作用小, 有望进入正式的临床实验。

表 2 CCP对荷H22和JF305昆明鼠的抗肿瘤活性(mean $\pm$ SD, g/只)

药物(mg/kg)	n	体质量		瘤质量(g)	抑瘤率(%)
		治疗前	治疗后		
H22对照	20	19.83 $\pm$ 0.35	22.58 $\pm$ 0.64	1.15 $\pm$ 0.34	
CCP(10)	10	19.35 $\pm$ 0.41	21.20 $\pm$ 0.75	0.66 $\pm$ 0.32 ^a	42.6
CCP(15)	10	20.29 $\pm$ 0.19	21.37 $\pm$ 1.03	0.52 $\pm$ 0.32 ^b	54.8
CCP(20)	10	20.3 $\pm$ 0.10	19.62 $\pm$ 1.31	0.38 $\pm$ 0.24 ^b	67.0
CBP(20)	10	19.54 $\pm$ 0.32	19.09 $\pm$ 1.01	0.56 $\pm$ 0.30 ^b	51.3
JF305对照	8	18.04 $\pm$ 0.02	20.43 $\pm$ 0.3	1.24 $\pm$ 0.24	
CCP(10)	8	18.61 $\pm$ 0.01	18.22 $\pm$ 0.1	0.96 $\pm$ 0.19	22.6
CCP(15)	8	18.79 $\pm$ 0.04	17.71 $\pm$ 0.03	0.57 $\pm$ 0.14 ^b	54.0
CCP(20)	8	18.43 $\pm$ 0.02	17.12 $\pm$ 0.3	0.33 $\pm$ 0.10 ^b	73.4
CBP(20)	8	19.02 $\pm$ 0.02	18.17 $\pm$ 0.05	0.78 $\pm$ 0.13 ^b	37.1

^a P <0.05, ^b P <0.01 vs 葡萄糖组瘤质量。

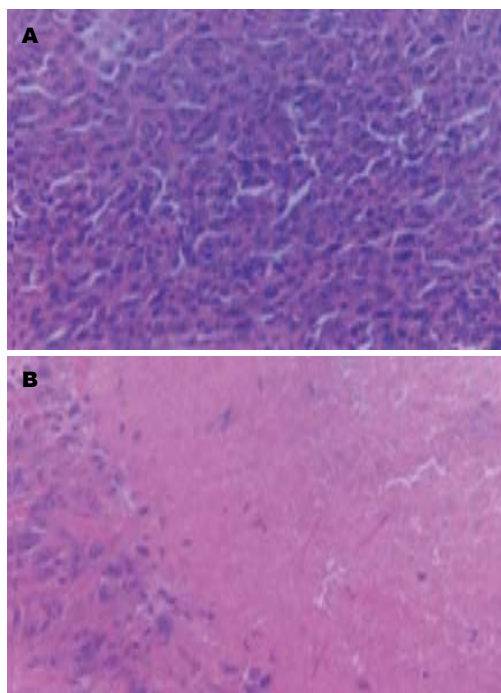


图 1 裸鼠JF305胰腺癌组织HE染色(HE $\times$ 400). A: 葡萄糖; B: 20 mg/kg CCP.

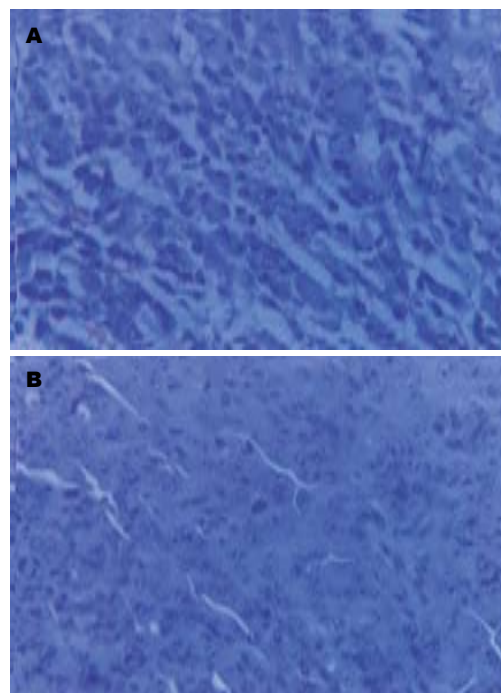


图 2 裸鼠JF305胰腺癌组织CD34表达(DAB $\times$ 400). A: 葡萄糖; B: 20 mg/kg CCP.

超分子药物, 他的设计是基于超分子化学的理念。所谓超分子化学是指多个分子间以非共价键范德华力(氢键力、偶极力等)紧密结合形成的分子聚合物, 具有新的选择、识别、信息传递、能量转移等一系列的功能和性质。双螺旋DNA分子中的嘌呤和嘧啶是以氢键结合的超分子, 各种营养成分在体内传递时, 其与细胞膜结合等过程都是非共价键结合的超分子化学过程。超分子化学药物是由主体化学药物分子与特别的客体分子在一定的条件下, 通过分子间的非共价键组装成稳定的特定结构的超分子化合物。

他可能改变药物的稳定性和在人体的传送机制, 即改进药物在体内的膜运输, 使药物达到特定的作用靶点, 提高和特异靶点结合的能力, 提高药物的有效利用度, 降低药物的毒副作用。因此可能开发出具有新的结构、药理、药效和剂型的药物。目前已经有超分子药物的报道, 但主要作为药物的载体, 关于超分子铂类药物迄今未见文献报道^[25]。CCP以卡铂分子作为主体分子, 以柠檬酸作客体分子。柠檬酸分子中3个-COOH, 其中2个结合成分子内键, 生成超分子CCP, 第三个-COOH, 增加分子的极性, 增加了CCP的溶解

度,同时增加了与膜蛋白的结合、传递的能力和打开膜离子通道的跨膜能力。CCP分子呈笼状结构,能有效地保护和阻止卡铂的原子与水结合,减缓卡铂水解成活泼水合铂的速度,增加CCP在体液中的稳定性,降低药物的毒性。而且,酸性羧基构成的笼子,易被碱性基团打开,使主体分子卡铂易与DNA的碱基结合,起到抗肿瘤的作用。

本文研究结果显示,CCP均能明显抑制肝癌、胃癌、胰腺癌、结肠癌的生长,而且 IC_{50} 值仅为卡铂的1/2或1/3,但对人胚肺成纤维细胞的 IC_{50} 大于240 mg/L,说明CCP对消化系肿瘤有较高的杀伤作用,而对正常组织细胞的毒副作用较小。腹腔注射CCP给人胰腺癌细胞JF305荷瘤裸鼠,也有明确的抗肿瘤作用。按高、中、低剂量的抑瘤率分别是61.4%-73.4%, 51.4%-54.0%和17.6%-22.6%,抑瘤率呈现出剂量依赖性。此外,HE染色显示的大片肿瘤组织坏死,进一步证明上述结果。实验组与葡萄糖对照组相比,体质量有所减轻,以高剂量组较为明显,但仍符合体内抗肿瘤实验规范的要求。H22昆明鼠实验也得出同样结果。总之,在体外和体内,CCP的药效明显高于卡铂,而且副作用大大地降低。但是,关于CCP的作用机制,还需要进一步研究。

抗血管生成治疗是目前肿瘤研究的热点和重点。自上世纪70年代初,美国学者提出肿瘤发生和血管生成有关,并可通过抑制血管形成来治疗肿瘤的假说以来,历经30余年的研究,肿瘤血管成为抗肿瘤治疗的新靶点^[25-26]。目前抗血管治疗主要集中在下面几个方面:第一,抗血管内皮生长因子及其受体^[27-28],包括用长效脂质体包裹的抑制血管内皮生长因子的小分子多肽^[29-30]。而且有数种药物进入临床,如贝伐mAb抗体,联合化疗能明显地提高大肠癌治疗效果^[31]。第二,作用于血管内皮细胞的抑制因子^[32],如我国在世界上推出的血管生成抑制剂YH-16^[33],已经广泛地应用于非小细胞肺癌的治疗。第三,抑制血管外基质分解酶的药物^[34]。此外还有如抗Bcl-2基因等其他类型药物。CD34是血管内皮细胞的标志物,被证明在各种肿瘤包括消化系肿瘤均高表达,而且可能与肿瘤的转移及预后密切相关^[35-36]。在本研究中,CD34在肿瘤组织中均呈高表达,即微血管密度明显增高。当用CCP进行实验性治疗后,微血管密度显著降低。我们推测可能与CCP抑制肿瘤细胞的生长进而抑制促肿瘤血管生成

因子的释放有关,但确切的机制有待于进一步研究证实。

4 参考文献

- 1 Abu-Surrah AS. Development and current status of unconventional platinum anticancer complexes. *Mini Rev Med Chem* 2007; 7: 203-211
- 2 Ho YP, Au-Yeung SC, To KK. Platinum-based anticancer agents: innovative design strategies and biological perspectives. *Med Res Rev* 2003; 23: 633-655
- 3 Wosikowski K, Lamphere L, Unteregger G, Jung V, Kaplan F, Xu JP, Rattel B, Caligiuri M. Preclinical antitumor activity of the oral platinum analog satraplatin. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007; 60: 589-600
- 4 Ang WH, Pilet S, Scopelliti R, Bussy F, Juillerat-Jeanneret L, Dyson PJ. Synthesis and characterization of platinum(IV) anticancer drugs with functionalized aromatic carboxylate ligands: influence of the ligands on drug efficacies and uptake. *J Med Chem* 2005; 48: 8060-8069
- 5 Ye QS, Lou LG, Liu WP, Yu Y, Chen XZ, Hou SQ, Gao WQ, Liu Y. Synthesis and in vitro cytotoxicity of novel lipophilic (diamine)platinum(II) complexes of salicylate derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 2007; 17: 2146-2149
- 6 Hall MD, Alderden RA, Zhang M, Beale PJ, Cai Z, Lai B, Stampfl AP, Hambley TW. The fate of platinum(II) and platinum(IV) anti-cancer agents in cancer cells and tumours. *J Struct Biol* 2006; 155: 38-44
- 7 Wheate NJ, Day AI, Blanch RJ, Arnold AP, Cullinane C, Collins JG. Multi-nuclear platinum complexes encapsulated in cucurbit[n]uril as an approach to reduce toxicity in cancer treatment. *Chem Commun (Camb)* 2004; 21: 1424-1425
- 8 Wheate NJ, Collins JG. Multi-nuclear platinum drugs: a new paradigm in chemotherapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2005; 5: 267-279
- 9 张金超, 龚钰秋, 郑小明, 崔景荣, 杨梦甦. 碘桥双核铂配合物的合成及其抗肿瘤活性. *科学通报* 2006; 51: 796-801
- 10 王联红, 刘芸, 尤启冬, 苟少华. 非经典铂类抗肿瘤药物研究. *化学进展* 2004; 16: 456-462
- 11 张金超, 龚钰秋, 郑小明, 崔景荣, 杨梦苏. 对称胺和不对称胺的二碘合铂(II)混配合物的合成及其抗肿瘤活性. *浙江大学学报(理学版)* 2005; 32: 292-299
- 12 徐淑云, 卞如濂, 陈修. *药理实验方法学*. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 178-179
- 13 Karavasilis V, Malamou-Mitsi V, Briasoulis E, Tsanou E, Kitsou E, Pavlidis N. Clinicopathologic study of vascular endothelial growth factor, thrombospondin-1, and microvessel density assessed by CD34 in patients with stage III ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16 Suppl 1: 241-246
- 14 Labianca R, La Verde N, Garassino MC. Development and clinical indications of cetuximab. *Int J Biol Markers* 2007; 22: S40-S46
- 15 Giuliani F, Colucci G. Cetuximab in colon cancer. *Int J Biol Markers* 2007; 22: S62-S70
- 16 Oh SY, Kwon HC, Seo BG, Kim SH, Kim JS, Kim HJ. A phase II study of oxaliplatin with low dose leucovorin and bolus and continuous infusion 5-fluorouracil (modified FOLFOX-4) as first line

■名词解释

1 超分子化学: 多个分子间以非共价键紧密结合形成的分子聚合体, 具有新的选择、识别、信息传递、能量转移等一系列特定功能和性质; 他包括诸如“主-客体化学”、“超分子器件”、“超分子开关”等一系列全新的科学概念。

2 超分子药物: 是由主体药物分子和特别的客体分子在一定的条件下, 通过分子间的非共价键力, 组装成结构稳定的超分子, 他们改进了药物的稳定性和在人体内的运输机制。

■同行评价

本文研究具有科学性, 实验手段先进, 结果结论可信.

- therapy for patients with advanced gastric cancer. *Acta Oncol* 2007; 46: 336-341
- 17 Boeck S, Hinke A, Wilkowski R, Heinemann V. Importance of performance status for treatment outcome in advanced pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 224-227
- 18 Ducreux M, Boige V, Malka D. Treatment of advanced pancreatic cancer. *Semin Oncol* 2007; 34: S25-S30
- 19 Siersema PD. Pathogenesis, diagnosis and therapeutic possibilities of esophageal cancer. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23: 456-461
- 20 Layke JC, Lopez PP. Esophageal cancer: a review and update. *Am Fam Physician* 2006; 73: 2187-2194
- 21 Del Pozo AC, Lopez P. Management of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis* 2007; 11: 305-321
- 22 Gill S, Blackstock AW, Goldberg RM. Colorectal cancer. *Mayo Clin Proc* 2007; 82: 114-129
- 23 Blackstein ME, Blay JY, Corless C, Driman DK, Riddell R, Soulieres D, Swallow CJ, Verma S. Gastrointestinal stromal tumours: consensus statement on diagnosis and treatment. *Can J Gastroenterol* 2006; 20: 157-163
- 24 Goshe AJ, Steele IM, Bosnich B. Supramolecular recognition. Terpyridyl palladium and platinum molecular clefts and their association with planar platinum complexes. *J Am Chem Soc* 2003; 125: 444-451
- 25 Pandya NM, Dhalla NS, Santani DD. Angiogenesis-a new target for future therapy. *Vascul Pharmacol* 2006; 44: 265-274
- 26 Shimizu K, Oku N. Cancer anti-angiogenic therapy. *Biol Pharm Bull* 2004; 27: 599-605
- 27 Jo N, Mailhos C, Ju M, Cheung E, Bradley J, Nishijima K, Robinson GS, Adamis AP, Shima DT. Inhibition of platelet-derived growth factor B signaling enhances the efficacy of anti-vascular endothelial growth factor therapy in multiple models of ocular neovascularization. *Am J Pathol* 2006; 168: 2036-2053
- 28 Wedge SR, Kendrew J, Hennequin LF, Valentine PJ, Barry ST, Brave SR, Smith NR, James NH, Dukes M, Curwen JO, Chester R, Jackson JA, Boffey SJ, Kilburn LL, Barnett S, Richmond GH, Wadsworth PF, Walker M, Bigley AL, Taylor ST, Cooper L, Beck S, Jurgensmeier JM, Ogilvie DJ. AZD2171: a highly potent, orally bioavailable, vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase inhibitor for the treatment of cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 4389-4400
- 29 Yonezawa S, Asai T, Oku N. Effective tumor regression by anti-neovascular therapy in hypovascular orthotopic pancreatic tumor model. *J Control Release* 2007; 118: 303-309
- 30 Maeda N, Takeuchi Y, Takada M, Sadzuka Y, Namba Y, Oku N. Anti-neovascular therapy by use of tumor neovasculature-targeted long-circulating liposome. *J Control Release* 2004; 100: 41-52
- 31 Shih T, Lindley C. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. *Clin Ther* 2006; 28: 1779-1802
- 32 Ou-Yang F, Lan KL, Chen CT, Liu JC, Weng CL, Chou CK, Xie X, Hung JY, Wei Y, Hortobagyi GN, Hung MC. Endostatin-cytosine deaminase fusion protein suppresses tumor growth by targeting neovascular endothelial cells. *Cancer Res* 2006; 66: 378-384
- 33 周志伟, 万德森, 王国强, 任镜清, 卢震海, 唐绍贤, 叶燕丽, 陈功, 林素暇. 血管生成抑制剂YH-16联合氟尿嘧啶抑制结直肠癌肝转移的研究. *中华胃肠外科杂志* 2006; 9: 161-164
- 34 Kondo M, Asai T, Katanasaka Y, Sadzuka Y, Tsukada H, Ogino K, Taki T, Baba K, Oku N. Anti-neovascular therapy by liposomal drug targeted to membrane type-1 matrix metalloproteinase. *Int J Cancer* 2004; 108: 301-306
- 35 Des Guetz G, Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Morere JF, Benamouzig R, Breau JL, Perret GY. Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta-analysis of the literature. *Br J Cancer* 2006; 94: 1823-1832
- 36 Matsumoto M, Natsugoe S, Okumura H, Arima H, Yanagita S, Uchikado Y, Yokomakura N, Setoyama T, Ishigami S, Takao S, Aikou T. Overexpression of vascular endothelial growth factor-C correlates with lymph node micrometastasis in submucosal esophageal cancer. *J Gastrointest Surg* 2006; 10: 1016-1022

编辑 程剑侠 电编 马文华

胃癌组织MMP-10和VEGF表达与血管生成的关系

赵向阳, 施瑞华

赵向阳, 施瑞华, 南京医科大学第一附属医院消化内科 江苏省南京市 210029

赵向阳, 南京医科大学在职硕士, 南京市溧水县人民医院消化内科副主任医师, 主要从事胃肠道肿瘤等方面的研究.

江苏省自然科学基金资助项目, No. BK2005153

通讯作者: 施瑞华, 210029, 江苏省南京市, 南京医科大学第一附属医院消化内科. ruihuashi@126.com

电话: 025-83718836-6032

收稿日期: 2007-07-17 修回日期: 2007-10-10

Expression of matrix metalloproteinase-10 and vascular endothelial growth factor in gastric carcinoma and its relationship with angiogenesis

Xiang-Yang Zhao, Rui-Hua Shi

Xiang-Yang Zhao, Rui-Hua Shi, Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by: the Natural Science Fund of Jiangsu Province, No. BK2005153

Correspondence to: Rui-Hua Shi, Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. ruihuashi@126.com

Received: 2007-07-17 Revised: 2007-10-10

Abstract

AIM: To investigate the expression of matrix metalloproteinase-10 (MMP-10) and vascular endothelial growth factor (VEGF) and microvascular density (MVD) in gastric carcinoma and its relationship with the clinical characteristics of tumors.

METHODS: CD31 was used as the standard of MVD. 60 examples of gastric carcinoma tissue by immunohistochemistry for MMP-10, VEGF and CD31 were investigated, and were compared the results with those in 60 normal tissues.

RESULTS: The expression positive rates for MMP-10 and VEGF in the 60 gastric carcinoma tissues were 81.7% and 76.7%, respectively. They were much higher than those in normal tissue samples (11.7% and 8.3%, respectively). The differences were statistically significant ($P <$

0.05). The expression of MMP-10 and VEGF was related with MVD, and tumor grade, TNM classification, lymphatic metastasis, and degree of invasion.

CONCLUSION: The high expression of MMP-10 and VEGF in gastric carcinoma is closely related to metastasis of gastric carcinoma and angiogenesis. It can be used as an important factor in judging the metastasis prognosis of gastric carcinoma.

Key Words: Matrix metalloproteinase-10; Vascular endothelial growth factor; Gastric tumors; Immunohistochemistry

Zhao XY, Shi RH. Expression of matrix metalloproteinase-10 and vascular endothelial growth factor in gastric carcinoma and its relationship with angiogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(33): 3495-3499

摘要

目的: 研究胃癌组织中基质金属蛋白酶-10(MMP-10)、血管内皮生长因子(VEGF)和微血管密度(MVD)表达变化及其与肿瘤临床病理特征之间的关系.

方法: 以CD31作为MVD指标, 应用免疫组化法检测60例胃癌组织和60例距病灶5 cm以上的正常组织中的MMP-10、VEGF和CD31的表达并对结果进行分析.

结果: 60例胃癌组织中的MMP-10、VEGF的表达阳性率分别为81.7%、76.7%, 明显高于正常组织的表达阳性率11.7%、8.3%, 两者差异有统计学意义($P < 0.05$). MMP-10、VEGF的表达与MVD、与肿瘤的分化程度、TNM分型、淋巴结的转移、浸润程度有关.

结论: MMP-10、VEGF胃癌组织中高表达与胃癌侵袭转移、血管生成密切相关, 可作为判断胃癌侵袭转移及预后的重要指标.

关键词: 基质金属蛋白酶-10; 血管内皮生长因子; 胃肿瘤; 免疫组化方法

■背景资料

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤, 极易转移. 基质金属蛋白酶是人体重要的蛋白分解酶类, 在恶性肿瘤的发展与转移中发挥重要作用. MMP-10是重要的基质金属蛋白酶. 最近研究发现他参与肿瘤的病理过程, 并与血管内皮生长因子存在相互作用. 本研究通过免疫组化方法检测了胃癌组织和正常组织中MMP-10和VEGF的表达, 发现MMP-10和VEGF在胃癌中表达明显增加, 并与胃癌的病理学特征密切相关, 提示这两者在胃癌发展和转移中发挥重要作用.

■同行评价

本文采用方法成熟, 设计合理, 内容科学, 有一定的可读性和参考价值.

赵向阳, 施瑞华. 胃癌组织MMP-10和VEGF表达与血管生成的关系. 世界华人消化杂志 2007;15(33): 3495-3499
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3495.asp>

0 引言

胃癌是我国最常见的消化道恶性肿瘤之一, 其发病率、死亡率居所有恶性肿瘤之首, 因此探讨胃癌生长及转移机制具有重要意义. 基质金属蛋白酶是机体内一大类重要的基质分解酶类, 在生长发育、外伤修复、血管生成等生理过程中发挥重要作用, 同时他们也参与组织纤维化、肿瘤生长、转移等病理过程, 其中对MMP-2、MMP-7、MMP-9的研究较深入^[1-3]. 他们在胃癌的发生、发展和转移过程中发挥重要作用^[4-5]. 而近期研究表明, MMP-10在降解细胞外基质(ECM)、维持肿瘤微环境和促进肿瘤生长起重要作用并与肿瘤侵袭转移密切相关^[6-7]. VEGF是促进血管生成的重要因子, 他可以通过调节金属蛋白酶的生成, 使MMP-10表达升高, 与恶性肿瘤的发生、侵袭转移和预后等恶性生物学行为密切相关^[8-10]. 我们应用免疫组化法检测了60例胃癌组织中MMP-10、VEGF和MVD表达变化, 旨在探讨MMP-10和VEGF在胃癌发生、发展和血管生成中的作用及其与胃癌临床病理特征之间的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 2005-01/2006-11我院手术切除并经病理证实的胃癌组织标本60例, 男47例, 女13例, 年龄33-78(平均年龄56)岁. 60岁以下22例, 60岁及以上38例, 高中分化腺癌42例, 低分化腺癌18例, 贲门胃底部17例, 胃体胃窦43例, 肿块大于5.0 cm者26例, 肿块小于5 cm者34例, 未浸及浆膜层25例, 浸及浆膜下35例, 有淋巴结转移36例, 无淋巴结转移24例. TNM分期, T₁期9例, T₂期17例, T₃期24例, T₄期8例. 正常组织60例取自距肿瘤边缘5 cm以上, 并经病理检查排除肿瘤可能的组织标本.

标本经40 g/L中性甲醛固定, 石蜡包埋, 4 μm厚连续切片, HE染色作病理学检查证实. 免疫组化所用试剂均为mAb. MMP-10浓缩液(1:100)购自NeoMarkers, mAb CD31和VEGF(即用型)及免疫组化试剂盒均购自福建迈新生物技术开发有限公司.

1.2 方法 石蜡切片脱蜡水化后, 用pH7.4的0.01 mol/L的PBS洗涤3次, 每次5 min. 电炉煮沸20 min, 以修复组织抗原, 自然冷却至室温, PBS洗

涤3次, 每次5 min. 每片滴加30 mL/L的过氧化氢溶液1滴, 室温下孵育15 min, PBS洗涤3次, 每次5 min. 每片滴加MMP-10(1:100稀释)及VEGF一抗, 37℃恒温箱孵育1 h, PBS洗涤3次, 每次5 min. 每片滴加生物素标记的二抗, 室温30 min, PBS洗涤3次, 每次5 min. 每片滴加新鲜配制的3, 3'-二氨基联苯胺(DAB)溶液, 显微镜下观察3-10 min. 自来水冲洗, 苏木素复染, 1 mL/L盐酸分化. 经梯度酒精脱水干燥, 中性树脂封固, 光学显微镜下观察、计数. 本实验以PBS液代替一抗作为阴性对照, 以已证实MMP-10和VEGF染色阳性的食管标本作阳性对照. 结果判断标准根据Zhong *et al*^[11]报道. 细胞核、胞质或胞膜出现棕黄色颗粒视为阳性染色, 每张切片在高倍镜下(×200)随机选择5个视野, 计数200个细胞/视野, 共计1000个. 阳性细胞数<1%为阴性(-), 阳性细胞数1%-10%为弱阳性(+); 11%-50%为中度阳性(++); >50%为强阳性(+++), +~+++均视为阳性表达. 先在低倍镜(×40)下找出肿瘤组织中微血管最密集的部位, 然后在高倍镜(×200)下进行观察. 任何被抗CD31抗体染成棕黄色的内皮细胞或内皮细胞簇, 无论有或无管腔, 只要与邻近的微血管及其他结缔组织成分有明显区别, 均作为一个微血管计数. 管腔直径大于50 μm及带有较厚肌层及硬化区的血管不在计数范畴, 每个标本计数5个高倍视野下的血管数目, 每组MVD值以mean±SD表示.

统计学处理 应用SPSS10.0统计软件包进行统计分析, 胃癌组织和正常组织中MMP-10和VEGF的表达差异分析采用 χ^2 检验, MMP-10和VEGF相关表达分析采用Spearman秩和分析, MMP-10和VEGF表达与各组胃癌临床病理特征之间的关系采用 χ^2 检验. $P<0.05$ 时差异有统计学意义.

2 结果

MMP-10主要在肿瘤细胞胞质阳性表达, 阳性率为81.7%, 与正常组织的表达阳性率11.7%相比, 差异有统计学意义($P<0.05$, 表1, 图1A). 胃癌组织中MMP-10的表达与肿瘤的分化程度、TNM分期、淋巴结的转移、浸润深度相关(表2). VEGF主要在肿瘤细胞胞质阳性表达. 阳性率为76.7%, 与正常组织的表达阳性率8.3%相比, 差异有统计学意义($P<0.05$, 表1, 图1B). 胃癌组织中MMP-10的表达与肿瘤的分化程度、TNM分期、淋巴结的转移、浸润深度相关

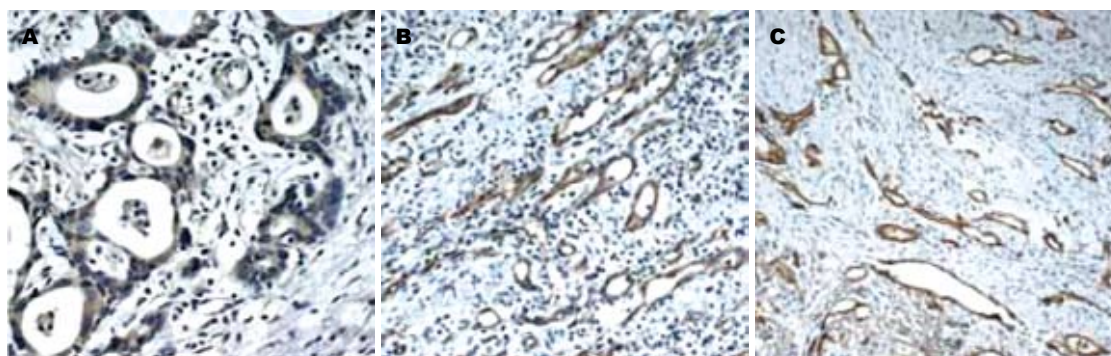


图1 胃癌组织中MMP-10, VEGF, CD31表达(DAB × 200). A: MMP-10; B: VEGF; C: CD31.

表1 胃癌组织MMP-10, VEGF表达和MVD值($n = 60$)

组织	MMP-10表达					VEGF表达					MVD(mean ± SD)
	-	+	++	+++	阳性率(%)	-	+	++	+++	阳性率(%)	
胃癌	11	24	15	10	81.7 ^b	14	20	18	8	76.7 ^b	31.3 ± 7.6 ^b
癌旁	53	5	1	0	11.7	55	5	0	0	8.3	14.8 ± 6.5

^b $P < 0.01$ vs 癌旁.

(表2). MMP-10和VEGF在胃癌组织中的表达之间有显著性相关($r = 0.71$, $P < 0.05$). 与MVD (图1C)值之间也呈正相关($r = 0.57$, $P < 0.05$).

3 讨论

肿瘤的浸润和转移首先降解肿瘤细胞外基质, 破坏基底膜的完整性, 而且必须穿过上皮基底膜浸润周围间质, 进入血管或淋巴管, 最后导出血管和淋巴管, 在新的位置形成转移灶^[12]. 既往研究认为, 基质金属蛋白酶中MMP-2、MMP-7和MMP-9是参与肿瘤转移的重要酶类^[13-14], 在肿瘤进展过程中不但活性明显增强, 与癌细胞的移动、定植密切相关, 而且应用相关抑制剂后可显著减少肿瘤转移的发生^[15-16]. MMP-10是基质金属蛋白酶中的一个成员, 属于间质溶解素类. 他可以降解一些蛋白质如胶原III, IV, V, 白明胶, 巢蛋白, 层粘连蛋白-1, 蛋白多糖和弹性蛋白, 从而降解和破坏肿瘤\细胞外基质及基底膜. MMP-10还可参与P53介导的肿瘤细胞凋亡过程^[17]. 近年来研究发现, 肿瘤组织中MMP-10的表达明显高于相应的正常组织及良性腺瘤^[18-19]. Bodey *et al*^[20]应用一种间接的碱性磷酸盐抗原抗体免疫反应技术, 发现在人的结肠、直肠癌中均有MMP-10的强烈表达, 特别是在接近细胞外基质处, 在肾癌和头颈部鳞癌组织中也发现MMP-10表达增强^[21-22]. 鳞癌细

表2 胃癌组织MMP-10, VEGF表达和MVD值与肿瘤临床病理特征的关系(n (%))

病理特性	n	MMP-10(%)	VEGF(%)	MVD
病灶大小				
<5 cm	34	27(79.4)	26(76.5)	30.9 ± 5.4
>5 cm	26	22(84.6)	20(76.9)	33.2 ± 6.4
分化程度				
中高分化	42	31(73.5 ^b)	29(69.1 ^a)	30.2 ± 7.1
低分化	18	18(100)	17(94.4)	33.0 ± 5.4
TNM分期				
T ₁ -T ₂	28	21(75.0 ^a)	17(60.8 ^a)	25.8 ± 6.1 ^a
T ₃ -T ₄	32	30(93.8)	29(90.6)	36.7 ± 5.9
浸润程度				
未及浆膜	25	15(60.0 ^b)	15(60.0 ^b)	27.6 ± 5.5
侵及浆膜	35	33(93.8)	32(91.4)	34.3 ± 4.5
淋巴结转移				
无	34	21(61.8 ^a)	29(85.3)	27.9 ± 5.9 ^a
有	26	22(84.6)	17(65.4)	35.8 ± 7.4

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$.

胞株在紫外线照射下可出现MMP-10表达变化^[23]. Kren和Zhang *et al*发现在肺癌中MMP-10表达明显增加, 与肿瘤病理学特征密切相关^[24-25]. 也有学者认为MMP-10可能成为治疗肺癌的其潜在靶点^[26]. 胃癌基因表达谱的研究发现MMP-10基因在胃癌组织中呈高表达^[27]. 因此我们研究了MMP-10在胃癌组织标本中的蛋白表达. 结果表明, 胃癌组织标本中MMP-10

蛋白呈高表达,显著高于癌旁组织。

肿瘤组织周围微血管生成的进程、微血管性质和微血管密度直接关系到肿瘤的生长、侵袭、转移的能力和预后,故血管生成是肿瘤生长和转移的必要条件,也是影响患者预后的重要因素。VEGF是一种高度特异的内皮细胞丝裂原,他通过诱导内皮细胞增殖、移行,在调控血管生成中发挥中心作用。研究表明,在乳腺癌、神经系统肿瘤、胃肠道肿瘤、肾癌、卵巢癌等肿瘤组织及血清中的VEGF表达水平都有不同程度的升高。其表达失控会促进肿瘤血管生成,并进一步促进肿瘤生长和转移。我们研究了VEGF在胃癌组织标本中的表达,结果表明胃癌组织中VEGF的高表达,与正常组织相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。肿瘤的侵袭转移是一个多因素、多阶段的复杂过程。在这一过程中,许多小分子可单独或相互作用共同参与肿瘤的侵袭转移。有资料显示,VEGF和MMP-10与恶性肿瘤的发生、侵袭转移和预后等恶性生物学行为密切相关。我们也发现,胃癌组织中两者表达呈高度正相关,提示两者共同促进了肿瘤细胞的伸展、迁移和趋化,并可作为潜在的临床治疗靶点,为今后肿瘤药物的研制开发和肿瘤基因治疗提供新的思路。

为了探讨MMP-10和VEGF在胃癌的发生、发展和血管生成过程中的作用,我们进一步研究了MMP-10和VEGF表达和MVD值与胃癌临床病理特征之间的关系。结果显示, MMP-10和VEGF表达增加与MVD变化相一致,表明MMP-10和VEGF介导的新血管生成密切相关,提示MMP-10和VEGF在肿瘤的发生、发展和血管生成过程中起重要作用。但MMP-10和VEGF与胃癌发生、发展和血管生成关系的确切机制,尚有待进一步研究。

4 参考文献

- 1 Lou G, Gao Y, Ning XM, Zhang QF. Expression and correlation of CD44v6, vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase-2, and matrix metalloproteinase-9 in Krukenberg tumor. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5032-5036
- 2 Li BH, Zhao P, Liu SZ, Yu YM, Han M, Wen JK. Matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in colorectal carcinoma invasion and metastasis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3046-3050
- 3 Li YJ, Wei ZM, Meng YX, Ji XR. Beta-catenin up-regulates the expression of cyclinD1, c-myc and MMP-7 in human pancreatic cancer: relationships with carcinogenesis and metastasis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2117-2123
- 4 钱颢, 刘南植, 程胜平. 胃癌组织Angiopoietin-2及MMP-9表达的意义. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 299-302
- 5 张丹丹, 郭琳, 王强. 胃癌组织中PTEN, MMP-9和Caspase-3表达的关系. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1487-1492
- 6 Fernandez-Figueras MT, Puig L, Musulen E, Gilaberte M, Lerma E, Serrano S, Ferrandiz C, Ariza A. Expression profiles associated with aggressive behavior in Merkel cell carcinoma. *Mod Pathol* 2007; 20: 90-101
- 7 Savaraj N, Wei Y, Unate H, Liu PM, Wu CJ, Wangpaichitr M, Xia D, Xu HJ, Hu SX, Tien Kuo M. Redox regulation of matrix metalloproteinase gene family in small cell lung cancer cells. *Free Radic Res* 2005; 39: 373-381
- 8 贾瑞鹏, 马庆铮, 刘军, 程继义, 许纯孝, 王万忠, 杜德利, 姜玉菲. 肾癌组织中微血管密度、DNA含量检测的临床意义. *南京医科大学学报(自然科学版)* 2003; 23: 261-263
- 9 王水, 武正炎, 范萍, 查小明. 血管内皮细胞生长因子在乳腺癌组织中的表达及其生物学意义. *南京医科大学学报* 2001; 21: 503-505
- 10 Garzetti GG, Ciavattini A, Lucarini G, Pugnali A, De Nictolis M, Amati S, Romanini C, Biagini G. Expression of vascular endothelial growth factor related to 72-kilodalton metalloproteinase immunostaining in patients with serous ovarian tumors. *Cancer* 1999; 85: 2219-2225
- 11 Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 1999; 59: 5830-5835
- 12 Johansson N, Ahonen M, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in tumor invasion. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 5-15
- 13 Yamazaki K, Tajima Y, Makino R, Nishino N, Aoki S, Kato M, Sakamoto M, Morohara K, Kaetsu T, Kusano M. Tumor differentiation phenotype in gastric differentiated-type tumors and its relation to tumor invasion and genetic alterations. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3803-3809
- 14 Zhao ZS, Zhou JL, Yao GY, Ru GQ, Ma J, Ruan J. Correlative studies on bFGF mRNA and MMP-9 mRNA expressions with microvascular density, progression, and prognosis of gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3227-3233
- 15 Kumar M, Liu ZR, Thapa L, Chang Q, Wang DY, Qin RY. Antiangiogenic effect of somatostatin receptor subtype 2 on pancreatic cancer cell line: Inhibition of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-2 expression in vitro. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 393-399
- 16 Liu JR, Yang BF, Chen BQ, Yang YM, Dong HW, Song YQ. Inhibition of beta-ionone on SGC-7901 cell proliferation and upregulation of metalloproteinases-1 and -2 expression. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 167-171
- 17 Meyer E, Vollmer JY, Bovey R, Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases 9 and 10 inhibit protein kinase C-potentiated, p53-mediated apoptosis. *Cancer Res* 2005; 65: 4261-4272
- 18 Chandler S, Miller KM, Clements JM, Lury J, Corkill D, Anthony DC, Adams SE, Gearing AJ. Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview. *J Neuroimmunol* 1997; 72: 155-161
- 19 Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, Kaiser HE.

- Prognostic significance of matrix metalloproteinase expression in colorectal carcinomas. *In Vivo* 2000; 14: 659-666
- 20 Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, Kaiser HE. Immunocytochemical detection of MMP-3 and -10 expression in hepatocellular carcinomas. *Anticancer Res* 2000; 20: 4585-4590
- 21 Miyata Y, Iwata T, Maruta S, Kanda S, Nishikido M, Koga S, Kanetake H. Expression of matrix metalloproteinase-10 in renal cell carcinoma and its prognostic role. *Eur Urol* 2007; 52: 791-797
- 22 Gorogh T, Beier UH, Baumken J, Meyer JE, Hoffmann M, Gottschlich S, Maune S. Metallo-proteinases and their inhibitors: influence on tumor invasiveness and metastasis formation in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck* 2006; 28: 31-39
- 23 Ramos MC, Steinbrenner H, Stuhlmann D, Sies H, Brenneisen P. Induction of MMP-10 and MMP-1 in a squamous cell carcinoma cell line by ultraviolet radiation. *Biol Chem* 2004; 385: 75-86
- 24 Kren L, Goncharuk VN, Krenova Z, Stratil D, Hermanova M, Skrickova J, Sheehan CE, Ross JS. Expression of matrix metalloproteinases 3, 10 and 11 (stromelysins 1, 2 and 3) and matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) by cancer cells in non-small cell lung neoplasms. *Clinicopathologic studies. Cesk Patol* 2006; 42: 16-19
- 25 Zhang X, Zhu S, Luo G, Zheng L, Wei J, Zhu J, Mu Q, Xu N. Expression of MMP-10 in lung cancer. *Anticancer Res* 2007; 27: 2791-2795
- 26 Gill JH, Kirwan IG, Seargent JM, Martin SW, Tijani S, Anikin VA, Mearns AJ, Bibby MC, Anthoney A, Loadman PM. MMP-10 is overexpressed, proteolytically active, and a potential target for therapeutic intervention in human lung carcinomas. *Neoplasia* 2004; 6: 777-785
- 27 Liu LX, Liu ZH, Jiang HC, Qu X, Zhang WH, Wu LF, Zhu AL, Wang XQ, Wu M. Profiling of differentially expressed genes in human gastric carcinoma by cDNA expression array. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 580-585

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

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

• 消息 •

首届海峡两岸消化论坛在厦召开

本刊讯 由福建省医学会、消化病学会、消化内镜学会、肝病学会主办, 厦门市医学会、厦门大学附属中山医院, 厦门大学消化疾病研究所, 厦门市消化疾病诊治中心承办, 哈佛大学麻省总医院、香港大学玛丽医院、北京协和医院、台湾中山大学医学院、台湾高雄医学大学附属医院、澳门镜湖医院、上海交大仁济医院、上海交大瑞金医院、北京解放军总医院、武汉大学人民医院等多家医院以及中华消化杂志、中华消化内镜杂志、胃肠病学、世界华人消化杂志协办的首届“海峡两岸•消化论坛”于2007-11-16/18在厦门金雁酒店金鹰厅胜利召开, 世界华人消化杂志(WCJD)科学编辑程剑侠应邀参加了此次论坛。

首先, 大会执行主席厦门大学附属中山医院消化内科主任任建林教授对来自大陆、台湾、香港、澳门及部分亚太地区500多名专家学者致以热情激昂的开幕词(图1), 随后50名消化病学、消化内镜权威专家就酸相关疾病、功能性胃肠病、幽门螺杆菌、消化系统



图1 海峡两岸•消化论坛现场。

肿瘤、各类肝病、胆胰疾病、消化内镜等领域的最新进展和发展动态作出了精彩的报告。本届论坛还由海峡两岸的专家重点对目前消化病学的热点和焦点分别介绍了各自的研究成果, 交流了两岸在消化病学和消化内镜方面应用新技术和新疗法的经验。此次消化论坛是一次学术的盛会, 也是一次交流的盛会, 提高了两岸四地消化系统疾病的诊治水平, 促进了我国消化领域的整体水平。(WCJD科学编辑: 程剑侠 2007-11-20)。

基因芯片技术检测西藏拉萨地区的乙型肝炎病毒基因型

曹占良, 高英堂, 刘霜, 景丽, 吉宗, 刘彤, 刘持佳, 杜智

■背景资料
HBV基因分型已广泛应用于HBV的分子流行病学、病因学和临床诊治研究, 因此, 建立一种准确、简便快速的分型方法就显得尤为重要。目前已有核苷酸测序、PCR-RFLP、型特异引物、基因芯片等多种方法用于HBV分型。

曹占良, 刘持佳, 武警医学院附属医院检验科 天津市 300162
高英堂, 景丽, 刘彤, 杜智, 天津市第三中心医院 天津市人工细胞重点实验室 天津市 300170
刘霜, 天津市人民医院检验科 天津市 300120
吉宗, 武警西藏总队医院检验科 西藏自治区拉萨市 850000
曹占良, 2002年第三军医大学本科毕业, 学士学位, 副主任技师。主要从事免疫、生化检验工作。
天津市科委攻关项目, No. 05YFSZSF02500
武警医学院院级科研基金项目, No. WY2004-15
通讯作者: 高英堂, 300170, 天津市河东区津塘路83号, 天津市第三中心医院。gaoyt816@163.com
电话: 022-84112148
收稿日期: 2007-08-09 修回日期: 2007-10-30

Detection of HBV genotypes in Lhasa by gene chip

Zhan-Liang Cao, Ying-Tang Gao, Shuang Liu, Li Jing, Zong Ji, Tong Liu, Chi-Jia Liu, Zhi Du

Zhan-Liang Cao, Chi-Jia Liu, Department of Laboratory, Affiliated Hospital of Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China
Ying-Tang Gao, Li Jing, Tong Liu, Zhi Du, Artificial Cells Key Lab of Tianjin, Tianjin Third Central Hospital, Tianjin 300170, China
Shuang Liu, Department of Laboratory, Tianjin People's Hospital, Tianjin 300120, China
Zong Ji, Department of Laboratory, Tibet Corps Hospital of Chinese Armed Police Forces, Lhasa 850000, Tibet Autonomous Region, China
Supported by: the Key Research Project of the Science Committee of Tianjin, No. 05YFSZSF02500; Science Foundation of Medical College of Chinese People's Armed Police Force, No. WY2004-15
Correspondence to: Dr. Ying-Tang Gao, Artificial Cells Key Lab of Tianjin, Tianjin Third Central Hospital, 83 Jintang Road, Hedong District, Tianjin 300170, China. gaoyt816@163.com
Received: 2007-08-09 Revised: 2007-10-30

Abstract

AIM: To investigate the distribution and characteristics of HBV genotypes in Lhasa.

METHODS: A total of 92 serum samples were collected from chronic hepatitis patients in Lhasa infected with HBV. Oligonucleotide probes were designed according to the DNA sequences from GenBank and used to prepare the genotyping chip. The fragments of HBV S gene were amplified using nested PCR. The genotypes were identified by gene chip and then confirmed by sequencing. The phylogeny was analyzed with BioEdit

software. The relationship with hepatitis markers, DNA load, gender and race was also analyzed.

RESULTS: Among the 73 patients positive for HBV DNA, 13 (17.8%) were genotype B, 18 (24.7%) genotype C, 39 (53.4%) genotype D, and 3 (4.1%) mixed genotype B/D. The distribution of the genotypes was not associated with serum HBV markers, HBV DNA load or gender, but was significantly associated with nationality ($\chi^2 = 7.179, P < 0.05$). Genotype B (9/13) was mostly distributed in the Han region, and genotypes C (12/18) and D (28/39) in Tibet. In addition, we selected 7 cases of genotype B, 6 of genotype C, 16 of genotype D, and 3 of mixed genotype B/D, identified by HBV typing chip which were further confirmed by sequencing, and the results of these two methods were consistent.

CONCLUSION: Gene chip technology can be used for HBV genotyping. HBV genotypes distributed in Lhasa include B, C, D and B/D, of which genotype D is the predominant strain.

Key Words: Hepatitis B virus; Genotype; Gene chip; Sequence analysis

Cao ZL, Gao YT, Liu S, Jing L, Ji Z, Liu T, Liu CJ, Du Z. Detection of HBV genotypes in Lhasa by gene chip. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(33): 3500-3506

摘要

目的: 研究西藏拉萨地区乙型肝炎病毒基因型的分布与特点。

方法: 采集92份西藏拉萨地区乙型肝炎患者的血清, 参照GenBank中HBV DNA序列设计寡核苷酸探针并制备HBV基因分型芯片, 利用套式PCR扩增HBV S基因部分片段, 结合基因芯片、DNA测序和BioEdit软件进行基因分型检测, 并对其与乙肝标志物、DNA含量、性别和民族之间的关系进行分析。

结果: 在92例血清标本中, 套式PCR检测73例HBV DNA阳性可进行基因分型检测, 其中B型13例(17.8%), C型18例(24.7%), D型39例(53.4%)和B/D混合基因型3例(4.1%)。统计

学分析3种基因型分布在不同乙肝标志物阳性、不同DNA含量和不同性别之间无差异, 但与民族存在统计学差异($\chi^2 = 7.179, P < 0.05$). B型以汉族为主(9/13), 而C、D型以藏族为主(12/18、28/39). 将基因芯片分型的B、C、D型和B/D混合型进行DNA序列分析, 表明两种分型方法的结果完全一致.

结论: PCR结合基因芯片技术可用于HBV基因分型. 西藏拉萨地区HBV基因型包括B、C、D和B/D混合型, 其中以D型为主.

关键词: 乙型肝炎病毒; 基因型; 基因芯片; 序列分析

曹占良, 高英堂, 刘霜, 景丽, 吉宗, 刘彤, 刘持佳, 杜智. 基因芯片技术检测西藏拉萨地区的乙型肝炎病毒基因型. 世界华人消化杂志 2007;15(33): 3500-3506

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3500.asp>

0 引言

自1988年Okamoto *et al*^[1]将18株不同血清亚型的HBV DNA全序列分为A、B、C和D 4个基因型之后, 相继又有E、F、G和H型4个基因型被确定^[2-4]. 在我国乙型肝炎患者中, 南方以B型为主, 北方以C型为主. D型仅见于少数民族地区, 如西藏、新疆等地区, A和F型偶有发现, 尚无E、G和H型的报道^[5-12]. 西藏地处青藏高原, 地域相对封闭, 而又靠近中亚地区, 因此, 其乙肝病毒基因型的分布特点非常值得研究. 本文应用基因芯片技术和DNA序列分析西藏拉萨地区92例乙肝患者的基因型, 进一步了解拉萨地区HBV基因型分布情况.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 血清标本: 92例血清标本均采自武警西藏总队医院门诊及住院的HBV患者, 患者均来自西藏拉萨地区, 年龄4-67岁. 32例为HBsAg、HBeAg和抗-HBcAb阳性, 46例为HBsAg、抗-HBeAb和抗-HBcAb阳性, 14例为HBsAg和抗-HBcAb阳性. 汉族男性21例, 汉族女性17例, 藏族男性26例, 藏族女性28例. 肘静脉采血5 mL, 分离血清于-80℃保存, 运输采用保温冰盒的特快专递.

1.1.2 主要试剂和仪器: HBV DNA定量检测试剂盒购自中山医科大学达安基因诊断中心, PCR仪为美国ABI公司的ABI Prism 7000实时荧光定量PCR仪, 芯片检测所需的尼龙膜、DIG-11-dUTP、过氧化物酶标记的地高辛抗体、封阻

试剂等均购自美国罗氏公司, Taq酶、UNG酶、dNTP、PCR产物克隆试剂等购自大连宝生物工程公司, 其他生化试剂均为国产分析纯. PCR引物和芯片探针由上海生工生物工程公司合成, 芯片制作采用中科院电工所的DY2003生物芯片点样仪, 探针固定采用美国UVP公司的CL-1000M紫外交联仪, 杂交使用国产多功能杂交反应仪, DNA测序由北京三博远志公司完成.

1.2 方法

1.2.1 HBV DNA定量检测: 采用荧光定量PCR法, HBV DNA提取、PCR扩增和数据分析均按达安基因诊断中心的试剂盒操作说明进行.

1.2.2 HBV DNA基因分型芯片的制备与检测: (1) 基因分型芯片的制备, 根据GenBank中HBV 7个基因型105株序列设计HBV S基因区的PCR引物和寡核苷酸探针, 探针经一定修饰后点到尼龙膜上并交联固定, 即成为HBV基因分型芯片. 引物和探针序列见表1, 探针在芯片上的排列位置见图1. (2) 地高辛标记的套式PCR, 第一次PCR反应体系: 2 μ L血清裂解液, 10 $\times$ PCR缓冲液2.5 μ L, 2 mmol/L dNTP(dTTP: Dig-dUTP为10:1)2 μ L, UNG酶0.5 μ L, Taq酶1 μ L, 上下游引物1 μ L, 超纯水16 μ L, 总计25 μ L. PCR扩增条件: 50℃ 5 min, 94℃ 2 min预变性, 94℃ 1 min, 55℃ 45 s, 72℃ 45 s, 35个循环, 然后72℃延伸5 min. 对于强阳性标本(HBV DNA定量大于 5×10^8 拷贝/L)取5 μ L一次PCR标记产物即可用于芯片杂交, 而其他标本需进行第二次PCR标记反应. 第二次PCR反应参照一次PCR进行, 区别在于使用一对内引物, 取5 μ L二次PCR产物电泳, 依据电泳带的强弱取5-20 μ L用于芯片杂交. 用灭菌水做套式PCR的阴性对照, 每6个标本设置1个对照. (3) 预杂交、杂交和显色, 参照Roche公司地高辛标记检测试剂盒并加以修改, 杂交温度为46℃. 显色采用华美公司的DAB试剂, 显色5-10 min, 用1 $\times$ PBS终止反应. (4) 芯片杂交信号的判读, 芯片杂交结果可直观判断, 整张芯片背景不着色, 特异杂交点和非特异杂交点之间差别明显. 进一步将芯片通过扫描仪输入到计算机中, 利用实验室研发的分析软件(Chip3.0)进行灰度值分析, 从而判断患者的基因型. 判断标准: 特异杂交点的灰度值不小于阳性对照点(10^2 稀释)的50%, 特异杂交点和非特异杂交点之间的探针灰度值比值不小于3. 对出现混合基因型的标本从处理血清步骤开始重复实验确证.

1.2.3 PCR产物的测序: 根据芯片杂交结果, 选取

■研发前沿
HBV基因型是目前乙型肝炎病毒的研究热点之一, 众多文献表明HBV基因型呈明确的地域性分布. HBV基因型与其他临床资料之间的关系虽呈一定的相关性, 但各文献报道结果尚不一致. 因此, HBV基因型与疾病的关系及其相关机制需要深入研究.

■相关报道

赵鸿和高俊薇分别在文献感染乙型肝炎病毒不同基因型和亚型患者的临床特点分析和中国11城市乙型肝炎病毒慢性感染者中乙型肝炎病毒基因型分布(中华流行病学杂志 2007; 28: 315-318)中, 对内地19个城市2000余例乙肝感染者HBV分型表明, B、C型是国内最常见的基因型, 其中南方以B型为主, 北方以C型为主。

座标点	座标点	座标点	座标点	A-G ₁	A-G ₁	A-G ₂	A-G ₂
A ₁	A ₁	A ₂	A ₂	BE ₁	BE ₁	BE ₂	BE ₂
C ₁	C ₁	C ₂	C ₂	ABDFG ₁	ABDFG ₁	ABDFG ₂	ABDFG ₂
CEF ₁	CEF ₁	CEF ₂	CEF ₂	A ₃	A ₃	C ₃	C ₃
C ₄	C ₄	D ₁	D ₁	D ₂	D ₂	D ₃	D ₃
E ₁	E ₁	E ₂	E ₂	F ₁	F ₁	F ₂	F ₂
G ₁	G ₁	PCR(+)	PCR(+)	空白	空白	座标点	座标点

图1 HBV基因分型芯片模式图。

7例B基因型、6例C基因型、16例D基因型和3例B/D混合基因型样品进行PCR产物序列分析, 即使用PCR内引物扩增100 μL产物直接测序。为进一步确定混合基因型的准确性, 对1例B/D混合基因型的PCR产物进行A/T克隆, 采用大连宝生物工程公司的PMD18T载体及其连接、转化试剂, 均按其说明书进行操作。挑选10个白色克隆进行PCR鉴定证明含有PCR产物的插入子, 随后将此10个克隆进行测序。

1.2.4 核苷酸序列相似性和系统发生树分析: 从GenBank中选取HBV 7个基因型的参照株序列, A-G型的基因号依次为M57663、D00329、M12906、X02496、X75657、X69798和AF160501。利用BioEdit7.0.0软件包进行序列比对分析, 其中使用Clustal W 1.4软件作多重序列比较, 使用Sequence Identity Matrix程序进行核苷酸相似性比较, 系统发生树分析采用Neighbor phylogenetic tree方法。

统计学处理 应用SPSS13.0统计软件中的 χ^2 检验分析数据。

2 结果

2.1 PCR扩增分析 荧光定量PCR检测乙肝标志物HBsAg、HBeAg和抗-HBcAb阳性患者的HBV DNA含量均不低于 1.0×10^3 拷贝/mL, 而HBsAg、抗-HBeAb和抗-HBcAb阳性和HBsAg和抗-HBcAb阳性的患者只有11例和9例大于 1.0×10^3 拷贝/mL。对于用于基因分型的地高辛标记套式PCR, DNA含量不低于 1.0×10^3 拷贝/mL的52例标本均阳性, 而定量小于 1.0×10^3 拷贝/mL的小三阳和一、五阳的患者中又有19例和2例套式二次PCR阳性, 其中17例的DNA含量介于 10^3 - 10^2 拷贝/mL之间(表2), 部分标本的套式PCR电泳结果见图2。为保证这些低拷贝标本扩增的准确性, PCR时严格设置空白对照并且不与高拷贝标本同时扩增, 并且重复PCR扩增仍获得相同结果, 表明这些低拷贝标本的阳性扩增带是可信的。因此, 可以用于芯片杂交的标本总计73例。

2.2 基因分型芯片杂交结果分析

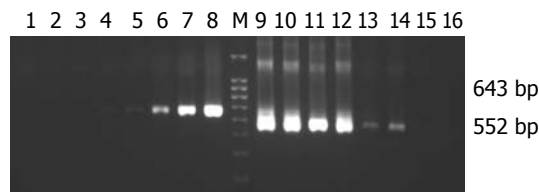


图2 套式PCR电泳结果: M: DNA分子量标准(100 bp DNA Ladder Marker); 1: 一次PCR空白对照; 2-8: 拷贝数 10^1 - 10^7 的标本; 9-15: 拷贝数 10^7 - 10^1 的标本; 16: 二次PCR空白对照。

2.2.1 芯片特异性验证: 为了确定芯片杂交结果的准确性, 我们从3个方面进行了试验检测。(1) 芯片上探针点样量的检测, 用点样针将HBV DNA的PCR产物点于膜上, 再用标记的PCR产物杂交, 观察各点之间点样量的误差。变异系数小于20%, 满足芯片定性检测的需要。(2) 使用人工合成的互补探针检测芯片的特异性, 均可获得对应探针的强杂交信号。(3) 对32份PCR产物直接测序表明基因芯片的判读结果与测序结果一致(下文2.3详述)。通过以上试验表明, 此芯片可初步用于该项研究。

2.2.2 HBV DNA基因型分布: 在73例基因分型的标本中, B型13例(17.8%), C型18例(24.7%), D型39例(53.4%)和B/D混合基因型3例(4.1%), 表明D型可能是拉萨地区最常见的HBV基因型, 芯片杂交图见图3, 基因型的详细分布见表3, 由于B/D混合型仅3例, 未进行统计分析。由表3可知, 3种基因型的分布在不同乙肝标志物阳性、不同DNA含量和不同性别之间无统计学差异, 但与民族存在统计学差异($\chi^2 = 7.179$, $P < 0.05$)。B型更多的存在于汉族中(9/13), 而C、D型更多的存在于藏族中(12/18、28/39)。

2.3 HBV DNA测序分析 选取基因芯片分型的7例B基因型、6例C基因型、16例D基因型和3例B/D混合基因型的PCR产物直接测序。测序使用上游内引物, 获得有效序列长度480 bp, 利用BioEdit7.0.0软件包的Sequence Identity Matrix程序结合7个基因型的7株参照株进行序列相似性比较。结果表明, 基因芯片分型的7例B基因型标本与B型参照株(D00329)的相似性大于98.2%,

表 1 PCR引物和HBV DNA基因分型探针序列

引物/探针		位置	序列组成
引物	上游外引物	182-202 nt	5 ' TAG GAC CCC TGC TCG TGT TAC
	下游外引物	805-824 nt	5 ' CA(A/G) AGA CAA AAG AAA ATT GG
	上游内引物	246-266 nt	5 ' GAG TCT AGA CTC GTG GTG GAC
	下游内引物	777-797 nt	5 ' GG(T/C) A(T/A)A AAG GGA CTC A(A/C)G ATG
探针	通用探针A-G ₁	377-393 nt	5 ' GG ATG TGT CTG CGG CGT
	通用探针A-G ₂	393-377 nt	5 ' ACG CCG CAG ACA CAT CC
	A ₁	483-502 nt	5 ' A ATT CCA GGA TCA ACA ACA A
	A ₂	502-483 nt	5 ' T TGT TGT TGA TCC TGG AAT T
	BE ₁	483-502 nt	5 ' A ATT CCA GGA TCA TCA AC(C/A) A
	BE ₂	502-483 nt	5 ' T (G/T)GT TGA TGA TCC TGG AAT T
	C ₁	483-502 nt	5 ' A CTT CCA GGA ACA TCA ACT A
	C ₂	502-483 nt	5 ' T AGT TGA TGT TCC TGG AAG T
	ABDFG ₁	596-613 nt	5 ' GCA CCT GTA TTC CCA TCC
	ABDFG ₂	613-596 nt	5 ' GGA TGG GAA TAC AGG TGC
	CEF ₁	596-613 nt	5 ' GCA CTT GTA TTC CCA TCC
	CEF ₂	613-596 nt	5 ' GGA TGG GAA TAC AAG TGC
	A ₃	483-502 nt	5 ' A ATT CCA GGA TCC ACA ACA A
	C ₃	524-540 nt	5 ' CC TGC ACG ATT CCT GCT
	C ₄	540-524 nt	5 ' AGC AGG AAT CGT GCA GG
	D ₁	549-566 nt	5 ' C TCT ATG TAT CCC TCC TG
	D ₂	284-300 nt	5 ' GG GGA ACC ACC GTG TGT
	D ₃	284-300 nt	5 ' GG GGA ACT ACC GTG TGT
	E ₁	613-630 nt	5 ' CCA TCA TCA TGG GCT TTC
	E ₂	700-716 nt	5 ' TGG TTC GCC GGG CTT TC
	F ₁	680-699 nt	5 ' TA CTA GTG CAA TTT GTT CAG
	F ₂	699-680 nt	5 ' CTG AAC AAA TTG CAC TAG TA
	G ₁	483-500 nt	5 ' G ATT CCA GGA TCC TCG AC

所列的核苷酸序列位置均为BioEdit比对后的位置, 比对时因出现空位等造成与GenBank中的位置有少许差异.

基因芯片分型的6例C基因型标本与C型参照株(M12906)的相似性大于98.5%, 基因芯片分型的16例D基因型标本与D型参照株(X02496)的相似性大于98.5%. 29例单一基因型的标本其两种分型方法完全一致, 而3例混合型按测序公司提供的序列文件分析显示D基因型. 进一步分析其提供的测序峰图文件, 发现3例B/D混合基因型的测序峰图在B、D基因型差异位点存在2个碱基的双峰(图4). 为确定混合型的真实性, 再次重新裂解血清、PCR扩增、芯片杂交和PCR产物直接测序, 杂交和测序结果均表明3例B/D混合基因型的真实性. 同时, 我们将1例B/D混合基因型的PCR产物进行A/T克隆, 挑选10个白色克隆进行PCR鉴定, 证明7个克隆为B型, 3个克隆为D型. 再次证明PCR产物直接测序观察到的双峰是由于B/D基因型混合造成的.

2.4 系统发生树分析 在上述测序分析基础上, 构建7株参照株序列和35株测序序列(将3株B/D混

■创新盘点
尽管国内多个地区的HBV基因型分布已被报道, 但对于地处青藏高原的西藏, 其乙肝病毒基因型的分布特点及其与临床的相关性研究目前报道较少. 本文采用基因芯片技术对西藏拉萨地区的HBV感染者进行基因分型测定, 并探讨其与患者的乙肝标志物、DNA含量、性别和民族之间的关系.

表 2 92例血清标本的PCR扩增结果(*n*)

分组	<i>n</i>	≥1.0X10 ³ /阳性	<1.0X10 ³ /阳性
HBsAg、HBeAg和抗-HBcAb阳性	32	32(7.33±1.12)/32	0/0
HBsAg、抗-HBeAb和抗-HBcAb阳性	46	11(5.06±1.18)/11	35(1.11±0.98)/19
HBsAg和抗-HBcAb阳性	14	9(5.72±1.17)/9	5(1.40±1.14)/2
合计	92	52/52	40/21

括号内为DNA拷贝数的对数值.

合型序列分解成B、D各3个序列)的系统发生树(图5). 从系统发生树中清楚看出, 35株测序序列包括10个B基因型(其中3株B/D混合型的B序列)、6个C基因型和19个D基因型(其中3株B/D混合型的D序列), 与芯片杂交完全吻合.

2.5 基因型与血清型的关系 将35株DNA测序

■应用要点

通过基因芯片和DNA测序结果的比较,表明PCR结合基因芯片具有较好的检测效果,可以广泛用于各项HBV基因分型研究。西藏拉萨地区HBV基因型包括B、C、D和B/D混合型,其中以D型为主。统计学分析3种基因型分布在不同乙肝标志物阳性、不同DNA含量和不同性别之间无差异,但与民族存在统计学差异。

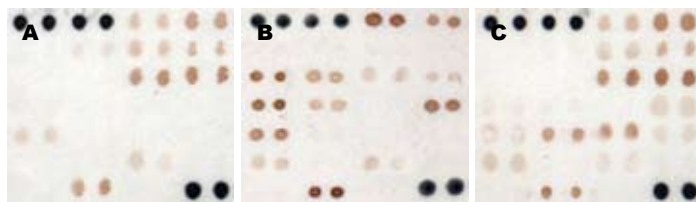


图3 HBV基因分型芯片杂交图。A: 乙肝病毒B基因型; B: C基因型; C: D基因型。

序列翻译成氨基酸序列,根据血清型的定义发现,10个B基因型的血清型均为adw2,6个C基因型的血清型均为adrq+,19个D基因型的血清型均为ayw2。

3 讨论

HBV基因分型已被广泛应用于HBV的分子流行病学、病因学和临床诊治研究,因此,建立一种准确、简便快速的分型方法就显得尤为重要。HBV基因型是根据其基因组核苷酸全序列异质性 $\geq 8\%$ 划分的^[1],因而HBV全基因组核苷酸序列分析是确定基因分型最可靠的经典方法,是许多其他分型方法的参考标准,并且在证实新基因(亚)型时具有举足轻重的作用。但由于设备技术条件要求高、成本贵、操作繁琐等原因导致其难以在临床上推广应用。为建立一种临床可行的分型方法,多位学者通过对GenBank中众多HBV全基因组序列的比对分析和建立分子系统发生树,发现基因组中前S/S基因或前C/C基因的差异与整个病毒核苷酸序列的异质性是一致的,因此只要通过PCR扩增具代表性的部分基因片段,再对PCR扩增产物直接进行测序并与参照株序列比对即可得出分型结果^[1-3]。在此基础上,相继建立了PCR-限制性片段长度多态性分型法(PCR-RFLP)^[13-14]、型特异引物PCR法^[15]、荧光探针PCR^[16-17]、基因芯片法(型特异探针反向杂交法)^[18-20]、特异性表位mAb的ELISA^[21]等多种方法。这些方法虽然可用于HBV基因分型,但各有利弊,均需进一步的改进、优化,尚无一种公认的标准分型方法。本文在比对GenBank中HBV 7个基因型105株序列的基础上,设计型特异的寡核苷酸探针制成HBV基因分型芯片。该芯片的特点是:(1)芯片基质为尼龙膜,显色采用DAB。尼龙膜与玻璃片等基质相比,膜更易于吸附固定DNA分子,可以保证更稳定和准确的信号强度。膜的制备工艺和杂交条件等更成熟,结果相对更稳定。各种荧光的干扰因素对尼龙膜的杂交和DAB显色无影响,并且不需昂贵的荧光扫描仪等设备,操作简便,凡能开展PCR检测的实验室都可应用。(2)同一基因型采

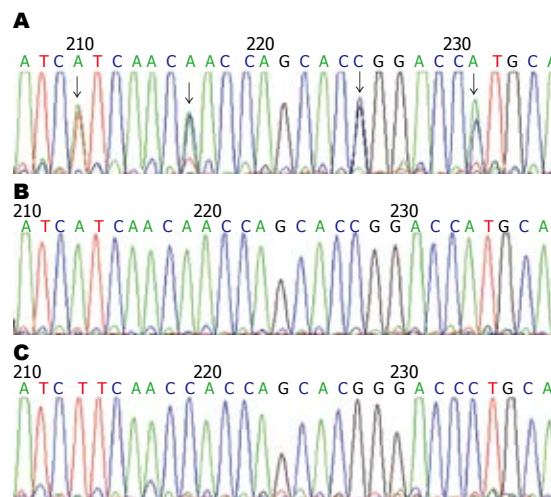


图4 B/D混合基因型的部分测序峰图。A: BC66号标本的PCR产物直接测序,箭头所指为2个碱基的重叠双峰;B: 为BC66号标本PCR产物克隆的B基因型序列;C: BC66号标本PCR产物克隆的D基因型序列。

表3 基因型的详细分布

分组	n	B	C	D	B/D	P值
乙肝标志物						
HBsAg、HBeAg和抗-HBcAb阳性	32	7	6	19	0	
HBsAg、抗-HBeAb和抗-HBcAb阳性	30	4	9	14	3	
HBsAg和抗-HBcAb阳性	11	2	3	6	0	0.778
荧光定量PCR						
$\geq 1.0 \times 10^3$ 拷贝/mL	52	11	10	28	3	
$< 1.0 \times 10^3$ 拷贝/mL	21	2	8	11	0	0.205
性别						
男性	38	6	8	21	3	
女性	35	7	10	18	0	0.767
民族						
汉族	28	9	6	11	2	
藏族	45	4	12	28	1	0.028

用多个型特异探针鉴别,通过序列比对发现,即使是最保守区域的型特异探针,在同一基因型内也有少数序列存在差异,同时其他型的个别序列又与此一致,这样用单一探针检测时即可能出现漏检也可能出现假阳性。因此,针对我国流行的B、C和D 3种基因型,我们均设计2个以

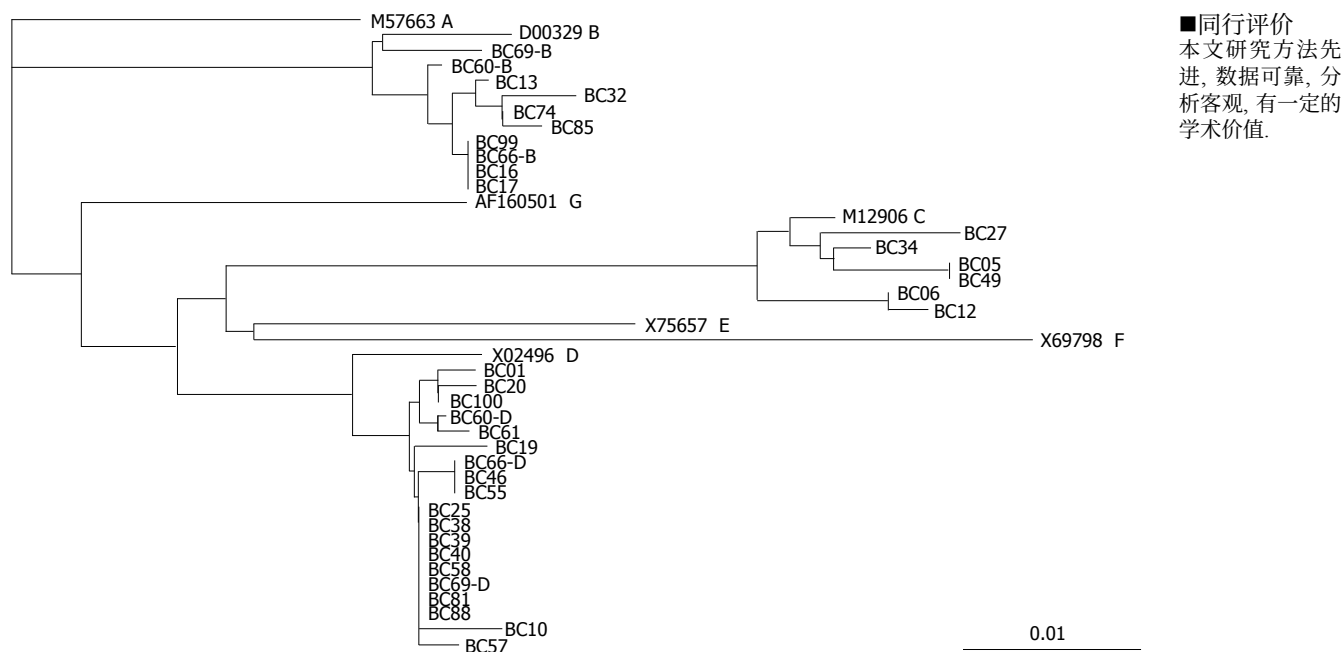


图 5 HBV DNA系统发生树.

上的探针进行检测。(3)该芯片成本低廉、试验条件简便、易于推广。利用此芯片对西藏拉萨地区92例血清标本的检测和其中32份PCR产物测序验证,表明该基因芯片具有较好的检测效果,可以广泛用于各项HBV基因分型研究。

本文依据HBV S基因核苷酸序列对西藏拉萨地区73例乙肝患者进行的基因型分析表明,优势基因型为D型,占53.4%,其次为C型(24.7%)和B型(17.8%),以及4.1%的B/D混合基因型。对比以往文献, Cui *et al*^[6]对26例西藏藏族乙肝携带者的S基因核苷酸序列分析表明,1例为C型,其余25例均为D型。姜双应 *et al*^[22]对9例青海同德地区藏族乙肝感染者的S基因核苷酸序列分析表明,7例为D型,2例为C型。边中启 *et al*^[23]报道了1例云南少数民族地区的藏族慢性乙肝患者为B型。因此,在西藏地区即存在D、C等优势基因型,同时也存在B、B/D等少数基因型。

由表3可知,3种基因型的分布在不同DNA含量和不同性别之间无统计学差异,这与最近的两篇报道相一致。赵鸿 *et al*^[7]对新疆等8个地区884例乙肝感染者分型表明,B、C型最为常见,占20.77%和78.22%,病毒载量在两基因型之间无差别。高俊薇 *et al*^[8]对11个内地城市1214例乙肝感染者分型表明,B、C型也是最常见的基因型,其不同性别中的分布无统计学差异。

众多文献报道国内南方以B型为主,北方以C型为主,其他型只有零星报道^[5-12]。而与西藏相邻的中东地区流行株为D型^[24]。因此,西藏独

特的地理位置和人口迁移等因素可能会影响该地区HBV基因型演化和分布规律。拉萨地区三种基因型的分布在不同民族之间存在统计学差异,不能简单地认为某种民族更容易感染某种基因型,而应更深层次地分析基因型的演化历史。D、C型是优势基因型,各占53.4%和24.7%,并且更多的存在于藏族中(28/39、12/18),表明这两种基因型可能是拉萨地区早期的基因型。B型仅占17.8%,且多存在于汉族中(9/13),推测其可能是随着汉族人在西藏的定居而引入的;另一方面,11例汉族D基因型、4例藏族B基因型、2例汉族B/D基因型和1例藏族B/D基因型的存在,也说明即使在国内其他省市几乎无D基因存在的情况下,当汉族人定居西藏时可以感染上D基因型,同样,藏族人也可以感染上B基因型。对HBV基因型在更多地区 and 不同民族之间分布特点的分析,将有助于阐明其演化历史。

4 参考文献

- Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 1988; 69 (Pt 10): 2575-2583
- Norder H, Courouce AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 1994; 198: 489-503
- Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, Rossau R. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and

- phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2000; 81: 67-74
- 4 Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnus LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002; 83: 2059-2073
- 5 Zeng G, Wang Z, Wen S, Jiang J, Wang L, Cheng J, Tan D, Xiao F, Ma S, Li W, Luo K, Naoumov NV, Hou J. Geographic distribution, virologic and clinical characteristics of hepatitis B virus genotypes in China. *J Viral Hepat* 2005; 12: 609-617
- 6 Cui C, Shi J, Hui L, Xi H, Zhuoma, Quni, Tsedan, Hu G. The dominant hepatitis B virus genotype identified in Tibet is a C/D hybrid. *J Gen Virol* 2002; 83: 2773-2777
- 7 赵鸿, 李俊, 李兴丰, 斯崇文, 于敏, 公维波, 于岩岩, 王贵强. 感染乙型肝炎病毒不同基因型和亚型患者的临床特点分析. *中华流行病学杂志* 2007; 28: 74-77
- 8 高俊薇, 李雅娟, 庄辉, 李杰, 王佳, 董庆鸣, 陈雅洁, 牛俊奇, 马为民, 赵伟, 赵保安, 钟金群. 中国11城市乙型肝炎病毒慢性感染者中乙型肝炎病毒基因型分布. *中华流行病学杂志* 2007; 28: 315-318
- 9 庄林, 游晶, 陈红英, 俞岚, 孔蕾, 唐宝璋, 黄俊华, 袁绍明, Hurcha S, Virasakdi C, Alan G, 袁丽芳, 王辉. 云南地区乙型肝炎病毒基因型分布与临床的相关性. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2120-2127
- 10 郭瑜, 刘晓燕, 胡惠梅, 陈斯勇, 伊瑶, 陈向伟, 毕胜利. 山西省乙型肝炎病毒基因型别的初步研究. *中华实验和临床病毒学杂志* 2006; 20: 361-363
- 11 马英, 窦晓光, 李智伟, 黄芬, 乔光彦, 闻颖, 张明香, 于蛟, 赵贺群. 沈阳地区乙型肝炎病毒基因型分子流行病学研究. *中华实验和临床病毒学杂志* 2006; 20: 349-351
- 12 李桂珍, 刘兴祥, 王兴亮. 江苏地区不同类型乙型肝炎患者HBV基因分型研究. *第四军医大学学报* 2007; 28: 157-159
- 13 Bartholomeusz A, Schaefer S. Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. *Rev Med Virol* 2004; 14: 3-16
- 14 Zeng GB, Wen SJ, Wang ZH, Yan L, Sun J, Hou JL. A novel hepatitis B virus genotyping system by using restriction fragment length polymorphism patterns of S gene amplicons. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3132-3136
- 15 Naito H, Hayashi S, Abe K. Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 362-364
- 16 Yeh SH, Tsai CY, Kao JH, Liu CJ, Kuo TJ, Lin MW, Huang WL, Lu SF, Jih J, Chen DS, Chen PJ. Quantification and genotyping of hepatitis B virus in a single reaction by real-time PCR and melting curve analysis. *J Hepatol* 2004; 41: 659-666
- 17 Liu Y, Hussain M, Wong S, Fung SK, Yim HJ, Lok AS. A genotype-independent real-time PCR assay for quantification of hepatitis B virus DNA. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 553-558
- 18 Osiowy C, Giles E. Evaluation of the INNO-LiPA HBV genotyping assay for determination of hepatitis B virus genotype. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5473-5477
- 19 Hussain M, Chu CJ, Sablon E, Lok AS. Rapid and sensitive assays for determination of hepatitis B virus (HBV) genotypes and detection of HBV precore and core promoter variants. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3699-3705
- 20 Tang XR, Zhang JS, Zhao H, Gong YH, Wang YZ, Zhao JL. Detection of hepatitis B virus genotypes using oligonucleotide chip among hepatitis B virus carriers in Eastern China. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1975-1979
- 21 Usuda S, Okamoto H, Tanaka T, Kidd-Ljunggren K, Holland PV, Miyakawa Y, Mayumi M. Differentiation of hepatitis B virus genotypes D and E by ELISA using monoclonal antibodies to epitopes on the preS2-region product. *J Virol Methods* 2000; 87: 81-89
- 22 姜双应, 易虎, 邵锡如, 杨维成, 唐志坚. 青海省同德地区藏族人群乙型肝炎病毒基因型的探讨. *病毒学报* 2006; 22: 400-402
- 23 边中启, 华占楼, 严维耀, 刘明秋, 吴殿源, 郑兆鑫. 中国云南少数民族地区慢性乙型肝炎患者病毒基因型的鉴定. *中华医学杂志* 2006; 86: 681-686
- 24 Alavian SM, Keyvani H, Rezai M, Ashayeri N, Sadeghi HM. Preliminary report of hepatitis B virus genotype prevalence in Iran. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5211-5213

编辑 李军亮 电编 郭海丽

乙型肝炎病毒基因型、BCP及PC区变异与拉米夫定治疗后HBV DNA反弹的关系

苏明华, 江建宁, 周元平, 陈茂伟, 刘志红

苏明华, 江建宁, 陈茂伟, 刘志红, 广西医科大学一附院感染性疾病科 广西壮族自治区南宁市 530027
周元平, 广州南方医院 广东省广州市 510000
苏明华, 2006年广西医科大学硕士研究生, 硕士, 副教授, 主要从事病毒性肝炎诊断与治疗的研究。
广西自然科学基金桂科资助项目, No. 0342009
通讯作者: 江建宁, 530027, 广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学一附院感染性疾病科, jjianing@163.com
收稿日期: 2007-08-08 修回日期: 2007-09-30

Relationship of HBV genotype and bcp and pc mutations with HBV DNA rebound after lamivudine therapy

Ming-Hua Su, Jian-Ning Jiang, Yuan-Ping Zhou, Mao-Wei Chen, Zhi-Hong Liu

Ming-Hua Su, Jian-Ning Jiang, Mao-Wei Chen, Zhi-Hong Liu, Department of Infectious Diseases, the First Clinical Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530027, Guangxi Zhuangzu Autonomous Region, China
Yuan-Ping Zhou, Nanfang Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of Guangxi, No. 0342009

Correspondence to: Professor Jian-Ning Jiang, Department of Infectious Diseases, the First Clinical Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530027, Guangxi Zhuangzu Autonomous Region, China. jjianing@163.com
Received: 2007-08-08 Revised: 2007-09-30

Abstract

AIM: To investigate the relationship of HBV gene mutations with HBV DNA rebound after lamivudine therapy.

METHODS: Twenty-seven hepatitis B patients with HBV DNA rebound after lamivudine therapy (therapy group) and 19 patients without antiviral therapy (control group) were investigated. HBV genotype was detected by nested PCR with multiple pair primers. Mutations of basal core promoter (BCP) and precore (PC) were identified by PCR gene sequence analysis in sera of 27 patients after HBV DNA rebound, and in sera of 4 patients before therapy in the therapy group and in sera of 19 patients in the control group.

RESULTS: The ratio of BCP (A1762T + G1764A) mutations in serum of patients with HBV DNA rebound was 44.44% (12/27) higher than 26.32% (5/19) in the control group, although not significantly. The mutation was not detected in the sera of 4 patients before therapy. The ratio of the PC (G1896A) mutation in serum of patients with HBV DNA rebound was 33.33% (9/27) higher than 5.26% (1/19) in the control group ($P < 0.01$). The mutation was not detected in the sera of 4 patients before therapy. The ratio of the C1856T mutation was 14.81% (4/27) higher than 10.53% (2/19) in the control group, but not significantly. It was not detected in the sera of 4 patients before therapy. In patients with the BCP mutation (A1762T + G1764A), the constituent ratio of genotype B was 75% higher and that of genotype C was 25% lower than those in the control group (both $P < 0.05$). In patients with mutation PC (G1896A), the constituent ratio of genotype B was 50% higher, and that of genotype C was 50% lower than those in the control group ($P > 0.05$). Gene mutations were not detected in four patients before lamivudine therapy but BCP and BCP + PC mutations occurred in two patients after HBV rebound. In 27 patients with HBV DNA rebound, there were BCP mutations in four, PC mutation in two, and BCP + PC mutation in eight.

CONCLUSION: BCP (T1762/A1764) and PC (G1896A) mutations may be involved in HBV DNA rebound after lamivudine therapy. The mutations occur in both single and multiple gene groups. The A1762T + G1764A mutation occurs more frequently in patients with genotype B after lamivudine therapy.

Key Words: Hepatitis B virus; Genotype; Gene mutation; Lamivudine; HBV DNA rebound

Su MH, Jiang JN, Zhou YP, Chen MW, Liu ZH. Relationship of HBV genotype and bcp and pc mutations with HBV DNA rebound after lamivudine therapy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(33): 3507-3513

■背景资料
国内外已公认拉米夫定治疗后出现的耐药导致HBV DNA反弹与YMDD变异密切相关。对于拉米夫定治疗后是否还可有其他基因区的变异, 以及是否存在联合变异、基因型与变异的关系, 为探讨这一问题本文做了以下研究。

■研发前沿

文献中研究拉米夫定治疗后出现的基因区变异主要为YMDD变异,但是否还存在有其他基因区的变异,目前国外文献报道很少,国内罕见这方面的研究。本文除YMDD变异外侧重于多个基因区的联合变异(BCP、PC区),并且设立了对照组(未用拉米夫定治疗)及治疗前后的对照。

摘要

目的: 探讨HBV基因型、C区基本核心启动子(BCP)及前C(PC)区变异与拉米夫定抗病毒治疗后HBV DNA反弹的关系。

方法: 应用多引物对巢式PCR法, PCR-序列分析法, 检测拉米夫定治疗27例乙型肝炎患者(治疗组), 以及19例从未用过抗病毒治疗患者(对照组)的HBV基因型PC区, BCP的突变位点。

结果: 27例HBV DNA反弹的患者9例检出G1896A变异率高于对照组(33.33% vs 5.26%, $P<0.05$), 4例检出C1856T变异(14.81%)。治疗组4份治疗前标本未检出G1896A、C1856T和BCP变异。与对照组比较, 治疗组PC(G1896A)及BCP(A1762T+G1764A)双变异的患者中B基因型的构成比增高, 分别为75%和50%, C基因型的构成比下降, 分别为25%和50%。其中在BCP(A1762T+G1764A)变异患者中B、C基因型构成比与对照组比较有显著性差异($P<0.05$)。4例HBV DNA反弹患者治疗前未检出有基因变异, 治疗后有2例检出变异, BCP变异1例, BCP+PC变异1例。27例HBV DNA反弹患者BCP变异4例, PC变异2例, BCP+PC变异8例。

结论: BCP(T1762/A1764)变异、PC区(G1896A)变异可能与拉米夫定治疗后HBV DNA反弹有关。病毒变异导致的HBV DNA反弹可以是单基因变异引起, 也可以是多个基因联合变异引起, 拉米夫定治疗后B基因型患者更易发生A1762T+G1764A变异。

关键词: 乙型肝炎病毒; 基因型; 基因变异; 拉米夫定; HBV DNA反弹

苏明华, 江建宁, 周元平, 陈茂伟, 刘志红. 乙型肝炎病毒基因型、BCP及PC区变异与拉米夫定治疗后HBV DNA反弹的关系. 世界华人消化杂志 2007; 15(15): 3507-3513
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3507.asp>

0 引言

慢性乙型肝炎是最常见的感染性疾病之一, 全世界约有3.5亿人感染乙型肝炎病毒(HBV)^[1], 其中75%在亚洲^[2]。我国是乙型病毒性肝炎的流行大国, 其中HBV携带者几乎占了人口的10%, 即1.2亿人。其中约有15%-40%的感染者发展为不同类型的肝病, 如活动性肝炎、肝硬化、甚至原发性肝癌。目前认为持续病毒复制是慢肝发展到肝硬化、重肝的主要原因。因此抗病毒治

疗是阻止和延缓病程发展的重要治疗措施。拉米夫定于1999年开始在国内广泛应用于治疗乙肝, 其疗效已得到多数学者肯定。但在治疗的过程中出现了许多问题, 如用药疗程不确定, 用药时间长会出现基因变异, 停药后又会出现HBV DNA反弹等。HBV是一种嗜肝DNA病毒, 基因组约含3200个bp, 其长链有4个开放性读框(ORF), 即S区、C区、P区和X区。由于在HBV的复制过程中有逆转录过程的参与, 因而HBV较其他DNA病毒更容易发生变异。HBV基因型可以分为A-H八种^[3], 不同的基因型可能有不同的病毒变异特点。国内外已公认拉米夫定治疗后出现的耐药导致HBV DNA反弹与YMDD变异密切相关, 对于拉米夫定治疗后是否还可有其他基因区的变异, 目前国外文献报道很少, 国内无这方面的研究。为了探讨HBV基因型、BCP及PC变异及变异位点与拉米夫定抗病毒治疗的关系, 以及拉米夫定治疗后HBV DNA反弹时是否存在联合变异的现象, 我们做了以下研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病例来源: 来源于2001-12/2004-12广西医科大学第一附属医院传染病科门诊及住院患者。

1.1.2 研究对象入选标准: 治疗组: (1)慢性乙型肝炎或者乙肝后肝硬化患者, 诊断标准符合2000年“全国第十次病毒性肝炎学术会议”修订的病毒性肝炎诊断标准^[4]; (2)治疗前HBV DNA拷贝数 $\geq 1.0 \times 10^7$ 拷贝/L, 谷丙转氨酶(ALT) > 1.5 倍正常值)反复异常 > 6 mo; (3)用拉米夫定治疗(100 mg/d)达到病毒血应答(HBV DNA $< 1.0 \times 10^6$ 拷贝/L)超过半年; (4)疗程至少1年; (5)治疗前均未用过抗病毒药物; (6)患者依从性好, 能按要求定期随访。所有患者追踪至HBV DNA反弹时即HBV DNA由阴性转为阳性。对照组: 从未用过抗病毒药物治疗的慢性乙型肝炎或者乙肝后肝硬化患者。两组患者治疗前HBV DNA拷贝数相近, 平均6.7log和6.56log。

1.1.3 患者剔除标准: (1)合并有抗HCV, 抗HDV, 抗HIV阳性; (2)乙肝病毒携带者、急性肝炎、重型肝炎、肝癌患者; (3)HBV DNA拷贝数 $< 1.0 \times 10^7$ 拷贝/L; (4)用免疫抑制剂治疗者。

1.1.4 入选对象的一般资料: 符合入选标准的治疗组患者27例, 其中男19例, 女8例, 年龄20-58(平均35.26)岁, 乙肝后肝硬化3例, 慢性乙肝24例, 其中HBeAg(+)18例, HBeAg(-)9例。

用药疗程12-33 mo, 平均19.99 mo. 对照组患者19例, 男16例, 女3例, 年龄20-58(平均33.63)岁, 乙肝后肝硬化3例, 慢性乙肝16例, 其中HBeAg(+)13例, HBeAg(-)6例. 两组中>35岁的患者占67.39%.

1.1.5 试剂和仪器: Tap DNA合成酶由TaKaRa宝生物(大连)科技有限公司提供. 10 mmol/L dNTP, 50 bp DNA Marker由广州东盛生物科技有限公司提供. 美国ThermoP×2 Thermal cycler, 美国Bio-Rad公司GelDoc 2000凝胶电泳成像分析系统.

1.2 方法 检测治疗前、治疗后每个月和HBV DNA阴转后每3 mo的肝功能、HBV DNA和HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb, HBcAb标记物.

1.2.1 血清的处理: 共收集到50份血清标本: 治疗组治疗前4份, 治疗后HBV DNA反弹时的标本27份, 对照组收集到19份. 将收集到的血清置于-20℃冰箱中贮存.

1.2.2 HBV DNA的提取: 采用酚: 氯仿抽提法, 将收集到的血清500 μL置于1.5 mL离心管内, 加等量饱和苯溶液, 混匀, 3500 r/min离心5 min. 取上清液置于另一1.5 mL离心管内, 加等量氯仿: 异戊醇溶液, 混匀, 3500 r/min离心5 min; 取上清液置于另一1.5 mL离心管内, 加入2.5倍无水乙醇, 轻轻摇晃离心管, 1000 r/min离心10 min, 弃上清液, 底部即为析出的DNA. 加入750 mL/L冰冻乙醇400 μL洗涤, 12000 r/min离心15 min, 去全部液体. 待干燥后加30 μL TAE缓冲液溶解, 置4℃冰箱待测.

1.2.3 检测项目: 检测46例患者的HBV基因型、BCP, PC基因的变异. HBV基因型引物根据HBV DNApre-S和S基因区保守序列设计^[5]. BCP, PC基因引物设计: 检索GenBank收录的HBV基因全序列(基因号为AY123041), 采用Premier5.0引物设计软件对HBV病毒基因组保守区序列设计引物, BCP, PC(sense)GCATGGAGACCACCGTGAAC(nt1607-1627), (antisense)CAAATTCTTTATACGGGTCAAT(nt1930-1908), 产物324 bp, 由上海生工生物工程有限公司合成.

1.2.4 检测方法: HBV DNA用荧光定量PCR法, HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb, HBcAb用ELISA法, 均由广西医科大学第一附属医院检验中心完成. HBV DNA $<1.0\times 10^6$ 拷贝/L定为阴性.

1.2.5 HBV基因型的检测: (1)采用基因型特异多引物对巢式PCR法: 第一轮PCR: 反应体系50 μL即ddH₂O 34.6 μL, 10×PCR 缓冲液 8 μL, 10 mmol/L dNTP 1.0 μL, 浓度为10 μmol/L的正

义、反义引物各1.0 μL, 5×10³ kU/L Taq DNA聚合酶0.4 μL, DNA模板4 μL. 反应参数为: 预变性94℃ 5 min, 循环参数为变性94℃ 1 min, 退火55℃ 1 min, 延伸72℃ 1 min, 共34个循环, 最后72℃延伸10 min的扩增条件放入PCR仪中扩增. 第二轮PCR: 分两组进行, 第一组反应体系的引物为A, B, C型特异性引物, 第二组反应体系的引物为D, E, F型特异性引物. 第一组反应体系25 μL即ddH₂O 15.3 μL, 10×PCR 缓冲液4 μL, 10 mmol/L dNTP 0.5 μL, 浓度为10 μmol/L的A to C正义引物1.5 μL, A, B, C型特异性引物反义引物各0.5 μL, 5×10³ kU/L Taq DNA聚合酶0.2 μL, 第一轮PCR扩增产物2 μL. 第二组反应体系亦为25 μL, 除引物为10 μmol/L的D to F正义引物1.5 μL, D, E, F型特异性引物反义引物各0.5 μL外, 其余均与第一组反应体系相同, 反应参数均与第一轮PCR相同. (2)HBV基因型的判定: 分别取第二轮两组PCR的扩增产物10 μL加2 μL 6×Loading dye 混合在15 g/L琼脂糖上样, 同时加入50 bp Marker对照, 100 V 40 min电泳后用凝胶电泳成像分析系统观察并照相. 通过产物片段大小判定待测样品的基因型, 即68bp-A基因型, 281bp-B基因型, 122bp-C基因型, 119bp-D基因型, 167bp-E基因型, 97bp-F基因型(图1). (3)BCP, PC区变异的检测: 采用PCR-序列分析法. PCR扩增反应体系25 μL: ddH₂O 17.3 μL, 10×PCR 缓冲液4 μL, 10 mmol/L dNTP 0.5 μL, 浓度为10 μmol/L的正义、反义引物各0.5 μL, 5×10³ kU/L Taq DNA聚合酶0.2 μL, DNA模板2 μL. 反应参数为: 预变性94℃ 5 min, 循环参数为变性94℃ 1 min, 退火55℃(C区为52℃) 1 min, 延伸72℃ 1 min, 共34个循环, 最后72℃延伸10 min. (4)基因测序: 上述扩增的产物10 μL加2 μL 6×Loading dye 混合在15 g/L琼脂糖上样, 同时加入50 bp Marker对照, 110 V 40 min电泳后用凝胶电泳成像分析系统观察并照相. BCP(包括PC区)的PCR扩增产物长度为324 bp, (图2)将扩增出的样品送上海鼎安生物科技有限公司经纯化后进行正义序列测定. 测序结果采用Analysis(Vect NTI suite 8.0)对比软件A-F基因型标准株核苷酸序列进行对比分析, 检测各区的变异位点. HBV P, C区的测序结果经翻译成氨基酸序列后与各区标准的氨基酸序列作对比分析.

统计学处理 全部数据采用SPSS13.0统计软件包进行统计处理, 率的比较用四格表的确切概率法.

■相关报道
国内汤守兵 *et al* 研究认为BCP变异可影响病毒复制, BCP变异可能与肝病的严重程度存在着相关性.侯阮沛 *et al*认为乙型肝炎病毒前C区和BCP区突变能显著影响HBeAg量的表达, 从而导致乙型肝炎病毒致病能力的变化.

■创新盘点

本文证实了YMDD变异是拉米夫定治疗后出现耐药导致HBV DNA反弹的主要原因,而且提示BCP(A1762T/G1764A)变异、前C区G1896A变异是病毒耐药的另—机制.病毒变异导致的HBV DNA反弹可以是单基因变异或多基因联合变异引起.

表 1 HBV BCP变异和PC变异的检测结果 n , (%)

分组	n	A1762T+G1764A	G1721A	T1753C	G1757A	A1775G	G1896A	C1856T
对照组	19	5(26.32)	6(31.58)	4(21.05)	3(0.00)	5(0.00)	1(5.26)	2(10.53)
治疗组								
治疗前	4	0(0.00)	1(25.00)	1(25.00)	1(25.00)	1(25.00)	0	0
治疗后	27	12(44.44)	8(29.63)	0(0.00)	3(11.11)	4(14.81)	9(33.33) ^a	4(14.81)

与对照组比较^a $P<0.05$.

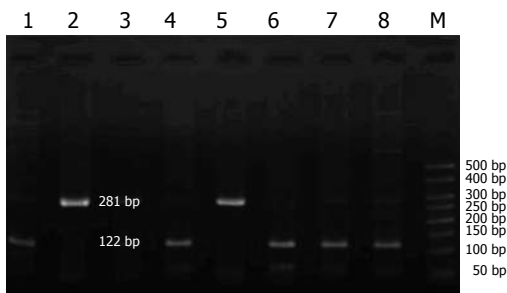


图 1 HBV基因分型PCR电泳图. 1, 4, 6, 7, 8: HBV C基因型; 2, 5: B基因型; 3: B+C基因型.

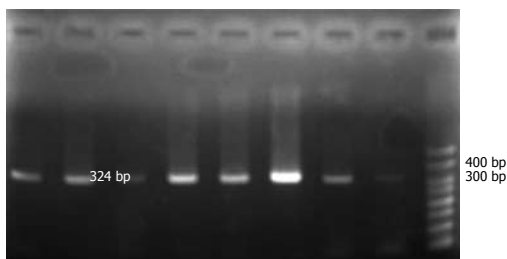


图 2 HBV BCP电泳图.

表 2 HBV基因型的检测结果及与基因变异的关系 n , (%)

分组/变异	n	B基因型(%)	C基因型(%)	B+C混合型(%)
对照组	19	6(31.58)	13(68.42)	
治疗组	27	10(37.04)	16(59.26)	1(3.70)
BCP	12	9(75.00)	3(25.00)	
PC	10	5(50.00)	5(50.00)	

变异的患者中B基因型的构成比增高, C基因型的构成比下降, 其中在BCP(A1762T+G1764A)变异患者中B, C基因型构成比与对照组比较有显著性差异($P<0.05$, 表2).

2.4 4例HBV DNA反弹患者治疗前后基因变异情况 4例HBV DNA反弹患者治疗前未检出有基因变异, 治疗后有2例检出变异, BCP变异1例, BCP+PC变异1例.

2.5 27例HBV DNA反弹患者BCP, PC, BCP+PC变异情况 27例HBV DNA反弹患者BCP变异4例、PC变异2例、BCP+PC变异8例.

2 结果

2.1 BCP变异的检测结果 BCP变异的检测结果, A1762T, G1764A均是同时出现, 治疗后BCP(A1762T, G1764A)变异检出率(44.44%)高于对照组(26.32%), 但无统计学差异. 同时, 在未治疗标本中还可检出7例有G1721A, 5例T1753C, 4例G1757A, 6例A1775G位点变异. 其中3例A1762T, G1764A双变异同时合并有G1721A, T1753C, G1757A的变异. G1721A, T1753C, G1757A, A1775G位点的变异, 治疗组与对照组比较无统计学意义(表1).

2.2 PC变异和46例患者HBV基因型的检测结果 PC区可检出G1896A及C1856T变异位点, G1896A变异检出率治疗组高于对照组($P<0.05$). C1856T变异治疗组与对照组比较($P>0.05$, 表1, 2).

2.3 BV基因型与基因变异的关系 与对照组比较, 治疗组PC(G1896A)及BCP(A1762T+G1764A)双

3 讨论

近15年的研究, 对HBV基因变异已有了较深入的了解. 研究发现, 病毒变异可能会导致病毒本身的复制、转录和表达水平的改变, 从而影响慢性乙型肝炎的临床诊断及治疗, 特别是核苷类似物耐药性的发现具有重要的临床价值. 拉米夫定治疗慢性乙型肝炎的主要缺陷之一是HBV对其易产生耐药性, 且随着治疗时间的延长, 耐药率明显增加. 亚洲的临床研究数据显示, 拉米夫定治疗1-4年的耐药率分别为14%, 38%, 49%和66%^[6-8]. 目前认为^[9], HBV对核苷类似物耐药性的产生与HBV P基因变异有关, 以C区酪氨酸(Y)、蛋氨酸(M)、天冬氨酸(D)、天冬氨酸(D)氨基酸(YMDD)基因的变异最为重要. 在我们的一项研究中(待发表), 在HBV DNA反弹的27例患者中, YMDD变异的检出率占48%, 仍有52%患者无YMDD变异. 我们认为除YMDD

外, 还存在其他引起拉米夫定治疗HBV DNA反弹的因素. BCP变异即基本核心启动子变异, 定位于1744-1851 nt之间, 大部分与X基因区重叠. 他可引起基本启动子与转录因子的结合减少, 导致前C和C mRNA的转录减少, 从而造成前C区蛋白的减少, 但不影响HBV其他RNA的转录和核心蛋白或多聚酶蛋白的翻译. 由于减少了HBV前C区蛋白对HBV复制的抑制作用, BCP变异株的复制能力有所增强. BCP中最重要、最常见的突变是1762 nt A→T, 1764 nt G→A, 两者常同时出现, 称为双突变. 其在HBeAg阴性的HBV长期携带者中高度流行, 但在HBeAg阳性者中却较罕见, BCP的变异在转录水平上影响HBeAg的形成. 体外试验证实BCP变异有利于病毒的复制^[10]. Kim^[11]研究100例慢性乙型肝炎(HBeAg阳性50例)发现BCP(T1762/A1764)变异, 在HBeAg阳性和阴性患者中均存在. Sendi *et al*^[12]研究30例HBeAg阴性慢性乙型肝炎发现BCP(T1762/A1764)变异的占20%, T1764G1766变异的占33%, 认为BCP常见变异位点在T1764和G1766, 而且常常联合A1757的变异, 与病毒高复制及转氨酶升高有关. BCP变异对核苷类似物治疗的影响. Chen *et al*^[13]认为T1762/A1764(无A1896)变异有益于拉米夫定治疗后HBeAg转阴. Tacke *et al*^[14]的研究认为BCP变异不影响耐药性, 但可使病毒的复制能力增强及可增强耐拉米夫定的变异株复制能力. 本研究检出BCP变异的位点有A1762T+G1764A, G1721A, T1753C, G1757A, A1775G, T1762+A1764双变异仍是BCP常见的变异位点. G1721A, T1753C, G1757A, A1775G的变异在治疗组和对照组均存在, 且变化不大, 可能不影响拉米夫定治疗的疗效. 是否影响乙型肝炎的临床表现有待进一步研究. BCP(T1762/A1764)变异在治疗组HBV DNA反弹的患者检出率(44.44%)高于对照组(26.32%), 但统计学上无差异, 可能与样本量少有关. 我们认为在拉米夫定这种抗病毒药物的压力下, 亦可导致BCP变异, BCP变异增强耐拉米夫定的变异株复制能力, 导致HBV DNA反弹.

前C基因的突变影响HBeAg的表达. 1989年Carman *et al*^[15]首次在乙肝患者HBV基因组中, 用PCR技术证明前C区核苷酸(nt)1896G→A的变异, 使密码子TGG变为TAG, 产生一个终止密码, 使前C蛋白的翻译终止, 从而使HBeAg不能合成. 前C区基因变异对核苷类似物疗效的影响. Reiichiro *et al*^[16]观察54例慢性乙型肝炎

患者用拉米夫定治疗至少1年, 结果提示有前C区变异的效果好. Chen *et al*^[13]研究74例HBeAg阳性的慢性肝病患者用拉米夫定治疗9-12 mo, 结果提示在治疗后和HBeAg阴转的34例完全应答的患者T1762/A1764变异增多而A1896变异减少. 40例无应答患者中可出现1773, 1802, 1803, 1845, 1850和1858核苷酸位点的变异, 认为T1762/A1764(无A1896)变异有益于拉米夫定治疗后HBeAg转阴. 1773, 1802, 1803, 1845, 1850和1858核苷酸位点的变异是患者无应答的原因. Shin *et al*^[17]研究认为1896位的突变是拉米夫定长期治疗后低应答的原因. 我们的结果显示, PC(G1896A)变异的发生率(9/27, 33.33%)在拉米夫定治疗后HBV DNA反弹的患者中明显高于对照组(1/19, 5.26%)($P<0.05$). 因此, 我们认为PC(G1896A)变异的出现也是HBV DNA反弹的原因之一. 同时我们还检测到C1856T位点的变异, 但治疗组与对照组比较($P>0.05$). C1856T位点的变异可能与HBV DNA反弹关系不大.

从治疗组治疗前后的4例患者看, 治疗前均未检出基因变异, 治疗后有3例患者检出基因变异, 其中两例为联合变异. 我们认为, 病毒变异导致的HBV DNA反弹的基因变异是多种形式的, 可以是单基因变异引起, 也可能是多个基因联合变异引起. 因此, 临床上在检测拉米夫定耐药变异时, 不能只单纯检测YMDD, 还应考虑检测其他基因变异.

HBV的基因型在1988年由Okamoto *et al*^[18]提出. 目前发现的HBV基因型可以分为A-H八种^[19-21], 并呈现一定的地理区域性分布特征. 在中国大陆地区, 主要为B和C基因型, 其中南方以B基因型为主, 北方以C基因型为主^[22]. 我们采用基因型特异多引物对巢式PCR法经过两次PCR扩增, 从PCR产物片段的大小直接判断HBV的基因型. 本研究共检测46例患者血清, 发现B基因型16例(34.78%), C基因型29例(63.04%), B+C基因型1例, 未检测出D, E, F, G基因型. 我们的结果与国内的相关报道有差异^[22], 可能与所选择患者的年龄多数在35岁以上有关.

不同基因型HBV对抗病毒药物的应答不一样, HBV基因型对拉米夫定抗病毒治疗的影响, 目前看法不一. 国内王永忠 *et al*通过对68例接受核苷类药物拉米夫定治疗的慢性乙肝患者的跟踪观察, 发现拉米夫定治疗后HBV C基因型感染者反弹比例明显低于B基因型感染者. 而香港Chan *et al*^[23]及Kao *et al*^[24]的研究均认为基

■应用要点
病毒变异导致的HBV DNA反弹的基因变异是多种形式的, 可以是单基因变异引起, 也可能是多个基因联合变异引起. 临床上在检测拉米夫定耐药变异时, 不能只单纯检测YMDD, 还应考虑检测其他基因变异(如BCP, PC区变异).

■同行评价

本文研究方法设计合理, 方法科学, 数据可信, 具有较强的参考价值.

因型对HBeAg血清转换无影响. Westland *et al*^[25]在adefovir dipivoxil III期临床试验的研究中认为HBV基因型并不影响阿得福韦的抗病毒疗效. 我们结果显示, 对照组B基因型构成比为31.58%(6/19), C基因型构成比为68.42%(13/19). 治疗组B基因型构成比为37.04%(10/27), C基因型构成比为59.26%(16/27). 两组患者B, C基因型的构成比较($P>0.05$). 我们认为感染B, C基因型的患者, 对用拉米夫定治疗后出现HBV DNA反弹无差别. 关于这一结果, 由于样本量不够大, 仍须扩大样本量进一步证实.

不同的基因型与某些变异相关, 如前C区1896变异是基因型依赖的. 在B, C, D和E型的G1896与T1858配对的干襟结构不稳定, 1896的G-A变异使干襟结构趋于稳定, 故前C终码变异率较高^[26]. 而A和F型的1858位核苷酸为C, 能与1896位核苷酸G形成稳定的结构, 较少发生变异^[27]. 所以, 前C区1896变异的流行率与基因型相关. 台湾学者^[28]通过对200例慢性乙肝及肝硬化患者的研究发现, C基因型BCP(T1762/A1764)变异率较高, 出现T1762/A1764变异的患者更易发展为肝硬化、HCC. Chan, Lindh, Orito, Kao *et al*^[29-32]的研究也认为BCP(T1762/A1764)变异C基因型较B基因型常见. 也有学者认为T1762/A1764变异伴随前C区变异常见于A基因型患者^[33]. Liu *et al*^[34]观察了45名慢性肝炎患者, 发现1858位核苷酸为C的基因型(A, F基因型)较1858位核苷酸为T的基因型(B, C, D, E基因型)更易出现BCP区变异. 也有人认为BCP变异在A, D基因型是相似的, 而前C区的变异常见于D基因型^[12]. 我们的研究结果显示, 与对照组比较, 治疗组PC(G1896A)及BCP(A1762T+G1764A)双变异的患者中B基因型的构成比增高, 分别为75%和50%; C基因型的构成比下降, 分别为25%和50%. 其中在BCP(A1762T+G1764A)变异患者中B, C基因型构成比与对照组比较有显性差异($P<0.05$), 即BCP(A1762T+G1764A)双变异在B基因型中常见.

拉米夫定治疗后HBV DNA反弹可能与BCP, PC变异有关, 而B基因型患者更易发生BCP变异.

4 参考文献

- Marques AR, Straus SE. Advances in the treatment of chronic hepatitis B virus infection. *Rev Med Virol* 1998; 8: 223-234
- Gust ID. Epidemiology of hepatitis B infection in

the Western Pacific and South East Asia. *Gut* 1996; 38 Suppl 2: S18-23

- Norder H, Courouce AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 1994; 198: 489-503
- 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学会. 病毒性肝炎的诊断标准. 中西医结合肝病杂志 2001; 11: 56-60
- Naito H, Hayashi S, Abe K. Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 362-364
- Liaw YF, Leung NW, Chang TT, Guan R, Tai DI, Ng KY, Chien RN, Dent J, Roman L, Edmundson S, Lai CL. Effects of extended lamivudine therapy in Asian patients with chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. *Gastroenterology* 2000; 119: 172-180
- Leung NW, Lai CL, Chang TT, Guan R, Lee CM, Ng KY, Lim SG, Wu PC, Dent JC, Edmundson S, Condreay LD, Chien RN. Extended lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B enhances hepatitis B e antigen seroconversion rates: results after 3 years of therapy. *Hepatology* 2001; 33: 1527-1532
- Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update of recommendations. *Hepatology* 2004; 39: 857-861
- Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, Schinazi RF. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology* 2001; 33: 751-757
- Laras A, Koskinas J, Hadziyannis SJ. In vivo suppression of precore mRNA synthesis is associated with mutations in the hepatitis B virus core promoter. *Virology* 2002; 295: 86-96
- Kim HJ, Yoo BC. The prevalence and clinical significance of precore and core promoter mutations in Korean patients with chronic hepatitis B virus infection. *Taehan Kan Hakhoe Chi* 2002; 8: 149-156
- Sendi H, Mehrab-Mohseni M, Zali MR, Norder H, Magnius LO. T1764G1766 core promoter double mutants are restricted to Hepatitis B virus strains with an A1757 and are common in genotype D. *J Gen Virol* 2005; 86: 2451-2458
- Chen CH, Lee CM, Lu SN, Changchien CS, Wang JC, Wang JH, Hung CH, Hu TH. Comparison of sequence changes of precore and core promoter regions in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients with and without HBeAg clearance in lamivudine therapy. *J Hepatol* 2006; 44: 76-82
- Tacke F, Gehrke C, Luedde T, Heim A, Manns MP, Trautwein C. Basal core promoter and precore mutations in the hepatitis B virus genome enhance replication efficacy of Lamivudine-resistant mutants. *J Virol* 2004; 78: 8524-8535
- Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey MJ, Makris A, Thomas HC. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 1989; 2: 588-591
- Kuwahara R, Kumashiro R, Murashima S, Ogata K, Tanaka K, Hisamochi A, Hino T, Ide T, Tanaka E, Koga Y, Sata M. Genetic heterogeneity of the precore and the core promoter region of genotype C

- hepatitis B virus during lamivudine therapy. *J Med Virol* 2004; 72: 26-34
- 17 Shin JW, Chung YH, Choi MH, Kim JA, Ryu SH, Jang MK, Kim IS, Park NH, Lee HC, Lee YS, Suh DJ. Precore stop codon mutation of hepatitis B virus is associated with low breakthrough rate following long-term lamivudine therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 844-849
- 18 Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 1988; 69 (Pt 10): 2575-2583
- 19 Norder H, Courouce AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 1994; 198: 489-503
- 20 Magnius LO, Norder H. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology* 1995; 38: 24-34
- 21 Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, Rossau R. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2000; 81: 67-74
- 22 吕志武, 许军, 殷积美, 许伟. 我国南北两城市乙型肝炎病毒血清型和基因型的调查研究. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 95
- 23 Chan HL, Wong ML, Hui AY, Chim AM, Tse AM, Hung LC, Chan FK, Sung JJ. Hepatitis B virus genotype has no impact on hepatitis B e antigen seroconversion after lamivudine treatment. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2695-2697
- 24 Kao JH, Liu CJ, Chen DS. Hepatitis B viral genotypes and lamivudine resistance. *J Hepatol* 2002; 36: 303-304
- 25 Westland C, Delaney W 4th, Yang H, Chen SS, Marcellin P, Hadziyannis S, Gish R, Fry J, Brosgart C, Gibbs C, Miller M, Xiong S. Hepatitis B virus genotypes and virologic response in 694 patients in phase III studies of adefovir dipivoxil. *Gastroenterology* 2003; 125: 107-116
- 26 Mayerat C, Mantegani A, Frei PC. Does hepatitis B virus(HBV)genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J Viral Hepat* 1999; 6: 299-304
- 27 Locarnini S. Molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis* 2004; 24 Suppl 1: 3-10
- 28 Kao JH. Hepatitis B virus genotypes and hepato-cellular carcinoma in Taiwan. *Intervirology* 2003; 46: 400-407
- 29 Chan HL, Hussain M, Lok AS. Different hepatitis B virus genotypes are associated with different mutations in the core promoter and precore regions during hepatitis B e antigen seroconversion. *Hepatology* 1999; 29: 976-984
- 30 Lindh M, Hannoun C, Dhillon AP, Norkrans G, Horal P. Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers. *J Infect Dis* 1999; 179: 775-782
- 31 Orito E, Mizokami M, Sakugawa H, Michitaka K, Ishikawa K, Ichida T, Okanoue T, Yotsuyanagi H, Iino S. A case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotypes B and C. Japan HBV Genotype Research Group. *Hepatology* 2001; 33: 218-223
- 32 Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *Gastroenterology* 2003; 124: 327-334
- 33 Hunt CM, McGill JM, Allen MI, Candrey LD. Clinical relevance of hepatitis B viral mutations. *Hepatology* 2000; 31: 1037-1044
- 34 Liu CJ, Kao JH, Lai MY, Chen PJ, Chen DS. Precore/core promoter mutations and genotypes of hepatitis B virus in chronic hepatitis B patients with fulminant or subfulminant hepatitis. *J Med Virol* 2004; 72: 545-550

编辑 孙学英 电编 马文华

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

• 消息 •

中国科技期刊引证报告(核心版)发布 WJG 2006 年影响因子 0.834

本刊讯 2006年*World Journal of Gastroenterology (WJG)*的总被引频次为3576, 位居全部1723种中国科技论文统计源期刊的第19位, 内科医学类28种期刊的第1位. 2006年*WJG*的影响因子为0.834, 内科医学类28种期刊的第7位. 即年指标0.134, 他引率0.77, 地区数26, 基金论文比0.40, 海外论文比0.78, 学科影响指标0.75. (总编辑: 马连生 2007-11-15)

遗传性胰腺炎胰蛋白酶原基因突变分析

刘奇才, 郜峰, 许幼仕, 王凤清, 潘云振, 欧启水

■背景资料

遗传性胰腺炎占胰腺炎的1%左右, 是常染色体显性遗传疾病, 有80%的表型外显率, 主要由胰蛋白酶原基因突变引起, 患者罹患胰腺癌的风险较正常人群高50多倍, 多伴有糖尿病。

刘奇才, 许幼仕, 王凤清, 潘云振, 欧启水, 福建医科大学附属第一医院检验科 福建省福州市 350005
郜峰, 福建医科大学附属第一医院病理科 福建省福州市 350005

刘奇才, 硕士研究生, 主要从事基因诊断的研究。

通讯作者: 欧启水, 350005, 福建省福州市茶中路20号, 福建医科大学附属第一医院检验科, lqc673@yahoo.com.cn
电话: 0591-87982327

收稿日期: 2007-06-07 修回日期: 2007-09-25

Mutations of the cationic trypsinogen gene in patients with hereditary pancreatitis

Qi-Cai Liu, Feng Gao, You-Shi Xu, Feng-Qing Wang, Yun-Zhen Pan, Qi-Shui Ou

Qi-Cai Liu, You-Shi Xu, Feng-Qing Wang, Yun-Zhen Pan, Qi-Shui Ou, Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China

Feng Gao, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China

Correspondence to: Dr. Qi-Shui Ou, Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, 20 Chazhong Road, Fuzhou 350005, Fujian Province, China. lqc673@yahoo.com.cn

Received: 2007-06-07 Revised: 2007-09-25

Abstract

AIM: To identify the mutation character of cationic trypsin gene (*PRSS1*) in the patients of hereditary pancreatitis (HP).

METHODS: Two Patients with hereditary pancreatitis, five exons of *PRSS1* gene were amplified by PCR and it's products were analyzed by sequencing, related clinical data were also collected.

RESULTS: Two patients of the HP families were found c.415 T > A mutation. It's members showed symptom about 16 years old.

CONCLUSION: *PRSS1* gene c.415 T > A mutation may be an factor associated with hereditary pancreatitis.

Key Words: Hereditary pancreatitis; Mutation of *PRSS1*; Characterization

Liu QC, Gao F, Xu YS, Wang FQ, Pan YZ, Ou QS.

Mutations in the cationic trypsinogen gene of patients with hereditary pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(33): 3514-3517

摘要

目的: 分析胰蛋白酶原基因(cationic trypsinogen, *PRSS1*)在遗传性胰腺炎(hereditary pancreatitis, HP)患者中突变的性质。

方法: 用基因产物直接测序法对1个遗传性胰腺炎家系中的胰腺炎患者(共有2例成员)的*PRSS1*基因5个外显子进行测序, 并分析其临床特征。

结果: 在2例胰腺炎患者中均出现了*PRSS1*基因3号外显子纯合子突变(c.415 T>A), 表达的氨基酸从胱氨酸(Cys)→丝氨酸(Ser), 平均发病年龄为16岁, 家系中胰腺炎患者的血清肿瘤标志物均正常。

结论: *PRSS1*基因3号外显子c.415 T>A突变与遗传性胰腺炎有关。

关键词: 遗传性胰腺炎; *PRSS1*基因突变; 临床特征

刘奇才, 郜峰, 许幼仕, 王凤清, 潘云振, 欧启水. 遗传性胰腺炎胰蛋白酶原基因突变分析. 世界华人消化杂志 2007;15(33): 3514-3517

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3514.asp>

0 引言

遗传性胰腺炎(hereditary pancreatitis, HP)是一种罕见的疾病, 约占胰腺炎总数的1%, 于1952年由Comfort和Stein-berg发现并确立的一种独立的疾病^[1-3]. HP是常染色体显性遗传疾病, 有80%的表型外显率, 见于不同人种, 男女发病几率相等. 目前没有证据表明其和特殊的HLA系耦联. HP患者有45%的机会可发展为胰腺癌. 两个独立的大型流行病学研究(国际遗传性胰腺炎研究小组和欧洲胰腺癌和遗传性胰腺炎登记处)发现HP发生胰腺癌的危险性增加了将近50-70倍^[4-8]. 近年来有关HP的相关研究已深入开展, 至今已经在60%-70%的家族中发现了胰蛋白酶原基因

(cationic trypsinogen gene, *PRSS1*)两个不同的突变即R122H和N29I^[1]。为了明确*PRSS1*基因在中国HP家系中的突变情况, 本研究对一个HP家系的胰腺炎患者进行*PRSS1*基因的5个外显子全长测序如下。

1 材料和方法

1.1 材料 家系2: 含3代14个成员(图1)。胰腺炎2例, 分别为III5、III6。先证者(III6), 女, 28岁, 14岁时胰腺炎第1次发病, 先后6次住院均确诊为胰腺炎。

1.2 方法 经同意后, 取家系中胰腺炎患者的外周血2 mL, EDTA抗凝, 用Wizard® Genomic DNA Purification Kit(promega公司)提取DNA, 按使用说明操作。应用Primer Express软件自行设计引物, 上游引物: 5'-ggctctgggtctctacactt-3'; 下游引物: 5'-gggtaggaggcttcacactt-3'(由上海生工生物技术公司合成), 该引物扩增产物长度为818 bp。PCR反应体积为50 μ L, 含50 ng样品DNA, 0.06 mol/L引物, 0.2 mmol/L dNTP, 10 $\times$ PCR缓冲液2.5 μ L, 2.0 mmol/L Mg²⁺, 1 U Taq酶(Promega公司)。在PE9700热循环仪上94 $^{\circ}$ C 60 s $\rightarrow$ 55 $^{\circ}$ C 60 s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 60 s, 循环35次, 72 $^{\circ}$ C延长7 min。琼脂糖凝胶电泳, 观察结果。PCR产物使用Tiangen公司胶回收试剂盒, 按使用说明操作, 回收产物。PCR产物直接测序由上海生工生物技术公司完成。另收集记录家系成员的其他临床一般资料(年龄、性别、发病年龄、病程、家族史、并发症以及治疗情况)。

2 结果

2.1 基因测序 胰腺炎患者III5、III6的*PRSS1*基因测序图与NCBI公布的标准序列比对可见3号外显子第415位碱基发生T $\rightarrow$ A突变(图2)

2.2 *PRSS1*基因Swiss-Model模拟的三维结构 家系中患者*PRSS1*基因突变后的胰蛋白酶原空间三维结构与国际上报道的R122H相似(图3)。

2.3 氨基酸序列和临床资料 遗传性胰腺炎患者*PRSS1*基因突变将引起的氨基酸序列改变如下: MNPLLILTFVAAALAAPFDDDDKIVGGYNC EENSVPYQVSLNSGYHFCGSLINEQWVV SAGHCYKSRIQVRLGEHNIEVLEGNEQFINA AKIIRHPQYDRKTLNNDIMLIKLSRAVINAR VSTISLPTAPPATGTK(C/S)LISGWGNTASSGA DYPDELQCLDAPVLSQAKCEASYPGKITSN MFCVGFLEGGKDSCQGDSGGPVVCNGQLQ

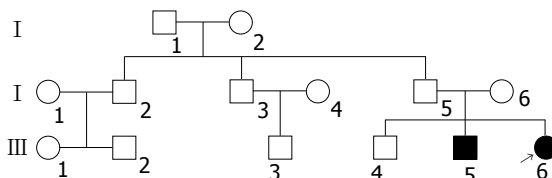


图1 胰腺炎患者家系图。↗: 先证者; ●: 胰腺炎患者; ○: 正常人。

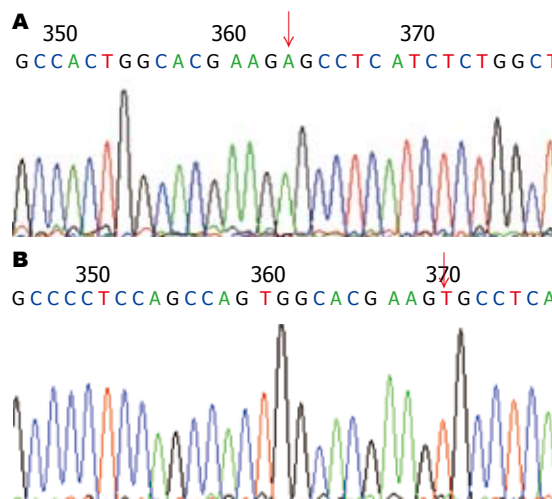


图2 家系2胰腺炎患者的*PRSS1*基因测序图。突变的结果: Cys139(胱氨酸) *PRSS1*wt 5'...G AAG TGC CTC...3', Ser139(丝氨酸) T $\rightarrow$ A 5'...G AAG AGC CTC...3'。A: 胰腺炎患者的正向测序图; B: 正常对照者的*PRSS1*基因测序图。

GVVSWGDGCAQKNKPGVYTKVYNYVKWI KNTIAANS。遗传性胰腺炎患者的血液生化改变情况见表1。

3 讨论

1996年Whitcomb *et al*^[9-13]在遗传性胰腺炎(hereditary pancreatitis, HP)患者中发现, 与之相关联的第7号染色体长臂(7q³⁵)上的胰蛋白酶原基因(cationic trypsinogen, *PRSS1*)发生突变与HP发病相关(阳离子胰蛋白酶原所起的作用是水解食物中含有赖-精氨酸残基的蛋白质, 同时他在激活/灭活其他消化酶的过程中起关键的作用), 对*PRSS1*基因的深入研究可为HP的分子病理学解析提供新线索。据报道HP发生胰腺癌的机率比正常人高53倍^[14-16]。至今已经在60%-70%的家族中发现了阳离子胰蛋白酶原基因常见的2种突变即R122H(密码子122, 外显子3, 精氨酸 $\rightarrow$ 组氨酸)和N29I(密码子29, 外显子2, 精氨酸 $\rightarrow$ 组氨酸)^[17-19]。其中, 以R122H最为常见。R122H突变可使蛋白质对胰蛋白酶的裂解呈抗性, 结果是蛋白质自我激活, 伴有蛋白水解酶胰蛋白酶在细胞内的不恰当积聚, 导致胰腺组织本身的消化^[6,20-23]。

■相关报道

1996年Whitcomb *et al*发现遗传性胰腺炎患者中, 与之相关联的第7号染色体长臂(7q³⁵)上的胰蛋白酶原基因发生突变与其发病相关(阳离子胰蛋白酶原所起的作用是水解食物中含有赖-精氨酸残基的蛋白质, 同时他在激活/灭活其他消化酶的过程中起着关键的作用), 对胰腺炎发病的分子病理学解析提供了新线索, 据报道HP发生胰腺癌的机率比正常人高出53倍。至今已经在60%-70%的家族中发现了阳离子胰蛋白酶原基因常见的2种突变即R122H(密码子122, 外显子3, 精氨酸 $\rightarrow$ 组氨酸)和N29I(密码子29, 外显子2, 精氨酸 $\rightarrow$ 组氨酸), 其中以R122H最为常见。

■创新盘点

在国内首次用分子生物学技术对胰蛋白酶原基因在中国遗传性胰腺炎家系中突变情况做详细的分析。

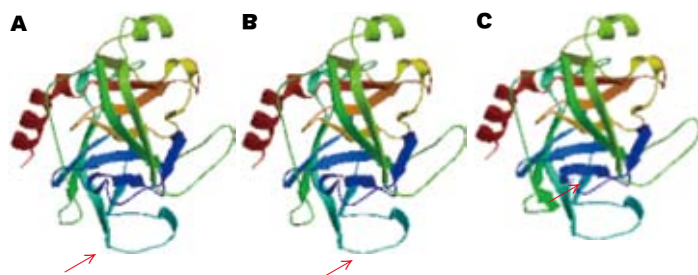


图3 基于Swiss-Model的胰蛋白酶原蛋白空间结构。A: T→A突变后的PRSS1胰蛋白酶原构像; B: R→C突变后的PRSS1胰蛋白酶原构像(国际上通常报道的R122H); C: 正常的PRSS1胰蛋白酶原构像。

表1 遗传性胰腺炎患者的血液生化改变情况

病例	空腹血糖 (mmol/L)	GHb (%)	乳酸 (mmol/L)	胰抑制素 C(mmol/L)	CA19-9 (mmol/L)
III5	5.32	3.69	3.22	1.06	15.3
III6	4.98	4.23	2.26	1.15	22.1
参考范围	3.89-6.11	3.8-5.8	1.0-2.1	0.34-1.70	0-27

我们通过分析遗传性胰腺炎家系发现他们具有以下特征: (1)呈常染色体显性遗传, 家系中均存在男女患者; (2)患者的肿瘤标志物水平不增高; (3)不表现出糖尿病症状。进一步分析家系的PRSS1基因突变情况发现家系胰蛋白酶原基因3号外显子415位碱基存在T→A纯合子突变, 表达的氨基酸从胱氨酸(Cys)→丝氨酸(Ser), 与国际上报道的R122H突变在同一外显子^[3,8]。三维构像与R122H相似, 突变改变识别位点, 不改变胰蛋白酶原的三级结构, 也不改变其催化活性; 在三维立体构像中的精氨酸位于胰蛋白酶催化活性部位及其抑制物结合位点的背面, 本家系发病年龄与参考文献[24-29]相当。另外, 本家系目前未发现糖尿病和胰腺癌患者, 可能与基因突变引起的临床表型不同有关, 我们将做进一步分析。

HP患者的PRSS1基因存在多种形式的突变, 且与临床表型相关, 对PRSS1基因的深入研究可为探讨胰腺炎的发病机制提供新的线索。

4 参考文献

- Applebaum-Shapiro SE, Finch R, Pfitzer RH, Hepp LA, Gates L, Amann S, Martin S, Ulrich CD 2nd, Whitcomb DC. Hereditary pancreatitis in North America: the Pittsburgh-Midwest Multi-Center Pancreatic Study Group Study. *Pancreatol* 2001; 1: 439-443
- Pandya A, Blanton SH, Landa B, Javaheri R, Melvin E, Nance WE, Markello T. Linkage studies in a large kindred with hereditary pancreatitis confirms mapping of the gene to a 16-cM region on 7q. *Genomics* 1996; 38: 227-230
- Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, Martin SP, Gates LK Jr, Amann ST, Toskes PP, Liddle R, McGrath

K, Uomo G, Post JC, Ehrlich GD. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet* 1996; 14: 141-145

- Creighton JE, Lyall R, Wilson DI, Curtis A, Charnley RM. Mutations of the cationic trypsinogen gene in patients with hereditary pancreatitis. *Br J Surg* 2000; 87: 170-175
- Yamamoto K, Mine T, Katagiri K, Suzuki N, Kawaoka T, Ueno T, Matsueda S, Yamada A, Itoh K, Yamana H, Oka M. Immunological evaluation of personalized peptide vaccination for patients with pancreatic cancer. *Oncol Rep* 2005; 13: 874-883
- Schneider A, Lamb J, Barmada MM, Cuneo A, Money ME, Whitcomb DC. Keratin 8 mutations are not associated with familial, sporadic and alcoholic pancreatitis in a population from the United States. *Pancreatol* 2006; 6: 103-108
- Howes N, Greenhalf W, Neoptolemos J. Screening for early pancreatic ductal adenocarcinoma in hereditary pancreatitis. *Med Clin North Am* 2000; 84: 719-738
- Ockenga J, Stuhmann M, Ballmann M, Teich N, Keim V, Dork T, Manns MP. Mutations of the cystic fibrosis gene, but not cationic trypsinogen gene, are associated with recurrent or chronic idiopathic pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 2061-2067
- Zhou GX, Huang JF, Zhang H, Chen JP. Diagnosis of pancreatic cancer by cytology and telomerase activity in exfoliated cells obtained by pancreatic duct brushing during endoscopy. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6: 308-311
- Liu QC, Cheng ZJ, Yang Y, Ou QS. A novel mutation of PRSS1 gene in a Chinese hereditary pancreatitis family. *Yi Chuan* 2007; 29: 1067-1070
- Whitcomb DC. Hereditary pancreatitis: new insights into acute and chronic pancreatitis. *Gut* 1999; 45: 317-322
- Sahin-Toth M, Toth M. Gain-of-function mutations associated with hereditary pancreatitis enhance autoactivation of human cationic trypsinogen. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 278: 286-289
- Le Bodic L, Schnee M, Georgelin T, Soulard F, Ferec C, Bignon JD, Sagniez M. An exceptional genealogy for hereditary chronic pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 1504-1510
- Lowenfels AB, Maisonneuve P, DiMaggio EP, Elitsur Y, Gates LK Jr, Perrault J, Whitcomb DC. Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 442-446
- Applebaum-Shapiro SE, Peters JA, O'Connell JA, Aston CE, Whitcomb DC. Motivations and concerns of patients with access to genetic testing for hereditary pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1610-1617
- Lee TY, Oh HC, Kim MH, Kwon S, Lee SS, Seo

■应用要点

由于胰蛋白酶原基因突变在本文中主要表现为纯合突变, 患者的症状不如文献报道的典型, 无糖尿病、胰腺癌倾向, 新发现的突变形式将对药物开发提供新的线索。

- DW, Lee SK. Three cases of hereditary pancreatitis in two households in the same family associated with R122H mutation in cationic trypsinogen gene. *Korean J Gastroenterol* 2007; 49: 395-399
- 17 Klein AP, de Andrade M, Hruban RH, Bondy M, Schwartz AG, Gallinger S, Lynch HT, Syngal S, Rabe KG, Goggins MG, Petersen GM. Linkage analysis of chromosome 4 in families with familial pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther* 2007; 6: 320-323
- 18 Archer H, Jura N, Keller J, Jacobson M, Bar-Sagi D. A mouse model of hereditary pancreatitis generated by transgenic expression of R122H trypsinogen. *Gastroenterology* 2006; 131: 1844-1855
- 19 Le Marechal C, Masson E, Chen JM, Morel F, Ruzsiewicz P, Levy P, Ferec C. Hereditary pancreatitis caused by triplication of the trypsinogen locus. *Nat Genet* 2006; 38: 1372-1374
- 20 Sahin-Toth M. Biochemical models of hereditary pancreatitis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2006; 35: 303-12
- 21 Vitone LJ, Greenhalf W, Howes NR, Neoptolemos JP. Hereditary pancreatitis and secondary screening for early pancreatic cancer. *Rocz Akad Med Bialymst* 2005; 50: 73-84
- 22 Khalid A, Finkelstein S, Thompson B, Kelly L, Hanck C, Godfrey TE, Whitcomb DC. A 93 year old man with the PRSS1 R122H mutation, low SPINK1 expression, and no pancreatitis: insights into phenotypic non-penetrance. *Gut* 2006; 55: 728-731
- 23 Keim V. Genetics of pancreatitis. *Scand J Surg* 2005; 94: 103-107
- 24 Pho-Iam T, Thongnoppakhun W, Yenchitsomanus PT, Limwongse C. A Thai family with hereditary pancreatitis and increased cancer risk due to a mutation in PRSS1 gene. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1634-1638
- 25 Kenesi E, Katona G, Szilagyi L. Structural and evolutionary consequences of unpaired cysteines in trypsinogen. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309: 749-754
- 26 Cheng ZJ, Yang B, Liu QC, Jiang L, Xie HH, Ou QS. Study on a new point mutation of nt7444 G-->A in the mitochondrial DNA in a type 2 diabetes mellitus family. *Yi Chuan* 2007; 29: 433-437
- 27 Keim V. Identification of patients with genetic risk factors of pancreatitis: impact on treatment and cancer prevention. *Dig Dis* 2003; 21: 346-350
- 28 Uygur-Bayramicli O, Dabak R, Orbay E, Dolapcioglu C, Sargin M, Kilicoglu G, Guleryuzlu Y, Mayadagli A. Type 2 diabetes mellitus and CA 19-9 levels. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5357-5359
- 29 Lee SE, Yang SH, Jang JY, Kim SW. Pancreatic fistula after pancreaticoduodenectomy: A comparison between the two pancreaticojejunostomy methods for approximating the pancreatic parenchyma to the jejunal seromuscular layer: Interrupted vs continuous stitches. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5351-5356

■同行评价
本文选题紧密结合临床, 方法先进, 结果可信, 图文并茂, 文笔流畅, 讨论客观. 对于丰富遗传性胰腺炎发病机制的认识, 具有重要的指导价值.

编辑 何燕 电编 郭海丽

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

• 消息 •

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.

北京地区消化性溃疡流行病学分析

成虹, 胡伏莲, 袁申元, 潘国宗

■背景资料

北京地区曾经于1977-1986年和1984-1993年进行过两次消化性溃疡(PU)流行病学调查, 幽门螺杆菌(*H pylori*)的发现彻底改变了人类对PU的认识, 但前两次PU流行病学调查均未涉及*H pylori*感染情况, 因此2000年中华医学会消化病学分会北京分会组织了第3次北京地区PU流行病学调查。研究结果显示PU的发病和复发均与*H pylori*感染相关, 但临床中存在*H pylori*检测假阴性情况, 本文对这种现象产生的原因和解决方法进行了详细的阐述, 以利于指导临床医生的工作。

成虹, 胡伏莲, 北京大学第一医院消化内科 北京市 100034
袁申元, 北京同仁医院消化内科 北京市 100730
潘国宗, 北京协和医院消化内科 北京市 100730
成虹, 2003年北京大学医学部硕士研究生毕业, 副主任医师, 主要从事幽门螺杆菌及其相关疾病的研究。
通讯作者: 胡伏莲, 100034, 北京市西城区西什库大街8号, 北京大学第一医院消化内科. hufli@263.net
电话: 010-66551122-2581 传真: 010-66555170
收稿日期: 2007-05-25 修回日期: 2007-10-24

Epidemiology of peptic ulcer in the Beijing area

Hong Cheng, Fu-Lian Hu, Shen-Yuan Yuan, Guo-Zong Pan

Hong Cheng, Fu-Lian Hu, Department of Gastroenterology, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China
Shen-Yuan Yuan, Department of Gastroenterology, Beijing Tongren Hospital, Beijing 100730, China
Guo-Zong Pan, Department of Gastroenterology, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China
Correspondence to: Fu-Lian Hu, Department of Gastroenterology, Peking University First Hospital, 8 Xishiku Street, Xicheng District, Beijing 100034, China. hufli@263.net
Received: 2007-05-25 Revised: 2007-10-24

Abstract

AIM: To investigate the epidemiological characteristics of peptic ulcer in the Beijing area and its relationship with *Helicobacter pylori*, and to provide a theoretical basis for the treatment and prevention of peptic ulcer.

METHODS: To analyze the clinical data for active or healing peptic ulcer, diagnosed by gastroscopy in 29 hospitals in the Beijing area in 1999. This was a retrospective study using a standard questionnaire. The following associations were analyzed: sex, age, blood type, occupation, living habits, drug use and *H pylori* status. The diagnosis of *H pylori* infection was reached by using one of the methods as follows: rapid urea test, pathology, ¹³C-urea breath test and culture.

RESULTS: The detection rate of peptic ulcer was 13.83% by endogastrosocopy in 58 546 patients. 3182 patients (2328 male, aged 17 - 86 years) were included in the final analysis. The ratio between duodenal and gastric ulcer was

2.81. The highest prevalence rate was in the 40-60 years group. The average age of patients with gastric ulcer was about 6.4 years higher than that of those with duodenal ulcer. Prevalence of peptic ulcer was significantly higher in patients with blood type O than in those with other blood types. Prevalence in smokers was significantly higher than that in non-smokers ($P = 0.012$). 1644 (54.9%) patients were found positive among the 2992 who were tested for *H pylori* infection in 1999. There was no significant difference in rate of *H pylori* infection among patients with different types of peptic ulcer ($P = 0.72$). 1660 (81.3%) patients were found positive among the 2042 patients who were tested for *H pylori* infection when they were first diagnosed with peptic ulcer. It was found that the recurrence of PU associated with *H pylori* infecting status and the selecting therapy, after the Logistic regression analysis.

CONCLUSION: Detection rate of peptic ulcer has decreased in the Beijing area. Detection of *H pylori* infection in patients diagnosed for the first time with peptic ulcer is very high, but detection was lower in patients diagnosed in 1999. Age, blood type O, smoking and *H pylori* infection are risk factors for peptic ulcer. Non-standard therapy and *H pylori* infection are associated with peptic ulcer recurrence.

Key Words: Peptic ulcer; Epidemiology; *Helicobacter pylori*

Cheng H, Hu FL, Yuan SY, Pan GZ. Epidemiology of peptic ulcer in the Beijing area. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(33): 3518-3523

摘要

目的: 了解北京地区消化性溃疡(pepticulcer, PU)的发病特点及变化情况, 以及幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)与PU的关系, 以便为PU的防治工作提供理论依据。

方法: 研究对象为1999-01-01/12-31在北京29家不同等级医院接受胃镜检查的患者。对其中经内镜下分期诊断为PU活动期及愈合期的患

者采用问卷方式进行调查, 调查内容主要包括PU患者的性别、年龄、血型、职业、生活习惯、服药情况以及*H pylori*感染情况. 快速尿素酶试验、病理染色、¹³C-尿素呼气试验和细菌培养检测*H pylori*感染, 其中任一项检测阳性判断为*H pylori*感染.

结果: 采用回顾性研究方法, 29家医院共有58546例北京地区患者接受了胃镜检查, PU检出率为13.83%. 本次调查总共回收调查表3182份, DU:GU为2.81:1. PU检出率以40-60岁患者中检出率(41.2%)最高, GU比DU者平均年龄大6.4岁. 不同血型构成比之间有显著性差异($P = 0.006$), 其中以O型血最多, 吸烟者明显高于非吸烟者($P = 0.012$). 在1999年有2992例PU患者接受了*H pylori*感染检测, 感染率为54.9%, 不同类型PU间*H pylori*感染率无显著性差异($P = 0.72$). 2042例患者在首次诊断PU时接受了*H pylori*感染检测, 其中1660例(81.3%)*H pylori*检测阳性. 经Logistic回归分析显示PU的复发主要与不规范治疗及*H pylori*感染密切相关.

结论: 北京地区PU检出率呈下降趋势, 患者首次诊断PU时*H pylori*感染率明显高于自然人群感染率, 但1999年度*H pylori*感染的检出率较低. 年龄、O型血、吸烟和*H pylori*感染是PU发病的危险因素, PU的复发主要与不规范治疗及*H pylori*感染密切相关.

关键词: 消化性溃疡; 流行病学; 幽门螺杆菌

成虹, 胡伏莲, 袁申元, 潘国宗. 北京地区消化性溃疡流行病学分析. 世界华人消化杂志 2007;15(33):3518-3523
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3518.asp>

0 引言

消化性溃疡(peptic ulcer, PU)是临床常见病和多发病, 全球有1/10的人口在一生中某一时间患过PU. 对北京地区曾经进行过两次PU流行病学调查, 1977-1986年和1984-1993年调查的PU检出率分别为19.95%^[1]和16.04%^[2], 但这2次流行病学调查均未了解PU患者幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, 下称*H pylori*)感染情况. 因此2000年中华医学会消化病学分会北京分会组织北京地区不同等级的29家医院进行了第3次PU流行病学调查, 以了解北京地区PU的发病特点、变化情况及其与*H pylori*感染的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 对北京地区不同等级的29家医院, 以1999-01-01/12-31接受胃镜检查的患者作为调查对象, 对内镜下确诊为活动期和愈合期的PU(不含瘢痕期及霜斑样溃疡)患者进行统一的规范化问卷调查, 外地来京就诊者除外.

1.2 方法 本文采用回顾性研究方法. 调查表由消化科及流行病学专家共同制定, 分为基本情况(姓名, 性别, 出生时间, 身高, 体质量, 血型, 文化程度, 工作性质, 吸烟, 饮酒等), 首次PU诊断情况(确诊时间, PU种类, 诊断方式, 伴有慢性胃炎、*H pylori*诊断及根治情况等), 家族史(患者父母的溃疡病史及肿瘤病史), 既往治疗情况(是否规范治疗, 使用药物, 疗程. 规范治疗定义: 质子泵抑制剂(PPI)治疗DU 2 wk, 治疗GU 4 wk; H₂受体拮抗剂治疗DU 4 wk, 治疗GU 6 wk), PU复发史(复发时间及次数, 诱因. PU复发以胃镜检查诊断PU复发, 或有典型PU症状持续1 wk, 服药后好转者判断为复发), PU与*H pylori*感染的关系(1999年胃镜诊断PU时*H pylori*感染情况, 治疗药物, 治疗效果), 目前PU状态(临床状态, 并发症, 合并症等)7类, 总共包括174项内容. 研究中*H pylori*感染诊断方法包括快速尿素酶试验、病理染色、尿素呼气试验和*H pylori*培养. 由于本文为回顾性研究, 因此对取材部位和检测方法没有统一规定. 上述任一项检测阳性判断为*H pylori*感染.

统计学处理 统计软件为SAS6.12软件包, 计量资料采用 t 检验, 计数资料采用 χ^2 检验, 多因素分析采用Logistic回归分析, $P < 0.05$ 认为存在统计学差异.

2 结果

2.1 PU检出率 1999-01-01/12-31参加研究的北京地区29家医院共进行胃镜检查64373例, 其中北京地区患者58546例, 检出北京地区PU 8097例, 检出率为13.83%. 本次调查总共回收调查表3182份, 其中3143例填写PU类型, 胃溃疡(GU)792例(25.2%), 十二指肠溃疡(DU)2222例(70.7%), 吻合口溃疡18例(0.6%), 复合溃疡111例(3.5%), DU:GU = 2.81:1.

2.2 PU发病相关因素 在3182例患者中男2328例, 女854例, 男:女为2.73:1($P = 0.084$, 表1). 调查年龄为17-86岁, 以40-60岁患者中检出率最高($P = 0.001$, 表1). GU中位年龄52.5岁, DU中位年龄46.1岁, GU比DU者平均年龄大6.4岁. 不同血型构成比之间有显著性差异($P = 0.006$, 表1),

■同行评价
本文选题实用, 内容丰富, 有一定的临床参考价值.

表 1 PU发病因素

		GU		DU		吻合口 溃疡	复合 溃疡	不详	合计	χ^2	<i>P</i>
		活动期	愈合期	活动期	愈合期						
性别	男	294	274	898	731	17	83	31	2328	9.695	0.084
	女	119	105	297	296	1	28	8	854		
年龄(岁)	<20	7	7	18	10	0	4	2	48	99.84	0.001
	20-40	144	123	252	185	9	32	30	775		
	40-60	168	146	484	450	7	49	6	1310		
	>60	94	103	441	382	2	26	1	1049		
血型	O	142	131	448	344	1	41	13	1120	39.13	0.006
	A	101	90	328	246	8	26	5	804		
	B	60	59	142	161	2	21	9	454		
	AB	87	76	180	198	4	18	9	572		
	不详	23	23	97	78	3	5	3	232		
工作性质	脑力	220	171	598	467	13	49	25	1543	10.67	0.384
	体力	157	159	516	425	4	43	9	1313		
	不详	36	49	81	135	1	19	5	326		
吸烟情况	不吸	207	175	561	497	8	56	0	1504	29.88	0.012
	吸烟	206	200	619	522	10	54	0	1611		
	不详	0	4	15	8	0	1	39	67		
饮酒情况	不饮	232	191	557	514	11	56	0	1561	23.65	0.540
	饮酒	180	185	555	501	7	55	0	1483		
	不详	1	3	83	12	0	0	39	138		

其中以O型血最多,吸烟者明显高于非吸烟者($P = 0.012$, 表1)。脑力劳动者和体力劳动者的PU检出率($P = 0.384$, 表1)以及饮酒者和非饮酒者的PU检出率($P = 0.54$, 表1)均无显著性差异。

2.3 *H pylori*感染检出率 在3182例中有2992例(94.0%)患者完成*H pylori*感染情况调查(指1999年胃镜诊断PU时),其中阳性1644例,阳性率为54.9%。GU患者*H pylori*感染检出率为53.9%,DU患者*H pylori*感染检出率为55.6%,复合溃疡患者*H pylori*感染检出率为53.9%,各型PU患者间*H pylori*感染的检出率无显著性差异($\chi^2 = 0.65$, $P = 0.72$)。在3182例中有3143例完成了首次诊断PU时*H pylori*感染情况调查,其中有2042例在首次诊断PU时进行了*H pylori*感染的检测,阳性1660例,阳性率81.3%,其中尿素酶阳性1132例,病理诊断阳性489例。 ^{13}C -尿素呼气试验阳性22例,*H pylori*培养阳性9例。

2.4 PU并发症发生情况 3182例中有3069例记录了PU并发症的发生情况,其中消化道出血613例(20.0%),PU穿孔22例(0.7%),消化道梗阻51例(1.7%)。

2.5 PU复发的相关因素 共有907例患者曾经有过1次及多次PU复发。采用单因素回归分析显示PU复发男性多于女性,年龄40-60岁间复发者

高于其他年龄组,脑力劳动者明显高于体力劳动者,而4种血型的患者间PU复发无明显差异(表2)。经调整性别、年龄、工作性质和血型后,采用Logistic回归分析,PU的复发与不规范治疗、*H pylori*感染及*H pylori*未根除有显著关系(表3)。

3 讨论

自1983年Warren和Marshall首次成功地从人类胃黏膜活检标本中分离培养出*H pylori*以来^[3],人类对上胃肠道疾病的认识和研究翻开了崭新的一页。*H pylori*的伟大发现使Warren和Marshall荣获了2005年度诺贝尔医学和生理学奖^[4]。PU是临床常见病和多发病,*H pylori*感染与PU的发病及复发密切相关。根除*H pylori*是治疗*H pylori*阳性PU最有效的治疗方法^[5],可以明显降低PU的复发率^[6-7]。随着人们对PU发病机制和治疗理念的更新及认识的加深,在很多地区PU的发病率已有下降趋势^[8-9]。Nervi *et al*^[10]在意大利的两个城市(Padova和Parma)分别进行了PU的流行病学调查,研究结果显示,与前*H pylori*时代相比,随着近10年的*H pylori*根除治疗的推广,两个城市PU发病率分别从12.7%和15.6%下降至6.3% ($P < 0.001$)和12% ($P < 0.001$)。Sonnenberg^[11-12]对欧洲以及欧洲以外的国家和

地区的PU死亡率分别进行了回顾性研究, 研究结果显示, 无论是在欧洲还是在欧洲以外的地区, 随着时间的迁移, PU死亡率均呈现出下降趋势, 而其中主要原因是由于 *H pylori* 的根除. 本次调查的29家医院在1999年1年内58 546例接受胃镜检查的北京地区患者中, PU的检出率为13.83%, 与北京地区既往的两次流行病学调查1977-1986年间和1984-1993年间调查的PU检出率19.95%^[1]和16.04%^[2]相比, 呈现出下降趋势. 近年来 *H pylori* 根除治疗在中国的普及可能是导致PU检出率降低的重要原因. 另外PU中, 以DU的发病为最常见, 而 *H pylori* 感染与DU的关系更为密切, 本次调查中, DU:GU为2.81:1, 而1984-1993年间的调查DU:GU为3.27:1^[2], 提示DU的发病率与GU相比下降更明显, 这也是临床对PU患者采用 *H pylori* 根除治疗方案后, PU检出率下降的原因之一.

本次调查表明, PU的复发与不规范治疗(如未使用抑酸剂治疗, 疗程不足等)、*H pylori* 感染与 *H pylori* 未根除有显著关系. 在本次调查的3182例患者中有2042例在首次诊断PU时进行了 *H pylori* 感染的检测, 阳性率81.3%, 与多数研究报道相近^[5,13]. 但在1999年度完成 *H pylori* 感染检测的2992例患者中, *H pylori* 的阳性率仅为54.9%. 关于 *H pylori* 感染的检出率在全球亦有逐年降低的趋势, 其重要原因是随着人们生活水平的提高, 卫生条件得以改善, 特别是近年来对 *H pylori* 防治工作的重视, 以致使 *H pylori* 感染的检出率呈现逐年下降趋势, 尤其是西方国家的检出率已经很低. 本次调查中1999年度 *H pylori* 感染的检出率低还考虑与以下因素有关: (1)患者在胃镜检查前服用过影响 *H pylori* 检查的药物, 如PPI、铋剂、抗生素等, 这些药物可抑制 *H pylori* 生长, 而导致假阴性的结果; 另外PPI可使胃内pH增高, 从而可能导致尿素酶活性降低, 使尿素酶依赖试验呈现假阴性结果^[14-15]. 1999年度完成 *H pylori* 感染检测的患者中包含了907例有PU复发史患者, 这些患者有可能在胃镜检查前已经自行服用过上述药物, 从而导致 *H pylori* 感染检出率的降低. (2)患者在检查前近期出现过上消化道出血, 导致尿素酶试验结果假阴性率增加^[16-18]. (3) *H pylori* 检查方法敏感性低, 在1999年时国内多数单位采用单一方法检测, 而其中以快速尿素酶试验应用最广, 该方法存在一定的假阴性情况^[19], 而且由于只能局部取材,

表 2 PU复发与相关单因素的Logistic分析

	相对危险	标准误	P	95%CI	
性别	0.9989	0.0002	0.001	0.9984	0.9993
年龄	0.9979	0.0004	0.001	0.9971	0.9987
工作性质	1.1907	0.0276	0.001	1.1378	1.2460
血型	1.0119	0.0102	0.242	0.9920	1.0321

表 3 调整性别、年龄、工作性质因素后PU复发的分析

	相对危险	标准误	P	95%CI	
不规范治疗	3.2783	0.3136	0.001	2.7178	3.9540
PPI治疗	0.9981	0.0027	0.472	0.9928	1.0030
H ₂ 受体拮抗剂	0.9890	0.0002	0.251	0.9714	1.0070
<i>H pylori</i> 感染	1.1755	0.0364	0.001	1.1063	1.2490
<i>H pylori</i> 治疗	1.1541	0.6446	0.001	1.0698	1.2450

不能反映全胃的情况, 也会导致假阴性率的增加. (4)非甾体类抗炎药(NSAIDs)相关性PU增加. NSAIDs和 *H pylori* 感染是PU的两个独立危险因素^[20-22], 随着NSAIDs在临床应用的增加, 其相关性PU发生率也在增加, 从而导致 *H pylori* 相关性PU检出率相对降低, 但本研究问卷中很遗憾未涉及患者NSAIDs服用情况, 这是本项研究中的一个缺陷.

在临床工作中为了提高 *H pylori* 感染检出率, 以改善PU治疗效果, 减少PU复发, 可考虑采取以下方法: (1)在胃镜检查前尽量避免让患者服用影响 *H pylori* 检查的药物. (2)当患者采用一种方法检测结果为阴性时, 在可能情况下争取采用多种方法进行检测, 如联合病理组织学染色、培养、¹³C/¹⁴C-尿素呼气试验^[23-24]或者 *H pylori* 粪便抗原检测^[25-27]等方法进行检测, 对于检测准确性高可确认 *H pylori* 现症感染的血清学检测方法, 也可用于 *H pylori* 现症感染的筛查^[28]. (3)对于 *H pylori* 检查阴性的患者, 在PU治疗结束停药后1 mo, 重复 *H pylori* 感染的相关检查, 以明确是否存在 *H pylori* 感染.

本次调查研究显示, 40-60岁之间的患者PU检出率最高, 男性患者高于女性患者, 吸烟者明显高于非吸烟者, O型血患者明显高于其他血型患者. 这些因素之间是否存在一定的关系, 比如男女性别差异是否与吸烟有关, 还有待于进一步研究. Borody *et al*^[29]随访根除 *H pylori* 的DU患者3年, 无论患者吸烟与否, 均未发现DU复

发. 而在不存在 *H pylori* 感染的情况下吸烟似乎并不足以成为一个独立致PU的危险因素^[30]. 但 Konturek *et al*^[31] 的研究显示 *H pylori* 感染、年龄、吸烟均在PU的发病中起重要作用. O型血患者PU发病率高可能与其容易感染 *H pylori* 有关. 有研究发现 *H pylori* 在胃型上皮特异定植是由于其黏附因子与胃上皮细胞特异结合. Lewisb血型抗原就是一种特异受体, 由于O型血者细胞表面表达更多的黏附受体, 从而导致O型血者更容易受 *H pylori* 感染^[32]. 另外, 本研究中PU并发症发生率分别为消化道出血20.0%, 穿孔0.7%, 梗阻51例1.7%. 与1984-1993年间北京地区第2次流行病学调查中消化道出血21.84%, 穿孔1.58%, 梗阻2.04%相比^[2], 均呈现下降趋势, 这可能与 *H pylori* 根除治疗的普及有关.

本研究结果显示, 北京地区PU的检出率及其并发症均呈下降趋势, *H pylori* 感染的检出率在患者首次诊断PU时明显高于自然人群, 而在1999年度的检出率则较低, 年龄、吸烟、O型血和 *H pylori* 感染是PU发病的危险因素. PU的复发与多种因素有关, 而其中与 *H pylori* 感染的关系尤为密切, PU的复发也与不规范治疗密切相关, 提示我们今后在PU的防治工作中应当注重 *H pylori* 感染的检测和根除, 使PU的治疗更加规范化.

致谢: 本研究由中华医学会消化病学分会北京分会组织进行, 参加单位: 北京大学第一医院, 北京同仁医院, 北京协和医院, 北京友谊医院, 北京天坛医院, 北京朝阳医院, 北京宣武医院, 中日友好医院, 复兴医院, 潞河医院, 海军总医院, 北京大学第三医院, 北京军区总医院, 铁路总医院, 解放军309医院, 解放军总医院, 海淀医院, 北京大学人民医院, 航天中心医院, 武警部队医院, 石景山医院, 佑安医院, 和平里医院, 煤炭总医院, 酒仙桥医院, 积水潭医院, 大兴区医院, 解放军306医院, 隆福医院.

4 参考文献

- 李益农, 徐肇敏, 林三仁, 夏琪. 消化性溃疡病的某些流行病学特点-北京地区22060例胃镜分析. 临床消化病杂志 1989; 1: 122-124
- 陆星华, 于中麟, 汪鸿志, 张齐联. 溃疡病的流行病学研究-北京地区358644例胃镜分析. 中华消化杂志 1996; 16: 152-154
- Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1: 1311-1315
- Hellstrom PM. This year's Nobel Prize to gastroenterology: Robin Warren and Barry Marshall

- awarded for their discovery of *Helicobacter pylori* as pathogen in the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3126-3127
- Ford AC, Delaney BC, Forman D, Moayyedi P. Eradication therapy for peptic ulcer disease in *Helicobacter pylori* positive patients. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; CD003840
- Miwa H, Sakaki N, Sugano K, Sekine H, Higuchi K, Uemura N, Kato M, Murakami K, Kato C, Shiotani A, Ohkusa T, Takagi A, Aoyama N, Haruma K, Okazaki K, Kusugami K, Suzuki M, Joh T, Azuma T, Yanaka A, Suzuki H, Hashimoto H, Kawai T, Sugiyama T. Recurrent peptic ulcers in patients following successful *Helicobacter pylori* eradication: a multicenter study of 4940 patients. *Helicobacter* 2004; 9: 9-16
- Arkkila PE, Seppala K, Kosunen TU, Sipponen P, Makinen J, Rautelin H, Farkkila M. *Helicobacter pylori* eradication as the sole treatment for gastric and duodenal ulcers. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 93-101
- Yuan Y, Padol IT, Hunt RH. Peptic ulcer disease today. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; 3: 80-89
- Xia B, Xia HH, Ma CW, Wong KW, Fung FM, Hui CK, Chan CK, Chan AO, Lai KC, Yuen MF, Wong BC. Trends in the prevalence of peptic ulcer disease and *Helicobacter pylori* infection in family physician-referred uninvestigated dyspeptic patients in Hong Kong. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 243-249
- Nervi G, Liatopoulou S, Cavallaro LG, Gnocchi A, Dal-Bo N, Rugge M, Iori V, Cavestro GM, Maino M, Colla G, Franze A, Di Mario F. Does *Helicobacter pylori* infection eradication modify peptic ulcer prevalence? A 10 years' endoscopic survey. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2398-2401
- Sonnenberg A. Time trends of ulcer mortality in Europe. *Gastroenterology* 2007; 132: 2320-2327
- Sonnenberg A. Time trends of ulcer mortality in non-European countries. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1101-1107
- Harris A, Misiewicz JJ. ABC of the upper gastrointestinal tract. Management of *Helicobacter pylori* infection. *BMJ* 2001; 323: 1047-1050
- Gatta L, Vakil N, Ricci C, Osborn JF, Tampieri A, Perna F, Miglioli M, Vaira D. Effect of proton pump inhibitors and antacid therapy on 13C urea breath tests and stool test for *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 823-829
- Mana F, Van Laere W, Bossuyt A, Urbain D. The early effect of proton pump inhibitor therapy on the accuracy of the 13C-urea breath test. *Dig Liver Dis* 2005; 37: 28-32
- Peitz U, Leodolter A, Wex T, Schutze D, Wolle K, Welte T, Gunther T, Schmidt U, Malfertheiner P. Diagnostics of *Helicobacter pylori* infection in patients with peptic ulcer bleeding. *Z Gastroenterol* 2004; 42: 141-146
- Schilling D, Demel A, Adamek HE, Nusse T, Weidmann E, Riemann JF. A negative rapid urease test is unreliable for exclusion of *Helicobacter pylori* infection during acute phase of ulcer bleeding. A prospective case control study. *Dig Liver Dis* 2003; 35: 217-221
- Stanciu C, Trifan A, Mihailovici S, Cojocariu C. Endoscopic diagnosis of *Helicobacter pylori* in patients with bleeding peptic ulcers. *Rev Med Chir*

- Soc Med Nat Iasi* 2007; 111: 57-64
- 19 Kato M, Shimizu Y, Kobayashi T, Komatsu Y, Takeda H, Sugiyama T, Asaka M. Rapid urease test. *Nippon Rinsho* 2003; 61: 72-78
- 20 Huang JQ, Sridhar S, Hunt RH. Role of Helicobacter pylori infection and non-steroidal anti-inflammatory drugs in peptic-ulcer disease: a meta-analysis. *Lancet* 2002; 359: 14-22
- 21 Salih BA, Abasiyanik MF, Bayyurt N, Sander E. H pylori infection and other risk factors associated with peptic ulcers in Turkish patients: a retrospective study. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3245-3248
- 22 Papatheodoridis GV, Sougioultzis S, Archimandritis AJ. Effects of Helicobacter pylori and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on peptic ulcer disease: a systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 130-142
- 23 Gisbert JP, Ducons J, Gomollon F, Dominguez-Munoz JE, Borda F, Mino G, Jimenez I, Vazquez MA, Santolaria S, Gallego S, Iglesias J, Pastor G, Hervas A, Pajares JM. Validation of the 13c-urea breath test for the initial diagnosis of helicobacter pylori infection and to confirm eradication after treatment. *Rev Esp Enferm Dig* 2003; 95: 121-126, 115-120
- 24 Cirak MY, Akyon Y, Megraud F. Diagnosis of Helicobacter pylori. *Helicobacter* 2007; 12 Suppl 1: 4-9
- 25 Cheng H, Hu FL. The value of Helicobacter pylori stool antigen ImmunoCard STAT in diagnosis of HP infection and assessing of eradication of HP. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2004; 84: 1166-1170
- 26 Gisbert JP, Pajares JM. Stool antigen test for the diagnosis of Helicobacter pylori infection: a systematic review. *Helicobacter* 2004; 9: 347-368
- 27 Perri F, Quitadamo M, Ricciardi R, Piepoli A, Cotugno R, Gentile A, Pilotto A, Andriulli A. Comparison of a monoclonal antigen stool test (Hp StAR) with the 13C-urea breath test in monitoring Helicobacter pylori eradication therapy. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5878-5881
- 28 Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, Hunt R, Rokkas T, Vakil N, Kuipers EJ. Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007; 56: 772-781
- 29 Borody TJ, George LL, Brandl S, Andrews P, Jankiewicz E, Ostapowicz N. Smoking does not contribute to duodenal ulcer relapse after Helicobacter pylori eradication. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 1390-1393
- 30 Blum AL. Helicobacter pylori and peptic ulcer disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1996; 214: 24-27; discussion 42-43
- 31 Konturek SJ, Bielanski W, Plonka M, Pawlik T, Pepera J, Konturek PC, Czarnecki J, Penar A, Jedrychowski W. Helicobacter pylori, non-steroidal anti-inflammatory drugs and smoking in risk pattern of gastroduodenal ulcers. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 923-930
- 32 Rothenbacher D, Weyermann M, Bode G, Kulaksiz M, Stahl B, Brenner H. Role of Lewis A and Lewis B blood group antigens in Helicobacter pylori infection. *Helicobacter* 2004; 9: 324-329

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

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

• 消息 •

中国学术期刊综合引证报告(2007)

本刊讯 根据《中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)》2006年从6500种统计刊源析出的290余万条中国期刊引文数据库及CNKI“中国期刊网”中心网站2006-01/12全文下载记录(2.1亿篇次)的大样本数据统计分析得到:世界华人消化杂志[标准刊号:ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R;类目名称:医药科学\临床科学\呼吸及消化系统疾病(YK5.2.3)]总被引频次为2611,影响因子为0.460,5年影响因子为0.482,即年指标为0.148,他引总引比为0.80,被引期刊数为585,被引半衰期为4.6,2006载文量为696,基金论文比为0.44,Web即年下载率为17.7.[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].

I κ B激酶家族新成员: IKK ϵ

曾 朋, 邓 欢, 刘 亮 明

■背景资料

I κ B激酶家族是NF- κ B信号途径最为重要的成员之一, IKKs是其最新成员. 最近证实IKK ϵ 还能通过亡蛋白抑制物调节caspases的活性, 加入caspases的凋亡和非凋亡依赖性信号途径.

曾朋, 武警江西省总队医院外一科 江西省南昌市 330001
邓欢, 刘亮明, 南昌大学第二附属医院消化内科 江西省南昌市 330006

国家自然科学基金资助项目, No. 30660066

通讯作者: 刘亮明, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化科. liuliangming@x263.net

电话: 0791-6801253

收稿日期: 2007-07-24 修回日期: 2007-10-25

New member of the I κ B kinases: IKK ϵ

Peng Zeng, Huan Deng, Liang-Ming Liu

Peng Zeng, First Department of Surgery, Jiangxi Provincial Corps Hospital, Chinese People's Armed Police Forces, Nanchang 330001, Jiangxi Province, China

Huan Deng, Liang-Ming Liu, Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30660066

Correspondence to: Liang-Ming Liu, Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital of Nanchang University, 1 Minde Road, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. liuliangming@x263.net

Received: 2007-07-24 Revised: 2007-10-25

Abstract

I κ B kinases (IKKs) are vital components of the nuclear factor- κ B signaling pathway, which play an important role in innate immune and inflammation responses. The newest member of the IKKs is IKK ϵ , which has similar functions to IKK α / β / γ and can act as a regulator of caspases by interacting with IAPs. Therefore, IKKs are a determinant of IAP level, and establish the threshold of activity required for the execution of non-apoptotic caspase functions.

Key Words: IKK ϵ ; caspase; Apoptosis

Zeng P, Deng H, Liu LM. New member of the I κ B kinases: IKK ϵ . *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(33): 3524-3526

摘要

I κ B激酶家族(I κ B kinases, IKKs)是NF- κ B信号途径最为重要的成员之一, 已发现其在先天性免疫以及炎症反应的调节中发挥关键作用.

除IKK α / β / γ 之外, 作为IKKs的最新成员, IKK ϵ 不仅具有与IKK α / β / γ 类似的作用, 而且最近的研究数据证实IKK ϵ 还能通过凋亡蛋白抑制物(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)调节caspases的活性, 参加caspases的凋亡和非凋亡依赖性信号途径.

关键词: IKK ϵ ; caspase; 凋亡

曾朋, 邓欢, 刘亮明. I κ B激酶家族新成员: IKK ϵ . *世界华人消化杂志* 2007;15(33): 3524-3526

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3524.asp>

0 引言

I κ B激酶家族(I κ B kinases, IKKs)作为NF- κ B信号途径的关键成员, 在先天性免疫以及炎症反应中发挥重要的作用. 之前发现的IKK家族成员能相互作用形成IKK α / β / γ 复合物. IKK α / β / γ 复合物能磷酸化I κ B上的特定位点, 从而使I κ B α 泛素化并最终被蛋白酶体降解, 解除I κ B对NF- κ B的抑制. 游离的NF- κ B从胞质转移入细胞核, 激活干扰素(IFN)的转录, 并出现后续的先天性免疫以及炎症反应. 但是随着IKK家族新成员IKK ϵ 的发现及其生物功能研究的不断深入, 对IKK家族作用的认识不再局限于NF- κ B信号途径.

1 IKK ϵ 在先天性免疫和炎症反应中的作用

Peters *et al*^[1]发现利用佛波酯(phorbol esters, PMA)处理的细胞内, 除IKK α / β / γ 复合物以外, 还存在另外一种I κ B激酶复合物. 这种复合物包含一种全新的I κ B激酶: IKK ϵ .

Peters *et al*通过对氨基酸序列的分析发现, IKK ϵ 与IKK α / β / γ 之间有非常高的同源性, 他们在N末端的相似位置都包含一个特殊的激酶功能结构域, 而在C末端则是一个螺旋-螺旋模体(motif). 研究同时还发现IKK ϵ 高表达于胸腺、脾、外周血白细胞以及富含活化T细胞的细胞群中. 这些研究结果都表明IKK ϵ 可能与IKK α / β / γ 具有类似的作用, 在细胞先天性免疫和炎症反应中都起重要的作用. 在之后的实验中得到进一步证

实, 功能结构域失活的突变型IKKε对于TNFα以及IL-1途径诱导的NF-κB活化影响甚小, 却能以浓度依赖的方式阻断PMA诱导的T细胞受体(T cell receptor, TCR)途径的T细胞活化^[1]. IKKα/β/γ可以磷酸化IκBα上的第32位丝氨酸(Serine 32, S32)和第36位丝氨酸(Serine 36, S36), 从而使IκBα泛素化. 重组的IKKε在体外实验中只能磷酸化S32, 而在利用PMA处理的Jurkat T细胞中却可以观察到S32/S36与IKKε抗体产生免疫共沉淀^[2]. 但其具体机制还不清楚, 可能是因为内源性的IKKε还能通过蛋白-蛋白方式直接或间接作用于IκBα S36.

目前对IKKε的功能了解较少, 特别是与他相互作用的上游信号分子. 最近, 4个独立的研究小组同时发现一种全新的细胞内信号蛋白: 线粒体抗病毒信号(mitochondrial antiviral signaling, MAVS)蛋白^[3]. MAVS通过C末端一个保守的疏水跨膜(transmembrane, TM)结构域定位于线粒体外膜, 这也是迄今发现的第一个参与细胞先天性免疫和炎症反应的线粒体蛋白. 进一步的研究发现IKKε可与MAVS一起定位于线粒体^[4], 表明MAVS与IKKε可能处于同一信号途径, 并且IKKε就是MAVS直接的下流效应物之一. 乙型肝炎病毒(HCV)的非结构(nonstructural, NS)蛋白NS3/4A也能与MAVS共同定位于线粒体外膜, 并利用自身蛋白激酶活性裂解TM结构域内的第508位半胱氨酸(Cys-508), 从而破坏MAVS的生物学功能以及MAVS与IKKε之间的相互作用, 最终入侵机体免疫系统^[5]. IKKε是HCV逃避细胞免疫的重要靶物之一, 也反映出IKKε在先天性免疫和炎症反应中的重要作用.

Kravchenko *et al*^[6]的实验结果还表明, IKKε可能是连接NF-κB信号途径与另外一条经典的先天免疫和炎症反应信号途径: C/EBP途径的关键枢纽. 在利用LPS处理的IKKε^{-/-}细胞中, C/EBPΔ的活化以及C/EBP的转录都显著降低. 同时, C/EBPβ/Δ还能直接与IKKε的启动子结合, 两者间存在精确的负反馈调节机制. 而在此前一直未发现NF-κB途径与C/EBP途径相关联的直接证据. IKKε的出现为先天免疫和炎症反应的研究指明了新的方向.

2 IKKε通过IAPs调节caspases功能

caspases是凋亡信号途径中最重要的蛋白之一, 为凋亡的最终执行者. caspases利用自身酶活性造成凋亡细胞功能和形态上的改变. 凋亡蛋

白抑制物(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)能通过BIR模序以及最新发现的RING模序与caspases结合, 同时利用RING模序结合E2泛素连接酶的特性, 直接使caspases泛素化, 并被蛋白酶体降解从而抑制细胞凋亡的发生, 调节细胞存亡的平衡^[7]. 最近, Kuranaga *et al*^[8]证实果蝇IKKε(*Drosophila* IKKε, DmIKKε)能够直接与果蝇IAP1(*Drosophila* IAP1, DIAP1)结合并使之磷酸化, 磷酸化的DIAP1失去了抑制caspases的能力, 促进了细胞凋亡. 这一发现的重要意义在于IKKε可能将成为细胞命运的另一个决策者. 但是, 只有当DmIKKε过表达的量达到一定的程度时才会出现促进凋亡的表型, 正常范围附近的波动不足以引起细胞活性明显的改变, 表明DmIKKε与DIAP1和caspases相关联的主要目的可能不是影响凋亡进程. 最新的研究发现, IAPs和caspases的功能并不仅仅局限于凋亡信号途径, 他们还具有调控细胞增殖、分化、形态发生等非凋亡依赖作用^[9-10]. 而Oshima *et al*^[11]发现DmIKKε可以通过抑制DIAP1来活化一种起始caspase(apical caspase): 含有补充结构域的果蝇caspase(recruitment domain-containing *Drosophila* caspase, DRONC). 一方面, DRONC可以通过活化Shaggy激酶的一个特定亚型, 参与果蝇感觉器官前体的分化; 另一方面, DRONC还能以间接的方式调节F肌动蛋白(F-actin)的装配, 从而发挥对细胞形态发生的影响. 实验观察到, 在DmIKKε过表达的果蝇细胞中, 气道系统结构出现明显紊乱; 而在表达功能结构域失活的突变型DmIKKε的细胞中, 肌动蛋白细胞骨架(actin cytoskeleton)的稳定性则明显增强. 这也进一步说明了虽然过度表达的DmIKKε可以通过抑制DIAP1从而增强效应caspases(effector caspases)的活性, 但其主要的正常生物学功能却是间接作用于类似DRONC的起始caspases, 来影响细胞正常形态的发生以及其他生理进程. 此外, 由于DIAP1非常不稳定, 体内的半衰期大约只有30 min, 因此DmIKKε可以通过控制DIAP1的数量来掌控caspases的活性水平和平衡caspases参与的非凋亡进程(图1).

3 结论

IKKε的发现对于研究IAPs和caspases在非凋亡依赖的正常细胞事件中有重要的作用, 同时他也是机体先天性免疫和炎症反应的重要组成环节. 虽然如此, 在IKKε的研究过程中仍然有许多

■研发前沿

目前对于IKKε的研究还处于起步阶段, 但IKKε被证实能与MAVS直接发生作用, 而MAVS是已发现的唯一能将线粒体与先天性免疫联系在一起的核蛋白. 目前最大的疑问在于哪些信号分子直接作用于IKKε的上游.

■应用要点

本文较为深入的总结并探讨了目前对于IκB激酶家族及其新成员IKKε的研究进展以及所存在的问题, 对于细胞凋亡和细胞先天性免疫的相关研究有较大的参考价值.

■同行评价

本文结构合理, 叙述流畅, 有一定的学术参考价值, 是一篇较好的综述类文章。

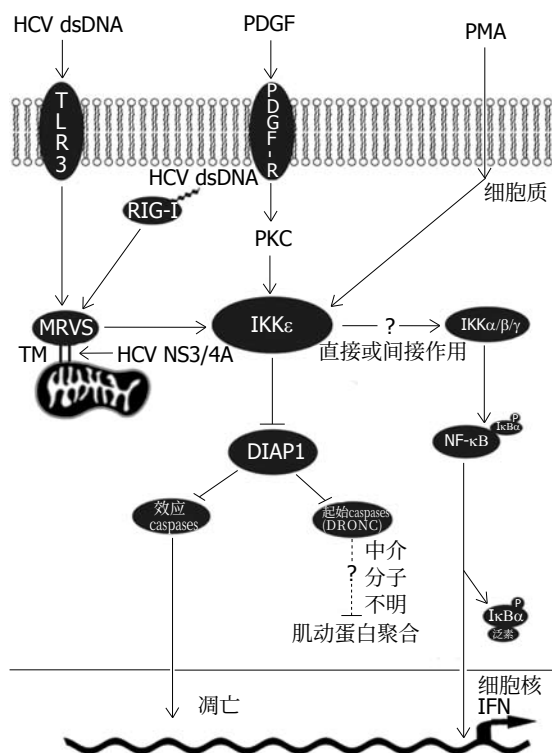


图1 IKKε活化途径图。

难题没有解决。是什么激活了IKKε? 这是目前最大的疑问。Tojima *et al*^[12]在HEK293细胞中发现, 血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)可以通过蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)激活IKKε。但除了MAVS与PKC外, 目前尚不清楚是否还有其他的活化途径。其次, 在caspases调控的非凋亡功能信号途径中, DRONC的直接下游靶物是什么? 目前只观察到DRONC可以间接作用于肌动蛋白, 但是与二者直接相互作用的中介信号分子仍不确定。随着研究的不断深入, IKKε的重要作用必将进一步显现, 这也为研究细胞先天性免疫和炎症反应机制以及caspases的功能开辟了全新的领域^[13]。

4 参考文献

- Peters RT, Liao SM, Maniatis T. IKKepsilon is part

of a novel PMA-inducible IkappaB kinase complex. *Mol Cell* 2000; 5: 513-522

- Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM, Maniatis T. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat. Immunol.* 2003; 4: 491-496
- Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 2005; 122: 669-682
- Lin R, Lacoste J, Nakhaei P, Sun Q, Yang L, Paz S, Wilkinson P, Julkunen I, Vitour D, Meurs E, Hiscott J. Dissociation of a MAVS/IPS-1/VISA/Cardif-IKKepsilon molecular complex from the mitochondrial outer membrane by hepatitis C virus NS3-4A proteolytic cleavage. *J Virol* 2006; 80: 6072-6083
- Li XD, Sun L, Seth RB, Pineda G, Chen ZJ. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 17717-17722
- Kravchenko VV, Mathison JC, Schwamborn K, Mercurio F, Ulevitch RJ. IKKi/IKKepsilon plays a key role in integrating signals induced by pro-inflammatory stimuli. *J Biol Chem* 2003; 278: 26612-26619
- Vaux DL, Silke J. IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 287-297
- Kuranaga E, Kanuka H, Tonoki A, Takemoto K, Tomioka T, Kobayashi M, Hayashi S, Miura M. Drosophila IKK-related kinase regulates nonapoptotic function of caspases via degradation of IAPs. *Cell* 2006; 126: 583-596
- Fernando P, Brunette S, Megeney LA. Neural stem cell differentiation is dependent upon endogenous caspase 3 activity. *FASEB J* 2005; 19: 1671-1673
- Schwerk C, Schulze-Osthoff K. Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 1453-1458
- Oshima K, Takeda M, Kuranaga E, Ueda R, Aigaki T, Miura M, Hayashi S. IKK epsilon regulates F actin assembly and interacts with Drosophila IAP1 in cellular morphogenesis. *Curr Biol* 2006; 16: 1531-1537
- Tojima Y, Fujimoto A, Delhase M, Chen Y, Hatakeyama S, Nakayama K, Kaneko Y, Nimura Y, Motoyama N, Ikeda K, Karin M, Nakanishi M. NAK is an IkappaB kinase-activating kinase. *Nature* 2000; 404: 778-782
- 邓欢, 刘亮明, 张吉翔, 罗杰, 尹东, 熊瑛, 汤蕾, 谢正元. 原癌基因pim-3的克隆及其对肝癌细胞凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2288-2293

编辑 程剑侠 电编 何基才

PPAR γ 表达上调体外抑制肝星状细胞的增殖

陈瑞, 杨胜兰

陈瑞, 杨胜兰, 华中科技大学附属协和医院中医科 湖北省武汉市 430022

通讯作者: 陈瑞, 430022, 湖北省武汉市汉口解放大道, 华中科技大学附属协和医院中医科. unioncr@hotmail.com

电话: 027-85726395 传真: 0411-83631284

收稿日期: 2007-03-19 修回日期: 2007-11-15

Inhibition of proliferation of hepatic stellate cells by up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ

Rui Chen, Sheng-Lan Yang

Rui Chen, Sheng-Lan Yang, Department of Chinese Traditional Medicine, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Correspondence to: Rui Chen, Department of Chinese Traditional Medicine, Huazhong University of Science and Technology, Jiefang Avenue, Wuhan 430022, Hubei Province, China. unioncr@hotmail.com

Received: 2007-03-19 Revised: 2007-11-15

Abstract

AIM: To evaluate the effect of up-regulated expression of peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR) γ on hepatic stellate cell (HSC) apoptosis and proliferation.

METHODS: The rat hepatic stellate cell line (HSC-T6) was cultured in DMEM, and treated with PPAR γ agonist 1, 2, 3 μ mol/L 15d-PGJ2 for 24 h. The proliferation rate for HSC-T6 cells was determined in 15d-PGJ2-treated and control groups by the MTT colorimetric assay. The cell cycle and apoptosis ratio were measured by flow cytometry.

RESULTS: The expression of PPAR γ mRNA in HSC-T6 cells treated with 1, 2, 3 μ mol/L 15d-PGJ2 was increased (0.513 ± 0.031 , 0.697 ± 0.018 , 0.674 ± 0.032 vs 0.198 ± 0.021), and the proliferation of HSC-T6 cells was significantly inhibited by 15d-PGJ2, especially at a concentration of 2 μ mol/L ($54.6\% \pm 11.1\%$). In addition, flow cytometry suggested that the apoptosis was significantly increased in HSC-T6 cells treated with 15d-PGJ2.

CONCLUSION: Up-regulated expression of PPAR γ can inhibit proliferation and induce apoptosis of HSC cells.

Key Words: Peroxisome proliferator-activated receptor γ ; Hepatic stellate cell; Apoptosis; Flow cytometry

Chen R, Yang SL. Inhibition of proliferation of hepatic stellate cells by up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ . Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(33): 3527-3530

摘要

目的: 观察过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)表达上调对肝星状细胞增殖及凋亡的影响。

方法: 体外培养HSC-T6细胞, 取对数生长期的细胞, 应用1, 2, 3 μ mol/L不同浓度的PPAR γ 激动剂15d-PGJ2作用24 h. 同时以不加药物只加无血清培养基作为对照组, 24 h后应用RT-PCR的方法观察分析各组间肝星状细胞PPAR γ mRNA表达的变化, MTT检测HSC增殖, 流式细胞仪分析HSC-T6细胞凋亡。

结果: 经1, 2, 3 μ mol/L 15d-PGJ2处理的HSC-6细胞中PPAR γ mRNA表达比例上调(0.513 ± 0.031 , 0.697 ± 0.018 , 0.674 ± 0.032 vs 0.198 ± 0.021)。MTT结果显示不同浓度的15d-PGJ2对HSC-T6细胞的增殖均有抑制作用, 以2 μ mol/L组最为显著($54.6\% \pm 11.1\%$)。流式细胞仪结果显示15d-PGJ2处理组凋亡细胞数明显增多。

结论: PPAR γ 表达上调能够抑制HSC-T6增殖并诱导其凋亡。

关键词: 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ; 肝星状细胞; 凋亡; 流式细胞仪

陈瑞, 杨胜兰. PPAR γ 表达上调体外抑制肝星状细胞的增殖. 世界华人消化杂志 2007;15(33): 3527-3530
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3527.asp>

■背景资料

肝星状细胞的激活、增殖及细胞外基质的沉积是肝纤维化的重要环节。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)属核激素受体超家族成员之一, 是配体依赖性激活的核转录因子。目前已知PPAR γ 存在多种配体及激活物, 参与细胞增殖以及脂质代谢、免疫炎症因子激活等生理调控机制。

■相关报道

有报道肝纤维化组织中PPAR γ 表达明显下调,与纤维化程度存在某种相关关系。越来越多证据表明PPAR γ 在肝脏代谢功能方面发挥重要调节作用,其功能改变与一些肝脏疾病的发生发展显示有某种相关性。

0 引言

肝纤维化是各种原因引起的慢性肝损伤所共有的病理过程。肝星状细胞的激活、增殖及细胞外基质的沉积是肝纤维化的重要环节。近年有学者观察到肝纤维化组织中PPAR γ 表达明显下调,与纤维化程度存在某种相关关系^[1]。目前已知PPAR γ 存在多种配体及激活物,大致可分为合成型配体和天然型配体两大类。PPAR γ 的天然配体多为前列腺素代谢产物,如PGD₂, PGJ₂, 15-deDxy-D12.14-PGJ₂等。另外,不饱和脂肪酸、氧化低密度脂蛋白也可以作为PPAR γ 的天然配体,发挥他们的生理作用^[2]。我们通过PPAR γ 的激动剂15d-PGJ₂上调PPAR γ 表达观察其对HSC增殖凋亡的影响,旨在探讨其对HSC增殖凋亡的调节机制,为将来指导抗肝纤维化治疗提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料 大鼠肝星状细胞株HSC-T6购自上海中医药大学肝病研究所。PPAR γ 的激动剂15d-PGJ₂为美国Caymen公司产品,购自晶美公司,溶于二甲基亚砜,并充入氮气于-20℃保存。其余分生试剂均为Promega公司产品。大鼠肝星状细胞株HSC-T6生长于体积分数为100 mL/L小牛血清及1×10⁵ U/L青霉素、100 mg/L链霉素的DMEM培养液中,在37℃, 50 mL/L CO₂、水饱和蒸汽的条件下进行培养。分为对照组、15d-PGJ₂处理组。处理组加入浓度分别为1, 2, 3 μmol/L 15d-PGJ₂,以不加药物而加等体积的无血清培养基为对照组。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR检测PPAR γ mRNA的表达: 各取1×10⁶细胞,按TRIzol试剂盒说明书用一步法提取总RNA,测定RNA的浓度及纯度。逆转录反应条件参照试剂盒说明,将逆转录产物5 μL加入PCR反应液中,PCR反应液如下: 10×buffer 5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 3 μL,目的引物各2 μL, 10 mmol/L dNTP 1 μL,用无菌水补足20 μL体积。PCR反应条件为95℃变性5 min后,按95℃ 1 min变性,55℃ 1 min退火,72℃ 2 min延伸3步组成的32个循环,最后72℃延伸10 min,反应物经凝胶电泳检测。PPAR γ 的引物序列为上游引物: 5'-TGATATCG CCACTGGAACC-3',下游引物: 5'-GTCCTCTC AGCTGTTTCGCCA-3', β-actin 上游引物: 5'-AT CATGTTTGAGACCTTTCAACA-3',下游引物: 5'-CACCTCTTTGCTCCGAAGTCCAA-3'。PCR反

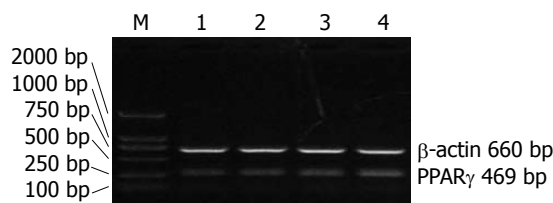


图1 RT-PCR检测HSC-T6中PPAR γ mRNA的表达。M: marker; 1: 对照组; 2-4: 1, 2, 3 μmol/L 15d-PGJ₂。

应产物10 μL凝胶电泳显像,应用美国UVP公司的凝胶成像系统(GDAS-1200)行荧光灰度分析,用β-actin作内参,进行半定量分析。

1.2.2 MTT法检测细胞增殖: MTT试剂用PBS配成5 g/L的溶液,过滤除菌备用。取对数生长期的HSC-T6细胞,用0.1 g/L EDTA消化后制成5×10⁸/L的细胞悬液,以每孔200 μL接种于96孔平底培养板上,置于37℃、50 mL/L CO₂及饱和湿度的培养箱中,24 h后加入不同浓度的15d-PGJ₂。以不加药物而加等体积的无血清培养基为空白对照组。每组设3个复孔,分别于24, 48, 72 h时每孔加入5 g/L的MTT 10 μL,并于37℃温育4 h后小心吸弃上清,每孔加入10% DMSO 100 μL充分混匀,用TRCAN酶标仪(American research公司产品)于570 nm处测吸光度值A值,以3个复孔的平均A值为相应的A值。抑制率(%) = (空白孔平均A值-加药组平均A值)/空白孔平均A值×100%。

1.2.3 流式细胞仪检测15d-PGJ₂对HSC-T6细胞凋亡的影响: 取对数生长期细胞,加入不同浓度的15d-PGJ₂。以仅加入等体积的无血清培养基作为对照组。作用48 h,分别收集各组细胞。每组设立3份标本重复,具体实验步骤如下。配置PI染液,浓度为100 mg/L,加入RNase100 mg/L,4℃避光保存,收集各组细胞2×10⁶/L, 500-1000 r/min, 5 min去上清,磷酸盐缓冲液(PBS)3 mL洗涤1次,将细胞团缓慢加入700 mL/L乙醇固定4 h, PBS洗去固定液,400目筛网过滤,500-1000 r/min离心5 min去上清,加入碘化丙啶(PI)染液混匀,4℃避光作用30 min,用FACS400型流式细胞仪进行检测,观察细胞凋亡情况。

2 结果

2.1 HSC-T6中PPAR γ mRNA的表达 对照组及不同浓度15d-PGJ₂作用组细胞中均有PPAR γ mRNA的表达。随着15d-PGJ₂作用浓度的增加,PPAR γ mRNA表达增强,A值分别为0.513±0.031, 0.697±0.018, 0.674±0.032。且同对照组(A值为0.198±0.021)相比,经方差分析检验,

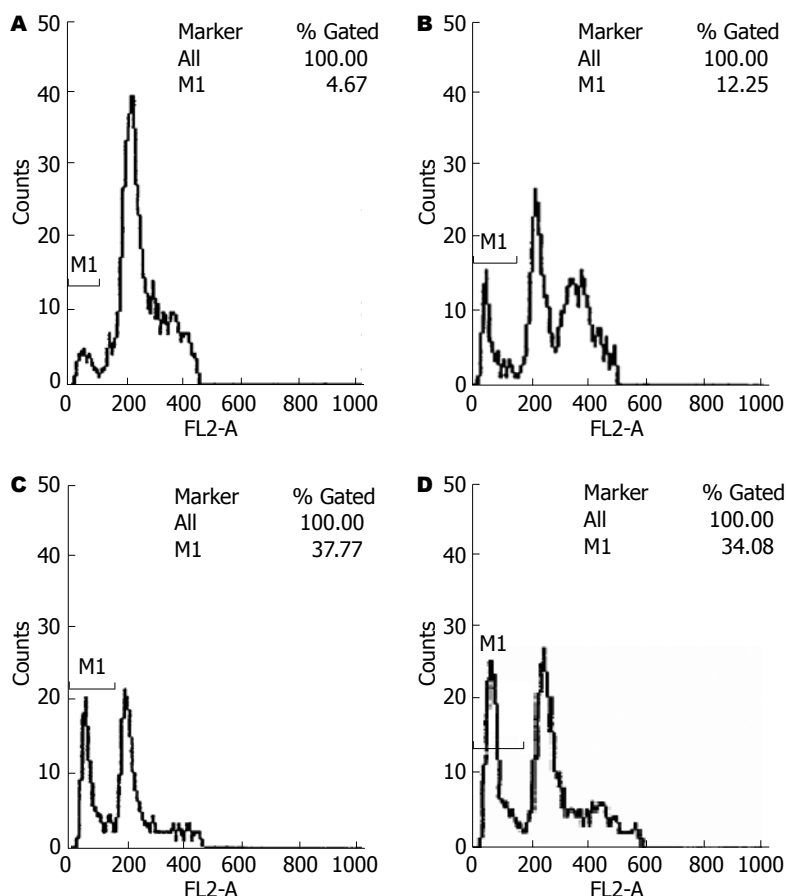


图 2 流式细胞仪检测15d-PGJ2对HSC-T6细胞凋亡的影响. A: 对照组; B-D: 1, 2, 3 $\mu\text{mol/L}$ 15d-PGJ2处理组.

■应用要点
本文通过PPAR γ 的激动剂15d-PGJ2上调PPAR γ 表达观察对HSC增殖凋亡的影响, 旨在探讨对HSC增殖凋亡的调节机制, 为将来指导抗肝纤维化治疗提供实验基础.

表 1 MTT法检测15d-PGJ2对HSC-T6增殖的抑制作用 (mean $\pm$ SD, %)

t/h	15d-PGJ2处理组($\mu\text{mol/L}$)		
	1	2	3
24	8.7 $\pm$ 1.7	15.4 $\pm$ 6.2 ^a	17.6 $\pm$ 3.1 ^a
48	24.3 $\pm$ 8.3	54.6 $\pm$ 11.1 ^a	57.2 $\pm$ 16.8 ^a
72	21.5 $\pm$ 6.7	50.2 $\pm$ 10.5 ^a	51.6 $\pm$ 13.2 ^a

^a $P < 0.05$ vs 1 $\mu\text{mol/L}$ 15d-PGJ2处理组.

差异性有显著性意义(图1).

2.2 15d-PGJ2对HSC-T6细胞增殖的影响 48 h时1, 2, 3 $\mu\text{mol/L}$ 15d-PGJ2对HSC-T6细胞增殖的抑制率分别为24.3% $\pm$ 8.3%, 54.6% $\pm$ 11.1%, 57.2% $\pm$ 16.8%. 2 $\mu\text{mol/L}$ 15d-PGJ2的浓度即出现较明显的抑制作用. 与3 $\mu\text{mol/L}$ 15d-PGJ2相比, 其抑制率并没有显著性差异($P > 0.05$), 表明剂量加大并不能明显增加抑制作用. 同时观察到抑制率也呈现出一定的时间依赖性, 15d-PGJ2处理组细胞在24 h后增殖速度即开始减缓, 48 h抑制率达高峰(表1).

2.3 15d-PGJ2对HSC-T6细胞凋亡的影响 15d-PGJ2处理组细胞在G1峰左侧均有一凋亡峰, 分别有12.32% $\pm$ 1.24%, 30.74% $\pm$ 6.09%, 30.56% $\pm$

5.44%的细胞凋亡. 而对照组细胞此凋亡峰不明显, 仅有3.36% $\pm$ 1.87%的细胞产生凋亡, 差异有显著性意义($P < 0.05$, 图2).

3 讨论

细胞凋亡是机体内细胞生理性的调节机制, 通过凋亡清除多余和有害的细胞, 与细胞分裂增殖一起调控组织器官的细胞数目, 保证机体的正常发育. 研究发现, 在肝纤维化进展过程中HSC有丝分裂及凋亡均增加, 但以增殖为主. 而在逆转阶段凋亡占优势, 使HSC失去净增加, HSC凋亡与转化激活状态密切相关. 对这一过程的调控机制尚无一致的定论^[3]. 近年来对肝纤维化形成的机制的研究取得了令人鼓舞的进展. 越来越多的临床及实验证据表明, 肝纤维化是可逆转的病变, 这一观点逐渐被广泛接受. 肝星状细胞的激活是肝纤维化形成的中心环节, HSC在肝纤维化逆转过程中的作用亦成为研究的热点. HSC激活后大量增殖, 并可以自分泌的方式维持这种增殖与活化的持续. 那么, 活化的HSC命运如何, 是否从激活状态转变为静止的状态? 是否通过死亡或凋亡的方式减少数量, 从而使肝纤维化逐渐被吸收, 病理过程发生逆转? 这些

问题一直是目前研究的关注焦点之一. 有学者认为, 肝纤维化逆转时HSC的减少是由于激活状态的HSC转化为静止状态^[3]. 但最新研究表明, 肝纤维化恢复期, 激活状态的HSC主要是通过凋亡机制, 而不是表型的转化^[4]. 了解HSC凋亡的机制, 并通过一定方式诱导活化的HSC凋亡, 在肝纤维化发生机制与治疗中具有重要意义.

已知PPAR γ 在脂肪组织中高表达, 主要参与脂质代谢. 近来发现PPAR γ 在多种组织中都有表达, 不仅参与炎症过程, 还可调节细胞增殖分化, 在肿瘤细胞的凋亡机制中亦发挥一定作用. 我们利用配体激动剂15d-PGJ2上调HSC中PPAR γ 的表达, 发现随着PPAR γ 的表达上调, HSC细胞增殖速度减慢, PPAR γ 对HSC的增殖速度影响有一定的剂量依赖和时间依赖性, 在2 $\mu\text{mol/L}$ 15d-PGJ2浓度下即可发挥最大抑制效应. 抑制作用发挥亦有一定的时间限制性, 在48 h时抑制作用最为显著. 研究表明, 在持续纤维化肝损伤过程中HSC有丝分裂及凋亡均增加, 但增殖占优势, 故而使纤维化程度不断加剧. 而在肝纤维化逆转阶段, HSC凋亡占优势, 活化HSC绝对数量减少, 故而诱导HSC凋亡成为抗肝纤维化治疗的一种新策略^[5]. 目前关于HSC凋亡机制尚未完全清楚. TNF- α , 胰岛素样生长因子-1, TGF- β 等多种细胞因子都参与此过程^[6]. 有学者发现Fas途径可诱导体外培养的HSC凋亡, 也有学者认为, 随着HSC的激活进程P53基因不断增加, 可能参与HSC的凋亡过程^[7-8]. 除了上述凋亡调节基因的作用外, TNF- α 对激活的HSC可产生凋亡诱导作用, 此作用可被转录因子NF κ B所阻断^[9]. 我们采用流式细胞仪的方法, 针对PPAR γ 表达上调后是否诱

导HSC凋亡进行了进一步的研究. 结果表明随着PPAR γ 表达的上调, HSC凋亡率逐渐增加, 表明PPAR γ 一方面抑制HSC增殖; 另一方面诱导其凋亡, 从而发挥抗纤维化的作用. 这就为我们进一步进行抗纤维化治疗提供了新的切入点.

4 参考文献

- 1 Mann DA, Smart DE. Transcriptional regulation of hepatic stellate cell activation. *Gut* 2002; 50: 891-896
- 2 Spiegelman BM. PPAR- γ : adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 1998; 47: 507-514
- 3 Gong W, Pecci A, Roth S, Lahme B, Beato M, Gressner AM. Transformation-dependent susceptibility of rat hepatic stellate cells to apoptosis induced by soluble Fas ligand. *Hepatology* 1998; 28: 492-502
- 4 Di Sario A, Bendia E, Svegliati Baroni G, Ridolfi F, Casini A, Ceni E, Saccomanno S, Marziani M, Trozzi L, Sterpetti P, Taffetani S, Benedetti A. Effect of pirfenidone on rat hepatic stellate cell proliferation and collagen production. *J Hepatol* 2002; 37: 584-591
- 5 Lang A, Schoonhoven R, Tuvia S, Brenner DA, Rippe RA. Nuclear factor kappaB in proliferation, activation, and apoptosis in rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2000; 33: 49-58
- 6 Lang A, Brenner DA. Gene regulation in hepatic stellate cell. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999; 31: 173-179
- 7 Gong W, Pecci A, Roth S, Lahme B, Beato M, Gressner AM. Transformation-dependent susceptibility of rat hepatic stellate cells to apoptosis induced by soluble Fas ligand. *Hepatology* 1998; 28: 492-502
- 8 Saile B, Knittel T, Matthes N, Schott P, Ramadori G. CD95/CD95L-mediated apoptosis of the hepatic stellate cell. A mechanism terminating uncontrolled hepatic stellate cell proliferation during hepatic tissue repair. *Am J Pathol* 1997; 151: 1265-1272
- 9 Hellerbrand C, Jobin C, Iimuro Y, Licato L, Sartor RB, Brenner DA. Inhibition of NF κ B in activated rat hepatic stellate cells by proteasome inhibitors and an IkappaB super-repressor. *Hepatology* 1998; 27: 1285-1295

编辑 何燕 电编 李海寅

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

• 消息 •

中国科技期刊引证报告(核心版)发布 世界华人消化杂志 2006 年影响因子 0.373

本刊讯 2006年世界华人消化杂志的总被引频次为1855, 位居全部1723种中国科技论文统计源期刊的第104位, 内科医学类28种期刊的第7位. 2006年世界华人消化杂志的影响因子为0.373, 内科医学类28种期刊的第21位. 即年指标0.134, 他引率0.71, 地区数27, 基金论文比0.42, 海外论文比0.02, 学科影响指标 0.50. (总编辑: 马连生 2007-11-15)

利胆化瘀片的利胆消炎作用

杨琼, 陆付耳, 徐丽君, 高志强, 王开富

杨琼, 陆付耳, 徐丽君, 高志强, 王开富, 华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合研究所 湖北省武汉市 430030
武汉市技术创新与产业化重大专项攻关课题资助项目, No. 2002600513415

通讯作者: 陆付耳, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合研究所.

felu@tjh.tjmu.edu.cn

电话: 027-83663237

收稿日期: 2007-05-11 修回日期: 2007-10-08

Cholagogic and anti-inflammatory effects of Lidan Huayu tablets

Qiong Yang, Fu-Er Lu, Li-Jun Xu, Zhi-Qiang Gao, Kai-Fu Wang

Qiong Yang, Fu-Er Lu, Li-Jun Xu, Zhi-Qiang Gao, Kai-Fu Wang, Institute of Integrative Traditional Chinese and Western Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Supported by: the Key Research Projects of Wuhan Municipal Technical Innovation and Industrialization, No. 2002600513415

Correspondence to: Dr. Fu-Er Lu, Institute of Integrative Traditional Chinese and Western Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, 1095 Jiefang Avenue, Wuhan 430030, Hubei Province, China. felu@tjh.tjmu.edu.cn

Received: 2007-05-11 Revised: 2007-10-08

Abstract

AIM: To observe the cholagogic and anti-inflammatory effects of Lidan Huayu tablets in experimental animals.

METHODS: Murine bile output was measured to observe the effects of Lidan Huayu tablets on bile secretion and the composition or ratio of bilirubin and bile acids. Ursodeoxycholic acid was used as a positive control. The anti-inflammatory action of Lidan Huayu tablets was observed in a model of xylene-induced auricular swelling and acetic-acid-induced celiac microcapillary permeability in mice. Aspirin was used as a positive control.

RESULTS: Compared with the normal saline group, the bile secretory volume in the Lidan Huayu tablet treatment group increased signifi-

cantly in healthy rats in a dose-dependent manner, and this facilitating effect on bile excretion remained for > 3 h. The output of total bilirubin and bile acids was elevated. Xylene-induced auricular swelling and body twisting response to acetic acid were significantly reduced in mice treated with Lidan Huayu tablets.

CONCLUSION: Lidan Huayu tablets possess strong cholagogic and anti-inflammatory effects and may promote the excretion of bilirubin and bile acids.

Key Words: Lidan Huayu tablets; Cholagogic agent; Anti-inflammatory activity

Yang Q, Lu FE, Xu LJ, Gao ZQ, Wang KF. Cholagogic and anti-inflammatory effects of Lidan Huayu tablets. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(33): 3531-3534

摘要

目的: 通过动物实验观察利胆化瘀片的利胆消炎作用。

方法: 以熊去氧胆酸为对照药物, 测定健康大鼠单位时间内胆汁流量, 观察利胆化瘀片对胆汁分泌及胆汁总胆红素及胆汁酸含量的影响。以阿司匹林为对照药物, 采用二甲苯及冰醋酸建立炎症模型, 观察利胆化瘀片对小鼠耳廓肿胀及血管通透性的影响。

结果: 利胆化瘀片明显增加胆汁分泌量, 且随剂量增加而利胆效应增强, 可持续3 h以上, 提高泌出胆汁、胆汁酸及总胆红素含量。低、中和高剂量组抑制小鼠因二甲苯所致的耳廓肿胀和对抗小鼠因冰醋酸所致的腹腔毛细血管通透性增加, 与模型组比较差异有显著性(34.9%, 39.5%, 52.3% vs 0; 38.6%, 52.6%, 55.5% vs 0, $P < 0.01$)。高剂量利胆化瘀片组利胆, 促总胆红素和胆汁酸排出作用, 与熊去氧胆酸组比较差异有显著性, 抗炎作用与ASP相似。中剂量利胆化瘀片组促总胆汁酸排出与熊去氧胆酸组比较差异有显著性, 对抗小鼠因冰醋酸所致的腹腔毛细血管通透性增加的作用与ASP相似。

■背景资料

胆囊炎及胆石症是一种世界性常见古老的疾病, 并多同时发生, 发病年龄有年轻化趋势, 并随着年龄增长, 癌变发病率升高。利胆化瘀片是同济医院自行研制并在院内长期应用30余年。

■应用要点

本文通过治疗机制的研究为利胆化瘀片的改进提供思路,为临床应用提供理论依据。

结论: 利胆化瘀片具有明显的利胆消炎及促总胆红素及胆汁酸排泄的作用。

关键词: 利胆化瘀片; 利胆; 抗炎

杨琼, 陆付耳, 徐丽君, 高志强, 王开富. 利胆化瘀片的利胆消炎作用. 世界华人消化杂志 2007;15(33): 3531-3534

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3531.asp>

0 引言

利胆化瘀片由大黄、茵陈、金钱草等中药组成,是我院自行研制并在院内长期应用达30余年之久的有效验方制剂,具有清热解毒、疏肝利胆、祛瘀消炎之功效。临床主要用于治疗胆石症及胆囊炎,取得良好疗效。胆石症与胆囊炎关系密切,炎症可以促进结石形成,而结石梗阻又可发生炎症,常合并存在^[1]。为了探讨该制剂利胆消炎的药理作用,为临床应用提供理论依据,本文对其拮抗小鼠急慢性炎症和对正常大鼠胆汁分泌及生化指标的影响进行了实验研究。

1 材料和方法

1.1 材料 利胆化瘀片由华中科技大学同济医学院中西医结合研究所提供。1 g浸膏相当于2.54 g原生药,4℃冰箱保存,临床应用时用0.85%氯化钠溶液稀释至所需浓度。阿司匹林肠溶片,由石家庄神威药业股份有限公司生产,规格为25 mg/片,批号03042674。熊去氧胆酸片,由盘锦恒昌隆药业有限公司生产,规格为50 mg/片,批号040621。冰醋酸由北京北化精细化工厂生产,二甲苯由武汉有机合成化工厂生产,伊文思兰由上海化学试剂采购供应站生产,总胆红素试剂盒(批号20040922)由北京柏定生物工程有限公司提供,胆汁酸试剂盒(批号20041208)为英国原装朗道RANDOX试剂,由广州康达科学仪器有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 剂量设置: 利胆化瘀片临床成人日服生药用量为2 g/kg,按实验动物给药剂量公式计算后,折合成浸膏。大鼠低、中、高剂量分别为3.15、6.30、12.60 g/kg,分别相当于成人日服用量的4、8、16倍。小鼠低、中、高剂量分别为3.94、7.87、15.75 g/kg,分别相当于成人日服用量的5、10、20倍。熊去氧胆酸片根据利胆实验选用剂量为0.1 g/kg,阿司匹林片根据抗炎实验选用合适剂量为0.2 g/kg,相当于人日服用量的10倍。

1.2.2 对大鼠胆汁流量的影响^[2]: 取健康Wistar ♂

大鼠50只,体质量250-300 g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。称质量标记后随机分为5组,每组10只,每只灌胃容积以20 mL/kg来计算。以等量0.85%氯化钠液(NS)灌胃作为空白对照。熊去氧胆酸(UDCA)组及利胆化瘀片低(LHT I)、中(LHT II)、高剂量(LHT III)组见剂量设置1.2.1。连续用药2 d后,禁食不禁水12 h。末次给药前各组大鼠用3%戊巴比妥钠ip麻醉后(1 mL/kg),仰位固定于固定板上,沿腹部正中线切开约2 cm开腹,找到胃幽门部,翻转十二指肠,在十二指肠降部肠系膜中找到白色有韧性的胆管,在其下穿二根丝线,结扎乳头部,向肝脏方向作“V”形切口,插入引流管,见有淡黄绿色胆汁流出,结扎固定导管。另一端插入10 mL刻度离心管收集胆汁,手术后用止血钳夹闭腹壁,以浸生理盐水纱布覆盖。待稳定20 min后,收集30 min胆汁,然后各组大鼠分别自十二指肠给药。此后每隔1 h自十二指肠给5%(w/w)葡萄糖盐水5 mL/kg一次,每隔30 min收集胆汁一次,共3 h,记录胆汁流量。将末次给药后,3 h内收集到的胆汁测定总胆红素(TBI用重氮法测定)及胆汁酸(TBA用比色法测定)含量。

1.2.3 二甲苯致小鼠耳肿胀实验^[3]: 取昆明种小鼠50只,4周龄,体质量18-22 g,雌雄各半,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。称质量标记后随机分为5组,每组10只。以等量0.85%氯化钠液(NS)灌胃作为空白对照。阿司匹林(ASP)组及利胆化瘀片低(LHT I)、中(LHT II)、高剂量(LHT III)组见剂量设置1.2.1。连续用药3 d后,禁食不禁水12 h。用药第4天,末次给药30 min后,于小鼠右耳两面涂二甲苯0.2 mL/只致肿,左耳不涂为正常耳,1 h后脱颈椎处死,用直径8 mm打孔器冲下左耳及右耳同一部位的圆片,于分析天平上称质量。右耳质量减去左耳质量为肿胀度,计算鼠耳肿胀度及肿胀抑制率。

1.2.4 小鼠腹腔毛细血管通透性的实验^[4]: 取昆明种小鼠50只,4周龄,体质量18-22 g,雌雄各半,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。称重标记后随机分为5组,每组10只,各组设置及灌给剂量见1.2.3。连续用药3 d后,用药第4天,于末次给药1 h后,各鼠尾静脉注射0.5%伊文思兰0.1 mL/10 g,5 min后静脉注射7.5 mL/L醋酸溶液0.4 mL/只,30 min后处死动物,用0.85%氯化钠液8 mL冲洗腹腔分泌物,洗出后配成总体积为10 mL放于试管内,于3000 r/min离心10 min。取上清液,用半自动生化分析仪于620 nm比色,

表 1 对各组大鼠胆汁流量的影响($n=10$, mean $\pm$ SD, $\mu\text{L}/\text{min}$)

分组	剂量(g/kg)	-30 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
NS	—	11.33 $\pm$ 1.67	10.33 $\pm$ 1.33	9.67 $\pm$ 1.67	9.00 $\pm$ 1.33	8.33 $\pm$ 1.33	7.67 $\pm$ 1.00	7.00 $\pm$ 1.00
UDCA	0.10	16.00 $\pm$ 2.00 ^b	16.33 $\pm$ 2.00 ^b	15.33 $\pm$ 2.00 ^b	14.00 $\pm$ 1.67 ^b	12.67 $\pm$ 1.67 ^b	11.33 $\pm$ 1.67 ^b	9.67 $\pm$ 1.67 ^b
LHT I	3.15	14.67 $\pm$ 2.33 ^b	14.33 $\pm$ 2.33 ^b	13.67 $\pm$ 1.67 ^b	12.33 $\pm$ 2.00 ^b	11.00 $\pm$ 1.67 ^b	9.67 $\pm$ 1.67 ^a	8.67 $\pm$ 1.33
LHT II	6.30	18.67 $\pm$ 3.33 ^b	18.33 $\pm$ 3.00 ^b	17.00 $\pm$ 2.67 ^b	15.00 $\pm$ 2.33 ^b	13.67 $\pm$ 2.67 ^b	11.67 $\pm$ 2.33 ^b	10.67 $\pm$ 2.00 ^b
LHT III	12.60	21.00 $\pm$ 3.33 ^{bd}	19.67 $\pm$ 2.67 ^{bd}	18.67 $\pm$ 2.33 ^{bd}	17.00 $\pm$ 2.67 ^{bd}	15.67 $\pm$ 2.00 ^{bd}	13.67 $\pm$ 2.00 ^{bc}	11.33 $\pm$ 2.00 ^{bc}

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs NS组; ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs UDCA组。

0.85%氯化钠液溶液调零, 测量腹腔洗出液的光密度, 记录4值。

统计学处理 实验数据以mean $\pm$ SD表示, 用SPSS11.0软件包进行统计学处理。

2 结果

2.1 对大鼠胆汁流量的影响比较 在LHT组可观察到明显的利胆作用, 与NS组比较有显著性意义($P<0.01$)。低剂量组使正常大鼠胆汁流量可持续增加2 h, 中、高剂量组给药后3 h各时相都显著增加($P<0.01$)。高剂量组与UDCA组比较有显著差异($P<0.01$)。这表明高剂量组效果优于UDCA组, 并且药物作用在2 h内效果犹佳。结果提示利胆化瘀片具有显著的利胆作用, 可持续增加达3 h以上(表1)。

2.2 对大鼠胆汁总胆红素及胆汁酸含量的影响比较 在LHT组可观察到明显的促进总胆红素和胆汁酸排泄的作用, 与NS组比较有显著性意义($P<0.01$)。中剂量组促总胆汁酸排泄效果优于UDCA($P<0.01$)。高剂量组促总胆红素和胆汁酸排泄效果优于UDCA组($P<0.01$)。提示利胆化瘀片具有明显的促总胆红素和胆汁酸排出的作用(表2)。

2.3 对二甲苯各组小鼠致炎的影响比较 在LHT组可观察到显著抑制小鼠耳肿胀程度的作用, 与NS组比较有显著性意义($P<0.01$)。其高剂量组抗炎作用与ASP组相似($P>0.05$)。表明利胆化瘀片对二甲苯引起的小鼠耳廓炎性水肿有显著抑制作用(表3)。

2.4 各组小鼠对醋酸所致腹腔毛细血管通透性的影响比较 LHT组与NS组比较, 有显著性意义($P<0.01$)。能明显降低因醋酸所致的腹腔毛细血管通透性增加, 其中、高剂量组抗炎作用与ASP组相似($P>0.05$)。表明利胆化瘀片对醋酸引起的急性炎症有显著的拮抗作用(表3)。

表 2 对正常大鼠胆汁成分的影响($n=10$, mean $\pm$ SD, $\mu\text{mol}/\text{L}$)

分组	剂量(g/kg)	胆汁酸	总胆红素
NS	—	12.81 $\pm$ 1.04	41.85 $\pm$ 9.10
UDCA	0.10	15.23 $\pm$ 1.22 ^b	60.48 $\pm$ 14.54 ^b
LHT I	3.15	14.42 $\pm$ 1.10 ^b	58.38 $\pm$ 14.94
LHT II	6.30	17.43 $\pm$ 1.57 ^{bd}	69.71 $\pm$ 14.80 ^b
LHT III	12.60	17.85 $\pm$ 1.56 ^{bd}	77.68 $\pm$ 16.01 ^{bd}

^b $P<0.01$ vs NS组; ^d $P<0.01$ vs UDCA组。

3 讨论

胆道疾病极为常见, 通常包括胆石症和急慢性胆囊炎, 病情轻重不一, 诊断处理不当可危及生命或迁延不愈, 常反复发作^[5]。祖国医学认为, 胆石症是因嗜食肥甘厚腻及湿浊热邪虫毒等蕴聚于胆, 胆汁淤积, 与邪毒凝结而成砂石之结石类疾病, 包括胆囊结石、胆总管结石及肝胆管结石。急性胆囊炎是因湿热邪毒壅积于胆, 胆汁及气血瘀滞而化热之内脏热病。慢性胆囊炎是因湿热痰瘀等邪阻滞于胆或情志郁怒等刺激, 使胆气淤滞不舒之内脏诸病^[6]。在胆囊炎病例中90%以上属于结石性的, 胆囊炎与胆石症关系密切。

目前认为引起胆囊炎的主要病因是胆道排空障碍, 胆汁淤积、浓缩所致。而胆石形成的机制非常复杂, 至今尚未完全明了。但基本公认的因素有: 胆汁理化状态的改变、胆汁淤滞、感染等三种, 常为两种以上因素联合致病^[1]。因此, 防治各种胆道梗阻性疾病的发生和发展, 利胆消炎仍是治疗用药的出发点, 去除感染灶、疏通胆道是主要的治疗方法^[5]。

利胆化瘀片是同济医院资深专家在反复临床实践的基础上, 研制出的治疗胆石症及胆囊炎的有效验方, 主要由大黄、茵陈、金钱草等组成。大黄味苦性寒, 可凉血解毒、清热泻火、祛瘀攻滞, 对消化系统有利胆作用, 可降低Oddi扩约肌张力, 令胆汁分泌增加, 同时令胆红素和胆汁酸含量增

■同行评价
本文思路清晰, 资料可靠, 具有较好的理论意义和临床应用价值。

表 3 利胆化瘀片对小鼠耳壳肿胀和腹腔毛细血管通透性的影响($n=10$, mean $\pm$ SD)

分组	剂量(g/kg)	左耳质量(mg)	右耳质量(mg)	鼠耳肿胀度 %	肿胀抑制率	<i>t</i> 值	抑制率(%)
NS	-	15.9	24.5	8.6 $\pm$ 2.7	-	0.321 $\pm$ 0.088	-
ASP	0.20	14.5	18.1 ^b	3.6 $\pm$ 1.1 ^b	58.1	0.128 $\pm$ 0.062 ^b	60.1
LHT I	3.94	15.7	21.3 ^b	5.6 $\pm$ 1.6 ^{bd}	34.9	0.197 $\pm$ 0.075 ^{bd}	38.6
LHT II	7.87	15.2	20.4 ^b	5.2 $\pm$ 1.7 ^{bd}	39.5	0.152 $\pm$ 0.072 ^b	52.6
LHT III	15.75	15.5	19.6 ^b	4.1 $\pm$ 1.2 ^b	52.3	0.143 $\pm$ 0.058 ^b	55.5

^b $P<0.01$ vs NS组; ^d $P<0.01$ vs ASP组.

加,对多种动物实验性炎症有明显的抑制作用.茵陈味微苦微辛,性微寒,可清湿热退黄疸,能促进胆汁分泌增加和排泄,增加胆汁中胆红素和胆酸的含量,具有显著的解热镇痛消炎作用.金钱草味甘淡性凉,可清热利湿,通淋排石,具有抗炎镇痛利胆作用^[7].本实验表明,利胆化瘀片对二甲苯诱发的小鼠渗出性炎症有明显的抑制作用,提示其对急性炎症显著抗炎作用.对醋酸所致小鼠毛细血管通透性增加具有明显的抑制作用,提示其对慢性炎症有显著的拮抗作用.对正常大鼠利胆实验结果表明,利胆化瘀片能显著增加大鼠的胆汁分泌,令胆汁流量增加,有利于胆道系统内的炎症产物和小结石随胆汁流出,推测其利胆作用可能是治疗胆囊炎的药效基础^[8].并显著提高总胆汁酸和胆红素排泄含量,改善胆汁理化状态,有利于溶解胆固醇和胆色素^[9],从而抑制结石的形成,这也初步揭示了利胆化瘀片用于防治胆石症的药理基础.而无论何种原因引起的胆汁滞留,总会使胆囊受化学刺激引起胆囊炎^[10].因此促进胆汁排泄及代谢有利于消除淤积胆汁引起的化学刺激,所以利胆化瘀片可能是通过消炎并联合利胆作用来治疗胆囊炎的.同时通过消除感染抑制胆囊炎症,改变胆汁生化成分抑制结石形成,促进胆汁分

泌防止胆汁过度浓缩,疏解胆汁淤滞等发挥防治胆石的作用.至于利胆化瘀片药效作用是否与促进胆囊收缩,舒张胆道括约肌,缓解胆总管痉挛,增强胆囊排空功能有关,尚待进一步研究.本文结果提示,利胆化瘀片具有明显的利胆消炎作用,是治疗胆石症及胆囊炎有效中药复方制剂.

4 参考文献

- 1 陈奇.中药药效研究思路与方法.第1版.北京:人民卫生出版社,2005:450-469
- 2 李仪奎,王钦茂.中药药理实验方法学.第1版.上海:上海科学技术出版社,1991:70
- 3 张忠泉,包翠屏.药理学实验指导.第1版.郑州:河南医科大学出版社,2000:44
- 4 陈奇.中药药理学实验.第1版.上海:上海科学技术出版社,2001:42,441
- 5 巫协宁.临床肝胆病学.第1版.上海:上海科学技术文献出版社,2002:474-475
- 6 朱文锋,何清湖.现代中医临床诊断学.第1版.北京:人民卫生出版社,2003:604-606
- 7 蔡光先.湖南药物志.第1版.湖南:湖南科学技术出版社,2004:198,2748,3081
- 8 大浦彦吉.大黄的药理疗效.国外医学·中医中药分册1992;14:17
- 9 贺平.茵陈对小鼠肝药酶的影响.中国中药杂志1990;15:52
- 10 张小薄,吴硕东,孔静,王伟.法莫替丁及西咪替丁对Oddi括约肌压力变化的影响.世界华人消化杂志2007;15:897-900

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

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

• 消息 •

WJG 2007 年 1-11 月份收稿及发稿数字统计结果

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology (WJG)* 2007年1-48期共发表文章1120篇,其中国际文章791篇,占71%;国内文章329篇,占29%.社论63篇,综述30篇,专题亮点139篇,文章663篇(基础研究和临床研究),病例报告193篇,读者来信等32篇,评论性文章占发文总量的21%.2007年1-11月份共收稿2432篇,其中国内稿件912篇,占38%;国外稿件1520篇,占62%;退稿1000篇,退稿率为41%.(常务副主任:刘晔 2007-11-15)

脾脏大小CT测量值与慢肝纤维化、肝硬化病理学分期的相关性

丁可, 黄仲奎, 龙莉玲, 林盛才, 李春兰, 孙龙伟

丁可, 黄仲奎, 龙莉玲, 林盛才, 李春兰, 孙龙伟, 广西医科大学第一附属医院放射科 广西壮族自治区南宁市 530021
国家自然科学基金资助项目, No. 30760060
广西自然科学基金资助项目, No. 桂科自0728155
通讯作者: 黄仲奎, 530021, 广西壮族自治区南宁市双拥路6号, 广西医科大学第一附属医院放射科. cjr.hzhk@vip.163.com
电话: 0771-5356231 传真: 0771-5356231
收稿日期: 2007-06-14 修回日期: 2007-10-12

Correlation of CT measurement of spleen size with histopathological stage of chronic hepatic fibrosis and cirrhosis

Ke Ding, Zhong-Kui Huang, Li-Ling Long, Sheng-Cai Lin, Chun-Lan Li, Long-Wei Sun

Ke Ding, Zhong-Kui Huang, Li-Ling Long, Sheng-Cai Lin, Chun-Lan Li, Long-Wei Sun, Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuangzu Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30760060 and Natural Science Foundation of Guangxi Zhuangzu Autonomous Region, No. 0728155

Correspondence to: Zhong-Kui Huang, Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuangzu Autonomous Region, China. cjr.hzhk@vip.163.com

Received: 2007-06-14 Revised: 2007-10-12

Abstract

AIM: To investigate the changes in the spleen of patients with chronic hepatic fibrosis and cirrhosis by measuring the length, thickness, number of rib units and volume of the spleen with 16-slice spiral CT, and to establish the correlation between these values and histopathological stage.

METHODS: Volume CT scan was performed in 67 participants, including 36 patients with hepatic fibrosis, who were divided into S1 (8/36), S2 (11/36), S3 (7/36) and S4 (10/36) groups, confirmed by liver biopsy, 15 patients with liver cirrhosis with typical clinical and imaging signs, and 16 normal participants as a control group.

We measured the length, thickness, number of rib units and volume of the spleen.

RESULTS: Compared with normal subjects, the hilar thickness and volume of the spleen were enlarged gradually in patients with liver cirrhosis. The differences between typical cirrhosis and other groups were significant, as were the differences between S3, S4 and the others, but no significant difference between S1 and control group, S3 and S4, S1 and S2 was observed. The length of the spleen increased gradually with the development of hepatic fibrosis. The difference between typical cirrhosis and the other groups was significant, as were the differences between S4 and S0-2, S1-3 and S1, control group, but no significant differences between S1 and S2, S3 and S4, or S1-2 and control group were observed. The number of rib units tended to increase with the development of fibrosis. Significant differences were seen between the S1 cirrhosis and control groups, and the S1 and S2 cirrhosis groups, but no significant differences were observed among the S2-cirrhosis groups. Multiple linear regression analysis showed that the regression coefficient for the spleen volume was at a maximum.

CONCLUSION: The length, hilar thickness and especially the volume of the spleen correlate closely with the histopathological stage of hepatic fibrosis and cirrhosis. The measurement of spleen size with CT should be helpful for the early diagnosis, treatment and follow-up of hepatic fibrosis and cirrhosis.

Key Words: Hepatic fibrosis; Liver cirrhosis; 16-slice spiral CT; Volume measurement

Ding K, Huang ZK, Long LL, Lin SC, Li CL, Sun LW. Correlation of CT measurement of spleen size with histopathological stage of chronic hepatic fibrosis and cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(33): 3535-3539

摘要

目的: 采用16层螺旋CT对脾脏长径、厚度、

■背景资料

肝纤维化是慢性肝病的重要病理特征,也是各种慢性肝病向肝硬化发展的必经阶段,如何作出早期诊断并加以干预是非常重要的。目前肝纤维化、早期肝硬化的临床诊断困难,主要依赖于有创性的肝穿刺病理活检。如何为其提供非创伤性检查正成为医学界研究的热点之一。关于肝纤维化的CT、MR表现仅见少许文献报道。本文采用16层螺旋CT对不同程度肝纤维化的肝脏血流动力学、肝、脾细微解剖形态学变化以及门静脉高压的早期征象进行研究,以期对肝纤维化、肝硬化的早期诊断提供重要的影像学信息。

■相关报道

有关这方面的CT、MRI研究报道很少。Kaneko *et al*发现脾脏大小与体质量、体表面积、性别无关。Prassopoulos *et al*也得到了相似的研究结果。他们认为脾脏体积与患者年龄、性别、身高、体质量、体型等无显著相关性,从而排除了这些非病变因素对脾脏的影响,更有利于对脾脏进行相关研究。

肋单元数以及脾脏容积进行测量,探讨慢肝纤维化、肝硬化脾脏大小变化规律及其与病理学分期的相关性。

方法: 对经肝穿病理活检确诊的肝纤维化S1期8例、S2期11例、S3期7例、S4期/早期肝硬化10例,具有典型临床症状和影像学表现的中晚期肝硬化15例以及正常组16例行16层螺旋CT脾脏容积扫描,分别测量脾脏的长径、厚度、肋单元数,采用仪器自身携带的Volume功能软件测量脾脏的容积。

结果: 从正常肝脏到肝硬化阶段,脾门厚度以及脾脏容积逐渐增大。重度肝纤维化S3、4期及肝硬化与其他各组之间均存在显著性差异($P<0.01$), S1期与正常组以及轻度肝纤维化S1、2、S3、4期之间无显著差异。随着病变程度的加重,脾脏长径逐渐增大。典型肝硬化与其他各组比较差异均有统计学意义($P<0.01$)。S4期/早期肝硬化与正常组、S1、2期以及S3期与正常组、S1期之间均存在着显著性差异,而轻度肝纤维化S1、2期之间和重度肝纤维化S3、4期之间以及S1-2期与正常组之间差异均无显著意义($P>0.05$)。脾脏所占肋单元数随病变发展呈逐渐增大趋势。各实验组(S1期-典型肝硬化)与正常组间都存在显著性差异($P<0.01$), S2、3、4、典型肝硬化各组与S1期比较差异都有显著意义,但S2期-典型肝硬化各组之间肋单元数的差异均没有统计学意义。多元线性回归分析显示,脾脏容积与肝纤维化病理学分期的回归系数最大。

结论: 脾脏长径、脾门厚度以及脾脏容积,尤其是脾脏容积与肝纤维化病理学分期具有显著相关性。CT测量脾脏的大小有助于肝纤维化、肝硬化的早期诊断、治疗和疗效观察。

关键词: 肝纤维化; 肝硬化; 16层螺旋CT; 容积测量

丁可, 黄仲奎, 龙莉玲, 林盛才, 李春兰, 孙龙伟. 脾脏大小CT测量值与慢肝纤维化、肝硬化病理学分期的相关性. 世界华人消化杂志 2007;15(33): 3535-3539

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3535.asp>

0 引言

肝纤维化是指肝脏内纤维结缔组织的异常增生,是慢性肝病的重要病理特征,也是各种慢性肝病向肝硬化发展的必经阶段。肝纤维化时,肝脏微循环发生不同程度变化,门静脉血流灌注阻力增大,导致门静脉压力增高和脾脏增大。有文献报道^[1-2]脾脏厚度及长径能反映肝纤维化的严

重程度,但是有关脾脏大小与肝纤维化病理学分期相关性的CT、MRI研究很少。我们采用16层螺旋CT对脾脏进行各径线和容积测量并与肝纤维化病理学分期作相关性分析,旨在探讨慢肝纤维化、早期肝硬化脾脏大小变化规律,为临床诊疗提供帮助。

1 材料和方法

1.1 材料 2006-01/2007-02经肝穿活检病理确诊的肝纤维化、早期肝硬化36例,其中轻度肝纤维化S1期8例(男6例,女2例,平均年龄31.0岁),轻度肝纤维化S2期11例(男8例,女3例,平均年龄34.1岁),重度肝纤维化S3期7例(男6例,女1例,平均年龄29.5岁),重度肝纤维化S4期或早期肝硬化10例(男7例,女3例,平均年龄38.0岁)。肝硬化患者15例(男11例,女4例,年龄37-63岁,平均46.7岁)。所有病例肝、脾内均无占位性病变,且除外可引起脾脏肿大的血液性疾病。正常组选取行上腹部CT检查的住院或门诊患者16例(男10例,女6例,平均年龄37.8岁),纳入标准为无肝、脾疾病及肝功能损害,并除外血液性疾病,部分病例经肝穿活检病理确诊。

1.2 方法

1.2.1 组织病理学检查: 肝组织活检采用左侧卧位局部麻醉B超引导下快速穿刺活检术,注意避开肝脏大的血管和胆管,取病理标本长约1.5 cm,用甲醛固定,常规制片,HE、Masson染色及网织纤维染色。根据纤维组织增生情况,将肝纤维化分为S0, S1, S2, S3和S4五期。

1.2.2 16层螺旋CT成像技术: 采用Siemens Sensation 16层螺旋CT机进行上腹部容积扫描。行常规三期增强扫描,时间分别为动脉期约25 s,门静脉期约60 s,平衡期120 s,扫描范围从膈顶至肝脾的下缘,用非离子型对比剂85-90 mL,流率3 mL/s,由高压注射器经肘前静脉注射,每期1次屏气完成上腹部扫描。扫描结束后将原始数据进行3期的8 mm和2 mm重建。

1.2.3 脾脏大小和容积的测量: 采用径线测量法获取脾脏的上下缘径(约等于层厚×显示脾脏的层数)、脾门水平的厚度(图1),并观察脾脏所占据的最大肋单元数。将门脉期2 mm序列图像输入仪器自身携带的Volume功能软件进行容积测量。从膈顶至脾脏下缘逐层画取脾的轮廓,划取过程中避开脾门的大血管。所选择区域内取域值为30-200 Hu,以剔除脾脏大血管、脾周脂肪及腹水的体积,由Volume功能软件计算脾脏的

表 1 正常组、各期肝纤维化、肝硬化阶段脾脏的大小(mean ± SD)

	<i>n</i>	脾脏容积(cm ³)	脾脏长径(cm)	脾门厚度(cm)	占肋单元数(个)
正常组	16	135.98±23.64 ^{abd}	9.20±1.20 ^{abd}	3.54±0.41 ^{abd}	5.00±0.73
轻度肝纤维化S1期	8	175.54±35.96 ^{abd}	9.30±1.13 ^{abd}	3.91±0.43 ^{abd}	6.69±1.00 ^f
轻度肝纤维化S2期	11	260.53±62.15 ^{abd}	10.11±2.18 ^{bd}	4.23±0.39 ^{abd}	7.86±0.92 ^{cf}
重度肝纤维化S3期	7	385.32±119.11 ^b	11.86±1.64 ^b	4.81±0.53 ^b	8.07±0.89 ^{cf}
重度肝纤维化S4期 或早期肝硬化	10	404.86±173.65 ^b	12.80±2.23 ^b	4.84±0.58 ^b	8.00±0.75 ^{cf}
典型肝硬化	15	679.46±205.42	14.99±2.52	5.53±0.70	8.53±1.67 ^{cf}

^a*P*<0.05 vs S3期; ^b*P*<0.01 vs 典型肝硬化; ^c*P*<0.05 vs S1期; ^d*P*<0.01 vs S4期/早期肝硬化; ^f*P*<0.01 vs 正常组。

容积(图2)。

统计学处理 所有数据用mean±SD表示, 采用SPSS13.0统计软件包对上述参数进行统计分析, 不同病变阶段及正常组脾脏大小的数据比较采用One-Way ANOVA方差分析, 组间两两比较用Student-Newman-Keuls法, *P*<0.05认为差异有统计学意义。脾脏大小各测量指标与肝纤维化、肝硬化病理学分期的相关性采用多元线性回归分析。

2 结果

正常组和各期肝纤维化、肝硬化阶段脾脏长径、厚度、所占肋单元数以及脾脏容积的大小见表1。随着病变程度的加重, 脾脏长径逐渐增大。方差分析, 脾脏长径 $F = 18.42$, *P*<0.01, 说明不同病变阶段脾脏长径的大小不完全相同。进行两两组间比较发现, 典型肝硬化与其他各组比较差异均有统计学意义(*P*<0.01)。另外, S4期/早期肝硬化与正常组、S1、2期以及S3期之间均存在着显著性差异(*P*<0.05), 而轻度肝纤维化S1、2期之间和重度肝纤维化S3、4期之间以及S1-2期与正常组之间差异均无显著意义(*P*>0.05)。

脾门厚度及脾脏容积随着慢性肝病严重程度的加重而增大, 脾门厚度 $F = 25.95$, 脾脏容积 $F = 33.21$ 。经两两比较发现, 肝硬化与其他各组之间的脾门厚度和脾脏容积均存在着显著性差异(*P*<0.01), 重度肝纤维化S3、4期的脾门厚度和脾脏容积与其他各组比较都有统计学差异(S4与各组之间 P <0.01, S3与各组之间 P <0.05), 但S3、4期两组之间的差异没有显著意义。除S1期与正常组以及轻度肝纤维化S1、2之间无显著差异外, S1、2期与其他各组比较脾门厚度和脾脏容积的差异均有统计学意义。

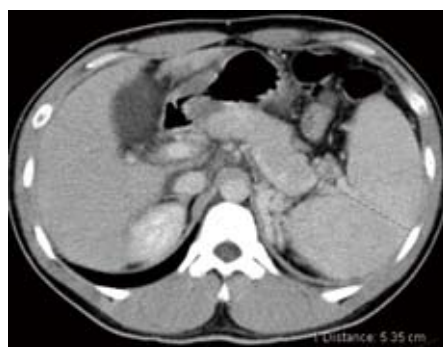


图 1 脾门水平测量脾脏的厚度。

随着病变加重, 脾脏所占肋单元数呈逐渐增大趋势。统计学分析结果显示, 各实验组(S1期-典型肝硬化)与正常组间都存在着显著性差异(*P*<0.01)。S2、3、4典型肝硬化各组与S1期比较差异都有显著意义(*P*<0.05), 但S2期-典型肝硬化各组之间肋单元数的差异均没有统计学意义。

3 讨论

脾脏的径线常常用于测量脾脏长径(上下缘径)和脾门水平的厚度, B超与CT都能实现较精确的脾脏径线测量。由于脾脏轮廓非完全对称性和B超检查图像的不稳定性, B超难以对脾脏进行准确的容积测量, 而CT扫描图像的稳定性则能克服上述不足。CT测量脾脏容积的方法主要有两种, 一种是在CT机上逐层手工描绘测量各层面积, 再乘以层厚, 累加得到脾脏的容积, 脾门血管不包括在内^[3]; 另一种方法是将门静脉期2 mm序列图像输入仪器自身携带的Volume功能软件, 从膈顶至脾脏下缘逐层画取脾的轮廓, 划取过程中避开脾门的大血管, 所选择区域内取域值为30-200 Hu(以剔除脾门血管、脂肪及脾周腹水的体积), 由计算机计算脾脏的容积。本研究既采用第2种方法测量脾脏容积。

■创新盘点

既往的文献报道多采用径线法测量脾脏的大小。除径线测量法外, 本文还采用仪器自身携带的Volume功能软件对脾脏进行容积测量。由于脾脏的非对称性, 容积法将能更敏感而精确的反映脾脏大小的细微变化。本文还对脾脏大小与肝纤维化详细的病理学分期进行了相关性研究, 因而能较敏感和客观的反映不同程度肝纤维化、肝硬化患者脾脏大小的变化规律。

■应用要点

本文揭示了不同程度肝纤维化、肝硬化患者的脾脏大小变化规律. 随着研究的不断深入, 并结合肝脏血流动力学方面的功能性改变, 以及肝脏细微解剖形态学变化和门静脉高压的早期征象, 将有助于肝纤维化、肝硬化的早期诊断、治疗和疗效观察.

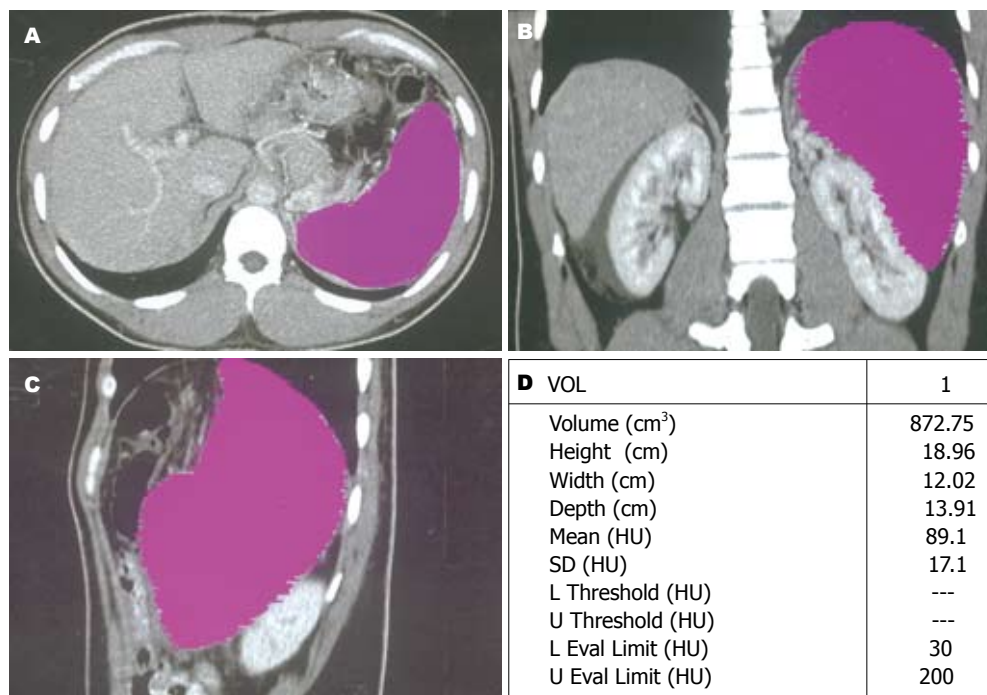


图2 脾脏容积测量示意图. A: 轴位; B: 冠状位; C: 矢状位; D: 测量结果.

Kaneko *et al*^[4]发现CT计算西方成年人的平均脾脏大小为112(32-209) cm³. Groshar *et al*^[5]测量36例正常对照组得到脾脏平均体积(239±90) cm³. Prassopoulos *et al*^[6]采用CT计算出140例正常脾脏的平均大小为214.6 cm³(107.2-314.5 cm³), 并认为与患者年龄、性别、身高、体质量、体型等无关. 涂蓉 *et al*^[7]测得50例正常对照组的脾脏体积为(124.8±45.6) cm³. 本研究正常组脾脏的平均容积为(135.98±23.64) cm³. 各研究测得的脾脏体积有一定的差异, 考虑是由于不同人种以及测量方法的不同等因素所致.

慢性肝病时, 由于肝细胞肿胀和肝纤维化使肝内门静脉受压以及不规则狭窄, 肝内门静脉血管床面积减少, 门静脉血流阻力增加, 门静脉被动充血, 导致门静脉高压和脾脏肿大. Hoefs *et al*^[8]观察了216例经活检证实的慢性肝病患者的脾脏体积, 发现脾脏肿大的程度与肝纤维化程度明显相关. 轻-中度肝纤维化患者的脾脏体积比正常高限平均高36.7%, 早期肝硬化者高52%, 晚期肝硬化者高75%($P<0.05$).

本组资料显示, 轻度肝纤维化S1期时, 由于肝脏炎症水肿及纤维化程度都较轻微, 所以门静脉血流受影响甚微, 脾脏仅仅轻度增大, 而且是以肋单元数增大为主(与正常组比较差异具有统计学意义). 发展至S2期时, 肝纤维化程度及门静脉血流受阻较前加重, 脾门厚度、脾脏容积及所占肋单元数均明显大于正常值, 但脾脏长

径无明显增大. 可见轻度肝纤维化S1-2期时, 脾脏增大以厚度和肋单元数(前后径)的影响较大.

当病变发展至重度肝纤维化S3-4期, 尤其是S4期或早期肝硬化时, 肝脏发生广泛性纤维化并纤维间隔形成, 同时伴有小叶结构紊乱甚至肝硬化结节形成. 因此门静脉血流障碍明显加重, 必然引起较明显的脾脏肿大, 表现为各径线值和脾脏容积的增大, 而且与正常组、轻度肝纤维化S1-2期比较差异具有显著意义. 典型肝硬化脾脏各径线值和脾脏容积显著增大且与其他各组比较都有统计学差异($P<0.01$), 考虑是由于肝硬化时, 肝脏发生弥漫性纤维化并广泛性肝硬化结节形成, 导致肝内门静脉受压和不规则狭窄, 肝血管床面积大幅度减少, 门静脉灌注血流明显受阻, 从而引起严重的门静脉高压和脾脏肿大. 同属于轻度肝纤维化的S1、2期之间以及同属于重度肝纤维化的S3、4期之间脾脏大小并无显著差异($P>0.05$). 由此可见肝纤维化严重程度对门静脉高压和脾脏大小的影响.

随着病变加重, 脾脏所占肋单元数呈逐渐增大趋势. 值得注意的是, 虽然各实验组(S1期-典型肝硬化)与正常组间均存在着显著性差异($P<0.01$), 但S2期到典型肝硬化各组之间肋单元数的差异都没有统计学意义. 因此, 脾脏所占肋单元数虽然能间接的反映肝脏正常与否, 但不能反映肝纤维化及肝硬化的严重程度.

多重线性回归分析显示, 脾脏容积的标

准化回归系数最大(0.39)且具有统计学意义($P<0.05$). 由此可见, 在脾脏大小的测量指标中, 脾脏容积对肝纤维化、肝硬化病理学分期的影响最大.

总之, 脾脏长径、脾门厚度以及脾脏容积, 尤其是脾脏容积与肝纤维化病理学分期具有显著的正相关性, 是反映肝纤维化严重程度和早期肝硬化较为敏感的指标.

4 参考文献

- 1 郑荣琴, 吕明德, 宁芳芹, 李建国, 卢翠容, 蔡银科, 姚集鲁. 慢性肝炎肝纤维化的病理分期与脾脏声像及血流动力学改变. 中国超声医学杂志 1999; 15: 924-926
- 2 马洪波, 郎振为, 金瑞, 金荣华. 肝纤维化病理分期与B超及血液检测指标的关系. 中华肝脏病杂志 2002; 10: 131, 134
- 3 涂蓉, 张阳德, 伍保忠, 黄海伟, 刘惠, 郑妙琼. CT肝硬

化定量诊断的应用研究. 临床肝胆病杂志 2004; 20: 28-29

- 4 Kaneko J, Sugawara Y, Matsui Y, Ohkubo T, Makuuchi M. Normal splenic volume in adults by computed tomography. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 1726-1727
- 5 Groshar D, Slobodin G, Zuckerman E. Quantitation of liver and spleen uptake of (99m)Tc-phytate colloid using SPECT: detection of liver cirrhosis. *J Nucl Med* 2002; 43: 312-317
- 6 Prassopoulos P, Daskalogiannaki M, Raissaki M, Hatjidakis A, Gourtsoyiannis N. Determination of normal splenic volume on computed tomography in relation to age, gender and body habitus. *Eur Radiol* 1997; 7: 246-248
- 7 涂蓉, 张阳德, 黄海伟, 伍保忠, 郑妙琼. 正常肝脾容积的CT研究. 解剖学杂志 2004; 27: 317-318
- 8 Hoefs JC, Wang FW, Lilien DL, Walker B, Kanel G. A novel, simple method of functional spleen volume calculation by liver-spleen scan. *J Nucl Med* 1999; 40: 1745-1755

■同行评价
本文选题有一定创意, 学术价值一般.

编辑 何燕 电编 何基才

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

• 消息 •

WCJD 和 WJG 2008 年对同行评议及作者贡献分布 将开始实行公开策略

本刊讯 世界华人消化杂志(WCJD)和World Journal of Gastroenterology (WJG)为了确保刊出文章的质量, 即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 如: 同行评议者: 房静远教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾病研究所; 韩新巍教授, 郑州大学第一附属医院放射科; 匡安仁教授, 四川大学华西医院核医学科.

WCJD和WJG即将开始实行在每篇文章的脚注内注明每个作者对文章的贡献率, 如: 作者贡献分布: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献均等; 此课题由陈湘川, 庞丽娟, 陈玲, 杨兰, 张金芳, 齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲, 杨兰, 张金芳, 蒋金芳, 杨磊, 李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川, 杨兰及 庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川, 庞丽娟及李洪安完成.

WCJD和WJG即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传. 读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文. 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程. (总编辑: 马连生 2007-11-15)

原发性肝癌组织芯片中乙酰肝素酶的表达及意义

陈 罡, 党裔武, 罗殿中, 冯震博, 唐小玲

■背景资料
乙酰肝素酶(HPA)是目前发现的能切割细胞外基质中硫酸肝素蛋白多糖侧链的内源性糖苷酶。HPA在肿瘤血管生成, 肿瘤生长浸润和转移中发挥重要的作用。组织芯片技术作为一项新兴的科研技术已被应用于肿瘤相关基因的科研工作中。

陈罡, 党裔武, 罗殿中, 冯震博, 唐小玲, 广西医科大学病理教研室 第一附属医院病理科 广西壮族自治区南宁市 530021
中国高等学校博士学科点专项科研基金项目资助, No. 20050598005
广西科学研究与技术开发计划应用基础研究项目资助, No. 0639040
通讯作者: 罗殿中, 530021, 广西壮族自治区南宁双拥路, 广西医科大学病理教研室, 广西医科大学第一附属医院病理科。
ludianzhong@yahoo.com.cn
电话: 0771-5356534 传真: 0771-5358502
收稿日期: 2007-07-12 修回日期: 2007-11-03

Expression of heparanase in tissue microarrays of primary hepatocellular carcinoma and its significance

Gang Chen, Yi-Wu Dang, Dian-Zhong Luo, Zhen-Bo Feng, Xiao-Ling Tang

Gang Chen, Yi-Wu Dang, Dian-Zhong Luo, Zhen-Bo Feng, Xiao-Ling Tang, Department of Pathology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: Chinese University PhD Division Special Science Research Fund Project, No. 20050598005; Science Research and Technology Exploitation Program Application Basic Research Projects of Guangxi, No. 0639040

Correspondence to: Dian-Zhong Luo, Department of Pathology, Guangxi Medical University, Shuangyong Road, Nanjing 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. ludianzhong@yahoo.com.cn

Received: 2007-07-12 Revised: 2007-11-03

Abstract

AIM: To investigate the expression of heparanase in tissue microarrays of hepatocellular carcinoma (HCC), and its clinical significance.

METHODS: Tissue microarrays comprised 125 tissues from HCC, 48 from tumor-adjacent liver, 62 from cirrhosis, and 23 from normal liver. Immunohistochemistry was employed to detect the expression of heparanase. Correlation between the expression and clinicopathological features of HCC was analyzed statistically.

RESULTS: The positive rate of HPA in HCC tissues (45.83%) was significantly higher than that in the adjacent-tumor liver (27.08%) ($\chi^2 = 2.23$, $P < 0.05$, cirrhosis (6.45%) ($\chi^2 = 5.262$, $P <$

0.05) and normal liver tissues (4.35%) ($\chi^2 = 3.895$, $P < 0.05$). Heparanase expression in tumor-adjacent tissues was significantly higher than that in cirrhosis ($\chi^2 = 2.882$, $P < 0.05$) and normal liver ($\chi^2 = 2.361$, $P < 0.05$). The rate of heparanase expression in HCC tissues in TNM stage I and II tumors was significantly lower than that in the stage III and IV tumors (29.41% vs 67.31%; $\chi^2 = 4.111$, $P < 0.05$); the rate of heparanase in cases without metastasis within 20 months was significantly lower than that in those with metastasis (14.71% vs 63.33%; $\chi^2 = 3.978$, $P < 0.05$). HPA expression in patients with AFP ≥ 400 $\mu\text{g/L}$ was 52.05%, 71.74% in portal vein tumor embolus, 73.91% in multiple tumor nodes, and 57.89% in tumors ≥ 5 cm diameter. This was significantly higher than in patients with AFP < 400 $\mu\text{g/L}$ (36.17%; $\chi^2 = 2.071$, $P < 0.05$), without tumor embolus (29.73%; $\chi^2 = 4.472$, $P < 0.05$), single tumor node (28.38%; $\chi^2 = 4.847$, $P < 0.05$), and tumor diameter < 5 cm (25%; $\chi^2 = 3.471$, $P < 0.05$). Heparanase expression was not associated with patient age, sex, histological classification, cirrhosis or tumor capsular infiltration.

CONCLUSION: Overexpression of heparanase plays an important role in the pathogenesis, development and metastases of HCC. The heparanase gene serves as an important molecular biological indicator in diagnosing and predicating the biological behavior of HCC patients.

Key Words: Heparanase; Carcinoma; Hepatocytes; Immunohistochemistry; Tissue microarrays

Chen G, Dang YW, Luo DZ, Feng ZB, Tang XL. Expression of heparanase in tissue microarrays of primary hepatocellular carcinoma and its significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(33): 3540-3544

摘要

目的: 探讨乙酰肝素酶(heparanase, HPA)蛋白在原发性肝细胞癌(HCC)组织芯片中的过度表达及临床意义。

方法: 125例HCC患者肝组织、48例肝癌患者

癌旁组织、62例肝硬化患者肝组织及23例肝血管瘤患者相应正常肝组织构建组织微阵列. 应用免疫组织化学检测HPA蛋白的表达水平, 并分析其与HCC临床病理特征的关系.

结果: HCC组织中的HPA蛋白的阳性率45.83%明显高于癌旁组织27.08% ($\chi^2 = 2.23$, $P < 0.05$), 肝硬化6.45% ($\chi^2 = 5.262$, $P < 0.05$)和正常肝组织4.35% ($\chi^2 = 3.895$, $P < 0.05$). 癌旁组织中的HPA蛋白阳性率明显高于肝硬化 ($\chi^2 = 2.882$, $P < 0.05$)及正常肝组织 ($\chi^2 = 2.361$, $P < 0.05$); HCC中临床TNM分期 I II期HPA阳性率明显低于IIIIV期 (29.41% vs 67.31%, $\chi^2 = 4.111$, $P < 0.05$); HCC中无转移组HPA阳性率明显低于转移组 (14.71% vs 63.33%, $\chi^2 = 3.978$, $P < 0.05$); HPA表达率在AFP ≥ 400 $\mu\text{g/L}$ 和AFP < 400 $\mu\text{g/L}$ 组 (52.05% vs 36.17%, $\chi^2 = 2.071$, $P < 0.05$)、有无门脉癌栓组 (71.74% vs 29.73%, $\chi^2 = 4.472$, $P < 0.05$)、多个和单个肿瘤结节组 (73.91% vs 28.38%, $\chi^2 = 4.847$, $P < 0.05$)以及肿瘤直径 ≥ 5 cm和 < 5 cm组 (57.89% vs 25%, $\chi^2 = 3.471$, $P < 0.01$)分别具有显著性意义. HPA表达与年龄、性别、分化程度、有无肝硬化及肿瘤包膜浸润无关.

结论: HPA高表达在HCC的发生、发展及转移中起重要作用. 检测HPA蛋白指标有助于HCC诊断和判断患者预后.

关键词: 乙酰肝素酶; 癌; 肝细胞; 免疫组织化学; 组织芯片

陈罡, 党裔武, 罗殿中, 冯震博, 唐小玲. 原发性肝癌组织芯片中乙酰肝素酶的表达及意义. 世界华人消化杂志 2007;15(33): 3540-3544

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3540.asp>

0 引言

乙酰肝素酶(heparanase, HPA)是目前发现的哺乳动物细胞中唯一能切割细胞外基质中硫酸肝素蛋白多糖侧链的内源性糖苷酶. 研究发现HPA能加快血管生成, 促进肿瘤生长和转移, 其在多种肿瘤组织中呈现高表达状态^[1-5], 并且与肿瘤的侵袭性、转移性和复发关系密切^[6-10]. 组织芯片技术因为其高效快速等特点, 已被广泛应用于多种肿瘤相关基因的科研工作中^[11-15]. 为此, 我们采用组织芯片技术回顾性的检测了HPA蛋白在125例HCC患者肝组织, 48例癌患者癌旁组织和89例非癌患者肝组织中的表达及临床意义, 报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 2002-5/2005-12广西医科大学第一附属医院以及广西桂林临床病理诊断中心接受的HCC患者125例, 患者均为病理学检查证实. 有效例数120例, 男115例, 女5例, 年龄23-81(平均 49.2 ± 11.2)岁. HCC患者AFP阳性73例, 阴性47例. 术后均继续给予以化疗为主的综合治疗. 按照WHO的标准HCC分为: 高分化9例, 中分化73例, 低分化38例. 按国际TNM分期HCC分为: I期15例, II期53例, III期23例, IV期29例. 其中64例追踪20 mo, 转移复发情况由病理和临床决定, 转移复发30例, 无转移复发34例. 48例患者中癌旁肝组织为距癌结节2 cm以上的肝组织, 均为有效例数, 其中伴肝硬化36例, 无肝硬化12例. 非癌患者包括单纯性肝硬化及肝血管瘤患者, 其中单纯性肝硬化患者64例, 有效例数62例, 男41例, 女21例, 年龄15-74(平均 43.3 ± 12.6)岁. 25例肝血管瘤周围正常肝组织, 有效例数23例, 男16例, 女7例, 年龄18-72(平均 42.3 ± 11.2)岁. 抗HPA兔抗人多克隆抗体购于武汉博士德生物工程有限公司. 抗HPA兔单抗已知阳性胃癌组织切片作阳性对照, 以PBS代替一抗作阴性对照. 免疫组化二步法试剂盒(Polymer Detection System for Immuno-Histological Staining, PV-9000)为北京中杉金桥生物技术有限公司产品.

1.2 方法

1.2.1 组织芯片制作: 对供体组织苏木精-伊红(HE)染色切片作形态学观察, 并在供体蜡块上准确标记所需要的靶点. 参照Kallioniemi *et al*^[16]创建的方法, 利用组织芯片制作仪(Beecher)钻取靶点组织, 并转移至受体蜡块相应的孔位上, 制成所需的阵列蜡块. 每例取2处, 常规方法作4 μm 切片制作成组织芯片. HE染色, 确定组织芯片中的组织样本及形态学表现.

1.2.2 免疫组织化学检测: 4 μm 厚石蜡切片, 65℃烘烤脱蜡, 30 mL/L过氧化氢(H_2O_2)去离子水阻断内源性过氧化物酶10 min, 微波修复抗原, 加一抗37℃湿盒中孵育1 h, 加聚合体助手(Polymer Helper)37℃反应30 min, 加兔多抗(polyperoxidase-anti-rabbit)IgG 37℃处理30 min, 冲洗后加二氨基联苯胺(DAB)显色, 苏木素复染, 脱水、封片后在光镜下观察. 凡细胞质中出现明显棕黄色颗粒者为阳性细胞. 由两名病理医师采用双盲法阅片和评分, 采用双评分半定量法进行评分: 靶细胞阳性率 $< 25\%$ 为0分, 25%-50%为1分, 51%-75%为2分, $> 75\%$ 为3分. 显

■研发前沿

本文应用组织芯片技术回顾性的检测了HPA蛋白在HCC患者肝组织、癌旁组织和非癌患者肝组织中的表达及临床意义, 探讨检测HPA蛋白指标对HCC诊断和判断患者预后方面的价值和意义.

■相关报道

相关研究发现 HPA 在多种恶性肿瘤中异常高表达, 而相应的正常组织不表达或者低表达. Liu *et al* 的研究也发现, 肝癌组织 HPA 蛋白的表达显著高于癌旁肝组织及正常肝组织.

色程度按切片中细胞显色有无及染色深浅记分, 细胞无染色为0分, 浅棕黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分. 将两分相加, <2分为(-), 2-3分为(+), 4-5分为(++), ≥6分为(+++).

统计学处理 应用SPSS13.0统计软件对数据进行 χ^2 检验, 以 $P<0.05$ 判为差异有显著性意义.

2 结果

成功制备了3个组织芯片腊块. 制作芯片过程中由于取材不当, 切片过程中组织折叠及染色过程中组织脱失, 最后HCC组有效率96%(120/125), 癌旁组100%(48/48), 非癌组95.51%(85/89), 总有效率96.56%(253/262). HPA蛋白阳性反应明显定位于胞质内, 为胞质内棕黄色颗粒状或斑片状染色, 阳性细胞的分布呈弥漫性、小巢状或散在分布. HCC组织中的HPA蛋白的阳性率明显高于癌旁、肝硬化及正常肝组织($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$). 癌旁组织中HPA蛋白阳性率明显高于肝硬化及正常肝组织($P<0.01$, $P<0.05$). HCC中临床TNM分期I、II期HPA阳性率明显低于III、IV期($P<0.01$). HCC中无转移组HPA阳性率明显低于转移组($P<0.01$). HPA表达率在AFP≥400 μg/L组、有门脉癌栓组、多个肿瘤结节组和肿瘤直径≥5 cm组分别明显高于AFP<400 μg/L组、无门脉癌栓组、单个肿瘤结节组和肿瘤直径<5 cm组($P<0.05$, 后三者均 $P<0.01$, 表1). HPA表达与患者年龄、性别、有无肝硬化、肿瘤分化程度、及肿瘤包膜浸润无关.

3 讨论

组织微阵列技术(tissue microarrays), 也称组织芯片(tissue chip)^[16-17], 具有体积小、高通量、经济、省时省力、易于重复、易于标准化、实验误差小和节约开支等优点^[18-22]. 我们制作了120例肝癌、48例癌旁及85例非癌患者的肝组织芯片. 芯片上样品排列整齐, 外形为圆形或类圆形, 较少皱折和掉片现象. 免疫组织化学染色定位准确, 结果判读明确, 组织芯片利用率达96.56%. 仅用几张芯片即完成了全部实验, 极大地节约了研究经费和降低了劳动量.

HPA基因定位于染色体4q21.3, cDNA全长1758 bp, 编码543个氨基酸^[23]. Hpa蛋白是由2条多肽链通过非共价结合形成的异二聚体, 相对分子质量分别为 8×10^3 kDa和 50×10^3 kDa, 他们共同来源于HPA蛋白前体^[24]. 人HPA共有6个

表1 HCC组织芯片中HPA表达与临床病理参数的关系

病理指标	n	HPA表达				χ ² 值	P值
		阳性(n)	阴性(n)	阳性率(%)			
组织							
HCC	120	55	65	45.83			
癌旁 ^a	48	13	35	27.08			
肝硬化 ^{bd}	62	4	58	6.45			
正常肝 ^{bc}	23	1	22	4.35			
年龄							
≥50	53	22	31	41.51	0.475	0.635	
<50	67	33	34	49.25			
性别							
男	115	53	62	46.09	0.266	0.790	
女	5	2	3	40.00			
分化程度							
高	9	5	4	55.56			
中	73	34	39	46.58			
低	38	16	22	42.11			
临床分期							
I II	68	20	48	29.41	4.111	0.000	
III IV	52	35	17	67.31			
转移复发							
有	30	19	11	63.33	3.978	0.000	
无	34	5	29	14.71			
伴肝硬化							
有	36	9	27	25	0.557	0.578	
无	12	4	8	33.33			
AFP(μg/L)							
≥400	73	38	35	52.05	2.071	0.038	
<400	47	17	30	36.17			
门脉癌栓							
有	46	33	13	71.74	4.472	0.000	
无	74	22	52	29.73			
包膜浸润							
无包膜或包膜浸润	83	41	42	49.40	1.541	0.118	
包膜完整或无浸润	37	14	23	37.84			
肿瘤结节							
多个	46	34	12	73.91	4.847	0.000	
单个	74	21	53	28.38			
肿瘤直径(cm)							
≥5	76	44	32	57.89	3.471	0.001	
<5	44	11	33	25			

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs HCC; ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs 癌旁.

糖基化位点, HPA前体经糖基化后相对分子质量约为 65×10^3 kDa, 其糖基化与否对于酶活性并无明显影响. 在生理状态下, HPA主要分布在胎盘、脾脏、血小板以及中性粒细胞、单核细胞、T淋巴细胞和B淋巴细胞等免疫细胞内, 在

肝脏、肾脏及胰腺等均不表达。研究发现HPA在多种恶性肿瘤中^[1-5]异常高表达, 而相应的正常组织不表达或者低表达。Liu *et al*^[30]的研究发现, 肝癌组织HPA蛋白的表达显著高于癌旁肝组织及正常肝组织, 与本实验结果相符, 说明HPA的表达可能与肝细胞的恶性转化及肿瘤的进展有关。

肿瘤细胞穿透基底膜及细胞外基质以及新生血管形成是肿瘤扩散和转移的基本过程。HPA作为一种葡萄糖醛酸内切酶, 通过切断硫酸乙酰肝素蛋白多糖(heparansulfate protoglycan, HSPGs)分子的侧链来降解细胞外基质和血管基底膜, 并能促使硫酸乙酰肝素结合型的生长因子(如bFGF和VEGF等)的释放和活化以诱导血管生成^[25-28], 从而促进肿瘤细胞的侵袭和转移。多项研究结果表明HPA的高表达与肿瘤侵袭转移有极高相关性^[6-10, 29]。Edovitsky *et al*^[31]使用RNA干扰技术阻断人乳腺癌细胞(MDA-MB-435)的HPA表达, 结果发现转染了特异性HPA siRNA在体外实验中侵袭和黏附都明显的减少。Goldshmidt *et al*^[32]将HPA转染到小鼠非转移性淋巴瘤细胞中, 发现细胞的侵袭性明显增强, 体内实验也证明转染HPA的小鼠更容易发生肝转移。Zhang *et al*^[6]使用反义寡核苷酸以及RNA干扰技术下调肝癌细胞系SMMC-7721的HPA表达后, 肝癌细胞的浸润和转移能力都降低。以上研究均提示HPA与肿瘤的浸润转移关系密切。本实验显示伴随转移的HCC癌组织中乙酰肝素酶的阳性率明显高于无转移组, 同时HPA表达率在有门脉癌栓组明显高于无门脉癌栓组, 提示HPA与代表肿瘤生物学行为的浸润转移因素有关。HPA高表达者, 易发生肿瘤细胞的浸润转移, 预后差。

本研究还发现, 临床TNM III、IV期HCC的HPA的表达明显高于I、II期, 说明HPA的表达与肿瘤的生长和进展有关, 临床分期越靠后, HPA的表达越高。同时, HPA表达率在AFP $\geq$ 400 μ g/L组、多个肿瘤结节组和肿瘤直径 $\geq$ 5 cm组分别明显高于AFP $<$ 400 μ g/L组、单个肿瘤结节组和肿瘤直径 $<$ 5 cm组, 提示HPA的异常表达可能与HCC的恶性进展有关。HPA有望成为评价HCC预后的重要分子生物学检测指标和肝癌治疗的新靶点。

4 参考文献

- 1 Doweck I, Kaplan-Cohen V, Naroditsky I, Sabo E, Ilan N, Vlodavsky I. Heparanase localization and expression by head and neck cancer: correlation with tumor progression and patient survival. *Neoplasia* 2006; 8: 1055-1061
- 2 de Mestre AM, Soe-Htwe T, Sutcliffe EL, Rao S, Pagler EB, Hornby JR, Hulett MD. Regulation of mouse Heparanase gene expression in T lymphocytes and tumor cells. *Immunol Cell Biol* 2007; 85: 205-214
- 3 Gotte M, Yip GW. Heparanase, hyaluronan, and CD44 in cancers: a breast carcinoma perspective. *Cancer Res* 2006; 66: 10233-10237
- 4 Ben-Izhak O, Kaplan-Cohen V, Ilan N, Gan S, Vlodavsky I, Nagler R. Heparanase expression in malignant salivary gland tumors inversely correlates with long-term survival. *Neoplasia* 2006; 8: 879-884
- 5 Davidson B, Shafat I, Risberg B, Ilan N, Trope' CG, Vlodavsky I, Reich R. Heparanase expression correlates with poor survival in metastatic ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2007; 104: 311-319
- 6 Zhang Y, Li L, Wang Y, Zhang J, Wei G, Sun Y, Shen F. Downregulating the expression of heparanase inhibits the invasion, angiogenesis and metastasis of human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358: 124-129
- 7 Ralph S, Brenchley PE, Summers A, Rosa DD, Swindell R, Jayson GC. Heparanase gene haplotype (CGC) is associated with stage of disease in patients with ovarian carcinoma. *Cancer Sci* 2007; 98: 844-849
- 8 Chang XZ, Wang ZM, Yu JM, Tian FG, Jin W, Zhang Y, Yu J, Li LF, Liu XF, Li ZW, Shao ZM. Isolation of a human gallbladder cancer cell clone with high invasive phenotype in vitro and metastatic potential in orthotopic model and inhibition of its invasiveness by heparanase antisense oligodeoxynucleotides. *Clin Exp Metastasis* 2007; 24: 25-38
- 9 Nadir Y, Brenner B, Zetser A, Ilan N, Shafat I, Zcharia E, Goldshmidt O, Vlodavsky I. Heparanase induces tissue factor expression in vascular endothelial and cancer cells. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 2443-2451
- 10 Cao HJ, Fang Y, Zhang X, Chen WJ, Zhou WP, Wang H, Wang LB, Wu JM. Tumor metastasis and the reciprocal regulation of heparanase gene expression by nuclear factor kappa B in human gastric carcinoma tissue. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 903-907
- 11 Chen WC, Lin MS, Zhang BF, Fang J, Zhou Q, Hu Y, Gao HJ. Survey of molecular profiling during human colon cancer development and progression by immunohistochemical staining on tissue microarray. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 699-708
- 12 Liu K, Lei XZ, Zhao LS, Tang H, Liu L, Feng P, Lei BJ. Tissue microarray for high-throughput analysis of gene expression profiles in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1369-1372
- 13 Costa P, Catarino AL, Silva F, Sobrinho LG, Bugalho MJ. Expression of prolactin receptor and prolactin in normal and malignant thyroid: a tissue microarray study. *Endocr Pathol* 2006; 17: 377-386
- 14 Sandlund J, Hedberg Y, Bergh A, Grankvist K, Ljungberg B, Rasmuson T. Evaluation of CD31 (PECAM-1) expression using tissue microarray in patients with renal cell carcinoma. *Tumour Biol* 2007; 28: 158-164
- 15 Ko SS, Na YS, Yoon CS, Park JY, Kim HS, Hur MH,

■应用要点
实验结果说明HPA高表达在HCC的发生、发展及转移中起作用, 检测HPA蛋白指标可能有助于HCC诊断和判断患者预后。

■同行评价

本文方法成熟, 分析有据, 对基础和临床研究具有一定的指导意义和学术价值.

- Lee HK, Chun YK, Kang SS, Park BW, Lee JH. The significance of c-erbB-2 overexpression and p53 expression in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: a tissue microarray study. *Int J Surg Pathol* 2007; 15: 98-109
- 16 Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 657-662
- 17 Viti F, Merelli I, Galizia A, D'Agostino D, Clematis A, Milanesi L. Tissue MicroArray: a distributed Grid approach for image analysis. *Stud Health Technol Inform* 2007; 126: 291-298
- 18 Dan HL, Zhang YL, Zhang Y, Wang YD, Lai ZS, Yang YJ, Cui HH, Jian YT, Geng J, Ding YQ, Guo CH, Zhou DY. A novel method for preparation of tissue microarray. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 579-582
- 19 Hewitt SM. The application of tissue microarrays in the validation of microarray results. *Methods Enzymol* 2006; 410: 400-415
- 20 Danciu M, Plamadeala P, Mihailovici MS. New methods in cancer research--tissue microarray. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2005; 109: 854-860
- 21 West RB, van de Rijn M. The role of microarray technologies in the study of soft tissue tumours. *Histopathology* 2006; 48: 22-31
- 22 Giltane JM, Rimm DL. Technology insight: Identification of biomarkers with tissue microarray technology. *Nat Clin Pract Oncol* 2004; 1: 104-111
- 23 Hulett MD, Freeman C, Hamdorf BJ, Baker RT, Harris MJ, Parish CR. Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis. *Nat Med* 1999; 5: 803-809
- 24 Fairbanks MB, Mildner AM, Leone JW, Cavey GS, Mathews WR, Drong RF, Slightom JL, Bienkowski MJ, Smith CW, Bannow CA, Heinrikson RL. Processing of the human heparanase precursor and evidence that the active enzyme is a heterodimer. *J Biol Chem* 1999; 274: 29587-29590
- 25 Vlodavsky I, Goldshmidt O, Zcharia E, Atzmon R, Rangini-Guatta Z, Elkin M, Peretz T, Friedmann Y. Mammalian heparanase: involvement in cancer metastasis, angiogenesis and normal development. *Semin Cancer Biol* 2002; 12: 121-129
- 26 Gingis-Velitski S, Zetser A, Kaplan V, Ben-Zaken O, Cohen E, Levy-Adam F, Bashenko Y, Flugelman MY, Vlodavsky I, Ilan N. Heparanase uptake is mediated by cell membrane heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 2004; 279: 44084-44092
- 27 Ferro V, Hammond E, Fairweather JK. The development of inhibitors of heparanase, a key enzyme involved in tumour metastasis, angiogenesis and inflammation. *Mini Rev Med Chem* 2004; 4: 693-702
- 28 Vlodavsky I, Friedmann Y. Molecular properties and involvement of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *J Clin Invest* 2001; 108: 341-347
- 29 Ikeguchi M, Hirooka Y, Kaibara N. Heparanase gene expression and its correlation with spontaneous apoptosis in hepatocytes of cirrhotic liver and carcinoma. *Eur J Cancer* 2003; 39: 86-90
- 30 Liu YB, Gao SL, Chen XP, Peng SY, Fang HQ, Wu YL, Peng CH, Tang Z, Xu B, Wang JW, Deng GL, Li HJ, Feng XD, Qian HR. Expression and significance of heparanase and nm23-H1 in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1378-1381
- 31 Edovitsky E, Elkin M, Zcharia E, Peretz T, Vlodavsky I. Heparanase gene silencing, tumor invasiveness, angiogenesis, and metastasis. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1219-1230
- 32 Goldshmidt O, Zcharia E, Abramovitch R, Metzger S, Aingorn H, Friedmann Y, Schirmacher V, Mitran E, Vlodavsky I. Cell surface expression and secretion of heparanase markedly promote tumor angiogenesis and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 10031-10036

编辑 李军亮 电编 郭海丽

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

● 消息 ●

世界华人消化杂志 2007 年 1-11 月份 收稿及发稿数字统计结果

本刊讯 世界华人消化杂志2007年1-11月份收稿及发稿数字统计结果: 自2007-01-01/2007-11-30, 世界华人消化杂志共收到稿件1450篇, 退稿585篇, 退稿率40.34%。发表文章707篇, 其中述评44篇(6.2%), 基础研究181篇(25.6%), 临床研究89篇(12.6%), 文献综述100篇(14.1%), 研究快报84篇(11.9%), 临床经验179篇(25.3%), 病例报告10篇(1.4%), 焦点论坛19篇(2.7%)。会议纪要1篇(0.14%), 英文摘要677篇(95.8%)。其中受国家级基金资助的157篇(22.2%), 省部级基金资助的222篇(31.4%)。作者分布遍及全国各地, 绝大多数来自高等院校及附属医院。(常务副总编辑: 张海宁 2007-11-15)

早期肠内营养联合肠屏障保护剂治疗急性重症胰腺炎64例

王远志, 丁岩冰, 吴健, 邓彬, 肖炜明

王远志, 丁岩冰, 吴健, 邓彬, 肖炜明, 扬州市第一人民医院
消化内科 江苏省扬州市 225001

通讯作者: 王远志, 225001, 江苏省扬州市泰州路45号, 扬州市
第一人民医院消化内科. meteorcloud@yeah.net

电话: 0514-87907336

收稿日期: 2007-04-26 修回日期: 2007-11-08

Treatment of 64 cases severe acute pancreatitis with early enteral nutrition and intestinal barrier protective agents

Yuan-Zhi Wang, Yan-Bing Ding, Jian Wu, Bin Deng,
Wei-Ming Xiao

Yuan-Zhi Wang, Yan-Bing Ding, Jian Wu, Bin Deng,
Wei-Ming Xiao, Department of Gastroenterology, First
People's Hospital of Yangzhou city, Yangzhou 225001, Ji-
angsu Province, China

Correspondence to: Yuan-Zhi Wang, Department of
Gastroenterology, First People's Hospital of Yangzhou city,
Yangzhou 225001, Jiangsu Province,
China. meteorcloud@yeah.net

Received: 2007-04-26 Revised: 2007-11-08

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy of early enteral nutrition and intestinal barrier protective agents on severe acute pancreatitis (SAP).

METHODS: Sixty-four patients with SAP were randomly divided into groups A, B and C. Group A was given conventional therapy, group B enteral nutrition by nasogastric feeding, and group C enteral nutrition and intestinal barrier protective agents by nasogastric feeding. We measured the recovery time from symptoms, physical signs and laboratory parameters [white blood cell count (WBC), C-reactive protein (CRP) and serum amylase], changes in body weight and serum albumin, cost of hospitalization and length of stay.

RESULTS: Recovery time from symptoms, physical signs and laboratory parameters in group B was significantly shorter than that in group A ($P < 0.05$). Cost of hospitalization and length of stay in group B were better than those in group A ($P < 0.05$). Recovery time of CRP

and WBC in group C was significantly shorter than that in group B ($P < 0.05$). Average daily hospitalization cost was comparable in the three groups.

CONCLUSION: Treatment of SAP with early enteral nutrition and intestinal barrier protective agents can improve nutrition, speed up symptom recovery, shorten length of stay and reduce medical costs.

Key Words: Early enteral nutrition; Intestinal barrier protective agents; Severe acute pancreatitis; Nasojejunal tube

Wang YZ, Ding YB, Wu J, Deng B, Xiao WM. Treatment of 64 cases severe acute pancreatitis with early enteral nutrition and intestinal barrier protective agents. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(33): 3545-3548

摘要

目的: 探讨早期肠内营养联合肠屏障保护剂在急性重症胰腺炎治疗中的应用价值。

方法: 将64例SAP患者随机分三组, A组予常规治疗, B组在常规治疗基础上通过鼻空肠管给予早期肠内营养, C组通过鼻空肠管给予早期肠内营养并加用肠屏障保护剂。观察患者症状、体征、WBC、CRP、血淀粉酶恢复正常时间, 其体质量及血清白蛋白变化情况以及对比其总住院费用、平均每天的住院费用及住院时间。

结果: B组在症状、体征、WBC、CRP、血淀粉酶恢复时间以及住院时间、住院费用均明显优于A组($P < 0.05$)。C组在CRP及白细胞数恢复时间上更是优于B组, 但平均每天住院费用三组没有明显差异性($P > 0.05$)。

结论: 在SAP治疗中应用鼻空肠管进行早期肠内营养联合肠屏障保护剂, 可以改善SAP患者的营养状况, 加快症状恢复, 缩短病程, 减少医疗费用。

关键词: 早期肠内营养; 肠屏障保护剂; 重症胰腺炎; 鼻空肠管

■背景资料

急性重症胰腺炎是常见危急重症, 病程中多存在代谢紊乱, 营养不良, 肠道功能障碍和菌群失衡等。近年来经鼻空肠管进行肠内营养以及应用肠黏膜保护药物治疗SAP在临床实践中备受关注。

■研发前沿
如何选择合适肠
内营养剂配伍,使
之发挥更好的治
疗作用,为广大临
床医生面临的实
践课题。

王远志, 丁岩冰, 吴健, 邓彬, 肖炜明. 早期肠内营养联合肠屏障
保护剂治疗急性重症胰腺炎64例. 世界华人消化杂志 2007;
15(33): 3545-3548
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3545.asp>

0 引言

急性重症胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是消化科常见危急重症,病情复杂,并发症多,病死率高,病程中多存在代谢紊乱,消化吸收功能障碍,营养摄入不足^[1]. 因此进行肠内营养联合肠屏障保护剂的治疗对改善SAP患者的营养状况,调节肠内菌群失衡,减少并发症发生,从而从根本上减轻患者的经济负担,显得尤为重要. 本文将我院2004-01/2006-09确诊为SAP的64例患者随机分成三组,观察治疗效果. 现将治疗结果报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 SAP患者64例,男34例,女30例,年龄26-81岁,平均年龄52岁. 入选患者均符合《中国急性胰腺炎诊治指南(草案)》关于SAP的诊断标准,并且CT分级为D或E级^[2].

选用由荷兰纽迪希亚公司生产的复尔凯螺旋型鼻空肠管CH10(外径3.3 mm),肠内营养剂采用瑞素(华瑞制药500 mL),肠黏膜保护剂:复方谷氨酰胺肠溶胶囊(成都地奥药业,其成分L-谷氨酰胺,白术,茯苓等),肠道菌群调节剂:培菲康胶囊(上海信谊药业,成分为双歧杆菌).

1.2 方法

1.2.1 治疗方案: 64例患者随机分为三组,三组患者入院时一般情况、生化指标、CRP、ALB以及CT分级无统计学差异(表1). A组24例,采用常规治疗:禁食、胃肠减压、PPI制酸、加贝脂及奥曲肽抑酶、抗生素治疗、补充胶体以及中药清胰汤口服等治疗. B组19例,在常规治疗基础上,入院后48-96 h开始实施肠内营养,采用内镜下放置肠内营养管到达Treitz韧带以下并进行X线透视,以证实鼻空肠管的确切位置. C组21例,在B组的基础上加用肠屏障保护剂及肠道菌群调节剂.

以肠道功能完全恢复为结束肠内营养标准(肠功能恢复包括肠动力正常、吸收功能正常、调节菌群功能正常,即肠鸣音4-5次/min,保持每日1-2次成形大便,无腹痛腹胀).

1.2.2 观察指标: 观察患者的一般情况,包括体温、脉搏、腹部的症状和体征以及肛门排便排气情况. 分别在入院后的第0, 1, 4, 7, 10, 14天抽

表 1 入院时三组患者指标

项目	A组	B组	C组
性别	男(<i>n</i> = 13) 女(<i>n</i> = 11)	男(<i>n</i> = 10) 女(<i>n</i> = 9)	男(<i>n</i> = 11) 女(<i>n</i> = 10)
年龄(岁)	48±27	46±26	48±25
WBC(10 ⁹ /L)	16.8±7.2	17.1±6.9	16.9±7.3
CRP(mg/dL)	268±74	266±68	273±70
血淀粉酶(U/L)	1586±528	1539±498	1601±482
ALB(g/L)	31.2±3.4	30.9±3.2	30.8±3.5
CT分级(D/E)	21/3	17/2	19/3

血检测血淀粉酶、血常规(采用全自动生化分析仪). 分别在入院的第0, 7, 10, 14天抽血检测血清白蛋白情况(全自动生化分析仪)以及CRP(采用免疫比浊法). 分别在入院时以及出院时检测患者体质量变化情况,观测和记录患者肠内营养时间、住院时间、住院总费用、平均每天住院费用.

统计学处理 三组资料应用SPSS10.0统计软件进行统计学分析,各计量资料以mean±SD表示,各指标比例采用配对 t 检验, $P<0.05$ 为有统计学意义,计数资料采用 χ^2 检验.

2 结果

2.1 症状体征、实验室检查指标等恢复正常的时间 三组患者治疗后WBC、CRP、血淀粉酶均逐渐下降,症状及体征均有明显改善. B组患者恢复正常时间明显短于A组($P<0.05$), C组CRP及WBC恢复时间明显短于B组(表2, 图1).

2.2 三组患者体质量及血清ALB变化情况 B组血清白蛋白升高水平较A组有明显差异(9.5 ± 5.1 vs 6.4 ± 3.5 , $P<0.05$), C组血清白蛋白升高水平较A组有明显差异(9.4 ± 5.3 vs 6.4 ± 3.5 , $P<0.05$), B组、C组血清白蛋白升高水平无明显差异.

B组体质量减低水平较A组有明显差异(2.3 ± 0.8 vs 3.9 ± 1.7 , $P<0.05$), C组体质量减低水平较A组有明显差异(2.5 ± 0.9 vs 3.9 ± 1.7 , $P<0.05$), B组、C组体质量减低水平无明显差异.

2.3 患者住院时间(d)及住院总费用(万元)对比 B组住院时间较A组明显缩短(16.2 ± 5.5 vs 24.8 ± 8.2 , $P<0.05$), C组住院时间较A组明显缩短(15.8 ± 5.9 vs 24.8 ± 8.2 , $P<0.05$), B组、C组住院时间无明显差异($P>0.05$).

B组住院总费用较A组明显缩短(4.3 ± 0.7 vs 5.6 ± 0.9 , $P<0.05$), C组住院时间较A组明显缩短(4.4 ± 0.8 vs 5.6 ± 0.9 , $P<0.05$), B组、C组住院时

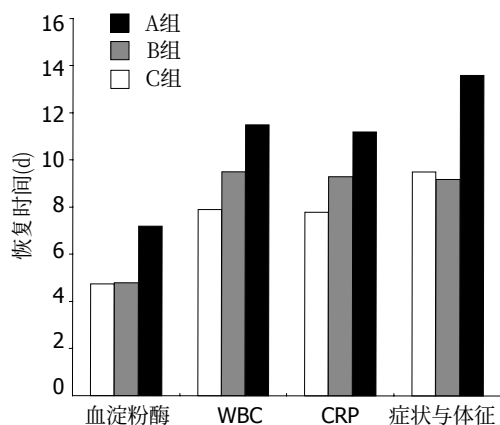


图 1 三组患者各指标恢复时间(d).

间无明显差异($P>0.05$).

3 讨论

急性重症胰腺炎时, 蛋白质分解, 糖原异生, 脂肪动员增强, 机体呈高代谢反应状态, 可使患者出现严重的营养不良, 防御免疫能力下降, 感染概率增高^[3]. 传统治疗SAP时, 为了减少胰腺的分泌让胰腺得到更充分的休息, 往往需要长期禁食. 而此必导致胃肠道黏膜由于缺少食物的营养和对消化道的刺激, 消化道黏膜更新能力下降, 同时消化液化学杀菌能力减弱, 结果大量细菌内毒素经门静脉和淋巴系统进入体循环造成肠源性感染和内毒素血症. 内毒素诱导单核-吞噬细胞系统所产生的一系列细胞因子和炎症介质包括: TNF, IL-6, IL-8, 自由基等, 其促进全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)的产生, 使SAP的并发症增多, 甚至诱发多器官功能衰竭(multiple organ dysfunction syndrome, MODS). 近来发现通过对炎症介质和细胞因子释放的阻断可以减少并发症的产生^[4-5].

研究表明肠内刺激距幽门越远对胰腺分泌的影响越弱, 90 cm以上时对胰腺的分泌无明显影响. 近年来通过鼻空肠管进行肠内营养已经成为SAP的基本治疗策略, 肠内营养在改善营养方面则优于全肠外营养^[6]. 本研究从B、C组体质量减轻以及白蛋白升高的情况可以看出, 早期肠内营养有利于缓解SAP患者的高代谢状态, 改善患者的营养状况. 而对比SAP患者的WBC、CRP、血淀粉酶以及症状与体征恢复正常的时间长短, 充分证明早期肠内营养在改善细胞因子与炎症介质的释放方面起到了一定的作用^[7-8]. 而C组由于优化组合肠内营养

表 2 三组患者各指标恢复时间(d)

指标	A组	B组	C组
症状与体征	13.6±3.4	9.2±2.6 ^a	9.5±1.9 ^a
CRP	11.2±3.6	9.3±2.5 ^a	7.8±1.9 ^b
WBC	11.5±4.8	9.5±2.2 ^a	7.9±1.8 ^b
血淀粉酶	7.2±2.6	4.8±2.1 ^a	4.2±1.8 ^a

^a $P<0.05$ vs A组; ^b $P<0.05$ vs B组.

的部位, 营养制剂以及肠黏膜保护剂和菌群调节剂等, 可以改善肠内菌群的移位和失衡, 尽快恢复肠道的动力功能、吸收功能以及调节肠道菌群功能, 从而减少或阻断炎症介质和细胞因子释放的发生与发展. 近年来免疫营养(immunonutrition, IMN)在防治感染, 保护肠黏膜功能方面的作用倍受关注, 其可以刺激免疫细胞, 维持正常. 适度免疫应答, 调控细胞因子的产生和释放, 维护肠黏膜屏障功能等^[9-11]. 在使用肠黏膜保护剂(谷参肠安)以及肠道菌群调节剂(培菲康)的C组中, 其CRP与WBC两项指标恢复正常时间与B组也存在统计学差异, 提示优化组合肠内营养的部位, 营养制剂以及肠黏膜保护剂和菌群调节剂等, 可以改善肠内菌群的移位和失衡, 尽快恢复肠道的动力功能, 吸收功能、以及调节肠道菌群功能, 从而减少或阻断炎症介质和细胞因子释放的发生与发展^[12-14].

本研究中实施早期肠内营养的B、C组住院医疗总费及住院时间均较A组有明显下降($P<0.05$), 提示应用早期肠内营养联合肠屏障保护剂对急性重症胰腺炎治疗后通过对患者营养状况的改善以及减少全身炎症反应综合征的持续时间, 从而减少了感染性并发症的发生率, 并最终缩短了住院周期以及降低了住院医疗总费用.

总之, 早期肠内营养联合肠屏障保护剂治疗不但可以减少肠源性感染及其他并发症的发生率, 改善患者的营养状况, 加快症状恢复, 而且可以降低医疗总费用及缩短住院病程. 对SAP患者给予早期的肠内营养联合肠屏障保护剂治疗是安全有效的且十分经济的治疗方法.

4 参考文献

- 1 杜鹏. 急性重症胰腺炎与肠内营养. 胰腺病学 2002; 2: 110-112
- 2 中华医学会消化病学分会胰腺疾病学组. 中国急性胰腺炎诊治指南(草案). 中华内科杂志 2004; 43: 236-238
- 3 Scolapio JS, Malhi-Chowla N, Ukleja A. Nutrition supplementation in patients with acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterol Clin North Am* 1999; 28: 695-707
- 4 Rinderknecht H. Fatal pancreatitis, a consequence

■应用要点

本文初步证实鼻空肠管肠内营养联合黏膜保护剂能更有效地控制急性重症胰腺炎的全身炎症反应, 缩短病程.

■同行评价

本文选题实用, 层次清楚, 数据可信, 为临床治疗提供了一种建议.

- of excessive leukocyte stimulation? *Int J Pancreatol* 1988; 3: 105-112
- 5 郭利涛, 潘承恩. 急性胰腺炎相关的细胞因子和介质. *胰腺病学* 2006; 6: 249-251
- 6 Vu MK, van der Veek PP, Frolich M, Souverein JH, Biemond I, Lamers CB, Masclee AA. Does jejunal feeding activate exocrine pancreatic secretion? *Eur J Clin Invest* 1999; 29: 1053-1059
- 7 王慧, 钟燕, 蔡东联, 耿珊珊, 韩婷, 陈凌云. 添加益生元肠内营养对重症急性胰腺炎肠屏障损害和内毒素易位的作用. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 694-699
- 8 Kalfarentzos F, Kehagias J, Mead N, Kokkinis K, Gogos CA. Enteral nutrition is superior to parenteral nutrition in severe acute pancreatitis: results of a randomized prospective trial. *Br J Surg* 1997; 84: 1665-1669
- 9 邓诗琳, 曹丽萍. 免疫营养基础与临床研究的进展. *中华烧伤杂志* 2005; 21: 77-78
- 10 Choudhry MA, Haque F, Khan M, Fazal N, Al-Ghoul W, Ravindranath T, Gamelli RL, Sayeed MM. Enteral nutritional supplementation prevents mesenteric lymph node T-cell suppression in burn injury. *Crit Care Med* 2003; 31: 1764-1770
- 11 Zulfikaroglu B, Zulfikaroglu E, Ozmen MM, Ozalp N, Berkem R, Erdogan S, Besler HT, Koc M, Korkmaz A. The effect of immunonutrition on bacterial translocation, and intestinal villus atrophy in experimental obstructive jaundice. *Clin Nutr* 2003; 22: 277-281
- 12 王兴鹏, 吴恺, 王冰娴, 徐选福, 徐敏, 龚自华. 谷氨酰胺对急性坏死型胰腺炎大鼠肠道衰竭的治疗作用. *中华内科杂志* 2001; 40: 815-818
- 13 任建安, 汪仕良, 黎鳌. 富含精氨酸早期肠内营养对烧伤后肠黏膜增殖的实验研究. *中华烧伤杂志* 2001; 17: 219-221
- 14 Ding LA, Li JS. Effects of glutamine on intestinal permeability and bacterial translocation in TPN-rats with endotoxemia. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1327-1332

编辑 程剑侠 电编 何基才

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

• 消息 •

消化内镜诊疗技术研讨会在青岛成功举办

本刊讯 2007-11-17/18国家级继续医学教育项目消化内镜诊疗技术研讨会在青岛市成功举办(图1), 此次大会由青岛大学医学院附属医院主办, 世界华人消化杂志(*World Chinese Journal of Digestology, WCJD*)协办. *WCJD*科学编辑李军亮参加此次大会, 大会特邀国内外著名专家100多位, 其中包括*WCJD*部分编委.

大会期间, 日本名古屋大学医学部附属医院广冈芳树博士, 山东省齐鲁医院内科主任赵幼安教授和李延青教授等10多位消化内镜专家, 就超声造影和弹性成像在胰腺疾病诊断中的应用, 消化内镜清洗规范和共聚焦内镜在消化系统疾病诊断中的应用等4个专题进行报告. 然后, 由山东省交通医院肝胆、内镜外科中心主任孙文生教授, 青岛大学医学院附属医院消化内科主任田宇彬教授, 青岛大学医学院附属医院内镜诊疗中心刘希双教授、赵清喜教授和青岛市立医院消化内科王青教授等8位专家通过内镜对肝胆疾病, 食管狭窄和胃肠息肉等的治疗进行现场演示, 借助网络技术使会场和病房合二为一, 成为此次大会的一大亮点.

为了使作者更好的了解世界胃肠病学杂志(*World Journal of Gastroenterology, WJG*)和*WCJD*, *WCJD*科学编辑李军亮就作者在投稿中遇到的问题,



图1 大会执行主席, 青岛大学医学院附属医院内镜诊疗中心刘希双教授(左一), *WCJD*科学编辑李军亮(二排右二)和部分参会专家.

围绕*WJG*和*WCJD*进行发言, 介绍*WJG*和*WCJD*在同类期刊中的优势和投稿流程, 并代表*WCJD*赠送大会《生物医学核心期刊指南》100余本, 同时还赠送部分专家最新出版的*WJG*和*WCJD*杂志. 会后, 认真听取专家们对这两本杂志的看法, 他们对*WJG*和*WCJD*取得的成就表示赞赏和肯定. 其中解放军401医院消化内科钟慧闽教授指出, *WJG*和*WCJD*与同类期刊相比观点更新, 办刊更灵活, 她希望能在这两本杂志上发表更多更好的文章. 大会在一片紧张而又充实的气氛中圆满结束. (科学编辑: 李军亮 2007-11-20)

分析中西医结合治疗重症急性胰腺炎2271例

黄萍, 李永红, 黄宗文, 薛平, 郭佳, 游真, 何馥倩

黄萍, 四川省卫生学校 四川省成都市 610100
李永红, 四川大学华西基础与法医学院 四川省成都市 610041
黄宗文, 薛平, 郭佳, 游真, 何馥倩, 四川大学华西医院中西医结合科 四川省成都市 610041
通讯作者: 黄宗文, 610041, 四川省成都市外南国学巷37号, 四川大学华西医院中西医结合科.
huangzongwen@medmail.com.cn
收稿日期: 2007-06-11 修回日期: 2007-10-29

Integrated Chinese and Western medicine in the treatment of severe acute pancreatitis: an analysis of 2271 cases

Ping Huang, Yong-Hong Li, Zong-Wen Huang,
Ping Xue, Jia Guo, Zhen You, Fu-Qian He

Ping Huang, Sichuan Province Health School, Chengdu 610100, Sichuan Province, China
Yong-Hong Li, School of West China Basic Medicine and Forensics, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Zong-Wen Huang, Ping-Xue, Jia Guo, Zhen You, Fu-Qian He, Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Correspondence to: Zong-Wen Huang, Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, West China Hospital, Sichuan University, 37 Wainan Guoxue Lane, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. huangzongwen@medmail.com.cn
Received: 2007-06-11 Revised: 2007-10-29

Abstract

AIM: To assess the efficacy of non-surgical methods of combined with integrated traditional Chinese and Western medicine on severe acute pancreatitis (SAP), guided by the theory of febrile disease.

METHODS: The inherent factors and characteristics of successful treatment of severe acute pancreatitis were analyzed by reviewing its three-stage treatment with integrated traditional Chinese and Western medicine.

RESULTS: Along with constant improvements after treatment with traditional Chinese and Western medicine, the success rate of non-

surgical treatment for severe acute pancreatitis has increased. The mortality rate has decreased significantly in the three stages (40.52%, 17.17% and 10.36%), as has the surgery rate (40.52%, 17.17% and 10.36%). In particular, the fatality rate dropped to about 10%. New breakthroughs were made in the pathogenesis and treatment theory and technology of SAP.

CONCLUSION: The fever theory of traditional Chinese and Western medicine for SAP methods by "Yi-Huo-Qing-Xia" is highly operable.

Key Words: Traditional Chinese medicine; Severe acute pancreatitis; Yi-Huo-Qing-Xia

Huang P, Li YH, Huang ZW, Xue P, Guo J, You Z, He FQ. Integrated Chinese and Western medicine in the treatment of severe acute pancreatitis: an analysis of 2271 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(33): 3549-3552

摘要

目的: 评估在中医热病理论指导下, 中西医结合非手术治疗重症急性胰腺炎的疗效和方法。

方法: 通过对华西医院中西医结合治疗重症急性胰腺炎三个阶段的回顾, 分析其成功的内在因素和诊治特点。

结果: 随着中西医结合的不断完善, 重症胰腺炎非手术治疗率不断提高, 三个阶段的并发症, 病死率(40.52%, 17.17%, 10.36%)和手术率(40.52%, 17.17%, 10.36%)均明显下降。

结论: 中医热病理论较好地诠释了以益活清下为主的中西医结合治疗重症急性胰腺炎方法有很强的可操作性。

关键词: 中西医结合; 重症急性胰腺炎; 益活清下

黄萍, 李永红, 黄宗文, 薛平, 郭佳, 游真, 何馥倩. 分析中西医结合治疗重症急性胰腺炎2271例. *世界华人消化杂志* 2007;15(33):3549-3552
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3549.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)

■背景资料

随着生活水平的提高, 胰腺炎的发病率越来越高, 尤其是急性重症胰腺炎, 严重威胁到患者的健康和安全. 寻找有效的诊治经验加以推广势在必行.

■研发前沿
华西医院在长达27年的研究历程中,在外科、重症监护科、影像放射科、ICU等众多科室为支撑和保障下,运用中西医结合治疗重症胰腺炎,独创了益活清下理论体系,强调辨证与辨病相结合,进一步降低了死亡率(10.36%)。

发病急、病死率高,被称为外科21世纪最后待攻克的一个堡垒。华西医院多个科室精诚合作,27年来不断探索与研究,从早期手术治疗到中西医结合非手术治疗,取得了可喜的成就。本文归纳分析该院中西医结合治疗重症急性胰腺炎的诊治特点,结合近年胰腺炎发病机制理论的新进展,展望该领域基础和临床的发展趋势。

1 材料和方法

1.1 材料 华西医院从1980/2006-12, 27年间共收治急性胰腺炎患者共9996例,其中重症胰腺炎2271例,比例为22.72%;男1121例、女1150例;中位年龄49.5(14-85)岁。

1.2 方法

1.2.1 诊断标准: SAP采用曼谷会议SAP的诊断标准^[1], SAP是指在急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)的基础上有以下之一者: (1)有脏器功能障碍; (2)Rason评分>3分; (3)急性生理和慢性健康评价指标II(acute physiology and chronic health evaluation II, APACHE II)评分>8分; (4)Balthazar CT分级II级或II级以上; (5)出现局部并发症。

1.2.2 分期: 发病3 d以内为早期, 3-14 d为中期, 14 d以上为晚期。

1.2.3 分阶段: 27年三个阶段, 第I阶段: 1980-1990年用早期手术治疗, 以胰床引流术、开放式填塞引流术为主(1980年代后期手术术式为经后上腰腹膜后引流术); 中后期配合清热通下的中医疗法^[2]。第II阶段: 1991-1993年, 该阶段采用早期接受抗休克和以柴芩承气汤及丹参、生脉注射液为主体的益活清下疗法为主的非手术治疗, 短期症状无缓解或炎症过度反应综合征、腹部体征明显及重要器官损害的患者则强调早期中转手术。第III阶段: 1994-2006年该阶段用早期接受抗休克和以柴芩承气汤及丹参、生脉注射液为主体的益活清下疗法为主的非手术治疗为早期治疗的主要手段, 强调重症监护作为防治多器官功能衰竭的重要保障, 外科穿刺引流术及在超声或CT引导下的小切口引流术为辅, 尽量避免剖腹引流手术, 确需剖腹引流术患者据其全身情况、坏死感染的部位和范围决定相应术式。

统计学处理 数据采用SPSS11.0统计软件, 采用 χ^2 检验分析所得结果, $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 并发症 三个阶段的并发症发生率, 第I阶段

并发休克、早期重要器官功能障碍、感染及其导致的多器官功能障碍发生率在早中晚三个时段的发生率都高于30%。第II阶段并发症休克、感染及其导致的多器官功能障碍明显下降, 但早期重要器官功能障碍无明显变化。第III阶段各并发症在三个时段均大幅下降(表1)。

2.2 病死率 据表2统计可以看出, 第I阶段病死率高达40.52%, 第II阶段为17.17%, 第III阶段为10.36%(表1)。

2.3 手术率和手术与病程的关系 第I阶段的手术率高达77.59%, 以早期手术为主, 3 d内手术(47例)为52.22%。第II阶段手术率为54.54%, 3 d内手术率为35.18%。第III阶段手术率19.07%, 大幅下降, 3 d内手术者仅占6.12%(表2)。

3 讨论

除传统的“胰酶的激活与自身消化”理论及“共同通道学说”外, 近10年发展了以下学说: (1)白细胞过度激活: 多种细胞因子和炎症递质级联反应学说。促炎细胞因子反应与抗炎细胞因子反应在AP的早期便发挥了作用。AP急性反应期在胰酶的刺激下, 单核-巨噬细胞系统异常激活, 释放大促炎细胞因子(如TNF, IL-6等)进入胰腺组织和血液循环, 引发其他炎症递质产生“瀑布样”连锁放大反应, 导致机体细胞因子网络失衡, 并发全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)^[3]。因此, 促炎细胞因子的过度释放是AP时胰腺局部出血、坏死和远处脏器损伤的中心环节, 也是AP早期死亡的主要原因之一^[4]。(2)肠道细菌移居-胰腺组织继发感染学说: 重症急性胰腺炎胃肠道损伤在SAP的病理生理过程中起关键性作用。胃肠蠕动减弱或消失, 肠道内细菌和毒素排泄障碍, 肠道内细菌过度生长繁殖, 造成菌群失调, 引起细菌易位和毒素的吸收。肠运动抑制将导致肠内容物停滞, 菌群失调和细菌上移导致细菌更易于黏附在肠上皮表面进而穿透上皮进入体内^[5]。肠内容物推进停止和细菌发酵产气可增加肠内压力增加, 导致黏膜血流减少和黏膜破损, 最终破坏黏膜的屏障功能, 因此肠道微生态和胃肠动力的改变是AP发病过程中的早期事件。(3)胰腺微循环障碍学说: 上世纪九十年代华西医院周总光 *et al* 揭示了胰腺微循环的独特结构, 提出胰腺小叶内动脉属终动脉的特点是胰腺对缺血高度敏感及AP时胰腺小叶内灶性坏死的形态学基础^[6]。后来的实验结果印证胰腺微循

表 1 SAP并发症发生率和病死率比较(%)

阶段	<3 d	3-14 d	>14 d	Total
并发症				
I	31.89(37/116)	37.38(40/107)	37.50(33/88)	
II	19.19(19/99)	36.08(35/97)	18.18(16/88)	
III	4.52(93/2056)	18.01(266/2038)	12.02(227/1895)	
病死率				
I	2.76(9/116)	17.76(19/107)	21.59(19/88)	40.52(47/116)
II	2.02(2/99)	9.28(9/97)	6.82(6/88)	17.17(17/99)
III	0.88(18/2056)	7.02(143/2038)	2.70(52/1895)	10.36(213/2056)

环障碍作用的一种持续损伤机制贯穿于AP发展的整个过程, 是水肿性胰腺炎向出血性胰腺炎转化的重要因素, 该学说为中药的活血化瘀法提供了佐证。

在传统中西医结合治疗的基础上, 我们进一步完善和发展了诊疗方法和理念。中西医结合科黄宗文教授将重症急性胰腺炎的诊疗归纳为“早、准、狠、稳”, 这一精髓贯穿SAP的诊治全过程。在诊断上综合运用了Ranson、APACHE-II、Balthazar等评分系统。

在实践中提出了以下理念: (1)辩证动态看待血清淀粉酶的变化。(2)重视影像学检查结果, 尤其是CT检查。CT被公认为是目前诊断SAP的金标准, 动态增强CT扫描是目前急性胰腺炎诊断、分期、严重程度分级及并发症诊断最准确的影像学方法, 宋彬 *et al*^[7]评价其总敏感性为87%, 对胰腺坏死的发现率为90%, 特别是通过对胰腺实质和胰周坏死的定性和定量分析可判断其预后。(3)胰腺坏死程度与病情轻重不完全成正相关。治疗理念的突破: (1)将液体复苏视为早期治疗的关键措施, 中心静脉压、尿量的变化作为观察补液疗效的重要指标。(2)补液中强调恢复电解质和血糖的平衡, 其中控制血糖的原则是宜高不宜低, 控制范围在<11 mmol/L, 以6-9 mmol/L最佳。(3)选择穿透血-胰屏障较好的抗生素如: 氟喹诺酮、三代头孢+甲硝唑(替硝唑)、泰能等, 最好根据药敏试验选择。(4)在营养支持上早期使用TPN(全胃肠外营养), 待肠道功能恢复后尽早给予肠内营养。

“益活清下”法是在中医热病观理论指导下创立的, 其内容包括益气救阴、活血化瘀、清热解毒、通里攻下法^[8]。SAP辨证分型为肝郁气滞、肝胆湿热、脾胃实热、蛔虫上扰等四型, 分别以大柴胡汤、大柴胡汤合龙胆泻肝汤、柴芩承气汤、大柴胡汤合乌梅汤结合上述分期加

表 2 三个阶段SAP的手术率和手术与病程的关系

阶段	n	手术例数			手术率 (%)
		<3 d	3-14 d	>14 d	
I	116	47	25	18	77.5(90/116)
II	99	19	17	18	54.54(54/99)
III	2056	24	57	311	19.07(392/2056)

减化裁治疗。上述汤剂采用*po*、胃管注入和灌肠等手段治疗。加用代表中医益气救阴、活血化瘀法的中药针剂生脉注射液、丹参注射液或灯盏细辛注射液给予静脉滴注。肠麻痹明显者以新斯的明穴位注射两侧足三里。病程初期胰周蜂窝织炎明显者, 在体表肿胀处每日1-2次外敷行气活血止痛的外敷中药六合丹(大黄、黄柏、白芨等七味药)^[9]。“益活清下”法的关键是通里攻下, 其中柴芩承气汤为主要方剂^[10]。

必须加紧对以下热点和难点的研究, (1)爆发性胰腺炎的治疗: FAP是SAP中的极重类型, 早期ARDS、肾功能衰竭及休克的发生率极高, 明显高于SAP, 是当前临床工作的难点, 其发生的机制尚有待于研究, 如能及时、准确的识别FAP, 正确掌握其早期和晚期的病理生理特点及其病死原因, 有针对性的治疗, 有望降低FAP及SAP的死亡率^[11]。(2)胰性脑病的治疗。(3)并发真菌感染的处理。(4)液体复苏中晶体与胶体的比例关系。(5)怎样恰当处理疼痛问题。(6)怎样解决腹内高压综合征的问题。(7)激素的应用指征和时机, 尤其防止其使用引起消化道出血的副作用^[12]。

不难看出华西医院以中西医结合治疗重症胰腺炎, 迄今27年, 尤其是近10年, 成就显著。在大量病例研究基础上成功地降低了并发症发生率、中转手术率和死亡率。其病例数量之多, 病死率之低, 属国际领先水平^[13-18]。中医热病理论

■应用要点

以整体观、辨证观和热病观为指导, 以热病理论概括重症急性胰腺炎的病机证治, 正确使用益活清下法为主的中西医结合疗法, 有效阻断其病机发展, 控制胰腺及胰周器官的炎症, 防治多器官功能衰竭和胰周脓肿等并发症的发生和发展。

■同行评价

本文样本量较大,数据可靠,具有较强的临床参考价值。

很好地诠释了以益活清下为主的中西医结合治疗重症急性胰腺炎方法有很强的可操作性,与现代医学的新技术相得益彰,互补性强。

4 参考文献

- 1 Toouli J, Brooke-Smith M, Bassi C, Carr-Locke D, Telford J, Freeny P, Imrie C, Tandon R. Guidelines for the management of acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17 Suppl: S15-S39
- 2 刘续宝, 蒋俊明, 黄宗文, 田伯乐, 胡伟明, 夏庆, 陈光远, 李全生, 袁朝新, 罗传新, 严律南, 张肇达. 中西医结合治疗重症急性炎的临床研究(附1376例报告). *四川大学学报(医学版)* 2004; 35: 204-2082
- 3 Makhija R, Kingsnorth AN. Cytokine storm in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002; 9: 401-410
- 4 Wereszczynska-Siemiatkowska U, Dabrowski A, Siemiatkowski A, Mroczko B, Laszewicz W, Gabryelewicz A. Serum profiles of E-selectin, interleukin-10, and interleukin-6 and oxidative stress parameters in patients with acute pancreatitis and nonpancreatic acute abdominal pain. *Pancreas* 2003; 26: 144-152
- 5 吴承堂, 黎洁良, 黄祥成, 齐德林. 中药清胰汤及双歧杆菌合剂对急性坏死性胰腺炎肠道细菌移位影响的比较研究. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 525-528
- 6 周总光, 程中, 舒晔. 胰腺微循环障碍与急性胰腺炎. *中华实用外科杂志* 1999; 19: 522-525
- 7 宋彬, 徐隽. 急性胰腺炎的CT评价. *中国普外基础与临床杂志* 2003; 10: 623-628
- 8 蒋俊明, 张瑞明, 黄宗文, 杨学海, 邹才华, 齐桂芬, 罗云, 迟焕海. 益活清下法治疗重症急性胰腺炎-附32例报告. *中国中西医结合外科杂志* 1994; 1: 9-12
- 9 张肇达. 急性胰腺炎. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 126
- 10 黄宗文, 夏庆, 陈光远, 唐文富, 谢守勇, 赵健蕾, 蒋俊明. 早期应用柴芩承气汤治疗重症急性胰腺炎临床疗效分析. *成都中医药大学学报* 2003; 26: 25
- 11 Fölsch UR, Nitsche R, Lüdtk R, Hilgers RA, Creutzfeldt W. Early ERCP and papillotomy compared with conservative treatment for acute biliary pancreatitis. The German Study Group on Acute Biliary Pancreatitis. *N Engl J Med* 1997; 336: 237-242
- 12 薛平, 黄宗文, 张鸿彦, 郭佳, 赵建蕾, 郑晓梅. 暴发性胰腺炎67例. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 680-681
- 13 Cavallini G, Frulloni L, Bassi C, Gabbriellini A, Castoldi L, Costamagna G, De Rai P, Di Carlo V, Falconi M, Pezzilli R, Uomo G. Prospective multicentre survey on acute pancreatitis in Italy (ProInf-AISP): results on 1005 patients. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 205-211
- 14 Maraví-Poma E, Gener J, Alvarez-Lerma F, Olaechea P, Blanco A, Domínguez-Muñoz JE; Spanish Group for the Study of Septic Complications in Severe Acute Pancreatitis. Early antibiotic treatment (prophylaxis) of septic complications in severe acute necrotizing pancreatitis: a prospective, randomized, multicenter study comparing two regimens with imipenem-cilastatin. *Intensive Care Med* 2003; 29: 1974-1980
- 15 Luiten EJ, Hop WC, Lange JF, Bruining HA. Controlled clinical trial of selective decontamination for the treatment of severe acute pancreatitis. *Ann Surg* 1995; 222: 57-65
- 16 Fagniez PL, Pezet D, Millat B, Cherqui D, Dziri C, Létoublon C, Jaeck D, Rotman N. Surgical treatment of severe acute pancreatitis. Results of a prospective multicenter study of the Associations of Research in Surgery. *Gastroenterol Clin Biol* 1994; 18: 932-937
- 17 金世龙, 张天迹, 顾红光, 王仁云, 廖维健. 急性重症胰腺炎的致死性并发症分析. *第三军医大学学报* 2002; 24: 450-452
- 18 张代成, 王秉均, 康迎新. 271例重症胰腺炎手术治疗时机和指征研究. *兰州医学院学报* 2002; 28: 38-39

编辑 程剑侠 电编 何基才

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

● 消息 ●

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.

肛肠腔内导入复合能治疗仪治疗溃疡性结肠炎30例

穆剑玲, 侯振江, 徐湘江

穆剑玲, 沧州医学高等专科学校 河北省沧州市 061001
侯振江, 沧州医专附属医院 河北省沧州市 061001
徐湘江, 沧州市中西医结合医院 河北省沧州市 061001
河北省科技攻关项目, No. 07276421
通讯作者: 穆剑玲, 061001, 河北省沧州市迎宾大道西高教区,
河北沧州医学高等专科学校. mjl888782@sohu.com
电话: 0317-8919580 传真: 0317-5508007
收稿日期: 2007-09-06 修回日期: 2007-10-30

Efficacy of therapeutic instrument inducing combined energies into the anus on chronic ulcerative colitis: an analysis of 30 cases

Jian-Ling Mu, Zhen-Jiang Hou, Xiang-Jiang Xu

Jian-Ling Mu, Cangzhou Medical College, Cangzhou 061001, Hebei Province, China
Zhen-Jiang Hou, Affiliated Hospital, Cangzhou 061001, Hebei Province, China
Xiang-Jiang Xu, the Hospital of Chinese-Western Combined Medicine, Cangzhou 061001, Hebei Province, China
Supported by: the key Technologies Research and Development program of Hebei Province, No. 07276421
Correspondence to: Jian-Ling Mu, Cangzhou Medical College, Cangzhou 061001, Hebei Province, China. mjl888782@sohu.com
Received: 2007-09-06 Revised: 2007-10-30

Abstract

AIM: To explore the clinical therapeutic effects of therapeutic instrument inducing combined energies into the anus on chronic ulcerative colitis (UC).

METHODS: Sixty patients with UC were randomly divided into two groups. There were 30 in the treated group, who were treated with the therapeutic instrument inducing combined energies into the anus. There were 30 patients in the control group, who received regular drugs. The two groups were compared after 3 and 12 mo.

RESULTS: In the treated group after 3 mo, 25 patients were cured (completely relieved), 3 had improvements, and 2 responded well. The improvement rate was 100% and the cure rate was 83.3%. In the control group, 9 patients were cured, 10 had improvements, 5 responded well, and 6 showed no improvement. The improve-

ment rate was 76.6% and the cure rate was 30%. The improvement rate for the two groups showed a significant difference ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The overall improvement rate and cure rate for the two groups after 12 mo was significantly different by the χ^2 test ($P < 0.01$). No recurrence was observed in the 25 cured patients treated with the therapeutic instrument.

CONCLUSION: The treatment has obvious curative effects on UC. The instrument is inexpensive, safe and comfortable with no adverse effects.

Key Words: Ulcerative colitis; Therapeutic instrument; Physical therapy

Mu JL, Hou ZJ, Xu XJ. Efficacy of therapeutic instrument inducing combined energies into the anus on chronic ulcerative colitis: an analysis of 30 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(33): 3553-3556

摘要

目的: 探讨肛肠腔内导入复合能治疗仪治疗慢性溃疡性结肠炎(UC)的临床疗效。

方法: 60例UC患者随机分为2组, 治疗组30例, 使用肛肠腔内导入复合能治疗仪治疗。对照组30例, 用常规药物治疗, 分别于3 mo和维持治疗12 mo比较。

结果: 治疗组3 mo临床治愈(完全缓解)25例, 显效3例, 有效2例, 无效0例, 总有效率100%, 治愈率83.3%。对照组3 mo临床治愈9例, 显效10例, 有效5例, 无效6例, 总有效率76.6%, 治愈率30%。两组有效率、治愈率有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$), 12 mo两组总有效率和治愈率比较也均有显著性差异($P < 0.01$)。治疗组25例患者治愈, 1年之内无复发。

结论: 肛肠腔内导入复合能治疗仪对溃疡性结肠炎的缓解治疗和维持缓解状态的疗效明显优于药物治疗, 是治疗溃疡性结肠炎较好的方法。

关键词: 溃疡性结肠炎; 复合能治疗仪; 物理疗法

穆剑玲, 侯振江, 徐湘江. 肛肠腔内导入复合能治疗仪治疗溃疡性结肠炎30例. *世界华人消化杂志* 2007;15(33):3553-3555
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3553.asp>

■背景资料

目前, UC是一种临床难治之病, 临床上有慢性迁延, 反复发作, 较难根治的特点, 需长期维持缓解治疗。探索疗效高、无副作用的疗法, 是当前急需解决的问题。

■研发前沿

本文使用肛肠腔内导入复合能治疗UC目前尚无报道,疗效优于常用药物疗法,属于技术创新.治疗机制有待于进一步研究.

0 引言

溃疡性结肠炎(UC)是难治性肠道炎症性疾病,病因不明确,治疗主要采用柳氮磺胺吡啶、糖皮质激素和免疫抑制剂.这些药长期服用对人体免疫系统有不同程度的影响,停药后复发率高,因此UC的缓解治疗和维持缓解状态的治疗仍是一个难题.如何提高UC缓解治疗和维持缓解状态治疗的疗效,降低不良反应,成为临床亟待解决的难题.肛肠腔内导入复合能治疗仪是由微电脑控制的棒状腔内电极自肛门插入直肠治疗疾病的一种新型仪器,其特点是置于直肠腔内的电极能同步实现电、热、磁综合治疗和电疗收缩肌肉产生的按摩功能,且有两个热电式片状外电极配合治疗增强疗效,对人体下腹部炎症性疾病有较好的治疗作用.我们用该仪器对UC进行缓解治疗和维持缓解状态治疗获得良好疗效,无不良反应.本文对该仪器治疗UC与药物疗法进行比较,现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 选取UC患者60例,男28例,女32例,年龄18-66(平均年龄36.5)岁,病程均为两年以上,临床诊断符合2000年成都全国炎症性肠病学术研讨会制定的诊断标准^[1].全部患者均行纤维结肠镜检查及病理组织活检确诊,排除细菌性痢疾、阿米巴痢疾、慢性血吸虫病、肠结核等感染性结肠炎及结肠克隆病、缺血性结肠炎、放射性结肠炎等.临床表现:腹泻60例,大便次数4-16次/d,腹痛51例,脓血便48例.结肠镜检查:UC患者轻度32例,中度28例,肠黏膜充血水肿46例,糜烂出血及溃疡形成50例,假息肉形成16例.

1.2 方法 60例患者随机分为两组.治疗组30例,选择肛肠腔内导入复合能治疗仪治疗,停止使用药物.对照组30例,进行常规药物治疗.使用仪器时,打开电源开关,患者屈膝仰卧位将内电极治疗棒套上导电橡胶外套,套外涂导电润滑剂后缓慢插入肛肠5-7 cm,2个片状外电极分别置于腹部关元穴和腰部下方中髂穴区域.内电极通过人体与外电极组成导电回路,内电极温度设为41℃,磁感应强度为0.3-0.4 T.外电极温度由患者感觉温热合适随时分级调节.选择处方“1”,脉冲强度随时调节,由患者感觉舒适为好,50 min/次,2次/d.症状减轻后(大便1-3次/d、成形、无血或偶有血丝)大约治疗30 d改为:50 min/次,1次/d.治疗约60天后观察症状改善程度逐渐减少治疗次数(3-5次/wk).对照组使用常规药物治疗,轻度UC患者选用柳氮磺胺吡啶3-4

g/d,分次po,或用相当剂量的5-氨基水杨酸制剂.病变分布于远段结肠的患者酌用柳氮磺胺吡啶栓剂0.5-1 g,中度UC患者用上述等剂量水杨酸类制剂治疗,反应不佳者适当加量或改服激素,用泼尼松30-40 mg/d,分次po.

3 mo后治疗组30例患者依然用复合能治疗仪治疗和维持缓解治疗.对完全缓解(临床治愈)者减少治疗次数(2-3次/wk),以维持缓解状态,防止复发.没有完全缓解者继续治疗1-2次/d.对照组用柳氮磺胺吡啶继续缓解治疗和维持缓解治疗,完全缓解者减少药量.2组患者继续维持治疗12 mo观察结果,12 mo内治愈者有复发现象或病情恶化者记为无效.

临床治愈(完全缓解):自觉症状消失,大便常规正常,结肠镜复查黏膜充血水肿、溃疡消失. **显效:**临床症状基本消失,结肠镜复查,黏膜充血水肿消失或溃疡面缩小. **有效:**临床症状好转,结肠镜检查黏膜病变有所好转. **无效:**经治疗后,临床症状、内镜复查无改善.

统计学处理 两组在年龄、病程、病情程度、疗程、病变部位情况等构成方面差别的比较以及两组总有效率和治愈率的比较均采用 χ^2 检验.

2 结果

两组在年龄、病程、病情程度、疗程、病变部位情况等构成方面差别的比较,无统计学意义($P>0.05$).治疗组与对照组UC疗效比较结果见表1.3 mo后两组总有效率比较,有显著性差异($P<0.05$);两组治愈率比较,有显著性差异($P<0.01$).药物组中3例患者因药物副作用不能坚持长期用药,结果无效.治疗组无副作用,治疗组中有15例曾用过多种药物治疗虽有效,但容易反复发作,4例自述药物治疗基本上无效.这19例患者自述仪器治疗比药物治疗见效快、疗效好,在仪器治疗过程中,患者感到舒适,仪器治疗后1-7 d,患者的睡眠、食欲、精力、腹痛、排便次数和质量、出血得到很大的改善.因此患者能够坚持使用仪器全程治疗,达到临床治愈的目的.12 mo后两组总有效率比较,有非常显著性差异($P<0.01$).两组治愈率比较,有非常显著性差异($P<0.01$).治疗组中完全缓解(治愈)患者25例无1例复发,2例有效者变为显效;对照组完全缓解患者9例中有2例复发.显效患者10例有3例复发,有1例无效患者变为有效,有3例由于副作用不能坚持按要求服药,无效.

3 讨论

UC是直肠与结肠部位一种原因不明,可能与自身免疫有关的炎症性肠病,以腹泻、黏液脓血便、腹痛为主要症状的消化道疾病。结肠黏膜呈慢性炎症和溃疡形成,严重者可有发热及肠外表现,如关节炎、虹膜炎、皮肤结节性红斑等,并发症有结肠大出血、穿孔、癌变等,被WHO列为现代难治病之一。近年来,该病的发病率有明显增高趋势,我国的文献报道颇多,也显示该病的发病率明显增加。临床资料显示^[2],患者肠系膜血管可出现微梗死,且发生血栓概率比正常人高。大部分UC患者病情缓慢,有反复发作的趋势,需维持治疗较长时间^[1]。目前西药治疗主要采用水杨酸类药物及糖皮质激素等进行消炎、止血、止泻。其中柳氮磺吡啶被认为是治疗慢性结肠炎的首选药物,但疗效往往不尽如人意^[4]。柳氮磺胺吡啶口服后大部分到达结肠,经肠道细菌分解为5-氨基水杨酸(5-)和磺胺吡啶。5-是其主要治疗成分,其滞留在肠内与肠上皮接触而发挥抗炎作用。但因含有磺胺成分,不良反应发生率较高,少数患者因此而减量或停药,使临床应用受限^[5]。因此,探索治疗UC的新方法,适合长期维持治疗且无副作,仍是当前需要解决的问题。

根据理疗理论,仪器通过综合物理疗法,使电、热、磁和按摩多种物理能量同时作用于人体病变部位附近,改善机体局部及全身的代谢,促进组织细胞修复,影响各种酶的活性,调节神经内分泌机能,调整机体免疫功能,可很快缓解UC患者的腹痛、腹泻及便血等症状。坚持3 mo的治疗,可以使UC患者的结肠病变从量变到质变,达到临床治愈(完全缓解)。

UC症状缓解后,应继续维持治疗。维持治疗的时间尚无定论,至少应维持1年。近年来愈来愈多的作者主张长期维持^[6]。尽管大多数UC患者接受过柳氮磺吡啶(SASP)或美沙拉嗪(mesalazine, 5-ASA)的维持缓解治疗,但其1年内复发率仍高达50%^[7]。而仪器治疗维持UC缓解1年内没有1例复发,表明肛肠腔内导入复合能治疗仪对UC稳定缓解状态的治疗具有良好的效果。中医原理: UC患者脾肾阳虚为发病之本,湿热为致病之标。许雅萍^[8]采用中药温肾健脾法治疗结肠炎取得了较好的疗效。仪器内外电极在相应的部位进行综合物理治疗,相当于在会阴、长强、关元、中髎等穴位施加电针与热灸。其中长强穴的作用既治疗泄泻、痢疾、

表 1 治疗组与对照组UC疗效

分组	3 mo		12 mo	
	治疗组	对照组	治疗组	对照组
<i>n</i>	30	30	30	30
治愈(<i>n</i>)	25	9	25	7
显效(<i>n</i>)	3	10	5	7
有效(<i>n</i>)	2	5	0	6
无效(<i>n</i>)	0	6	0	10
总有效率(%)	100	76.6	100	66.6
治愈率(%)	83.3	30	83.3	23.3

便秘、便血、痔疮等,又可温肾升阳。中髎穴功能作用是疏导水液,通络除湿。对以上诸穴同步施术,对整体调节UC患者的脏腑功能,改善UC患者的脾肾阳虚证状、湿热症状,恢复肠功能具有很好的作用。UC患者病机为邪壅肠中,脉络淤阻,局部病理变化为血瘀。血瘀在溃疡性结肠炎的发病中起十分重要的作用。局部病理检查可以看到微血栓形成,外周血可出现高凝状态^[9]。中医治疗结肠炎的原则是坚持化瘀止血,而不用收涩止血^[10],化瘀生新,标本兼治^[11]。仪器腔内电极的热和磁可改善结肠病变部位的微循环,活血化淤,促进溃疡面的愈合。

目前尚没有用纯物理疗法治疗慢性结肠炎的报道。用该仪器对结肠炎是一种创新,其治疗机制有待于进一步研究。

4 参考文献

- 中华医学会消化病学分会. 对炎症性肠病诊断治疗规范的建议. 中华消化杂志 2001; 21: 236-239
- 刘建军, 王吉耀. 血小板激活因子与炎症性肠病. 胃肠病学与肝病学杂志 1999; 8: 92-93
- 金丹, 胡江鸿. 中西医结合治疗溃疡性结肠炎46例. 海南医学 2006; 17: 100-101
- 张东坡. 加减参苓白术散治疗慢性结肠炎65例临床观察. 实用中西医结合临床 2007; 7: 48
- 荣家慧. 丹参注射液和中药保留灌肠辅助治疗溃疡性结肠炎54例疗效分析. 中国实用医药 2007; 2: 52-53
- 2000年全国炎症性肠病学术研讨会成都. 对溃疡性结肠炎治疗的建议. 新医学 2005; 36: 263
- 韩英. 溃疡性结肠炎的临床维持缓解治疗评价. 中国医院用药评价与分析 2004; 4: 338-341
- 许雅萍. 温肾健脾法治疗慢性结肠炎. 浙江中医学院学报 1995; 19: 24
- 魏艳静, 卞红磊, 武会珍. 溃疡性结肠炎患者血小板功能状态的研究. 上海医学 2004; 27: 202-203
- 王长洪, 陆宇平, 王立新, 杨卓, 麻树人, 陈山泉, 刘杨, 高文艳, 林一帆, 朱虹. 中西医结合加内镜介入治疗溃疡性结肠炎126例临床观察. 中医杂志 2006; 47: 112-114
- 王小流. 参灵白术散加六神丸治疗慢性非特异性溃疡性结肠炎96例. 河南中医 2002; 22: 40

■同行评价
本文内容新颖, 结果可靠, 对临床工作有一定的指导意义。

编辑 李军亮 电编 郭海丽

阑尾切除与克罗恩病的关系

刘旭, 蔡小鹏, 田丰, 董卫

刘旭, 蔡小鹏, 田丰, 中国医科大学附属盛京医院消化内科
辽宁省沈阳市 110004

董卫, 中国医科大学附属第一医院临床流行病学教研室 辽宁省
沈阳市 110001

通讯作者: 刘旭, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属盛
京医院消化内科. valentine1120@126.com

电话: 024-83956986

收稿日期: 2007-06-21 修回日期: 2007-11-17

Appendectomy and Crohn's disease

Xu Liu, Xiao-Peng Cai, Feng Tian, Wei Dong

Xu Liu, Xiao-Peng Cai, Feng Tian, Department of Gastro-
enterology, Shengjing Hospital, China Medical University,
Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Wei Dong, Department of Clinical Epidemiology, First
Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang
110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Xu Liu, Department of Gastroenterolo-
gy, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang
110004, Liaoning Province, China. valentine1120@126.com

Received: 2007-06-21 Revised: 2007-11-17

Abstract

AIM: To identify the relationship between appendectomy and Crohn's disease and the pathogenesis of Crohn's disease.

METHODS: We performed a meta-analysis of case-control studies on the relationship between appendectomy and Crohn's disease published domestically and abroad from January 1987 to May 2007.

RESULTS: Twelve case-control studies collectively gathered evidence from 11 058 patients and 784 440 controls. The results from the individual studies gave an overall odds ratio (OR) of 1.66 [95% confidence interval (CI) 1.32-2.09]. Stratification indicated a significant difference between the incident (OR = 1.22, 95% CI 0.77-1.95) and prevalent cases (OR = 1.82, 95% CI 1.38-2.14), and between the childhood group (OR = 1.16, 95% CI 0.94-1.44) and adult groups (OR = 2.15, 95% CI 1.85-2.50).

CONCLUSION: The meta-analysis suggests there is a positive association between appen-

dectomy and Crohn's disease. Further studies are needed to establish whether a causal relationship exists.

Key Words: Appendectomy; Crohn's disease; Meta-analysis; Case-control studies

Liu X, Cai XP, Tian F, Dong W. Appendectomy and Crohn's disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(33): 3556-3560

摘要

目的: 探讨阑尾切除与克罗恩病的关系以及克罗恩病可能的发病机制。

方法: 对1987-01/2007-05公开发表的关于阑尾切除与克罗恩病关系的病例对照研究进行Meta分析。

结果: 共纳入12个病例对试验, 累积病例11 058例, 对照784 440例。整体优势比为1.66 (95%可信区间1.32-2.09)。分层分析显示新发患者组(优势比1.22, 95%可信区间0.77-1.95)与患病患者组(优势比1.82, 95%可信区间1.38-2.14), 儿童组(优势比1.16, 95%可信区间0.94-1.44)与成人组(优势比2.15, 95%可信区间1.85-2.50)之间差异显著。

结论: 阑尾切除与克罗恩病的发生呈正相关。

关键词: 阑尾切除; 克罗恩病; Meta分析; 病例对照试验

刘旭, 蔡小鹏, 田丰, 董卫. 阑尾切除与克罗恩病的关系. *世界华人消化杂志* 2007;15(33): 3556-3560

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3556.asp>

0 引言

克罗恩病(Crohn's disease, CD)是一种病因不清楚的胃肠道慢性炎症肉芽肿性疾病, 其发病率在我国有逐年上升的趋势。近年来, 克罗恩病的病因学研究受到了人们的普遍关注。经过研究发现, 许多环境因素可能与克罗恩病的发生有关, 包括吸烟、阑尾切除、饮食因素、肠道感

■背景资料

近年来, 克罗恩病发病率在我国有逐年上升的趋势, 克罗恩病的病因学研究受到了人们的普遍关注。

■研发前沿
阑尾切除与克罗恩病的关系引人注意,因为他可能为阐明克罗恩病的发病机制提供重要线索。

染、口服避孕药和社会经济因素等。其中,阑尾切除与克罗恩病的关系更加引人注意,因为他可能为阐明克罗恩病的发病机制提供重要线索。

1 材料和方法

1.1 材料 1987-01/2007-05公开发表的关于阑尾切除与克罗恩病关系的病例对照试验。

1.2 方法

1.2.1 数据库检索:运用自由词“Crohn's disease”或“inflammatory bowel disease”联合“appendicectomy”或“appendectomy”对MEDLINE数据库、Cochrane临床试验中心登记库和EMBASE数据库进行检索,运用关键词“克罗恩病”或“炎性肠病”,联合“阑尾切除”、“阑尾炎”、“病因学”或“病例对照试验”对中国生物医学文献数据库(CBM)和中国医院知识仓库(CHKD)进行检索。

1.2.2 文献入选标准: (1)1987-01/2007-05公开发表的关于阑尾切除与克罗恩病关系的病例对照试验, (2)文献提供OR值和95%可信区间(confidence interval, CI)或根据文献提供的数据可以转化为OR值和95%可信区间, (3)各文献所研究的问题和研究方法相似, (4)对照组的来源是一般人群或临床非炎性肠病患者, (5)阑尾切除在克罗恩病发生之前。

1.2.3 文献排除标准: (1)重复发表的文献或不能提取统计学内容的研究, (2)病例对照试验质量差、报道信息少而无法利用的文献。

1.2.4 资料提取: 由2名作者各自独立地对入选研究进行资料评价和摘录, 事先确定提取内容, 提取结果出现差异时经讨论决定。

统计学处理 对资料进行一致性检验, 存在异质性者选用随机效应模型计算效应, 合并OR值的点估计和区间估计。反之则采用固定效应模型计算效应, 合并OR值的点估计和区间估计。数据处理采用RevMan4.3完成。

2 结果

2.1 文献基本情况 根据文献的入选和排除标准, 纳入Meta分析文献12篇, 均为外文文献。累计病例组11 058例, 对照组784 440例。文献的数据、特征总结见表1和表2。

2.2 阑尾切除与克罗恩病发生的Meta分析

2.2.1 Meta分析: 将符合入选标准的12篇文献进行Meta分析, 整体OR值为1.66, 95% CI为1.32-2.09(表3)。

表1 文献数据

作者	病例组		对照组	
	阑尾切除数(%)	总数	阑尾切除数(%)	总数
Gilat ^[1]	41(16.6)	247	52(10.5)	494
Gent ^[2]	14(10.8)	130	10(7.7)	130
Russel ^[3]	39(11.3)	344	24(7.0)	344
Breslin ^[4]	19(14.2)	134	33(17.4)	189
Koutroubakis ^[5]	19(25)	76	10(13.2)	76
Thompson ^[6]	0(0)	26	15(7.2)	207
Reif ^[7]	50(19.2)	260	95(10.5)	903
Sicilia ^[8]	13(12.6)	103	10(9.7)	103
Kurina ^[9]	162(3.2)	5023	16 181(2.2)	749 322
Frisch ^[10]	98(2.2)	4498	194(0.9)	22 488
Garcia	8(4.7)	171	469(4.69)	10 000
Rodriguez ^[11]				
Firouzi ^[12]	5(10.9)	46	4(2.2)	184
合计	468(4.2)	11 058	17 097(2.18)	78 4440

2.2.2 亚组分析: (1)将病例对照试验根据一般病例对照试验或巢式病例对照试验进行亚组分析。一般病例对照试验采用固定效应模型进行Meta分析, OR值为1.65, 95% CI为1.34-2.03。巢式病例对照试验采用随机效应模型进行Meta分析, OR值为1.61, 95% CI为1.01-2.56。 (2)将病例对照试验根据对照组是一般人群或临床患者进行亚组分析。对照组为一般人群时采用固定效应模型进行Meta分析, OR值为1.75, 95% CI为1.32-2.33。对照组为临床患者时采用随机效应模型进行Meta分析, OR值为1.72, 95% CI为1.20-2.47。 (3)将病例对照试验根据克罗恩病患者为新发患者或患病患者进行亚组分析。新发患者组采用固定效应模型进行Meta分析, OR值为1.22, 95% CI为0.77-1.95。患病患者组采用随机效应模型进行Meta分析, OR值为1.82, 95% CI为1.38-2.14。 (4)将病例对照试验根据研究对象阑尾切除时的年龄分为儿童组、成人组, 进行亚组分析。其中儿童组定义为阑尾切除时, 患者年龄小于或等于20岁。成人组定义为阑尾切除时, 患者年龄大于20岁。儿童组采用固定效应模型进行Meta分析, OR值为1.16, 95% CI为0.94-1.44。成人组采用固定效应模型进行Meta分析, OR值为2.15, 95% CI为1.85-2.50。

3 讨论

我们对12个病例对照试验进行分析后得出的结论是, 阑尾切除与克罗恩病的发生呈正相关, 具

■创新盘点
国内外首次运用Meta分析的方法对阑尾切除与克罗恩病的关系进行分析。

表 2 文献特征

作者	病例/对照来源	匹配情况	是否新发病例	多因素分析	信息搜集方法
Gilat ^[1]	临床患者/胃肠道门诊患者以及骨科患者和一般人群	年龄、性别匹配	否	无	标准调查表
Gent ^[2]	临床患者/一般人群	年龄、性别匹配	否	无	标准调查表; 家访
Rusell ^[3]	临床患者/一般人群	年龄、性别匹配	含新发病例	吸烟	标准调查表; 病历
Breslin ^[4]	临床患者/骨科患者	年龄、性别、社会阶层匹配	否	无	标准调查表
Koutroubakis ^[5]	临床患者/一般人群	年龄匹配	否	家族史, 扁桃体切除	标准调查表
Thompson ^[6]	NSHD和NCDS队列中炎症性肠病患者/NSHD和者NCDS队列中非炎症性肠病患者	性别、社会阶层匹配(巢式病例对照试验)	否	无	医疗记录; 联系医师获取相关信息
Reif ^[7]	门诊患者/胃肠道门诊非炎症性肠病患者以及一般人群	年龄、性别、民族、学历匹配	否	无	会面调查
Sicilia ^[8]	临床患者/门诊患者(非消化、风湿科)	年龄、性别、城乡匹配	是	无	标准调查表; 病历
Kurina ^[9]	ORLS数据库中炎症性肠病患者/ORLS数据库中非炎症性肠病患者	年龄、性别、地域匹配(巢式病例对照试验)	否	无	医疗记录
Frisch ^[10]	VA ⁴ 医院电子医疗记录炎症性肠病患者/VA医院电子医疗记录非炎症性肠病患者	年龄、民族匹配(巢式病例对照试验)	否	无	医疗记录
Garcia Rodriguez ^[11]	GRPD新发炎症性肠病患者/GRPD非炎症性肠病患者	年龄、性别匹配(巢式病例对照试验)	是	吸烟	医疗记录
Firouzi ^[12]	临床患者/妇产科和骨科患者	年龄、性别匹配	否	吸烟、扁桃体切除、口服避孕药等	标准调查表

NSHD: the MRC National Survey of Health & Development of 1946; NCDS: the 1958 National Child Development Study; ORLS: the Oxford Record Linkage Study; VA: Veterans Affairs; GRPD: the General Practice Research Database.

有显著的统计学意义, 提示阑尾切除可能是克罗恩病发生的危险因素。

吸烟与克罗恩病的发生呈正相关^[8,13], 可能成为本研究最主要的混杂因素之一。在12个病例对照试验中有3个试验对吸烟这一混杂因素进行了详细的说明。通过使用多因素分析, 这3个试验都证实了控制吸烟这一混杂因素后, 阑尾切除与克罗恩病发生的关系并未因此改变^[3,11-12]。

其他的混杂因素如饮食因素、口服避孕药和社会经济因素也很难改变Meta分析的结果。其一, 他们与克罗恩病的关系并非像吸烟那样确定, 且关联强度不高。其二, 运用多因素分析控制口服避孕药或对社会经济因素进行匹配分组后, 并不能改变阑尾切除与克罗恩病发生的关系。

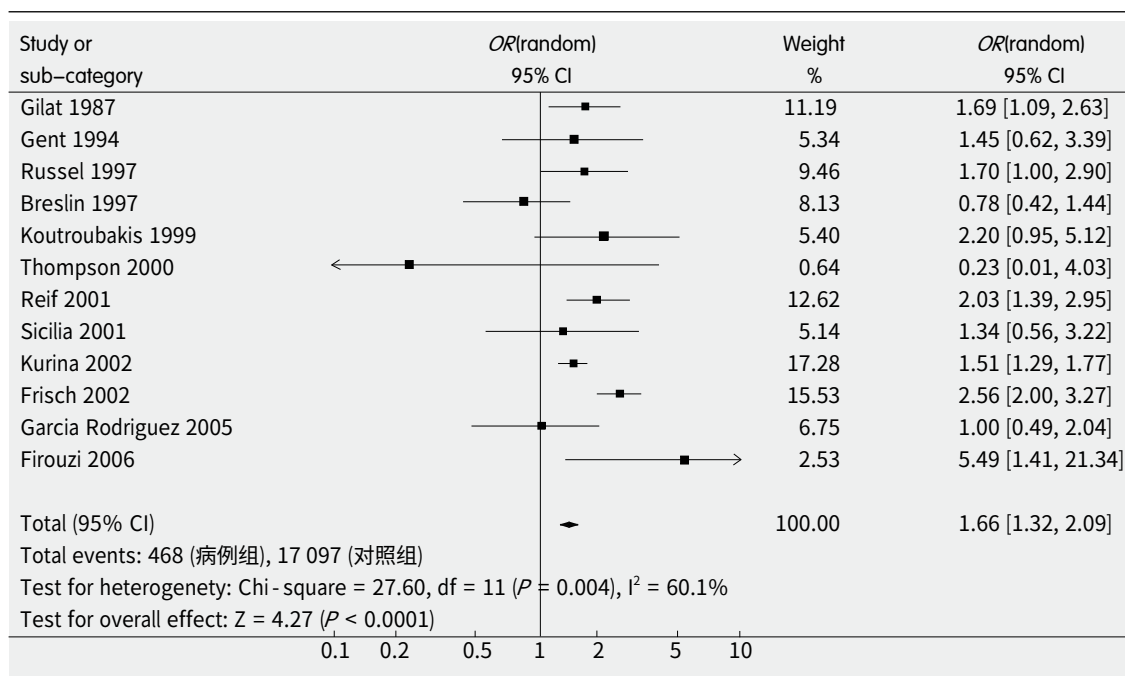
根据文献的基本特征, 将这12个病例对照

试验进行亚组分析发现, (1)尽管一般病例对照试验和巢式病例对照试验在信息搜集方法上存在明显差异以及前者存在更多回忆偏倚和观察者偏倚, 但这两种试验, 均得出阑尾切除与克罗恩病的发生呈正相关, 且关联强度相似。(2)对照组为一般人群或者临床患者并不会影响阑尾切除与克罗恩病发生的关系及其关联强度。(3)新发患者组并未达到显著的统计学意义, 而患病患者组达到显著的统计学意义。其一, 由于选择性偏倚, 患病患者组的临床病程更重, 会低估轻型病例以及非活动期病例。其二, 不能排除是由于新发病例组统计样本较小的原因(新发患者病例组为410人, 而患病患者病例组为10 594人)。(4)儿童组接近达到显著的统计学意义, 而成人组达到显著的统计学意义, 两者之间差异明显。这说明阑尾切除与克罗恩病发生的关系可能与

■应用要点

对今后分析阑尾切除与克罗恩病关系的临床试验提供方法学的指导,为进一步研究阑尾切除与克罗恩病的关系,阐明克罗恩病的发病机制指出方向。

表 3 12篇文献Meta分析结果



阑尾切除的年龄有关。

阑尾切除与克罗恩病发生呈正相关的原因可能有三: (1)阑尾可能是一种重要的免疫器官。阑尾切除后改变了机体,特别是肠黏膜的免疫调节机制,这可能与阑尾切除后克罗恩病发生率增高有关。家兔阑尾具有将浆细胞前体细胞植入肠道黏膜固有层的作用,对能产生IgA的前体细胞更为明显^[14]。但是对与克罗恩病发生相关的辅助T细胞1以及白细胞介素12等在阑尾切除后的变化情况,目前尚无动物及人体试验。(2)与克罗恩病发生呈正相关的是阑尾炎而非阑尾切除。这一点在以上12个病例对照试验中并未提及,但在Andersson *et al*^[15]列队试验中得到了证实。克罗恩病与体内辅助T细胞1和辅助T细胞2之间的平衡向辅助T细胞1倾斜有关。在孕妇中,阑尾炎的发病率减少可能与妊娠时体内辅助T细胞2的增加有关,提示阑尾炎可能与辅助T细胞1介导的免疫反应有关^[16]。这就解释了为什么阑尾炎与克罗恩病的发生呈正相关。但是,在西方,克罗恩病的发病率逐年升高而阑尾炎的发病率却呈下降趋势,这与我们所得结论相矛盾。可能因为阑尾炎发病机制具有多样性,仅一部分与克罗恩病相关。(3)由于将克罗恩病误诊为阑尾炎而予以阑尾切除。在两个病例对照试验中, Kurina *et al*^[9]和Frisch *et al*^[10]将阑尾切除距发生克罗恩病的时间予以分层分析发

现,在距发生克罗恩病1年时间内,病例组的阑尾切除率显著高于对照组。Kaplan *et al*^[17]在进行列队试验后,得到了相似的结论。但是在Andersson *et al*^[15]的列队试验中,除外距发生克罗恩病1年时间内的阑尾切除,仍得到阑尾切除与克罗恩病发生呈正相关的结论,并且其关联强度与本研究的结论基本相同。因此,阑尾切除与克罗恩病发生呈正相关是否由于将克罗恩病误诊为阑尾炎,有待更多病例对照试验和列队试验证实。

Meta分析作为一种观察性研究,不可避免地会受到混杂和偏倚的影响。虽然严格界定了文献纳入标准和排除标准,尽可能地减少了异质性的来源,并且通过一致性检验选择恰当的效应模型,但由于方法学应用的不同、研究设计的差异、文献质量的优劣、研究样本的大小,以及一些潜在混杂因素的存在,仍有可能出现不同质的情况。总之,通过本Meta分析初步明确了阑尾切除与克罗恩病的发生呈正相关。但要得出更准确的结果,仍有待于研究设计方法的改进和更多高质量研究。

4 参考文献

- 1 Gilat T, Hachohen D, Lilos P, Langman MJ. Childhood factors in ulcerative colitis and Crohn's disease. An international cooperative study. *Scand J Gastroenterol* 1987; 22: 1009-1024
- 2 Gent AE, Hellier MD, Grace RH, Swarbrick ET, Coggon D. Inflammatory bowel disease and

- domestic hygiene in infancy. *Lancet* 1994; 343: 766-767
- 3 Russel MG, Dorant E, Brummer RJ, van de Kruijs MA, Muris JW, Bergers JM, Goedhard J, Stockbrugger RW. Appendectomy and the risk of developing ulcerative colitis or Crohn's disease: results of a large case-control study. South Limburg Inflammatory Bowel Disease Study Group. *Gastroenterology* 1997; 113: 377-382
- 4 Breslin NP, McDonnell C, O'Morain C. Surgical and smoking history in inflammatory bowel disease: a case-control study. *Inflamm Bowel Dis* 1997; 3: 1-5
- 5 Koutroubakis IE, Vlachonikolis IG, Kapsoritakis A, Spanoudakis S, Roussomoustakaki M, Mouzas IA, Kouroumalis EA, Manousos ON. Appendectomy, tonsillectomy, and risk of inflammatory bowel disease: case-controlled study in Crete. *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 225-230
- 6 Thompson NP, Montgomery SM, Wadsworth ME, Pounder RE, Wakefield AJ. Early determinants of inflammatory bowel disease: use of two national longitudinal birth cohorts. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12: 25-30
- 7 Reif S, Lavy A, Keter D, Broide E, Niv Y, Halak A, Ron Y, Eliakim R, Odes S, Patz J, Fich A, Villa Y, Arber N, Gilat T. Appendectomy is more frequent but not a risk factor in Crohn's disease while being protective in ulcerative colitis: a comparison of surgical procedures in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 829-832
- 8 Sicilia B, Lopez Miguel C, Arribas F, Lopez Zaborras J, Sierra E, Gomollon F. Environmental risk factors and Crohn's disease: a population-based, case-control study in Spain. *Dig Liver Dis* 2001; 33: 762-767
- 9 Kurina LM, Goldacre MJ, Yeates D, Seagroatt V. Appendicectomy, tonsillectomy, and inflammatory bowel disease: a case-control record linkage study. *J Epidemiol Community Health* 2002; 56: 551-554
- 10 Frisch M, Gridley G. Appendectomy in adulthood and the risk of inflammatory bowel diseases. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 1175-1177
- 11 Garcia Rodriguez LA, Gonzalez-Perez A, Johansson S, Wallander MA. Risk factors for inflammatory bowel disease in the general population. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 309-315
- 12 Firouzi F, Bahari A, Aghazadeh R, Zali MR. Appendectomy, tonsillectomy, and risk of inflammatory bowel disease: a case control study in Iran. *Int J Colorectal Dis* 2006; 21: 155-159
- 13 Bernstein CN, Rawsthorne P, Cheang M, Blanchard JF. A population-based case control study of potential risk factors for IBD. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 993-1002
- 14 Dasso JF, Howell MD. Neonatal appendectomy impairs mucosal immunity in rabbits. *Cell Immunol* 1997; 182: 29-37
- 15 Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekblom A. Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2003; 124: 40-46
- 16 Andersson RE, Lambe M. Incidence of appendicitis during pregnancy. *Int J Epidemiol* 2001; 30: 1281-1285
- 17 Kaplan GG, Pedersen BV, Andersson RE, Sands BE, Korzenik J, Frisch M. The risk of developing Crohn's disease after an appendectomy: a population-based cohort study in Sweden and Denmark. *Gut* 2007; 56: 1387-1392

■同行评价
本文资料详实, 统计方法得当, 结论可信, 有一定的临床指导意义。

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

关于2006年度山西省期刊质量评估结果的通报

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