世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年2月18日; 15(5): 433-439
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

述评 EDITORIAL

抑制血管生成与胃癌治疗的研究进展

汤 涛, 王国斌

汤涛, 王国斌, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科 湖北省武汉市 430022
王国斌, 教授, 博士生导师, 主要从事胃肠病及腔镜外科的研究.
通讯作者: 汤涛, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 华中科技大学附属协和医院腹腔镜外科. tangtao0411@126.com
电话: 027-85351661
收稿日期: 2006-12-19 接受日期: 2007-01-07

Progress of antiangiogenesis in treatment of gastric carcinoma

Tao Tang, Guo-Bin Wang

Tao Tang, Guo-Bin Wang, Department of General Surgery, Union Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Correspondence to: Tao Tang, Department of General Surgery, Union Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. tangtao0411@126.com
Received: 2006-12-19 Accepted: 2007-01-07

Abstract
Angiogenesis provides nourishment for tumors, promoting tumor to grow rapidly while making tumor cells enter blood circulation, which enhances tumor metastasis. Suppression of tumor angiogenesis can inhibit the growth and metastasis of tumors significantly, and it has initially exhibited a satisfactory application perspective in various kinds of treatment experiment for gastric cancer. Tumor angiogenesis inhibitor will be hopeful for the treatment of gastric cancer.

Key Words: Gastric cancer; Angiogenesis; Combined therapy

Tang T, Wang GB. Progress of antiangiogenesis in treatment of gastric carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(5):433-439

摘要
血管生成为肿瘤生长提供了营养, 促进了肿瘤迅速增长, 同时也使肿瘤细胞进入血液循环, 促进了转移. 抑制血管生成能显著抑制肿瘤的生长及转移, 在胃癌的各种治疗实验已初步显示良好的应用前景, 有望成为胃癌治疗的新方法.

关键词: 胃癌; 新生血管; 综合治疗

汤涛, 王国斌. 抑制血管生成与胃癌治疗的研究进展. 世界华人消化杂志 2007;15(5):433-439
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/433.asp

0 引言
目前, 胃癌的治疗仍是以根治性手术切除为主, 辅以术前术后化疗的常规治疗模式. 虽然早期胃癌的治疗效果较为乐观, 但对进展期胃癌而言, 大多有血行和淋巴转移, 相当一部分患者确诊时已失去手术时机, 且胃癌对化疗不甚敏感, 化疗本身又有许多毒副作用, 故上述治疗方案难以取得满意疗效. 因此, 探讨胃癌生成及转移机制, 寻找新的治疗途径有着重要意义. 大量研究表明, 肿瘤的生长、转移和预后均与血管生成相关[1]. 肿瘤生长具有明确的血管依赖性, 肿瘤通过新生血管从宿主获取营养成分, 又经过血管向宿主输送肿瘤细胞, 增强肿瘤灶的远处转移能力[2]. 肿瘤血管生成是一个多因子参与的多步骤过程, 基本步骤包括: 肿瘤组织释放血管生成刺激因子; 血管周围细胞外基质重塑, 基膜降解; 内皮细胞增殖迁移; 新生血管形成. 阻断其中任何一步, 都将阻止肿瘤血管生成, 因此肿瘤的血管系统已成为一个崭新的抗肿瘤治疗靶点. 肿瘤血管生成抑制剂(tumor angiogenesis inhibitor, TAI)作用于肿瘤内皮细胞, 阻止其增殖, 迁移、出芽及形成新生血管, 并诱导不成熟内皮细胞趋向凋亡, 抑制肿瘤生成和转移, 具有良好的特异性和针对性. 近年来, 这类抑制剂的研究已取得新的进展, 有望成为抗肿瘤治疗的新方法, 也是目前胃癌治疗的研究热点之一, 本文就此方面作一综述.

1 血管生成因子与胃癌
1.1 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) VEGF是目前所知作用最强的促血管内皮生成的细胞因子[3]. 在血管生

■背景资料
1971年Folkman博士首次提出了关于肿瘤血管形成以及通过抗血管形成抑制肿瘤生长的假设, 认为早期肿瘤生长可以不依赖于新生血管的生长, 当肿瘤直径大于1-2 mm时, 简单扩散方式已经不能保证其生长所需要的氧和营养供应, 这时肿瘤细胞可以分泌多种刺激因子引起周围的血管内皮细胞增殖、迁移、血管基底膜及内皮细胞胞外基质的降解和毛细血管的形成等, 在肿瘤内形成新的毛细血管网为其提供重要的养料和氧气, 以保证肿瘤继续生长和转移. 肿瘤新生血管形成的所有这些过程都可以成为血管生成抑制剂作用的靶点. 抑制肿瘤血管生成治疗具有高效、抑瘤谱广、不易产生耐药和无明显毒副作用等优点. 目前有多种抑制血管生成的药物进入临床研究中.

■研发前沿
目前, 多数抑制血管形成的干预治疗还处于实验室研究阶段, 部分进入临床实验阶段. 鉴于肿瘤血管与正常组织血管在形态结构、特异性蛋白分子含量等方面的差异, 具有治疗针对性、靶向性更强的免疫治疗方法成为研究热点. 目前存在的问题有: (1)对自发性人类肿瘤的疗效是否与实验性动物肿瘤的疗效相似; (2)长期应用是否对人体产生毒副作用; (3)由于肿瘤血管生成受多种因子的调控, 针对单一因子或其受体进行治疗的效果有限, 甚至不够理想; (4)抗血管生成治疗的疗效评价尚无统一标准; (5)抗血管治疗肿瘤的最佳时间及剂量, 与化疗、放疗及多种分子靶向药物的联合应用尚待解决.

成与胃癌的研究中发现, VEGF能增加血管通透性, 有利于肿瘤细胞通过循环系统播散, 因此对肿瘤血管内皮细胞的增殖和迁移发挥重要作用[4]. VEGF可增加组织因子的产生, 直接改变内皮细胞基因表达, 进而调控蛋白水解, 并参与细胞间的黏附, 促进细胞浸润, 有利于血管形成. 同时VEGF能诱导蛋白水解酶、组织因子、基质胶原酶等的表达, 改变并降解细胞基质, 介导内皮细胞迁移和浸润, 有利于血管生成. 研究发现, VEGF在Ⅲ期及Ⅳ期胃癌中表达明显增高, 微血管密度(microvessel density, MVD)也明显增加[5], MVD与肿瘤生物学行为密切相关, 肿瘤生长到2-3 mm大小时, 即需要通过微血管获得营养, 在无血管时期肿瘤很少发生转移, 新生的微血管是肿瘤浸润和转移的第一站, 肿瘤微血管数量越多, 肿瘤细胞进入血液循环的机会越大. 肿瘤新生血管结构缺乏完整性, 管壁薄, 仅排列一层内皮细胞, 使他们比正常成熟的血管更容易被肿瘤细胞穿透[6-9]. Kakeji *et al*[10]通过对118例早期胃癌患者及125例进展期胃癌患者的研究发现, 与肿瘤组织VEGF表达阴性的胃癌患者相比, 表达阳性者其肿瘤细胞浸润程度较深, 病理分期较晚, 更容易发生转移, 与Maeda *et al*[11], Chaudhry *et al*[12]最近报道的胃癌组织中VEGF表达情况相近, 而且癌肿浸润前缘VEGF蛋白表达较其他部位明显, 微血管密度也高, 血管生成活跃, 说明VEGF蛋白表达与血管生成部位的一致性. 丰富的血管不仅增加了肿瘤细胞进入血液循环的机率, 而且肿瘤细胞还可以通过小静脉连接进入淋巴管, 促进淋巴转移. 因此, 在众多反映胃癌生物学行为的指标中, VEGF表达和MVD与胃癌浸润转移密切相关[13].

1.2 促血管生成素(angiopoietin, Ang) Ang是新近克隆的与血管生成有关的一个家族, 其中以Ang-1和Ang-2的研究较为深入. Ang及其受体酪氨酸激酶家族(Tie-2)参与新生血管的成熟, 维持血管的稳定性, 是与血管生成及重塑密切相关的分子[14]. 近年来, Tie-2及其配体Ang在血管生成中的作用日益受到重视. Ang-1是Tie-2受体的分泌性激活配体, 可促使肿瘤血管生芽, 迁移, 促进血管延长和肿瘤血管与供体血管间形成联系, 调节促进血管内皮分化. 动物实验证实, Ang-1参与了胃癌组织的血管生成, 促进了胃癌细胞在裸鼠体内的成瘤性[15]. Ang-2由激活的淋巴细胞和巨噬细胞分泌, 在有VEGF存在的情况下, 可使血管处于不稳定状态, 促进新生血管形成, 有利于肿瘤的转移. 当其强表达时, 血管的生成使局部缺氧得到缓解, VEGF表达水平降低, 导致血管的退化[16]. 因此推测Ang-2对肿瘤血管生成可能具有双向调节作用[17]. Etoh *et al*[18]研究发现, 胃癌Ang-2表达量与肿瘤性血管数量和肿瘤发展阶段呈正相关, Ang-2高表达者生存时间缩短. 国内陈林莺 *et al*[19]研究也表明, Ang-1激活Tie-2, 促进血管成熟, 保持血管稳定; 而Ang-2拮抗Ang-1的功能, 对血管生成具有双向调节作用, 并呈VEGF依赖性. Ang-1可抑制胃癌血管生成的主要原因在于Ang-1能拮抗VEGF诱发的血管生成, 以及Ang-1的血管稳定作用能募集管周细胞包绕内皮细胞, 使其不能对促血管生长因子反应, 从而抑制内皮细胞的出芽、迁移[20]和基底膜的降解[21]. 张真真 *et al*[22]认为, Ang-2/Ang-1蛋白的比值与胃癌MVD呈正相关, 其比值可能是决定胃癌血管生成和肿瘤生长的最终因素, 当Ang-2高表达而Ang-1低表达时, 促进胃癌的血管生成; 反之, 则抑制胃癌的血管生成. 并进一步推测Angs及其受体系统在胃癌血管生成中的调节作用是以Ang-2的作用为主导的.

1.3 酶类及体液因子 目前研究表明, 多种酶类及体液因子与胃癌的血管生成有关. 已确定的有碱性成纤维细胞生成因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)[23]、基质金属蛋白酶(MMP)、表皮生长因子(EGF)、转化生长因子(TGF)、血小板反应素(thrombospondin, TSP-1)[24]等. 新近还发现, 诱导性一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)、尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase-type plasminogen activator, uPA)等也可促进胃癌血管生成[25]. 此外, Ribatti *et al*[26]报道胃癌组织中内皮细胞和肿瘤组织促红细胞生成素(EPO)受体表达增高, 认为EPO可通过对消化道血管的营养作用而促进血管生成. Yasuda *et al*[27]认为, EPO是一种内源性促血管生成因子, 他可促进肿瘤血管生成并抑制肿瘤细胞凋亡, 使肿瘤细胞在缺氧环境中存活下来. 国内研究发现, EPO受体水平与胃癌患者血管生成及病情发展高度相关, 并进一步指出EPO在胃癌进展过程中可能是一种通过自分泌和(或)旁分泌作用环发挥作用的内源性促血管生成因子[28].

2 抑制血管生成治疗

阻止新生血管形成中的任何一步均可抑制肿瘤生长, 根据此理论, 抗血管生成疗法的策略包括:

阻断血管生成因子的合成及释放并拮抗其作用; 阻断内皮细胞降解细胞外基质的能力; 阻断内皮细胞表面整合素作用; 直接抑制内皮细胞增殖和(或)诱导其调亡. 目前, 治疗胃癌的抑制血管生成剂主要有以下几类.

2.1 血管内皮细胞增殖抑制剂 O(氯乙酰-氨甲酰基)烟曲霉醇, 简称TNP-470, 是一种半合成的烟曲霉素衍生物, 通过不可逆抑制蛋氨酸氨肽酶阻碍新血管的生长, 该酶在内皮细胞增殖中起关键作用, 体内实验证明, TNP-470可完全抑制bFGF诱导的血管生成, 显示了强大的抑制内皮细胞生长的能力. 与传统的化疗效果比较TNP-470有以下几个显著优点: (1)基本无毒副作用; (2)不产生耐药; (3)抑制肿瘤的转移复发. Ma *et al*[29]实验表明, TNP-470对内皮细胞及实体瘤的生长均有抑制作用. 研究发现, 他不仅能抑制胃癌动物模型原发灶的生长, 而且能有效治疗肿瘤肝脏和腹膜的转移[30]. 内皮细胞抑制素(endostatin)是1997年O'Reilly *et al*[31]发现的强力内皮细胞增殖抑制剂, 可有效的抑制血管形成, 使原发肿瘤缩小到1 mm^3以下, 肿瘤凋亡速度比治疗前快7倍, 他可特异性的抑制内皮细胞增殖并明显的抑制肿瘤的生长和转移. 王天宝 *et al*[32-33]发现, 人重组内皮抑素(rhES)可明显抑制人胃癌荷瘤裸鼠肿瘤的生长, 并认为他是通过抑制微血管内皮细胞的迁移、增殖, 减少实体肿瘤内血管生成, 使肿瘤缺氧, 营养匮乏, 增加肿瘤细胞凋亡, 从而“杀灭”肿瘤细胞, 抑制肿瘤血管生成和肿瘤的生长. rhES抑制肿瘤生长具有广谱性, 目前尚未发现耐药性和毒副作用.

2.2 血管抑素(angiostatin) 血管抑素是一种肿瘤源性血管生成抑制物, 最早由O'Reilly *et al*[34]在1994年从荷瘤小鼠的血清和尿液中提炼纯化后得到, 他是大分子物质血浆纤溶酶原(Pgn)的一个片段, 能致内皮细胞凋亡, 并在不影响细胞进入S期的情况下, 减少内皮细胞的数目, 故Lucas *et al*[35]推测其抗血管生成作用可能部分通过细胞毒来实现. 血管抑素毒副作用小, 能长期应用来抑制肿瘤的生长和转移, 其重组片段已完成, 即将应用于临床研究.

2.3 基质金属蛋白酶抑制剂(MMPI) MMP能降解细胞外基质和血管基底膜, 在肿瘤血管生成、转移和侵袭中起关键作用. 迄今已发现了26种, 其中以明胶酶(MMP-2和MMP-9)与肿瘤生长关系密切. 实验证实, MMP-9是一种加速肿瘤浸润、转移的蛋白水解酶, 其表达程度的增加, 使得原本均匀、稳定的基底膜和细胞外基质结构被降解和破坏, 产生肿瘤细胞迁移浸润的通路[36]. 因此, 以这些靶点设计可选择性抑制明胶酶的药物, 已成为抗肿瘤治疗很有前景的一类. 目前, MMPs的几个合成抑制剂已进入临床, 包括: (1)Marimastat: 又名BB2516, 是第Ⅱ代人工合成的MMP抑制剂, 可抑制多种MMP; (2)BMS275291: 能抑制与肿瘤生长扩散相关的MMPS, 如MMP-1, MMP-2, MMP-9, 现仍处于试验阶段, 预期其顺应性比Marimastat好; (3)新伐司他(Neovastat): 又名AE-941, 是一种从鲨鱼软骨中提取的天然MMPI, 抑制MMP-2, MMP-9, MMP-12的活性, 并拮抗血管内皮细胞生长因子受体(VEGFR), 为一多功能抗肿瘤血管生成药, 目前尚处于Ⅲ期临床试验阶段.

2.4 非甾体类抗炎药物(non-steroidalanti-inflammatorydrugs, NSAIDs) 环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)在人类多数肿瘤的发生、发展过程中起重要作用, 多数胃癌及其癌前病变常表现为COX-2的过度表达[37]. 近年来众多研究表明, COX-2参与了癌症的发生和进展[38-39]. 体外实验发现, 胃癌组织中MVD与肿瘤的TMN分期和淋巴结转移密切相关; COX-2表达和MVD呈显著正相关, 因此, COX-2过度表达不但促进细胞增殖、抑制细胞凋亡, 而且可能通过促进肿瘤新生血管形成的机制参与胃癌的发生和发展过程[40]. 吕晓君 *et al*[41]研究显示, COX-2表达与胃癌胃壁浸润深度呈正相关, 其过度表达与胃癌的侵袭转移能力密切相关. COX-2抑制剂舒林酸和塞来昔布可明显减少胃癌种植瘤的血管数, MVD较未用药组降低, 提示COX-2除了抑制抗凋亡基因Bcl-2表达, 还通过减少胃癌血管生成, 影响肿瘤的营养供应, 进而抑制胃癌细胞增殖, 诱导其凋亡, 实现抗胃癌效应[42]. COX-2特异抑制剂SC-236通过前凋亡蛋白Bak的上调, 细胞色素C的释放及最后激活caspase-3诱导胃癌细胞凋亡[43], NS-398则对体外培养的胃癌细胞株SGC-7901中COX-2, VEGF的表达有抑制作用, 能同时降低移植瘤组织中COX-2, VEGF及MVD, 从而抑制胃癌血管生成和增殖[44]. 目前研究较多的药物西乐葆是一种选择性COX-2抑制剂, 近年发现其不但能抑制胃癌细胞增殖, 而且能抑制胃癌血管形成, 明显降低胃癌细胞的侵袭能力[45-46].

2.5 以VEGF为靶点的抗血管生成剂 由于VEGF是目前发现的诱导肿瘤血管形成作用最强和最

■应用要点

作为一种新的治疗方法, 血管生成抑制剂疗效的好坏决定于选择合理的治疗时机和治疗方案. 与传统化疗、放疗的联合使用, 将是其发展方向. 一方面, 血管生成抑制剂有可能提高传统化疗、放疗的疗效; 另一方面, 传统治疗后处于肿瘤消退期的患者, 应用血管生成抑制剂有可能使微小转移灶处于休眠状态, 从而控制肿瘤的转移和复发. 尽管血管生成抑制剂在肿瘤治疗中的临床应用价值仍有待进一步验证, 但随着对肿瘤转移分子机制的逐步深入了解, 可供选择的作用靶点越来越多, 为研制更有效的血管生成抑制剂开辟了广阔的前景.

特异的生长因子, 故VEGF/VEGFR信号转导通路被认为是最有前途的靶点. 根据作用靶点的部位不同分为以下几类: (1)与内源性VEGF竞争结合VEGF受体细胞外区的mAb; (2)对抗细胞外VEGFR的抗体IMC–ICII; (3)针对VEGFR细胞内的酪氨酸激酶抑制剂(SU6668和ZD6474). 现对研究较为深入的几种药物做一简介: 贝伐单抗[47](Bevacizumab, 商品名: 阿瓦斯丁, Avastin)是一种基因工程mAb药物, 主要通过抑制VEGF发挥作用, 2004年获美国批准上市, 是第一种采用“饿死肿瘤”技术的抗癌新药, 在转移性结肠、直肠癌中配合化疗作为一线药物. 王宁 *et al*[48]在人胃癌裸鼠原位移植的研究中发现, Avastin通过抑制新生血管生成, 阻断肿瘤血供, 进而诱导肿瘤细胞凋亡, 并认为这样的治疗效果更加符合生理性细胞的死亡过程, 减少了传统化疗药物的毒副作用. SU5416化学名为3-[(2, 4-dimethylpyrrol-5-yl)methylidene]-in-Dolin-2-one, 是一种新合成的VEGF受体F1k-1/KDR酪氨酸激酶抑制物[49]. 他可明显抑制胃癌血管生成, 阻断其血供, 进而诱导肿瘤细胞凋亡, 使肿瘤从大到小, 处于休眠状态[50], 目前III期临床试验正在进行中[51]. SU6668是一种具有多靶点的新血管生成抑制剂, 为VEGF, bFGF, PDGF受体的小分子抑制剂, 从而阻断血管生成因子的合成和释放并拮抗其作用, 可有效抑制肿瘤血管生成; 还能诱导内皮细胞和肿瘤细胞的凋亡, 达到抗肿瘤作用[52-53]. 蒋晓婷 *et al*[54]研究发现, SU6668可有效抑制活体内胃癌的生长和转移, 并认为其机制与抗血管生成及诱导肿瘤细胞调亡有关. Ⅰ期临床试验认为其安全有效[55]. IMC-ICII: VEGF的生物学作用需通过两个酪氨酸激酶受体VEGFR-1(Flt-1)和VEGFR-2(KDR)实现, IMC-ICII是一个嵌合性阻断KDR的抗体, 能避免配体与受体结合并且抑制VEGF诱导的内皮细胞增生. 此外, 有研究表明肝素除了抗凝作用外, 还可抑制肿瘤血管生成, 具有抗肿瘤转移的作用[56]. 陈金联 *et al*[57]利用N-去硫酸肝素(经过化学修饰的肝素,抗凝作用明显减弱)对重度联合免疫缺陷(SCID)小鼠的人胃癌血管生成进行了研究, 发现肿瘤细胞中VEGF明显被抑制, MVD明显低于对照组, 认为N-去硫酸肝素抑制VEGF和肿瘤新生血管的形成, 进而对胃癌等肿瘤具有抑制作用.

2.6 EGFR通路抑制剂 EGFR家族由4种结构类似的受体酪氨酸激酶蛋白组成, 之所以称作受体酪氨酸激酶蛋白是因为他们除了作受体外, 均有内在酪氨酸激酶活性, 每种受体均含有细胞外、跨膜和细胞内功能区; 当配体存在并结合到受体的细胞外区时, 受体便发生构型改变, 经跨膜区激活胞内区的激酶后, 胞内的底物便出现酪氨酸自身磷酸化, 从而启动该信号通路引起一系列分子级联反应, 导致细胞生长分化、肿瘤增长、转移、血管生成及凋亡抑制等. 自1980年代, 已研制出两类针对EGFR通路的阻断剂. 第一类是避免配体与受体细胞外区结合的mAb, 代表药物有: 西妥昔单抗(Cetuximab)(IMC-C225, Erbitux)、曲妥珠单抗(Trastugumab)(Herceptin, 赫赛汀). 第二类便是抑制细胞内区酪氨酸激酶蛋白自身磷酸化的小分子酪氨酸激酶抑制剂(TKI), 代表药物有: 吉非替尼(Gefitinib)(ZD1839, Iressa): 是一个口服的选择性EGFR细胞内区酪氨酸激酶抑制剂, 对结肠癌和胃癌等细胞的生长抑制作用有剂量和时间依赖性, 并在发挥作用的同时伴随其他类生长因子(如VEGF, bFGF和TGF-a)的降低. 伊马替尼(Imatinib)(ST1571, Gleevec, Glivec格列卫): 是一种口服的特异性酪氨酸激酶跨膜受体抑制剂, 除了对慢性髓性白血病(CML)高度有效外, 对胃肠间质肿瘤(GIST)也有显著的临床和放射学效应. 这两类抑制剂代表了两种抑制下游信号转导的不同策略, 目前, 上述几种EGFR通路抑制剂正在临床进行胃肠肿瘤治疗的研究.

2.7 阻止内皮细胞与细胞外基质结合类药物 Vitaxin是整合蛋白(integrin) avβ3人源化mAb, 由av亚型整合素介导的内皮细胞与胞外基质的相互作用是血管生成的必要环节, avβ3抗体在动物试验中有很好的抗肿瘤生长和转移作用. 在Ⅰ期临床试验中, 14例晚期癌症患者接受了治疗, 8例病情没再发展或肿瘤减小, 未发现毒副反应, 目前, 正在进行Ⅱ/Ⅲ期临床试验, 这是一类机制独特的抗血管生成药物, 值得注意[58].

3 问题及展望

目前, 肿瘤血管生成抑制剂的研究已从实验室阶段进入临床试验. 虽然从理论上分析, 抗血管生成治疗克服了肿瘤治疗中最棘手的问题——耐药性和组织毒性, 但血管生成抑制剂的临床实验结果显示, 其并非想象中的那样有效. 在美国癌症研究协会(AACR)1999年会上, 有关专家们一致认为, 目前应该清醒和理性地看待肿瘤血管生成抑制疗法. 肿瘤血管生成的复杂性和异时性使单一药物疗效有限, 肿瘤血管生成是

■名词解释

1 IMC-ICII: 是针对人KDR的一种鼠嵌和性的IgG1单克隆抗体, 他与细胞表面的KDR有高亲和力, 能与放射性核素标记的VEGF竞争结合到表达KDR的人内皮细胞表面, IMC-ICII能够强有力的阻断VEGF诱导的KDR磷酸化, 并抑制VEGF诱导的人类内皮细胞的有丝分裂.

2 内皮抑素: 大分子物质胶原蛋白X, Ⅷ的羧基末非胶原区片段, 而胶原蛋白X, Ⅷ则主要存在于血管周围, 内皮抑素可特异性的抑制内皮细胞增殖并明显的抑制肿瘤的生长和转移, 在体内能抑制原发癌和转移癌的生长; 持久使用内皮抑素就能使原发肿瘤消退并抑制肿瘤的复发.

3 贝伐单抗: 第一个由FDA批准用于肿瘤治疗的抗VEGF单抗, 他是一个人源化单抗, 含有93%人IgG骨架及7%鼠源结合区域, 人源化有利于延长半衰期及减少免疫原性, 抗体的分子量大约149 000道尔顿, 此抗体对VEGF的识别和结合有高度特异性, 不识别其他类型的生长因子.

一个多因素多步骤复杂调控的过程[59], 多种调控因素参与调节血管生成过程, 并且在肿瘤血管生成的不同阶段发挥主导调控作用的因素不同, 如VEGF在血管生成早期发挥主导作用, 整和素avβ3在血管内皮细胞增殖迁移的中期地位重要; Tie2受体在血管成熟期发挥主要作用[60], 因此单纯阻断血管生成某个环节所产生的抑瘤作用必定有限[61]. 目前, 抗血管生成药物研究多采用皮下种植同系或人类肿瘤的免疫缺陷动物肿瘤模型, 这种动物模型与临床实际有一定的差距, 而且夸大了血管生成抑制剂的疗效[1]. 血管生成过程是人体内许多正常生理活动的基础, 抑制血管生成在治疗肿瘤的同时不可避免的干扰和破坏许多正常生理过程, 近来发现血管生成和凝血过程有关, 所以抗血管治疗可能会引起出血/凝血异常, 在老年患者中可能还会引起或加剧心血管疾病[62], 其他如伤口愈合、成年妇女正常的月经周期、胎儿的生长发育也会受到血管生成抑制剂治疗的影响[63].

以肿瘤新生血管作为治疗靶点, 从而抑制肿瘤的生长、浸润、转移, 是胃癌治疗理论上的突破, 为胃癌治疗提供了一条新思路, 丰富了胃癌综合治疗体系. 但目前大多数抑制血管生成药物尚处于Ⅰ, Ⅱ期临床试验阶段, 在应用于临床之前还要克服许多问题. 从理论上讲, 目前抗血管生成治疗不可能彻底治愈肿瘤, 当肿瘤直径小于2 mm时, 处于肿瘤生长的血管前期, 可直接从组织间液获得足够的养分, 对血管依赖性不大[64], 此时抑制血管治疗对这部分细胞基本无效, 故难以达到根治的目的. 因此与传统化疗、放疗及手术等治疗手段的联合应用, 将是血管生成抑制剂的发展方向. 作为新的治疗方法, 抗血管生成治疗还不成熟, 还需要在基础理论、药物筛选、临床前期药理研究、临床应用等方面进行更深入的研究.

4 参考文献

1 Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 2000; 21: 505-515
2 Harlozinska A. Progress in molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. *Anticancer Res* 2005; 25: 3327-3333
3 Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 1999; 18: 5356-5362
4 Brekken RA, Thorpe PE. Vascular endothelial growth factor and vascular targeting of solid tumors. *Anticancer Res* 2001; 21: 4221-4229
5 Song ZJ, Gong P, Wu YE. Relationship between the expression of iNOS,VEGF,tumor angiogenesis and gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 591-595
6 Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267: 10931-10934
7 Fujisawa T, Watanabe J, Akaboshi M, Ohno E, Kuramoto H. Immunohistochemical study on VEGF expression in endometrial carcinoma--comparison with p53 expression, angiogenesis, and tumor histologic grade. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; 127: 668-674
8 Xu W, Zhang L, Xie Y. Expression of vascular endothelial growth factor in primary esophageal squamous cell carcinoma and its significance in angiogenesis and prognosis of the tumor. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2001; 81: 860-862
9 王升, 吴本俨, 尤纬缔. 胃癌组织血管内皮生长因子表达对胃癌生物学行为的影响. 世界华人消化杂志 2005; 13: 716-719
10 Kakeji Y, Koga T, Sumiyoshi Y, Shibahara K, Oda S, Maehara Y, Sugimachi K. Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression in gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2002; 21: 125-129
11 Maeda K, Chung YS, Takatsuka S, Ogawa Y, Sawada T, Yamashita Y, Onoda N, Kato Y, Nitta A, Arimoto Y. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 1995; 13: 477-481
12 Chaudhry IH, O'Donovan DG, Brenchley PE, Reid H, Roberts IS. Vascular endothelial growth factor expression correlates with tumour grade and vascularity in gliomas. *Histopathology* 2001; 39: 409-415
13 骞爱荣, 赵俊生, 商澎, 赵建业, 陈建, 陈志南. 血管内皮生长因子和血管生成与胃癌发展的关系. 第四军医大学学报 2003; 24: 1100-1104
14 Stratmann A, Acker T, Burger AM, Amann K, Risau W, Plate KH. Differential inhibition of tumor angiogenesis by tie2 and vascular endothelial growth factor receptor-2 dominant-negative receptor mutants. *Int J Cancer* 2001; 91: 273-282
15 王均, 吴开春, 张德新, 幺立萍, 樊代明. 人血管生成素-1基因转染对胃癌细胞体内致瘤力及血管生成的影响. 中华肿瘤杂志 2005; 27: 77-80
16 Veikkola T, Alitalo K. Dual role of Ang2 in postnatal angiogenesis and lymphangiogenesis. *Dev Cell* 2002; 3: 302-304
17 Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts *in vivo* angiogenesis. *Science* 1997; 277: 55-60
18 Etoh T, Inoue H, Tanaka S, Barnard GF, Kitano S, Mori M. Angiopoietin-2 is related to tumor angiogenesis in gastric carcinoma: possible *in vivo* regulation via induction of proteases. *Cancer Res* 2001; 61: 2145-2153
19 陈林莺, 张声, 林建银, 黄培生. 促血管生成素-2对胃癌血管生成的双向效应. 中华肿瘤杂志 2004; 26: 161-164
20 Korff T, Kimmina S, Martiny-Baron G, Augustin HG. Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness.

■同行评价

本文综述了血管生成因子的作用以及抑制血管生成在胃癌治疗中的作用机制, 并对存在的总是进行了分析, 内容较全面, 有一定深度与临床意义.

FASEB J 2001; 15: 447-457
21 Lafleur MA, Forsyth PA, Atkinson SJ, Murphy G, Edwards DR. Perivascular cells regulate endothelial membrane type-1 matrix metalloproteinase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282: 463-473
22 张真真, 张声, 林建银, 黄培生, 陈余鹏. 促血管生成素及其受体的异常表达与胃癌血管生成的关系. 中华肿瘤杂志 2006; 28: 280-284
23 周红凤, 吴瑾, 王翠华, 张波, 刘丹, 王雯, 赵宁. 胃癌组织与血清中VEGF和bFGF的表达意义. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2087-2092
24 Zhang J, Ito R, Oue N, Zhu X, Kitadai Y, Yoshida K, Nakayama H, Yasui W. Expression of thrombospondin-1 is correlated with microvessel density in gastric carcinoma. *Virchows Arch* 2003; 442: 563-568
25 Kaneko T, Konno H, Baba M, Tanaka T, Nakamura S. Urokinase-type plasminogen activator expression correlates with tumor angiogenesis and poor outcome in gastric cancer. *Cancer Sci* 2003; 94: 43-49
26 Ribatti D, Marzullo A, Nico B, Crivellato E, Ria R, Vacca A. Erythropoietin as an angiogenic factor in gastric carcinoma. *Histopathology* 2003; 42: 246-250
27 Yasuda Y, Fujita Y, Matsuo T, Koinuma S, Hara S, Tazaki A, Onozaki M, Hashimoto M, Musha T, Ogawa K, Fujita H, Nakamura Y, Shiozaki H, Utsumi H. Erythropoietin regulates tumour growth of human malignancies. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1021-1029
28 刘飞德, 陈凛, 李基业. 胃癌组织促红细胞生成素受体表达与血管生成的关系及意义. 中华普通外科杂志 2006; 21: 130-132
29 Ma J, Pulfer S, Li S, Chu J, Reed K, Gallo JM. Pharmacodynamic-mediated reduction of temozolomide tumor concentrations by the angiogenesis inhibitor TNP-470. *Cancer Res* 2001; 61: 5491-5498
30 Yoshikawa T, Yanoma S, Tsuburaya A, Kobayashi O, Sairenji M, Motohashi H, Noguchi Y. Angiogenesis inhibitor, TNP-470, suppresses growth of peritoneal disseminating foci. *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 298-302
31 O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88: 277-285
32 王天宝, 吴小鹏, 张维东, 李兆亭. 重组人内皮抑素对裸鼠胃癌瘤株生长的影响. 中国普通外科杂志 2004; 13: 268-271
33 王天宝, 董文广, 李兆亭. 重组人内皮抑素联合应用5氟脲嘧啶对胃癌裸鼠移植瘤的影响. 中华普通外科杂志 2005; 20: 307-309
34 O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; 79: 315-328
35 Lucas R, Holmgren L, Garcia I, Jimenez B, Mandriota SJ, Borlat F, Sim BK, Wu Z, Grau GE, Shing Y, Soff GA, Bouck N, Pepper MS. Multiple forms of angiostatin induce apoptosis in endothelial cells. *Blood* 1998; 92: 4730-4741
36 Li H, Lindenmeyer F, Grenet C, Opolon P, Menashi S, Soria C, Yeh P, Perricaudet M, Lu H. AdTIMP-2 inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis, and prolongs survival in mice. *Hum Gene Ther* 2001; 12: 515-526
37 Saukkonen K, Tomasetto C, Narko K, Rio MC, Ristimaki A. Cyclooxygenase-2 expression and effect of celecoxib in gastric adenomas of trefoil factor 1-deficient mice. *Cancer Res* 2003; 63: 3032-3036
38 Singh B, Berry JA, Shoher A, Ramakrishnan V, Lucci A. COX-2 overexpression increases motility and invasion of breast cancer cells. *Int J Oncol* 2005; 26: 1393-1399
39 Eibl G, Takata Y, Boros LG, Liu J, Okada Y, Reber HA, Hines OJ. Growth stimulation of COX-2-negative pancreatic cancer by a selective COX-2 inhibitor. *Cancer Res* 2005; 65: 982-990
40 孙为豪, 孙运良, 方仁年, 欧希龙, 薛绮萍, 邵耘, 许海尘, 程蕴琳. 环氧化酶-2在胃癌组织中的表达及其与血管生成的关系. 中华胃肠外科杂志 2005; 8: 343-347
41 吕晓君, 毛晓韵, 李锦毅, 韩玲波, 吴东瑛, 张淑敏, 辛彦. 利用组织芯片技术研究COX-2在胃癌中的表达及其与血管生成的关系. 世界华人消化杂志 2006; 14: 550-556
42 孙波, 吴云林, 王升年, 张学军, 贺恒益, 乔敏敏, 钟捷. 舒林酸诱导人肝细胞癌凋亡及对环氧合酶-2和Bcl-2蛋白表达的影响. 中华消化杂志 2002; 22: 338-340
43 樊晓明, 郑发寿, 刘红燕, 马元华, 王振宇. 环氧合酶-2特异抑制剂诱导胃癌细胞凋亡的机制研究. 中华肿瘤杂志 2005; 27: 145-147
44 李建生, 张金平, 刘升云. 环氧合酶-2抑制剂对人胃癌细胞株的作用及机制探讨. 中华消化杂志 2005; 25: 119-121
45 Kismet K, Akay MT, Abbasoglu O, Ercan A. Celecoxib: a potent cyclooxygenase-2 inhibitor in cancer prevention. *Cancer Detect Prev* 2004; 28: 127-142
46 徐美虹, 吴开春, 吴汉平, 幺立萍, 樊代明. 尼美舒利对胃癌抑制作用的实验研究. 解放军医学杂志 2003; 28: 246-248
47 Zondor SD, Medina PJ. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor with efficacy in colorectal and other malignancies. *Ann Pharmacother* 2004; 38: 1258-1264
48 王宁, 王斌, 王雅杰. Avastin对胃癌裸鼠原位移植模型血管生成的影响. 癌症 2006; 25: 1076-1081
49 Mendel DB, Laird AD, Smolich BD, Blake RA, Liang C, Hannah AL, Shaheen RM, Ellis LM, Weitman S, Shawver LK, Cherrington JM. Development of SU5416, a selective small molecule inhibitor of VEGF receptor tyrosine kinase activity, as an anti-angiogenesis agent. *Anticancer Drug Des* 2000; 15: 29-41
50 张国锋, 王元和, 王强, 张明敖, 韩策然, 饶应阳. SU5416抑制胃癌生长和肝转移的实验研究. 中华消化杂志 2002; 22: 213-216
51 Stopeck A, Sheldon M, Vahedian M, Cropp G, Gosalia R, Hannah A. Results of a Phase I dose-escalating study of the antiangiogenic agent, SU5416, in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2798-2805
52 Laird AD, Vajkoczy P, Shawver LK, Thurnher A, Liang C, Mohammadi M, Schlessinger J, Ullrich A, Hubbard SR, Blake RA, Fong TA, Strawn LM, Sun L, Tang C, Hawtin R, Tang F, Shenoy N, Hirth KP, McMahon G, Cherrington. SU6668 is a potent antiangiogenic and antitumor agent that induces regression of established tumors. *Cancer Res* 2000; 60: 4152-4160

53 Laird AD, Christensen JG, Li G, Carver J, Smith K, Xin X, Moss KG, Louie SG, Mendel DB, Cherrington JM. SU6668 inhibits Flk-1/KDR and PDGFRbeta in vivo, resulting in rapid apoptosis of tumor vasculature and tumor regression in mice. *FASEB J* 2002; 16: 681-690
54 蒋晓婷, 陶厚权, 邹寿椿. 血管生成抑制剂SU6668对SCID鼠胃癌生长和转移抑制的作用. 中华胃肠外科杂志 2006; 9: 335-337
55 Xiong HQ, Herbst R, Faria SC, Scholz C, Davis D, Jackson EF, Madden T, McConkey D, Hicks M, Hess K, Charnsangavej CA, Abbruzzese JL. A phase I surrogate endpoint study of SU6668 in patients with solid tumors. *Invest New Drugs* 2004; 22: 459-466
56 Collen A, Smorenburg SM, Peters E, Lupu F, Koolwijk P, Van Noorden C, van Hinsbergh VW. Unfractionated and low molecular weight heparin affect fibrin structure and angiogenesis *in vitro*. *Cancer Res* 2000; 60: 6196-6200
57 陈金联, 陆金来, 陈明祥, 陈维雄, 朱金水, 陈尼维, 陈国强, 耿建国. N-去硫酸肝素对SCID小鼠胃癌血管生成和VEGF表达的影响. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2685-2688
58 Posey JA, Khazaeli MB, DelGrosso A, Saleh MN, Lin CY, Huse W, LoBuglio AF. A pilot trial of Vitaxin, a humanized anti-vitronectin receptor (anti alpha v beta 3) antibody in patients with metastatic cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 2001; 16: 125-132
59 Kong HL, Crystal RG. Gene therapy strategies for tumor antiangiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 273-286
60 Thompson WD, Li WW, Maragoudakis M. The clinical manipulation of angiogenesis: pathology, side-effects, surprises, and opportunities with novel human therapies. *J Pathol* 2000; 190: 330-337
61 Cao Y. Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33: 357-369
62 O'Reilly MS, Pirie-Shepherd S, Lane WS, Folkman J. Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the serpin antithrombin. *Science* 1999; 285: 1926-1928
63 Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller GA, Rangell L, Wright BD, Radtke F, Aguet M, Ferrara N. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 1999; 126: 1149-1159
64 Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002; 29: 15-18

电编 张敏 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

中华医学会第七次全国消化系疾病学术会议征文通知

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

1 征文内容

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

2 征文要求

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年2月18日; 15(5): 440-446
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

环氧化酶-2选择性抑制剂抑制人食管癌细胞的生长及其诱导凋亡

金春亭, 鲁 蓓, 李海军, 李玉珍, 武 欣, 范 婕, 张林西

■背景资料
食管癌是我国常见恶性肿瘤之一, 且食管癌的分布具有明显的地区差异, 寻找有效的化学预防药物是食管癌防治的重要任务之一, COX-2选择性抑制剂对食管癌细胞的生长抑制及诱导癌细胞凋亡使其用于食管癌等肿瘤的预防及临床辅助治疗成为可能.

金春亭, 李海军, 李玉珍, 武欣, 范婕, 张林西, 河北北方学院医学院病理学教研室 河北省张家口市 075029
鲁蓓, 河北北方学院附属第二医院普外科 河北省张家口市 075100
金春亭, 学士, 副教授, 主要从事消化道肿瘤的研究.
河北省自然科学基金资助课题, No. C2005000664
通讯作者: 张林西, 075029, 河北省张家口市长青路14号, 河北北方学院医学院病理学教研室. linxizhang@sohu.com
电话: 0313-8045177 传真: 0313-8032544
收稿日期: 2006-11-18 接受日期: 2006-12-01

Effects of cyclooxygenase-2 selective inhibitor NS-398 on the proliferation and apoptosis of human esophageal carcinoma cell lines

Chun-Ting Jin, Bei Lu, Hai-Jun Li, Yu-Zhen Li, Xin Wu, Jie Fan, Lin-Xi Zhang

Chun-Ting Jin, Hai-Jun Li, Yu-Zhen Li, Xin Wu, Jie Fan, Lin-Xi Zhang, Department of Pathology, Hebei North University, Zhangjiakou 075029, Hebei Province, China
Bei Lu, Department of Surgery, the Second Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075100, Hebei Province, China
Supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province, No. C2005000664
Correspondence to: Lin-Xi Zhang, Department of Pathology, Hebei North University, 14 Changqing Road, Zhangjiakou 075029, Hebei Province, China. linxizhang@sohu.com
Received: 2006-11-18 Accepted: 2006-12-01

Abstract

AIM: To investigate the biological effects of NS-398, a cyclooxygenase-2 (COX-2) selective inhibitor, on esophageal carcinoma cell lines and the possible mechanism.

METHODS: Esophageal carcinoma cell lines Eca-109 and TE-13 were cultured by routine method, and then treated with different concentrations of NS-398 (5, 10, 20, 40, and 80 μmol/L) for 24, 48 and 72 hours. The growths of Eca-109 and TE-13 cells were measured by MTT assay. The expression of COX-2, Bcl-2 and Bax in the cells were detected by flow cytometry (FCM). TUNEL and FCM methods were also used to detect the NS-398-induced apoptosis of the cells. The content of prostaglandin E_2 in the supernatants of cell culture was measured by radioimmunoassay (RIA).

RESULTS: NS-398 inhibited the proliferations of Eca-109 and TE-13 cells in concentration- and time-dependent manners, and also decreased the production of PGE_2. Meanwhile, NS-398 treatment resulted in an increase of G_0/G_1-phase cells and a decrease of S-phase ones in both kinds of cells (Eca-109: $F = 22.39$, $P < 0.01$; TE-13: $F = 46.99$, $P < 0.01$). The apoptosis of Eca-109 and TE-13 cells was also obviously increased after NS-398 treatment. COX-2 and Bcl-2 protein expression were down-regulated, while Bax protein expression was up-regulated in Eca-109 and TE-13 cells after NS-398 treatment. There was a positive correlation between COX-2 and Bcl-2 expression in the two cell lines (Eca-109: $r = 0.925$, $P < 0.01$; TE-13: $r = 0.925$, $P < 0.01$), but a negative correlation between COX-2 and Bax expression (Eca-109: $r = -0.937$, $P < 0.01$; TE-13: $r = -0.703$, $P < 0.01$) as well as between Bax and Bcl-2 expression (Eca-109: $r = -0.926$, $P < 0.01$; TE-13: $r = -0.753$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: COX-2 selective inhibitor NS-398 may inhibit the proliferation and induce the apoptosis of esophageal carcinoma cell lines through the inactivation of COX-2, down-regulation of Bcl-2 expression, and up-regulation of Bax experssion. It may be used in the chemoprevention or adjuvant treatment of esophageal carcinomas.

Key Words: Esophageal carcinoma; Eca-109 cell line; TE-13 cell line; Apoptosis; Proliferation; Cyclooxygenase-2; MTT assay; Flow cytometry; Radioimmunoassay

Jin CT, Lu B, Li HJ, Li YZ, Wu X, Fan J, Zhang LX. Effects of cyclooxygenase-2 selective inhibitor NS-398 on the proliferation and apoptosis of human esophageal carcinoma cell lines. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(5):440-446

摘要

目的: 探讨NS-398对食管癌细胞的生物学效应及可能的作用机制.

方法: 常规方法培养食管癌Eca-109和TE-13细胞, 以不同浓度NS-398(5, 10, 20, 40, 80 μmol/L)处理24, 48, 72 h. 采用四甲基唑蓝法(MTT)检测NS-398对Eca-109和TE-13细胞生长的抑制作用; 流式细胞仪(FCM)检测细胞凋亡及COX-2, Bcl-2, Bax蛋白的表达; TUNEL法检测2种细胞凋亡情况; 用放射免疫分析(RIA)检测培养液上清中前列腺素E_2(PGE_2)含量.

结果: NS-398可抑制2种细胞的生长, 并随药物浓度的增高及作用时间的延长抑制率逐渐增高, 并使2种细胞产生的PGE_2明显降低. NS-398使2种细胞G_0/G_1期细胞显著增多, S期细胞显著减少(Eca-109: F = 22.39, P<0.01; TE-13: F = 46.99, P<0.01), 并引起了明显的细胞凋亡. NS-398使2种细胞COX-2和Bcl-2表达显著减少, 而Bax表达显著增高. COX-2和Bcl-2的表达呈显著正相关(Eca-109: r = 0.925, P<0.01; TE-13: r = 0.925, P<0.01), COX-2和Bax表达呈显著负相关(Eca-109: r = -0.937, P<0.01; TE-13: r = -0.703, P<0.01)、Bax和bcl-2表达呈显著负相关(Eca-109: r = -0.926, P<0.01; TE-13: r = -0.753, P<0.01).

结论: NS-398可抑制食管癌细胞的增殖并可诱导其凋亡, 应用COX-2选择性抑制剂对食管癌进行化学预防或辅助治疗具有可能性.

关键词: 食管癌; Eca-109细胞; TE-13细胞; 凋亡; 增殖; 环氧化酶-2; 四甲基唑蓝法; 流式细胞术; 放射免疫分析

金春亭, 鲁蓓, 李海军, 李玉珍, 武欣, 范婕, 张林西. 环氧化酶-2选择性抑制剂抑制人食管癌细胞的生长及其诱导凋亡. 世界华人消化杂志 2007;15(5):440-446

http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/440.asp

0 引言

环氧化酶(cyclooxygenase, COX)是前列腺素(prostaglandin, PG)合成过程中的重要限速酶, 在哺乳动物至少有2种同工酶: COX-1和COX-2. COX-1在多种细胞中呈常规保守性表达, 其产物PG在肾的血流调节及胃黏膜上皮细胞保护中可能有重要作用; 而COX-2在正常情况下绝大多数组织中检测不到, 但可被许多因素如细胞因子、癌基因、促癌剂、胆汁酸等诱导表达[1], 参与多种病理生理过程. 研究发现, COX-2在食管癌[2-6]中表达显著增高. 在人及动物实验性肿瘤中发现, PGE_2含量增高[7-9], 而PGE_2是由COX产生的. 提示可应用COX-2抑制剂对食管癌进行预防及辅助治疗. 关于应用非类固醇类抗炎药(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)预防食管癌变的机制仍不清楚. 我们采用COX-2选择性抑制剂NS-398对2个食管癌细胞株进行研究, 试图探讨COX-2选择性抑制剂对食管癌细胞的生物学效应及可能的作用机制, 为NSAIDs对食管癌高发区人群进行化学预防奠定理论基础.

■研发前沿

近年流行病学研究发现, 长期服用阿司匹林、消炎痛等非类固醇类抗炎药(NSAIDs)可降低食管、胃及结肠等部位癌的危险性. 但是, 关于COX-2与癌变的关系及NSAIDs对癌细胞的作用机制还不太清楚, 是近年的研究热点之一.

1 材料和方法

1.1 材料 COX-2为兔IgG多抗、Bax, Bcl-2为小鼠IgG单抗; 羊抗兔FITC-IgG、羊抗鼠FITC-IgG购自Santa Cruz公司. NS-398为Cayman Chemical公司产品. 原位细胞凋亡检测试剂盒购自华美生物工程公司; H-PGE2放射免疫(RIA)检测试剂盒购自解放军总医院放免研究所.

1.2 方法 食管癌细胞株Eca-109购自第四军医大学实验动物中心; TE-13由河北医科大学第四医院科研中心惠赠. Eca-109和TE-13分别用含100 mL/L胎牛血清(FBS)的RPMI1640培养液在37℃含50 mL/L CO_2及950 mL/L空气饱和湿度温箱中常规培养. 取对数生长期的单层培养细胞, 用2.5 g/L Trypsin+0.2 g/L EDTA对单层细胞进行消化、分离成单细胞悬液, 进行正常传代、收获细胞做相关实验. 应用NS-398分别对2个细胞株进行实验. 观测3个作用时间点即24, 48和72 h. 药物浓度依次为: 5, 10, 20, 40, 80 μmol/L. 在给予不同浓度的NS-398对培养细胞作用一定时间(24, 48及72 h)后, 分别收获细胞. 首先吸取培养液进行离心, 1200 r/min离心5 min, 然后吸取培养液上清1 mL至无菌Ep管中, 立即密封-20℃冰箱冻存, 留取做PGE_2放射免疫分析. 离心管底部的细胞与收获的贴壁细胞收集到一起后, 洗涤、固定并送检.

1.2.1 NS-398对人食管癌细胞生长的影响 细胞增殖抑制实验, 采用四甲基唑蓝(MTT)法. 单细胞悬液常规接种96孔板. 细胞贴壁生长后, 同时换液并施加不同浓度NS-398. 每浓度重复6孔. 同时设滴加单细胞悬液而不加药物的正常对照及只滴加培养液的空白对照. 3个培养板分别于药物作用24, 48及72 h时终止培养. 在酶标仪上选择490 nm滤光片测定A值, 并记录结果. 生长

■创新盘点
本文用多种方法对2个食管癌细胞株进行研究, 对细胞生长、细胞周期、细胞凋亡及凋亡相关蛋白等多指标、多方法进行检测. 并应用RIA(放射免疫分析)法检测培养液中PGE_2含量.

表 1 NS-398对Eca-109细胞和TE-13细胞的生长抑制作用(MTT法)(mean ± SD, n = 6)

药物浓度	24 h		48 h		72 h	
(μmol/L)	A_{490}	IR(%)	A_{490}	IR(%)	A_{490}	IR(%)
Eca-109						
0	0.289 ± 0.012		0.363 ± 0.041		0.689 ± 0.028	
5	0.269 ± 0.011	−6.92	0.352 ± 0.021	−3.03	0.492 ± 0.022	−28.59
10	0.254 ± 0.027	−12.11	0.291 ± 0.034	−19.83	0.293 ± 0.031	−57.47
20	0.211 ± 0.019	−26.99	0.245 ± 0.033	−32.51	0.154 ± 0.017	−77.65
40	0.173 ± 0.014	−40.14	0.107 ± 0.046	−70.52	0.102 ± 0.023	−85.20
80	0.129 ± 0.033	−55.36	0.093 ± 0.031	−74.38	0.088 ± 0.012	−87.23
TE-13						
0	0.380 ± 0.020		0.624 ± 0.016		0.860 ± 0.073	
5	0.319 ± 0.015	−16.05	0.567 ± 0.024	−9.13	0.748 ± 0.062	−13.02
10	0.304 ± 0.036	−20.00	0.334 ± 0.027	−46.47	0.226 ± 0.027	−73.72
20	0.097 ± 0.018	−74.47	0.029 ± 0.005	−95.35	0.016 ± 0.005	−98.14
40	0.065 ± 0.008	−82.89	0.048 ± 0.007	−92.31	0.027 ± 0.007	−96.86
80	0.069 ± 0.006	−81.84	0.075 ± 0.011	−87.98	0.052 ± 0.007	−93.95

抑制率(IR)(%) = (实验组A_{490}值-对照组A_{490}值)/对照组A_{490}值×100%

1.2.2 细胞周期及凋亡的FCM检测 20 μmol/L NS-398对培养细胞作用一定时间(24, 48及72 h)后, 分别收获细胞. 对收获的细胞用碘化丙啶一步插入性DNA荧光染色方法进行DNA染色, 具体步骤见文献[10]. 应用相关软件对细胞周期及凋亡进行分析. 在二倍体细胞(G_0/G_1)峰前出现一个亚二倍体峰位判定为凋亡细胞峰, 以凋亡指数(apoptotic index, AI)表示凋亡状态, 公式为: AI = [细胞总数-(G_0/G_1+S+G_2/M)各时相细胞数]/细胞总数×100%

1.2.3 COX-2, Bcl-2, Bax基因蛋白表达的FCM检测 对上述收获的细胞同时进行COX-2, Bcl-2, Bax表达的定量检测. 具体操作见参考文献[10].

1.2.4 原位细胞凋亡检测 对培养液进行离心, 收集已经悬浮的细胞, 再常规消化收获贴壁细胞, 合并后离心成细胞团块进行石蜡包埋. 具体方法根据文献[11]进行操作. 细胞凋亡检测采用TUNEL试剂盒. 对于细胞蜡块切片, 先进行脱蜡至水化, 然后按试剂盒说明书进行. DAB显色, 显微镜下控制显色, 自来水终止显色, 苏木精对比染色, 常规脱水、封片. 以细胞核呈显著棕黄色颗粒状为阳性凋亡细胞, 在光镜下(×400)随机选取5个视野对凋亡细胞进行计数, 并以AI表示凋亡细胞的多少, 即100个完整细胞中平均凋亡细胞数的百分数表示.

1.2.5 PGE_2放射免疫法测定 对Eca-109和TE-13两个细胞株培养液中PGE_2含量进行测定. 应用NS-398进行药物干预实验, 在药物分别作用24, 48及72 h后收集培养液. 具体操作步骤如下: 吸取培养瓶中培养液入离心管中, 1200 r/min离心5 min, 吸取上清液1.5 mL入无菌Ep管中, 立即放入-20℃冰箱中冻存. 测定时按放免检测试剂盒说明书进行操作, 液体闪烁计数器进行检测.

统计学处理 采用SPSS11.0统计软件进行统计分析. 对流式细胞仪检测细胞周期分布、凋亡及COX-2, Bax和Bcl-2的表达的统计分析, 采用单因素方差分析及组间的两两比较. 并对COX-2, Bax和Bcl-2的表达进行相关性分析.

2 结果

2.1 细胞形态学观察 Eca-109细胞和TE-13细胞常规培养下呈单层贴壁生长. Eca-109细胞给予NS-398后继续培养24 h, 20 μmol/L培养瓶中细胞增殖不明显, 少量细胞变圆呈球形; NS-398作用48 h后, 20 μmol/L培养瓶中较多细胞呈球形, 贴壁生长细胞较少. 对于TE-13细胞的形态改变与Eca-109细胞相似.

2.2 NS-398对细胞生长的影响 NS-398对Eca-109细胞和TE-13细胞的生长抑制作用都比较显著. 随NS-398浓度的增高, 其细胞生长抑制作用逐渐增强, 对Eca-109细胞10 μmol/L NS-398作用24 h后其抑制率为26.99%, 40 μmol/L NS-398作用24 h后其抑制率为40.14%. 随药物作用时间的延长, 其抑制率也不断增高, 如对TE-13细

表 2 20 μmol/L NS-398对食管癌细胞周期分布及凋亡的影响(mean ± SD, n = 6)

分组	细胞周期分布			AI
	G_0/G_1	S	G_2/M	
Eca-109细胞株				
对照	66.46 ± 1.33[b]	17.64 ± 1.73[b]	15.91 ± 1.46[b]	1.40 ± 0.53[b]
24 h	73.89 ± 2.27	12.52 ± 1.13	13.60 ± 1.21	8.97 ± 0.46
48 h	76.00 ± 1.94	11.22 ± 0.64	12.78 ± 1.44	8.61 ± 0.34
72 h	72.90 ± 1.83	13.25 ± 1.91	13.85 ± 0.26	8.37 ± 0.88
TE-13细胞株				
对照	61.08 ± 4.27[b]	21.03 ± 2.65[b]	17.89 ± 2.37	1.80 ± 0.35[b]
24 h	68.38 ± 4.39	13.04 ± 2.23	18.58 ± 2.20	8.18 ± 0.79
48 h	74.09 ± 1.72	9.60 ± 0.69	16.31 ± 1.77	8.88 ± 1.05
72 h	74.75 ± 2.06	10.54 ± 1.13	14.71 ± 1.40	11.57 ± 0.54

[b]P<0.01 *vs* 24, 48和72 h各组.

表 3 20 μmol/L NS-398作用后细胞COX-2, Bax和Bcl-2表达的FCM检测(mean ± SD, n = 6)

分组	COX-2	Bax	Bcl-2
Eca-109细胞株			
对照	7.34 ± 0.33[b]	4.14 ± 0.31[b]	7.03 ± 0.23[b]
24 h	5.00 ± 0.32	7.07 ± 0.15	4.65 ± 0.22
48 h	4.96 ± 0.41	7.11 ± 0.26	4.74 ± 0.24
72 h	5.12 ± 0.16	6.85 ± 0.68	4.35 ± 0.12
TE-13细胞株			
对照	8.26 ± 0.93[b]	4.22 ± 0.22[b]	6.37 ± 0.34[b]
24 h	5.10 ± 0.28	5.99 ± 0.39	4.86 ± 0.15
48 h	5.09 ± 0.18	5.18 ± 0.17	4.84 ± 0.21
72 h	4.52 ± 0.42	5.11 ± 0.20	4.75 ± 0.20

[b]P<0.01 *vs* 24, 48和72 h各组.

表 4 40 μmol/L NS-398对Eca-109和TE-13细胞作用后的凋亡指数(mean ± SD, n = 5)

细胞株	时间		
	24 h	48 h	72 h
Eca-109	4.2 ± 1.3	17.9 ± 2.7	36.7 ± 3.3
TE-13	2.9 ± 1.8	15.9 ± 2.3	36.5 ± 3.8

胞10 μmol/L NS-398作用24 h后其抑制率为20.00%, 48 h后其抑制率为46.47%, 72 h后其抑制率为73.72%(表1).

2.3 细胞周期及凋亡分析 NS-398使Eca-109细胞和TE-13细胞G_0/G_1期细胞显著增多(Eca-109细胞: F = 28.85, P<0.01; TE-13细胞: F = 191.62, P<0.01); 而S期细胞显著减少(Eca-109细胞: F = 22.39, P<0.01; TE-13细胞: F = 46.99, P<0.01). 20 μmol/L NS-398分别对2种细胞都引起了显著的细胞凋亡(Eca-109细胞: F = 229.29, P<0.01; TE-13细胞: F = 191.62, P<0.01). 由于NS-398作用时间的不同, 凋亡率范围为8.18%-11.57%(表2).

2.4 COX-2, Bax, Bcl-2表达的FCM检测 Eca-109及TE-13在正常生长时都有较强的COX-2表达, NS-398作用一定时间后, COX-2表达显著减少(Eca-109细胞: F = 79.72, P<0.01; TE-13细胞: F = 60.06, P<0.01); 2种细胞在正常生长情况下Bax表达很接近, NS-398作用一定时间后, Bax表达显著增高(Eca-109细胞: F = 76.96, P<0.01; TE-13细胞: F = 46.87, P<0.01); 而Bcl-2在正常生长时都有较高表达, NS-398作用不同时间后, 其表达显著减少(Eca-109细胞: F = 208.77, P<0.01; TE-13细胞: F = 65.97, P<0.01)(表3).

2.5 FCM检测COX-2, Bax和Bcl-2表达的相关性分析 对于2个细胞株, COX-2和Bcl-2的表达呈显著正相关(Eca-109细胞: r = 0.925, P<0.01; TE-13细胞: r = 0.925, P<0.01), COX-2和Bax表达呈显著负相关(Eca-109细胞: r = -0.937, P<0.01; TE-13细胞: r = -0.703, P<0.01)、Bax和Bcl-2表达呈显著负相关(Eca-109细胞: r = -0.926, P<0.01; TE-13细胞: r = -0.753, P<0.01).

2.6 原位细胞凋亡检测结果 常规培养的Eca-109细胞及TE-13细胞HE染色可见癌细胞呈单层贴壁生长(图1A-B). 原位细胞凋亡检测显示, 40 μmol/L NS-398对Eca-109作用24 h后只有少数细胞发生凋亡, 48 h后HE染色可见部分癌细胞固缩呈球形、浓染(图1C), 凋亡细胞数目明显

■同行评价

本文探讨了NS-398对食管癌细胞的生物学效应及可能的作用机制, 关于NS-398对肿瘤的生物学效应及凋亡已有较多的报道, 但本文应用多种方法就NS-398对多个细胞株的生物学效应进行研究, 少见报道, 方法新颖, 结果可靠, 具有一定的指导意义.

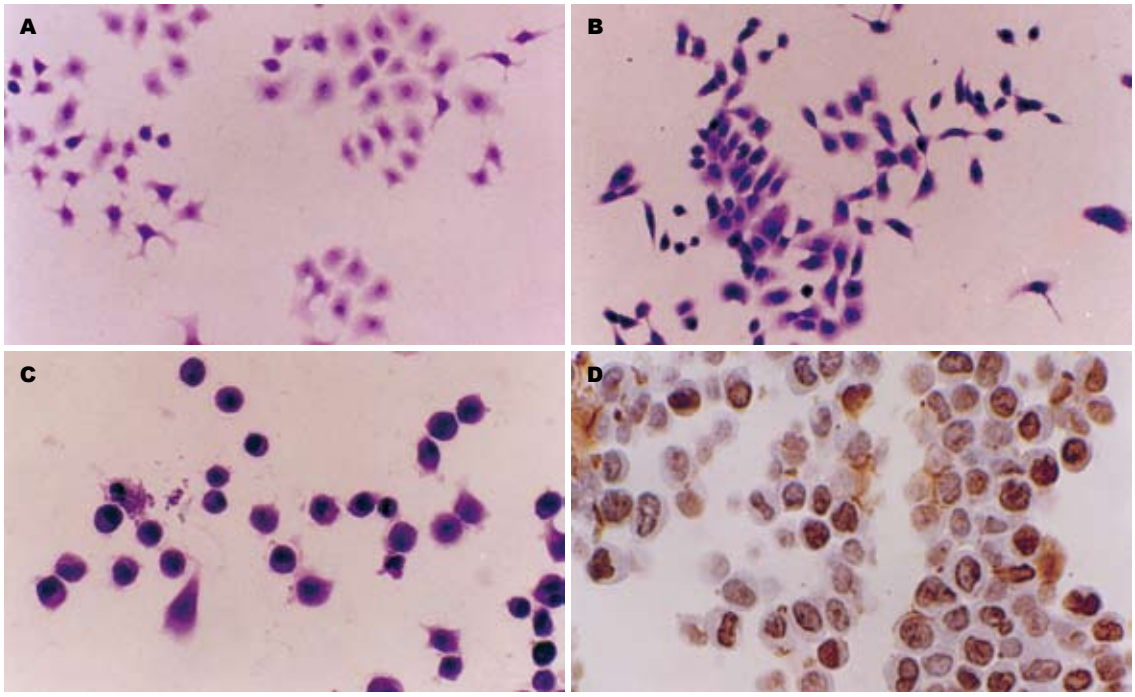


图 1 正常生长的Eca-109细胞和TE-13细胞及40 μmol/L NS-398对Eca-109作用后的形态改变. A: Eca-109细胞呈单层克隆性生长(HE×100); B: TE-13细胞HE染色可见癌细胞呈单层贴壁生长(HE×100); C: 40 μmol/L NS-398对Eca-109作用48 h后HE染色可见部分癌细胞固缩呈球形、浓染(HE×400); D: 40 μmol/L NS-398对Eca-109细胞作用72 h后可见有较多细胞发生凋亡(TUNEL×400).

增多, 药物作用72 h后可见有较多细胞发生凋亡(图1D). NS-398分别对Eca-109和TE-13两细胞株的凋亡情况见表4.

2.7 PGE_2放射免疫分析结果 NS-398对Eca-109及TE-13细胞在生长过程中产生的PGE_2都有明显的抑制作用. 随着NS-398浓度的增高, PGE_2产量明显减少, 尤其是当浓度≥20 μmol/L时; 随着药物作用时间的延长, 与正常生长癌细胞相比, PGE_2产量也显著减少(表5).

表 5 细胞培养上清液中PGE_2含量的RIA检测(ng/L)

药物浓度(μmol/L)	24 h	48 h	72 h
Eca-109细胞株			
0	2011	5967	8104
10	2009	2518	1606
20	1963	1802	1596
40	1475	1802	1236
80	803	1502	765
TE-13细胞株			
0	4195	5647	7634
10	1244	715	1011
20	1030	503	592
40	653	500	585
80	547	464	488

3 讨论

食管癌的形成是一个多步骤、多阶段过程, 在其形成及浸润进展过程中, 可有多种基因发生突变或表达异常, 其中发现多数食管癌组织中有COX-2基因表达增高[12-16], COX-2基因作为诱导表达基因, 可能参与食管癌早期阶段的形成[17-19], 而COX-1基因呈常规低水平表达, 可能不参与食管癌的形成. 因此, COX-2基因可作为食管癌化学治疗或进行有效预防的一个新靶点, 应用COX-2选择性抑制剂有可能延缓或阻断食管癌的形成及进展. 目前, 关于COX-2选择性抑制剂对食管癌等癌细胞的作用机制还不清楚. 本研究应用COX-2选择性抑制剂NS-398在2个食管癌细胞系中进行了研究. 研究发现, NS-398能够显著的抑制2个细胞株的增殖活性, 呈药物剂量依赖模式和时间依赖模式, 即随药物浓度的增加其抑制作用逐渐增强及随药物作用时间的延长而抑制作用明显加强. 从细胞形态上可见, 原来呈多边形贴壁生长的细胞部分变为圆形, 不再进行分裂增殖. 对细胞周期的分析发现, 经NS-398作用一定时间后, 2种细胞株G_0/G_1期细胞显著增多, 而S期及G_2/M期细胞明显减少. 可

见NS-398使食管癌细胞的生长停滞于G_0/G_1期. 这与Zhi *et al*[17]的研究结果一致.

人食管癌细胞系Eca-109和TE-13都是食管鳞状细胞癌. Eca-109及TE-13正常生长情况下都有明显的COX-2表达, 20 μmol/L NS-398作用一段时间后, COX-2表达都显著降低. 对细胞培养液中PGE_2含量的检测发现, PGE_2产量随药物浓度的增高而显著降低. 提示, NS-398对癌细胞生长的抑制可能是通过对COX-2酶活性的抑制, 从而使PGE_2产量明显减少[20-21], 使较多癌细胞停滞于G_0/G_1期, 从而抑制细胞的生长. 关于COX-2选择性抑制剂对食管癌细胞的作用多有报道[22-24], 但结果不一. 本研究中, NS-398对2个细胞株不但有明显的生长抑制, 还可诱导癌细胞发生凋亡. 凋亡细胞的多少随药物作用时间的延长而增多. 关于COX-2抑制剂可诱导食管癌细胞发生凋亡已有报道[20,25-26], 但其作用机制仍不清楚. Eca-109及TE-13在正常生长时都有明显的Bcl-2表达, Bcl-2可以抑制由多种因素引起的细胞凋亡. 2种细胞由于其COX-2酶活性可以产生较多的PGE_2. 在给予一定浓度的NS-398作用一段时间后, PGE_2产量明显减少, Bcl-2表达也显著降低, 部分细胞发生了凋亡. 同时, Bax表达显著增高, 其自身能够形成同源二聚体诱导细胞凋亡[27]. Tsujii *et al*[28]对上皮细胞的研究发现, COX-2高表达细胞中有Bcl-2水平的升高, 而无COX-2表达的细胞中则没有发现Bcl-2表达; Sheng *et al*[29]发现, PGE_2可以抑制由SC-58125诱发的结肠癌细胞凋亡并诱导Bcl-2表达, 说明PGE_2可通过Bcl-2抑制细胞凋亡. 提示NS-398诱导食管癌细胞凋亡可能是通过对COX-2酶活性的抑制而起作用的, 同时使抗凋亡蛋白Bcl-2表达降低, 而促凋亡蛋白Bax表达上调, 促进了癌细胞凋亡.

应用COX-2抑制剂对甲基苄基亚硝胺(NMBA)诱发的大鼠食管癌模型中的肿瘤形成有明显预防作用已有报道[30-31]. 因此, 有可能应用COX-2选择性抑制剂对食管癌的形成进行有效的化学预防或辅助治疗, 探索出对我国食管癌防治的新途径.

4 参考文献

1 Coffey RJ, Hawkey CJ, Damstrup L, Graves-Deal R, Daniel VC, Dempsey PJ, Chinery R, Kirkland SC, DuBois RN, Jetton TL, Morrow JD. Epidermal growth factor receptor activation induces nuclear targeting of cyclooxygenase-2, basolateral release of prostaglandins, and mitogenesis in polarizing colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 657-662

2 Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, Borchard F, Gabbert HE, Schror K. Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59: 198-204

3 Ratnasinghe D, Tangrea J, Roth MJ, Dawsey S, Hu N, Anver M, Wang QH, Taylor PR. Expression of cyclooxygenase-2 in human squamous cell carcinoma of the esophagus; an immunohistochemical survey. *Anticancer Res* 1999; 19: 171-174

4 Shamma A, Yamamoto H, Doki Y, Okami J, Kondo M, Fujiwara Y, Yano M, Inoue M, Matsuura N, Shiozaki H, Monden M. Up-regulation of cyclooxygenase-2 in squamous carcinogenesis of the esophagus. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1229-1238

5 Kuo KT, Chow KC, Wu YC, Lin CS, Wang HW, Li WY, Wang LS. Clinicopathologic significance of cyclooxygenase-2 overexpression in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Thorac Surg* 2003; 76: 909-914

6 Kawabe A, Shimada Y, Uchida S, Maeda M, Sato F, Itami A, Imamura M. Expression of cyclooxygenase-2 is associated with carcinogenesis of the lower part of thoracic esophageal squamous cell carcinoma and p53 expression. *Oncology* 2002; 62: 46-54

7 Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994; 107: 1183-1188

8 Pugh S, Thomas GA. Patients with adenomatous polyps and carcinomas have increased colonic mucosal prostaglandin E2. *Gut* 1994; 35: 675-678

9 Boolbol SK, Dannenberg AJ, Chadburn A, Martucci C, Guo XJ, Ramonetti JT, Abreu-Goris M, Newmark HL, Lipkin ML, DeCosse JJ, Bertagnolli MM. Cyclooxygenase-2 overexpression and tumor formation are blocked by sulindac in a murine model of familial adenomatous polyposis. *Cancer Res* 1996; 56: 2556-2560

10 左连富, 林培中, 齐凤英, 张林西, 郭建文, 刘江惠. 食管癌前细胞DNA含量及多基因表达的定量检测. 中华肿瘤杂志 2002; 24: 30-33

11 高洁, 侯敏, 刘彤华. 培养细胞的石蜡包埋切片用于免疫组织化学染色的优越性. 中华病理学杂志 1999; 28: 459-460

12 Yang GZ, Li L, Ding HY, Zhou JS. Cyclooxygenase-2 is over-expressed in Chinese esophageal squamous cell carcinoma, and correlated with NF-kappaB: an immunohistochemical study. *Exp Mol Pathol* 2005; 79: 214-218

13 Jiang JG, Tang JB, Chen CL, Liu BX, Fu XN, Zhu ZH, Qu W, Cianflone K, Waalkes MP, Wang DW. Expression of cyclooxygenase-2 in human esophageal squamous cell carcinomas. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2168-2173

14 Li Y, Wo JM, Ray MB, Jones W, Su RR, Ellis S, Martin RC. Cyclooxygenase-2 and epithelial growth factor receptor up-regulation during progression of Barrett's esophagus to adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 928-934

15 齐凤英, 张林西, 韩彩丽, 左连富, 林培中, 郭建文. 食管上皮癌变过程中环氧化酶-2表达上调. 世界华人消化杂志 2003; 11: 508-511

16 Nozoe T, Ezaki T, Kabashima A, Baba H, Maehara

Y. Significance of immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Am J Surg* 2005; 189: 110-115
17 Zhi H, Wang L, Zhang J, Zhou C, Ding F, Luo A, Wu M, Zhan Q, Liu Z. Significance of COX-2 expression in human esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2006; 27: 1214-1221
18 Lagorce C, Paraf F, Vidaud D, Couvelard A, Wendum D, Martin A, Flejou JF. Cyclooxygenase-2 is expressed frequently and early in Barrett's oesophagus and associated adenocarcinoma. *Histopathology* 2003; 42: 457-465
19 Yu HP, Xu SQ, Liu L, Shi LY, Cai XK, Lu WH, Lu B, Su YH, Li YY. Cyclooxygenase-2 expression in squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer Lett* 2003; 198: 193-201
20 Liu JF, Jamieson GG, Drew PA, Zhu GJ, Zhang SW, Zhu TN, Shan BE, Wang QZ. Aspirin induces apoptosis in oesophageal cancer cells by inhibiting the pathway of NF-kappaB downstream regulation of cyclooxygenase-2. *ANZ J Surg* 2005; 75: 1011-1016
21 Buttar NS, Wang KK, Leontovich O, Westcott JY, Pacifico RJ, Anderson MA, Krishnadath KK, Lutzke LS, Burgart LJ. Chemoprevention of esophageal adenocarcinoma by COX-2 inhibitors in an animal model of Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2002; 122: 1101-1112
22 Kase S, Osaki M, Honjo S, Takeda A, Adachi K, Araki K, Ito H. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor, NS398, inhibits cell growth and induces cell cycle arrest in the G2/M phase in human esophageal squamous cell carcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2004; 23: 301-307
23 Oyama K, Fujimura T, Ninomiya I, Miyashita T, Kinami S, Fushida S, Ohta T, Koichi M. A COX-2 inhibitor prevents the esophageal inflammation-metaplasia-adenocarcinoma sequence in rats. *Carcinogenesis* 2005; 26: 565-570
24 Tuynman JB, Buskens CJ, Kemper K, ten Kate FJ, Offerhaus GJ, Richel DJ, van Lanschot JJ. Neoadjuvant selective COX-2 inhibition down-regulates important oncogenic pathways in patients with esophageal adenocarcinoma. *Ann Surg* 2005; 242: 840-849, discussion 849-850
25 Yu HP, Shi LY, Lu WH, Su YH, Li YY, Xu SQ. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human esophageal cancer and *in vitro* inhibition by a specific COX-2 inhibitor, NS-398. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 638-642
26 Vona-Davis L, Riggs DR, Jackson BJ, McFadden DW. Antiproliferative and apoptotic effects of rofecoxib on esophageal cancer *in vitro*(1). *J Surg Res* 2004; 119: 143-148
27 Sermadiras S, Dumas M, Joly-Berville R, Bonte F, Meybeck A, Ratinaud MH. Expression of Bcl-2 and Bax in cultured normal human keratinocytes and melanocytes: relationship to differentiation and melanogenesis. *Br J Dermatol* 1997; 137: 883-889
28 Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 1995; 83: 493-501
29 Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1998; 58: 362-366
30 Carlton PS, Gopalakrishnan R, Gupta A, Liston BW, Habib S, Morse MA, Stoner GD. Piroxicam is an ineffective inhibitor of N-nitrosomethyl-benzylamine-induced tumorigenesis in the rat esophagus. *Cancer Res* 2002; 62: 4376-4382
31 Stoner GD, Qin H, Chen T, Carlton PS, Rose ME, Aziz RM, Dixit R. The effects of L-748706, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on N-nitrosomethyl-benzylamine-induced rat esophageal tumorigenesis. *Carcinogenesis* 2005; 26: 1590-1595

电编 张敏 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

世界华人消化杂志在线办公系统

本刊讯 自2005-12-15起, 世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读，以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流. 凡在在线办公系统注册的用户, 将可获得世界华人消化杂志最新出版消息. (世界胃肠病学杂志社 2007-02-18)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年2月18日; 15(5): 447-452
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

小干扰RNA抑制胃癌细胞株葡萄糖调节蛋白Grp78的表达

张新晨, 杨维良, 徐华锋, 吴德全, 杨宝峰

张新晨, 杨维良, 吴德全, 哈尔滨医科大学附属第二医院普通外科 黑龙江省哈尔滨市 150086
徐华锋, 黑龙江大学生命科学院 黑龙江省哈尔滨市 150080
杨宝峰, 哈尔滨医科大学药理学教研室 150080
张新晨, 副主任医师, 医学博士, 博士后, 主要从事普通外科、肿瘤基因治疗方面研究.
黑龙江省自然科学基金资助项目, No. D2004-23
通讯作者: 杨宝峰, 150080, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学药理学教研室. yangbf@ems.hrbmu.edu.cn
电话: 0451-86605356
收稿日期: 2006-10-31 接受日期: 2006-12-14

Repressive effects of small interfering RNA on expression of glucose-regulated protein Grp78 in human gastric cell line

Xin-Chen Zhang, Wei-Liang Yang, Hua-Feng Xu, De-Quan Wu, Bao-Feng Yang

Xin-Chen Zhang, Wei-Liang Yang, De-Quan Wu, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Hua-Feng Xu, College of Life Science, Heilongjiang University, Harbin 150080, Heilongjiang Province, China
Bao-Feng Yang, Department of Pharmacology, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Supported by the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province, No. D2004-23
Correspondence to: Professor Bao-Feng Yang, Department of Pharmacology, Harbin Medical University, Harbin 150086, China. yangbf@ems.hrbmu.edu.cn
Received: 2006-10-31 Accepted: 2006-12-14

Abstract

AIM: To construct the eukaryotic expression vector of RNA interference specific for glucose-regulated protein Grp78, and to observe silencing effect on Grp78 expression in human gastric cell line 7901.

METHODS: Gene sequences of human Grp78 were obtained from GenBank. A couple of Grp78 gene hairpin oligonucleotide was designed, whose sequence met the need of psiSTRIKE™ U6 small interfering RNA (siRNA) expression vector. The designed oligonucleotide was inserted into plasmid psiSTRIKE™, which was an eukaryotic expression vector controlled by the U6 promoter of RNA polymerase III, and then human gastric cell line 7901 was transfected with the recombinant plasmid by Lipofectamin2000. The expression of Grp78 was detected both at mRNA and protein level by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) immunofluorescent assay, respectively, before transfection, 24, 48, and 72 hours after transfection.

RESULTS: The recombinant plasmid of RNA interference specific for Grp78 was successfully constructed, named as psiSTRIKE™/Grp78. The expression of Grp78 was obviously down-regulated both at mRNA and protein level by psiSTRIKE™/Grp78 transfection. The analysis for the relative level of Grp78 mRNA showed a gradual and stable decrease with the prolonging of time. The expression of Grp78 mRNA was 1.069, 0.972, 0.662, 0.408, and 0.420, respectively, in the cells of negative control, before transfection, 24, 48, and 72 hours after transfection, and it was significantly lower in the cells after transfection than that before or without transfection ($P < 0.01$). There was no difference between the negative control group and pre-transfection group ($P > 0.05$). Immunofluorescent assay showed that the protein expression of Grp78 had been significantly decreased in the cells after transfection than that before transfection ($P < 0.001$), and it was also markedly different between 48 and 24 hours after transfection ($P < 0.00714$).

CONCLUSION: The siRNA eukaryotic expression vector psiSTRIKE™/Grp78 specific for Grp78 is constructed successfully, which can evidently inhibit the expression of Grp78 both at protein and mRNA level.

Key Words: Gastric cancer; RNA interference; Glucose-regulated protein; Reverse transcription-polymerase chain reaction; Immunofluorescent assay

Zhang XC, Yang WL, Xu HF, Wu DQ, Yang BF. Repressive effects of small interfering RNA on expression of glucose-regulated protein Grp78 in human gastric cell line. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(5):447-452

■背景资料
胃癌是威胁人类生命的严重疾病, 是消化道系统最常见的恶性疾病. 其发生、发展是涉及到多基因、多因素的复杂过程, 先前的研究认为内质网应激产物Grp78在胃癌组织中呈高表达状态, 并且与其生物学特性有关. 因此, 抑制Grp78表达可能起到治疗作用, 本实验即是通过RNA干扰方法抑制胃癌细胞Grp78表达, 以期达到治疗效果.

■研发前沿
Grp类在很多肿瘤细胞中都呈高表达趋势, 对于肿瘤细胞的形成、抗药性、抗原表达都有重要意义, 在Grp种族中, Grp78是目前研究较多且重要成员, 以此为靶点而开展的肿瘤基因治疗及免疫治疗已成为国内外研究的热点.

摘要

目的: 观察Grp78靶向RNA干扰质粒载体对人类胃癌细胞株7901 Grp78基因表达的抑制作用.

方法: 设计1对Grp78基因发卡寡核苷酸, 并与psiSTRIKE^{TM}质粒载体连接, 构建受控于人RNA聚合酶Ⅲ启动子U6的真核表达载体, 将重组质粒导入人类胃癌细胞株7901内, 分别在转染前、转染后24, 48和72 h通过RT-PCR、免疫荧光技术检测Grp78 mRNA及蛋白水平的表达情况.

结果: 成功构建RNA干扰质粒载体, 靶向Grp78干扰质粒载体命名为psiSTRIKE^{TM}/Grp78. 将上述质粒转染到人类胃癌细胞株后, 观察到Grp78 mRNA及蛋白水平的表达明显下调, 随着时间的延长Grp78在实验组中的表达逐渐降低, 并随着时间推移稳定存在. 阴性对照组, 转染前组, 转染12, 48, 72 h组Grp78的mRNA相对表达量分别为1.069, 0.972, 0.662, 0.408, 0.420. 转染后组较转染前组及阴性对照组分别具有显著性差异(P<0.01), 转染前与阴性对照组无显著性差异(P>0.05). 转染前后组免疫荧光表达结果统计学差异明显(P<0.001), 其中转染后48 h同转染后24 h相比较Grp78蛋白表达明显减少(P<0.00714).

结论: 构建的RNA干扰真核表达载体psiSTRIKE^{TM}/Grp78能明显抑制Grp78 mRNA及蛋白的表达.

关键词: 胃癌; RNA干扰; 葡萄糖调节蛋白; 逆转录-聚合酶链反应; 免疫荧光技术

张新晨, 杨维良, 徐华锋, 吴德全, 杨宝峰. 小干扰RNA抑制胃癌细胞株葡萄糖调节蛋白Grp78的表达. 世界华人消化杂志 2007;15(5):447-452
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/447.asp

0 引言

葡萄糖调节蛋白(glucose regulative proteins, Grp)是一种内质网分子伴侣, 是细胞为了适应内质网应激状态所产生的一类应激蛋白, 与热休克蛋白(heat shock proteins, Hsps)有高度的同源性, 因而被认为是热休克蛋白的一种. Grp的生理功能主要是协助蛋白质的正确折叠和装配, 此外还具有其他多种生物学功能. 近期的研究认为, Grp类在某些肿瘤细胞中呈高表达趋势, 对于肿瘤细胞的抗药性、抗原表达有重要意义[1-2]. 在Grp种族中, Grp78是目前研究较多且重要成员, 在多种肿瘤细胞中都呈过表达趋势, 以此为靶点而开展的肿瘤基因治疗及免疫治疗已成为国内外研究的热点. 我们先前研究已经证明, Grp78在胃癌细胞中呈过表达趋势, 并揭示这种过表达与胃癌的发生、发展及预后有密切关系[3]. 抑制Grp的表达有可能对胃癌的生长及抗药性有重要影响. 本研究的目的就是在体外通过siRNA抑制胃癌细胞中Grp78蛋白的表达, 为下一步实验打下坚实基础.

1 材料和方法

1.1 材料 人类胃癌细胞株7901(中国科学院上海细胞库), siSTRIKE^{TM}U6载体(Promega), 限制性内切酶*Pst* Ⅰ (Promega), 质粒小量提取试剂盒(Promega), 凝胶回收试剂盒(上海华舜生物工程有限公司), Lipofectamne^{TM} 2000转染试剂(Invitrogen), 总RNA提取试剂盒(Invitrogen), Access RT-PCR A1250试剂盒(Promega), RPMI 1640培养基(Gibco), 山羊抗人Grp78抗体(Santa Cruz), FITC-兔抗山羊IgG(北京中山).

1.2 方法

1.2.1 Grp78特异性siRNA的设计 选择GenBank中人类Grp78基因编码区序列作为分析序列, 依据siRNA表达载体siSTRIKE^{TM}U6的要求, 采用Promega公司网站(http://www.promega.com)提供的siRNA Target Designer-Version 1.51设计软件设计出1对Grp78基因发卡寡核苷酸序列, 序列符合siRNA表达载体siSTRIKE^{TM}U6的要求: 经BLAST数据库分析, 与其他分子无同源序列; G+C含量接近50%; 不含TTT或GGG序列. 每对符合上述要求的60 nt的单链寡核苷酸, 每条单链寡核苷酸内都包含两段20 nt的寡核苷酸, 他们互为反转重复序列, 中间以CTTCCTGTCA间隔, 使寡核苷酸内部可形成发夹结构. 两对寡核苷酸的核心序列反向互补, 两端分别带有*Pst* Ⅰ酶切位点, 3'末端有转录终止信号DNA序列片段TTTTT. DNA序列片段由上海生物工程公司合成. Grp78: 5'-ACCGCAAGAATTGAAATTGAGTTTCAAGAGAACTCAATTTCAATTCTTGCTTTTTC -3'; 5'-TGCAGAAAAAGCAAGAATTGAAATTGAGTTCTCTTGAAACTCAATTTCAATTCTTG -3'.

1.2.2 Grp78 siRNA表达载体的构建 1 g/L人工合成单链核苷酸在退火缓冲液中, 90℃ 3 min后缓慢降到室温, 与5 μL快速连接缓冲液、1 μL

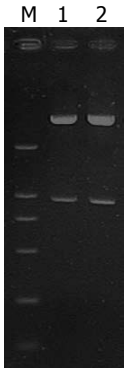


图 1 psiSTRIKE™/Grp78重组质粒鉴定结果. M: D2000 marker; 1-2: psiSTRIKE™/Grp78.

psiSTRIKE™载体(50 mg/L)、2 μL Nuclease-Free水和1 μL T4 DNA连接酶(5.0×10^7 nkat/L)配制成连接反应液, 室温培养1 h. 加入到100 μL *E.coli* JM109感受态细胞中, 冰浴, 加入400 μL室温的LB培养液, 37℃振荡培养(50 r/min) 45 min. 200 μL转化液涂在在LB/氨苄西林平板上铺板, 37℃过夜培养. 挑取菌落, 小量提取质粒, 经*Pst* Ⅰ酶切鉴定正确的重组质粒命名为psiSTRIKE™/Grp78, 于-20℃保存备用.

1.2.3 基因转染 胃癌细胞接种于6孔板, 置于37℃、50 mL/L的二氧化碳培养箱中, 待细胞生长融合达90%时, 采用Invitrogen公司Lipofectamne™ 2000转染试剂进行转染. 实验分为二组: 实验组: 每孔分别加入4 μL脂质体和psiSTRIKE™/Grp78重组质粒2 μg; 阴性对照组: 加2 μL Lipofectamne™ 2000转染试剂; 分别于转染前、转染后24, 48, 72 h后收获细胞检测Grp78的表达水平.

1.2.4 RT-PCR检测目的基因的表达 分别检验阴性对照组、转染后24, 48, 72 h时Grp78 mRNA的表达, 应用TRIzol试剂盒提取细胞总RNA, 采用Promega公司Access RT-PCR(A1250)系统进行一步法RT-PCR检测Grp78的mRNA表达. 以β-actin为内对照, RT-PCR扩增Grp78目的基因. 引物序列及预计扩增片段如表1所示. 50 μL反应体系为: 10×Buffer 5 μL, $MgSO_4$(终浓度1 mmol/L) dNTP(终浓度0.35 mmol/L), 目的基因及β-actin各自上下游引物(终浓度0.3 μmol/L), AMV逆转录酶83.35 nkat/L, Tfl DNA聚合酶16.67 nkat/L, RNA模板4 μg. RT-PCR反应参数: 48℃孵育50 min, 94℃ 预变性2 min, 94℃变性30 s, 56℃退火40 s, 70℃延伸80 s, 35个循环, 最后70℃ 7 min. 每一RT-PCR反应均重复3次. 取2 μL RT-PCR产物, 加上样缓冲液1 μL, 15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 凝胶呈像系统照相, 用Totallab2.01软件分析条带的积分吸光度, 计算Grp mRNA相对表达水平. Grp mRNA相对表达水平计算公式如下: Grp mRNA相对表达水平 = 样品Grp扫描值/样品β-actin扫描值.

表 1 RT-PCR引物序列及预计扩增片段大小

目的基因	引物序列	片段大小
Grp78	5' TGGGTCGACTCGAATTCCAAAG3'	513 bp
	5' GTCAGGCGATTCTGGTCATTGG3'	
β-actin	5' GTTTGAGACCTTCAACACCCC3'	320 bp
	5' GTGGCCATCTCTCTTGCTCGAAGTC3'	

1.2.5 间接法免疫荧光检测目的基因的表达 分别将转染后24, 48, 72 h的细胞消化, 均以1×10^5细胞于24孔中爬片, 24 h后吸去上清, PBS冲洗标本3次, 40 g/L多聚甲醛室温固定30 min; PBS冲洗10次, 50 g/L BSA室温封闭30 min; 加入1∶200稀释的Grp78抗体, 覆盖已知抗原标本片, 将玻片置于湿盒内, 4℃过夜; PBS冲洗10次后滴加1∶100稀释的FITC-兔抗山羊IgG抗体, 将玻片平放在湿盒内, 室温2 h后在荧光显微镜高倍视野下观察. 每一观察时间点选取3张图片, 每张图片在40倍视野下随机选择200个细胞, 计算其荧光细胞数和阳性率.

统计学处理 应用SPSS12.0软件分析, 结果以均数±标准差(mena±SD)表示, RT-PCR实验数据组内比较和组间比较用方差分析及*t*检验, 免疫荧光实验数据组内比较和组间比较采用χ^2检验, 组内数据或组间数据两两比较采用χ^2分割法. $P<0.05$为有统计学意义, χ^2分割法时$P<0.00714$为有统计学意义.

2 结果

2.1 重组质粒的鉴定结果 psiSTRIKE™载体包含一个*Pst* Ⅰ位点, 重组质粒将会形成第2个*Pst* Ⅰ位点, 经过限制性*Pst* Ⅰ内切酶消化后, 成功的重组质粒将会产生2个DNA片段. 靶向Grp78 RNA重组质粒psiSTRIKE™用限制性*Pst* Ⅰ内切酶酶切后, 可清楚地看到重组载体被切为两个片段, 证明重组质粒构建成功. 将由Grp78序列片段构建的靶Grp78 RNA干扰质粒载体命名为psiSTRIKE™/Grp78(图1).

2.2 RT-PCR结果 用RT-PCR方法分析Grp mRNA相对表达水平显示, 发现随着时间的延长Grp78在实验组中的表达逐渐降低, 转染后12, 48, 72 h Grp78的mRNA相对表达量较转染前分别具有显

■创新盘点
本实验通过RNA干扰方法抑制胃癌细胞中Grp78表达并获得成功, 国内外尚无相关报道, 因此具有一定的创新性.

■应用要点
通过RNA干扰方法成功抑制胃癌细胞中Grp78的表达, 为进一步的实验打下坚实基础, 可进一步检验在胃癌中Grp78过表达对细胞生长、抗药性形成及肿瘤免疫的作用.

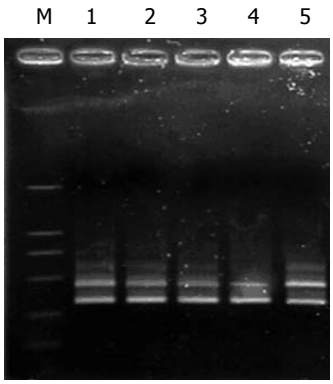


图 2 psiSTRIKE™/Grp78 mRNA RT-PCR结果. M: D2000 Maker; 1: 转染前; 2; 转染后24 h; 3: 转染后48 h; 4: 转染后72 h; 5: 空白对照.

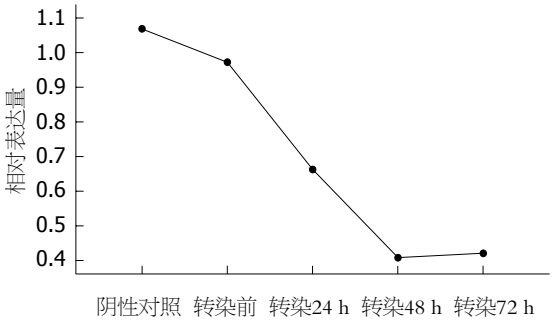


图 3 psiSTRIKE™/Grp78 RT-PCR相对表达量趋势图.

表 2 psiSTRIKE™/Grp78 RT-PCR相对表达量

	相对表达量	*P*值
阴性对照	1.069	[1]*P*<0.001
转染前	0.972	[2]*P*>0.05
转染24 h	0.662	[3]*P*<0.001
转染48 h	0.408	[4]*P*<0.01
转染72 h	0.420	[5]*P*>0.05

[1]整体比较; [2]阴性对照与转染前比较; [3]转染前与24 h比较; [4]24 h与48 h比较; [5]48 h与72 h比较.

著性差异, 转染前与阴性对照组无显著性差异(图2-3, 表2).

2.3 免疫荧光结果 每一观察时间点选取3张图片, 每张图片40倍视野下随机选择200个细胞, 计算其荧光细胞数和阳性率. 由图4和表3可见psiSTRIKE™/Grp78组在转染前后免疫荧光表达结果统计学差异明显(*P*<0.001), 其中转染后24 h同转染前相比较Grp78蛋白表达明显减少(*P*<0.00714); 转染后48 h同转染后24 h相比较Grp78蛋白表达明显减少(*P*<0.00714); 而转染

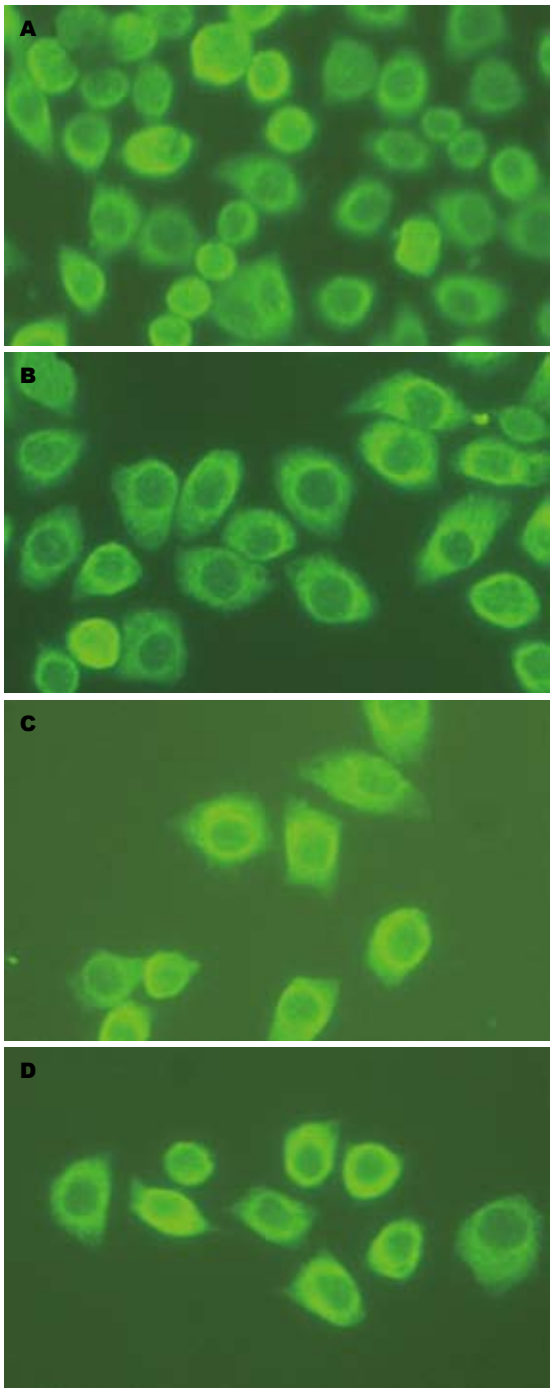


图 4 psiSTRIKE™/Grp78表达免疫荧光结果. A: 转染前; B: 转染后24 h; C: 转染后48 h; D: 转染后72 h.

72 h后的荧光细胞数少于转染48 h后的荧光细胞数, 但二者没有统计学意义(*P*>0.00714).

3 讨论

胃癌是一种常见疾病, 严重威胁人民生命健康. 随着手术技术及综合治疗的不断完善, 胃癌患者的生存率有所提高, 但目前仍未根本解决肿瘤转移及复发的问题, 基因治疗或许是其治疗

表 3 psiSTRIKE™/Grp78免疫荧光结果(选取3张图片)

	阳性细胞数			阳性率			*P*值
转染前	183	187	189	91.5%	93.5%	94.5%	[1]*P*<0.001
转染24 h	145	152	156	72.5%	76%	78%	[2]*P*<0.00714
48 h	56	68	46	28%	34%	23%	[3]*P*<0.00714
72 h	67	54	66	33.5%	27%	33%	[4]*P*>0.00714

[1]整体比较; [2]转染前与24 h比较; [3]24 h与48 h比较; [4]48 h与72 h比较.

■名词解释
葡萄糖调节蛋白(Grps): 是一种内质网(ER)分子伴侣, 可参与内质网蛋白的转运、蛋白质量控制及ER相关蛋白降解、ER应激调节及ER钙绑定等活动. 近期的研究发现, Grps与肿瘤生长、肿瘤抗化疗药物性及肿瘤免疫尚有重要关联. 同时, Grps可以作为一种新的标志物指示肿瘤进展及化疗反应性, 也可以作为肿瘤治疗的靶点.

的希望所在[4]. 应激反应是机体的重要保护措施, 如果肿瘤一但形成, 应激反应就会变成肿瘤的保护机制. 这种保护机制对于肿瘤细胞的抗免疫原性、抗化疗药物性、抗凋亡性有重要作用, 也是目前肿瘤化疗、基因治疗、免疫治疗效果不佳的重要原因之一. 应激反应主要以两种形式存在, 其一为热休克蛋白(Hsp)介导的细胞质内的应激反应及Grp介导的细胞核内的内质网应激. 现在已经明确, Hsp族在胃癌中呈过表达并在肿瘤的发生、发展及多药耐药方面有重要作用, 在此方面研究中我国学者处于世界领先地位[5-6]. 另一种则为Grp介导的细胞核内的内质网应激.

Grp是一种内质网分子伴侣, 是细胞为了适应内质网应激状态所产生的一组应激蛋白, 主要包括Grp78, Grp94及Grp170等. 传统观点认为, Grps可在维持细胞稳态方面发挥多种功能. 作为内质网(ER)分子伴侣, Grps参与内质网蛋白的转运、蛋白质量控制及ER相关蛋白降解、ER应激调节及ER钙绑定等活动[7-9]. 其中, Grp78是研究及应用最多的Grp, 被认为在肿瘤增殖、抗药性等方面起重要作用[10]. 早有研究证实, Grp78在纤维肉瘤的增殖中有重要作用[11]; 应用大鼠模型可发现在肿瘤的生长过程中体内激活了Grp78的启动子[12]; 在正常组织转化为腺瘤或腺癌的过程中, 细胞质内Grp78也呈相应的过表达趋势[13]. 尚有研究证实乳腺癌标本的Grp78表达显著高于癌旁组织[14]; Grp78在结肠癌及肺癌等也存在着过表达[13,15]. 抑制Grp78的表达可以抑制肿瘤细胞增殖, 促进肿瘤细胞凋亡[16-17]. Grp78已被证实为肿瘤转移的重要因子, 有报道称在转移癌细胞系中Grp78蛋白水平增高[18-21], 并在抗药性形成方面发挥重要作用[22-24]. 作者课题组已首先证实Grp78及Grp94在胃癌中呈过表达[3,25], 并与胃癌的多种生物学特性有关, 国内外已有多名学者证实这个结果[26-28]. 因为在已有的文献中证实Grp78在内质网应激及肿瘤形成、抗药性形成过程中起主导作用, 作者设想通过RNA干扰方法抑制胃癌细胞中Grp78蛋白的表达.

在抑制方法方面, RNA干扰(RNAi)是一种在进化上保守的机制, 是用由dsRNA前体剪切产生的短的反义RNA靶向对应的mRNA然后进行剪切. RNAi可以高效、特异的阻断体内特定基因的表达, 促使mRNA降解, 诱使细胞表现出特定基因缺失的表型的过程, 是基因沉默的理想工具, 可以直接用于疾病相关基因的抑制, 从而达到疾病治疗或预防的目的[29-30].

本实验采用设计重组质粒表达载体持续表达siRNA的方法, 能较长时间内保持干扰作用. 将siRNA以折叠的茎环结构表达, 成功地克隆了靶向胃癌细胞Grp78的重组质粒, 并将其转染到人胃癌细胞株中, 来观察其对Grp78表达的抑制作用. 实验结果显示, 在转染24 h后, 人胃癌细胞株Grp78表达呈现明显抑制, 并随着时间的推移继续抑制, 在48 h时达到高峰, 到72 h时仍稳定存在. 本实验的结果证明, 体外通过siRNA抑制胃癌细胞中Grp78蛋白的表达是十分有效和稳定的, 可以为进一步的实验研究提供有效的工具, 为进一步应用抗化疗药物和其他药物进行对比实验打下坚实基础.

在检测手段方面, 本实验采用了RT-PCR及免疫荧光法从mRNA和蛋白两个水平检验Grp78的表达水平, 多方面证实了抑制的有效性. 免疫荧光检测方法简便、特异性高, 可以代替Western blot, 是检测蛋白有效的方法.

4 参考文献

1 张新晨, 杨维良. 葡萄糖调节蛋白在肿瘤细胞中的表达及意义. 中华普通外科杂志 2003; 18: 501-502
2 Lee AS. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci* 2001; 26: 504-510
3 张新晨, 杨维良, 徐华锋, 吴德全, 张伟峰, 张东伟. 葡萄糖调节蛋白78在胃癌组织中的表达及意义. 中华实

■同行评价

本文应用RNA干扰技术研究了葡萄糖调节蛋白(Grp)介导的细胞核内的内质网应激, 实验手段和技术路线较为先进, 结果可靠, 有指导和参考价值.

验外科杂志 2005; 22: 1483-1485

4 杨维良, 张新晨. 胃癌基因治疗的现状及展望. 中华实验外科杂志 2004; 21: 639-640

5 Zhao ZG, Shen WL. Heat shock protein 70 antisense oligonucleotide inhibits cell growth and induces apoptosis in human gastric cancer cell line SGC-7901. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 73-78

6 Liu X, Ye L, Wang J, Fan D. Expression of heat shock protein 90 beta in human gastric cancer tissue and SGC7901/VCR of MDR-type gastric cancer cell line. *Chin Med J (Engl)* 1999; 112: 1133-1137

7 Hendershot LM. The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mt Sinai J Med* 2004; 71: 289-297

8 Lee AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods* 2005; 35: 373-381

9 Yang Y, Li Z. Roles of heat shock protein gp96 in the ER quality control: redundant or unique function? *Mol Cells* 2005; 20: 173-182

10 Fu Y, Lee AS. Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy. *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 741-744

11 Jamora C, Dennert G, Lee AS. Inhibition of tumor progression by suppression of stress protein GRP78/BiP induction in fibrosarcoma B/C10ME. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 7690-7694

12 Dong D, Dubeau L, Bading J, Nguyen K, Luna M, Yu H, Gazit-Bornstein G, Gordon EM, Gomer C, Hall FL, Gambhir SS, Lee AS. Spontaneous and controllable activation of suicide gene expression driven by the stress-inducible grp78 promoter resulting in eradication of sizable human tumors. *Hum Gene Ther* 2004; 15: 553-561

13 Xing X, Lai M, Wang Y, Xu E, Huang Q. Overexpression of glucose-regulated protein 78 in colon cancer. *Clin Chim Acta* 2006; 364: 308-315

14 Fernandez PM, Tabbara SO, Jacobs LK, Manning FC, Tsangaris TN, Schwartz AM, Kennedy KA, Patierno SR. Overexpression of the glucose-regulated stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 59: 15-26

15 Wang Q, He Z, Zhang J, Wang Y, Wang T, Tong S, Wang L, Wang S, Chen Y. Overexpression of endoplasmic reticulum molecular chaperone GRP94 and GRP78 in human lung cancer tissues and its significance. *Cancer Detect Prev* 2005; 29: 544-551

16 Ermakova SP, Kang BS, Choi BY, Choi HS, Schuster TF, Ma WY, Bode AM, Dong Z. (-)-Epigallocatechin gallate overcomes resistance to etoposide-induced cell death by targeting the molecular chaperone glucose-regulated protein 78. *Cancer Res* 2006; 66: 9260-9269

17 Gupta P, Walter MR, Su ZZ, Lebedeva IV, Emdad L, Randolph A, Valerie K, Sarkar D, Fisher PB. BiP/GRP78 Is an Intracellular Target for MDA-7/IL-24 Induction of Cancer-Specific Apoptosis. *Cancer Res* 2006; 66: 8182-8191

18 Mintz PJ, Kim J, Do KA, Wang X, Zinner RG, Cristofanilli M, Arap MA, Hong WK, Troncoso P, Logothetis CJ, Pasqualini R, Arap W. Fingerprinting the circulating repertoire of antibodies from cancer patients. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 57-63

19 Misra UK, Gonzalez-Gronow M, Gawdi G, Pizzo SV. The role of MTJ-1 in cell surface translocation of GRP78, a receptor for alpha 2-macroglobulin-dependent signaling. *J Immunol* 2005; 174: 2092-2097

20 Misra UK, Deedwania R, Pizzo SV. Binding of activated alpha2-macroglobulin to its cell surface receptor GRP78 in 1-LN prostate cancer cells regulates PAK-2-dependent activation of LIMK. *J Biol Chem* 2005; 280: 26278-26286

21 Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2002; 52: 23-47

22 Tsutsumi S, Gotoh T, Tomisato W, Mima S, Hoshino T, Hwang HJ, Takenaka H, Tsuchiya T, Mori M, Mizushima T. Endoplasmic reticulum stress response is involved in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2004; 11: 1009-1016

23 Tsutsumi S, Namba T, Tanaka KI, Arai Y, Ishihara T, Aburaya M, Mima S, Hoshino T, Mizushima T. Celecoxib upregulates endoplasmic reticulum chaperones that inhibit celecoxib-induced apoptosis in human gastric cells. *Oncogene* 2006; 25: 1018-1029

24 Dong D, Ko B, Baumeister P, Swenson S, Costa F, Markland F, Stiles C, Patterson JB, Bates SE, Lee AS. Vascular targeting and antiangiogenesis agents induce drug resistance effector GRP78 within the tumor microenvironment. *Cancer Res* 2005; 65: 5785-5791

25 张新晨, 杨维良, 张伟峰, 李冀宏, 徐文弟. 内质网分子伴侣Grp94在胃癌组织中的表达及其临床意义. 中华实验外科杂志 2003; 20: 792-793

26 赵永亮, 余佩武, 蔡志民, 吴淼, 雷晓, 饶芸, 周立新. 胃癌组织gp96表达的临床意义. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1969-1971

27 曲晶磊, 徐惠绵, 阎影, 唐冰, 贾兰玲. 人胃癌组织中分子伴侣蛋白的表达及检测. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1809-1813

28 Wang XP, Liao J, Liu GZ, Wang XC, Shang HW. Co-expression of heat shock protein 70 and glucose-regulated protein 94 in human gastric carcinoma cell line BGC-823. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3601-3604

29 Hannon GJ, Rossi JJ. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 2004; 431: 371-378

30 Mello CC, Conte D Jr. Revealing the world of RNA interference. *Nature* 2004; 431: 338-342

电编 张敏 编辑 张焕兰

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年2月18日; 15(5): 453-457
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

急性胰腺炎大鼠肺组织中水通道蛋白-1的表达及功能

高振明, 陈海龙, 刘小东

高振明, 大连医科大学附属第二临床学院普外科 辽宁省大连市 116023
陈海龙, 刘晓东, 大连医科大学附属第一临床学院普外科 辽宁省大连市 116011
高振明, 医学硕士, 在读博士, 从事普通外科和中西医结合外科临床研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30271667
通讯作者: 陈海龙, 116011, 辽宁省大连市西岗区中山路222号, 大连医科大学附属第一临床学院普外科.
hailongchen2006@163.com
电话: 0411-83600680 传真: 0411-83631428
收稿日期: 2006-12-01 接受日期: 2006-12-18

Expression and function of aquaporin-1 in acute lung injury induced by severe acute pancreatitis in rats

Zhen-Ming Gao, Hai-Long Chen, Xiao-dong Liu

Zhen-Ming Gao, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116023, Liaoning Province, China
Hai-Long Chen, Xiao-Dong Liu, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China
Supported by National Science Foundation of China, No. 30271667
Correspondence to: Hai-Long Chen, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China. hailongchen20062163.com
Received: 2006-12-01 Accepted: 2006-12-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of aquaporin-1 (AQP-1) in acute lung injury induced by severe acute pancreatitis (SAP) in rats, and to explore the relationship between AQP-1 expression and acute lung injury (ALI).

METHODS: Adult Wistar rats were randomly divided into 3 groups: sham operation (SO) group, ALI group and dexamethasone (DEX, 2 mg/kg via caudal vein) group. Sodium deoxycholate was (15 g/L) injected inversely into the biliopancreatic duct of rats to make the model of SAP-induced ALI. Eight rats of each group (n = 8) were killed 4, 8, 12 h respectively after SAP model was established, and blood samples and lung tissues were collected. Serum amylase, partial pressure of oxygen, lung wet-to-dry weight ratio (W/D) and pulmonary homogenate were measured to evaluate the degrees of pancreatic inflammation and ALI. Serum level of tumor necrosis factor-α (TNF-α) was also measured. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to quantify AQP-1 mRNA changes and immunohistochemistry was used to detect AQP-1 protein expression in lung tissues.

RESULTS: As compared with those in SO group, the levels of serum amylase, TNF-α, the value of W/D, and the pathological changes of lung tissues were obviously increased in ALI group, while the partial pressure of oxygen, the expression of AQP-1 mRNA (4 h: 0.403 ± 0.018 *vs* 0.794 ± 0.015, $P < 0.01$; 8 h: 0.382 ± 0.025 *vs* 0.812 ± 0.032, $P < 0.01$; 12 h: 0.361 ± 0.016 *vs* 198 ± 5, $P < 0.01$) and AQP-1 protein (4 h: 104 ± 4 *vs* 193 ± 8, $P < 0.01$; 8 h: 96 ± 5 *vs* 201 ± 7, $P < 0.01$; 12 h: 94 ± 3 *vs* 198 ± 5, $P < 0.01$) were significantly decreased. However, DEX treatment elevated the partial pressure of oxygen, the expression of AQP-1 mRNA (4 h: 0.681 ± 0.031 *vs* 0.403 ± 0.018, $P < 0.05$; 8 h: 0.763 ± 0.013 *vs* 0.382 ± 0.025, $P < 0.05$; 12 h: 0.784 ± 0.032 *vs* 0.361 ± 0.016, $P < 0.05$) and AQP-1 protein (4 h: 145 ± 6 *vs* 104 ± 4, $P < 0.05$; 8 h: 152 ± 8 *vs* 96 ± 5, $P < 0.05$; 12 h: 154 ± 4 *vs* 94 ± 3, $P < 0.05$) in lung tissues while lowered the levels of serum amylase, TNF-α, the value of W/D and the pathological changes of lung tissues. The level of serum TNF-α was negatively correlated with the expression of AQP-1.

CONCLUSION: AQP-1 may play an important role during ALI induced by SAP. The expression of AQP-1 is probably adjusted by TNF-α. DEX can decrease the pulmonary edema by increasing the expression of AQP-1.

Key Words: Severe acute pancreatitis; Acute lung injury; Aquaporin-1; Rat

Gao ZM, Chen HL, Liu XD. Expression and function of aquaporin-1 in acute lung injury induced by severe acute pancreatitis in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(5):453-457

■背景资料
急性胰腺炎可引起以肺水肿为主要病理表现的急性肺损伤, 其发病机制复杂. 以往的研究提示肺损伤的发生与炎症介质和细胞因子的过度释放有关, 如TNF-α等. 而对于和肺水转运密切相关的AQP-1与肺损伤的关系, 以及肺AQP-1的表达与炎症介质的关系尚未见报道.

■研发前沿
目前关于AQP-1与肺水转运以及肺水肿性疾病的关系是众多学者研究的热点, 现已证实其与多种肺损伤性疾病有关, 但对于AQP-1在肺组织表达的调控机制还没有完全明确. 对于其是否参与急性胰腺炎肺损伤的形成过程也亟待明确.

摘要

目的: 研究水通道蛋白-1(AQP-1)在急性胰腺炎大鼠肺组织中的表达及其功能, 探讨其表达与肺损伤的关系.

方法: 将Wistar大鼠分为假手术组(n = 24)、肺损伤组(n = 24)、地塞米松治疗组(n = 24). 采用逆行胰胆管注射15 g/L去氧胆酸诱发大鼠急性胰腺炎肺损伤模型, 地塞米松组于造模后立即于尾静脉注射地塞米松2 mg/kg. 每组分别于造模后4, 8, 12 h剖杀, 取血及肺组织. 通过检测血淀粉酶、血气、肺干/湿比值和肺组织病理切片判断胰腺炎及肺损伤的严重程度, 放免法测血清TNF-α水平, RT-PCR检测肺组织AQP-1 mRNA的表达, 免疫组化法检测肺组织AQP-1的表达.

结果: 与假手术组相比, 胰腺炎肺损伤组血清淀粉酶、肺干/湿比值、TNF-α、肺组织病理损害程度明显升高, 血氧、AQP-1 mRNA(4 h: 0.403±0.018 *vs* 0.794±0.015, P<0.01; 8 h: 0.382±0.025 *vs* 0.812±0.032, P<0.01; 12 h: 0.361±0.016 *vs* 198±5, P<0.01)和AQP-1蛋白(4 h: 104±4 *vs* 193±8, P<0.01; 8 h: 96±5 *vs* 201±7, P<0.01; 12 h: 94±3 *vs* 198±5, P<0.01)表达显著下调. 与肺损伤组相比, 地塞米松组血清淀粉酶、TNF-α、肺干/湿比值、肺组织病理损害程度明显降低, 血氧、AQP-1 mRNA(4 h: 0.681±0.031 *vs* 0.403±0.018, P<0.05; 8 h: 0.763±0.013 *vs* 0.382±0.025, P<0.05; 12 h: 0.784±0.032 *vs* 0.361±0.016, P<0.05)和AQP-1的蛋白(4 h: 145±6 *vs* 104±4, P<0.05; 8 h: 152±8 *vs* 96±5, P<0.05; 12 h: 154±4 *vs* 94±3, P<0.05)表达则明显升高, 且与TNF-α的水平呈负相关性.

结论: 水通道蛋白-1表达与急性胰腺炎的肺损伤密切相关, 其表达可能与TNF-α有关, 地塞米松可上调其表达而减轻肺水肿.

关键词: 急性重症胰腺炎; 肺损伤; 水通道蛋白-1; 大鼠

高振明, 陈海龙, 刘小东. 急性胰腺炎大鼠肺组织中水通道蛋白-1的表达及功能. 世界华人消化杂志 2007;15(5):453-457
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/453.asp

■相关报道
我国学者焦广宇、谢艳萍 *et al* 通过实验证实AQP-1在肺组织中有明确表达, 并且参与了内毒素血症引起的肺损伤过程, 为本实验研究的立题提供了重要依据.

0 引言

急性重症胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)发病急剧, 病情凶险, 早期合并以肺水肿为主要表现的急性肺损伤(acute lung injury, ALI)而加重病情[1]. 以往的研究多认为其损伤机制与炎症介质和细胞因子的过度释放有关[2], 而对水通道蛋白在肺损伤中的作用研究甚少, 其对肺水肿形成的影响尚不清楚. 本实验观察急性胰腺炎大鼠肺组织中水通道蛋白-1(aquaporin-1, AQP-1)表达的变化以及地塞米松对其表达的影响, 从新的角度探讨急性胰腺炎时肺损伤的发病机制.

表 1 肺组织镜下病理评分结果(n = 8)

分组	4 h	8 h	12 h
SHAM组	0.33 ± 0.58[b]	0.34 ± 0.46[b]	0.41 ± 0.58[b]
ALI组	1.50 ± 0.84	1.90 ± 0.74	2.08 ± 0.64
DEX组	0.96 ± 0.62[b]	0.87 ± 0.48[b]	0.91 ± 0.70[b]

[b]P<0.01 *vs* ALI.

1 材料和方法

1.1 材料 成年Wistar大鼠, 雌雄不限, 体质量200-250 g, 由大连医科大学实验动物中心提供; TNF-α放免试剂盒、AQP-1抗体、免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司; RT-PCR试剂盒购自大连宝生物工程公司.

1.2 方法

1.2.1 动物模型及分组 大鼠随机分3组: 假手术组(SHAM组), 胰腺炎肺损伤组(ALI组)和地塞米松治疗组(DEX组), 每组24只. ALI模型制备: 以15 g/L的熊去氧胆酸钠逆行注入胰胆管诱发胰腺炎肺损伤模型; SHAM组只在剖腹后翻动胰腺; DXE组在造模后立即于股静脉注射地塞米松2 mg/kg. 在造模后4, 8, 12 h每组随机选取8只(n = 8), 腹主动脉及下腔静脉采血, 动脉血立即行血气分析, 静脉血离心后血清置-70℃冰箱保存备用.

1.2.2 肺干/湿比值测定 动物放血致死后取左肺叶称湿质量, 置60℃烤箱连续烘烤24 h, 去除水分后称干质量.

1.2.3 肺组织病理形态观察 取右肺部分组织甲醛固定、石蜡包埋, 切片5 μm, HE染色观察.

1.2.4 血清淀粉酶测定 采用酶法, 由HITACHI自动生化分析仪测定.

1.2.5 血清TNF-α水平测定 采用放免法, 按试剂盒操作程序进行.

1.2.6 肺组织中AQP-1免疫组化检测 取右肺组织常规脱水、包埋制成蜡块, 用于免疫组化染色. 采用SP法, PBS代替一抗作为阴性对照, 按免疫组化试剂盒说明书操作. 结果判定: 每只大鼠取

表 2 各组大鼠检测指标比较(n = 8)

分组	时间(h)	Amy(μkat/L)	Po_2(mmHg)	W/D	TNF-α(ng/L)	AQP-1 mRNA	AQP-1免疫组化
SHAM组	4	15.2 ± 1.5	12.6 ± 0.5	5.28 ± 0.32	71.25 ± 5.25	0.794 ± 0.015	193 ± 8
	8	17.5 ± 0.7	11.3 ± 0.7	6.31 ± 0.25	74.31 ± 6.43	0.812 ± 0.032	201 ± 7
	12	16.0 ± 1.6	11.8 ± 0.4	6.12 ± 0.31	78.28 ± 5.26	0.782 ± 0.021	198 ± 5
ALI组	4	68.7 ± 6.0[b]	8.7 ± 0.8[b]	9.52 ± 0.71[b]	143.47 ± 29.00[b]	0.403 ± 0.018[b]	104 ± 4[b]
	8	75.7 ± 7.3[b]	7.9 ± 1.1[b]	10.45 ± 0.47[b]	234.20 ± 13.23[b]	0.382 ± 0.025[b]	96 ± 5[b]
	12	69.2 ± 8.9[b]	7.4 ± 0.8[b]	11.72 ± 0.68[b]	273.86 ± 14.21[b]	0.361 ± 0.016[b]	94 ± 3[b]
DEX组	4	20.5 ± 2.3[d]	10.6 ± 0.2[c]	6.82 ± 0.28[c]	98.32 ± 27.00[c]	0.681 ± 0.031[c]	145 ± 6[c]
	8	21.9 ± 2.8[d]	10.1 ± 0.3[c]	6.72 ± 0.34[c]	110.48 ± 32.12[c]	0.763 ± 0.013[c]	152 ± 8[c]
	12	18.8 ± 3.6[d]	9.8 ± 0.5[c]	6.12 ± 0.52[c]	108.72 ± 27.42[c]	0.784 ± 0.032[c]	154 ± 4[c]

[b]P<0.01 *vs* SHAM; [c]P<0.05 *vs* ALI; [d]P<0.01 *vs* ALI.

■创新盘点
本文通过动物实验证实AQP-1参与了急性胰腺炎肺损伤的病理过程, 同时证实AQP-1的表达受TNF-α的影响, 地塞米松可通过上调AQP-1的表达而减轻急性胰腺炎肺损伤的程度.

3张切片进行图像分析, 求其平均灰度.

1.2.7 肺组织中AQP-1 mRNA表达检测 取右肺组织, 提取总RNA. RT-PCR采用一步法. AQP-1引物设计: 上游为5' ATGGCCAGCGAAATCAAGAAG 3'; 下游引物为5'GATATCATCAGCATCCAGGTC 3'. β-action作为内参照, 其引物设计: 上游为5' GATATCGCTGCGCTCGTCGTC 3'; 下游为5' CATGAGGTAGTCTGTCAGGTC 3'. PCR反应条件: 94℃预变性5 min, 98℃变性10 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸10 s, 循环30次, 72℃延伸1 min, 最后降至4℃结束反应. PCR产物在琼脂糖凝胶中电泳后采用凝胶成像系统记录分析.

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

2 结果

2.1 肺组织病理形态学改变 光镜下SHAM组肺组织正常. ALI组4, 8, 12 h可见肺间质高度充血、水肿, 大量炎性细胞浸润, 可见广泛的肺泡出血, 肺间隔增厚, 部分肺泡腔融合形成肺大泡. 随着时间延长, 上述表现呈逐渐加重趋势. 按雷文章肺组织病理评分标准[3], 组织学评分显著高于SHAM组(P<0.01), 而DEX组肺组织炎症反应明显减轻, 组织学评分显著低于ALI组(P<0.01). 肺组织学评分见表1.

2.2 血清淀粉酶水平 SHAM组血清淀粉酶水平处于低水平, ALI组明显升高(P<0.01), 而DEX组较ALI组显著降低(P<0.05)(表2).

2.3 血清TNF-α水平 ALI组显著升高, 并随时间延长逐渐升高; 而SHAM组及DEX组明显低于ALI组(表2).

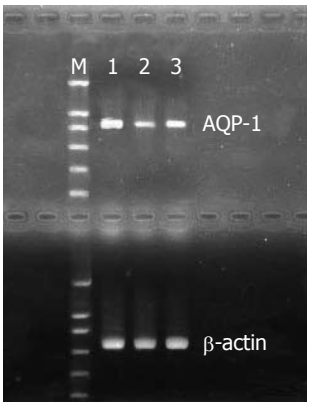


图 1 各组大鼠造模后8 h时肺组织AQP-1 mRNA表达结果. 1: SHAM组; 2: ALI组; 3: DEX组.

2.4 肺干/湿比值测定 ALI组肺干/湿比值明显增加, DEX组与其相比显著性降低(P<0.05)(表2).

2.5 肺组织中AQP-1 mRNA表达结果分析 ALI组AQP-1 mRNA表达较SHAM组显著下调(P<0.01), 而DEX组则较ALI组明显上调(P<0.05)(表2, 图1).

2.6 肺组织中AQP-1免疫组化分析 SHAM组可见AQP-1表达, 而ALI组AQP-1表达明显下调, 随着时间推移, 肺水肿逐渐加重, 伴随肺干/湿比值、血清TNF-α水平的升高, AQP-1表达下调逐渐加剧, DEX组较ALI组呈显著上调(表2, 图2).

3 讨论

SAP发病急剧, 病死率高. 早期死亡的主要原因是由于合并出现了ALI[1], 因此在SAP早期采取有效的治疗措施, 减少ALI的发生, 会大大提高SAP的生存率. 对于ALI的发病机制, 以往的研究认为炎症介质和细胞因子的过度激活与释放有关[2]. 其中TNF-α作为SAP早期即出现的炎症

■应用要点
本研究为今后治疗急性胰腺炎肺损伤中寻找能够调整AQP-1表达的治疗方法提供参考.

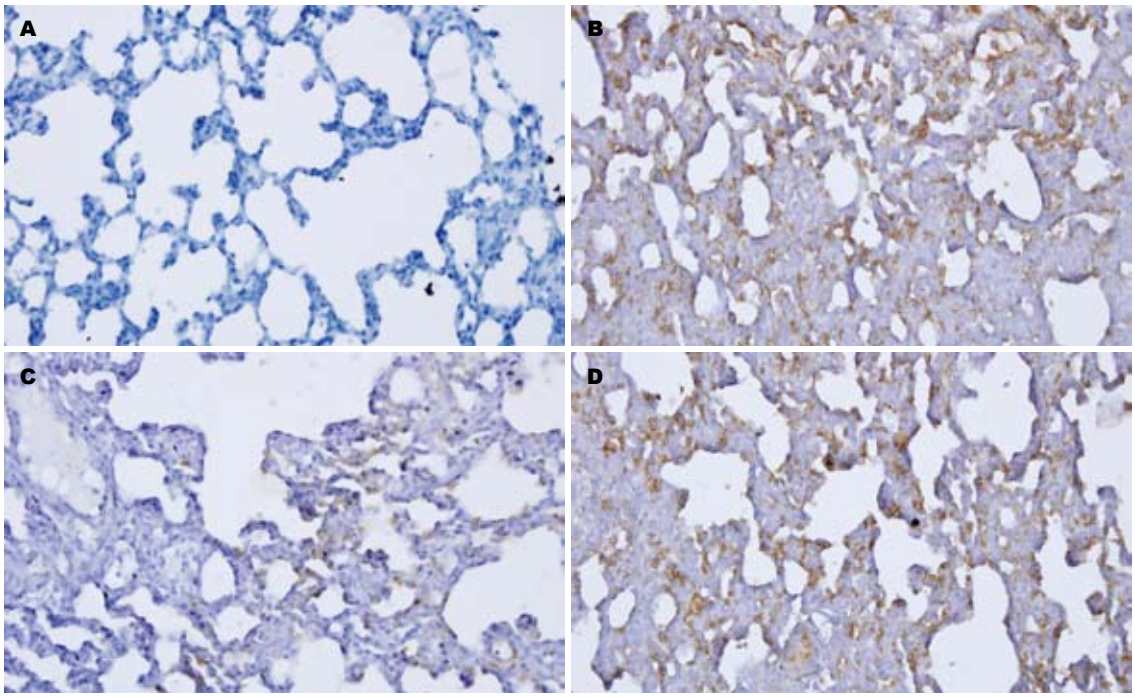


图 2 各组大鼠造模后8 h时肺组织AQP-1免疫组化结果. A: 阴性对照; B: SHAM组; C: ALI组; D: DEX组.

介质, 被认为是引起ALI的关键性物质, 其出现及水平的高低已经成为判定SAP发病严重程度及预后的早期指标[4-5]. ALI后肺水肿是导致急性呼吸功能衰竭的病理基础, 虽然涉及的因素较多, 但主要是肺内液体渗出与清除失衡的结果. 以往人们一直侧重研究血管内皮细胞的通透性, 而对病理条件下肺组织水通道蛋白的作用认识不足.

AQP是1990年代早期人们发现的、存在哺乳动物细胞膜上的一类疏水性蛋白, 是一种可调节进出细胞膜的水通道同源蛋白质大家族的总称, 他的存在很好解释了水分子的快速转运[6-7]. AQPs不仅参与生理状态下液体的转运, 可能还与病理状态下液体的转运失衡有关. 目前已证实肺组织中存在AQP-1, AQP-3, AQP-4, AQP-5等, 并参与了多种肺水肿性疾病的发生, 尤其是AQP-1被证实参与了高氧肺损伤、内毒素肺损伤等多种病理生理过程[8-10]. 而对于SAP继发ALI的病理过程中AQP-1作用目前研究甚少. 本实验结果证实, 在SAP继发ALI的过程中, 随着肺水肿的出现, AQP-1在肺组织中的蛋白表达及mRNA水平出现下调, 与SHAM组相比有显著差异(P<0.01), 其下调水平与肺水肿的程度成正比. 而在DEX组, 肺水肿程度较ALI组减轻, AQP-1在肺组织中的蛋白表达及mRNA水平相应出现显著上调(P<0.05), 证实了AQP-1确实参与肺水肿的形成. 同时本实验结果提示在ALI组, TNF-α水平显著高于SHAM组(P<0.01), 随着时间的推移、TNF-α水平逐渐升高, 肺损害逐渐加重, 表现为低氧血症逐渐加重, 肺水肿逐渐加重, 与此同时AQP-1蛋白表达及mRNA水平出现下调, 下调程度与TNF-α的升高水平存在负的线性关系, 提示AQP-1在肺组织的表达与TNF-α密切相关. Towne *et al*[11]证实TNF-α可能通过与TNF-α受体1结合激活了NF-κB途径下调了AQP-5的蛋白表达和mRNA水平, 推测TNF-α也可能通过同样途径下调了AQP-1的蛋白表达和mRNA水平.

由于激素作为非特异性免疫抑制剂, 具有抑制多种炎症介质及细胞因子的合成与释放, 所以地塞米松(DEX)很早即被应用于治疗SAP, 以减轻ALI的严重程度. 本实验中, DEX组肺损伤程度、TNF-α升高水平等指标均好于ALI组(P<0.01). DEX同时上调了AQP-1在肺组织中的蛋白表达及mRNA水平, 具体机制可能与DEX降低了TNF-α水平有关, 另外King *et al*[12]在AQP-1启动子中发现糖皮质激素反应元件, 提示DEX可调节AQP-1的表达.

本实验初步证实AQP-1确实与SAP合并ALI的形成有关, AQP-1的表达与TNF-α等因素有关, DEX可调节AQP-1的表达. 关于AQP-1参与AP时ALI形成的确切机制、AQPs的表达与AP类型

■名词解释
AQP-1: 水通道蛋白-1, 是水通道家族的一个亚型, 在肺组织中分布, 是肺水转运的快速通道, 与多种肺水肿性疾病的形成有关.

和时间的关系及寻找有效调节AQP-1表达的措施还有待进一步深入研究.

4 参考文献

1 Hartwig W, Werner J, Muller CA, Uhl W, Buchler MW. Surgical management of severe pancreatitis including sterile necrosis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002; 9: 429-435
2 Pastor CM, Matthay MA, Frossard JL. Pancreatitis-associated acute lung injury: new insights. *Chest* 2003; 124: 2341-2351
3 雷文章, 韦靖江. 实验性坏死性胰腺炎多器官损害与内毒素血症的关系. 中华实验外科杂志 1995; 12: 131-132
4 闻庆平, 陈海龙, 关凤林. 中药清胰汤治大鼠重症急性胰腺炎时急性肺损伤的比较. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1341-1345
5 徐军, 张梅, 刘学民, 潘承恩, 刘青光. TNF-α基因表达在大鼠急性重症胰腺炎肺损伤中的作用. 西安交通大学学报(医学版) 2004; 25: 388-389, 392
6 Saboori AM, Smith BL, Agre P. Polymorphism in the Mr 32,000 Rh protein purified from Rh(D)-positive and -negative erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 4042-4045
7 Anderson MR. Update on pediatric acute respiratory distress syndrome. *Respir Care* 2003; 48: 261-276
8 Jiao G, Li E, Yu R. Decreased expression of AQP1 and AQP5 in acute injured lungs in rats. *Chin Med J (Engl)* 2002; 115: 963-967
9 Su X, Song Y, Jiang J, Bai C. The role of aquaporin-1 (AQP1) expression in a murine model of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Respir Physiol Neurobiol* 2004; 142: 1-11
10 Towne JE, Harrod KS, Krane CM, Menon AG. Decreased expression of aquaporin (AQP)1 and AQP5 in mouse lung after acute viral infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22: 34-44
11 Towne JE, Krane CM, Bachurski CJ, Menon AG. Tumor necrosis factor-alpha inhibits aquaporin 5 expression in mouse lung epithelial cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 18657-18664
12 King LS, Nielsen S, Agre P. Aquaporin-1 water channel protein in lung: ontogeny, steroid-induced expression, and distribution in rat. *J Clin Invest* 1996; 97: 2183-2191

■同行评价

研究水通道蛋白-1(AQP-1)在急性胰腺炎大鼠肺组织中的表达及其功能, 探讨其表达与肺损伤发生机制的关系, 对于探讨急性胰腺炎重症化和多器官功能障碍的发病机制具有重要意义. 文章选题新颖, 立题有据, 结果准确, 结论可信, 有重要理论价值和临床意义.

电编 张敏 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

2007年协和肝脏外科新技术学习班通知

本刊讯 为了提高我国肝脏外科学临床与研究水平, 学习该领域国际先进技术和理念, 促进学术交流和学科发展, 由洛克菲勒基金会设立的CMB基金会资助, 中国医学科学院、中国协和医科大学、北京协和医院主办, 天津第一中心医院东方器官移植中心、中山大学第一附属医院器官移植中心协办, 中国医学科学院国际会议中心承办的“07年协和肝脏外科新技术学习班”将于2007-04下旬在北京市中国协和医科大学新科研教学楼举行.

培训班将邀请国内外肝脏外科领域著名专家黄洁夫教授、钟守先教授、芝加哥大学移植中心主任Michael Millis教授、瑞典Lund 大学肝外科主任Bengt Jeppsson教授、香港范上达教授、冷希圣教授、叶胜龙教授、沈中阳教授、何晓顺教授、朱继业教授、戴朝六教授等任教. 培训班除邀请国内知名专家作专题学术讲座外, 还有机会在天津第一中心医院东方器官移植中心进行临床肝移植的学习和观摩; 本培训班的另一个特点是参加培训的学员有申请CMB基金会合作课题并得到适当的基金资助的机会; 培训班将给予国家级继续教育学分10分. 我们真诚欢迎各位肝脏外科领域的同仁参加培训班, 共同促进和加强肝脏外科学的学术交流与合作, 推动我国肝脏外科学的发展.

收费标准: 培训费680元/人(含材料费和讲课费, 食宿自理)

通讯地址: 北京东城区东单三条9号中国医学科学院/中国协和医科大学国际合作处 邮编: 100730 联系人: 乔楠、蒋育红 电话: 010-65105934, 65105935, 65253447 传真: 010-65124876 E-mail: jiangyuhong@yzjg.pumc.edu.cn; dakuansun@yahoo.com.cn.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年2月18日; 15(5): 458-463
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

糖尿病慢传输运动结肠Cajal间质细胞和干细胞因子的变化

罗 云, 林 琳, 张红杰, 李学良, 吴高珏, 王美峰

■背景资料
糖尿病胃肠动力障碍作为糖尿病常见并发症, 严重影响着患者的生活质量和各种治疗性药物的吸收, 直到目前其发病原因仍不甚清楚. 随着对Cajal间质细胞功能的不断认识, 使人们看到了解决这个问题的曙光.

罗云, 林琳, 张红杰, 李学良, 吴高珏, 王美峰, 南京医科大学第一附属医院消化内科 江苏省南京市 210029
罗云, 南京医科大学硕士研究生, 主要研究方向为胃肠动力性疾病.
江苏省"135工程"重点人才基金项目, No. RC2003087
江苏省自然科学基金项目, No. BK2004158
通讯作者: 林琳, 210029, 江苏省南京市, 南京医科大学第一附属医院消化内科. lin9100@yahoo.com.cn
电话: 025-83781836-6920
收稿日期: 2006-11-29 接受日期: 2006-12-18

Alteration of Cajal interstitial cells and stem cell factors in colon with slow transit motility of diabetes mellitus

Yun Luo, Lin Lin, Hong-Jie Zhang, Xue-Liang Li, Gao-Jue Wu, Mei-Feng Wang

Yun Luo, Lin Lin, Hong-Jie Zhang, Xue-Liang Li, Gao-Jue Wu, Mei-Feng Wang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2004158, and the Fund from "135 Project" for the Key Talents of Health and Science Education Department of Jiangsu Province, No. RC2003087
Correspondence to: Lin Lin, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. lin9100@yahoo.com.cn
Received: 2006-11-29 Accepted: 2006-12-18

Abstract

AIM: To observe the alterations of interstitial cells of Cajal (ICC) and stem cell factors (SCF) in colon tissues with slow transit motility of diabetes mellitus, and study their roles and possible regulatory mechanism.

METHODS: A total of 54 male Sprague-Dawley rats were randomly and averagely divided into diabetes group and control group. Diabetes model was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin. Nine rats of the above two groups were killed respectively 6, 8 and 10 weeks after injection. The alterations of ICC and membrane-bound SCF (M-SCF) in the proximal colon tissues were analyzed by immunohistochemistry, transmission electron microscopy and Western blot, and the serum concentration of soluble SCF (S-SCF) were examined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: The level of blood glucose was elevated while the intestinal propulsive rate was lowered with the prolonging of time ($P > 0.05$). Immunohistochemistry showed that the number of myenteric ICC was significantly higher in diabetic rats than that in the controls, and the expression of proximal colon ICC was decreased with the time prolonging. Electron microscopy exhibited damaged microstructures of colonic ICC such as swelling, vacuole-like degeneration of mitochondria and obvious decrease of organelles. Meanwhile, the serum concentration of S-SCF was remarkably lower in diabetic rats than that in the controls (6 wk: 0.93 ± 0.53 μg/L *vs* 1.87 ± 0.92 μg/L, $P < 0.05$; 8 wk: 0.78 ± 0.21 μg/L *vs* 1.76 ± 0.94 μg/L, $P < 0.05$; 10 wk: 0.73 ± 0.20 μg/L *vs* 1.82 ± 0.96 μg/L, $P < 0.05$), but the content of M-SCF in the colon tissues had no significant difference between the diabetic and normal rats ($P > 0.05$). The alteration trend of S-SCF concentration was in accordance with that of ICC numbers.

CONCLUSION: Decrease of colonic ICC quantity and serum S-SCF concentration, and damaged microstructures of ICC are demonstrated in diabetic rats with slow transit motility of colon, and these changes and their successive regulation may contribute to the pathogenesis of slow transit motility.

Key Words: Interstitial cells of Cajal; Stem cell factor; Colon with slow transit motion; Diabetes mellitus

Luo Y, Lin L, Zhang HJ, Li XL, Wu GJ, Wang MF. Alteration of Cajal interstitial cells and stem cell factors in colon with slow transit motility of diabetes mellitus. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(5):458-463

摘要

目的: 了解Cajal间质细胞(ICC)、干细胞因子(SCF)在糖尿病大鼠结肠慢传输运动模型中的变化, 探讨其作用及可能的调控机制.

方法: 54只♂SD大鼠分为糖尿病和正常对照组, 经腹腔注射链脲佐菌素建立糖尿病大鼠模型, 于造模后6, 8, 10 wk各组分别处死9只大鼠, 以免疫组化、透射电镜研究近端结肠组织中ICC的变化, 以Western blot方法检测近端结肠组织中膜结合型干细胞因子的表达, 以ELISA测定血清中可溶型SCF的浓度, 分析他们之间的相关性.

结果: 糖尿病大鼠血糖随时间增加而升高, 而胃肠推进率却降低(P>0.05). 免疫组化结果显示, 6, 8, 10 wk时的糖尿病大鼠肌间ICC表达较对照组明显减少(P<0.05), 且糖尿病大鼠近端结肠ICC数量随时间推移有逐渐降少的趋势. 透射电镜显示糖尿病大鼠结肠ICC线粒体肿胀、空泡样变, 细胞器数量明显减少. 与对照组相比, 糖尿病大鼠血清中可溶型SCF显著降低(6 wk: 0.93±0.53 μg/L *vs* 1.87±0.92 μg/L, P<0.05; 8 wk: 0.78±0.21 μg/L *vs* 1.76±0.94 μg/L, P<0.05; 10 wk: 0.73±0.20 μg/L *vs* 1.82±0.96 μg/L, P<0.05), 而结肠组织中的膜结合型SCF无明显差异(P>0.05), 且可溶型干细胞因子与ICC具有相同的变化趋势.

结论: 糖尿病胃肠动力障碍大鼠存在血清中可溶性干细胞因子浓度下降以及结肠组织中ICC数量减少和结构破坏, 这些变化及其可能存在的序贯性调控作用可能是糖尿病出现结肠慢传输变化的基础.

关键词: 干细胞因子; 糖尿病; 结肠慢传输运动; Cajal间质细胞

罗云, 林琳, 张红杰, 李学良, 吴高珏, 王美峰. 糖尿病慢传输运动结肠Cajal间质细胞和干细胞因子的变化. 世界华人消化杂志 2007;15(5):458-463
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/458.asp

0 引言

糖尿病胃肠动力障碍是糖尿病最常见的并发症之一, 但其发病机制目前尚不十分清楚, 研究已经发现, 这可能与糖尿病胃肠道中对胃肠运动起重要作用的Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)的数量和结构异常有关[1-9], 但引起ICC异常的调控因素却知之甚少. 有关研究已经发现: Kit受体(蛋白)是ICC的特异性标记物, 其天然配基干细胞因子(stem cell factor, SCF)与Kit受体结合形成SCF-KIT系统, 参与机体所有含Kit受体细胞的发育、增殖及分化[10-16], 而干细胞因子又有两种形式: 可溶型干细胞因子(soluble stem cell factor, S-SCF)及膜结合型干细胞因子(membrane-bound stem cell factor, M-SCF), 目前对SCF的研究报道主要集中在S-SCF, 而对M-SCF的生物学作用知之相对为少. 两者都有生物学活性, 均可影响髓系和红系造血, 且S-SCF可能指导造血祖细胞的迁移和精原细胞、黑色素细胞(均为Kit阳性细胞)在胚胎发育中的生成或皮肤黑色素细胞的存活; 而对于同样拥有Kit受体的ICC, 其调控作用尚不明确. 糖尿病胃肠动力障碍时胃肠道ICC表达异常是否与SCF改变有关, 本实验拟对此作出研究-观察两种SCF和ICC在糖尿病胃肠动力障碍机体肠道中的变化情况, 并探讨SCF对ICC可能的调控作用.

■研发前沿
Cajal间质细胞作为胃肠道起搏细胞, 当前研究证实他与多种胃肠动力性疾病相关, 已成为此领域研究的一个热点.

1 材料和方法

1.1 材料 成年♂SD大鼠(上海, 斯莱克公司)54只, 体质量180-200 g, 随机分为: 实验组(糖尿病组)27只; 正常对照组27只. 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ, Sigma, USA), 印度墨水(南京晚晴化玻仪器有限公司), c-Kit抗体(sc-168, 兔多克隆抗体, Santa Cruz, USA), SCF抗体(Peprotech, 羊多克隆抗体, USA), 兔抗羊二抗(Santa Cruz, USA), 免疫组化SP法试剂盒(福州迈新生物有限公司), SCF ELISA试剂盒(RapidBio Lab, California, USA), 透射电镜等.

1.2 方法

1.2.1 糖尿病大鼠模型的建立 实验组大鼠腹腔内一次性注射STZ 60 mg/kg[17-18]; 正常对照组腹腔内注射等量柠檬酸注射液. 3 d后测定血糖, 糖尿病组大鼠以血糖≥16.7 mmol/L(300 mg/dl)者为糖尿病模型建立, 血糖<16.7 mmol/L者剔除实验[17]. 所有大鼠在无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级环境饲养, 监测大鼠血糖等一般情况.

1.2.2 糖尿病胃肠动力障碍模型的形成和确认 所有大鼠均记录(1)日平均粪便重量和性状; (2)胃肠推进率: 于造模后6, 8, 10 wk各组分别处死9只大鼠, 所有大鼠于处死前均给予印度墨水(10 μL/g体质量)灌胃, 30 min后颈椎脱臼处死大鼠, 剖腹取出全部胃肠道, 测量并计算无张力下胃肠推进率(胃肠推进率 = 墨汁推进距离/肠道全长×100%)[19]. 根据张亚萍 *et al*[6]报道方法, 具备以上任一种显著变化情况时, 则可认为糖尿病胃肠功能紊乱大鼠模型建立成功.

1.2.3 免疫组化(SP法)分析ICC表达情况 剪取大

■创新盘点
本研究通过在体大鼠实验, 在验证糖尿病胃肠动力障碍Cajal间质细胞的变化基础上, 从其配基干细胞因子方面探讨其可能的调控因素, 此在国内尚无报道, 而国外仅见个别通过离体培养在此方面作出的相关研究.

鼠近端结肠长约0.5 cm, PBS冲洗、40 g/L多聚甲醛固定, 常规包埋、切片、脱蜡、水化、抗原修复. 滴加c-Kit一抗(1∶50稀释)50 μL, 37℃孵育1 h后4℃过夜, 先后滴加生物素标记的二抗C及链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶D各50 μL, 室温孵育15 min, DAB显色1-10 min, 苏木素衬染细胞核, 冲洗、脱水透明、封片、显微镜观察. 阳性结果判断: 显微镜下胞质出现棕黄色片状或颗粒状物为阳性反应.

1.2.4 电镜观察 取近端结肠长约1 cm, 清洗吸干后, 立即放入50 g/L戊二醛中固定. 经前固定、漂洗、后固定、漂洗、块染、脱水、浸渍后包埋成块, 60℃恒温箱36 h, 光镜下半薄切片定位, 确定组织分层后, LKB-Ⅱ超薄切片机切片, 行透射电镜观察、照相.

1.2.5 酶联免疫吸附实验(ELISA)检测血清中SCF(S-干细胞因子)的浓度 血清按1∶10 000稀释, 依照试剂盒要求步骤操作, 最后在酶标仪上450 nm波长处读取*A*值并换算成浓度.

1.2.6 Western blot法检测结肠组织中M-干细胞因子的含量 近端结肠组织研磨后提取蛋白并定量, 150 g/L SDS-PAGE凝胶40 μg蛋白/孔, 恒流40 mA电泳, 恒压100 V电转膜2 h, 将蛋白转印至PVDF膜. 50 g/L脱脂奶粉于室温封闭2 h, 加入稀释的SCF羊抗鼠多克隆抗体(0.1 mg/L)37℃孵育1 h后4℃过夜. TBST洗膜后, 加1∶3000 HRP标记二抗, 28℃孵育90 min, TBST洗膜, 加入化学发光试剂至膜上1 min, 最后曝光、显影.

统计学处理 所有数据录入SPSS10.0软件包分析, 采用成组*t*检验和方差分析, 以均数±标准差表示, $P<0.05$为有显著性差异.

2 结果

2.1 空腹血糖 饲养6, 8, 10 wk后, 糖尿病组血糖明显高于相应对照组($P<0.05$)(图1), 且随病程延长糖尿病组血糖有逐渐升高的趋势($F = 1.156$, $P>0.05$).

2.2 胃肠推进率 在6, 8, 10 wk时, 糖尿病组均较对照组显著降低, 有统计学差异($P<0.05$)(图2), 且胃肠推进率随时间推移有逐渐降低的趋势($F = 2.201$, $P>0.05$).

2.3 免疫组化结果 ICC主要位于结肠肌间、黏膜下及肌内, 尤以肌间表达丰富. 6, 8, 10 wk时的糖尿病大鼠肌间ICC表达较对照组明显减少($P<0.05$), 且糖尿病大鼠近端结肠ICC表达随时间推移有逐渐降少的趋势(图3).

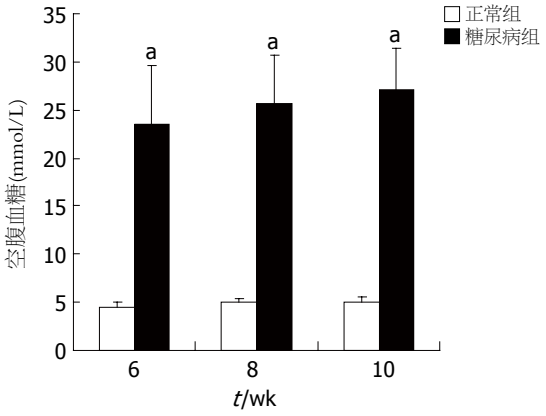


图 1 正常及糖尿病组空腹血糖值. $^aP<0.05$ *vs* 正常组.

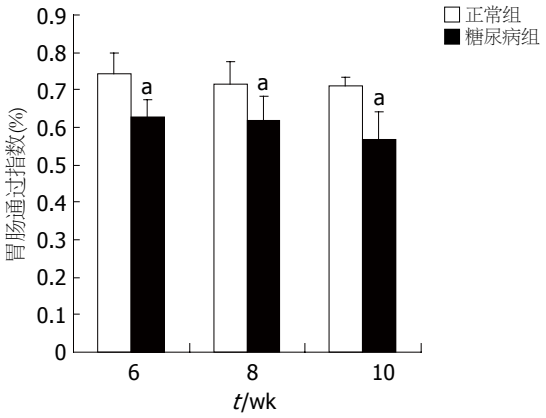


图 2 正常及糖尿病组胃肠通过指数. $^aP<0.05$ *vs* 正常组.

2.4 透射电镜结果 正常大鼠结肠ICC主要分布于环肌层与纵肌层之间、环肌细胞之间、环肌层内表面, 常与神经纤维末梢及神经束平行分布, 可见散在缝隙连接, 核不规则, 胞质少, 有较完整的基膜, 胞质内富有细胞器, 以线粒体最丰富, 紧密排列在胞质里, 游离核糖体与多聚核糖体亦多见, 偶有粗面内质网、滑面内质网及高尔基体等. 糖尿病大鼠结肠ICC线粒体肿胀、空泡样变、甚至溶解, 胞质、基膜部分溶解, 细胞器数量较正常明显减少, 细胞内大量空泡形成, 内质网明显扩张, 部分粗面内质网脱颗粒, ICC之间、与平滑肌细胞、神经末梢之间的缝隙连接结构破坏并减少. 此变化随时间延长有愈发严重的趋势(图4).

2.5 血清SCF浓度 血清中S-SCF, 6 wk时糖尿病组和对照组分别为0.93±0.53 μg/L和1.87±0.92 μg/L($P<0.05$); 8 wk时分别为0.78±0.21 μg/L和1.76±0.94 μg/L($P<0.05$); 10 wk时分别为0.73±0.20 μg/L和1.82±0.96 μg/L($P<0.05$); 均存在统计学差异, 且糖尿病各组S-SCF随时间

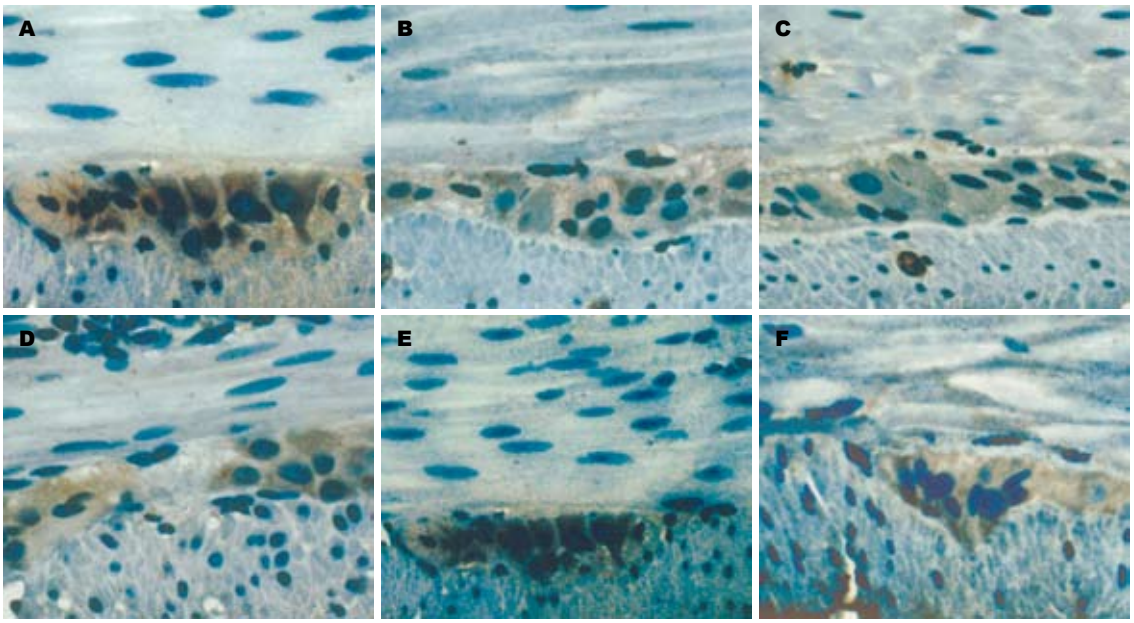


图 3 正常及糖尿病组肌间ICC免疫组化结果(×400). A−C: 正常组; D−E: 糖尿病组; F: 糖尿病组近端结肠组织; A, D: 6 wk; B, E: 8 wk; C, F: 10 wk.

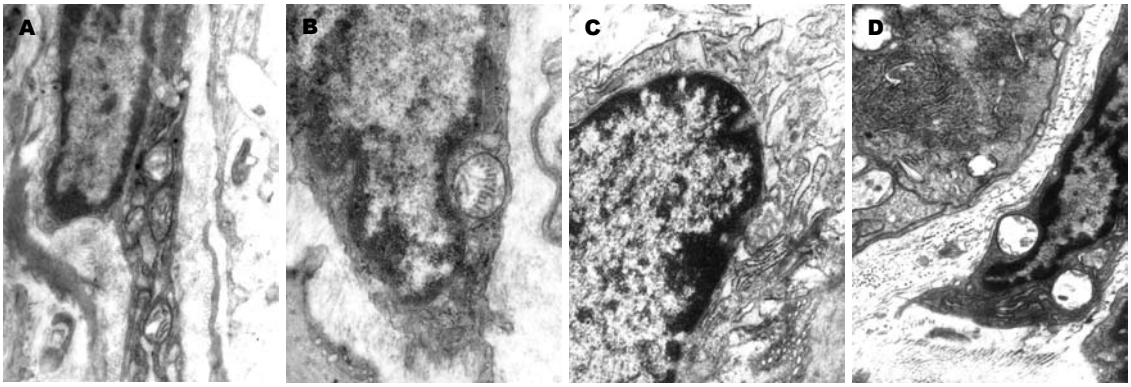


图 4 正常及糖尿病组肌间ICC电镜结果. A: 正常组(×15 000); B: 6 wk糖尿病组(×25 000); C: 8 wk糖尿病组(×20 000); D: 10 wk糖尿病组近端结肠组织(×15 000).

推移有逐渐下降的趋势($F = 0.593$, $P>0.05$).

2.6 结肠组织SCF的Western blot结果 近端结肠组织中M-SCF, 经Western blot检测发现6, 8, 10 wk时糖尿病组与对照组之间, M-SCF均无明显差异($P>0.05$)(图5).

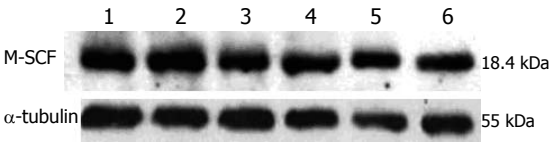


图 5 近端结肠组织中膜结合型SCF的Western blot结果. 1, 3, 5: 糖尿病组; 2, 4: 正常组; 6: 正常组近端结肠组织; 1−2: 6 wk; 3−4: 8 wk; 5−6: 10 wk.

3 讨论

胃肠动力障碍是糖尿病常见并发症, 随着对ICC是胃肠道起搏细胞并传导肌电信号理论[20-23]的不断认识, 愈来愈多的证据[1-9]表明胃肠道组织内ICC数量减少及结构破坏导致胃肠功能紊乱发生, 由于ICC数量减少和结构破坏, 导致胃肠起搏功能减弱及电兴奋传导衰减, 平滑肌产生异常的不规则慢波、收缩运动障碍、蠕动减少或不能产生有效的推进性收缩运动, 临床上出现胃肠动力障碍症状. 本实验中, 糖尿病大鼠模型, 经胃肠通过指数检测筛选出胃肠动力障碍大鼠(主要为胃肠转运减慢). 免疫组化和透射电镜发现糖尿病大鼠近端结肠肌间丛ICC数量明显减少, 超微结构破坏, 且随时间推移ICC数量

■应用要点
阐明糖尿病胃肠动力障碍的致病原因及可能的调控因素, 可为临床治疗和开发相关用药提供理论基础.

■名词解释
Kit受体(蛋白): 是Cajal间质细胞的特异性标记物, 中文名为酪氨酸蛋白激酶受体, 干细胞因子是其天然配基, 由于检测其含量可间接反映Cajal间质细胞表达水平, 因此国内外都以他作为ICC定量的一个指标.

进一步减少、超微结构破坏加重, 与文献报道相符, 提示胃肠道ICC数量减少和结构改变可能是导致糖尿病胃肠动力障碍的机制之一, 且随病程延长这种改变愈加明显. 由于ICC数量减少和结构破坏, 导致胃肠起搏功能减弱及电兴奋传导衰减, 平滑肌产生异常的不规则慢波、收缩运动障碍、蠕动减少或不能产生有效的推进性收缩运动, 临床上出现胃肠动力障碍症状. 本实验结果还提示, ICC数量减少和结构破坏与糖尿病的病程有关, 有随病程延长而改变愈加明显的的趋势.

SCF作为ICC的特异性标志物Kit受体的天然配基, 他参与机体发育中的多种细胞生长的调控, 是一种多功能细胞生长因子, 在细胞增殖、分化和迁移过程中发挥重要的调控作用[24]. 天然的SCF存在两种类型: S-SCF和M-SCF, 两者都有生物学活性, 他们是通过蛋白水解酶位点的相互剪切而产生(6位外显子编码一种蛋白水解酶, 含有可产生S-SCF, 否则产生M-SCF). Kit受体被其配体SCF活化后, PI3激酶活化, 导致磷酸肌醇的肌醇环O-H位点磷酸化, 产生3, 4, 5-三磷酸磷脂酰肌醇, 使多个信号途径活化, 此对于ICC的分化、发育、增殖及表型维持具有重要作用[16]. 另有文献报道, 造血干细胞和胰岛组织等含有Kit受体的细胞, 在其发育及分化过程中亦需要SCF-Kit信号的持续刺激[11-14], 可见SCF-Kit的信号通路在所有Kit阳性细胞的形态和功能维持方面具有重要的意义. 有关ICC受SCF-Kit系统的调控作用, 先前多数研究均集中于Kit受体方面(如ACK2受体阻滞)[20,25], 而理论上SCF的改变将可能同样影响ICC的存在及功能, Battaglia *et al*[8]的报道及ICC离体培养实验[15,26]均支持此种推测. 究竟糖尿病胃肠动力障碍时有无SCF表达下调、何种亚型表达异常并发挥作用, 目前尚无明确结论. 本实验显示: 糖尿病大鼠血清中S-SCF显著降低, 且随病程延长有愈加明显的趋势; 而在糖尿病病程的不同阶段, 均未见M-SCF的表达与正常组存在差异. 此与Horvath *et al*[27]关于糖尿病时胃肠道S-SCF-RNA表达下调报道相一致. 作为Kit受体的功能性配基, S-SCF表达的降低, 将导致SCF-Kit信号传导功能减弱, 影响ICC发育、增殖、分化及表型维持[15-16].

文献报道, SCF变异及降低后可见ICC的数量减少[28-29], Horvath *et al*[30]亦提出, 胰岛素及胰岛素样生长因子-Ⅰ刺激SCF的表达, 对于维持ICC的长期存在是必需的, 糖尿病胃肠动力障碍时可能由于胰岛素分泌减少, 使SCF表达下降, 导致ICC异常改变而致病. 本实验中作为信号通路的一方面, S-SCF的降低将影响ICC的表达, 结合糖尿病大鼠血清中S-SCF呈渐进性的降低, 与ICC随糖尿病病程的延长逐渐减少具有相同的变化趋势, 更加提示血清中SCF降低与结肠组织ICC异常改变具有一定相关性, SCF浓度降低可能是糖尿病胃肠慢传输运动时ICC表达下调的动因之一. 至于实验结果中糖尿病大鼠结肠组织M-SCF在病程的不同阶段改变均不明显, 是否与实验模型和检测部位有关, 或有其他作用途径, 尚需进一步实验加以证实.

ICC异常改变可能是糖尿病胃肠动力障碍的重要发病因素之一, SCF-Kit系统下调可能是其上游调控因素, 但糖尿病时血清中SCF表达下调的机制, 他是否影响ICC的存在及功能, 糖尿病胃肠动力障碍时ICC的改变是否受存在其他调控途径, 都有待于进一步研究.

4 参考文献

1 Ordog T, Takayama I, Cheung WK, Ward SM, Sanders KM. Remodeling of networks of interstitial cells of Cajal in a murine model of diabetic gastroparesis. *Diabetes* 2000; 49: 1731-1739
2 Forster J, Damjanov I, Lin Z, Sarosiek I, Wetzel P, McCallum RW. Absence of the interstitial cells of Cajal in patients with gastroparesis and correlation with clinical findings. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 102-108
3 Lin Z, Forster J, Sarosiek I, Damjanov I, McCallum RW. Baseline status of interstitial cells of Cajal predicts long-term symptom improvement in gastroparetic patients treated with gastric electrical stimulation. *Gastroenterology* 2004; 126(Suppl.2): A-73
4 He CL, Soffer EE, Ferris CD, Walsh RM, Szurszewski JH, Farrugia G. Loss of interstitial cells of cajal and inhibitory innervation in insulin-dependent diabetes. *Gastroenterology* 2001; 121: 427-434
5 Nakahara M, Isozaki K, Hirota S, Vanderwinden JM, Takakura R, Kinoshita K, Miyagawa J, Chen H, Miyazaki Y, Kiyohara T, Shinomura Y, Matsuzawa Y. Deficiency of KIT-positive cells in the colon of patients with diabetes mellitus. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 666-670
6 张亚萍, 张宽学, 罗金燕, 齐惠滨. 糖尿病大鼠肠道Cajal间质细胞结构变化的研究. 中华内科杂志 2002; 41: 310-312
7 龙庆林, 房殿春, 史洪涛, 罗元辉. 糖尿病大鼠胃Cajal间质细胞超微结构的改变. 中华消化杂志 2004; 24: 434-435
8 Battaglia E, Bassotti G, Bellone G, Dughera L, Serra AM, Chiusa L, Repici A, Mioli P, Emanuelli G. Loss of interstitial cells of Cajal network in severe idiopathic gastroparesis. *World J Gastroenterol* 2006;

12: 6172-6177
9 Long QL, Fang DC, Shi HT, Luo YH. Gastro-electric dysrhythm and lack of gastric interstitial cells of cajal. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1227-1230
10 Hollenbeck ST, Sakakibara K, Faries PL, Workhu B, Liu B, Kent KC. Stem cell factor and c-kit are expressed by and may affect vascular SMCs through an autocrine pathway. *J Surg Res* 2004; 120: 288-294
11 Li J, Goodyer CG, Fellows F, Wang R. Stem cell factor/c-Kit interactions regulate human islet-epithelial cluster proliferation and differentiation. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 961-972
12 Bashamboo A, Taylor AH, Samuel K, Panthier JJ, Whetton AD, Forrester LM. The survival of differentiating embryonic stem cells is dependent on the SCF-KIT pathway. *J Cell Sci* 2006; 119: 3039-3046
13 Muta K, Krantz SB, Bondurant MC, Dai CH. Stem cell factor retards differentiation of normal human erythroid progenitor cells while stimulating proliferation. *Blood* 1995; 86: 572-580
14 Wojda U, Leigh KR, Njoroge JM, Jackson KA, Natarajan B, Stitely M, Miller JL. Fetal hemoglobin modulation during human erythropoiesis: stem cell factor has "late" effects related to the expression pattern of CD117. *Blood* 2003; 101: 492-497
15 Nakahara M, Isozaki K, Vanderwinden JM, Shinomura Y, Kitamura Y, Hirota S, Matsuzawa Y. Dose-dependent and time-limited proliferation of cultured murine interstitial cells of Cajal in response to stem cell factor. *Life Sci* 2002; 70: 2367-2376
16 Ward SM, Brennan MF, Jackson VM, Sanders KM. Role of PI3-kinase in the development of interstitial cells and pacemaking in murine gastrointestinal smooth muscle. *J Physiol* 1999; 516 (Pt 3): 835-846
17 Yumuk Z, Kucukbasmaci O, Buyukbaba Boral O, Kucuker Ang M, Dundar V. The effects of streptozotocin-induced diabetes on brucellosis of rats. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; 39: 275-278
18 Vural H, Sabuncu T, Arslan SO, Aksoy N. Melatonin inhibits lipid peroxidation and stimulates the antioxidant status of diabetic rats. *J Pineal Res* 2001; 31: 193-198
19 乔娴, 刘劲松, 吴汉妮, 侯晓华. 糖尿病大鼠胃肠运动障碍的实验研究. 胃肠病学和肝病学杂志 1998; 9: 242-244
20 Ordog T, Ward SM, Sanders KM. Interstitial cells of cajal generate electrical slow waves in the murine stomach. *J Physiol* 1999; 518 (Pt 1): 257-269
21 Sanders KM. A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 1996; 111: 492-515
22 Ward SM, Harney SC, Bayguinov JR, McLaren GJ, Sanders KM. Development of electrical rhythmicity in the murine gastrointestinal tract is specifically encoded in the tunica muscularis. *J Physiol* 1997; 505 (Pt 1): 241-258
23 Der-Silaphet T, Malysz J, Hagel S, Larry Arsenault A, Huizinga JD. Interstitial cells of cajal direct normal propulsive contractile activity in the mouse small intestine. *Gastroenterology* 1998; 114: 724-736
24 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10344-10349
25 Torihashi S, Nishi K, Tokutomi Y, Nishi T, Ward S, Sanders KM. Blockade of kit signaling induces transdifferentiation of interstitial cells of cajal to a smooth muscle phenotype. *Gastroenterology* 1999; 117: 140-148
26 Li CX, Liu BH, Tong WD, Zhang LY, Jiang YP. Dissociation, culture and morphologic changes of interstitial cells of Cajal *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2838-2840
27 Horvath VJ, Vittal H, Lorincz A, Chen H, Almeida-Porada G, Redelman D, Ordog T. Reduced stem cell factor links smooth myopathy and loss of interstitial cells of cajal in murine diabetic gastroparesis. *Gastroenterology* 2006; 130: 759-770
28 Ward SM, Burns AJ, Torihashi S, Harney SC, Sanders KM. Impaired development of interstitial cells and intestinal electrical rhythmicity in steel mutants. *Am J Physiol* 1995; 269: C1577-1585
29 Mikkelsen HB, Malysz J, Huizinga JD, Thuneberg L. Action potential generation, Kit receptor immunohistochemistry and morphology of steel-Dickie (Sl/Sld) mutant mouse small intestine. *Neurogastroenterol Motil* 1998; 10: 11-26
30 Horvath VJ, Vittal H, Redelman D, Almeida-Porada G, Ordog T. Stimulation of stem cell factor (SCF) expression by insulin or insulin-like growth factor-1 (IGF-1) is required for the long-term maintenance of interstitial cells of Cajal (ICC). *Gastroenterology* 2004; 126(Suppl.2): A-102

电编 张敏 编辑 张焕兰

■同行评价

本文实验证据尚充足，结果较明确，文章的科学性、创新性和可读性能较好的反映我国或国际胃肠病学临床和基础研究的先进水平.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年2月18日; 15(5): 464-470
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

骨髓基质干细胞向肝细胞的定向分化及体内移植

郭菲菲, 刘晓萍, 高胜利, 冯智慧

■背景资料
骨髓基质干细胞(BMSCs)是骨髓内的一种非造血干细胞, 他既有自我复制和高度增殖的能力, 又有多向分化的潜能. 利用BMSCs的可获得性、可扩增性及可多向分化性, 可将BMSCs应用于细胞替代及组织器官再造等治疗方法, 具有非常重要的理论研究意义和临床应用价值.

郭菲菲, 青岛大学医学院病理生理学教研室 山东省青岛市 266021
刘晓萍, 冯智慧, 青岛大学医学院组织学与胚胎学教研室 山东省青岛市 266021
高胜利, 青岛大学医学院医学研究生教育管理办公室 山东省青岛市 266021
郭菲菲, 2002年青岛大学医学院硕士, 助教, 主要从事干细胞的研究.
通讯作者: 刘晓萍, 266021, 山东省青岛市登州路38号, 青岛大学医学院组织学与胚胎学教研室. xpliu572001@yahoo.com.cn
电话: 0532-82991708
收稿日期: 2006-10-26 接受日期: 2006-11-28

Differentiation into hepatocytes and transplantation of bone marrow stromal stem cells

Fei-Fei Guo, Xiao-Ping Liu, Sheng-Li Gao, Zhi-Hui Feng

Fei-Fei Guo, Department of Pathophysiology, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong Province, China
Xiao-Ping Liu, Zhi-Hui Feng, Department of Histology and Embryology, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong Province, China
Sheng-Li Gao, Office of Postgraduate Administration, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong Province, China
Correspondence to: Xiao-Ping Liu, Department of Histology and Embryology, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong Province, China. xpliu572001@yahoo.com.cn
Received: 2006-10-26 Accepted: 2006-11-28

Abstract

AIM: To investigate the differentiation of bone marrow stromal stem cells (BMSCs) into hepatocytes *in vitro* and the reparation of liver cells after BMSCs transplantation in mice with liver injury.

METHODS: BMSCs were induced by hepatic extract fluid (HE) to differentiate into hepatocytes *in vitro*, which was identified by immunocytochemistry and Indocyanine green (ICG) staining. The BrdU-labeled BMSCs were transplanted into the mice through caudal vein, and then the their distributions were detected by immunohistochemistry. The concentration changes of aspartate aminotransferase (AST, nkat/L), alanine aminotransferase (ALT, nkat/L) and alkaline phosphatase (AKP, nkat/L) were observed by serum enzymology test on the 7th, 14th, 28th day after transplantation.

RESULTS: BMSCs were differentiated into hepatocytes under the induction of HE *in vitro*, but the expression levels of α1-antitrypsin (4 d: 52.5 ± 3.9 *vs* 76.8 ± 4.5, $P < 0.05$; 14 d: 60.3 ± 6.1 *vs* 85.4 ± 7.6, $P < 0.05$; 21 d: 80.5 ± 8.0 *vs* 105.7 ± 8.6, $P < 0.05$) and albumin (4 d: 43.2 ± 6.5 *vs* 71.6 ± 7.6, $P < 0.05$; 14 d: 61.5 ± 10.4 *vs* 93.6 ± 13.9, $P < 0.05$; 21 d: 80.6 ± 17.1 *vs* 128.3 ± 22.2, $P < 0.05$) in the HE-induced cells were significantly higher than those in the hepatic growth factor-induced ones. It was found that the transplanted BMSCs slowly transferred from the portal area to liver parenchyma, and fused with liver cells. The serum concentration of ALT (7 d: 493.43 ± 120.02 *vs* 696.81 ± 140.03, $P < 0.01$; 14 d: 558.45 ± 130.03 *vs* 780.16 ± 151.7, $P < 0.01$; 28 d: 583.45 ± 138.36 *vs* 880.18 ± 170.53, $P < 0.01$), AST (7 d: 1521.97 ± 186.7 *vs* 2342.14 ± 208.38, $P < 0.01$; 14 d: 1590.32 ± 200.04 *vs* 2692.21 ± 238.38, $P < 0.01$; 28 d: 1625.33 ± 208.38 *vs* 2872.24 ± 281.72, $P < 0.01$) and AKP (7 d: 1.24 ± 0.22 *vs* 1.78 ± 0.18, $P < 0.01$; 14 d: 1.21 ± 0.21 *vs* 2.00 ± 0.19, $P < 0.01$; 28 d: 1.32 ± 0.19 *vs* 2.27 ± 0.20, $P < 0.01$) were lower in the transplanted group than those in liver-injury group, but still higher than those in the normal controls.

CONCLUSION: BMSCs can differentiate into hepatocytes under the induction of HE *in vitro*, and the transplantation of BMSCs can be helpful in the repair of injured liver in mice.

Key Words: Bone marrow stromal stem cell; Hepatocyte; Differentiation; Transplantation

Guo FF, Liu XP, Gao SL, Feng ZH. Differentiation into hepatocytes and transplantation of bone marrow stromal stem cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(5):464-470

摘要

目的: 研究骨髓基质干细胞(BMSCs)在体外向肝细胞的定向分化和体内移植后对小鼠受损肝脏的修复作用.

方法: 在体外培养体系中用肝细胞提取液(HE)模拟体内肝脏微环境, 诱导BMSCs向肝细胞定向分化, 以免疫细胞化学和吲哚靛青绿(ICG)染色检测其分化程度. 将5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)标记的BMSCs移植入小鼠体内, 免疫组织化学方法显示BMSCs在肝脏的分布, 血清酶学检测肝脏受损小鼠移植后7, 14, 28 d谷草转氨酶(AST, nkat/L)、谷丙转氨酶(ALT, nkat/L)和碱性磷酸酶(AKP, nkat/L)的含量变化.

结果: 在体外BMSCs可由HE诱导分化成肝细胞, 但HE诱导组α1-抗胰蛋白酶(4 d: 52.5±3.9 *vs* 76.8±4.5, $P<0.05$; 14 d: 60.3±6.1 *vs* 85.4±7.6, $P<0.05$; 21 d: 80.5±8.0 *vs* 105.7±8.6, $P<0.05$)和白蛋白(4 d: 43.2±6.5 *vs* 71.6±7.6, $P<0.05$; 14 d: 61.5±10.4 *vs* 93.6±13.9, $P<0.05$; 21 d: 80.6±17.1 *vs* 128.3±22.2, $P<0.05$)表达量少于HGF诱导组; 体内移植后BMSCs整合于肝实质内; 肝脏受损小鼠移植BMSCs后, 血清中ALT (7 d: 493.43±120.02 *vs* 696.81±140.03, $P<0.01$; 14 d: 558.45±130.03 *vs* 780.16±151.7, $P<0.01$; 28 d: 583.45±138.36 *vs* 880.18±170.53, $P<0.01$)、AST (7 d: 1521.97±186.7 *vs* 2342.14±208.38, $P<0.01$; 14 d: 1590.32±200.04 *vs* 2692.21±238.38, $P<0.01$; 28 d: 1625.33±208.38 *vs* 2872.24±281.72, $P<0.01$)和AKP(7 d: 1.24±0.22 *vs* 1.78±0.18, $P<0.01$; 14 d: 1.21±0.21 *vs* 2±0.19, $P<0.01$; 28 d: 1.32±0.19 *vs* 2.27±0.2, $P<0.01$)比损伤组小鼠相应值均有下降, 但仍高于正常对照组.

结论: BMSCs在体外可由HE诱导分化成肝细胞, 在体内移植后可促进小鼠受损肝脏的修复.

关键词: 骨髓基质干细胞; 肝细胞; 分化; 移植

郭菲菲, 刘晓萍, 高胜利, 冯智慧. 骨髓基质干细胞向肝细胞的定向分化及体内移植. 世界华人消化杂志 2007;15(5):464-470
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/464.asp

0 引言

骨髓基质干细胞(bone marrow stromal stem cells, BMSCs)是骨髓内的一种非造血干细胞[1], 他既有自我复制和高度增殖的能力, 又有多向分化的潜能[2-4]. 利用BMSCs的可获得性、可扩增性及可多向分化性, 可将BMSCs应用于细胞替代及组织器官再造等治疗方法, 具有非常重要的理论研究意义和临床应用价值. 现已有大量研究证实, 在体外培养条件下BMSCs可由HGF等细胞因子诱导向肝细胞分化, 并可释放多种肝细胞因子[5], 但体内移植后BMSCs对受损肝脏是否有修复作用则鲜见报道. 本实验从小鼠骨髓中分离BMSCs细胞, 以肝细胞提取液(HE)模拟体内微环境, 体外诱导BMSCs向肝细胞分化; 然后将标记的BMSCs通过尾静脉移植入肝脏损伤小鼠体内, 检测BMSCs移植后在肝实质内的分布, 并检测移植后小鼠肝脏损伤修复程度. 以期摸索一种慢性肝脏损伤治疗的新途径, 为临床上应用BMSCs细胞移植治疗慢性肝脏疾病提供理论依据.

■研发前沿
现已有大量研究集中在体外培养条件下BMSCs向肝细胞的分化, 但体内移植后BMSCs对受损肝脏是否有修复作用则鲜见报道, 如何调控BMSCs向肝细胞分化及分化后在肝脏修复中的作用是现在研究的热点.

1 材料和方法

1.1 材料 DMEM-LG培养液(Gibco公司); 100 mL/L新生牛血清(奥地利PAA); 肝细胞生长因子(HGF, Sigma公司); AAT抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司); ALB抗体(丹麦Dako公司); ICG(吲哚靛青绿, Sigma公司); BrdU(Sigma公司).

1.2 方法 健康昆明种小鼠(♂, 体质量18-22 g)脊椎脱臼处死, 无菌条件下取股骨和胫骨. 用含100 mL/L新生牛血清的DMEM-LG培养液冲洗骨髓腔. 将收获的骨髓反复吹打成为细胞悬液, 离心后重新悬浮, 调整密度为1×10^{10}个/L, 放至37℃、50 mL/L CO_2、饱和湿度的CO_2培养箱中培养. 于24, 72 h换液, 以去除未贴壁的造血细胞, 之后每3 d换液一次. 培养至12-14 d时, 当细胞汇合80%时, 加入2.5 g/L胰蛋白酶和1 mmol/L EDTA混合消化液0.1 mL/cm^2, 消化1-2 min. 离心弃上清后重新悬浮, 以1∶2比例接种, 此为第一代细胞. 在首次传代细胞汇合之前即再行传代.

1.2.1 体外诱导小鼠BMSCs向肝细胞分化 取新生小鼠肝脏, 称质量后加入D-hanks液匀浆, 调整浓度为1 g/L. 将此溶液4℃下5000 r/min离心20 min, 取其上清液, 过滤除菌制备肝细胞提取液(HE). 将培养第二代的BMSCs按2×10^8/L密度接种于预先置有小盖玻片的6孔板中, 分3组进行诱导实验, 未诱导组: 不加任何诱导剂; 肝细胞生长因子: 50 μg/L; 肝细胞提取液(HE): 500 mg/L. 每组均3 d换液一次, 诱导组需重新加入上述剂量的诱导剂. 用倒置显微镜观察诱导组和未诱导组细胞分布及形态改变.

分别于诱导的第4、14、21天从诱导组和对照组的各个孔中取出一张小盖玻片, 40 g/L多聚甲醛固定. 常规免疫细胞化学方法检测α1-抗

■相关报道
目前多篇实验报道已证实BMSCs在体外可转化为肝细胞, 诱导分化方法主要有细胞因子诱导, 共培养和转基因3种, 其中最常用的是在培养液中添加细胞因子的方法.

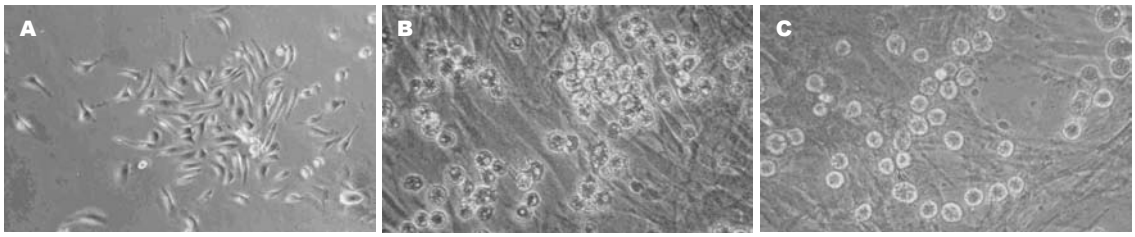


图 1 体外诱导BMSCs向肝细胞分化的形态(10 × 20). A: 诱导前; B: HGF诱导21 d; C: HE诱导21 d.

表 1 诱导后的骨髓基质干细胞AAT和ALB的表达(mean ± SD, n = 10)

	AAT(灰度值)			ALB(灰度值)		
	4 d	14 d	21 d	4 d	14 d	21 d
对照	33.8 ± 5.1	37.4 ± 7.5	43.2 ± 9.1	13.6 ± 3.4	18.2 ± 4.5	23.9 ± 7.4
HGF	76.8 ± 4.5[b]	85.4 ± 7.6[b]	105.7 ± 8.6[b]	71.6 ± 7.6[b]	93.6 ± 13.9[b]	128.3 ± 22.2[b]
HE	52.5 ± 3.9[ab]	60.3 ± 6.1[ab]	80.5 ± 8.0[ab]	43.2 ± 6.5[ab]	61.5 ± 10.4[ab]	80.6 ± 17.1[ab]

[a]P<0.05 *vs* HGF组; [b]P<0.01 *vs* 对照组.

胰蛋白酶(AAT)的表达. 一抗为1∶100兔抗AAT抗体, DAB显色, 中性树胶封片. 免疫细胞化学法检测白蛋白(ALB)的表达: 步骤同上, 一抗为1∶200的ALB抗体. 采用MIAS-300型图像分析系统(pcvision85 plus, 美国)对AAT和ALB表达的免疫细胞化学结果进行灰度分析.

BMSCs诱导后ICG摄取检测: 诱导21 d后, 将非诱导组和两个诱导组的培养液吸弃, 加入ICG溶液, 37℃孵育30 min[6]. 用PBS缓冲液轻洗3遍, 倒置显微镜下观察细胞颜色和分布.

1.2.2 小鼠体内注射BMSCs治疗慢性肝损伤 72只小鼠, 随机分为正常对照组(A组)、CCl_4损伤组(B组)和CCl_4损伤+BMSCs移植组(C组), 每组24只.

将CCl_4溶液按0.1 mL/kg给B组和C组小鼠腹腔注射, 每7 d注射2次, 共28 d[7], 制备慢性肝损伤模型. 第二代BMSCs细胞培养3 d后, 在培养瓶中加入10 μL BrdU溶液(BrdU, 50 mg; 二甲基亚砜, 0.8 mL; 双蒸水, 1.2 mL)标记BMSCs 72 h. 慢性肝损伤模型制备完毕后, 将C组小鼠选其尾部左右两侧粗大静脉注入10^5个BrdU标记的BMSCs, 在尾静脉注射后继续按原剂量腹腔注射CCl_4[7].

免疫组织化学法检测受体肝脏内移植细胞的分布: 分别于尾静脉注射BMSCs 7, 14和28 d后取C组小鼠肝脏, 入40 g/L多聚甲醛固定24 h, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 浸蜡包埋, 石蜡切片. 免疫组织化学法检测受体肝脏内移植细胞的分布.

于BMSCs移植后7, 14和28 d将3组小鼠眼球摘除取血, 离心获得血清, 全自动生化仪检测谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)和碱性磷酸酶(AKP)的含量[8-9].

统计学处理 数据资料以mean±SD表示并进行双因素方差分析, 以P<0.05为有统计学差异, P<0.01为有显著性差异. 应用统计软件SPSS 11.0分析数据.

2 结果

2.1 体外诱导BMSCs向肝细胞分化 体外培养的BMSCs细胞在HE或HGF诱导后形态逐渐发生变化: 贴壁细胞聚集成簇状分布, 细胞突起回缩, 细胞变圆, 并逐渐增多; 21 d后部分BMSCs呈肝细胞样圆形, 有的可见双核. 而无诱导组BMSCs大部分保持梭形, 带有长的胞质突起, 细胞核较大, 扁圆形, 呈成纤维细胞样形态(图1).

应用免疫细胞化学方法检测HGF或HE诱导后BMSCs细胞中AAT和ALB的表达量, 图2为免疫细胞化学法显示诱导14 d后AAT, ALB的表达情况. HGF或HE诱导组细胞在诱导4, 14和21 d后AAT和ALB在细胞中的表达量明显高于未诱导组, 差异有统计学意义(P<0.01); 并且HE诱导组与HGF诱导组的AAT和ALB表达量间存在统计学差异(P<0.05)(表1). 另外从表1中可见, 无论有无诱导剂3组细胞中AAT和ALB的表达量都表现出随时间而递增的趋势.

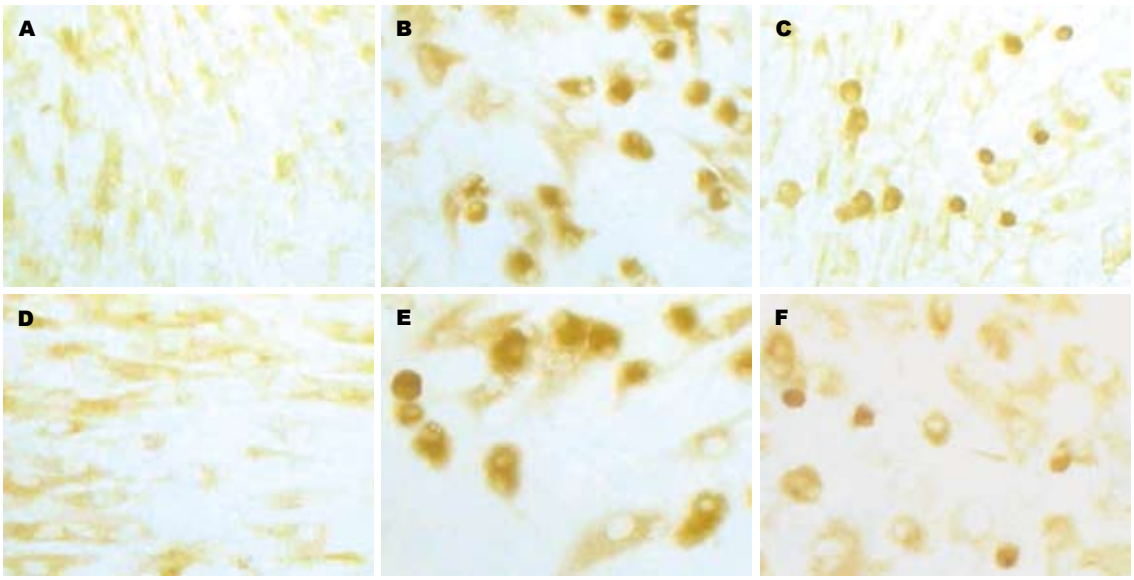


图 2 BMSCs诱导14 d后AAT, ALB的表达(10 × 20). A, B, C: AAT; A: 未诱导组; B: HGF诱导组; C: HE诱导组; D, E, F: ALB; A: 未诱导组; B: HGF诱导组; C: HE诱导组.

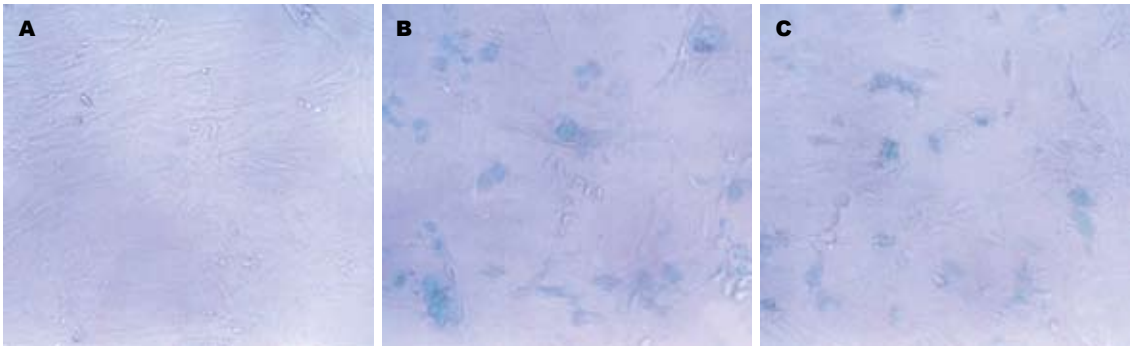


图 3 BMSCs细胞诱导14 d后ICG摄取(10 × 10). A: 未诱导组; B: HGF诱导组; C: HE诱导组.

诱导14 d后, 在整个视野中HE组约有20%的BMSCs细胞形态变成卵圆形, 并能摄取ICG, 在显微镜下观察呈现绿色(图3A); HGF组细胞约50%可摄取ICG, 并成簇状排列, 细胞形态也由卵圆形变为肝细胞样圆形(图3B); 而对照组细胞则不能摄取ICG(图3C).

2.2 小鼠体内注射BMSCs治疗慢性肝脏损伤 在BMSCs细胞经尾静脉移植一定天数后, 将肝脏损伤小鼠处死, 观察BrdU标记BMSCs细胞在肝脏内的分布: 7 d后在肝脏汇管区周围的肝实质内可见BMSCs细胞(图4A); 14 d后BMSCs细胞向肝实质内转移(图4B); 28 d后BMSCs细胞在肝脏内散在分布, 并与肝细胞紧密结合, 呈索状排列(图4C).

BMSCs细胞体内移植7, 14和28 d后分别检测3组小鼠的血清中ALT, AST和AKP的变化, 损伤组和损伤+BMSCs移植组ALT, AST和AKP值明显高于正常对照组(两组均为: $P<0.01$), 损伤+BMSCs移植组ALT, AST和AKP值与损伤组之间差异有显著统计学意义($P<0.01$). 另外, 损伤组和损伤+BMSCs移植组ALT, AST和AKP值随损伤时间的延长逐渐增大(表2).

3 讨论

骨髓中存在两种干细胞: 造血干细胞和BMSCs, 有实验证实, BMSCs诱导后可向多种方向分化, 包括神经细胞、肝细胞、成骨细胞、脂肪细胞、胰岛细胞等, 这些分化过程需要多种不同的细胞因子参与诱导[10-11]. Miyazaki *et al*[12]采用不同浓度的HGF诱导BMSCs分化, BMSCs在用较高浓度的HGF诱导时分化比较低浓度时好, 细胞形成了类似成年大鼠肝细胞的结构; Oh *et al*[13]及张刚庆 *et al*[14]的研究也有同样的结果. 在单独或联合应用FGF, SCF, HGF和EGF的条件

■创新盘点

目前, 关于干细胞转化为肝细胞的研究集中在对分化条件及分化机制的探索上, 本实验以肝细胞提取液(HE)为培养微环境, 体外诱导BMSCs向肝细胞分化; 并将BMSCs移植入小鼠体内, 检测移植后小鼠肝脏损伤修复程度, 为诱导干细胞向肝细胞分化以及人工肝研究提供了一个新的思路.

■应用要点
本研究诱导BMSCs向肝细胞分化, 为临床上应用干细胞的再生和分化治疗肝脏疾病提供有价值的实验依据.

表 2 ALT, AST和AKP在3组小鼠血清中的表达(mean ± SD, n = 10)(nkat/L)

分组	ALT			AST			AKP		
	7 d	14 d	28 d	7 d	14 d	28 d	7 d	14 d	28 d
A	275.06 ± 106.69	300.06 ± 101.69	291.73 ± 98.35	503.43 ± 130.03	525.11 ± 135.03	515.10 ± 133.36	0.55 ± 0.12	0.57 ± 0.13	0.56 ± 0.13
B	696.81 ± 140.03[b]	780.16 ± 151.70[b]	880.18 ± 170.53[b]	2342.14 ± 208.38[b]	2692.21 ± 238.38[b]	2872.24 ± 281.72[b]	1.78 ± 0.18[b]	2.00 ± 0.19[b]	2.27 ± 0.20[b]
C	493.43 ± 120.02[bd]	558.45 ± 130.03[bd]	583.45 ± 138.36[bd]	1521.97 ± 186.70[bd]	1590.32 ± 200.04[bd]	1625.33 ± 208.38[bd]	1.24 ± 0.22[bd]	1.21 ± 0.21[bd]	1.32 ± 0.19[bd]

[b]P<0.01 *vs* 组B; [d]P<0.01 *vs* 组A.

下, 骨髓来源的多能干细胞可分化为肝细胞样细胞, 并可以分泌白蛋白等肝细胞特异性物质[15-17]. 还有报道将BMSCs与肝细胞共同培养可诱导BMSCs分化成为肝细胞[18-19], NGF也可成功诱导干细胞分化成为肝细胞[20]. 这就证明BMSCs分化并不是受单一因子的调控, 而具体调控分化的机制目前还不明确. 动物或人体内环境复杂, 多种因素共同发挥作用维持体内稳态, 所以体内不可能存在单纯一种或几种细胞因子发挥作用的环境. 本实验脱离以前单独某种因子作用的模式, 以肝细胞提取液(HE)模拟肝脏内微环境. HE是由新生小鼠肝脏匀浆离心后获得, 包含了多种新生小鼠肝细胞成熟所需的细胞因子和肝细胞自身分泌的多种因子, 既有促进肝细胞再生的因子, 又有抑制肝细胞增生过度的因子, 所以HE可很好的模拟新生小鼠肝脏内微环境, 为下一步体内移植BMSCs打下良好的基础.

从光镜下观察HE, HGF诱导的BMSCs形态都发生了变化, 即细胞贴壁伸出的长触角回缩, 有由成纤维型逐渐变圆的趋势, 部分BMSCs细胞形成胞质少、核呈卵圆形的小细胞, 而对照组则无此变化. 目前研究认为, 卵圆细胞是一种肝前体细胞, 具有分化为肝细胞和胆管上皮细胞的双向分化能力[21-25]. 为进一步鉴定这种分化细胞的性质, 我们用免疫细胞化学染色和细胞摄取ICG验证. α1-抗胰蛋白酶(AAT)和白蛋白(ALB)是常用的肝细胞检测标志, 在体内主要由成熟肝细胞分泌; 能摄取ICG的细胞具有肝细胞特异性的标志如ALB, AFP, HNF3β, LST-1等, 可以推论ICG的摄取是肝细胞特异性的[6,26]. HE诱导组与HGF诱导组在诱导后细胞形态变化、免疫细胞化学染色和ICG摄取实验结果均显示: HE诱导组细胞分化明显高于未诱导组而比HGF诱导组弱, 这也很好的说明了HE作用的复杂性. 随着体外培养时间的延长, 未诱导组和诱导组免疫细胞化学反应都有AAT和ALB阳性细胞, 并且表达逐渐增强, 提示了在没有外源性细胞因子存在的情况下BMSCs细胞也可由原始干细胞分

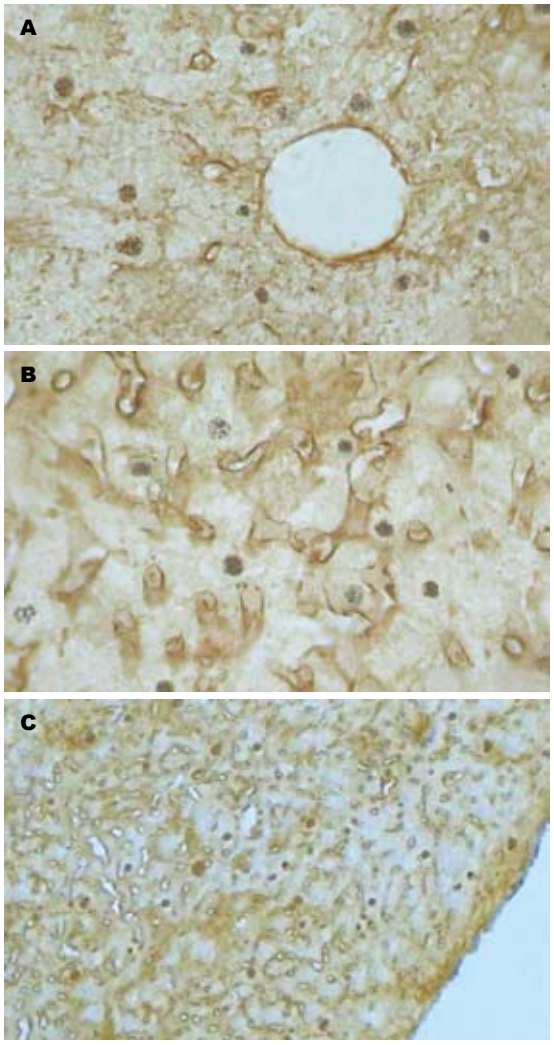


图 4 BMSCs体内移植后在肝脏内的分布. A: 7 d(10 × 20); B: 14 d(10 × 20); C: 28 d(10 × 10).

化为肝细胞, 这可能与BMSCs细胞能够分泌多种细胞因子如TNF, HGF, GM-CSF, IL-6等[27]有关.

Okumoto *et al*[18], 张刚庆 *et al*[19]分别将BMSCs与肝细胞共同培养, 观察到BMSCs细胞形态变成圆形, PCR和免疫细胞化学结果显示分化后细胞能够表达白蛋白、HNF1α、CK8、AFP及CK-18等肝细胞特异性蛋白. 本实验采用肝细胞提取液作为诱导剂, 与将BMSCs和肝细胞共培养的方法类似, 都使其培养环境中含有多种因子, 可更好地模拟肝内微环境. 两种实验比较发现, 分化后的细胞形态、数量和免疫细胞化学结果相似, 说明肝细胞提取液中诱导BMSCs分化的有效物质主要来之于肝细胞. 上述共培养的实验研究未对分化后的BMSCs作功能性检测, 无法与本实验中BMSCs体内移植后的功能性研究作进一步的比较.

本实验中BrdU标记的BMSCs细胞经尾静脉注射入慢性肝脏损伤的小鼠体内后, 由汇管区向肝实质内扩散. 在此过程中, BMSCs细胞不断分化成肝细胞, 并在肝脏微环境下与成熟的肝细胞紧密结合呈索状排列. Terada *et al*[4]证实BMSCs细胞可以和其他种类的细胞发生自发性融合, 接受来自外源细胞的表型, 包括与胚胎干细胞, 脾细胞, 骨细胞等融合, 并表达其表型. 本实验中BMSCs细胞进入肝脏也可能与肝细胞发生一定程度的融合, 从而可以在短期内发挥修复受损肝脏的作用; 同时还按原肝细胞的生长方式排列, 避免了细胞异常增生可能造成的胆管或血管的阻塞.

我们在肝脏受损小鼠体内移植BMSCs细胞后, 肝功能指标与未治疗组相比有明显好转, Takeda *et al*[27]发现BMSCs可通过分泌细胞因子IL-6刺激肝细胞修复和再生, 由此推测可能是BMSCs细胞分泌的多种细胞因子发挥了促进受损肝脏功能恢复的作用, 这有待我们进一步通过实验进行研究.

BMSCs移植后在体内微环境、细胞生长因子、基质细胞、细胞外基质等多种因素的共同作用下, 不仅可以分化为肝细胞, 还有对受损肝细胞的修复功能[28-29], 这为以后临床上治疗慢性肝损伤提供了一个新的选择. 干细胞诱导后能否具有肝细胞完整的功能且无致癌性将是我们今后研究的重点.

4 参考文献

1 Bonnet D. Biology of human bone marrow stem cells. *Clin Exp Med* 2003; 3: 140-149

2 Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001; 19: 180-192

3 Mertelsmann R. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *J Hematother Stem Cell Res* 2000; 9: 957-960

4 Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002; 416: 542-545

5 Wang PP, Wang JH, Yan ZP, Hu MY, Lau GK, Fan ST, Luk JM. Expression of hepatocyte-like phenotypes in bone marrow stromal cells after HGF induction. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320: 712-716

6 Yamada T, Yoshikawa M, Kanda S, Kato Y, Nakajima Y, Ishizaka S, Tsunoda Y. In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green. *Stem Cells* 2002; 20: 146-154

7 Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, Omori K, Watanabe T, Ohata S, Katada T, Miyamoto K, Shinoda K, Nishina H, Okita K. An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J Biochem (Tokyo)* 2003; 134: 551-558

8 Han KH, Hashimoto N, Shimada K, Sekikawa M, Noda T, Yamauchi H, Hashimoto M, Chiji H, Topping DL, Fukushima M. Hepatoprotective effects of purple potato extract against D-galactosamine-induced liver injury in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006; 70: 1432-1437

9 He SX, Luo JY, Wang YP, Wang YL, Fu H, Xu JL, Zhao G, Liu EQ. Effects of extract from Ginkgo biloba on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3924-3928

10 Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001; 226: 507-520

11 Quintavalla J, Uziel-Fusi S, Yin J, Boehnlein E, Pastor G, Blancuzzi V, Singh HN, Kraus KH, O'Byrne E, Pellas TC. Fluorescently labeled mesenchymal stem cells (MSCs) maintain multilineage potential and can be detected following implantation into articular cartilage defects. *Biomaterials* 2002; 23: 109-119

12 Miyazaki M, Akiyama I, Sakaguchi M, Nakashima E, Okada M, Kataoka K, Huh NH. Improved conditions to induce hepatocytes from rat bone marrow cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 298: 24-30

13 Oh SH, Miyazaki M, Kouchi H, Inoue Y, Sakaguchi M, Tsuji T, Shima N, Higashio K, Namba M. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279: 500-504

14 张刚庆, 方驰华, 池达智. 肝细胞生长因子诱导骨髓间充质干细胞向肝细胞分化的实验研究. 中华外科杂志 2005; 43: 716-720

15 Saji Y, Tamura S, Yoshida Y, Kiso S, Iizuka AS, Matsumoto H, Kawasaki T, Kamada Y, Matsuzawa Y, Shinomura Y. Basic fibroblast growth factor promotes the trans-differentiation of mouse bone marrow cells into hepatic lineage cells via multiple liver-enriched transcription factors. *J Hepatol* 2004;

■名词解释

骨髓基质干细胞(BMSCs): 是骨髓内的一种非造血干细胞, 他具有强大的增殖能力和多向分化潜能, 取材容易便于自体移植, 安全性高, 为肝脏疾病的细胞移植治疗提供了可利用的细胞库.

■同行评价
目前, 国内外学者多采用HGF为主的多个细胞因子组合来进行诱导分化. 本研究在上述基础上首先提出用新生小鼠肝细胞悬液做为诱导剂, 成功的使骨髓基质干细胞向肝细胞样细胞定向分化, 并具有一定的功能, 且优于HGF诱导组. 这是本文的新颖和独到之处, 为诱导干细胞向肝细胞分化以及人工肝研究提供了一个新的思路.

41: 545-550
16 Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109: 1291-1302
17 Lange C, Bassler P, Lioznov MV, Bruns H, Kluth D, Zander AR, Fiegel HC. Hepatocytic gene expression in cultured rat mesenchymal stem cells. *Transplant Proc* 2005; 37: 276-279
18 Okumoto K, Saito T, Hattori E, Ito JI, Adachi T, Takeda T, Sugahara K, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Kawata S. Differentiation of bone marrow cells into cells that express liver-specific genes *in vitro*: implication of the Notch signals in differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304: 691-695
19 张刚庆, 方驰华, 池达智. 共同培养诱导骨髓基质干细胞向肝细胞分化的研究. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 648-651
20 蒯小玲, 从笑倩, 李秀兰, 萧树东. 小鼠胚胎干细胞诱导为肝细胞的研究. 胃肠病学 2003; 8: 6-10
21 Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170
22 马俊勋, 方驰华. 卵圆细胞及其与原发性肝癌关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2002; 10: 448-451
23 王宇明, 陈耀凯. 肝干细胞的研究进展. 世界华人消化杂志 2002; 10: 337-342
24 万东君, 王春雨, 李六金. 肝干细胞研究现状. 世界华人消化杂志 2002; 10: 452-454
25 陈耀凯, 王宇明, 李俊刚, 郎松. 大鼠肝卵圆细胞的生物学特性. 世界华人消化杂志 2003; 11: 430-433
26 Faybik P, Hetz H. Plasma disappearance rate of indocyanine green in liver dysfunction. *Transplant Proc* 2006; 38: 801-802
27 Takeda M, Yamamoto M, Isoda K, Higashiyama S, Hirose M, Ohgushi H, Kawase M, Yagi K. Availability of bone marrow stromal cells in three-dimensional coculture with hepatocytes and transplantation into liver-damaged mice. *J Biosci Bioeng* 2005; 100: 77-81
28 Suzuki A, Iwama A, Miyashita H, Nakauchi H, Taniguchi H. Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells. *Development* 2003; 130: 2513-2524
29 Dumble ML, Croager EJ, Yeoh GC, Quail EA. Generation and characterization of p53 null transformed hepatic progenitor cells: oval cells give rise to hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2002; 23: 435-445

电编 张敏 编辑 张焕兰

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

• 消息 •

全国消化及消化内镜诊断与治疗进展学术研讨会征文启事

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

1 征文内容

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

2 征文要求

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年2月18日; 15(5): 471-475
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

幽门螺杆菌重组中性粒细胞激活蛋白蛋黄抗体的制备

邓 颖, 杨致邦, 黄 伟, 林珊珊, 黄 进, 叶翠莲

邓颖, 杨致邦, 林珊珊, 黄进, 叶翠莲, 重庆医科大学微生物学与免疫学教研究室 重庆市 400016
黄伟, 西南大学蚕学与生物技术学院生物技术系 重庆市 402460
邓颖, 重庆医科大学硕士, 主要从事临床消化内科及幽门螺杆菌的研究.
通讯作者: 杨致邦, 400016, 重庆市, 重庆医科大学微生物学与免疫学教研究室. dryangfm365@sina.com
电话: 023-68485193
收稿日期: 2006-01-09 接受日期: 2006-01-25

Preparation of egg yolk immunoglobulin against recombinant neutrophil activating protein in *Helicobacter pylori*

Ying Deng, Zhi-Bang Yang, Wei Huang, Shan-Shan Lin, Jin Huang, Cui-Lian Ye

Ying Deng, Zhi-Bang Yang, Shan-Shan Lin, Jin Huang, Cui-Lian Ye, Department of Microbiology and Immunology, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China
Wei Huang, Department Biotechnology, College of Silkworm and Biotechnology Science, Southwest University, Chongqing 402460, China
Correspondence to: Zhi-Bang Yang, Department of Microbiology and Immunology, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China. dryangfm365@sina.com
Received: 2006-01-09 Accepted: 2006-01-25

Abstract

AIM: To prepare a highly specific and efficient egg yolk immunoglobulin (IgY) against recombinant neutrophil activating protein (Nap) of *Helicobacter pylori* from the yolk of hen's eggs.

METHODS: Recombinant bacteria of pQE30-NapA-DH5α were cultured in large numbers to collect Nap protein. The recombinant protein was purified by Ni^{2+}-NAT chromatography, and its protein concentration was detected by Bradford method. After laying hens were immunized with recombinant Nap, IgY was isolated by water-dilution (WD) combined chloroform precipitation method. The relationship between IgY titer and immune time was assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). High-titer IgY was purified and concentrated by ammonium sulphate precipitation. The Nap-IgY titer and protein concentration were measured by indirect ELISA and Bradford method, respevtively, and the activity of Nap-IgY was identified by Western blot.

RESULTS: SDS-PAGE result showed that the recombinant protein was mainly expressed as inclusion bodies. After purification, the protein concentration was 0.37 g/L. The recombinant protein could be recognized by egg yolk extraction. The antibody titer became higher as the increase of immune time, and reached the highest value on the 110th day. The titer and protein concentration were 1∶12800 and 23.67 g/L, respectively.

CONCLUSION: Nap-IgY with high concentration, purity and specificity is successfully prepared.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Recombinant protein; Neutrophil activating protein; Egg yolk immunoglubin

Deng Y, Yang ZB, Huang W, Lin SS, Huang J, Ye CL. Preparation of egg yolk immunoglobulin against recombinant neutrophil activating protein in *Helicobacter pylori*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(5):471-475

摘要

目的: 制备高效价的抗Nap蛋黄抗体(IgY).

方法: 大量诱导、培养重组菌pQE30-NapA-DH5α获得重组蛋白Nap, 经Ni^{2+}-NTA树脂纯化后, Bradford法测定蛋白浓度. 用纯化的Nap蛋白免疫鸡, 水稀释结合氯仿有机沉淀法提取IgY. ELISA法测定抗体产生的时间-效价变化. 将效价高的Nap-IgY用硫酸铵沉淀法纯化浓缩, 间接ELISA法检测效价, Bradford法测定蛋白含量. Western blot检测制备的Nap-IgY的抗体活性.

结果: Nap重组蛋白主要以包涵体形式表达, 蛋白含量为0.37 g/L. 免疫鸡的蛋黄提取物可

■背景资料
随着研究的深入, 幽门螺杆菌已被确定为慢性胃炎的一个重要的致病因素, 同时又是消化性溃疡及胃癌发生的危险因素, 1994年国际癌症研究机构已将其列为1类致癌原, 蛋黄抗体应用研究十分活跃, 其最基本又最重要的生物学功能与IgG相似, 具有中和病毒、抑杀细菌和中和毒素等抗病防御作用, 是消化道传染病的有效治疗和预防药物.

与Nap发生特异性反应, IgY效价随免疫时间增加而升高, 在110 d达最高效价. 经纯化浓缩后, Nap-IgY的效价为1∶12800, 蛋白浓度为23.67 g/L.

结论: 成功制备了高浓度、高效价的Nap特异性IgY.

关键词: 幽门螺杆菌; 重组蛋白; 中性粒细胞激活蛋白; 蛋黄抗体

邓颖, 杨致邦, 黄伟, 林珊珊, 黄进, 叶翠莲. 幽门螺杆菌重组中性粒细胞激活蛋白蛋黄抗体的制备. 世界华人消化杂志 2007;15(5):471–475

http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/471.asp

■相关报道

近年来蛋黄抗体用于人类疾病防治的研究已经开始, 用于防治人HIV和HCV感染的IgY已由Kobilke和Tsolkas(1996)报道, 国内郭立君 *et al*(1997)报道了抗轮状病毒IgY的免疫保护作用, 常山 *et al*(2001)报道了抗白色念珠菌IgY的应用研究, 王忠泽 *et al*(2002)报道了抗大肠杆菌O157: H7鸡蛋黄抗体的制备及被动保护作用.

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)在全球范围内流行, 是引起人类慢性活动性胃炎、消化性溃疡的重要致病因子, 并与胃腺癌和胃淋巴瘤的发生密切相关[1-2]. *H pylori*是一种多致病物质引起病理损伤的细菌, 该菌的致病物质主要有细胞空泡毒素(vacuolating cytotoxin A,VacA)、细胞毒素相关蛋白(cytotoxin-associated proteinA, CagA)、尿素酶、过氧化氢酶、黏附素(*Helicobacter pylori* adhesin A, HpaA)、中性粒细胞激活蛋白(neutrophil activating protein, Nap)等. *H pylori*感染引起的胃黏膜损伤是以中性粒细胞和单核细胞浸润为特征, 其损害程度与中性粒细胞浸润密切相关. 近年的研究表明, Nap在*H pylori*引发的炎性细胞浸润所造成的胃黏膜损伤及其转归中起重要的作用,已被认为是*H pylori*导致损伤的新的致病因子[3].

被免疫的鸡蛋黄中含大量来源于血清的IgG, 远高于血清中的浓度, 因该抗体从蛋黄中提取, 故名蛋黄抗体(egg yolk immunoglubilin, IgY). 蛋黄抗体具有化学性质稳定、产量高、成本低等优势, 适合工业化生产特异性抗体, 可以用于抗病毒和细菌性疾病, 具有开发功能性食品和新药的潜能[4]. 现在已有许多学者将其制成口服制剂以防治龋齿、轮状病毒引起的腹泻和其他胃肠道感染性疾病, 并取得满意效果[5-9]. 本研究旨在制备高效价的抗Nap蛋黄抗体(IgY)为研制幽门螺杆菌防治性抗体制剂奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 DH5α菌株和pQE30质粒, 源于重庆医科大学病毒性肝炎研究所, 本室保存. 重组菌pQE30-Nap-DH5α, 本室研究生构建并保存[10]. 206日龄立克次体产蛋母鸡, 西南大学荣昌分校生物中心提供. HRP标记羊抗鸡IgY为Promega公司产品. 蛋白质Marker为晶美公司产品. Ni^{2+}-NTA亲合层析柱为QIAGEN公司产品. 琼脂粉为日本公司产品. IPTG、SDS、DTT、EDTA、丙烯酰胺、N, N'-亚甲丙烯酰胺、考马斯亮蓝R250、考马斯亮蓝G250均为Sigma公司产品. 胰蛋白胨、酵母抽提物均为Ddifco公司产品. NC膜与DAB显色试剂盒为武汉博士德公司产品.

1.2 方法

1.2.1 重组蛋白Nap的表达、纯化和蛋白定量 挑取一个含有重组质粒pQE30-Nap的阳性克隆DH5α菌落接种于5 mL LA培养基中, 同时以含空pQE30质粒的DH5α为对照, 37℃ 150 r/min振摇过夜培养. 按1∶20比例, 吸取菌液转种于盛有100 mL LA培养基的培养瓶中, 于37℃培养至A = 0.6时, pQE30-Nap加入终浓度为0.5 mmol/L的IPTG, 诱导表达5 h; 收集菌液, 4℃, 5000 r/min离心10 min, 弃上清, 沉淀物按3 mL/g湿菌的比例加入超声破碎缓冲液(50 mmol/L NaH_2PO_4, 300 mmol/L NaCl)碎菌. 然后4℃ 10 000 g离心20 min, 分别收集沉淀与上清. 120 g/L SDS-PAGE分析重组蛋白的表达形式. 在细菌破碎物的沉淀中加入包涵体裂解液(50 mmol/L NaH_2PO_4, 300 mmol/L NaCl, 8 mol/L尿素), 4℃过夜裂解, 然后4℃, 12 000 g离心15 min, 收集上清, 用Ni^{2+}-NTA树脂亲和层析进行纯化. 120 g/L SDS-PAGE分析纯度, Bradford法测定蛋白含量.

1.2.2 母鸡免疫和IgY的分离 用纯化的重组Nap和等量完全弗氏佐剂混合, 并充分研磨乳化作为抗原免疫206日龄立克次体产蛋母鸡, 第1次免疫剂量为100 μg/只; 15 d后进行第2次免疫, 剂量为200 μg/只; 之后每隔1 mo进行第3次免疫和加强免疫, 剂量均为300 μg/只. 免疫方式均为胸部肌肉多点注射. 第2次免疫后1 wk开始收集鸡蛋于4℃保存备用. 采用水稀释法结合氯仿有机沉淀法. 基本步骤为: 取出蛋黄液, 加入等体积生理盐水稀释, 加入适量的氯仿然后离心留上清, 上清即含有IgY, 4℃保存备用.

1.2.3 检测Nap-IgY的间接ELISA法 用重组蛋白Nap作为抗原进行包被. 用包被液稀释为6.0, 8.0, 10.0, 15.0, 20.0, 30.0 mg/L, 每孔100 μL包被聚苯乙烯反应板; 酶标羊抗鸡IgY用酶稀释液作1∶5000, 1∶10000, 1∶20000, 1∶40000稀

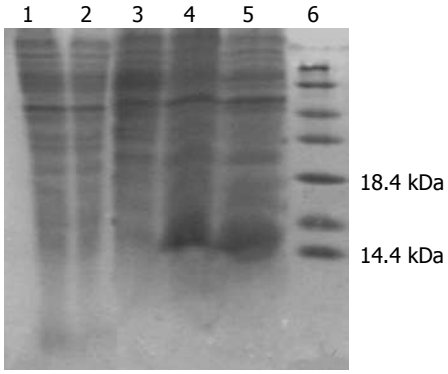


图 1 重组蛋白表达形式的鉴定. 1, 2: pQE30-NapA-DH5α无IPTG的诱导; 3: pQE30-NapA-DH5α经IPTG诱导的上清; 4, 5: pQE30-NapA-DH5α经IPTG诱导的包涵体.

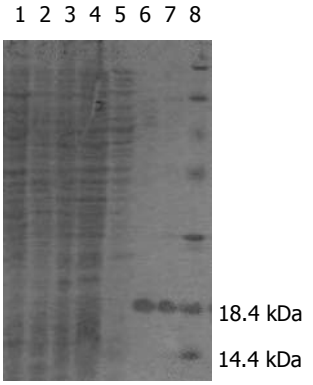


图 2 重组蛋白纯化后的SDS-PAGE结果. 1: 无诱导的DH5α; 2: 有诱导的DH5α; 3: 无诱导的DH5α(pQE30); 4: 有诱导的DH5α(pQE30); 5-7: 纯化后的蛋白质; 8: 蛋白质标准条带.

■应用要点

制备*H pylori*融合蛋白的IgY, 可成为集预防、治疗为一体的口服特异抗体制剂, 也可制成冲剂和加入饮料中服用, 具有广泛的应用前景和重大的经济效益.

释; Nap-IgY用样品稀释液作1∶20, 1∶50, 1∶100, 1∶200稀释. 方阵滴定法确定最佳抗原包被浓度, 酶标二抗工作浓度和一抗的工作浓度. 测定5份免疫前的鸡蛋提取的IgY的A_{450}值, 并计算平均值作为阴性对照. 测定免疫后提取的IgY, 以免疫后与免疫前IgY的A_{450}值之比大于2.1判为阳性. 将未免疫和第一次免疫后不同时间提取的IgY用样品稀释液稀释成一定浓度, 用所建立的ELISA法测定其效价. 将免疫后效价较高的IgY分别混合, 用常规饱和硫酸铵法纯化. 用已建立的检测IgY的ELISA法测定IgY效价; Bradford法测定蛋白含量.

1.2.4 Nap-IgY抗原性的Western blot鉴定 以诱导表达的全菌进行150 g/L SDS-PAGE电泳, 将凝胶上的蛋白质点转移到硝酸纤维素(NC)膜上. 用封闭液作用2 h封闭非特异性位点. PBS洗膜后分别加上1∶200的Nap-IgY作为一抗, 室温转摇2 h, 再用PBS洗膜. 然后加入1∶5000稀释的HRP标记羊抗鸡IgY, 室温作用2 h, 去出后再用PBS洗膜, 最后用DAB显色.

2 结果

2.1 重组蛋白Nap的表达, 纯化和蛋白定量 SDS-PAGE分析表明破碎菌的沉淀物可见明显特异蛋白表达带, 占96%, 上清液中无明显表达带(图1). 将收集的破碎菌的沉淀洗涤后变性溶解, 以NI^{2+}-NTA柱纯化, 经SDS-PAGE和图像分析表明, 纯化产物主要存在于前2管洗脱液中, 纯度为92.8%(图2). Bradford法测定蛋白含量为0.37 g/L.

2.3 检测IgY的间接ELISA结果 方阵滴定法确定的最佳工作浓度是; 抗原包被浓度为15 mg/ L, 样品稀释度为1∶50, 酶标羊抗鸡IgY的稀释度为1∶10000. 阴性IgY平均值为0.112. 在上述实验条件下, A_{450}>0.235时, 判为阳性, A_{450}≤0.235判为阴性. ELISA法检测结果发现, 免疫时间和抗体效价的变化总体上呈现上升趋势. 在第一次免疫重组蛋白Nap后30 d(PID30)左右抗体效价达到1∶800, 随后虽*A*值呈现出一定的升降变化, 但抗体效价基本维持在1∶1600, 在第一次免疫后75 d(即PID75)时效价则上升到1∶3200, 第1次免疫后110 d左右(PID110)达到1∶6400, 并可维持一定时间(表1). Nap-IgY纯化浓缩后的效价为1∶12800, 蛋白浓度为23.67 g/L.

表 1 免疫时间与抗体效价变化

免疫时间(d)	IgY 在不同稀释浓度下的A_{450} 值					IgY 滴度
	1∶400	1∶800	1∶1600	1∶3200	1∶6400	
PID30	0.389	0.246	0.215	0.167	0.103	1∶800
PID45	0.439	0.392	0.245	0.125	0.120	1∶1600
PID60	0.578	0.451	0.256	0.202	0.098	1∶1600
PID75	0.598	0.426	0.401	0.269	0.158	1∶3200
PID100	0.857	0.802	0.567	0.427	0.235	1∶6400
PID110	0.908	0.725	0.513	0.402	0.240	1∶6400

2.4 Western blot鉴定 NC膜显色后在相对分子量约17 000处出现相应的条带, 大小和预期的一致(图3), 说明Nap-IgY具有良好的抗原性.

3 讨论

大量研究表明, *H pylori*与慢性、活动性胃炎和消化性溃疡密切相关, 同时也是胃肿瘤的危险因素. 我国普通人群中的感染率为50%-60%, 并以每年1%-2%的速度增加[11]. 预防*H pylori*感染具有重要的现实意义. 对已感染者的大量研究表明, 多种抗生素和铋剂的联合应用是清除*H pylori*的有效方法, 但10%-15%的病例由于细菌产生耐药性而治疗失败. 而且随着抗生素的应

■名词解释
IgY: 蛋黄抗体即蛋黄中的免疫球蛋白, 是母禽血清中的IgG经受体介导主动转运到卵黄中富积形成.

用, 耐药菌株不断增加. 随着对*H pylori*致病机制和基因组结构与功能认识的逐步深入, 免疫疗法被认为是防治*H pylori*感染最有效最有前景的方法之一[12-17].

*H pylori*感染的胃黏膜损伤主要表现为炎症反应[18], 而*H pylori*的中性粒细胞激活蛋白NAP可以诱导中性粒细胞黏附于内皮细胞上, 这种黏附作用与中性粒细胞表面的CDb/CD18整合素的表达量呈正相关. Satin以纯化重组的*H pylori*-Nap口服免疫10只小鼠, 结果80%个体获得了保护性免疫, 高于CagA(70%), 低于*H pylori*超声裂解物(90%), 此结果也提示Nap作为*H pylori*主要的毒力因子, 可以作为有效的保护性抗原用于*H pylori*感染的疫苗防治.

IgY是抗胃肠道感染的有效制剂. Mine *et al* [19]总结了IgY的治疗作用后表明口服特异性IgY抗体的被动免疫替代抗生素可以成功的治疗许多胃肠道感染性疾病. 故本实验选择Nap作为抗原来免疫产蛋母鸡获得特异性的IgY. *H pylori*培养物制备的IgY的抗感染作用虽有报道[9], 但用重组Nap制备的IgY国内外尚未见报道. IgY是一种免疫球蛋白(Ig), 提纯方法与提纯IgG相似, 纯化的方法很多, 采用浓度为25%-40%的硫酸铵来沉淀IgY, 可得到较纯的IgY, 费用也低, 适合于标准化的大规模生产IgY , 这也是现在大量粗提IgY最常用的方法. 当然, 进一步纯化IgY的最好的方法是亲和层析, 得到的IgY纯度更高, 但在洗脱过程中可能会造成IgY变性, 产率也低. 本实验用水稀释法结合氯仿有机沉淀法提取IgY, 用不同浓度硫酸铵沉淀法纯化并浓缩IgY, 取得了良好的效果: 纯度较高; ELISA和Western的结果显示制备的IgY能与Nap发生反应, 表明其具有相应的抗原性; 而且保证了其抗体活性, 可满足本实验要求.

IgY抗体不仅安全性好, 而且鸡蛋来源丰富、抗体含量高、稳定性好、提取方法简便, 作为口服药物防治*H pylori*感染将具有广阔的前景. 本实验成功制备了高浓度、高效价的特异性IgY, 为进一步制备抗*H pylori*感染的口服IgY制剂和食品添加剂奠定了基础.

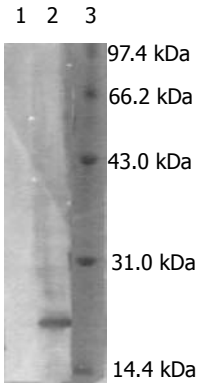


图 3 Nap-IgY的Western blot鉴定. 1: 无诱导的对照; 2: Nap与Nap-IgY反应后的条带; 3: 蛋白质标准条带.

4 参考文献

1 Christian Prinz, Susanne Schwendy, Petra Voland. *H Pylori* and gastric cancer:shifting the global burden. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5458-5464
2 Karolin Trautmann, Manfred Stolte, Stephan Miehlke. Eradication of *H Pylori* for the prevention of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5101-5107
3 Barbara S, Giuseppe DG, Vittorina DB, Stefano D, Carlo L, Fiorella, T, Dermot, K, Rino R, Cesare M, Filippo R. The Neutrophil-activating Protein(Hp-NAP) of Hp is a Protective Antigen and a Major Virulence Factor. *J.Exp* 2000: 1467-1476
4 Rudiger S, 张小莺, 郑礼. IgY技术及其医药应用: 理论基础. 中国药理学通 2004; 20: 491-495
5 Nomura S, Suzuki H, Masaoka T, Kurabayashi K, Ishii H, Kitajima M, Nomoto K, Hibi T. Effect of dietary anti-urease immunoglobulin Y on *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *Helicobacter* 2005; 10: 43-52
6 Suzuki H, Nomura S, Masaoka T, Goshima H, Kamata N, Kodama Y, Ishii H, Kitajima M, Nomoto K, Hibi T. Effect of dietary anti-*Helicobacter pylori*-urease immunoglobulin Y on *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 185-192
7 Shin JH, Nam SW, Kim JT, Yoon JB, Bang WG, Roe IH. Identification of immunodominant *Helicobacter pylori* proteins with reactivity to *H pylori*-specific egg-yolk immunoglobulin. *J Med Microbiol* 2003; 52: 217-222
8 Horie K, Horie N, Abdou AM, Yang JO, Yun SS, Chun HN, Park CK, Kim M, Hatta H. Suppressive effect of functional drinking yogurt containing specific egg yolk immunoglobulin on *Helicobacter pylori* in humans. *J Dairy Sci* 2004; 87: 4073-4079
9 陈翠萍, 杨朝晖, 王永谦. IgY抗体在体外和体内对幽门螺杆菌作用的研究. 中华微生物和免疫学杂志 2002; 22: 37-40
10 林姗姗, 杨致邦, 吴利先. 幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白的基因克隆与表达. 中国生物制品学杂志 2004 ; 11: 344-347
11 Pounder RE, Ng D. The prevalence of *Helicobacter Pylori* infection in different countries. *science* 1995; 267: 17
12 Micbetti P. Oral Immunization against *Helicobacter pylori*-a future concept. *J Gastroenterol* 1998; 33: 66-72
13 宁云山, 李妍, 龙敏, 董文其, 李明. 幽门螺杆菌5种候选疫苗抗原基因的克隆、表达及抗原性的鉴定. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2605-2609
14 Andreas Leodolter, Matthias P Ebert, Ulrich Peitz, Kathlen Wolle, Stefan Kahl, Michael Vieth, Peter Malfertheiner. Prevalence of *H pylori* associated "high risk gastritis" for development of gastric

cancer in patients with normal endoscopic findings. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5509-5512
15 徐智民, 张万岱, 周殿元. 幽门螺杆菌的研究进展. 世界华人消化杂志 2003; 11: 635-639
16 米宏杰, 王瑞华, 徐冰. 幽门螺杆菌菌苗及免疫相关问题研究进展. 中华临床医学研究杂志 2006; 12: 2383-2383
17 陈洁, 陈文湖, 朱森林, 于君, 梁伟强, 陈为, 胡品津, 沈祖饶. 重组幽门螺杆菌疫苗免疫保护机制的研究. 中华消化杂志 2002; 22: 80-83
18 Bourke, Billy MD; Jones, Nicola L. MD, PhD. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Gastrointestinal infections* 2001; 17: 24-29
19 Mine Y, Kovacs-Nolan J. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease:a review. *J Med Food* 2002; 5: 159-69

电编 李琪 编辑 张焕兰

■同行评价
根据蛋黄抗体的特点，制备的抗*H pylori* IgY更能有效的防治*H pylori*感染，*H pylori*的IgY将为*H pylori*感染的防治开辟新的途径. 国内已有研究*H pylori*-Nap基因重组减毒鼠伤寒沙门菌口服DNA疫苗，但用重组Nap制备的IgY国内外尚未见报道. 本研究具有创新性及良好的应用前景.

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

• 消息 •

2005年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序表[1]

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

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年2月18日; 15(5): 477-481
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

焦点论坛 HIGHLIGHT TOPIC

胃、结直肠癌术前区域性动脉化疗几个相关问题

邹寿椿, 陶厚权

邹寿椿, 陶厚权, 浙江省人民医院普外科 浙江省杭州市 310014
邹寿椿, 主任医师, 教授, 主要从事胃肠道、甲状腺、乳腺等肿瘤和相关疾病的研究.
通讯作者: 邹寿椿, 310014, 浙江省杭州市, 浙江省人民医院普外科. luoad2004@zj.com
收稿日期: 2006-11-22 接受日期: 2006-12-18

摘要
胃、结直肠癌根治性切除术复发转移是严重影响术后5 a生存率提高的重要原因. 以手术为主综合治疗已成为新的趋势, 其中术前区域性动脉化疗(preoperative regional-arterial chemotherapy, PRAC)尤为值得重视. 本文介绍了术前PRAC的概念、作用机制和影响区域性动脉化疗疗效的相关因素, 并就术前区域性动脉化疗在胃、结直肠癌综合治疗中的评价进行讨论.

关键词: 胃癌; 结、直肠癌; 动脉化疗; 转移; 复发

邹寿椿, 陶厚权. 胃、结直肠癌术前区域性动脉化疗几个相关问题. 世界华人消化杂志 2007;15(5):477-481
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/477.asp

0 引言
胃、结直肠癌是我国常见的恶性肿瘤, 约占整个消化道肿瘤的50%以上. 20世纪以来, 人们对胃、结直肠癌手术治疗的研究已取得了很大的进步, 尤其是扩大范围区域性淋巴结清扫的各种根治性切除术(包括全直肠系膜切除术)的实施, 使术后5 a生存率有了较大的提高, 但近10 a中术后5 a生存率始终徘徊在40%-50%左右, 难以再有新突破, 究其原因除就诊病期较晚外, 复发转移率高是其主要原因. 因此, 研究分析复发病例中结构的变化, 对今后的治疗方向, 很有指导性的意义. 我国台湾学者Wu *et al*[1]报道的611例胃癌根治术后245(40.1%)例复发病例中, 单灶性复发与多灶性复发约各占半数; 复发部位以腹膜复发率最高(53.5%, 131/245), 血行转移居次(43.3%, 106/245), 远处淋巴结复发最低(28.6%, 70/235). 另据国外报道[2], 15%-25%的结直肠癌患者在检出原发病时已有肝转移; 另有20%的患者在原发肿瘤治疗后, 会继续发生肝转移. 上述报告提示: 胃、结直肠癌的各种根治性手术, 均只能切除肉眼所见的肿瘤病灶及相关区域性淋巴结, 但对早已存在的微小转移癌、亚临床癌灶及已处于脱落、游离、移动状态中的癌细胞是无效的, 势必尚需应用其他的治疗手段来弥补其不足. 因此, 以手术为主的综合治疗已成为新的趋势, 其中近年倡用的术前区域性动脉化疗(preoperative regional-arterial chemotherapy, PRAC)尤为受到重视. 我们根据我院近年的相关研究, 结合文献和临床实践作一介绍, 供同道参考.

■背景资料
胃、结直肠癌术后复发转移是影响预后的重要因素, 综合治疗已成为新趋势. 其中术前区域性动脉化疗(PRAC)尤受重视. 本文根据自身研究实践结合相关文献, 全面介绍了PRAC作用机制的最新研究成果.

1 PRAC的概念和作用机制
PRAC是指在肿瘤供血血管未遭手术破坏前, 采用Seldinger插管技术, 在数字减影血管造影(DSA)经股动脉插管, 将导管插入供血动脉, 以高浓度的化疗药物经其注入肿瘤内部, 使药物与肿瘤细胞充分接触, 杀死癌细胞, 降低瘤负荷, 减少术中医源性播散, 防止术后复发转移. PRAC治疗胃、结直肠癌的作用是多方面的.

1.1 药代动力学的优势 众所周知, 化疗药物对肿瘤细胞的作用, 具有很强的浓度依赖性, 一般认为, 药物浓度提高1倍, 杀伤力可提高10倍以上. 动物实验证明[3], 化疗药物经胃左动脉灌注后, 无论是化疗药物作用的峰值浓度(Cmax)、消除半衰期值($T_{½}$)或浓度时间曲线下面积(AUCD), PRAC组测得的腹腔内各脏器组织内的药物质量浓度均高于全身静脉化疗组的1-7倍以上; 其中胃窦、胃体、胃小弯及胃左动脉旁淋巴结等区域的药量、浓度更明显, 可达静脉化疗组的2.68-16.63倍不等, 且化疗药物作用于癌组织的时间延长, 组织对药物的利用率也有较大的提高, 起到直接杀死癌细胞的作用.

1.2 诱导细胞凋亡 细胞凋亡是一种程序性的细胞死亡, 是在基因调控下主动清除多余细胞或缺陷细胞的正常现象. 传统的观点认为, 化学治疗效果均是由化疗药物直接杀伤肿瘤细胞所致, 但近年的研究证实[4], 化疗药物还可通过诱导癌

■同行评价
本文对消化道肿瘤术前动脉区域性化疗的机制, 疗效, 相关因素作了论述, 其中结合了自己的经验和研究结果, 论述充分, 且比较全面, 具有明显的临床交流和实用价值, 内容丰富, 数据详实, 对消化道肿瘤的综合治疗具有一定的指导作用.

细胞凋亡来清除肿瘤细胞, 使肿瘤缩小或退变. 遗传及生物化学的研究证明, 诱发细胞凋亡的中心成分为死亡基因的同源酶——白介素-1β-转化酶(ICE). ICE可参与某些化疗药物(顺铂等)诱导的凋亡. 经研究后认为, PRAC后可以显著加速结直肠癌肿瘤细胞的凋亡, 抑制细胞增殖, 并且化疗药物可能通过刺激肿瘤细胞ICE的表达, 进而诱发肿瘤细胞凋亡的发生. 我院对50例大肠癌行PRAC的病例, 进行了术前、术后肿瘤细胞凋亡密度的检测对照[5], 结果显示, 肿瘤细胞凋亡密度动脉化疗组, 术前化疗前为31.47±5.58个/网格, 术后、化疗后为76.69±17.12个/网格, 而瘤旁正常肠黏膜为8.01±3.39个/网格, 凋亡细胞密度PRAC后明显高于PRAC前(P<0.01), 差异性十分显著. 并发现肿瘤细胞凋亡与病理组织学疗效是一致的. 组织学疗效越显著, 肿瘤细胞凋亡也越明显. 此外, 我院还对110例胃癌手术切除标本进行了研究[6], 其中PRAC组68例, 术前未行化疗组42例, PRAC组肿瘤细胞凋亡指数(AI)为12.5‰±4.33‰, 术前未行化疗组为7.1‰±3.43‰, PRAC组明显高于未化疗组(P<0.01). Inada *et al*[7]也得到了同样的研究结果, 并认为诱导肿瘤细胞凋亡可作为判断化疗药物抑制肿瘤生长能力的重要标志之一.

1.3 *肿瘤细胞增殖的抑制及周期的调节* 肿瘤细胞的倍增主要取决于肿瘤细胞的增殖速率与细胞丢失(细胞凋亡和病理性死亡)之比. 研究发现, PRAC对胃、结直肠癌的肿瘤细胞增殖也具有抑制作用. 有人通过测定增殖细胞核指数(PCNA)来了解细胞增殖状况[8], 发现PRAC后48 h内PCNA明显低于治疗前水平, 7-12 d后复又进入增殖活跃期. Cyclin D1是一种较为明确的细胞周期蛋白, 是细胞周期中G1期过渡到S期的关键调节物[9]. Cyclin D1的过渡表达与结直肠癌的发生有关. 有人研究发现[10], 接受PRAC的患者与未接受PRAC的患者相比, Cyclin D1表达显著降低. 因此认为, PRAC可能通过抑制结直肠癌中Cyclin D1的表达, 阻抑了癌细胞由G1期向S期过渡, 从而抑制了肿瘤细胞的增殖.

1.4 *抑制肿瘤细胞分泌*VEGF 肿瘤血管的生成是肿瘤不断生长、增大的必备条件, 也是肿瘤细胞转移的重要途径. 彭亦凡 *et al*[11]观察了PRAC对结直肠癌组织的微血管密度(MVD)和血管内皮生长因子(VEGF)的影响, 结果发现, PRAC组的MVD值为19.2±5.2, 未化疗组为42.4±18.4, 化疗组明显低于未化疗组; PRAC组的VEGF表达也明显低于未化疗组, 两组间差异十分显著(P<0.01). 研究者认为, PRAC可通过抑制肿瘤细胞分泌VEGF蛋白, 或直接作用于肿瘤的血管内皮细胞, 减少肿瘤血管生成, 减少血供来促进肿瘤细胞坏死, 诱导肿瘤细胞凋亡, 缩小肿瘤体积, 消灭肿瘤周缘的微小浸润灶和转移灶, 防止肿瘤细胞从新生血管中漏出或转移到其他器官, 从而为根治性手术创造条件, 改善患者的治疗效果和预后.

1.5 *促进肿瘤的病理性坏死* 众多的研究证明, 各种化疗的治疗作用都是通过增加肿瘤的病理性坏死来实现的. 但在区域性动脉经化疗药物的作用后, 90%以上的手术标本内都有小动脉炎存在; 75%以上的病理切片中小血管内有血栓形成, 血栓形成可使肿瘤产生缺血性坏死, 这也是动脉性化疗与静脉化疗区别所在. 有人经对照研究发现[12], 区域性动脉化疗组Ⅱ-Ⅲ级坏死率为67.7%, 而静脉化疗组只有36.8%, 两组间差异显著. 同时, 动脉灌注化疗药物后, 肿瘤组织内可出现细胞间质水肿, 纤维增生以及大量炎性细胞浸润, 炎性细胞浸润可提高局部的免疫功能, 加强局部的抗肿瘤效应[13].

2 影响区域性动脉化疗疗效的相关因素

区域性动脉化疗应用于胃、结直肠癌的辅助治疗已有近20 a历史, 但对其疗效报道并不一致. 目前, 多数报道仅限于临床、病理学疗效等观察, 而对影响其疗效的相关因素的研究尚不多见.

2.1 *胃、结直肠癌的血供与疗效的关系* 我院对42例进展期胃癌在DSA下, 行选择性腹腔动脉造影后进行了血供观察[14], 发现胃癌的供血动脉主要是胃左动脉(35例, 83.3%); 其次为胃十二指肠动脉(11例, 26.2%), 胃后动脉(6例, 14.28%), 左膈下动脉(4例, 9.5%), 胃右动脉(4例, 9.5%); 其中两根动脉同时供血者18例. 根据造影后肿瘤染色量的多少分为无染色、少量染色、中量染色、大量染色4级, 又将无染色和少量染色归为少血管型, 中量染色、大量染色归为多血管型, 并对染色量的多少与30例行PRAC后手术切除标本的病理组织学疗效间的关系进行了分析, 结果见表1. 由表1可见, 随着染色量的增多, 疗效不断提高; 少血管型组中病理疗效评定全部在Ⅰ级以下, 而多血管型组中, 不仅有效率达94.7%, 而且Ⅱ级以上疗效者6例, 占38.3%. 同时, 我院还对51例大肠癌的肿瘤染色量情况与术后手术切除标本的血供情况及病理组织学疗效间

表 1 染色量与疗效的关系

病理组织学疗效评级(*n*)	0级	Ⅰ级	Ⅱ级	Ⅲ级	有效(*n*)	有效率(%)
少血管型(无)	1	1			7	63.6(7/11)
(少)	3	6				
多血管型(中等)		11	3	1	18	94.7(18/19)
(大量)	1	1	1	1		

表 2 插管动脉与供血动脉一致性与疗效的关系

组织学疗效	0级(*n*)	Ⅰ级(*n*)	Ⅱ级(*n*)	Ⅲ级(*n*)	有效(*n*)	有效率(%)
一致组	1	15	4	2	22	95(21/22)
不一致组	4	4				

两组疗效差异有显著意义(χ^2 = 8.75, P<0.05).

表 3 插管动脉与供血动脉一致性与根治性切除的关系

术式	根治(*n*)	非根治(*n*)	合计例数(*n*)	根治切除率(%)
一致组	20	2	22	90.8(20/22)
不一致组	1	7	8	12.5(1/8)

两组根治切除率差异有显著意义(χ^2 = 17.7, P<0.01).

表 4 大肠癌介入化疗超选插管的动脉选择

病变部位	动脉主干	主选动脉	次选动脉
升结肠	肠系膜上动脉	右结肠动脉	回结肠动脉
横结肠	肠系膜上动脉	结肠中动脉	右支或左支
降结肠	肠系膜下动脉	左结肠动脉	乙状结肠动脉
乙状结肠	肠系膜下动脉	乙状结肠动脉	直肠上动脉
直肠中上段	肠系膜下动脉	直肠上动脉	髂内动脉
直肠下段	髂内动脉	直肠中动脉	阴部动脉

的关系进行了分析比较[15]. 结果显示, 51例中少血供4例, 中等血供10例, 多血供37例; 同胃癌术前区域性化疗后的结果一样, 大肠癌的多血供组的组织学有效率: Ⅱ+Ⅲ级为67.6%; 中等供血组: Ⅱ+Ⅲ级为40.0%; 而少血供组的组织学疗效无1例达到Ⅱ级以上.

2.2 *插管动脉、供血动脉一致性与疗效的关系* 从对胃癌的血供研究来看, 胃癌的血供均来自腹腔动脉分支, 主要有: 胃左动脉、胃右动脉、胃网膜左动脉、胃网膜右动脉, 此外尚有胃短动脉、胃十二指肠动脉参与供血, 胃后动脉来自脾动脉, 其出现率为37.5%[16], 各动脉分支均在胃壁内相互吻合, 因此胃癌的血供丰富, 多支动脉同时供血多. 所以, 仔细观察腹腔动脉造影结果, 寻找肿瘤供血动脉再进行超选择插管后灌注化疗药物是提高疗效的关键. 我们对30例行PRAC后再手术切除的胃癌标本, 根据插管动脉与供血动脉的一致与否, 分为两组, 并统计分析其与病理组织学疗效、根治性切除率之间的关系[14], 结果见表2-3. 与胃癌的血供情况不同, 结直肠癌供血主要来自腹主动脉发出的肠系膜上和肠系膜下动脉的分支, 腹段直肠主要由肠系膜下动脉分出的直肠上动脉供血, 直肠下段主要由髂内动脉发出的直肠中、下动脉供血. 因此可根据肿瘤所在部位超选择相应的动脉插管(表4). 由于结直肠癌血供变异少, 解剖位置固定, 两根动脉同时供血者少. 因此术后病理组织学疗效高, 总的有效率可达98%, 根治性切除率达92.1%[15], 提示结直肠癌行PRAC的疗效可能更优于胃癌.

2.3 *瘤体大小与疗效的关系* 从我院42例胃癌和51例大肠癌行PRAC的疗效评定结果分析[14-15], 瘤体大小与疗效评级呈负相关, 瘤体越小、效果越好, 尤其是组织学疗效达到Ⅲ级的7例患者(胃癌2例, 大肠癌5例), 其共同特点是瘤体直径均<2 cm, 而与肿瘤细胞分化程度无关, 提示PRAC具有瘤体愈小, 疗效愈佳的倾向.

2.4 *PRAC次数与疗效的关系* 根据我院胡庭扬 *et al*[15]对51例大肠癌PRAC的病理组织学疗效的相关性分析, 51例中术前行1次PRAC者44例, 其组织学疗效达Ⅱ, Ⅲ级者为54.5%; 行2次PRAC者7例, 其组织学疗效达Ⅱ, Ⅲ级者为71.4%, 两组间差异显著, 提示增加术前化疗次数有助于提高疗效, 尤其是对于瘤灶较大者, 增加PRAC次数是提高PRAC疗效的有效措施.

2.5 *化疗药物与疗效的关系* 近半个世纪以来, 人们一直在研究除手术以外治疗胃、结直肠癌的方法, 化疗是其中研究最早、范围最广的一种治疗方法. 据统计, 许多抗癌药物单药应用时对胃、结直肠癌的近期有效率均在15%-30%左右, 而两药联用则近期有效率可>30%; 三药联用则可>40%[17]. 1980-1990年代常用的FAM(5-FU+表阿霉素+丝裂霉素)、FMP(5-FU+丝裂霉素+顺铂)、FAP(5-FU+表阿霉素+顺铂)等方案对胃、结直肠的反应率约在28%-42%之间. 近年来, 由于四氢叶酸(leuconvorin, LV), 奥沙利铂

(oxaliplatin, L-OHP, 第3代铂类抗癌药)、紫杉醇(paclitaxal, PCT)等新抗癌药物的问世, 新的联合用药方案亦相继产生, 使胃、结直肠癌对化疗的反应率已提高到50%或接近60%左右[17]. 这些联合用药的共同特点是均在5-FU+L-OHP的基础上, 再加用抗肿瘤抗生素或植物类抗肿瘤药物. 不少学者认为含有LV的联合用药方案, 是目前胃、结直肠癌化疗中较为理想的方案.

3 术前区域性动脉化疗在胃、结直肠癌综合治疗中的评价

1989年, Wilke *et al*报道了34例剖腹探查无法切除的进展期胃癌, 经EAP(依托泊甙+表阿霉素+顺铂)方案化疗后, 33例实施第2次R0和R1的手术切除, 为了有别于传统的术后化疗而提出了新辅助化疗这一概念. Wang *et al*则对60例进展期胃癌术前化疗后的形态学及基因改变进行了研究, 结果显示, 术前化疗组在瘤体缩小、细胞退变、脉管内癌栓的坏死以及5 a生存率等方面, 均明显优于单纯手术组. 因此, 新辅助化疗近年来越来越受到人们的关注. 新辅助化疗提出时, 给药途径是以静脉给药为主的, 但根据WHO化疗评定标准的要求[17], 实体瘤的增殖周期为40-60 d, 故新辅助化疗的整个疗程至少需2-3个周期以上. 术前化疗时间过长, 患者常难以接受. 此外, 静脉化疗的全身毒副反应较重, 尤其是骨髓抑制如一时得不到缓解, 可延误手术时机. PRAC的特点是术前经肿瘤主要供血动脉靶向性给药, 使肿瘤组织中的药物浓度较静脉给药高出10-20倍, 使之能最大限度的杀伤癌细胞, 并能抑制肿瘤细胞增殖, 诱导肿瘤细胞凋亡, 降低细胞活力, 防止转移; 同时能使瘤体局限缩小, 从而提高根治性切除率; 此外, PRAC后, 化疗药物均经伴行静脉流向门静脉, 再经肝代谢降解, 故在门脉系统内抗癌药物浓度高而持久, 对预防血行转移(肝转移)有较好的效果, 其毒副反应亦较静脉化疗为轻, 因此, 化疗作为一种手术治疗的辅助措施, PRAC具有浓度高、见效快、毒副反应少、与手术间隔时间短(14 d/次)等优点, 因此较静脉化疗更符合临床和患者的要求. 应该说PRAC是在新辅助化疗基础上的一次新的发展和提高.

尽管众多的研究已经表明, PRAC能使肿瘤坏死缩小、TNM分期提前、血行转移减少、并能提高根治性切除率等, 但对能否改善终极预后学界仍有人持有不同意见. 如Braun *et al*[18]认为, PRAC虽能取得较好的病理组织学疗效, 但并不能提高术后生存率. 我院Zhang *et al*[19]对91例进展期胃癌进行随机分组、对照分析, 结果显示, PRAC组(37例)于化疗1-2次进行手术, 术后并发症率为5.4%, 5 a生存率为52.55%; 而单纯手术组(54例), 术后并发症率为5.5%, 而5 a生存率仅为39.8%; PRAC组明显优于单纯手术组, 并认为PRAC是影响预后的一个独立因素. Shchepotin *et al*[20]则对一组已被证实未能切除的晚期胃癌, 分别进行PRAC(25例), 静脉化疗(23例)及对症治疗(26例), 结果PRAC组中2例行再次手术切除, 全组平均生存期为401 d, 而静脉化疗组中无再次手术切除者, 平均生存期为96 d, 对症治疗组为91 d. PRAC在结直肠癌病例中的应用研究亦显示了相同的效果. 顾晋 *et al*[21]对44例结直肠癌患者行PRAC治疗, 经长期随访及生存分析后, 发现PRAC组1, 3 a生存率分别为93.0%和71.8%; 而对照组仅为80.78%和40.76%, 两组间差异显著(P = 0.023). Thompson *et al*[22]对107例晚期直肠癌患者作了回顾性研究, 结果PRAC组(52例)的5 a生存率为64.8%, 而单纯手术组仅为38.2%. 上述研究结果, 均说明PRAC不仅能提高胃、结直肠癌患者的远期生存率, 对晚期病例也能起到延长生存时间的作用. 为了探讨胃癌术后复发的形式及影响复发的独立因素, 我们曾对225例胃癌根治术后84例肿瘤复发情况及可能影响术后复发的15个临床因素和治疗措施先进行单因素分析, 再行多因素分析[23], 结果显示, 胃癌术后复发以腹膜复发(47.6%, 40/84)、血源性复发(33.3%, 28/84)最为常见, 术后早期腹腔化疗为影响胃癌术后复发的独立因素, 术前区域性动脉化疗为影响术后血源性转移复发的独立因素, 表明PRAC对减少术后血源性转移复发及EPIC对减少术后腹膜复发均具有重要意义.

我院于1989年设计并提出了“胃癌围手术期三联序贯综合治疗方案”(sequential triple therapeutic scheme, STTS), 即“术前区域性动脉化疗, 2 wk后行根治性手术, 术毕时行腹腔化疗”. 经对134例胃癌的观察, 术后5 a生存率、根治性切除率、腹膜复发率和肝转移率均明显优于单纯手术组, 显示了这一治疗方案的合理性和有效性[24].

胃、结直肠癌的综合治疗方法是多种多样的, 如区域性动脉化疗、术中腹腔化疗、免疫治疗、基因治疗、静脉化疗等, 但纵观我国

胃、结直肠癌术后生存率不断提高的过程, 手术术式的不断改善, 根治程度的不断提高, 无疑起着最关键的作用, 手术仍是其他治疗手段不能取代的主要治疗方法.

4 参考文献

1 Wu CW, Lo SS, Shen KH, Hsieh MC, Chen JH, Chiang JH, Lin HJ, Li AF, Lui WY. Incidence and factors associated with recurrence patterns after intended curative surgery for gastric cancer. *World J Surg* 2003; 27: 153-158

2 Penna C, Nordlinger B. Colorectal metastasis (liver and lung). *Surg Clin North Am* 2002; 82: 1075-1090, x-xi

3 吴鹏, 朱正纲, 叶正宝, 陈红专, 陆晖, 商俊, 张明钧, 燕敏, 刘炳亚, 于颖彦, 林言箴. 5-氟尿嘧啶-2'-脱氧核苷经胃左动脉介入灌注后的药代动力学实验研究. 外科理论与实践 2004; 9: 135-139

4 Masuyama M, Taniguchi H, Takeuchi K, Miyata K, Koyama H, Tanaka H, Higashida T, Koishi Y, Mugitani T, Yamaguchi T. Recurrence and survival rate of advanced gastric cancer after preoperative EAP-II intra-arterial infusion therapy. *Gan To Kagaku Ryoho* 1994; 21: 2253-2255

5 袁建华, 赵仲生, 胡庭扬, 茹国庆, 俞文强, 陈方宏, 罗祖炎, 毛颖民, 邓高里, 董全进, 屠世良. 经动脉导管化疗对大肠癌组织学疗效和细胞凋亡的影响. 中华放射学杂志 2003; 37: 1-4

6 陶厚权, 邹寿椿, 裘华森, 茹国庆, 赵仲生. 术前区域性动脉化疗对胃癌细胞凋亡的影响. 中华消化杂志 2000; 20: 215-216

7 Inada T, Ichikawa A, Igarashi S, Kubota T, Ogata Y. Effect of preoperative 5-fluorouracil on apoptosis of advanced gastric cancer. *J Surg Oncol* 1997; 65: 106-110

8 刘福坤. 进展期胃癌手术前后介入治疗. 中国实用外科杂志 2001; 21: 403-404

9 Arber N, Doki Y, Han EK, Sgambato A, Zhou P, Kim NH, Delohery T, Klein MG, Holt PR, Weinstein IB. Antisense to cyclin D1 inhibits the growth and tumorigenicity of human colon cancer cells. *Cancer Res* 1997; 57: 1569-1574

10 顾晋, 马朝来, 王怡, 徐光炜. 结直肠癌患者术前区域动脉灌注化疗对癌细胞增殖的影响. 中华胃肠外科杂志 2000; 3: 213-216

11 彭亦凡, 顾晋, 李沛, 王怡, 徐光炜. 术前区域动脉灌注化疗对结直肠癌组织微血管计数及血管内皮生长因子表达的影响. 中华胃肠外科杂志 2001; 4: 218-221

12 刘福坤. 大肠癌术前介入化疗的基础与临床. 大肠肛门病外科杂志 2002; 8: 70-71

13 顾晋, 马朝来, 叶颖江, 薛卫成, 曲军, 赵永东, 于永祥, 冷希圣, 祝学光. 结肠、直肠癌术前区域性动脉灌注化疗的临床病理观察. 中华外科杂志 1999; 37: 333-335

14 邹寿椿, 裘华森, 陈方宏, 袁建华. 胃癌血供与供血动脉插管化疗的临床观察. 中国实用外科杂志 1996; 16: 658-659

15 胡庭扬 袁建华, 茹国庆, 赵仲生, 罗祖炎, 刘子江, 俞文强, 蔡学祥, 陈方宏, 邓高里, 董全进. 大肠癌术前动脉灌注化疗的组织学疗效分析. 中国肿瘤 2001; 10: 44-45

16 Trubel W, Turkof E, Rokitansky A, Firbas W. Incidence, anatomy and territories supplied by the posterior gastric artery. *Acta Anat (Basel)* 1985; 124: 26-30

17 邹寿椿. 胃癌的辅助化疗. 见张启瑜. 钱礼腹部外科学. 第3版. 人民卫生出版社, 2006: 259-260

18 Braun EM, Kikot VA, Ugrinov OG, Lishchishina EM. Neoadjuvant intra-arterial polychemotherapy of locally advanced rectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 1997; 23: 228-232

19 Zhang CW, Zou SC, Shi D, Zhao DJ. Clinical significance of preoperative regional intra-arterial infusion chemotherapy for advanced gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3070-3072

20 Shchepotin IB, Chorny V, Hanfelt J, Evans SR. Palliative superselective intra-arterial chemotherapy for advanced nonresectable gastric cancer. *J Gastrointest Surg* 1999; 3: 426-431

21 顾晋, 李明. 结直肠癌术前区域动脉灌注化疗. 中华胃肠外科杂志 2001; 4: 212-214

22 Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-1462

23 张成武, 邹寿椿, 赵大建, 施敦. 胃癌术后复发及其相关因素分析. 中华胃肠外科杂志 2004; 7: 282-285

24 Zou SC, Qiu HS, Zhang CW, Tao HQ. A clinical and long-term follow-up study of perioperative sequential triple therapy for gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 284-286

电编 张敏 编辑 王晓瑜

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年2月18日; 15(5): 482-488
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

焦点论坛 HIGHLIGHT TOPIC

消化道肿瘤肝转移的介入治疗

裘华森, 魏 星, 周济春

■背景资料
消化道肿瘤肝转移的发生率很高, 而能获得手术切除者仅占10%-20%, 介入治疗方法愈来愈得到国内外学者的重视, 转移性肝癌的介入治疗方法多种, 主要包括经皮的局部消蚀法和经血管的介入方法两大类. 目前肝动脉栓塞化疗、瘤内无水酒精注射等介入治疗已经得到了广泛应用, 各种新技术不断应用于转移性肝癌介入治疗.

裘华森, 魏星, 周济春, 浙江中医药大学第一临床医院 浙江省杭州市 310000
裘华森, 教授, 主要从事腹腔镜治疗、胃肠肿瘤外科以及肝胆外科方面的研究.
通讯作者: 裘华森, 310000, 浙江省杭州市, 浙江中医药大学第一临床医院. qhs86@163.com
电话: 0571-87075085
收稿日期: 2006-11-22 接受日期: 2006-12-27

摘要
介入治疗方法是一种微创手术, 具有损伤小、近期疗效显著、并发症少、易于重复等特点, 愈来愈得到国内外学者的重视. 目前, 肝动脉栓塞化疗、瘤内无水酒精注射等介入治疗已经得到了广泛应用, 各种新技术不断应用于转移性肝癌介入治疗, 并显示了较好的治疗效果. 转移性肝癌的介入治疗方法多种, 主要包括经皮的局部消蚀法和经血管的介入方法两大类.

关键词: 转移性肝癌; 介入治疗; 超声

裘华森, 魏星, 周济春. 消化道肿瘤肝转移的介入治疗. 世界华人消化杂志 2007;15(5):482-488
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/482.asp

0 引言
肝脏是人体最大的实质性器官, 有肝动脉、门静脉双重血供, 故许多脏器的恶性肿瘤易发生肝脏转移. 10%-25%的结直肠癌患者在确立诊断时即已存在肝转移, 另有20%-25%的患者在肠癌术后发生肝转移, 因此消化道肿瘤肝转移的发生率可高达50%, 而能获得手术切除者仅占10%-20%[1-3]. 介入治疗方法是一种微创手术, 具有损伤小、近期疗效显著、并发症少、易于重复等特点, 愈来愈得到国内外学者的重视. 目前肝动脉栓塞化疗(TACE)、瘤内无水酒精注射等介入治疗已经得到了广泛应用, 各种新技术(如射频治疗、冷冻治疗)不断应用于转移性肝癌介入治疗, 并显示了较好的治疗效果. 转移性肝癌的介入治疗包括经皮的局部消蚀法和经血管的介入方法两大类, 前者主要是在超声引导下的各种经皮的治疗方法.

1 超声引导下的介入治疗
超声介入治疗是近年来应用广泛的局部治疗方法, 具有创伤小、并发症少、恢复快和可反复应用等优点. 方法包括无水酒精注射、射频消融、氩氦刀冷冻和微波等. 目前认为, 针对转移性肝癌超声引导下的各种介入治疗的适应症包括: (1)直径<5 cm的单个或多个转移癌, 尤其是位置深在, 手术困难者; (2)转移性肝癌术后复发不宜再次手术者; (3)作为TACE后的补充治疗; (4)由于其他原因而无法手术者.

1.1 瘤内无水酒精注射(PEI) 1983年Sugiura首先报道在超声导引下经皮无水酒精瘤内注射治疗肝癌的临床应用. 其原理是酒精在肿瘤组织内弥散, 使肝癌细胞发生凝固性坏死, 从而达到杀灭肿瘤细胞的目的. 主要适用于直径<3 cm, 结节在5个以下的小肝癌, 肿块有包膜者效果佳. 但对有肝衰竭倾向的患者、病变广泛或结节数超过5个或已有肝外转移, 以及对无水酒精过敏者均不宜采用本法治疗. Livraghi *et al*[4]报道酒精注射治疗15例肝转移灶<2 cm的患者, 其中13例得到缓解: 5例肝转移灶在2-3 cm的患者中4例缓解, 肝转移灶>4 cm的患者均无缓解, 认为影响疗效的主要因素为肿瘤的大小和数目. 其原因包括酒精扩散的不均质性及扩散范围的相对局限, 肿瘤周边常有癌细胞残存, 易原位扩散或转移. 操作前常规测定患者的肝肾功能、凝血机制. 在超声导引下经皮注射无水酒精于肝脏肿瘤内. 注射的量随肿瘤大小而定, 以10-15 mL/cm计算, 但一般不应超过30 mL. 应在肿瘤内多点、多方向、多层面注射, 每个注射点注入酒精0.5-1.0 mL左右. 通常每周1-2次, 一个疗程为4-6次, 也可根据每个患者的耐受情况及反应而定. 注射后的副反应为短暂发热、腹部不适或疼痛. 严重并发症罕见, 国外报道针道种植的发生率为3%, 严重胆道损伤率为1%[5-8].

1.2 射频消融(RFA) 射频(radiofrequency, RF)治疗用于直接使组织凝固坏死已有70余年的历史, 治疗肝癌的历史也已有10 a. 射频治疗除了射频发生器和插入肿瘤组织的电极针之外, 还需要在接受治疗者的体表垫置分散电极板以构成回路. 当射频范围内(460-500 kHz)的交流电在向回

路电极板传输时, 激发了电极针周围组织细胞的离子震荡和相互撞击继而产生热能, 其热能随时间逐渐向外周传导, 从而使局部组织细胞发生热凝固性坏死和变性[9].

早期使用普通的单电极针, 靠近电极的组织一旦被高温凝固发生干燥或炭化, 局部阻抗增高, 致使电流传导受阻, 消融坏死区直径仅1.5 cm左右, 实用价值有限. 近来RF技术的显著进步主要体现在电极针的改进, 如在中空的电极针内滴注生理盐水或电极尖端附设冷却装置, 都可延缓阻抗增高使消融范围扩大. 还有一种多电极的消融针(在我国俗称多弹头), 由4-10支记忆合金材料的细电极组成, 平时收拢在针鞘里, 穿刺进入瘤内后伸展开来呈伞骨状排列, 结果是大大增加了电极针的表面积和拓宽了电流传导的空间, 1次治疗可获得横径3.5-5.0 cm的扁球体状凝固区.

目前, 临床中采用的射频消融仪器有3种, 均由美国制造. 他们均采用相同的工作原理, 仅电极的设计, 监测的指标和RF消融仪器的功率有差别. 最常用的产品是美国的RITA射频消融系统(RITA medical system, Inc., Mountain View, CA), 其主机的能量设置为50-150 W, RF发生器的频率为460 kHz. 电极针产品系采用一根15 G的套针(starbust电极针), 配有多个电极导线; 当套针刺入肿瘤内后, 推进内套针, 其顶端有4-7根球形空间分布均匀的细针呈伞状展开, 可覆盖或包绕肿瘤. 细针的顶端配有热敏电偶并与RF电极系统相连. 通电后, 电极针不仅能将RF热能通过电极均匀播散到肿瘤组织内, 同时可显示各个电极周围组织内的温度, 从而, 具备监控温度与凝固参数的功能. 最新型的电极针(starbust XL)可一次性产生达5 cm直径的凝固灶, 而计算机系统可实时描绘射频发射能量、组织阻抗以及病灶内温度的曲线. 另一种常被应用的RF系统是Radionics公司生产的500 kHz单极RF发生器(Radionics, Boston, MA). 其电极产品是使用带有冷循环系统的中空冷却射频针(cooled-tip电极), 由一根或一簇直形的电极针和200 W RF主机构成. 在治疗过程中冷却的纯净水通过专用的动力泵在中空针内循环, 这样可防止由于温度过高使电极周围组织炭化而增加阻抗. 因为阻抗过高将降低RF能量的释放、热传导以及凝固坏死作用. 第3种产品是RTC公司生产的RF2000型RF消融仪(RadioTherapeuticus Corporation, Mountain View, CA), 装置与RITA系统相似, 主机为100 W的射频交流电机, 治疗针为可伸缩性15 G套管针. 展开内套针, 顶端为10支可弯曲的爪状细电极针. 研究报道多爪型电极可产生较为均匀的热损伤区域.

以RF2000(Mountain View, CA)射频仪为例. 射频治疗的方法为: 用尖刀在皮肤戳一小口作穿刺通路, 电极针鞘进入瘤内后将多电极弹出展开, 此时可见荧光屏上数个强回声点排列近似“一”字, 注意这些电极针的位置. 治疗开始先用20-40 W的功率, 以后每分钟加10 W, 最大功率勿超过90 W, 治疗时间15 min. 治疗中视具体情况可调整功率、时间或多电极针的伸展程度, 也可在功率输出停止后稍等片刻开始下一次能量释放或移动电极重新发射. 应依据肿瘤的位置、大小、深浅和数目等安排射频电极针的顺序. 由于在治疗中经常需要多点位的射频治疗, 前点位的射频消融产生组织高温、微气泡等. 使靶区组织出现强回声. 干扰后点位射频消融的超声显像的定位和治疗. 所以, 在肿瘤治疗中应遵循先深部后浅部, 先疑难部位后容易部位, 先主要病灶后次要病灶的原则, 以达到安全、有效、彻底的治疗目的.

RF是现时欧美国家采用消融疗法的主要手段, 被认为众多肿瘤消融治疗中最具前景的方法之一, 且较多的运用于转移性肝癌特别是消化道肿瘤肝转移的治疗. 结果亦令人鼓舞[6-7]. 除了超声引导下经皮介入外, 还可于开腹术中, 或腹腔镜下进行治疗. 目前射频治疗的目的包括两方面: (1)使肿瘤病灶全部凝固坏死达到根治性治疗的目的. 对于一些小肿瘤大小约3 cm的转移性肝癌患者, 由于肝功能不佳不能耐手术, 射频治疗使肿瘤组织发生凝固性坏死, 既根治性治疗肿瘤又不致患者出现手术后的肝功能衰竭. 另外, 肿瘤位于门脉区使得瘤灶难以彻底切除时也亦选用射频治疗; (2)缩减肿瘤负荷, 对肝内多发肿瘤或不能手术的大肝癌, 通过射频治疗使肿瘤组织部分坏死, 缩小肿瘤范围, 以期二期手术. 对肝功能C级, 有严重出血倾向、大量腹水或严重黄疸以及合并门脉癌栓者应列为手术禁忌. 射频治疗的局限性在于: (1)由于对多电极下热场还缺乏具体研究, 在三维上可能出现漏空现象造成凝固不完全, 特别是直径>5 cm的病灶, 体积大, 生长不规则, 治疗时各分区间不能完全排除留有残余癌组织; (2)肿瘤的位置: 靠近大血管的肿瘤, 由于血流带走热量, 降低治疗温度导致肿瘤易于残留; (3)定中心点不准确: 穿刺

■同行评价

本文综述了消化道肿瘤肝转移的各种介入治疗方法, 内容较丰富, 有一定的临床价值.

点偏移等导致部分肿瘤残存; (4)肝转移癌患者是否存在其他部位的隐性转移灶, 均影响射频消融术的疗效. 故目前提出需结合其他方法进行综合治疗才能收到更佳的效果.

1.3 *冷冻治疗*(CSA) 冷冻导致肿瘤细胞死亡的原理可能是细胞内冰晶形成和冰晶的机械性损伤、细胞脱水和皱缩、细胞膜脂蛋白成分变性以及血流淤积微血栓形成的综合作用. 最初的方法是将液氮直接倾倒在肿瘤部位或肝断面上. 由于这种方法可控性差, 并发症多, 近年来已不常被采用. 目前冷冻治疗肝癌的方法有单纯局部液氮冷冻和局部冷冻-加温治疗(氩氦刀)两类. 单纯局部液氮冷冻使用的是液氮冷冻机, 其冷冻头有不同形状、大小, 以适合不同部位的肝癌治疗. 常用的液氮冷冻头有3-5 cm直径的盘形冷冻头和5-10 mm粗的单针和多针冷冻头. 直径3.5 cm的盘形冷冻头接触冷冻, 其冷冻区表面积最大直径为7 cm, 产生的半球状冷冻区深度与表面直径比为1∶2; 直径5 mm的单根针冷冻头插入冷冻, 其冷冻最大直径达6 cm, 其冷冻深度随冷冻头插入深度而定. 局部冷冻-加温治疗(氩氦刀)是美国恩多凯尔公司采用太空火箭制导技术研制成功的超导手术系统. 其独特的温度及定位监控系统, 可使医务人员更精确定位和准确摧毁肿瘤细胞而又不损伤病灶周围的正常组织. 氩氦刀系统有4或8个能单独控制的热绝缘中空超导刀, 可输入高压常温氩气(冷媒)或高压常温氦气(热媒). 其降温及升温的速度, 时间和温度, 冰球尺寸与形状是完全可控和精确设定的. 更重要的是, 氩氦刀制冷或加热只局限在超刀尖端, 刀杆有很好的热绝缘, 不会对穿刺路径上的组织产生损伤, 还可在超声等的引导下经皮穿刺冷冻治疗, 加上其配有2 mm的超细刀, 可大大降低患者损伤, 减少出血. 氩氦刀比旧式液氮冷冻仪冷冻快速及冷冻温度更低, 可控性好, 可即时停止冷冻并急速加热处于超低温状态的病变组织, 此种冷热逆转疗法, 对病变组织的摧毁尤为彻底, 并可解决超低温对正常组织的冷冻伤害. 国外报道氩氦刀冷冻治疗即使在大血管周边也是安全有效[8], 且较多的运用于转移性肝癌行冷冻治疗[9-10].

对肝转移癌病灶进行CSA的适应证如下: (1)发生在双叶肝脏的不可切除性转移; (2)肝转移癌病灶贴近门静脉、肝静脉、腔静脉等大血管; (3)外科手术切除术后肿瘤切缘可见肿瘤细胞或切缘“安全距离”不足1 cm; (4)对于可切除的肝转移癌, 肝功能不良或患有其他伴随疾病而外科手术存在危险及拒绝手术者, 对于处于肝脏较深部位且直径较小的肝转移癌病灶, 采取CSA更有利于保护正常肝组织, 此为CSA治疗肝转移癌的最佳适应证. 经CSA后, 局部肿瘤控制率可达85%, 肝转移癌患者平均生存时间为23 mo, 2 a和3 a生存率分别为47%和29%. 在结直肠癌肝转移患者, 平均生存时间为27 mo, 2 a和3 a生存率分别为53%和33%, 术后肿瘤复发率为8%-60%[11]. Korpan *et al*[12]报道, 冷冻治疗123例肝转移癌, 5 a, 10 a生存率分别达44%, 19%, 与手术切除疗效近似. CSA与其他介入疗法相比, 术后并发症的发生率较高(约24%), 包括肝脏出血、肝脓肿、胸腔积液、肺炎等.

1.4 *微波固化法*(MCT) 肝癌的经皮MCT始创于1994年, 现在主要在中国和日本开展. 他主要是利用微波的热效应和肿瘤不耐热的特点, 在极短的时间内在肿瘤局部产生高温, 使肿瘤组织凝固性坏死, 达到原位灭活肿瘤的目的. 在B超引导下将穿刺针经皮插入肝癌组织内, 然后将微波电极通过穿刺针植入癌灶内, 在一定的外加磁场作用下, 微波能转变成热能. 各医疗设施使用的微波装置和治疗方法不完全相同, 现以国产UMC-Ⅰ型微波凝固治疗仪为例叙述该疗法的特点: 微波发生器频率2450 MHz, 输出功率1-100 W, 连续可调, 通过电缆与经防黏处理的电极(微波天线)相连. 电极长30 cm, 外径16 G, 先端为长2.7 cm的微波辐射芯线. 单电极穿刺一次辐射可形成横径2.5 cm、长径3.7 cm左右的椭球体状凝固区, 天线周围半径1.5 cm范围内最低温度达50-60℃. 具体操作方法: 先根据肿瘤的大小制定辐射方案. 对直径≤2.0 cm的结节, 单针穿刺、单点辐射能够达到完全毁灭病灶的要求; 2.0 cm以上的肿瘤则需要多针组合穿刺辐射, 针距2.5 cm, 最多可布5-7针. 必要时每针实行两点辐射, 即1次辐射后将电极针上提3.0 cm作另1次辐射. 单针穿刺辐射可采用局麻, 穿刺点全层组织必须充分浸润麻药, 多针穿刺辐射者如有条件最好在全麻或硬膜外麻醉下进行. 治疗操作先用14 G引导针经皮经肝穿刺至肿瘤底部, 尔后拔出针芯导入微波天线施行辐射, 输出功率60 W, 辐射时间300 s, 间隔3-4 d后再追加治疗1次. 微波辐射中产生的高热使肿瘤组织内的水分发生汽化, 形成高回声团伴后方多重反射, 会模糊瘤体的显像, 妨碍下一针的穿刺定位. 因此实行多针穿刺辐射方案时, 最好先完成所有的

预定穿刺, 然后再逐个辐射.

微波固化的适应证包括: (1)单个病灶直径<6 cm, <3 cm更佳; (2)肝内病灶少于5个, 每个直径不超过3 cm; (3)无肝外病灶或肝外原发病灶已切除; (4)无外科手术指征或需延迟手术及拒绝手术者; (5)凝血酶原活性≥50%, 血小板计数≥70×10^9/L; (6)对于合并肝硬化者, 若无顽固性腹水且肝功能为Child A级或B级, MCT亦行之有效. 文献报道[11,13], 对直径约3 cm的肝转移癌进行MCT治疗, 患者平均3 a和5 a生存率分别为46%-62%和l8%-29%, 疗效与外科手术相似. 微波固化常见的并发症有: (1)局部中度疼痛; (2)发热, 多考虑为肿瘤坏死后的吸收热; (3)转氨酶一过性升高. 其他少见的并发症有: 胸水、腹腔少量出血或腹水、肝脓肿、针道种植、门静脉血栓形成、低血压(迷走神经反射引起), 并发症发生率类似于RFA.

目前认为微波治疗对于直径在5 cm以下的肝癌有望达到完全灭活, 而对于直径>5 cm者, 虽然治疗后肿瘤大部分坏死, 肿瘤缩小, 但存活的肿瘤细胞可能出现耐热, 或受热刺激后处于增生活跃状态, 导致肿瘤的复发和转移. 对于较大肿瘤应结合其他方法如肝动脉化疗栓塞, 或先行肝动脉化疗栓塞使肿瘤缩小, 再行微波凝固治疗以提高疗效.

1.5 *激光治疗*(LITT) 1990年代中期, Vogl *et al*[14]首次证实激光热能可在肝转移癌患者肝脏深处产生局部定位热损伤而导致肿瘤坏死, 同时不影响周围邻近组织. 此后, LITT技术不断得到改进和发展, 包括采用弥散型激光头装置和带有冷却装置的穿刺针等, 明显扩大了肿瘤的治疗范围. LITT的基本原理是: 把一个激光头放在肝癌组织内, 通过光纤把低能激光(3-15 W)传输给激光头, 利用光能转变为热能, 把肝癌组织连续加热(3-30 min)到一定温度范围内(45-95℃)使其凝固坏死, 而正常肝组织不受损伤. 由于Nd：YAG穿透组织能力强, 可通过植入光纤传输等特点, 故常被选用于治疗恶性肿瘤. 通常应用Nd：YAG激光低功率(1-5 W)连续加热数分钟, 肝癌被凝固坏死直径达40 mm.

局麻下或全麻下B超、CT或MRI引导经皮穿刺或开腹直视下LITT治疗肝癌都有报道. 全麻下治疗好处是有利于控制呼吸, 防止患者不舒适和移动; 有利于MRI实时监测; 有利于经皮穿刺、气囊阻断门静脉血流而增强LITT治疗肝癌疗效. 局麻下B超引导16 G-20 G套管针经皮穿刺LITT优点是经济、安全、方便、微创、可反复治疗, 故被广泛应用. 直视下LITT肝癌优点是: 可准确植入激光探头, 针道出血可直视下止血, 肝脏可游离暴露后位肿瘤, 并且可增加光纤直径便于凝固较大体积肝癌, 可阻断肝门增强疗效.

在监测方面, 超声: 能使导管准确放置到肿瘤内, 但治疗区域实时监测则欠准确(在凝固期观察到的回声区域与凝固损伤不相关, 这个影像是由组织水蒸发发泡所产生的). CT: 在治疗后增强螺旋CT被认为是评价的“金标准”. 理想时机是1-4 d, 这与实验产生的凝固损伤有最大直径时间相一致, 但术中不能及时反映组织热损伤变化MRI: 形态学: 优质的软组织成像质量及直接三维成像能力. 更重要的是: 对温度敏感, 使操作者准确估计热损伤的真实程度, 增加了治疗过程中组织变化的直观性, 因此MRI是一个好的实时监测工具.

LITT治疗肝肿瘤的适应证包括: (1)病灶数目不超过5个, 最大直径不超过5 cm; (2)肿瘤病灶发生于双肝叶; (3)无肝外转移; (4)外科部分切除术后转移癌复发; (5)正在接受全身或局部化疗的转移癌患者; (6)不适合于外科手术或拒绝外科手术治疗的患者; (7)原先不适于外科手术治疗, 经LITT后转变成可手术治疗的患者(如左右肝均有转移癌者), 直径<2 cm的肿瘤经LITT治疗后6 mo, 肿瘤复发率为1.9, 直径>4 cm的肿瘤, 其复发率为4.4. 采用Kaplan Meier方法统计肝转移癌患者的平均生存时间为4.4 a, l, 2, 3, 5 a生存率分别为94%, 77%, 56%和37%[15]. LITT的并发症诸如胸腔积液(0.8%)、肝脓肿(0.7%)、胆道损伤(0.2%)、腹腔内出血(0.05%)均不严重, 通常情况下毋需特殊处理[16].

磁共振术控制下LITT技术被公认为是介入治疗肝转移癌的一种理想方法, 具有微创性、定位准确、监控性好、并发症少、肿瘤复发率低、简便易行等优点. 与其他局部治疗方法相比较, 该疗法不足之处是: (1)治疗费用相对较高; (2)对于直径较大, 形态不规则的肿瘤, 需要多个激光发射器, 并且需多次照射. 治疗、效果仍不理想, 对冷却装置的要求也提高, 需要一个能及时减少炭化与气化且热沉积能覆盖并超过整个肿瘤的方法; (3)MR温度监控技术目前只是半定量技术; (4)肝血流变化、激光能量与组织病理学结构改变3者之间的关系有待进一步确定.

1.6 *超声引导下的介入治疗的注意点* 随着超声介入治疗的成熟, 已部分取代手术而成为首选

治疗方法, 且治疗效果不亚于手术切除. 但在治疗中仍应注意以下几点: (1)定位准确是保证肿瘤完全坏死的前提, 损坏的范围必须大于瘤体直径; (2)瘤体不能太大, 否则难以保证肿瘤周边都被损毁. 一般而言, 肿瘤直径在3 cm以下, 予以微波、无水酒精注射; 瘤体直径在5 cm以下, 射频、氩氦刀均能达到肿瘤完全坏死; (3)与TACE结合应用可提高疗效, 并且应先行TACE, 再行超声介入治疗; (4)超声介入治疗的主要并发症是穿刺针道出血和腹腔脏器灼伤穿孔, 故对位于肝脏边缘、紧贴胆囊或胃肠的肿瘤治疗时应慎重. 拔针前针道内应注入止血剂, 并加压包扎; (5)不能替代手术切除、对多发转移灶手术切除结合术中射频或冷冻治疗可提高疗效.

2 肝血管的介入治疗

肝血管的介入治疗包括肝动脉栓塞治疗(TAE)、肝动脉栓塞化疗(TACE), 门静脉栓塞治疗(PVE)及肝动脉和门静脉双路径治疗等. 严格的说, 除了碘过敏外, 各期转移性肝癌均是肝血管介入治疗的适应症, 无绝对的禁忌证. 但一般认为严重的肝肾功能不全, 重度腹水, 重度门高压; 肿瘤巨大占肝脏体积的80%以上; 或者门静脉被广泛浸润, 癌栓造成门静脉主干完全闭塞; 全身广泛转移或临终期不适合血管的介入治疗.

2.1 *肝动脉栓塞治疗和肝动脉栓塞化疗* 正常肝脏接受肝动脉和门静脉双重血液供应, 肝动脉供血占25%, 门静脉占75%. 尸检资料说明, 当转移癌结节直径小于200 μm时, 并无血管形成, 供血来自肝血窦, 稍大的癌结节由肝动脉供血, 但血供量变化较大, 多血供者占77%, 少血供者占23%. 尽管肝动脉供血占优势, 但85%的癌结节同时接受门静脉供血, 主要分布在癌组织的外周部分[17]. 因此肝转移癌通常由肝动脉、门静脉双重供血且大部分由肝动脉供血. 这为肝动脉栓塞治疗提供了理论依据. 因此经导管肝动脉栓塞术及栓塞化疗术是目前治疗不能手术切除的转移性肝癌的首选方法.

用于阻断肿瘤血供栓塞剂目前常用的有碘油、带药微球、微囊以及明胶海棉. 碘油可作为化疗药物的载体, 由于能滞留在肝癌组织内, 故可较长时间保持药物浓度和生物活性, 有效的杀伤癌细胞, 增强局部的栓塞化疗作用, 是目前最常用的栓塞剂. 带药微球、微囊是将化疗药物包埋在可降解的基质中, 这种基质可选择性地进入肝癌的肿瘤小血管后, 发挥栓塞作用, 当包埋药物的基质降解时又释放出化疗药物, 继续起到靶向抗癌作用. 明胶海棉使用也较广泛, 通常用于近端肿瘤血管栓塞. 碘油等栓塞肿瘤内小血管后再用明胶海棉栓塞近端供血动脉, 两者有相互增强作用. 近端肿瘤血管栓塞, 使肿瘤内及周围的血流中断或减少, 减少了对肿瘤内碘油乳剂的冲刷作用.

由于转移性肝癌多数血管少, 血供不丰富, 以少血管型为主, 文献[18]报道高达92%(未统计肝癌肝内转移病例), 故目前认为栓塞化疗较单纯栓塞更适合于肝转移癌的治疗. 但仍有以下问题: (1)对肝功能的影响, 首次治疗后总胆红素及GPT明显升高, 多于1.5-3 mo后才能恢复. 如重复施行TACE, 肝功能则进行性损害; (2)插管成功率受一定的限制, 尤其是多次插管后肝动脉血管内膜受到刺激加上化疗药物的刺激, 导致管腔狭窄; (3)可发生胆囊血管栓塞, 急性胰腺炎, 胃十二指肠糜烂或溃疡; (4)仅单纯型肝动脉栓塞作用, 能同时对门脉产生栓塞者极少; (5)在化疗栓塞中, 最适合的碘油用量、理想的细胞毒性药物的选择, 以及治疗的间隔时间和治疗次数尚无统一标准.

2.2 *肝动脉插管灌注化疗*(TAI) 应用Seldinger插管技术, 将导管置于肝动脉, 通过灌注大剂量化学抗癌药, 使到达肝癌组织内的药物浓度比一般周围静脉给药或口服给药要高出10-30倍, 全身副作用明显减少, 因此对肝癌治疗更为有效. TAI具有以下优点: (1)肿瘤组织局部化疗药物浓度高, 而体循环中血药浓度低, 降低了化疗药物的全身性副反应, 局部脏器反应相对较重; (2)局部灌注所用的化疗药物的剂量比全身用药者明显提高; (3)化疗药物的联合作用, 使疗效明显提高. 常用的化疗药物包括5-氟尿嘧啶、丝裂霉素、顺铂和阿霉素等, 目前常采用大剂量联合用药. TAI在临床上的应用越来越广泛, Copur *et al*[19]对43例无法手术切除的肝转移癌症患者行肝动脉插管化疗, 有效率41%, 中位生存期13 mo, 疗效优于口服化疗. Kemeny *et al*[20]分析认为, 结直肠癌肝转移手术切除后辅助HAI, 可显著提高术后2 a生存率, 并减少肝脏转移癌的再发.

2.3 *肝动脉和门静脉双路径治疗* 尽管TACE是目前公认的对不能切除的转移性肝癌首选的治疗方法之一, 但仍有相当一部分患者疗效不佳, 原因之一是未能解决肿瘤细胞完全坏死, 而门静脉参与肿瘤血供是重要因素. 肝转移癌的血供都有相当一部分是来源于门脉. 单纯TACE术后

仅有20%-50%的肿瘤组织呈完全性坏死, 即使多次重复治疗仍有癌细胞残存, 因而其远期疗效不够理想. 经皮肝穿刺门静脉造影, 能使直径在6-7 cm以上的原发性与继发性肝癌、直径小于6 cm的原发性小肝癌及直径为1-2 cm的转移性肝癌显影[21], 提示门静脉灌注药物可到达肿瘤组织. 由此可见通过门静脉给药或同时加上肝动脉插管进行双途径给药对治疗肝脏肿瘤有重要意义.

Ji *et al*[22]报道47例行肝细针穿刺的患者, 副作用包括不同程度的肝区疼痛(80%, 38例), 低热(57.4%, 27例), 恶心呕吐(19.1%, 9例), 未出现异位栓塞、局部出血、胆漏等严重并发症. PVE术后2-4 wk绝大多数患者束栓塞叶出现30%-50%的肥大和栓塞叶相应程度的萎缩[23], 故PVE可导致未栓塞叶内的肿瘤加速生长, 一般未栓塞叶内有肿瘤的患者为栓塞禁忌症, 下列情况不宜行PVE术: 恶病质; 严重肝功能或心、肾功能损害; 严重肝硬化门静脉高压凝血功能障碍; 门静脉主干内大量瘤栓.

3 联合治疗

转移性肝癌的介入治疗方法多种, 各种方法各有优缺点, 由于单一的介入治疗往往不能使肝癌细胞彻底死亡, 很容易导致复发, 因此目前采用联合治疗来弥补各种方法的不足并提高治疗效果. 术中切除可与射频或冷冻相结合, 提高切除率, TACE加超声介入可提高后者治疗效果. 目前认为对肿瘤直径在3 cm以下, 结节在3个以下的患者, 可应用瘤内无水酒精注射或射频治疗; 对于肿瘤直径在3-5 cm, 肿瘤结节在3个以下, 可采用TACE及PEI治疗; 对于肝功能在Child A或B级者, 肿瘤直径在10 cm以下的患者, 可采用放射治疗或合并用TACE治疗.

4 预防性血管介入化疗

4.1 术前肝动脉化疗 Kemeny *et al*发现直径>0.5 mm微转移灶转移癌, 即见肝动脉供血这为肝动脉预防性化疗提供了理论依据. 同时导管置于腹腔干, 肠系膜血管等, 通过静脉回流入肿瘤部位, 对门脉供血的微转移灶也有一定作用. 化疗药物进入体循环, 对全身临床或亚临床转移灶产生一定的作用. 因此术前应用肝动脉预防性介入化疗具有疗效确切, 操作方便等优点. 但也有认为肝动脉化疗由于动脉血流快, 在肝脏停留时间短, 不利于肿瘤细胞的杀灭. 另外, 对其他器官副作用较大且目前仍缺乏大样本的随机对照研究.

4.2 门静脉预防性化疗 消化道肿瘤易通过门静脉发生肝转移, 部分肿瘤术前肝内已有癌细胞存在, 亚临床癌灶已经形成; 而B超、CT、MRI等检测手段尚不能检出, 术中亦难发现. 另外, 手术后个别微小和隐蔽的癌细胞、癌组织仍可能存在于原发区, 在适当的条件下, 仍可通过血运和淋巴系统向肝转移. 手术过程挤压肿瘤可能导致癌细胞进人门静脉, 从而增加肝转移的危险性. 研究证实, 大肠癌Dukes A, B, C, D期患者的门静脉血中, 分别有28.6%, 62.5%, 90.5%和100.0%患者可查出癌细胞[24-25]. 体积微小尚未在肝脏正式着床的肿瘤转移灶通常对化疗药物敏感性较高, 因此, 及时进行预防性门静脉的介入化疗, 是十分有必要的.

门静脉化疗具有以下优点: (1)全身不良反应轻; (2)药物剂量可相对增加; (3)5-FU, MMC在肝脏中有较高的摄取率; (4)辅助化疗应在手术后肿瘤负荷最小时开始, 由于经门静脉灌注化疗全身毒副反应轻, 术后可立即进行; (5)术中置管, 简便易行. 操作时应注意以下几点: (1)导管插入深度要适中, 过深易打折, 过浅易脱落. (2)导管结扎松紧要适宜, 固定要确切. (3)贮药泵周围皮下积液易导致感染. (4)化疗药物浓度不能太高, 注射速度不能太快、太猛. 要均匀缓慢注入, 有条件者可用微量泵缓慢泵人. (5)注射完毕一定要再注入肝素稀释液, 以防血栓形成

4.3 常用药物 目前最常用的预防性化疗药物为5-FU. 研究表明[26], 5-FU全身化疗间歇给药预防肝转移作用有限, 这是因为5-FU只对DNA合成期癌细胞有效. 是时间依赖性抗癌药物. 其活性代谢产物半衰期仅约10 min, 故5-FU间歇给药对大部分癌细胞不起作用, 而应以持续灌注方式给药. 另一方面, 5-FU经全身给药在肝脏浓度相当低. 而不利于肝转移的预防, 为了研究全身化疗与门静脉化疗的作用. Zalcberg *et al*[27]将450例大肠癌随机分为3组. (1)对照组: 根治术后未化疗; (2)全身化疗组: 根治术后5-FU 600 mg/(m^2·d)静点连用7 d; (3)门静脉化疗组: 同全身化疗组, 经门静脉给药7 d. 结果门静脉化疗组较对照组明显降低肝转移发生率, 降低死亡率, 而全身化疗组作用并不肯定. 另外, 门静脉5-FU化疗应在术后早期进行为宜, 最迟不宜超过术后6 h. 因为癌细胞在血液循环中存在5 h上, 即可存活发生转移. 所以强调术后早期至少应进行几天门静脉5-FU化疗.

5 中药介入治疗

由于化学药物大多对骨髓抑制明显, 使免疫功能低下等副作用较大, 对于晚期患者, 由于一般情况较差, 不能胜任化疗灌注等治疗, 为了寻找提高对晚期患者的疗效, 提高生活质量延长患者的生存期, 诸多的学者从中医药方面着手. 目前认为中药介入治疗优势在于: (1)与西药相比, 中药具有多靶点抗肿瘤的优势; (2)具有常规西药不可比拟的提高机体非特异性免疫功能的作用, 能延长患者生存期; (3)中医药在围介入手术期的应用可以较有效的减少肝脏介入治疗后的毒副反应及并发症, 改善患者生存质量. 常用的方法有中药瘤内注射, 中药肝动脉灌注及栓塞等法常用的中药有华蟾素针, 鸦胆子乳剂、白芨油、喜树碱、中药复方针剂等.

6 参考文献

1 Cromheecke M, de Jong KP, Hoekstra HJ. Current treatment for colorectal cancer metastatic to the liver. *Eur J Surg Oncol* 1999; 25: 451-463
2 Tellez C, Benson AB 3rd, Lyster MT, Talamonti M, Shaw J, Braun MA, Nemcek AA Jr, Vogelzang RL. Phase II trial of chemoembolization for the treatment of metastatic colorectal carcinoma to the liver and review of the literature. *Cancer* 1998; 82: 1250-1259
3 Adam R. Current surgical strategies for the treatment of colorectal cancer liver metastases. *Eur J Cancer* 2004; 2: 21-26
4 Livraghi T, Goldberg SN, Monti F, Bizzini A, Lazzaroni S, Meloni F, Pellicano S, Solbiati L, Gazelle GS. Saline-enhanced radio-frequency tissue ablation in the treatment of liver metastases. *Radiology* 1997; 202: 205-210
5 Livraghi T, Giorgio A, Marin G, Salmi A, de Sio I, Bolondi L, Pompili M, Brunello F, Lazzaroni S, Torzilli G. Hepatocellular carcinoma and cirrhosis in 746 patients: long-term results of percutaneous ethanol injection. *Radiology* 1995; 197: 101-108
6 Parikh AA, Curley SA, Fornage BD, Ellis LM. Radiofrequency ablation of hepatic metastases. *Semin Oncol* 2002; 29: 168-182
7 Solbiati L, Goldberg SN, Ierace T, Livraghi T, Meloni F, Dellanoce M, Sironi S, Gazelle GS. Hepatic metastases: percutaneous radio-frequency ablation with cooled-tip electrodes. *Radiology* 1997; 205: 367-373
8 Weber SM, Lee FT Jr, Chinn DO, Warner T, Chosy SG, Mahvi DM. Perivascular and intralesional tissue necrosis after hepatic cryoablation: results in a porcine model. *Surgery* 1997; 122: 742-747
9 Rivoire M, Voiglio E, Kaemmerlen P, Treilleux I, Biron P, Droz JP. Salvage resection of a chemorefractory mediastinal germ cell tumor. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 112: 1124-1126
10 Pearson AS, Izzo F, Fleming RY, Ellis LM, Delrio P, Roh MS, Granchi J, Curley SA. Intraoperative radiofrequency ablation or cryoablation for hepatic malignancies. *Am J Surg* 1999; 178: 592-599
11 Liang P, Dong B, Yu X, Yang Y, Yu D, Su L, Xiao Q, Sheng L. Prognostic factors for percutaneous microwave coagulation therapy of hepatic metastases. *AJR Am J Roentgenol* 2003; 181: 1319-1325
12 Korpan NN. Hepatic cryosurgery for liver metastases. Long-term follow-up. Ann Surg 1997; 225: 193-201
13 Morita T, Shibata T, Okuyama M, Tsukahara Y, Kitada M, Nishikubo M, Ishida T, Shimano T. Outcomes of patients undergoing microwave coagulation therapy for liver metastases from colorectal cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 2003; 30: 1595-1597
14 Vogl TJ, Muller PK, Hammerstingl R, Weinhold N, Mack MG, Philipp C, Deimling M, Beuthan J, Pegios W, Riess H. Malignant liver tumors treated with MR imaging-guided laser-induced thermotherapy: technique and prospective results. *Radiology* 1995; 196: 257-265
15 Vogl TJ, Straub R, Eichler K, Sollner O, Mack MG. Colorectal carcinoma metastases in liver: laser-induced interstitial thermotherapy-local tumor control rate and survival data. *Radiology* 2004; 230: 450-458
16 Vogl TJ, Straub R, Eichler K, Woitaschek D, Mack MG. Malignant liver tumors treated with MR imaging-guided laser-induced thermotherapy: experience with complications in 899 patients (2,520 lesions). *Radiology* 2002; 225: 367-377
17 宋恕平, 杨贵, 陈陈. 临床肿瘤转移学. 济南: 山东科学技术出版社, 2001: 123
18 邱伟利, 王成刚. 肝动脉化疗栓塞治疗转移性肝癌25例分析. 介入放射学杂志 1997; 6: 146
19 Copur MS, Capadano M, Lynch J, Goertzen T, McCowan T, Brand R, Tempero M. Alternating hepatic arterial infusion and systemic chemotherapy for liver metastases from colorectal cancer: a phase II trial using intermittent percutaneous hepatic arterial access. *J Clin Oncol* 2001; 19: 2404-2412
20 Kemeny N, Huang Y, Cohen AM, Shi W, Conti JA, Brennan MF, Bertino JR, Turnbull AD, Sullivan D, Stockman J, Blumgart LH, Fong Y. Hepatic arterial infusion of chemotherapy after resection of hepatic metastases from colorectal cancer. *N Engl J Med* 1999; 341: 2039-2048
21 Nagino M, Nimura Y, Kamiya J, Kondo S, Kanai M. Selective percutaneous transhepatic embolization of the portal vein in preparation for extensive liver resection: the ipsilateral approach. *Radiology* 1996; 200: 559-563
22 Ji W, Li JS, Li LT, Liu WH, Ma KS, Wang XT, He ZP, Dong JH. Role of preoperative selective portal vein embolization in two-step curative hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1702-1706
23 Imamura H, Shimada R, Kubota M, Matsuyama Y, Nakayama A, Miyagawa S, Makuuchi M, Kawasaki S. Preoperative portal vein embolization: an audit of 84 patients. *Hepatology* 1999; 29: 1099-1105
24 钱骏. 肝转移癌诊断与治疗. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 123-150
25 骆成玉, 李世拥. 大肠癌患者门静脉血癌细胞的检测及临床意义. 中华外科杂志 1999; 37: 214-215
26 Portal vein chemotherapy for colorectal cancer: a meta-analysis of 4000 patients in 10 studies. Liver Infusion Meta-analysis Group. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 497-505
27 Zalcberg JR, Siderov J, Simes J. The role of 5-fluorouracil dose in the adjuvant therapy of colorectal cancer. *Ann Oncol* 1996; 7: 42-46

电编 张敏 编辑 张焕兰

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年2月18日; 15(5): 489-492
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

焦点论坛 HIGHLIGHT TOPIC

肝癌门静脉癌栓的介入治疗

白爱国, 郑传胜

白爱国, 郑传胜, 华中科技大学同济医学院附属协和医院介入放射科 湖北省武汉市 430022
白爱国, 硕士, 主要从事影像诊断和介入治疗方面的研究.
通讯作者: 白爱国, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院介入放射科. a3014244@tom.com
收稿日期: 2006-12-27 接受日期: 2007-01-06

摘要

肝癌合并门静脉癌栓(PVTT)的治疗仍是医学难题, 既往一直被视为手术禁忌, 近年随着介入医学的进步, 发展了多种微创治疗方法, 取得了可喜的疗效, 使肝癌并PVTT由不可治变为部分可治, 展现了介入方法治疗肝癌并PVTT的乐观前景. 本文就当前针对门静脉癌栓的介入治疗方法, 技术要点及各种介入治疗方法的初步疗效进行了综述. 为进一步的临床规范化综合治疗肝癌并门静脉癌栓提供参考.

关键词: 门静脉癌栓; 介入治疗; 肝癌

白爱国, 郑传胜. 肝癌门静脉癌栓的介入治疗. 世界华人消化杂志 2007;15(5):489-492
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/489.asp

■背景资料
原发性肝癌的介入治疗正在走向深入, 介入治疗门静脉癌栓的方法学研究具有重大的临床意义, 是当前的研究热点之一, 很多专家开展了这方面的研究, 并形成了多种治疗方法, 取得了一定的疗效.

0 引言

门静脉癌栓(portal vein tumor thrombosis, PVTT)是肝癌肝内播散、远处转移, 术后复发及影响预后的重要因素, PVTT的发生率文献报道大体在20%-70%之间[1-2]. 1987年国际抗癌联盟规定, 侵犯门静脉或肝静脉的主要分支的肝癌, 其分期均在T4N0M0以上, 如不经治疗, 其中位生存期在3 mo左右[3]. 门脉癌栓在促使门脉高压进展, 癌灶扩散, 机体衰竭死亡的病理过程中起到关键作用[4]. 肝癌侵犯门静脉后, 大多已失去手术治疗的机会, 既往多采取保守治疗或中医药治疗, 甚至放弃治疗, 近来针对门脉癌栓采取积极主动的介入治疗不同程度的收到了解除门脉阻塞、延缓门脉高压、控制顽固性腹水、降低上消化道出血率的目的, 从而提高了生存质量, 延长了生存期.

1 肝动脉化疗栓塞术(TACE)

动物实验, 影像检查及手术病理均证实, PVTT主要接受动脉性肿瘤血管及胆管周围毛细血管从供血, 门静脉为出瘤血管, 而非营养血管[5-8]. 传统的TACE不仅能引起主瘤的坏死, 亦能引起PVTT的坏死. 1995年Chung *et al*[9]报道110例肝癌合并PVTT的患者, 主干癌栓48例, 其中15例主干完全阻塞, 右支36例, 左支26例分别以碘油加阿霉素行节段性栓塞, 结果显示, 31例瘤体和癌栓完全或部分消失, 部分病例术后癌栓内可见碘油沉积, 徐爱民 *et al*[10]报道, 124例肝癌并门静脉癌栓患者, 采用肝动脉碘油栓塞加化疗灌注, 77例采用肝动脉灌注化疗加碘油栓塞加明胶海绵颗粒栓塞, 结果门脉癌栓的缩小率及消失率为: 33.9%, 8.9%和33.8%, 16.9%. 但是, 为了防止术后发生肝功能衰竭等严重后果, 需根据门静脉血流方向, 癌栓的类型, 患者肝功能储备情况, 有无动门脉瘘等严格把握适应症. 一般认为[11-12], 当门脉主干癌栓形成时, 又无侧支循环形成是动脉栓塞禁忌证; 门脉左或右干癌栓不伴动门脉瘘时, 可行超选择供血动脉内栓塞; 门脉二级分支癌栓可行常规栓塞; 门脉三级分支癌栓由于癌栓的“门脉自家栓塞”作用, TACE实际上起动门脉联合栓塞作用, 不影响TACE的效果. 此外, 门脉主干或一级分支的癌栓的患者不适于用明胶海绵颗粒、钢圈等栓塞剂作主干栓塞, 可采用较温和的碘油化疗药物乳化剂栓塞.

2 经皮经肝门静脉化疗栓塞术(SPVE)

此方法是在TACE的基础上, 同时行门静脉化疗灌注或化疗栓塞. 不同于外科的肿瘤切除及门静脉取栓术后门静脉置管, 皮下埋泵化疗, 介入治疗主要是在B超或DSA机(数字减影血管造影)引导下经皮经肝穿刺选择性门静脉化疗栓塞. 具体的方法: 一是单纯B超引导下直接穿刺荷瘤侧门静脉分支, 然后进行化疗栓塞, 可以刺入癌栓内注入化疗药物碘油乳剂[13]; 二是B超引导下是穿刺健侧门静脉分支, 在DSA下行直接门静脉造影, 了解癌栓类型, 然后选择性插管至荷瘤侧门静脉分支注入化疗药物及栓塞剂[14]. 门静

■应用要点
本文较为全面的介绍了当前介入治疗门静脉癌栓的各种方法及其初步疗效, 并对各种方法的治疗原理, 技术要点进行了阐述, 具有一定的临床指导意义.

脉化疗栓塞可对肝肿瘤及PVTT的双重血供均起到阻断作用. 同时可使PVTT暴露于高浓度的抗癌药物环境中, 达到控制肿瘤、消除癌栓的目的. 此外, 研究表明, 患侧门脉分支的栓塞, 可促进健侧肝容积的增大, 从而提高肝功能的储备[15-16]. 司芩 *et al*[17]报道38例肝癌合并门脉癌栓的患者采用SPVE后, PVTT消失率23.7%, 缩小率44.7%, 肿瘤缩小率76.3%, AFP转阴率66.6%, 9例获Ⅱ期手术切除, 术后病理证实癌栓坏死率达100%.

3 门脉癌栓经皮无水酒精注射治疗(PEI)

在超声引导下穿过正常肝实质刺入PVTT内, 然后注入无水酒精, 实时观察无水酒精弥散情况, 待酒精弥散至整个癌栓实体后拔针. 采用PEI治疗门静脉癌栓的报道不多, Chan *et al*[18]报道1例48岁中年男性患者, 主瘤灶采用TACE, 门脉癌栓采用无水酒精注射, 随访18 mo, 未见肿瘤复发征象, 但发生了胆道狭窄. 国内林礼务 *et al*[19]报道, 18例肝PVTT行超声引导注射无水酒精治疗, 每周1-2次, 连续5-7次为一疗程. 随访6-12 mo发现, 18 例肝PVTT经超声引导肝门静脉穿刺注射无酒精后, 15例(83.3%)有不同程度改善, 其中7例(38.9%)注射4-5次后癌栓消失, 8例(44.4%)表现为癌栓缩小或停止发展, 3例无效者, 因肝内肿瘤较大, 其中2例左右支癌栓伴较严重腹水, 病情严重, 体质过于虚弱, 仅注射2-3次后无法继续治疗. 另1例肝门脉癌栓经注射酒精后缩小, 但因脑内与脊柱转移中断治疗. 治疗中除疼痛与发热(体温最高达39℃)外无其他重大并发症发生, 发热患者一般于1-3 d后自行退烧, 体温达39℃的患者可给予降温处理, 治疗前后肝功能检查结果无明显变化. 提示, PEI治疗门脉癌栓可取得一定得效果.

4 激光消融术(laser ablation, LA)

LA治疗PVTT是利用高功率半导体激光仪光纤头爆破, 气化的作用使癌组织热凝固坏死[20]. 由于激光本身具有杀伤分界性好的特点, 正常组织的热耐受性又比肿瘤细胞高, 所以通过调节所释放的激光功率大小, 时间长短可以控制杀伤范围的大小. 激光消融形成的隧道可以让血流通过, 治疗后坏死的癌栓组织可被机体逐渐吸收, 最终达到既杀灭了癌栓中的肿瘤细胞, 又使阻塞的门静脉再通的目的. 国内陆正华 *et al*[21]报道, 24例患者30支PVTT行LA治疗前, 经彩色多普勒检查均无血流信号; 行LA后第1天, 28支门静脉可观察到彩色血流信号; 行LA后第7天30支门静脉均可观察到彩色血流信号; 行LA后第30天, 12支可观察到连续但不稳定的彩色血流信号, 16支可观察到连续且稳定的再通血流信号; 术后第90天, 18支可观察到连续且稳定的再通血流信号. 在随访期内, 生存时间≥10 mo者4例, ≥7 mo者2例, ≥4 mo者6例, ≥1 mo者8例; 仍然生存的20例患者中, 尚无或呈轻度腹胀、腹痛、腹泻等临床表现者15例, 肝功能Child A级者19例. 提示PVTT的激光消融治疗有望成为一种疗效可靠, 技术安全的门静脉癌栓治疗新方法.

5 内放射治疗

采用介入的方法将放射性物质经肝动脉注入或直接植入瘤体内进行靶向性放疗, 不仅可以杀死肿瘤周边靠门静脉供血区残存的癌细胞, 对瘤区门静脉分支癌栓也可直接杀伤, 同时内放射治疗起栓塞作用, 可阻断部分癌栓血供. ^{133}I是临床上常用的一种放射性核素, Raoul *et al*[22]对有癌栓的14例进行内放射治疗, 从肝动脉注入^{133}I标记的碘化油, 3, 6, 9 mo的生存率分别为71%, 48%和7%, 而对照组分别为10%, 0和0. 目前研究表明, ^{32}P玻璃微球是较理想的内放射剂, 其优点为: (1)高纯度β射线源, 无γ射线, 无须隔离患者, 对人体无毒; (2)单位核素能在局部产生较大的辐射能量, 且不会累及邻近器官; (3)肿瘤剂量率大, ^{32}P所释放的β射线最大射程可达1 cm, 其能量为^{133}I所产生的β射线能量的2倍, 杀伤力强; (4)玻璃微球理化性质稳定, 半衰期长(14.3 d), 在肿瘤内不被溶解和吸收, 可使肿瘤受到较高的辐射剂量, 可永久性栓塞. 严律南 *et al*[23]采用^{32}P-玻璃微球肝动脉灌注, PVTT术后缩小或消失占42.19%(6/14).

6 金属内支架置入

金属内支架置入主要是为了缓解癌栓引起的肝脏供血不足, 门脉高压症等继发性病理生理变化.

6.1 经皮经肝门静脉支架置入 支架置入的门脉通路可通过穿肝、穿脾两种方式建立, 后者的难度和风险明显增大[24]. 大多数学者认为, 支架开通的是正常肝组织的血流, 因此, 支架应跨过狭窄段, 远端位于正常肝侧门脉分支, 近端位于门脉主干. 门静脉金属内支架置放后, 闭

塞的门脉再通, 文献报道[24-29], 门静脉压力可下降约100-150 mm H_2O_2, 从而有利于食管胃底静脉曲张、腹水的好转; 改善正常肝组织的门静脉血供, 改善肝功能, 增加肝功能储备, 降低肝功能衰竭、肝性脑病及上消化道出血的几率, 有利于进一步的化疗栓塞等其他治疗, 使肿瘤得到更好的控制. 关于支架置入后的通畅率, Yamakado *et al*[25]报道, 1组21例患者15例在生存期内支架通畅, 1 a累计通畅率为53.6%, 平均通畅期为12.4 mo. 2例未抗凝者发生血栓形成和内膜增生. 6例发生支架堵塞, 其中2例因肝功能衰竭死亡. 龚高全 *et al*[26]采用门静脉支架治疗门脉癌栓患者19例, 其中16例获得随访, 支架通畅期为1-20 mo, 中位通畅期仅为4 mo. 肿瘤沿支架网格或两端长入, 血栓形成及内膜增生均可导致支架再狭窄, 尤其是肿瘤的继续生长, 被认为是支架发生再狭窄的主要原因, 因此支架置入后, 尚需配合抗肿瘤, 抗凝等治疗.

6.2 经颈静脉肝内门腔分流术(TIPS) 姜在波 *et al*[30]报道了TIPS治疗门脉癌栓性门脉高压的手术方法: 常规术前准备, 右颈内静脉入路, 按常规TIPS方法穿刺门脉右支, 回抽有门脉血液后(由于癌栓引起门脉闭塞, 狭窄变形并继发门脉海绵样变等, 不一定穿刺到门脉右支的合适位置, 即便穿刺到分支中亦可继续进行手术; 如果门脉回血不畅, 常需造影指示), 引入黑泥鳅导丝, 通过黑泥鳅导丝钻入门脉主干, 引入导管, 造影证实导管在门脉主干或肠系膜上静脉后, 更换为超硬导丝, 进行球囊扩张并按狭窄段长度及肿瘤侵犯程度选择内支架的型号及个数. 放置支架时, 支架一定要覆盖癌栓. 球囊扩张前后测量门脉压力变化. 术前设计穿刺路径时, 尽量避免穿刺道经过肿瘤组织. 他们报道的14例终末期肝癌合并PVTT及门静脉高压症患者, 平均年龄53.6岁, 8例门静脉主干完全堵塞, 6例门静脉主干及分支有不同程度栓塞, 5例合并门静脉海绵样变, 1例单纯上消化道大出血, 3例单纯顽固性腹水, 10例上消化道大出血合并顽固性腹水. 结果14例中10例患者成功行TIPS治疗, 平均门静脉压力从术前37.2 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa)降至术后18.2 mmHg, 平均降低19.0 mmHg, 腹水减少或消失, 消化道出血、腹胀、腹泻等症状缓解, 平均生存132.3 d, 4例失败, 此4例均伴有严重肝硬化, 彩色多普勒提示门脉海绵样变, 放弃手术. 此组病例显示, TIPS技术是治疗肝癌合并PTVV引起的上消化道大出血和顽固性腹水的有效方法.

目前, 各种针对PVTT的介入疗法均取得了一定的效果, 采用与肝内主瘤灶联合治疗的方法不同程度的延长了患者的生存期, 但是更确切的疗效仍需更多的临床实践及经验总结, 以便制定规范的治疗方案.

■同行评价
本文研究了肝癌门静脉癌栓的介入治疗, 总体内容较好, 但深度稍显不够.

7 参考文献

1 Cedrone A, Rapaccini GL, Pompili M, Aliotta A, Trombino C, De Luca F, Caturelli E, Caputo S, Gasbarrini G. Portal vein thrombosis complicating hepatocellular carcinoma. Value of ultrasound-guided fine-needle biopsy of the thrombus in the therapeutic management. *Liver* 1996; 16: 94-98
2 Arii S, Tanaka J, Yamazoe Y, Minematsu S, Morino T, Fujita K, Maetani S, Tobe T. Predictive factors for intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after partial hepatectomy. *Cancer* 1992; 69: 913-919
3 Ando E, Yamashita F, Tanaka M, Tanikawa K. A novel chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombosis of the main trunk of the portal vein. *Cancer* 1997; 79: 1890-1896
4 余万霰, 李惠, 刘安文, 张玲玲. 肝癌并发门脉高压门脉内有无癌栓影像对照. 世界华人消化杂志 1999; 7: 544-545
5 万智勇, 冯敢生, 梁惠民, 郑传胜, 张贵祥, 缪竟陶. 兔移植性肝癌门静脉癌栓的微血管结构与血供. 中国医学影像技术 2005; 21: 187-190
6 Toyosaka A, Okamoto E, Mitsunobu M, Oriyama T, Nakao N, Miura K. Intrahepatic metastases in hepatocellular carcinoma: evidence for spread via the portal vein as an efferent vessel. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 1610-1615
7 Sasaki Y, Imaoka S, Kasugai H, Fujita M, Kawamoto S, Ishiguro S, Kojima J, Ishikawa O, Ohigashi H, Furukawa H. A new approach to chemoembolization therapy for hepatoma using ethiodized oil, cisplatin, and gelatin sponge. *Cancer* 1987; 60: 1194-1203
8 戚跃勇, 邹利光, 王文献, 陈卫军, 熊坤林, 赵晓晏, 杨彤翰, 易习之. 肝细胞肝癌合并门静脉癌栓的双期增强螺旋CT诊断. 世界华人消化杂志 2002; 10: 384-387
9 Chung JW, Park JH, Han JK, Choi BI, Han MC. Hepatocellular carcinoma and portal vein invasion: results of treatment with transcatheter oily chemoembolization. *AJR Am J Roentgenol* 1995; 165: 315-321
10 徐爱民, 程红岩, 陈栋, 贾雨辰, 吴伯文, 吴孟超. 放射介入栓塞化疗对肝癌合并门静脉癌栓治疗的疗效观察. 中国实用外科杂志 2002; 22: 530-532
11 张希全, 杨兴民, 孙海丽, 李兆荣. 肝动脉化疗栓塞治疗原发性肝癌的疗效及影响因素. 新消化病学杂志 1997; 5: 112-113
12 卢伟, 李彦豪, 陈勇, 何晓峰, 曾庆乐. TACE对有门脉主干癌栓肝癌患者肝功能的影响及疗效分析. 临床放射学杂志 2002; 21: 139-142
13 陆力, 顾危贞, 张建生, 严轶群, 陆振玉. B超引导下经皮肝穿刺门静脉及瘤体内药物联合治疗肝癌及控制其肝内播散. 苏州医学院学报 2000; 20: 635-637
14 徐健, 孙立军, 贺洪德, 李敬邦, 张学昕, 周文英, 吴萍. 经肝动脉和门静脉联合化疗栓塞治疗中晚期肝癌的临床研究. 实用放射学杂志 2005; 21: 1183-1186
15 Takayama T, Makuuchi M. Preoperative portal vein

embolization: is it useful? *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2004; 11: 17-20
16 Nakao N, Miura K, Takahashi H, Ohnishi M, Miura T, Okamoto E, Ishikawa Y. Hepatocellular carcinoma: combined hepatic, arterial, and portal venous embolization. *Radiology* 1986; 161: 303-307
17 司芩, 王轩, 马巧珍, 钱晓莉, 吴卫英, 穆红艳, 殷广福. 超声引导经皮门静脉栓塞化疗术在中晚期肝癌合并门静脉癌栓治疗中的应用. 中华超声影像学杂志 1999; 8: 151-153
18 Chan MK, Kwok PC, Chan SC, Lam TW, Lo KK, Lam CL. Percutaneous ethanol injection as a possible curative treatment for malignant portal vein thrombosis in hepatocellular carcinoma. *Cardiovasc Intervent Radiol* 1999; 22: 326-328
19 林礼务, 何以敕, 高上达, 叶真, 薛恩生, 林晓东, 余丽云. 超声介入无水酒精治疗肝门静脉癌栓的探讨. 中华超声影像学杂志 2001; 10: 81-83
20 Steger AC, Lees WR, Shorvon P, Walmsley K, Bown SG. Multiple-fibre low-power interstitial laser hyperthermia: studies in the normal liver. *Br J Surg* 1992; 79: 139-145
21 陆正华, 沈锋, 袁国新, 施乐华, 宗明, 杨家和, 郭佳, 吴孟超. 肝癌门静脉癌栓的经皮激光消融治疗. 中华外科杂志 2004; 42: 566-569
22 Raoul JL, Guyader D, Bretagne JF, Heautot JF, Duvauferrier R, Bourguet P, Bekhechi D, Deugnier YM, Gosselin M. Prospective randomized trial of chemoembolization versus intra-arterial injection of 131I-labeled-iodized oil in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997; 26: 1156-1161
23 严律南, 李立, 陈晓理, 吴言涛, 卢武胜, 谢晓东, 官泳松, 李林, 孙文豪, 李茂良. ^{32}磷-玻璃微球肝动脉灌注治疗晚期肝癌的初步应用. 中华外科杂志 1996; 34: 526-529
24 Liang HL, Yang CF, Pan HB, Chen CK, Chang JM. Percutaneous transsplenic catheterization of the portal venous system. *Acta Radiol* 1997; 38: 292-295
25 Yamakado K, Tanaka N, Nakatsuka A, Matsumura K, Takase K, Takeda K. Clinical efficacy of portal vein stent placement in patients with hepatocellular carcinoma invading the main portal vein. *J Hepatol* 1999; 30: 660-668
26 龚高全, 王小林, 周康荣, 王建华, 颜志平, 程洁敏, 钱晟, 刘清欣, 陈颐. 肝癌伴门静脉癌栓的金属内支架治疗的初步研究. 临床放射学杂志 2003; 22: 498-501
27 Yamakado K, Nakatsuka A, Tanaka N, Fujii A, Isaji S, Kawarada Y, Takeda K. Portal venous stent placement in patients with pancreatic and biliary neoplasms invading portal veins and causing portal hypertension: initial experience. *Radiology* 2001; 220: 150-156
28 Tsukamoto T, Hirohashi K, Kubo S, Tanaka H, Hamba H, Shuto T, Higaki I, Takemura S, Kinoshita H. Percutaneous transhepatic metallic stent placement for malignant portal vein stenosis. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 453-455
29 Yamakado K, Nakatsuka A, Tanaka N, Fujii A, Terada N, Takeda K. Malignant portal venous obstructions treated by stent placement: significant factors affecting patency. *J Vasc Interv Radiol* 2001; 12: 1407-1415
30 姜在波, 单鸿, 关守海, 朱康顺, 黄明声, 李征然, 郭添胜, 刘浪. 门静脉癌栓合并门脉高压症的TIPS姑息治疗. 中华放射学杂志 2002; 36: 1075-1079

电编 张敏 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

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

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年2月18日; 15(5): 493-496
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

焦点论坛 HIGHLIGHT TOPIC

CT结肠成像在结肠癌防治中的应用

李来友, 许茂盛, 卢良骥, 高旭宁, 吕 宾

李来友, 许茂盛, 卢良骥, 高旭宁, 吕宾, 浙江中医药大学附属第一医院 浙江省杭州市 310006
许茂盛, 博士, 主任医师, 教授, 主要从事医学影响学方面的研究.
通讯作者: 许茂盛, 310006, 浙江省杭州市, 浙江中医药大学附属第一医院. xumaosh@yahoo.com.cn
电话: 0571-87070272
收稿日期: 2006-12-10 接受日期: 2006-12-27

摘要

近年来, 结肠癌的发病率呈明显上升趋势, 传统的检查方法包括大便潜血试验、结肠双对比造影和结肠内镜等在结肠癌的防治中具有十分重要的作用, 但仍不能完全满足临床要求. CT结肠成像(CT Colonography, CTC)随着其技术的进步, 临床应用明显增加, 逐渐从一种研究方法变成切实可行的应用技术. 显然, CTC因其丰富的后处理技术, 全方位的观察手段, 可能对结肠癌的防治起到积极的促进作用, CTC不但可观察肠腔内结构, 还可清晰显示肠壁、肠腔外情况以及邻近脏器, 提供大量的影像学信息, 因此有可能成为结肠癌高危人群筛查的有效方法.

关键词: 结肠癌; 体层摄影术; X线计算机; 结肠成像

李来友, 许茂盛, 卢良骥, 高旭宁, 吕宾. CT结肠成像在结肠癌防治中的应用. 世界华人消化杂志 2007;15(5):493-496
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/493.asp

0 引言

结肠癌是常见恶性肿瘤之一, 近年来其发病率呈明显上升趋势, 全世界每年新增病例超过50万[1]. 结肠癌是美国第2大死亡原因, 约占癌症死亡率的10%[2]. 中国人的结肠癌发病率在恶性肿瘤中居第4位, 占癌症总发病数的13%. 传统的检查方法包括大便潜血试验(fecal occult blood testing, FOBT)、结肠双对比造影(double contrast barium enema, DCBE)和结肠镜等在结肠癌的防治中具有十分重要的作用, 但FOBT阳性率低, 不能区分胃、小肠还是结肠来源; DCBE对小病灶敏感性低, >5 mm息肉敏感性仅26%[3]. 结肠镜(colonoscopy)是结肠癌诊断“金标准”, 同时可进行活检和息肉摘除术, 但属侵入性检查, 有潜在穿孔和出血可能[4]. 过去10余年间, CT结肠成像(computed tomographic colonography, CTC or virtual colonography, VC)被越来越广泛用来检查结肠肿瘤[5-12]. 随着CT技术的进步, 特别是多层螺旋CT(multi-slice CT, MSCT)的发展, CTC逐渐从单纯的研究转变为临床应用. 显然, CTC不但可观察肠腔内结构, 还可清晰显示肠壁、肠腔外情况以及邻近脏器, 提供大量的影像学信息, 因此有可能成为结肠癌防治的重要检查手段.

■背景资料
近年来, 结肠癌的发病率呈明显上升趋势, 传统的检查方法不能满足临床要求. CT结肠成像(CT colonography, CTC)随着其技术的进步, 临床应用明显增加, CTC不但可观察肠腔内结构, 还可清晰显示肠壁、肠腔外情况以及邻近脏器, 提供大量的影像学信息, 已逐渐从单纯的研究转变为临床应用.

1 CT结肠成像技术

CTC是一种无创性成像技术, 他依靠薄层全结肠扫描进行二维和三维成像. 尽管有不同的报道, 多数学者认为, CTC对结肠和直肠肿块的评价十分满意, 对10 mm以上息肉的敏感性是75%-100%[13], 特异性>95%[14].

1.1 患者准备 主要是肠道准备, 方法很多但何者最佳仍无定论. 目的是易于实施并使肠管充分舒张, 有利于检出病变, 可较好的鉴别病灶、皱壁或是食物残渣. 经济实用的肠道清洁法包括泻药如柠檬酸镁、磷酸苏打和清洁剂如聚乙二醇, 也可选择专用的“经济套餐”[15]. 但上述方法可引起患者的不适, 并有少量患者肠道清洁不够充分. 最近有学者采用一种更为简便且有效的肠道准备技术——饮食标记法(fecal tagging, FT)[13,16-17]. FT就是在检查前患者食物中加入少量钡剂或碘剂, 高密度对比剂和食物残渣混合有利于与病灶区分, 对>10 mm结肠息肉的检出敏感性和特异性分别达到100%和80%[18], 其息肉检出率和结肠镜一致[19]. 舒张结肠: 通过结肠内注入一定量的气体(空气或二氧化碳)形成对比并使肠腔舒张, 但会引起患者不适. CTC要求结肠充分舒张, 因此操作时请患者忍耐尽可能纳入多量气体. 通常感到不适时说明结肠已经舒张良好.

1.2 数据采集 多层螺旋CT(MSCT, 球管一次旋转就可获得4-64层断面图像)的使用显著降低曝光剂量, 改善CT断面图像质量和缩短扫描时间. MSCT可保证1次屏气采集到大范围的各向同性

■同行评价
本文研究了CT结肠成像在结肠癌防治中的应用, 结果真实可靠, 科学性强, 有很大的指导意义.

数据. 使用16层CT时, 取层厚0.75 mm, 螺距1.5, 扫描腹腔和盆腔需要15-20 s. 而采用64层螺旋CT, 腹腔和盆腔扫描一般少于10 s. 多数作者采用仰卧和俯卧位2个体位扫描, 可改变残渣、残液的位置, 便于区分息肉和残渣. 单体位扫描图像中部分肠管会被残渣、残液掩盖, 因此, 仰卧和俯卧位扫描提高了息肉的检出率, 但将增加辐射剂量.

1.3 辐射剂量 单层螺旋CT常规扫描有效剂量可达18 mSv[20], 通过增加螺距、层厚或降低峰值电压、mAs可减少辐射剂量. 由于气体与结肠壁的对比非常好, 因此降低曝光量并不会影响病灶的检出率. 最近的研究显示[21], 其有效剂量男性为1.8 mSv, 女性2.4 mSv而不影响病灶检出率.

1.4 图像分析 主要有二维(2D)和三维(3D)2种基本技术, 可以单独使用. 但因各自的优势, 结合2D和3D图像分析技术, 可更有效区分肠壁皱折、残渣和病灶, 其缺点是增加图像分析的时间.

2 结肠癌的影像学诊断

2.1 影像学表现 结肠癌原发病灶大体形态学表现分为溃疡型、浸润型和肿块型, 与结肠镜、手术结果一致. 溃疡型的CTC特征表现为肿瘤周边呈不规则的环行隆起或多结节状、凹凸起伏, 中心呈不规则凹陷, 中心区域较周边隆起略灰暗, 参考2D轴位、矢状位、冠状位可测量肿瘤大小及溃疡中心凹陷深度与溃疡口部宽径. 浸润型CTC可见环肠壁部分或全部生长的多结节形态不规则的肿块影, 肠腔明显狭窄, 部分呈细小间隙通过, 结合2D轴位、矢状位、冠状位图像可见肿瘤沿肠壁生长, 肠壁增厚侵及浆膜层. 肿块型在CTC腔内呈息肉状或无蒂菜花状突向腔内, 形态多不规则, 其中心密度较高, 而周缘呈环状暗带, 肿瘤周围可有散在的子结节. 借助CT 2D图像可观察结肠癌周围浸润、淋巴结肿大和远处转移等情况.

2.2 结肠癌分期 近年来随着CT设备的发展和软件的升级, 在结肠癌术前分期中的优势已很明显. 对照国际TNM分期法可综合观察肿瘤的原发灶(T)、淋巴结转移(N)和远处转移(M)情况. TNM分期法中, Tis: 原位癌, T1: 肿瘤位于黏膜下层, T2: 侵犯肌层, T3: 侵犯浆膜层或肠系膜脂肪, T4: 侵犯邻近器官. N0: 无局部淋巴结转移, N1: 转移淋巴结1-3个, N2: 转移淋巴结4个以上. M0: 无远处转移, M1: 远处转移. CT对肿瘤的肠壁浸润、肠腔周围淋巴结肿大以及腹部脏器转移等均有独到的应用价值, 但由于CT对结肠壁的3层结构较难显示, 也即在区分癌肿瘤浸润肠壁深度有一定的限度, CT对淋巴结转移的判定也有一定的难度. 因此, Filippone *et al*[22]根据TNM分期制定的CT诊断标准为: ≤T2: 结肠壁增厚, 外侧边缘光整, 周围脂肪层清晰; T3: 肿瘤呈圆形或结节状突起, 肿块突入邻近脏器间脂肪层; T4: 肿瘤向外浸润, 肿块与邻近脏器间脂肪层消失. N1: 至少1个长径>1 cm的1-2个淋巴结, 或任何大小的3个淋巴结; N2: 任何大小的3个以上淋巴结; N3: 长径>1 cm后腹膜多个肿大淋巴结. 该研究[22]对原发病灶的敏感性和特异性分别为88%和94%, 其诊断准确率分别是: ≤T2, 93%; T3, 90%; T4, 98% . 由于CTC尚不能分辨结肠的黏膜下层和肌层, 因此无法区分原发肿瘤的T1和T2期. 淋巴结转移的敏感性和特异性分别为: N0, 81%和90%; N1, 73%和87%; N2, 89%和94%. M: 远处转移, M0无远处转移, M1有远处转移. 远处转移以肝脏最多(75%), 其次是肺、肾上腺和骨骼等.

2.3 结肠癌梗阻性病变近端结肠的评价 结肠癌中约5%可同时出现两个以上病灶, 有时肿块引起梗阻妨碍内镜评价他近端的情况[23], CTC检查对评价同时性病灶所在的位置以及结肠周围情况十分有效. 另外, 对梗阻性癌肿、放射性狭窄病例均会妨碍结肠镜检. 有报道[23]结肠镜检失败病例CTC均可提供高质量图像以供研究, 但对于完全梗阻病例应慎用, 因为这种病例肠道清洁是禁忌症.

2.4 局限性 CTC诊断结肠癌具有较大的优越性, 但也存在一定的局限性. (1)不能观察黏膜的颜色改变, 缺乏组织特异性, 如除借助于轴位图像可以明确脂肪瘤的定性诊断外, 尚难对其他病变做定性诊断; (2)对浅表型的病变和黏膜下浸润为主的病变显示差; (3)影响病变检出的敏感性和准确性的干扰因素较多, 如肠道准备, 扫描参数等; (4)无法进行活检和治疗.

3 CTC结肠癌筛查

尽管存在争议, CTC筛查已有较多临床研究[24-26]. 结肠癌发病与下列因素有关: 结肠癌或大腺瘤样息肉患者(<60岁)的直系亲属, 肠炎性病变, 家族性腺瘤样息肉病或遗传性非息肉性大肠癌综合征以及腺瘤病前期或结肠癌前期病变等[27]. 文献报道的结肠癌筛查均针对结肠息肉, 而筛查

中直接发现结肠癌的情况尚未见报道, 因此, 结肠息肉的检测成为结肠癌防治工作的重要内容. 与DCBE和结肠镜对同样大小息肉检测比较, CT对>10 mm的息肉敏感性超过90%, 优于前两者[14,24]. 另1项研究显示[28], 大肠癌的CT敏感性是100%, >10 mm息肉是91%, 6-9 mm的是82%. 但并不是所有的研究对>10 mm息肉检测都有相似的敏感性. Fletcher *et al*[29]对180例>10 mm息肉检测敏感性是85%. 这一特点也出现在近来的多中心多层螺旋CT结肠成像和传统内镜的评价中, 该研究中总的CT结肠成像对>10 mm息肉的检出率仅为55%, 然而对于有CT结肠成像检查经验医生而言诊断息肉的敏感性接近90%, 但对于小息肉(<5 mm)敏感性略低.

对高危人群筛查的不同意见来自Cotton *et al*[30]的多中心研究, 该研究对703例高于平均危险因素人群的同一天CTC和结肠镜检查进行对照研究, 3位有经验的阅片医生对>10 mm的息肉检出率分别为34%, 32%和73%, 即使采取两人阅片的方法这些息肉的发现率也仅为63%. 这一研究结果受到较多放射和内镜学家们的质疑[31]. 随后的许多研究均认为, CTC对结肠息肉的检测有较高的敏感性[25-26]. 因此, CTC在高危人群的筛查中可能具有积极的意义.

总之, CT结肠成像随着软硬件技术的不断发展, 尤其是多层螺旋CT的使用, 其临床应用价值已愈来愈受到重视. CTC对结肠癌原发病灶、淋巴结转移和邻近脏器转移等的观察比传统的检查技术有明显优势, 对结肠癌术前分级有较高的准确率, 对高危人群的筛查有较高的敏感性. 因此, CTC有望成为结肠癌防治的重要检查方法.

4 参考文献

1 Chen K, Cai J, Liu XY, Ma XY, Yao KY, Zheng S. Nested case-control study on the risk factors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 99-103

2 Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 2006; 56: 106-130

3 Norfleet RG, Ryan ME, Wyman JB, Rhodes RA, Nunez JF, Kirchner JP, Parent K. Barium enema versus colonoscopy for patients with polyps found during flexible sigmoidoscopy. *Gastrointest Endosc* 1991; 37: 531-534

4 Detsky AS. Screening for colon cancer-can we afford colonoscopy? *N Engl J Med* 2001; 345: 607-608

5 Hara AK, Johnson CD, Reed JE, Ehman RL, Ilstrup DM. Colorectal polyp detection with CT colography: two- versus three-dimensional techniques. Work in progress. *Radiology* 1996; 200: 49-54

6 Beaulieu CF, Jeffrey RB Jr, Karadi C, Paik DS, Napel S. Display modes for CT colonography. Part II. Blinded comparison of axial CT and virtual endoscopic and panoramic endoscopic volume-rendered studies. *Radiology* 1999; 212: 203-212

7 Macari M, Bini EJ, Xue X, Milano A, Katz SS, Resnick D, Chandarana H, Krinsky G, Klingenbeck K, Marshall CH, Megibow AJ. Colorectal neoplasms: prospective comparison of thin-section low-dose multi-detector row CT colonography and conventional colonoscopy for detection. *Radiology* 2002; 224: 383-392

8 Iannaccone R, Laghi A, Catalano C, Mangiapane F, Lamazza A, Schillaci A, Sinibaldi G, Murakami T, Sammartino P, Hori M, Piacentini F, Nofroni I, Stipa V, Passariello R. Computed tomographic colonography without cathartic preparation for the detection of colorectal polyps. *Gastroenterology* 2004; 127: 1300-1311

9 Mainenti PP, Romano M, Imbriaco M, Camera L, Pace L, D'Antonio D, Bucci L, Galloro G, Salvatore M. Added value of CT colonography after a positive conventional colonoscopy: impact on treatment strategy. *Abdom Imaging* 2005; 30: 42-47

10 Yeshwant SC, Summers RM, Yao J, Brickman DS, Choi JR, Pickhardt PJ. Polyps: linear and volumetric measurement at CT colonography. *Radiology* 2006; 241: 802-811

11 Pickhardt PJ, Lehman VT, Winter TC, Taylor AJ. Polyp volume versus linear size measurements at CT colonography: implications for noninvasive surveillance of unresected colorectal lesions. *AJR Am J Roentgenol* 2006; 186: 1605-1610

12 Taylor SA, Halligan S, Slater A, Marshall M, Bartram CI. Comparison of radiologists' confidence in excluding significant colorectal neoplasia with multidetector-row CT colonography compared with double contrast barium enema. *Br J Radiol* 2006; 79: 208-215

13 Lefere PA, Gryspeerdt SS, Dewyspelaere J, Baekelandt M, Van Holsbeeck BG. Dietary fecal tagging as a cleansing method before CT colonography: initial results polyp detection and patient acceptance. *Radiology* 2002; 224: 393-403

14 Pickhardt PJ, Choi JR, Hwang I, Butler JA, Puckett ML, Hildebrandt HA, Wong RK, Nugent PA, Mysliwiec PA, Schindler WR. Computed tomographic virtual colonoscopy to screen for colorectal neoplasia in asymptomatic adults. *N Engl J Med* 2003; 349: 2191-2200

15 Macari M, Bini EJ, Jacobs SL, Lui YW, Laks S, Milano A, Babb J. Significance of missed polyps at CT colonography. *AJR Am J Roentgenol* 2004; 183: 127-134

16 Ganeshan A, Upponi S, Uberoi R, D'Costa H, Picking C, Bungay H. Minimal-preparation CT colon in detection of colonic cancer, the Oxford experience. *Age Ageing* 2006

17 Kealey SM, Dodd JD, MacEneaney PM, Gibney RG, Malone DE. Minimal preparation computed tomography instead of barium enema/colonoscopy for suspected colon cancer in frail elderly patients: an outcome analysis study. *Clin Radiol* 2004; 59: 44-52

18 Callstrom MR, Johnson CD, Fletcher JG, Reed JE,

Ahlquist DA, Harmsen WS, Tait K, Wilson LA, Corcoran KE. CT colonography without cathartic preparation: feasibility study. *Radiology* 2001; 219: 693-698
19 Zalis ME, Hahn PF. Digital subtraction bowel cleansing in CT colonography. *AJR Am J Roentgenol* 2001; 176: 646-648
20 Yee J, Akerkar GA, Hung RK, Steinauer-Gebauer AM, Wall SD, McQuaid KR. Colorectal neoplasia: performance characteristics of CT colonography for detection in 300 patients. *Radiology* 2001; 219: 685-692
21 van Gelder RE, Venema HW, Florie J, Nio CY, Serlie IW, Schutter MP, van Rijn JC, Vos FM, Glas AS, Bossuyt PM, Bartelsman JF, Lameris JS, Stoker J. CT colonography: feasibility of substantial dose reduction-comparison of medium to very low doses in identical patients. *Radiology* 2004; 232: 611-620
22 Filippone A, Ambrosini R, Fuschi M, Marinelli T, Genovesi D, Bonomo L. Preoperative T and N staging of colorectal cancer: accuracy of contrast-enhanced multi-detector row CT colonography-initial experience. *Radiology* 2004; 231: 83-90
23 Fenlon HM, McAneny DB, Nunes DP, Clarke PD, Ferrucci JT. Occlusive colon carcinoma: virtual colonoscopy in the preoperative evaluation of the proximal colon. *Radiology* 1999; 210: 423-428
24 Johnson CD, Dachman AH. CT colonography: the next colon screening examination? *Radiology* 2000; 216: 331-341
25 Summers RM, Yao J, Pickhardt PJ, Franaszek M, Bitter I, Brickman D, Krishna V, Choi JR. Computed tomographic virtual colonoscopy computer-aided polyp detection in a screening population. *Gastroenterology* 2005; 129: 1832-1844
26 Yasumoto T, Murakami T, Yamamoto H, Hori M, Iannaccone R, Kim T, Abe H, Kuwabara M, Yamasaki K, Kikkawa N, Arimoto H, Passariello R, Nakamura H. Assessment of two 3D MDCT colonography protocols for observation of colorectal polyps. *AJR Am J Roentgenol* 2006; 186: 85-89
27 Ransohoff DF, Sandler RS. Clinical practice. Screening for colorectal cancer. *N Engl J Med* 2002; 346: 40-44
28 Fenlon HM, Nunes DP, Schroy PC 3rd, Barish MA, Clarke PD, Ferrucci JT. A comparison of virtual and conventional colonoscopy for the detection of colorectal polyps. *N Engl J Med* 1999; 341: 1496-1503
29 Fletcher JG, Johnson CD, Welch TJ, MacCarty RL, Ahlquist DA, Reed JE, Harmsen WS, Wilson LA. Optimization of CT colonography technique: prospective trial in 180 patients. *Radiology* 2000; 216: 704-711
30 Cotton PB, Durkalski VL, Pineau BC, Palesch YY, Mauldin PD, Hoffman B, Vining DJ, Small WC, Affronti J, Rex D, Kopecky KK, Ackerman S, Burdick JS, Brewington C, Turner MA, Zfass A, Wright AR, Iyer RB, Lynch P, Sivak MV, Butler H. Computed tomographic colonography (virtual colonoscopy): a multicenter comparison with standard colonoscopy for detection of colorectal neoplasia. *JAMA* 2004; 291: 1713-1719
31 Ferrucci J, Barish M, Choi R, Dachman A, Fenlon H, Glick S, Laghi A, Macari M, Morrin M, Paulson E, Pickhardt PJ, Soto J, Yee J, Zalis M. Virtual colonoscopy. *JAMA* 2004; 292: 431-432

电编 张敏 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

中国学术期刊综合引证报告(2006)

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年2月18日; 15(5): 497-499
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

焦点论坛 HIGHLIGHT TOPIC

结直肠癌术前区域动脉灌注化疗的临床价值

袁建华

袁建华, 浙江省人民医院放射科 浙江省杭州市 310014
袁建华, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事放射学诊断和介入放射学研究.
通讯作者: 袁建华, 310014, 浙江省杭州市上塘路158号, 浙江省人民医院放射科. yjhhzzj@sina.com
电话: 0571-85893086 传真: 0571-85131448
收稿日期: 2006-11-22 接受日期: 2006-12-18

摘要

区域动脉灌注抗癌药物, 肿瘤组织中高浓度的抗癌药物高度抑制肿瘤细胞的活性, 最大限度的杀伤癌细胞, 除了提高肿瘤局部化疗药物浓度外, 较高浓度的化疗药经门静脉回流到肝脏, 对预防肝转移起到非常重要的作用. 结直肠经术前区域动脉灌注化疗, 肿瘤组织学疗效显著, 肿瘤细胞凋亡明显, 能提高手术根治切除率, 减少术后转移和复发, 提高长期生存率, 而且并发症少, 几无痛苦, 为一种微创和安全的治疗方法, 可以作为一种有效的结直肠癌综合治疗方案.

关键词: 区域动脉灌注化疗; 结直肠癌; 价值

袁建华. 结直肠癌术前区域动脉灌注化疗的临床价值. 世界华人消化杂志 2007;15(5):497-499
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/497.asp

0 引言

结直肠癌是我国常见恶性肿瘤, 在恶性肿瘤的发病中居第3位, 近年来有增加趋势. 早期大肠癌的预后较好, 根治切除的5 a生存率约为80%以上. 但临床上确诊为大肠癌时常为进展期, 约30%已发生转移[1], 手术根治率和生存率低. 经动脉灌注化疗药物治疗恶性肿瘤是近年来临床应用最广的介入治疗方法之一, 结直肠癌术前区域动脉灌注化疗(preoperative regional intra-arterial chemotherapy, PRAC)和手术联合应用已有许多报道. 我院自1992年以来开展结直肠癌PRAC, 术后12 d左右手术切除肿瘤, 对结直肠癌PRAC后组织学疗效、肿瘤细胞凋亡等进行了评介, 手术根治率和生存率有所提高.

1 区域动脉灌注化疗的概念和方法

传统的化疗为静脉化疗或口服化疗, 区域动脉灌注化疗是相对于全身化疗而言的一种化疗方法, 采用介入方法, 通过导管在肿瘤供血动脉内直接灌注化疗药, 药物直接经导管注入肿瘤供血动脉, 在到达肿瘤组织前, 抗癌药物与血浆蛋白结合率较经静脉给药要低得多, 而且, 经动脉灌注的抗癌药物浓度常常较静脉滴注要高得多. 许多抗癌药物的效价与药物浓度呈正比, 在一定浓度范围内, 抗癌药物浓度越高, 疗效越好. 同静脉化疗比较, 消化道肿瘤经区域动脉灌注抗癌药物, 肿瘤边缘抗癌药物浓度是全身化疗时的9-68倍[2]. 经区域动脉灌注抗癌药物, 肿瘤组织中高浓度的抗癌药物高度抑制肿瘤细胞的活性, 最大限度的杀伤癌细胞, 启动肿瘤细胞的凋亡机制. 根据肿瘤部位, 右半结肠癌采用肠系膜上动脉插管造影和经导管灌注化疗, 左半结肠癌采用肠系膜下动脉、直肠癌采用肠系膜下动脉及髂内动脉插管造影和经导管灌注化疗. 肿瘤供血动脉条件允许, 应尽可能将导管超选择性插入动脉分支. 常用化疗方案选用5-氟脲嘧啶0.75-1.0 g或脱氧核苷0.75-1.0 g; 丝裂霉素10 mg或阿霉素类抗癌药物30-40 mg; 顺铂类抗癌药物60-80 mg. 通常3组中各选1种联合灌注化疗, 每种药物稀释成50 mL, 0.5 h内灌注完毕. 近年来新的抗癌药物卡培他滨、依立替康、奥沙利铂等相继投入临床应用, 疗效有所提高.

2 动脉灌注化疗对肿瘤组织的影响

结直肠癌经区域动脉灌注化疗后, 病理检查表现为癌细胞不同程度的坏死、核变性、肿瘤血管血栓形成、间质纤维增生等, 说明动脉灌注抗癌药物治疗大肠癌疗效确切. 参照胃癌组织学疗效评定标准[3], 0级: 无效, 未见癌细胞和组织因治疗引起的变性坏死损害; Ⅰ级: 轻效, 2/3以下癌细胞发生变性坏死和溶解; Ⅱ级: 轻显效, 2/3以上癌细胞发生变性坏死和溶解; Ⅲ级: 显效, 癌细胞全部变性坏死和溶解或消失, 有时可见癌组织为肉芽组织或纤维组织所代替. 我院对其中50例结直肠癌介入治疗后进行了组织学疗效评定, 组织学疗效Ⅰ级20例, Ⅱ级21例, Ⅲ

■背景资料
恶性肿瘤的区域动脉灌注化疗疗效已得到临床广泛认可. 结直肠癌是我国常见的恶性肿瘤, 结直肠癌在术前通过区域动脉灌注化疗能提高手术根治切除率, 减少术后转移和复发, 从而提高生存率.

■研发前沿
国内外多家医院, 通过术前区域动脉灌注化疗, 观察结直肠癌肿瘤组织学改变、细胞凋亡、微血管密度、手术根治切除率, 但是, 化疗药物选择、药物浓度和药物灌注时间、是否超选择性肿瘤供血动脉插管或留置导管化疗、动脉灌注化疗和外科手术的最佳间隔时间、手术前的多次介入化疗能否进一步提高疗效, 如何采用规范的治疗方法等需要更多的研究.

级9例. 而且对病理分期Dukes A期、B期和C期各期均有效, 有效率达到100%, 不同分期之间疗效并无差异[4]. 邢安堂 *et al*[5]报道56例结肠癌PRAC后, 组织学疗效0级2例, Ⅰ级24例, Ⅱ级28例, Ⅲ级2例, 总有效率达96.4%. 肿瘤的发生、生长、转移与肿瘤新生血管的生成密切相关, 微血管的数量是估计实体肿瘤发展的重要生物学特性. 林清 *et al*[6]报道, 28例大肠癌PRAC后, 大肠癌组织中心、癌黏膜表面及癌旁组织的微血管密度与对照组比较, 癌黏膜表面的微血管密度明显降低, 差异有显著性.

3 动脉灌注化疗对细胞凋亡的影响

细胞凋亡是一种程序性细胞死亡, 是在基因严密控制下主动清除多余细胞或缺陷细胞的正常现象, 与肿瘤的发生、发展和治疗密切相关. 细胞凋亡的形态学和生化特征与细胞坏死不同, 表现为细胞核皱缩、失去细胞间连接、胞质浓集、胞核固缩、染色体边缘胞膜突起、缢断, 形成凋亡小体. 传统化疗药物治疗效果被认为是其对肿瘤细胞的直接杀伤作用, 近年来研究表明化疗药物还可通过诱导癌细胞凋亡来清除肿瘤细胞, 使肿瘤缩小或退变. 区域动脉灌注化疗诱导癌细胞凋亡是一持续过程, 由于介入化疗后凋亡细胞增加使肿瘤生长减慢而产生治疗作用[7]. p53基因在化疗药物诱导的癌细胞凋亡过程中发挥重要作用, 化疗药物可以阻碍DNA的合成, 通过p53基因而诱导癌细胞凋亡[8-9]. 介入化疗除了化疗药物产生小动脉炎、动脉血栓、引起血管周围癌组织病理性坏死外, 通过诱导肿瘤细胞凋亡, 使肿瘤缩小或退变. 残存肿瘤细胞的大量凋亡, 无疑对提高肿瘤手术根治率, 降低肿瘤复发和转移有积极的临床意义. 我院66例结直肠癌中, 22例介入治疗前肠镜活检标本的癌细胞凋亡细胞密度为31.47±5.58个/网格, 介入治疗后为76.69±17.12个/网格, 通过介入治疗癌组织细胞凋亡密度显著增加, 两者有显著性差异. 肿瘤细胞凋亡与组织学疗效对照, 组织学化疗反应越明显者, 肿瘤细胞凋亡也越明显[4]. 代志军 *et al*[10]对照45例直肠癌术前介入化疗患者和47例单纯手术治疗患者, 癌细胞凋亡指数术前介入化疗组明显高于单纯手术治疗组; 局部复发和肝转移发生率明显低于单纯手术治疗组; 术后5, 10 a生存率也显著高于单纯手术治疗组. 近来研究提示, 细胞凋亡的失控与肿瘤的发生、发展密切相关, 但我院大肠术后标本正常段肠黏膜的凋亡细胞密度明显低于结直肠癌的凋亡细胞密度. 孙保存 *et al*[11]观察32例大肠绒毛状腺瘤和33例大肠乳头状腺癌的凋亡细胞, 大肠腺癌和腺瘤的细胞凋亡密度均显著高于非肿瘤黏膜, 腺癌的细胞凋亡密度高于腺瘤的细胞凋亡密度, 与我院结果相类似. 所以, 癌组织的发生和发展是否与癌组织的凋亡减少有关尚不能做满意解释.

4 区域动脉灌注化疗对手术根治切除率、生存率的影响

结直肠癌手术前进行介入化疗的目的是期望提高手术根治切除率, 降低术后肿瘤转移和复发, 提高生存质量和生存率. 我院66例结直肠癌经介入化疗后, 手术根治58例, 根治率为87.9%, 我院同期结直肠癌单纯手术根治切除率仅为72.9%(70/96)[12]. 结直肠癌手术根治切除率的提高必然提高生存率, 本组获得随访结果的病例中, 1, 3和5 a生存率分别为95.1%, 71.1%和48.5%. 顾晋 *et al*[13]报道44例结直肠癌术前经区域动脉灌注化疗, 1, 3 a生存率分别为93.05%和71.80%, 同期单纯手术的1, 3 a生存率分别为80.78%和40.76%, 两组对比有明显差异. Braun *et al*[14]对107例晚期直肠癌患者作了回顾性研究, 其中52例术前动脉内联合化疗, 结果动脉内化疗组5 a生存率(64.76%)较单纯手术组(38.23%)明显提高. 大肠癌术前经导管区域动脉灌注化疗对提高手术根治切除率, 提高生存率确有积极的临床意义.

5 区域动脉灌注化疗对不同病理分期、不同组织学类型肿瘤的作用

我院66例结直肠癌, 不同病理分期的结直肠癌经过介入化疗均获得较好的组织学反应, 不同病理分期的组织学反应相互间无显著性差异. Dukes氏病理分期A, B, C各期的结直肠癌经过介入化疗, 肿瘤细胞均发生明显的凋亡, 不同病理分期肿瘤的细胞凋亡相互间无显著性差异[4], 说明经动脉灌注化疗, PRAC对不同病理分期的结直肠癌均有效, 除了对可以手术切除的大肠癌提高手术根治切除率、提高生存率外, 对不能手术根治切除的结直肠癌也不失为一种有效的姑息治疗手段. 顾晋 *et al*[13]对一组结直肠癌患者应用COX回归分析方法, 对所有患者的性别、年龄、肿瘤的大体类型、大小、生长方式、分化程度、Dukes分期以及是否行PRAC等

临床病理因素对患者生存的影响进行多因素风险分析, 结果发现患者的性别、年龄、肿瘤的病理类型、生长方式、分化程度对于患者的生存影响较小, 而是否行术前区域动脉灌注化疗和肿瘤分期对于患者的生存有明显影响.

肝脏是结直肠癌血行转移的重要靶器官, 约20%Ⅱ期和50%Ⅲ期的结直肠癌根治术后发生肝脏转移, 其中, 肝转移灶无法手术切除的患者中位生存期只有6.9 mo[15]. 而许多结直肠癌患者术前常常已经有肝脏转移. 结直肠癌区域动脉灌注的化疗药物除了提高肿瘤局部化疗药物浓度外, 较高浓度的化疗药经门静脉回流到肝脏, 对预防肝转移起到非常重要的作用. 许剑民 *et al*[16]将110例结直肠癌术前肝动脉联合区域动脉灌注化疗, 112例作为对照组, 随访提示, 术前肝动脉联合区域动脉灌注化疗组和对照组的3 a肝转移率分别为10.0%和19.6%; 3 a无瘤生存率、总生存率、中位生存期, 术前肝动脉联合区域动脉灌注化疗组均较对照组明显提高, 其中Ⅲ期的结直肠癌差异有显著性.

结直肠癌PRAC, 肿瘤组织学疗效显著, 肿瘤细胞凋亡明显, 能提高手术根治切除率, 减少术后转移和复发, 延长生存时间, 并发症少, 为一种微创和安全的治疗方法. 化疗药物选择、药物浓度和药物灌注时间、是否超选择性肿瘤供血动脉插管或留置导管化疗、动脉灌注化疗和外科手术的最佳间隔时间、手术前的多次介入化疗能否进一步提高疗效等, 值得进一步研究.

6 参考文献

1 Midgley R, Kerr D. Colorectal cancer. *Lancet* 1999; 353: 391-399
2 Maurer CA, Borner M, Bushler MW. Regional chemotherapy of gastro-intestinal cancer. *Dig Surg* 1997; 14: 9-22
3 中华人民共和国卫生部医政司. 中国常见恶性肿瘤诊治规范第四分册胃癌. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1991: 50-51
4 袁建华, 赵仲生, 胡庭扬, 茹国庆, 俞文强, 陈方宏, 罗祖炎, 毛颖民, 邓高里, 董全进, 屠世良. 经动脉导管化疗对大肠癌组织学疗效和细胞凋亡的影响. 中华放射学杂志 2003; 37: 1074-1077
5 邢安堂, 任宏, 吴放, 王荣, 陶勇博, 刘刚. 术前区域动脉灌注化疗对结直肠癌组织学疗效及预后的影响. 现代肿瘤医学 2006; 14: 969-971
6 林清, 李志霞, 张立军, 张树荣, 徐工学, 郭连瑞, 安大力. 术前动脉灌注化疗对大肠癌微血管密度的影响. 中华肿瘤杂志 2002; 24: 84-86
7 Wadler S. Systemic treatment of advanced colorectal cancer: Incorporating new agents into the therapeutic strategy. *Seminars Colo Rectal Surgery* 2002; 13: 269-276
8 Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-1462
9 Hannun YA. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood* 1997; 89: 1845-1853
10 代志军, 王西京, 高洁, 刘小旭, 郭新宇. 术前介入化疗对直肠癌细胞凋亡的影响. 消化外科 2005; 4: 357-359
11 孙保存, 张乃鑫, 赵秀兰, 惠京, 章明放, 王欣, 刘易欣. 大肠癌和腺瘤中的细胞凋亡及其调控基因表达. 中华病理学杂志 1997; 26: 137-140
12 袁建华, 赵仲生, 胡庭杨, 俞文强, 陈方宏, 罗祖炎, 茹国庆, 董全进, 屠世良. 介入联合手术综合治疗大肠癌的临床应用. 介入放射学杂志 2003; 12: 345-347
13 顾晋, 彭亦凡, 马朝来, 冷希圣, 王怡, 徐光炜. 手术前区域动脉灌注化疗治疗结肠直肠癌的远期疗效观察. 中华外科杂志 2002; 40: 404-406
14 Braun EM, Kikot VA, Ugrinov OG, Lishchishina EM. Neoadjuvant intra-arterial polychemotherapy of locally advanced rectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 1997; 23: 228-232
15 Takahashi Y. Gastrointestinal cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 2004; 31: 1275-1279
16 许剑民, 钟芸诗, 牛伟新, 任黎, 赖衍翰, 王建华, 颜志平, 程洁敏, 秦新裕. 术前肝动脉联合区域动脉灌注化疗预防结直肠癌术后肝转移. 中华医学杂志 2006; 86: 88-92

■同行评价

作者结合自己多年的研究, 并综合相关文献, 从基础研究和临床随访观察, 肯定了术前区域动脉灌注治疗结直肠癌的疗效, 是临床综合治疗结直肠癌可选择的有效手段, 具有很高的临床指导意义.

电编 张敏 编辑 张焕兰

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年2月18日; 15(5): 500-504
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

结肠癌羟基喜树碱耐药细胞SW1116/HCPT酵母双杂交cDNA文库的构建和鉴定

靳西凤, 冉志华, 陈 翔, 萧树东

■背景资料
肿瘤的多药耐药性(MDR)是一个十分复杂的生物学过程, 影响因素、参与机制众多, 也是造成化疗失败的重要原因. 为了更好的探讨MDR现象和机制, 本文构建了SW1116/HCPT细胞的酵母双杂交cDNA文库.

靳西凤, 冉志华, 陈翔, 萧树东, 上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所 上海市 200001
国家自然科学基金项目, No. 30670942
上海市科委重点实验室项目, No. 06DZ22027
通讯作者: 冉志华, 200001, 上海市, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化内科, 上海市消化疾病研究所. violetmoodee1210@126.com
电话: 021-63260930
收稿日期: 2006-10-31 接受日期: 2006-11-28

Construction and characterization of yeast two-hybrid cDNA library of hydroxycamptothecin-resistant human colon cancer cell line SW1116/HCPT in yeast cells

Xi-Feng Jin, Zhi-Hua Ran, Xiang Chen, Shu-Dong Xiao

Xi-Feng Jin, Zhi-Hua Ran, Xiang Chen, Shu-Dong Xiao, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University; Shanghai Institute of Digestive Diseases, Shanghai 200001, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30670942, and the Key Laboratory of Shanghai Municipal Commission of Science and Technology, No. 06DZ22027
Correspondence to: Zhi-Hua Ran, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University; Shanghai Institute of Digestive Diseases, Shanghai 20001, China. violetmoodee1210@126.com
Received: 2006-10-31 Accepted: 2006-11-28

Abstract

AIM: To construct a yeast two-hybrid cDNA library of hydroxycamptothecin-resistant human colon cancer cell line SW1116/HCPT in yeast cells.

METHODS: The total RNA of SW1116/HCPT cells was extracted using TRIzol method. Clontech SMART (switching mechanism at 5'end of RNA transcript) technique and homologous recombination mediated approach were used to construct cDNA library of SW1116/HCPT cells.

RESULTS: The ratio of A_{260} to A_{280} value of the extracted RNA was 1.98. A total of 3 bands (28S rRNA, 18S rRNA and 5S rRNA) were exhibited by agar gel electrophoresis, and the ratio of 28S rRNA and 18S rRNA was about 2. The ds cDNA smear in cDNA library was between 0.1-5 kb in length, with high expression at the 1-kb region. A total of (1.2-1.9)×10^6 recombinants were obtained from the cDNA library, and the recombination rate was 93.7%. The amplified polymerase chain reaction (PCR) fragments were between 0.2 and 5 kb in length.

CONCLUSION: The yeast two-hybrid cDNA library of SW1116/HCPT is successfully constructed by Clontech SMART technique in yeast cell.

Key Words: Yeast cell; Clontech SMART technique; Yeast two-hybrid cDNA library; Homologous recombination

Jin XF, Ran ZF, Chen X, Xiao SD. Construction and characterization of yeast two-hybrid cDNA library of hydroxycamptothecin-resistant human colon cancer cell line SW1116/HCPT in yeast cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(5):500-504

摘要

目的: 构建羟基喜树碱耐药结肠癌细胞株SW1116/HCPT细胞的酵母双杂交cDNA文库.

方法: 用TRIzol从SW1116/HCPT细胞提取总RNA, 采用CLONTECH SMART (switching mechanism at 5'end of RNA transcript)技术和同源重组(homologous recombination)的方法构建SW1116/HCPT细胞的cDNA文库.

结果: 提取的RNA的A_{260}/A_{280}为1.98, 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳示出28S rRNA、18S rRNA及5S rRNA 3条特异性带, 28S与18S带浓度及亮度比值约为2. 文库ds cDNA smear较长分布在0.1-5 kb, 成长瀑布条带, 而且在接近1 kb的区域有密集的带子, 为高丰度表达基因. 依据生长菌落计数, 共获得(1.2-1.9)×10^6个转化子, 重组率达93.7%, 文库插入片段大小为0.2-5 kb.

结论: 成功构建了SW1116/HCPT cDNA文库.

关键词: 酵母细胞; SMART技术; 酵母双杂交cDNA文库; 同源重组

靳西凤, 冉志华, 陈翔, 萧树东. 结肠癌羟基喜树碱耐药细胞SW1116/HCPT酵母双杂交cDNA文库的构建和鉴定. 世界华人消化杂志 2007;15(5):500-504
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/500.asp

0 引言

肿瘤的多药耐药性(multidrug resistance, MDR)是一个十分复杂的生物学过程, 影响因素、参与机制众多, 也是造成化疗失败的重要原因. 本研究组前期通过药物浓度递增诱导法, 建立了人结肠癌羟基喜树碱耐药细胞株(hydroxycamptothecin-resistant human colon cancer cell line SW1116/HCPT)[1]. 为了更好的探讨MDR现象和机制, 我们构建SW1116/HCPT细胞的酵母双杂交cDNA文库, 为进一步阐明羟基喜树碱耐药结肠癌细胞内的耐药蛋白之间的相互作用提供坚实的基础.

1 材料和方法

1.1 材料 HCPT耐药细胞株SW1116/HCPT为本课题组前期建立, cDNA文库构建试剂盒(含酵母菌AH109, 质粒pGADT7-Rec)购自Clontech公司. 其中含SMART ⅢTM Oligo寡核苷酸: 5'-AAGCAGT GGTATCA ACGCAG AGTGGCC ATTATGGCCGGG-3'; CDS Ⅲ 引物: 5'-ATTCTAGAGG CCGAGGCG GCCGACATG-d $(T)_{30}$VN-3'; LD-PCR上游引物: 5'-TTCCACCCAAGC AGTGGTAGAGGC CGAGGCGGCCGACA-3'和LD-PCR下游引物: 5'-GTATCGATGCCCACCCTCTAGAGGCCGA GGCGGCCGACA-3'. 文库扩增的上游引物5'-AGCAGTGGTATCAACGCAGAG-3'和下游引物: 5'-GCGGGGTTTTT CAGTATCTACGA-3'由上海生工合成. TRIzol购自Invitrogen公司. 酵母质粒抽提试剂盒购自Omega公司. 此外, YPDA培养基和SD/-Leu营养选择性培养基分别购自Oxford和Clontech公司.

1.2 方法

1.2.1 SW1116/HCPT细胞培养 用含100 mL/L胎牛血清的RPMI1640(Gibco BRL)完全培养液, 细胞置于含50 mL/L CO_2、950 mL/L空气的CO_2孵箱中, 在37℃、95%湿度条件下培养. 取对数生长期的细胞提取总RNA.

1.2.2 细胞总RNA提取 按照TRIzol提供的操作说明书进行, 提取的总RNA用30 μL DEPC水溶解. 从样品中取2 μL稀释成400 μL, 以DEPC水作对照, 在Ultraspec 2000型紫外/可见分光光度计上测定A_{260}和A_{280}比值, 另取2 μL样品进行甲醛变性琼脂糖凝胶电泳. 同时进行RNA保温试验以验证RNA溶液中有无RNA酶污染.

1.2.3 cDNA第一链的合成 在无菌的0.25 mL PCR薄壁管中加入1 μL 总RNA, 1.0 μL 10 μmol/L的CDSⅢ引物, 去离子水加至4 μL混匀, 稍离心, 72℃孵育2 min, 冰浴2 min. 轻轻混匀, 在室温下加入2.0 μL 第一链缓冲液, 1 μL 20 mmol/L DTT, 1.0 μL 10 mmol/L dNTP混合物, 1.0 μL的MMLV逆转录酶, 混匀, 稍离心, 42℃反应10 min, 加入1.0 μL 10 μmol/L SMART Ⅲ, 于42℃反应1 h. 75℃, 10 min终止第一链合成, 冷却至室温, 再加入1.0 μL RNase H, 37℃温育20 min, 以消化RNA.

1.2.4 LD-PCR合成 在无菌的0.5 mL PCR薄壁管中按操作说明书依次加入: 第一链cDNA, 无菌双蒸水, 10×Advantage 2 PCR 缓冲液, 10 μmol/L的50×dNTP, PCR上、下游引物, 10×GC-Melt Solution, 50×Advantage 2 polymerase Mix. 在PTC240型PCR仪上进行: 95℃ 30 s先变性后再进行95℃ 10 s, 68℃ 6 min(后一次循环的延伸时间在前一次循环时间上加5 s)二温度PCR反应, 共20个循环: 最后一循环68℃ 5 min. 取5 μL产物进行12 g/L琼脂糖凝胶电泳.

1.2.5 双链cDNA(ds cDNA)的纯化 纯化方法依照BD CHROMA SPINTM+T E-400 Columns (Clontech公司)说明书进行. 纯化柱颠倒数次以完全重悬凝胶基质, 纯化柱保持直立, 断去break-away端, 放入一灭菌的1.5 mL离心管中, 去掉顶盖. 1864 r/min离心5 min, 以平衡缓冲液, 重建基床, 纯化柱放入一新的1.5 mL离心管中, 将cDNA加到其内胶床平面的中心. 1864 r/min离心5 min, 离心管中即为纯化的ds cDNA.

1.2.6 AH109感受态的制备 PEG/LiAc法制备酵母感受态. 大致如下: 刮取少量酵母AH109贮存液接种于YPDA琼脂平板上, 30℃倒置培养直至克隆长出(2-3 d). 接种一个克隆(直径2-3 mm)于装有3 mL YPDA的15 mL无菌离心管中, 剧烈振荡以完全分散菌落, 30℃振荡孵育8 h. 将100 μL培养物转移到50 mL的YPDA培养基中, 30℃, 230-250 r/min振荡孵育16-20 h, 待A_{600}为0.15-0.3时, 室温1864 r/min离心5 min收获酵母. 弃上清, 重新悬浮沉淀于100 mL YPDA,

■相关报道
全长cDNA文库的构建是功能基因组研究的一种经济、快速、有效的途径, 目前国内外构建cDNA文库的方法主要有括Oligo-Capping, CAPture, SMART, CAP-trapper, CapSelect和CAPjumping等. 本文采用SMART技术构建cDNA文库, 节省了基因克隆和功能鉴定的时间, 同时也为后续的研究奠定了坚实的基础.

■创新盘点
本文在国内外首次构建了结肠癌羟基喜树碱耐药细胞cDNA文库, 目的是通过酵母双杂交技术寻找可能与耐药蛋白相关蛋白相互作用的蛋白质, 并探讨其作用方式.



图 1 RNA电泳图.

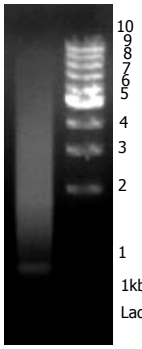


图 2 dsRNA电泳图.

30℃孵育3-5 h (A_{600}为0.4-0.5), 室温1864 r/min离心5 min. 弃上清, 重新悬浮沉淀于60 mL三蒸水, 室温1864 r/min离心5 min. 弃上清, 重新悬浮沉淀于3 mL 1.1×TE/LiAc溶液, 分装在两个1.5 mL离心管(每管1.5 mL), 高速离心15 s. 弃上清, 重新悬浮沉淀于600 μL 1.1×TE/LiAc溶液.

1.2.7 同源重组及转化 在7 mL离心管中加入ds cDNA (20 μL)、pGADT7- Rec (0.5 g/L 6 μL), 鲑鱼精DNA(取20 μL鲑鱼精DNA于离心管中100℃加热5 min, 置于冰上冷却, 在加样前重复几次, 使其变性彻底). 加入600 μL经上述处理的酵母AH109感受态细胞, 轻轻混匀. 加入2.5 mL PEG/LiAc溶液, 轻轻混匀, 30℃孵育45 min, 每15 min混匀一次. 加入160 μL DMSO, 混匀, 于42℃水浴20 min, 每10 min混匀一次. 1864 r/min离心5 min, 弃上清, 重新悬浮于3 mL YPD Plus溶液, 30℃振荡孵育90 min. 1864 r/min离心5 min, 弃上清, 重新悬浮于1 mL 9 g/L NaCl溶液. 然后分涂在10个直径为100 mm的SD/Leu选择性平板上. 30℃倒置培养3-6 d.

1.2.8 文库质粒DNA的评价 取共转化产物按1∶10、1∶100、1∶1000、1∶0000稀释, 分别涂100 μL稀释液至100 mm SD/-Leu平板, 30℃倒置培养3-6 d. 计数平板菌落. 依据公式计算转化效率: 克隆数目(cfu)×总转化混合物体积(μL)/稀释混合物涂板体积×稀释系数×转化所用质粒量(μg). 随机挑取16个生长在上述SD/-Leu平板上的克隆分别接种于5 mL SD/-Leu液体培养基中, 30℃振荡培养16 h, 直至培养物饱和. 使用Yeast Plasmid Mini Kit (Omega公司)提取质粒DNA, 用文库扩增引物扩增插入片段, 并计算重组率.

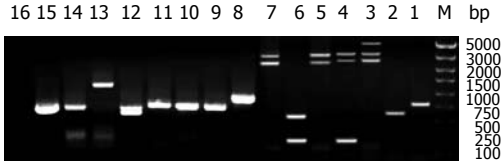


图 3 SW1116/HCPT cDNA文库质粒PCR扩增电泳结果. M: DNA 250 plus Marker; 1−16: cDNA文库质粒PCR扩增片段.

2 结果

2.1 SW1116/HCPT总RNA纯度及完整性分析 提取的RNA之A_{260}/A_{280}为1.98. 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳示, 28S rRNA、18S rRNA及5S rRNA 3条特异性带, 28S与18S带浓度及亮度比值约为2, 而且保温试验后RNA电泳结果如图1所示, 因此RNA质量较优可用于后续研究.

2.2 ds cDNA琼脂糖凝胶电泳 可见文库ds cDNA smear较长分布在0.1-5 kb, 成长瀑布条带, 而且在接近1 kb的区域有密集的带子, 为高丰度表达基因(图2).

2.3 文库质粒DNA评价 依据生长菌落计数, 共获得(1.2-1.9)×10^6个转化子. 从平板上随机挑取16个单克隆, 提取质粒, 用文库扩增引物扩增插入片段, 该文库的cDNA插入片段在0.2-5 kb之间, 其中泳道3, 4, 5, 7, 12有2或3条带子, 可能是挑取单克隆时菌落不纯所致, 亦可能是由于质粒中插入了不同的片段所致, 由菌落PCR推算得知重组率为93.7% (图3).

3 讨论

目前, 构建全长cDNA文库的方法主要有以下几种: Oligo-capping法[2], CAP ture法[3], SMART法[4-5], Cap-Select法[6], Cap-jumping法[7]以及Cap-trapper法[8]等. 所有的这些方法都着眼于真核生物mRNA 5'端的帽子结构, 但又各有其独到之处. 总的说来, cDNA文库构建大致经分离总RNA, 纯化mRNA, 反转录成cDNA, 然后与两端带有限制性酶切位点的人工接头相连接, 并将其插入到载体中, 转染大肠杆菌, 得到cDNA文库. 而本课题组直接选用SMART技术构建耐药细

胞株cDNA文库. Clontech公司提供的SMART[9]技术在构建cDNA文库时, 不需对总RNA中的mRNA进行分离纯化, 可以直接以微量的总RNA (50 ng)作为反转录的模板, 从而可避免因mRNA在分离纯化时的多步骤所造成mRNA的降解作用, 可以有效保证cDNA的完整性. 而且利用此方法所获得的cDNA全长比例较高.

在构建cDNA文库时, 将两端带有与线性穿梭表达质粒pGADT7-Rec (该质粒含L EU2筛选标志)两端相同序列的cDNA一起共转化酵母细胞, 即可在细胞内发生同源重组, 从而形成完整的环状文库质粒, 在相应的营养缺陷培养基中很容易筛选得到文库质粒. 与传统的cDNA文库构建方法相比, SMART方法省去了酶切、纯化、连接等环节, 减少了工作量, 提高了建库的效率. 但是, SMART方法也有其自身明显的缺点: PCR扩增具有偏性, 不利于长片段序列的扩增, 使得一些长片段全长基因丢失, 很难得到大于4 kb片段和低丰度全长基因, 造成了文库冗余性强. 另外一个缺点是: 寡聚脱氧鸟嘌呤核苷酸(dG)加尾效率低, 导致文库中基因信息丢失, 文库缺乏代表性. 因此, 人们采用Little-cycle SMART 和Large-size SMART这两种基于SMART改进的技术构建出质量较好的文库. Large-size SMART[10]在进行LD-PCR扩增合成ds cDNA前, 先将第一链产物按片段大小分出3-6个等级, 再分别PCR 扩增和克隆. 这样就避免了PCR 扩增和载体连接对片段大小产生偏爱性的缺点, 使长片段的基因也能得到等效扩增和克隆. 而Little-cycle SMART技术是将PCR循环数减少, 因此减小了PCR扩增对长片段的不利影响, 提高了克隆长片段全长基因的可能性, 使得文库的代表性大大提高[9].

酵母菌是遗传工程中用于表达真核细胞基因较理想的受体细胞, 用酵母菌作为受体菌克隆真核基因比大肠杆菌有许多优点, 因此本研究采用酵母细胞来构建cDNA文库. 利用其具有较高的同源重组酶活性, 且酵母细胞用LiAc处理后, 其转化效率大大提高, 酵母细胞往往具有不同的可用来筛选的表型标志(营养缺陷表型), 易于将转化子筛选. 而且, 酵母细胞没有质粒不相容性, 一次转化时几个具有相同复制起始点的质粒可以同时转入一个酵母细胞中[11]. 为后续的酵母双杂交技术筛选[12-14]目的蛋白奠定了坚实的基础. 哺乳动物细胞含有10 000-30 000种不同的mRNA. 按丰度可分为低丰度、中丰度和高丰度3种, 其中低丰度mRNA占总mRNA 30%左右, 每一细胞拥有的拷贝<14, 要克隆低丰度mRNA, 可按Clarke和Carbon公式[15]对文库大小进行估计: N = ln (1-P)/ln (1-1/n)(P为克隆到特定cDNA的概率, n为一种稀有mRNA在总mRNA中所占的比例, N = 所需克隆数), 若要求以99%概率得到一低丰度的克隆, 所需的文库克隆数为1.7×10^5. 我们所建文库已达到这一标准, 因此用此文库筛选目的基因是适当的, 可以用于后续研究.

肿瘤细胞的多药耐药性是造成化疗失败的主要原因, 各种耐药相关蛋白的表达和相互作用是肿瘤发生多药耐药现象的直接基础, 其确切机制尚不清楚. 本文构建SW1116/HCPT全长cDNA文库目的是利用酵母双杂交技术筛选与结肠癌羟基喜树碱耐药相关的蛋白质、探讨耐药蛋白质间的相互作用及其作用方式, 另外也可测表达序列标签ESTs (Expressed Sequcence Tags), 丰富SW1116/HCPT基因数据库, 同时也可以制作基因芯片.

■应用要点

SMART技术与经典的cDNA文库构建方法相比显然高效、快速、方便, 可直接以微量的总RNA (50 ng)作为反转录的模板, 从而可避免因mRNA在分离纯化时的多步骤所造成mRNA的降解作用, 可以有效保证cDNA的完整性. 同时, 此方法所获得的cDNA全长比例较高, 因此应用价值也较大.

4 参考文献

1 邹建, 冉志华, 黄美兰, 萧树东. 人结肠癌羟基喜树碱耐药细胞株SW1116/HCPT的建立与构建. 胃肠病学 2006; 11: 327-331

2 Maruyama K, Sugano S. Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides. *Gene* 1994; 138: 171-174

3 Edery I, Chu LL, Sonenberg N, Pelletier J. An efficient strategy to isolate full-length cDNAs based on an mRNA cap retention procedure (CAPture). *Mol Cell Biol* 1995; 15: 3363-3371

4 Chenchik A, Moqadam F, Siebert P. A Laboratory Guide to RNA: Isolation, Analysis and Synthesis. New York: Wiley-Liss, 1996: 273-321

5 Du XJ, Wang JX, Liu N, Zhao XF, Li FH, Xiang JH. Identification and molecular characterization of a peritrophin-like protein from fleshy prawn (Fenneropenaeus chinensis). *Mol Immunol* 2006; 43: 1633-1644

6 Schmidt WM, Mueller MW. CapSelect: a highly sensitive method for 5' CAP-dependent enrichment of full-length cDNA in PCR-mediated analysis of mRNAs. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: e31

7 Efimov VA, Chakhmakhcheva OG, Archdeacon J, Fernandez JM, Fedorkin ON, Dorokhov YL, Atabekov JG. Detection of the 5'-cap structure of messenger RNAs with the use of the cap-jumping approach. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 4751-4759

8 Carninci P, Kvam C, Kitamura A, Ohsumi T, Okazaki Y, Itoh M, Kamiya M, Shibata K, Sasaki N, Izawa M, Muramatsu M, Hayashizaki Y, Schneider C. High-efficiency full-length cDNA cloning by biotinylated CAP trapper. *Genomics* 1996; 37: 327-336

9 Zhu YY, Machleder EM, Chenchik A, Li R, Siebert

■同行评价
本文在前期工作的基础上, 构建SW1116/HCPT细胞的酵母双杂交cDNA文库, 为进一步阐明羟基喜树碱耐药结肠癌细胞内的耐药蛋白之间的相互作用提供试验基础, 条理分明, 结论明确, 实验证据充足, 具有一定的科学意义.

PD. Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction. *Biotechniques* 2001; 30: 892-897
10 Wellenreuther R, Schupp I, Poustka A, Wiemann S. SMART amplification combined with cDNA size fractionation in order to obtain large full-length clones. *BMC Genomics* 2004; 5: 36
11 黄功华, 梁景耀, 刘新光, 梁念慈. 酵母细胞中构建HL-60细胞的酵母双杂交cDNA文库. 广东医学院学报 2004; 1: 1-3
12 张黎颖, 成军, 邓红, 郭江, 郭风劲, 王巧侠. 酵母双杂交技术筛选白细胞cDNA文库中新基因NS2TP蛋白结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1688-1691
13 Huang YP, Zhang SL, Cheng J, Wang L, Guo J, Liu Y, Yang Y, Zhang LY, Bai GQ, Gao XS, Ji D, Lin SM, Zhong YW, Shao Q. Screening of genes of proteins interacting with p7 protein of hepatitis C virus from human liver cDNA library by yeast two-hybrid system. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4709-4714
14 刘敏, 王琳, 成军, 张树林, 邵清, 张健, 杨倩, 董菁. 应用酵母双杂交技术筛选肝细胞cDNA文库中乙型肝炎病毒前-X蛋白结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2004; 12: 790-793
15 Clarke L, Carbon J. A colony bank containing synthetic Col El hybrid plasmids representative of the entire E. coli genome. *Cell* 1976; 9: 91-99

电编 李琪 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

第十九届全国中西医结合消化会议征文通知

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

1 征文内容和要求

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

2 学习班招收对象

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

3 联系方式

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年2月18日; 15(5): 505-508
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

荆花胃康胶丸对大鼠胃黏膜的保护机制

朱国琴, 施瑞华, 沈 健, 周清清, 郝 波

朱国琴, 施瑞华, 沈健, 周清清, 郝波, 南京医科大学第一附属医院消化科 江苏省南京市 210029
通讯作者: 施瑞华, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院消化科. ruihuashi@126.com
电话: 025-83718836-6032
收稿日期: 2006-11-06 接受日期: 2006-12-08

Protective effect of Jinghua Weikang Jiaowan on gastric mucosa of rats and its mechanism

Guo-Qin Zhu, Rui-Hua Shi, Jian Shen, Qing-Qing Zhou, Bo Hao

Guo-Qin Zhu, Rui-Hua Shi, Jian Shen, Qing-Qing Zhou, Bo Hao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Correspondening to: Rui-Hua Shi, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. ruihuashi@126.com
Received: 2006-11-06 Accepted: 2006-12-08

Abstract

AIM: To explore the preventive and therapeutic effects of Jinghua Weikang Jiaowan (JWJ) on ethanol-induced acute gastric mucosal injury and the related mechanisms.

METHODS: Eighty-four rats were averagely randomized into 7 groups: null control group (Ⅰ), prevention group (Ⅱ), treatment control group (Ⅲa), talcid treatment group (Ⅲb group), JWJ treatment groups (treated with 10, 20, and 30 mg/kg; named as Ⅲc, Ⅲd, Ⅲe, respectively). After 1, 3 and 7 days, the rats were killed to measure the injury index and the tissue contents of prostaglandin E_2 (PGE_2) and epidermal growth factor (EGF). Histological changes were observed at the same time.

RESULTS: JWJ resisted gastric mucosal injury and increased the tissue contents of PGE_2 and EGF in dose- and time-dependent manners ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). The inflammatory degree was obviously alleviated in group Ⅲb, Ⅲc, Ⅲd, and Ⅲe than that in group Ⅲa. Besides, the swelling and degeneration of mucosal cells were relieved and the number of inflammatory cells was decreased. The contents of mucosal PGE_2 (3 d: 190.73 ± 12.20 pg/g *vs* 158.46 ± 11.44 pg/g, $P < 0.05$), EGF (3 d: 5.60 ± 0.46 ng/g *vs* 4.56 ± 0.70 ng/g, $P < 0.05$), and the ethanol-induced injury index (3 d: 10.50 ± 2.08 *vs* 18.25 ± 1.50, $P < 0.05$) were significantly decreased in group Ⅱ as compared with those in group Ⅲ(the same concentration as pretreatment).

CONCLUSION: JWJ can prevent and resist gastric mucosa against injury by increasing the contents of PGE_2 and EGF in gastric mucosa.

Key Words: Jinghua Weikang Jiaowan, Gastric mucosal injury; Prostaglandin E_2, Epidermal growth factor

Zhu GQ, Shi RH, Shen J, Zhou QQ, Hao B. Protective effect of Jinghua Weikang Jiaowan on gastric mucosa of rats and its mechanism. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(5):505-508

摘要

目的: 研究中药制剂荆花胃康胶丸对大鼠乙醇性急性胃黏膜损伤的预防和治疗作用并探讨其作用机制.

方法: 将84只SD大鼠随机分为7组, 每组12只. Ⅰ组为空白对照组, Ⅱ组为预防组, Ⅲa组为治疗对照组, Ⅲb为达喜对照组, Ⅲc, Ⅲd, Ⅲe分别为荆花胃康胶丸10, 20, 30 mg/(kg•d)治疗组. 于治疗1, 3, 7 d分别处死大鼠, 检测黏膜损伤指数, 刮取胃黏膜测定组织中前列腺素E_2(PGE_2)和表皮生长因子(EGF)的含量, 并作组织学观察.

结果: 荆花胃康胶丸的不同剂量组可不同程度的减轻无水乙醇对大鼠胃黏膜的损伤($P<0.05$, $P<0.01$), 增加组织中PGE_2和EGF的含量($P<0.05$, $P<0.01$), 效应与剂量及治疗时间成正比. 达喜及荆花胃康胶丸治疗组在治疗同一时间段的黏膜炎症程度明显轻于Ⅲa组, 黏膜细胞水肿、变性减轻, 炎性细胞减少. 同时预先给予一定剂量的荆花胃康胶丸与同样浓度

■背景资料
胃黏膜损伤是最常见的消化道疾病之一, 中医中药在治疗胃黏膜损伤方面具有独特的疗效, 但绝多数机制都不明确. 本文主要通过胃黏膜损伤的大鼠模型研究荆花胃康胶丸治疗胃黏膜损伤的相关机制, 利用测定局部血流调控和黏膜修复相关因子在治疗过程中的含量变化分析可能治疗机制, 这将有助于认识该中药复杂的治疗效应, 为改进剂型和成分提供帮助.

■同行评价
本文探讨了中药荆花胃康胶丸对大鼠胃黏膜的保护机制, 实验目的明确, 结论对临床有些帮助, 但方法比较简单.

的治疗组相比, 能明显增加黏膜中PGE_2(3 d: 190.73±12.20 pg/g *vs* 158.46±11.44 pg/g; P<0.05)和EGF(3 d: 5.60±0.46 ng/g *vs* 4.56±0.70 ng/g, P<0.05)的含量, 减轻无水乙醇对大鼠胃黏膜的损伤程度(3 d: 10.50±2.08 *vs*18.25±1.50, P<0.05).

结论: 荆花胃康胶丸对乙醇所致大鼠急性胃黏膜损伤有预防及修复治疗作用, 其作用机制可能与增加胃黏膜中PGE_2和EGF有关.

关键词: 荆花胃康胶丸; 胃黏膜损伤; 前列腺素E_2; 表皮生长因子

朱国琴, 施瑞华, 沈健, 周清清, 郝波. 荆花胃康胶丸对大鼠胃黏膜的保护机制. 世界华人消化杂志 2007;15(5):505-508
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/505.asp

0 引言

荆花胃康胶丸是在经典验方的基础上, 以现代医学理论为指导, 研制开发的一种新型中药. 该药由土荆芥和水团花组成. 已有文献[1]表明荆花胃康胶丸对急慢性胃炎、消化性溃疡有较好的治疗效果, 但关于其对胃黏膜保护、修复的机制方面的研究还少有报道. 高浓度乙醇可直接腐蚀胃黏膜组织, 引起胃黏膜急性炎症,黏膜出现充血、水肿、出血、糜烂及溃疡形成等[2]. 本研究通过建立无水乙醇所致大鼠急性胃黏膜损伤模型, 探讨中药荆花胃康胶丸对损伤大鼠胃黏膜的修复作用及其保护机制.

1 材料和方法

1.1 材料 由上海实验动物中心提供的Sprague Dawley大鼠84只, 体质量180-210(平均198) g, ♂♀各半, 清洁级. 荆花胃康胶丸(天津天士力制药股份有限公司提供), 80 mg/粒, 配成1, 2, 3 g/L 3种浓度, 达喜(拜耳医药保健有限公司提供), 500 mg/粒, 配成10 g/L浓度, 表皮生长因子(EGF)放免试剂盒(北京华英生物技术研究所), 前列腺素E_2(PGE_2)放免试剂盒(北京北方生物技术研究所), 无水乙醇、氯化钠(南京化学试剂有限公司), Tris-base(美国R&D公司提供), 蔗糖(上海化学试剂有限公司), EDTA-2Na(南京Sunshine公司). 玻璃匀浆器, 华利达WH-861Vortex Shaker, AnkeTGL-16B系列离心机, SCIENTZ JY96-II超声波细胞粉碎机, DHAUS Adventure电子天平, ZEISS荧光显微镜.

1.2 方法 大鼠禁食24 h(期间可自由饮水)后, 以无水乙醇1 mL/只灌胃[3], 1 h后即建立起急性胃黏膜损伤模型. 84只SD大鼠随机分为7组, 每组12只. Ⅰ组为空白对照组, 每次灌以1 mL的生理盐水. Ⅱ组为预防组, 给2 g/L荆花胃康胶丸1 mL, 每天上下午各一次, 给药3 d后给无水乙醇1 mL/只灌胃, 后用药同Ⅲd组. Ⅲ组为治疗组, 急性胃黏膜损伤模型建立后分为5个亚组：Ⅲa组为治疗空白对照组, 即给予等容量的生理盐水; Ⅲb组为达喜治疗组, 给10 g/L的达喜1 mL, 每天上下午给一次; Ⅲc为荆花胃康胶丸10 mg/(kg•d)治疗组, 给予1 g/L荆花胃康胶丸1 mL; Ⅲd为荆花胃康胶丸20 mg/(kg•d)治疗组, 给予2 g/L荆花胃康胶丸1 mL; Ⅲe为荆花胃康胶丸30 mg/(kg•d)治疗组, 给予3 g/L荆花胃康胶丸1 mL. 以上给药均为每天上下午各一次.

预防组大鼠分别于给予无水乙醇后用药第1, 3, 7天拉颈处死, 每次各5只. 其他组大鼠亦分别于用药第1, 3, 7天拉颈处死, 每次每组各5只. 剖腹后切下全胃, 沿胃大弯剪开, 用冰PBS缓冲液轻轻冲洗胃黏膜表面的污物, 继而将胃平铺在冰块上, 用滤纸吸干、除净胃黏膜表面的黏液等. 肉眼观察各组大鼠胃黏膜变化, 按Guth标准[4]评定损伤指数(UI), 点状糜烂1分, <1 mm 2分, 1-2 mm 3分, 3-4 mm 4分, >4 mm 5分. 剪取1小块胃黏膜组织固定于甲醛溶液中, 制成石蜡切片供组织学观察, HE染色, 电镜下观察评定黏膜炎症程度. 刮取胃黏膜组织, -70℃低温冷冻保存, 采用放免法测定表皮生长因子(EGF)、前列腺素E_2(PGE_2)用.

统计学处理 数据以mean±SD表示, 组间差异比较采用t检验, P<0.05表示差异有显著性.

2 结果

2.1 损伤指数变化 乙醇致大鼠胃黏膜损伤后UI显著升高, 荆花胃康胶丸预防、治疗均不同程度地减低UI (表1).

2.2 胃黏膜刮取物各项指标的变化 各组胃黏膜刮取物重量无显著差异(P>0.05). 无水乙醇致大鼠胃黏膜损伤后, PGE_2和EGF含量显著下降, 荆花胃康胶丸和达喜治疗后均使其含量升高(表1).

2.3 组织病理学结果 治疗对照组大鼠胃黏膜出血、充血明显, 灶性胃黏膜上皮脱落、糜烂, 失去完整性和连续性, 表面有渗出物覆盖, 有炎性细胞浸润, 浆膜充血、淤血明显; 荆花胃康胶丸组细胞水肿、变性、出血、淤血减轻, 炎性细胞减少, 尤其是大剂量组, 除个别黏膜表层有浅层糜烂和充血外, 其余黏膜及黏膜下层基本正

表 1 各组大鼠不同用药时间后胃黏膜UI, PGE_2, EGF的变化(mean ± SD)

分组	损伤指数(UI)			PGE_2含量(ng/kg)			EGF(μg/kg)		
	1 d	3 d	7 d	1 d	3 d	7 d	1 d	3 d	7 d
Ⅰ	0.50 ± 0.58	0.25 ± 1.32	0.75 ± 1.63	253.29 ± 9.40	256.50 ± 15.09	254.25 ± 21.99	6.45 ± 0.56	6.35 ± 0.76	6.40 ± 0.69
Ⅱ	20.25 ± 3.30[e]	10.50 ± 2.08[e]	1.75 ± 1.71	151.71 ± 9.51[e]	190.73 ± 12.20[e]	241.42 ± 10.45	4.08 ± 0.44[e]	5.60 ± 0.46[e]	6.12 ± 0.50
Ⅲa	57.50 ± 3.69	36.25 ± 2.22	6.50 ± 2.65	35.46 ± 5.59	98.38 ± 8.68	174.44 ± 9.67	1.17 ± 0.24	2.47 ± 0.66	4.13 ± 0.70
Ⅲb	31.50 ± 4.51[b]	19.25 ± 1.29[b]	2.50 ± 1.26[a]	105.66 ± 15.91[bd]	162.30 ± 11.68[bd]	221.35 ± 7.96[b]	2.98 ± 1.09[ad]	4.71 ± 0.86[ac]	5.89 ± 0.83[b]
Ⅲc	42.50 ± 2.38[b]	25.75 ± 0.96[b]	3.00 ± 0.82[a]	76.15 ± 7.02[bd]	132.62 ± 5.99[bd]	203.42 ± 8.05[bc]	2.14 ± 0.49[ad]	3.83 ± 0.74[ad]	5.66 ± 0.95[a]
Ⅲd	34.25 ± 2.63[b]	18.25 ± 1.50[b]	2.75 ± 0.50[a]	102.56 ± 14.22[bd]	158.46 ± 11.44[bd]	226.35 ± 12.35[b]	2.84 ± 0.87[ad]	4.56 ± 0.70[ad]	5.91 ± 0.62[b]
Ⅲe	26.25 ± 1.26[b]	13.75 ± 1.71[b]	2.00 ± 2.16[a]	143.03 ± 6.53[bd]	191.33 ± 8.62[bd]	224.81 ± 11.76[b]	4.03 ± 0.30[bd]	5.57 ± 0.77[b]	6.09 ± 0.51[b]

[a]P<0.05, [b]P<0.01 *vs* Ⅲa组(治疗对照组); [c]P<0.05, [d]P<0.01 *vs* Ⅰ组; [e]P<0.05 *vs* Ⅲd组; 治疗1, 3, 7 d Ⅲc, Ⅲd, Ⅲe各组间两两比较均有显著性差异.

常, 未见明显出血、炎症等改变; 达喜阳性对照组与中等剂量组基本相同; 正常组胃黏膜层、固有层、肌层结构完整清晰、依次排列, 腺体排列紧密, 无炎性细胞浸润, 未见明显异常.

3 讨论

众所周知, 胃黏膜屏障的破坏、黏膜损伤及溃疡形成是由于损害因素和防御因素的失衡, 而胃黏膜自身对损伤因素具有很强的防御功能, 其防御因素通常包括黏液-碳酸氢盐屏障、黏膜血流、诸多的胃肠道激素(如PGE_2, EGF等)和适应性细胞保护作用等. 近年来内源性前列腺素[5]在增强胃黏膜防御功能方面的作用受到广泛重视. 前列腺素可由多种细胞分泌, 被认为是一种局部激素, 其不仅有抑制胃酸分泌的作用, 更主要是对胃黏膜有保护作用. 前列腺素的保护机制[6-8]包括：(1)增加胃黏膜血流; (2)促进胃黏液和碳酸氢根的分泌; (3)刺激胃基地细胞向表面迁移, 促进细胞更新, 加快胃黏膜修复; (4)提高胃黏膜磷脂含量, 防止水溶性攻击因子对黏膜的损害; (5)可介导适应性细胞保护作用. EGF[9-10]是由53个氨基酸残基组成的小分子多肽类生长因子, 其能抑制胃酸、胃蛋白酶的分泌及其对黏膜的破坏作用; 能增加胃黏膜黏液及糖蛋白的合成和分泌, 还能刺激RNA和DNA的合成从而介导其对胃黏膜营养、保护、促进上皮修复的作用. 他通过与其受体EGFR结合, 发挥以上作用[11-12]. 另外EGF可以刺激多种其他细胞保护因子如PGs、巯基化合物等的释放, 共同发挥其细胞保护作用.

荆花胃康胶丸[13]是从土荆芥和水团花中提取的挥发油按一定比例组成的复方制剂, 土荆芥具有健胃止痛作用, 水团花有清热利湿、散寒化淤功效, 是一种治疗消化性溃疡及慢性浅表性胃炎的新型中成药. 临床研究表明其对慢性胃炎和消化性溃疡有很好的疗效, 对胃炎临床症状的总体改善在用药7 d可达78.9%, 用药14 d达95.8%[14], 治疗4 wk十二指肠溃疡愈合率达83.7%[15]. 本实验表明, 乙醇所致大鼠胃黏膜损伤后, 组织中PGE_2和EGF明显减少, 而荆花胃康胶丸治疗组的PGE_2和EGF显著增加, 胃黏膜损伤指数亦明显低于治疗对照组, 提示荆花胃康胶丸对乙醇所造成的大鼠胃黏膜损伤有较好的修复作用. 其机制可能与增加PGE_2和EGF有关, 从而抑制胃酸分泌, 增加胃黏膜血流量, 刺激胃黏液和碳酸氢根的分泌, 进而促进上皮修复. 并且随荆花胃康胶丸浓度的增加, 黏膜修复更快. 与达喜相比, 中等浓度的荆花胃康胶丸[20 mg/(kg•d)]即能达到达喜的治疗效果, 而30 mg/(kg•d)剂量组的荆花胃康胶丸治疗效果明显优于达喜. 另外, 在乙醇损伤胃黏膜之前, 预先给予一定浓度的荆花胃康胶丸, 与同等浓度、相同时间的治疗组相比, 损伤程度又有明显的降低. 同时病理组织学检查亦显示荆花胃康胶丸治疗组为黏膜的炎症及损伤程度较治疗对照组轻微. 以上结果提示, 荆花胃康胶丸对乙醇所致的大鼠胃黏膜损伤有明显的预防和治疗作用, 且高浓度的治疗效果优于达喜组. 故考虑荆花胃康胶丸对乙醇所致大鼠急性胃黏膜损伤

的预防和治疗作用是通过增加胃黏膜前列腺素和EGF的含量来实现的.

4 参考文献

1 梁浩, 徐红, 刘凡, 杨德胜. 荆花胃康胶丸治疗慢性上消化道疾病85例. 中国新药杂志 2001; 10: 226-227
2 何绍珍, 任建林. 乙醇对胃黏膜作用机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2591-2596
3 邵润轩, 郭宏华, 周长玉, 孙文伟. 无水乙醇引起大鼠急性胃黏膜损伤的机理研究. 白求恩医科大学学报 1998; 24: 133-134
4 Guth PH, Aures D, Paulsen G. Topical aspirin plus HCl gastric lesions in the rat. Cytoprotective effect of prostaglandin, cimetidine, and probanthine. *Gastroenterology* 1979; 76: 88-93
5 Cryer B. Mucosal defense and repair. Role of prostaglandins in the stomach and duodenum. *Gastroenterol Clin North Am* 2001; 30: 877-894
6 陈建民, 任建林. 胃黏膜保护剂临床应用进展. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2620-2622
7 Zhang LH, Yao CB, Gao MQ, Li HQ. Gastric mucosal injury due to hemorrhagic reperfusion and efficacy of Salvia miltiorrhizae extract F and cimetidine. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2830-2833
8 Gyires K. Gastric mucosal protection: from prostaglandins to gene-therapy. *Curr Med Chem* 2005; 12: 203-215
9 Yi SX, Yang RD, Yan J, Chang XR, Ling YP. Effect of electro-acupuncture at Foot-Yangming Meridian on somatostatin and expression of somatostatin receptor genes in rabbits with gastric ulcer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1761-1765
10 Barnard J. Epidermal growth factor receptor blockade: an emerging therapeutic modality in gastroenterology. *Gastroenterology* 2001; 120: 1872-1874
11 Okabe S, Amagase K. An overview of acetic acid ulcer models--the history and state of the art of peptic ulcer research. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 1321-1341
12 谭永港, 舒晴, 邱猛进, 张永峰. 表皮生长因子及其受体mRNA在胃溃疡发生与愈合过程中的表达. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1768-1770
13 李忠祥, 常明. 消化性溃疡良药–荆花胃康胶丸概述. 中国新药杂志 2001; 10: 227-228
14 姜慧卿, 张瑞星, 吕晓萍 刘改芳. 荆花胃康胶丸治疗慢性胃炎的临床观察. 天津医药 2004; 16: 31-33
15 吴敏. 荆花胃康胶丸治疗十二指肠溃疡86例疗效观察. 福建医药杂志 2005; 27: 176-177

电编 李琪 编辑 张焕兰

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》简介

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年2月18日; 15(5): 509-512
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

肠内生态营养对创伤后大鼠肠屏障功能的影响

余利坚, 徐 亮, 姚 晖, 魏仁志, 綦晓龙

余利坚, 泸州市人民医院普外科 四川省泸州市 646000
徐亮, 姚晖, 魏仁志, 綦晓龙, 泸州医学院附属医院胃肠外科 四川省泸州市 646000
通讯作者: 徐亮, 646000, 四川省泸州市, 泸州医学院附属医院胃肠外科. yulijianyouxiang@sina.com
电话: 0830-2392712-5448 传真: 0830-2392718
收稿日期: 2006-11-28 接受日期: 2006-12-18

Effects of enteral econutrition on intestinal mucosal barrier function in wounded rats

Li-Jian Yu, Liang Xu, Hui Yao, Ren-Zhi Wei, Xiao-Long Qi

Li-Jian Yu, Department of General Surgery, Luzhou People's Hospital, Luzhou 646000, Sichuan Province, China
Liang Xu, Hui Yao, Ren-Zhi Wei, Xiao-Long Qi, Department of Gastrointestinal Surgery, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China
Correspondence to: Liang Xu, Department of Gastrointestinal Surgery, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. yulijianyouxiang@sina.com
Received: 2006-11-28 Accepted: 2006-12-18

Abstract

AIM: To study effects of enteral econutrition on the function of intestinal mucosal barrier in wounded rats.

METHODS: A total of 30 Wistar rats were randomly and averagely divided into 3 groups, which received common forage (CF), enteral nutrition (EN) and enteral econutrition (EEN), respectively, for 7 days. The ileal membrane morphology and the numbers of IgA^+, $CD3^+$, $CD4^+$ and $CD8^+$ cells were examined.

RESULTS: The villus height (205.4 μm *vs* 177.7 μm, $P < 0.05$), crypt depth (99.4 μm *vs* 77.7 μm, $P < 0.05$), mucosal thickness (299.9 μm *vs* 267.0 μm, $P < 0.05$) and villus surface area (10 321.5 μm^2 *vs* 8927.6 μm^2, $P < 0.05$) of ileum were increased in EEN group as compared with those in control group, but there was no significance between EN and EEN group ($P > 0.05$). The quantities of IgA^+ (21.2 *vs* 17.5, 19.4, $P < 0.05$), $CD3^+$ (24.2 *vs* 20.2, 22.1, $P < 0.05$), $CD4^+$ (13.4 *vs* 8.9, 11.0, $P < 0.05$) and $CD8^+$ (18.7 *vs* 12.6, 15.4, $P < 0.05$) cells were increased in EEN group as compared with those in control and EN group ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Enteral econutrition can restore and improve the function of intestinal mucosal barrier in wounded rat.

Key Words: Enteral nutrition; Econutrition; Intestinal mucosal barrier; Wistar rat

Yu LJ, Xu L, Yao H, Wei RZ, Qi XL. Effects of enteral econutrition on intestinal mucosal barrier function in wounded rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(5):509-512

摘要

目的: 研究肠内生态营养对创伤后大鼠肠道屏障功能的影响.

方法: 将30只Wistar大鼠随机分为3组, 即对照组、普通肠内营养组和肠内生态营养组. 胃造瘘术后分别给予普通饲料、肠内营养剂和肠内生态营养剂7 d, 检测小肠黏膜形态学参数和黏膜IgA^+, $CD3^+$, $CD4^+$和$CD8^+$细胞数量.

结果: 肠内生态营养组的小肠绒毛高度(205.4 μm *vs* 177.7 μm, $P<0.05$)、肠腺隐窝深度(99.4 μm *vs* 77.7 μm, $P<0.05$)、黏膜厚度(299.9 μm *vs* 267.0 μm, $P<0.05$)以及绒毛表面积(10 321.5 μm^2 *vs* 8927.6 μm^2, $P<0.05$)均高于对照组, 肠内生态营养组和普通肠内营养组比较差异无显著性($P>0.05$). 肠内生态营养组大鼠小肠黏膜中IgA^+细胞(21.2 *vs* 17.5, 19.4, $P<0.05$)和$CD3^+$(24.2 *vs* 20.2, 22.1, $P<0.05$), $CD4^+$(13.4 *vs* 8.9, 11.0, $P<0.05$)、$CD8^+$(18.7 *vs* 12.6, 15.4, $P<0.05$)细胞数均高于对照组和普通肠内营养组.

结论: 肠内生态营养能较好的改善创伤后大鼠的小肠机械屏障功能, 促进小肠黏膜屏障功能的恢复, 增强其肠道免疫功能.

关键词: 肠内营养; 生态营养; 肠黏膜屏障; Wistar大鼠

■背景资料
近几十年通过对肠内营养的研究发现, 其不仅可以为机体提供营养, 而且可以改善肠黏膜屏障功能, 起到阻止SIRS和多器官功能障碍的发生和发展. 而随着肠内营养剂的商品化生产, 肠内营养的运用范围逐渐扩大, 对围手术期的肠内营养成为研究热点, 人们早就发现手术、创伤对肠道菌群有着较大的影响, 单纯的肠内营养并不完全符合生理状态, 故对于改善肠道菌群的生态营养的研究应运而生.

余利坚, 徐亮, 姚晖, 魏仁志, 綦晓龙. 肠内生态营养对创伤后大鼠肠屏障功能的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(5):509-512
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/509.asp

■创新盘点
本研究对普通手术创伤后的大鼠术后早期应用肠内营养, 比较普通的肠内营养和肠内生态营养对肠道黏膜和肠道免疫屏障功能的影响, 此类动物实验现阶段还较少.

0 引言

随着对肠道微生态结构与功能研究的不断加深, 肠道菌群对机体健康的重要性逐步被认识. Bengmark[1-2]根据多年临床观察和研究结果分析, 同时考虑到生态制剂在维护肠道正常功能的独特作用, 提出生态营养的概念, 即在传统肠内营养的基础上补充肠道有益菌群, 利用肠道内有益菌群的生物拮抗作用, 减少致病菌的过度生长. 同时提高肠道细菌的酵解效能以改善肠道内环境, 最终达到维护肠道微生态及肠道屏障功能, 改善机体营养状态及抗病力, 减少创伤、危重患者感染率的目的.

1 材料和方法

1.1 材料 选用清洁级Wistar大鼠30只, 体质量190-270 g, 雌雄各半, 由泸州医学院动物科提供, 随机分为3组: 对照组(control)、普通肠内营养组(EN)、肠内生态营养组(EEN), 每组各10只. 瑞素(Fresubin)购于Fresenius Kabi-华瑞公司. 金双歧片(口服双歧杆菌、乳杆菌、嗜热链球菌三联活菌片), 规格为0.5 g/片, 主要成分: 内含长型双歧杆菌活菌不低于0.5×10^7 CFU, 保加利亚乳杆菌活菌和嗜热链球菌活菌不低于0.5×10^6 CFU, 购于内蒙古双奇药业股份有限公司, 国药准字S19980004. 小鼠抗大鼠$CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$单克隆抗体试剂均购于Serotec公司, 山羊抗大鼠IgAα重链特异性单克隆抗体购于Rockland公司, SP系列试剂盒和相关的二抗购于北京中杉生物技术公司.

1.2 方法 大鼠适应性喂养2 d后, 手术造大鼠胃造瘘模型, 术后置于室温22-26℃, 湿度40%-70%的安静、通风良好的环境中单笼饲养, 除对照组给予大鼠专用饲料外, EN, EEN组分别给予不同成分的肠内营养剂(等氮等热量), 经胃造瘘管给予喂养, EN组给予瑞素, EEN组给予瑞素添加金双歧片(每只大鼠所用活菌数量大约为1×10^8 CFU/d), 制成混悬液均现配现用. 所有营养剂配置后均存放于冰箱中, 但不得超过24 h. 各组能量供应均为1037 kJ/(kg·d), 于大鼠术后开始喂养, 第1天注入全量的1/2, 第2天注入全量的2/3, 第3天开始注入全量. 喂养7 d后处死大鼠, 距回盲部5 cm切取3 cm长的末段回肠, 清洗后立即置于40 g/L中性甲醛中固定约12 h后, 然后常规石蜡包埋.

1.2.1 肠黏膜形态学参数 HE染色后, 显微镜下观察大鼠小肠黏膜形态结构. 每只动物取5张不连续的切片, 每张切片顺次取奇数视野观测10个绒毛, 并测量: 绒毛高度、肠腺隐窝深度、黏膜厚度以及绒毛表面积.

1.2.2 肠黏膜IgA^+, $CD3^+$, $CD4^+$和$CD8^+$细胞数量检测 免疫组织化学染色后镜下观察, 每张切片观察不相邻的5个视野, 计算出每张切片平均每个高倍视野IgA^+和$CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$细胞数.

统计学处理 实验结果计量资料以均数±标准差(mean±SD)表示, 均数的比较用方差分析, 均采用SPSS11.0统计软件包进行分析, 按检验水准$\alpha = 0.05$, $P<0.05$为有统计学意义.

2 结果

30只大鼠中, EN组1只于术后6 h死亡, 原因不详. EN, EEN组各有1只大鼠因术后胃造瘘管脱出或堵塞而退出实验, 其余27只大鼠完成实验.

2.1 小肠黏膜形态参数测定结果 显微镜下观察, 各组大鼠小肠肠壁层次清楚, 黏膜上皮结构完整, 无明显充血和炎性细胞浸润. 对照组的肠黏膜萎缩, 绒毛矮而稀疏. 而EN组和EEN组肠黏膜绒毛高而密集, 其肠黏膜绒毛高度、腺隐窝深度、黏膜厚度和绒毛表面积均明显高于对照组(除EN组黏膜厚度), EN组和EEN组间差异无显著性(表1).

2.2 小肠黏膜中IgA^+, $CD3^+$, $CD4^+$和$CD8^+$细胞的数量 通过免疫组织化学染色后, IgA^+, $CD3^+$, $CD4^+$和$CD8^+$细胞胞质被染成均匀的棕黄色, 细胞核被染成深蓝色, 绝大部分阳性细胞局限于黏膜层内, 计算出平均每高倍视野下阳性细胞数(表2).

3 讨论

胃肠道不仅具有消化吸收的功能, 而且还具有肠道屏障功能, 其主要包括: 机械屏障、化学屏障、免疫屏障和生物屏障等4部分. 结构完整的肠黏膜上皮及细胞间的紧密连接构成机械屏障; 肠黏膜上皮细胞分泌的黏液、消化液和肠道寄生菌产生的抑菌物质为化学屏障; 肠黏膜上皮细胞分泌的sIgA, IgM等抗体及黏膜T淋巴组织组成黏膜免疫屏障; 肠道内正常共生菌对致病菌的定植抵抗作用及其菌间聚集构成了生物屏障. 以上任何一部分受损, 均可导致肠道屏障功

表 1 各组大鼠小肠黏膜形态参数

分组	*n*	绒毛高度(μm)	腺隐窝深度(μm)	黏膜厚度(μm)	绒毛表面积(μm^2)
对照组	10	177.7 ± 24.1	77.7 ± 6.2	267.0 ± 20.5	8927.6 ± 1214.1
EN	8	197.9 ± 16.8[a]	88.5 ± 8.7[a]	286.4 ± 23.8[a]	9941.2 ± 842.1[a]
EEN	9	205.4 ± 11.4[a]	99.4 ± 11.9[a]	299.9 ± 24.0[a]	10321.5 ± 573.4[a]

[a]*P*<0.05 *vs* 对照组.

表 2 小肠黏膜中IgA^+, $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$细胞的数量(mean ± SD个/高倍视野)

分组	*n*	IgA^+	$CD3^+$	$CD4^+$	$CD8^+$
对照组	10	17.5 ± 2.0	20.2 ± 1.0	8.9 ± 1.2	12.6 ± 2.1
EN	8	19.4 ± 1.3[a]	22.1 ± 2.6[a]	11.0 ± 2.0[a]	15.4 ± 2.6[a]
EEN	9	21.2 ± 2.0[ac]	24.2 ± 2.4[ac]	13.4 ± 1.9[ac]	18.7 ± 2.9[ac]

[a]*P*<0.05 *vs* 对照组; [c]*P*<0.05 *vs* EN.

■名词解释

1 肠内生态营养: 又称为肠内微生态营养, 即通过在肠内营养中添加益生菌, 从而改善肠道微生态, 进而更好的保护肠道屏障功能, 减少细菌和内毒素移位, 促进机体的康复.

2 益生菌: 对维护人体健康有重要功能作用, 但无或较低致病性的自然活微生物为益生菌. 他对于肠道黏膜免疫的发生和成熟是极为重要的, 又可以为肠道黏膜细胞提供某些营养成分, 对于维护肠道功能起着重要的作用.

能损害, 导致细菌移位, 增加相关并发症. 大手术、创伤等应激状态下, 全身血流动力学改变可导致肠道的低灌注状态, 损害肠道黏膜屏障功能, 引起肠通透性升高, 在周围血中可检出内毒素[3]或肠道常驻菌的特异DNA[4]就是直接证据, 并与创伤程度成正比. 而正常人周围血中不能检测到肠腔内的常驻细菌特异DNA, 这是由于正常肠道屏障阻止了肠腔内常驻菌的入侵[5].

肠上皮70%的营养供应来自肠腔内的直接营养吸收, 如果缺乏肠内营养的吸收将使肠黏膜处于病理状态[6-7]. 本实验发现, 对照组的肠黏膜萎缩, 绒毛矮而稀疏, EN组和EEN组的小肠绒毛高度、肠腺隐窝深度、黏膜厚度、绒毛表面积均高于对照组(*P*<0.05), 表明肠内营养均可以避免应激状态下大鼠肠道绒毛的损害, 促进肠道绒毛的更新和修复, 增加了绒毛高度、腺隐窝深度和黏膜厚度, 增大了肠道绒毛表面积. 这与肠内营养对肠黏膜的营养作用密不可分. EN组和EEN组之间比较并没有显著差异(*P*>0.05), 表明肠内生态营养同普通肠内营养一样均能起到营养肠道上皮的作用, 促进肠道黏膜修复, 维护肠道黏膜屏障. 我们将延长生态营养给予的时间、增加剂量进行继续观察, 研究生态制剂对肠黏膜结构的持续影响.

肠道免疫屏障与肠黏膜中各种淋巴细胞的免疫功能有关, 即与肠相关淋巴样组织(gut-associated lymphoid tissue, GALT)和分泌型IgA(sIgA)有关. sIgA其相对分子质量为36 kDa, 是肠道分泌物中含量最丰富的免疫球蛋白,是肠道免疫的第一道防线, 在预防细菌黏附和移位上发挥重要的作用[8]. CD3是构成T细胞抗原受体(TCR)的膜抗原, 主要分布于成熟T细胞、胸腺细胞和末梢T细胞等. CD4是辅助T细胞(helper T cell)的代表性的膜抗原, 他主要分布于大部分胸腺细胞和末梢T细胞, 可以辅助由TCR识别抗原-MHC复合体的同时, 规定T细胞的MHC class Ⅱ限制性. CD8是杀伤T细胞(killer T cell)抑制T细胞(suppressor T cell)迟发性超敏反应(delayed type hypersensitivity, DTH)T细胞(DTH T cell)的共同标记, 辅助由TCR识别抗原-MHC复合体, 是选择的MHC class Ⅰ限制性T细胞的重要分子[9]. T淋巴细胞亚群不仅对于维护肠黏膜免疫屏障功能起着重要的作用[10], 而且其对于全身免疫功能尤其是T淋巴细胞功能的改善也十分有益[11]. EEN的黏膜IgA^+, $CD3^+$, $CD4^+$和$CD8^+$细胞高于对照组和EN组(*P*<0.05), 表明肠内生态营养比普通肠内营养更能促进术后大鼠肠道IgA的产生和肠黏膜GALT的增生, 从而促进了肠道免疫屏障恢复, 进而影响全身免疫状态, 减少细菌移位, 减少手术并发症, 促进创伤后大鼠恢复. 益生菌对于肠道防御的作用可能机制是: (1)在肠黏膜表面形成一层生物菌膜, 对致病菌起着生物拮抗作用, 起到占位性保护作用; (2)中和或减少肠道内某些有毒物质对肠黏膜造成的损害, 减少内毒素水平, 拮抗细菌毒素, 降低炎症反应; (3)细菌代谢为肠黏膜上皮细胞提供能量, 改善肠黏膜组织的局部血供, 促进损伤的肠上皮修复, 抑制致病菌繁殖; (4)激活肠道免疫系统活性,

■同行评价
本文研究了肠内生态营养对创伤后大鼠肠屏障功能的影响, 设计合理, 结果可靠, 具有一定的临床指导意义.

促进GALT的增生, 增加sIgA等抗体的分泌, 增强肠道免疫功能; (5)激活单核巨噬细胞系统, 促进了巨噬细胞的吞噬和消化功能[12-15].

总之, 肠内生态营养能保护创伤后大鼠肠道黏膜, 使肠道黏膜屏障功能和肠道免疫屏障功能改善, 提高了抗病能力和耐受手术应激的能力.

4 参考文献

1 Bengmark S. Econutrition and health maintenance - A new concept to prevent GI inflammation, ulceration and sepsis. *Clin Nutr* 1996; 15: 1-10
2 Bengmark S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut* 1998; 42: 2-7
3 姚国相, 薛新波, 卢兴培, 王剑明, 王欣, 俞亚红, 朱峰, 姜立, 申铭, 丁志强, 秦仁义, 邹声泉, 钱家勤. 大手术后免疫增强型肠内营养对血浆内毒素水平、血浆灭活内毒能力和预后的影响. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1992-1995
4 文利平, 蒋朱明, 唐伟松, 梁存和, 王树惠, 张云, 王宝贵. 外科手术患者血中细菌DNA的检出率. 中国临床营养杂志 2000; 8: 33
5 武正炎. 普通外科手术并发症预防与处理. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 2002: 25-28
6 徐亮, 魏仁志, 庞明辉, 付华. 胃肠手术后早期肠内营养的临床研究. 泸州医学院学报 2002; 25: 100-103
7 龚圣济, 骆明德, 陈大伟, 全志伟, 沈军, 储冰峰, 张一楚, 蔡威, 汤庆娅, 夏韶明, 冯一. 含纤维素肠内营养在消化道外科大手术患者中的应用. 世界华人消化杂志 2001; 9: 483-484
8 吴国豪. 肠道屏障功能. 肠外与肠内营养 2004; 11: 44-47
9 新保敏和・石黑精. CD分类手册. 第1版. 天津: 天津科技翻译出版社, 2001, 20-26
10 McGhee JR, Mestecky J, Elson CO, Kiyono H. Regulation of IgA synthesis and immune response by T cells and interleukins. *J Clin Immunol* 1989; 9: 175-199
11 陈强谱, 欧琨, 赵红梅, 周旭, 邢雪. 早期肠内营养对腹部手术后患者T淋巴细胞亚群的影响. 世界华人消化杂志 2000; 8: 1438-1439
12 Tuohy KM, Probert HM, Smejkal CW, Gibson GR. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discov Today* 2003; 8: 692-700
13 Doron S, Gorbach SL. Probiotics: their role in the treatment and prevention of disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2006; 4: 261-275
14 Thorlacius H, Nobaek S, Wang XD, Andersson R, Molin G, Bengmark S, Jeppsson B. Lactobacilli attenuate bacteremia and endotoxemia associated with severe intra-abdominal infection. *Surgery* 2003; 134: 467-473
15 Medici M, Vinderola CG, Weill R, Perdigon G. Effect of fermented milk containing probiotic bacteria in the prevention of an enteroinvasive Escherichia coli infection in mice. *J Dairy Res* 2005; 72: 243-249

电编 张敏 编辑 张焕兰

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

• 消息 •

欢迎订阅2007年《世界华人消化杂志》

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

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

《世界华人消化杂志》2007年由北京报刊发行局发行, 国际标准刊号 ISSN 1009-3079，国内统一刊号CN 14-1260/R, 邮发代号82-262, 出版日期每月8, 18, 28日, 月价72.00, 年价864元. 欢迎广大消化科医务工作者及科教研人员、各大图书馆订阅.联系地址: 100023, 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社. 联系电话: 010-85381901-1020; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; 网址: www.wjgnet.com.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年2月18日; 15(5): 513-517
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

抑制Akt活化对人结肠癌细胞c–FLIP基因表达的作用

周晓东, 陈红霞, 吕农华, 朱 萱, 徐 萍, 陈幼祥, 于红刚, 于皆平

周晓东, 吕农华, 朱萱, 徐萍, 陈幼祥, 南昌大学第一附属医院消化内科 江西省南昌市 330006
陈红霞, 南昌大学第一附属医院妇产科 江西省南昌市 330006
于红刚, 于皆平, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060
通讯作者: 周晓东, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第一附属医院消化内科. zhouxd7612@hotmail.com
电话: 0791–8694905
收稿日期: 2006–11–09 接受日期: 2006–11–28

Inhibition of Akt activation down-regulates the expression of cellular Fas associated death domain-like IL-1β-converting enzyme-inhibitory protein in human colon cancer cell line

Xiao-Dong Zhou, Hong-Xia Chen, Nong-Hua Lv, Xuan Zhu, Ping Xu, You-Xiang Chen, Hong-Gang Yu, Jie-Ping Yu

Xiao-Dong Zhou, Nong-Hua Lv, Xuan Zhu, Ping Xu, You-Xiang Chen, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Hong-Xia Chen, Department of Gynecology and Obstetrics, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Hong-Gang Yu, Jie-Ping Yu, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China
Correspondence to: Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. zhouxd7612@hotmail.com
Received: 2006-11-09 Accepted: 2006-11-28

Abstract

AIM: To investigate the changes of cellular Fas associated death domain-like IL-1β-converting enzyme-inhibitory protein (c-FLIP) expression after the inhibition of protein kinase B (PKB/Akt) activation.

METHODS: Human colon cancer cell line HT-29 was treated with 10, 20 and 40 nmol/L wortmannin (a specific inhibitor for Akt activation) for 0, 3, 6, 12 and 24 hours. MTT assay was used to detect the proliferation of HT-29 cells. After HT-29 cells were treated with 40 nmol/L wortmannin, the levels of phosphorylated Akt (pAkt) and c-FLIP protein were determined by Western blot, and the transcription of c-FLIP gene was detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) at the 0, 3rd, 6th, 12th and 24th hour.

RESULTS: Wortmannin suppressed the proliferation of HT-29 cells in a concentration- and time-dependent manner ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). With the prolonging of treatment time, the level of pAkt protein expression was obviously decreased, while the expression of c-FLIP protein was also down-regulated, with decreased rates of 82% and 91% at the 24th hour, respectively. After wortmannin for 3 hours, the mRNA expression of c-FLIP was decreased to 40% of the control cells, and for 24 hours, it was decreased to 25% of the control ones.

CONCLUSION: Wortmannin, a specific inhibitor for Akt activation, may inhibit the proliferation of HT-29 cells *in vitro* by down-regulation of c-FLIP gene.

Key Words: Colon cancer; Cellular Fas associated death domain-like IL-1β-converting enzyme-inhibitory protein; Protein kinase B

Zhou XD, Chen HX, Lv NH, Zhu X, Xu P, Chen YX, Yu HG, Yu JP. Inhibition of Akt activation down-regulates the expression of cellular Fas associated death domain-like IL-1β-converting enzyme-inhibitory protein in human colon cancer cell line. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(5):513-517

摘要

目的: 探讨结肠癌细胞中抑制蛋白激酶B(PKB/Akt)的活化对c-FLIP基因表达的调控作用.

方法: 取对数生长期的HT-29细胞系, 分别采用10、20和40 nmol/L的Akt活化特异性抑制剂wortmannin对其进行干预, 运用MTT法检测不同干预时间点的细胞增殖抑制情况. 采用40 nmol/L的wortmannin干预HT-29细胞0, 3, 6,

■背景资料
细胞FLICE抑制蛋白(c-FLIP)亦称caspase-8抑制蛋白, 是新近发现的抗凋亡蛋白, 他能抑制死亡受体介导的凋亡. 目前已发现在多种人类肿瘤组织细胞中存在c-FLIP的过表达, 并发现其与肿瘤的发生、发展密切相关, 本文课题组近期的研究亦发现, c-FLIP亦过表达于胃癌、结肠癌及子宫内膜癌组织中, 但有关c-FLIP表达的调控机制尚未阐明. 多种肿瘤中的研究结果表明, 蛋白激酶B经过磷酸化而活化后可促进c-FLIP的表达而抑制细胞凋亡. 然而, 在结肠癌细胞系中有关c-FLIP表达与Akt信号通路的关系还不明了.

■研发前沿
有关凋亡的研究一直是肿瘤研究的热点问题, 诱导肿瘤细胞的凋亡是肿瘤治疗的思路之一. 多种化疗药物都是通过诱导肿瘤细胞的凋亡而发挥作用的. 死亡受体介导的凋亡是参与肿瘤细胞凋亡的重要机制之一, 也是药物的重要作用靶之一. 然而, 死亡受体介导凋亡的机制和上下游信号通路还不明确. c-FLIP因具有强大的抗死亡受体介导凋亡的作用而倍受人们关注, 有关c-FLIP抗凋亡的机制也成为研究热点之一.

12, 24 h后, 采用Western blot检测磷酸化Akt和c-FLIP蛋白表达水平, 逆转录PCR检测c-FLIP基因的转录水平.

结果: 三个浓度的wortmannin都对HT-29细胞的生长具有抑制作用, 随着浓度、时间的递增, 其抑制效应逐渐增强(P<0.01或0.05), 而对照组未见明显变化(P>0.05). 随着wortmannin的干预时间延长, 磷酸化Akt蛋白的表达水平明显降低, 同时c-FLIP蛋白的表达水平也随之下降, 24 h后二者表达水平分别下降了82%和91%. wortmannin干预HT-29细胞3 h后, 与对照组相比其c-FLIP mRNA表达水平已明显下降到40%, 24 h后其表达水平下降到25%.

结论: Akt活化的特异性抑制剂wortmannin可抑制体外培养的结肠癌HT-29细胞的生长, 结肠癌中可能存在Akt/c-FLIP信号通路调节c-FLIP基因的表达.

关键词: 大肠癌; FLICE抑制蛋白; 蛋白激酶B

周晓东, 陈红霞, 吕农华, 朱萱, 徐萍, 陈幼祥, 于红刚, 于皆平. 抑制Akt活化对人结肠癌细胞c-FLIP基因表达的作用. 世界华人消化杂志 2007;15(5):513-517
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/513.asp

0 引言

细胞FLICE抑制蛋白(cellular FLICE inhibitory protein, c-FLIP)亦称caspase-8抑制蛋白, 是新近发现的抗凋亡蛋白, 他能抑制死亡受体介导的凋亡[1-2]. 已有研究表明, c-FLIP在多种人类肿瘤如肺癌、恶性黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤及肝癌等组织细胞中过表达, 并发现其与肿瘤的发生、发展密切相关[3-5], 我们近期的研究亦发现, c-FLIP亦过表达于胃癌及结肠癌组织中[6-9], 但有关c-FLIP表达的调控机制尚未阐明. 多种肿瘤中的研究结果表明, 蛋白激酶B(protein kinase B, PKB/Akt)经过磷酸化而活化后可促进c-FLIP的表达而抑制细胞凋亡. 然而, 在结肠癌细胞系中有关c-FLIP表达与Akt信号通路的关系还不明了. 本实验采用Akt活化的特异性抑制剂wortmannin进行干预, 旨在探讨结肠癌细胞中Akt对c-FLIP表达的调控作用.

■创新盘点
既往国外的和我们的研究已发现, 在结肠癌组织中存在c-FLIP基因的上调表达. 本文首次提出, 在结肠癌细胞中, Akt可促进c-FLIP基因表达, 从而进一步抑制肿瘤细胞凋亡, 这一发现必将丰富肿瘤生物学理论.

1 材料和方法

1.1 材料 人大肠癌细胞株HT-29购自湖南湘雅医学院肿瘤研究所, 为中分化大肠腺癌. RPMI1640培养基干粉和胎牛血清为Gibco公司产品, 青霉素、链霉素为华北制药有限公司, 胰蛋白酶为Sigma公司产品, wortmannin为Alexis Biochemical公司产品, 兔抗人c-FLIP$_{L/S}$多克隆抗体为Santa Cruz公司产品, 鼠抗人Akt Ser473磷酸化mAb、HRP-羊抗兔IgG和HRP-羊抗鼠IgG、预染色的蛋白Marker及增强化学发光显色试剂盒(LumiGLO^{TM})购自Cell Signaling技术公司, TRIzol试剂为Invitrogen公司产品; MMLV逆转录酶为Promega公司产品; Taq酶、dNTP、RNasin为Takara公司产品; PCR引物及寡聚核苷酸由上海生物工程公司合成.

1.2 方法 HT-29细胞株在含100 mL/L的小牛血清, 100 U/mL青霉素, 100 mg/L链霉素的RPMI 1640培养基中, 于37℃、50 mL/L CO_2、饱和湿度条件下培养、增殖、传代、扩增以备用.

1.2.1 MTT法检测wortmannin的干预对HT-29细胞增殖活性的影响 取对数生长期的HT-29细胞, 2.5 g/L胰蛋白酶消化, 通过血球计数板计数, 用培养液制成单细胞悬液, 调整细胞密度为5×10^7/L. 接种细胞于96孔培养板, 每孔200 μL, 含1×10^4细胞, 另取1孔加入不含细胞的培养液作为空白调零孔, 置于37℃, 50 mL/L CO_2的培养箱中培养24 h后换无血清的RPMI1640培养液培养, 再孵育24 h使细胞同步化后分组进行实验. 细胞培养24 h后, 更换培养液. 实验组: 加不同浓度的wortmannin, 使其终浓度分别为10 nmol/L, 20 nmol/L, 40 nmol/L; 对照组: 培养液不加wortmannin. 每组均为5孔, 于37℃、50 mL/L CO_2的培养箱中继续培养. 呈色及比色: 培养第0, 3, 6, 12, 24 h后, 在每孔加入MTT溶液(5 g/L)20 μL, 37℃继续培养4 h后, 小心吸弃上清, 每孔加入DMSO 150 μL振荡10 min, 使结晶物充分溶解, 以空白孔调零, 在酶标仪中检测490 nm波长处每孔吸光度值(absorbance, A值), 吸光度值取平均值, 以均数±标准差(mean±SD)表示, 重复试验3次. 按下式计算细胞存活率: 细胞存活率(%)=(实验孔A值/对照孔A值)×100%.

1.2.2 wortmannin干预后HT-29细胞pAkt(Ser473)及c-FLIP蛋白的检测 将细胞悬浮液接种到底面积为50 cm^{2}的培养瓶中, 待细胞生长到对数生长期, 用不含血清的RPMI1640培养液处理细胞24 h, 使细胞同步化后, 做如下分组: A组, 用不含小牛血清的RPMI1640培养液作为对照; B组: 无血清的RPMI1640培养液中加入40 nmol/L的wortmannin, 作用时间分别为0, 3, 6, 12, 24 h. 每组收集等量细胞(2×10^5), 提取细胞总蛋白, 用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度; 以β-actin的水平作为

等量蛋白质上样对照, 每个样本至少重复3遍, 取50 μg蛋白质样品进行SDS-PAGE电泳, 并转至硝酸纤维膜(PVDF)上, 加入100 g/L脱脂奶粉室温封闭2 h后, 加入一抗工作液(兔抗人c-FLIPL/S多克隆抗体和鼠抗人Akt Ser473磷酸化mAb的稀释度皆为1∶1000)后4℃过夜, 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔或鼠IgG二抗(1∶2000), 室温摇床孵育2 h, 增强化学发光显色系统显色, 暗室内X光底片感光成像.

1.2.3 wortmannin干预后HT-29细胞中c-FLIP的转录水平检测 收集HT-29细胞, 每5×10^6-10×10^6个细胞加入1 mL TRIzol提取总RNA, 每例取总RNA 2 μg用MMLV逆转录酶进行逆转录, PCR扩增c-FLIP, 同时扩增β-actin作为内参照, 每个标本至少重复3遍, c-FLIP引物序列(512 bp): 5'-TGT TGC TAT AGA TGT GG-3'(sense), 5'-AAG GAT CCT TGA GAC TCT-3'(antisense); β-actin引物序列(475 bp): 5'-TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC-3'(sense), 5'-CTG CAT CCT GTC GGC AAT GCC AG-3'(antisense). 95℃ 3 min 预变性后开始循环: 95℃ 30 s, 53℃ 30 s, 72℃ 45 min, 共30个循环, 最后于72℃延伸7 min. 扩增产物在15 g/L琼脂糖凝胶上电泳分离, 并在凝胶成像系统中计算每个样本所测得的c-FLIP与β-actin的积分光密度比值.

2 结果

2.1 wortmannin对HT-29细胞增殖的影响 用终浓度10 nmol/L, 20 nmol/L, 40 nmol/L的wortmannin分别处理生长良好的HT-29细胞0, 3, 6, 12、24 h, 采用MTT法检测其对细胞增殖的影响. 3个浓度的wortmannin都对HT-29细胞的生长具有抑制作用, 随着浓度、时间的递增, 其抑制效应逐渐增强($P<0.01$或$P<0.05$), 而对照组未见明显变化($P>0.05$)(图1).

2.2 wortmannin对pAkt及c-FLIP蛋白表达的影响 wortmannin是PI3'K特异性抑制剂, PI3'K的活性抑制后可导致Akt不能磷酸化而活化. 本实验通过在结肠癌细胞株HT-29中加入wortmannin干预不同的时间, 以观察磷酸化Akt蛋白水平的变化及其对c-FLIP蛋白表达的影响. 经与β-actin的相对积分光密度分析表明, 随着wortmannin的干预时间延长, 磷酸化Akt蛋白的表达水平明显降低, 干预24 h后下降到基础水平的18%; 同时, western blot亦显示c-FLIP蛋白的表达水平也随之下降, 3 h后其表达水平已明显降低, 至24 h则降至

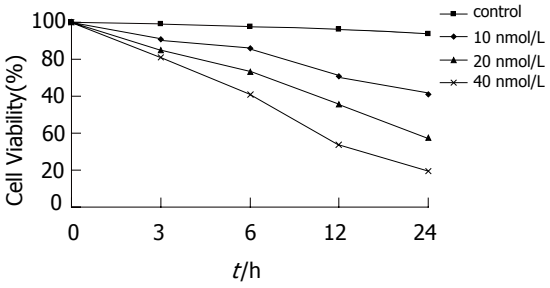


图 1 不同浓度及作用时间的wortmannin对HT-29细胞体外生长的影响.

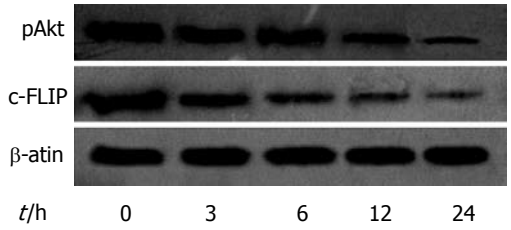


图 2 wortmannin干预后HT-29细胞c-FLIP和pAkt蛋白表达水平变化.

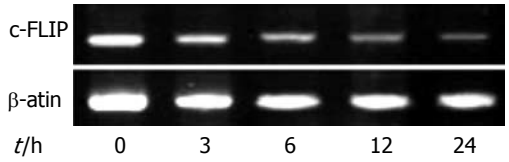


图 3 wortmannin干预后HT-29细胞c-FLIP mRNA表达水平变化.

基础水平的9%(图2)

2.3 wortmannin对c-FLIP基因转录水平的影响 wortmannin干预3 h后, c-FLIP mRNA表达水平已明显下降到40%, 24 h后其表达水平下降到25%(图3).

3 讨论

大肠肿瘤的发生、发展过程中包含了一系列的基因突变(如p53, APC, DCC, ras), 随着基因突变的不断累积最终导致正常肠腺上皮转变为腺瘤乃至恶性转化为腺癌. 其中凋亡失衡在这一过程中起着重要的作用, 结肠腺癌细胞可通过不同的机制逃逸受体介导的凋亡, 使肿瘤细胞继续生长. c-FLIP基因是最近发现的抗凋亡基因, c-FLIP蛋白能抑制caspase-8的活化从而阻断死亡受体Fas, TNF-R1, DR3及TRAIL-R介导的凋亡.

我们在前期的研究中发现, c-FLIP基因过高表达于胃癌、子宫内膜癌中, 并且与细胞凋亡的抑制密切相关, 另外, 我们同样发现在结

■应用要点

本文的研究证实在结肠癌细胞中存在Akt/c-FLIP信号通路调节c-FLIP基因的表达, 这一成果可进一步指导基于死亡受体凋亡通路的抗肿瘤研究, 必将为以后肿瘤的活学和基因治疗提供有益的思路和线索.

■名词解释
磷酸化活化: 某些蛋白的氨基酸序列上的某些位点被上游物质磷酸化后才具有生物学活性, 如Akt蛋白在磷酸化后才具有抗凋亡和促增殖活性.

肠癌组织亦存在c-FLIP基因的上调表达. 然而, 有关c-FLIP在肿瘤中表达的调节机制还不明了, 尤其是促其表达上调的上游分子事件还知之甚少. 已知, 在一系列生长因子的刺激下, 活化的Akt可通过磷酸化作用于不同的下游分子(如Forkhead转录因子家族、核转录因子κB及Erk等)而抑制凋亡, 最近有研究表明, Akt可促进c-FLIP的表达而抑制细胞凋亡, 这在肝癌[10]、卵巢癌细胞系[11]、肾细胞癌细胞系[12]、甲状腺癌细胞系[13]、内皮细胞[14]、乳腺癌及黑色素瘤细胞系中都得到了证实[15]. 然而, 在结肠癌中Akt对c-FLIP的表达有否调控作用还不明了. 我们通过检测结肠癌HT-29细胞系中Akt的活化与c-FLIP基因表达的关系, 以初讨在结肠癌中是否亦存在Akt/FLIP调节通路, 从而进一步了解c-FLIP表达的调节机制.

既往研究表明, 非磷酸化Akt蛋白不具备生物学活性, 然而Akt可经PI3K/Akt信号途径的磷酸化作用生成磷酸化Akt(phosphorylated Akt, pAkt)而活化, 其后pAkt能够通过两种不同的机制促进细胞转化: (1)促进细胞增殖, 使肿瘤细胞通过正常的细胞周期阻滞; (2)抑制细胞凋亡, 使肿瘤细胞免于机体自身所诱导的死亡, 延长其生存时间[16]. wortmannin是PI3'K特异性抑制剂, PI3'K的活性抑制后可导致Akt不能磷酸化而活化. 本实验在体外培养的HT-29细胞中加入wortmannin后其生长明显受到抑制, pAkt表达水平明显降低, 同时伴有c-FLIP蛋白的显著下调表达, 故此我们推测, 在结肠癌中存在Akt/FLIP信号通路调节c-FLIP基因的表达.

为了进一步考察wortmannin对c-FLIP蛋白表达的抑制效应是否伴随有c-FLIP基因转录水平的下调, 我们采用了逆转录PCR检测wortmannin干预不同时间点及对照组中HT-29的c-FLIP mRNA表达水平, 结果显示wortmannin干预3 h后, c-FLIP mRNA表达水平已明显下降达40%, 24 h后其表达水平下降达75%. 由此我们认为, 在HT-29细胞系中, wortmannin通过抑制Akt的活化而下调c-FLIP基因转录水平, 进一步导致c-FLIP蛋白表达的下调.

总之, 本研究表明在结肠癌细胞中, c-FLIP基因的表达水平依赖于Akt蛋白的活化, 存在一条Akt/FLIP信号通路调节FLIP基因的表达, 然而, 其确切的机制还不明了. 既往的研究表明, Akt能够磷酸化多种转录调控因子(如叉头转录因子和核因子-κB等), 而这些转录调控因子大多参与凋亡相关基因的表达. 核因子-κB在结肠癌等消化系疾病中扮演着重要角色[17-18], Micheau等发现HeLa细胞中核因子-κB的活化可诱导FLIP基因的转录[19], 在胰腺癌细胞和卵巢癌中同样存在此现象最新的研究表明, 在结肠癌细胞系Caco-2中, 核因子-κB能够调控FLIP基因的表达[20], 故此, 我们推测, 结肠癌中Akt可能通过活化核因子-κB后而进一步促进FLIP基因的转录, 当然, 这还有待于深入的研究验证.

4 参考文献

1 Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinl E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer JL, Schroter M, Scaffidi C, Krammer PH, Peter ME, Tschopp J. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 1997; 386: 517-521

2 Hu S, Vincenz C, Ni J, Gentz R, Dixit VM. I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1997; 272: 17255-17257

3 Zhang XD, Franco A, Myers K, Gray C, Nguyen T, Hersey P. Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma. *Cancer Res* 1999; 59: 2747-2753

4 Thomas RK, Kallenborn A, Wickenhauser C, Schultze JL, Draube A, Vockerodt M, Re D, Diehl V, Wolf J. Constitutive expression of c-FLIP in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Am J Pathol* 2002; 160: 1521-1528

5 Thome M, Tschopp J. Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 50-58

6 周晓东, 于皆平, 于红刚, 罗和生, 吕农华. 胃癌组织中细胞FLICE抑制蛋白基因的表达研究. 中华消化杂志 2005; 25: 10-14

7 Zhou XD, Yu JP, Liu J, Luo HS, Chen HX, Yu HG. Overexpression of cellular FLICE-inhibitory protein (FLIP) in gastric adenocarcinoma. *Clin Sci (Lond)* 2004; 106: 397-405

8 周晓东, 于皆平, 冉宗学, 罗和生, 余保平. 结肠肿瘤cFLIP基因表达与p53突变的关系. 世界华人消化杂志 2002; 10: 536-539

9 Zhou XD, Yu JP, Chen HX, Yu HG, Luo HS. Expression of cellular FLICE-inhibitory protein and its association with p53 mutation in colon cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2482-2485

10 Okano H, Shiraki K, Inoue H, Kawakita T, Yamanaka T, Deguchi M, Sugimoto K, Sakai T, Ohmori S, Fujikawa K, Murata K, Nakano T. Cellular FLICE/caspase-8-inhibitory protein as a principal regulator of cell death and survival in human hepatocellular carcinoma. *Lab Invest* 2003; 83: 1033-1043

11 Kamsteeg M, Rutherford T, Sapi E, Hanczaruk B, Shahabi S, Flick M, Brown D, Mor G. Phenoxodiol--an isoflavone analog--induces apoptosis in chemoresistant ovarian cancer cells. *Oncogene* 2003; 22: 2611-2620

12 Asakuma J, Sumitomo M, Asano T, Asano T,

Hayakawa M. Selective Akt inactivation and tumor necrosis actor-related apoptosis-inducing ligand sensitization of renal cancer cells by low concentrations of paclitaxel. *Cancer Res* 2003; 63: 1365-1370
13 Poulaki V, Mitsiades CS, Kotoula V, Tseleni-Balafouta S, Ashkenazi A, Koutras DA, Mitsiades N. Regulation of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in thyroid carcinoma cells. *Am J Pathol* 2002; 161: 643-654
14 Suhara T, Mano T, Oliveira BE, Walsh K. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling controls endothelial cell sensitivity to Fas-mediated apoptosis via regulation of FLICE-inhibitory protein (FLIP). *Circ Res* 2001; 89: 13-19
15 Panka DJ, Mano T, Suhara T, Walsh K, Mier JW. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activity regulates c-FLIP expression in tumor cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 6893-6896
16 Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* 2004; 30: 193-204
17 於亮亮, 于皆平, 冉宗学, 于红刚. 核因子-kappaB与大肠肿瘤细胞凋亡及增生的关系. 世界华人消化杂志 2002; 10: 309-312
18 凌江红, 李家邦, 聂海明, 蒋荣鑫, 申定珠, 韦宗平. 幽门螺杆菌阳性消化性溃疡患者胃黏膜核因子kappaB、beta-防御素-2表达及其与胃窦炎症的关系. 世界华人消化杂志 2006; 14: 376-381
19 Micheau O, Lens S, Gaide O, Alevizopoulos K, Tschopp J. NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 5299-5305
20 Wang Q, Wang X, Zhou Y, Evers BM. PKCdelta-mediated regulation of FLIP expression in human colon cancer cells. *Int J Cancer* 2006; 118: 326-334

电编 李琪 编辑 张焕兰

■同行评价

本研究对结肠癌细胞FLICE抑制蛋白和蛋白激酶B(PKB/Akt)的关系进行了初步的研究, 表明Akt活化的抑制可抑制c-FLIP基因的表达及癌细胞的生长, 提示结肠癌中可能存在Akt/c-FLIP信号通路调节. 研究设计较为合理, 方法得当, 结果明确, 对于进一步揭示Akt/c-FLIP信号通路的机制有指导意义.

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

• 消息 •

2007 年国际会议

Meeting Canadian Digestive Diseases Week (CDDW)
16–20 February 2007
Banff - AB
cagoffice@cag-acg.org
www.cag-acg.org/cddw/cddw2007.htm

Meeting Falk Symposium 158: Intestinal Inflammation and Colorectal Cancer
23–24 March 2007
Sevilla
symposia@falkfoundation.de

Meeting Falk Symposium 159: IBD 2007 - Achievements in Research and Clinical Practice
4–5 May 2007
Istanbul
symposia@falkfoundation.de

Digestive Disease Week
19–24 May 2007
Washington Convention Center, Washington DC

Meeting ESGAR 2007 18th Annual Meeting and Postgraduate Course
12–15 June 2007
Lisbon
fca@netvisao.pt

Meeting Falk Symposium 160: Pathogenesis and Clinical Practice in Gastroenterology
15–16 June 2007
Portoroz
symposia@falkfoundation.de

Meeting ILTS 13th Annual International Congress
20–23 June 2007
Rio De Janeiro
www.ilts.org

Meeting 9th World Congress on Gastrointestinal Cancer
27–30 June 2007
Barcelona
meetings@imedex.com

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年2月18日; 15(5): 518-521
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

胃恶性纤维组织细胞瘤临床病理特征

白辰光, 柯儒斌, 杨 蕾, 马大烈

■背景资料
目前认为胃原发性间叶源性肿瘤大多为胃肠道间质瘤(GIST), 而原发于胃的MFH极为少见. 最新版WHO肿瘤分类对MFH进行了重新定义, 将其与未分化多形性肉瘤视为同义词, 变为一种排除性诊断.

白辰光, 杨蕾, 马大烈, 第二军医大学长海医院病理科 上海市 200433
柯儒斌, 余杭区第一人民医院病理科 浙江省杭州市 311100
国家自然科学基金资助项目, No. 30471702
通讯作者: 马大烈, 200433, 上海市杨浦区长海路174号, 第二军医大学长海医院病理科. madalie@126.com
电话: 021-25074853
收稿日期: 2006-09-08 接受日期: 2006-11-28

Primary malignant fibrous histiocytoma of the stomach: 2-case reports and review of the literatures

Chen-Guang Bai, Ru-Bin Ke, Lei Yang, Da-Lie Ma

Chen-Guang Bai, Lei Yang, Da-Lie Ma, Department of Pathology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
Ru-Bin Ke, Department of Pathology, the First People's Hospital of Yuhang District, Hangzhou 311100, Zhejiang Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30471702
Correspondence to: Da-Lie Ma, Department of Pathology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China. madalie@126.com
Received: 2006-09-08 Accepted: 2006-11-28

Abstract

AIM: To study the clinical and pathological features of malignant fibrous histiocytoma (MFH) in the stomach.

METHODS: The clinical and pathological data of 2 patients with primary malignant fibrous histiocytoma of the stomach were analyzed, and the related literatures were reviewed.

RESULTS: The first case was a 71-year-old man with epigastralgia and dark stools. The second case was a 34-year-old man with epigastralgia and vomiting. The tumors in both cases were big in size, offwhite in color and located in the submucosal layer of posterior wall of gastric corpus. Histologically, it was composed of a mixture of pleomorphic fibroblast-like spindle cells, focally arranged in a storiform pattern, oval or round histiocyte-like cells and inflammatory cells. Immunohistochemically, the tumor cells expressed vimentin, CD68, lysozyme and alpha-1-antitrypsin, but were negative for other markers.

CONCLUSION: MFH of the stomach is rare, and its pathological feature is similar to MFH of the soft tissue. The diagnosis of gastric MFH depends on immunohistochemical labeling.

Key Words: Neoplasm of the stomach; Malignant fibrous histiocytoma; Clinical and pathological features

Bai CG, Ke RB, Yang L, Ma DL. Primary malignant fibrous histiocytoma of the stomach: 2-case reports and review of the literatures. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(5):518-521

摘要

目的: 探讨原发于胃的恶性纤维组织细胞瘤(MFH)的临床病理学特征.

方法: 报道2个胃MFH病例, 描述其临床表现、组织学及免疫组化特征, 并复习国内外文献.

结果: 2例均为男性, 年龄34及71岁. 肿物体积大, 均位于胃体后壁. 切面灰白色, 编织状, 质韧, 肿物位于黏膜下, 累及胃壁全层, 黏膜面形成溃疡. 镜下示: 梭形纤维母细胞样肿瘤细胞呈交织状及束状排列, 胞质红染, 核卵圆形, 大而异型, 并见较多单核及多核瘤巨细胞, 其间见组织细胞样瘤细胞散在分布, 可见数量不等的炎细胞散在分布. 免疫表型: Vimentin弥漫阳性, A1-ACT、CD68及Lysozyme部分细胞阳性.

结论: 胃MFH是一种罕见的肿瘤, 病理特征和软组织MFH相同, 鉴别诊断有赖于免疫组化标记.

关键词: 胃肿瘤; 恶性纤维组织细胞瘤; 临床病理

白辰光, 柯儒斌, 杨蕾, 马大烈. 胃恶性纤维组织细胞瘤临床病理特征. 世界华人消化杂志 2007;15(5):518-521
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/518.asp

0 引言

恶性纤维组织细胞瘤(malignant fibrous histiocytoma, MFH)是一种间叶源性恶性肿瘤, 好发于四肢软组织和体腔, 偶见于内脏器官[1-2]. 原发于胃的MFH极为少见, 国内外罕有报道[3-9]. 我们在总结胃间叶源性恶性肿瘤时发现2例胃MFH, 现作一报道, 并复习文献总结其临床病理特征.

1 材料和方法

1.1 材料 例1: 患者男性, 71岁. 2004-03因“头晕、乏力1 mo, 上腹不适、黑便1 wk”入我院治疗. 入院检查: 血色素5.0 g, 胃镜示胃体肿物. 术中见: 肿物位于胃体后壁, 黏膜面溃疡, 侵及浆膜, 大小7.5 cm×4.5 cm, 侵犯胰体尾. 遂行姑息性全胃切除术. 例2: 患者男性, 34岁. 2004-10因“上腹不适伴进食呕吐”入当地医院治疗. 当地诊断: 胃窦部占位伴幽门梗阻. 后行手术, 但未能切除肿物. 12 mo以“胃饱胀, 进食呕吐4 mo, 腹部巨大肿物术后1 mo余”入我院治疗. 入院检查: 触诊发现剑突下及一6 cm×2.5 cm包块. MRI示胃体肿物. 术中见: 肿物位于胃体后壁, 侵及浆膜, 大小10 cm×10 cm, 侵犯胰体尾及脾脏, 累及肝十二指肠韧带. 遂行根治性全胃切除术加胰体尾、脾脏切除术.

1.2 方法 标本经40 g/L甲醛固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 4 μm厚切片, 光镜观察. 免疫组化染色采用EnVision微波二步法, 所用一抗均购自福州迈新生物技术有限公司, EnVision试剂盒为丹麦DAKO公司产品.

2 结果

2例均为全胃切除标本, 肿物均位于胃体后壁, 大小分别为8 cm×4.5 cm×4 cm及12 cm×8 cm×8 cm. 切面灰白色, 编织状, 质韧, 肿物位于黏膜下(图1A), 累及胃壁全层, 黏膜面形成溃疡. 镜检梭形纤维母细胞样肿瘤细胞呈交织状及束状排列, 胞质红染, 核卵圆形, 大而异型, 并见较多单核及多核瘤巨细胞, 其间见圆形及卵圆形组织细胞样瘤细胞散在分布(图1B), 肿瘤组织累及胃壁全层, 可见数量不等的炎细胞散在分布(图1C). vimentin, PDGFRA弥漫阳性, α1抗糜蛋白酶(α1ACT), CD68及溶菌酶(lysozyme)部分细胞阳性, CD34, CD117, desmin, SMA, S-100, CD57, NSE, PCK(AE1/AE3), EMA, MCA和CR均阴性, P53高水平表达, PCNA低水平表达.

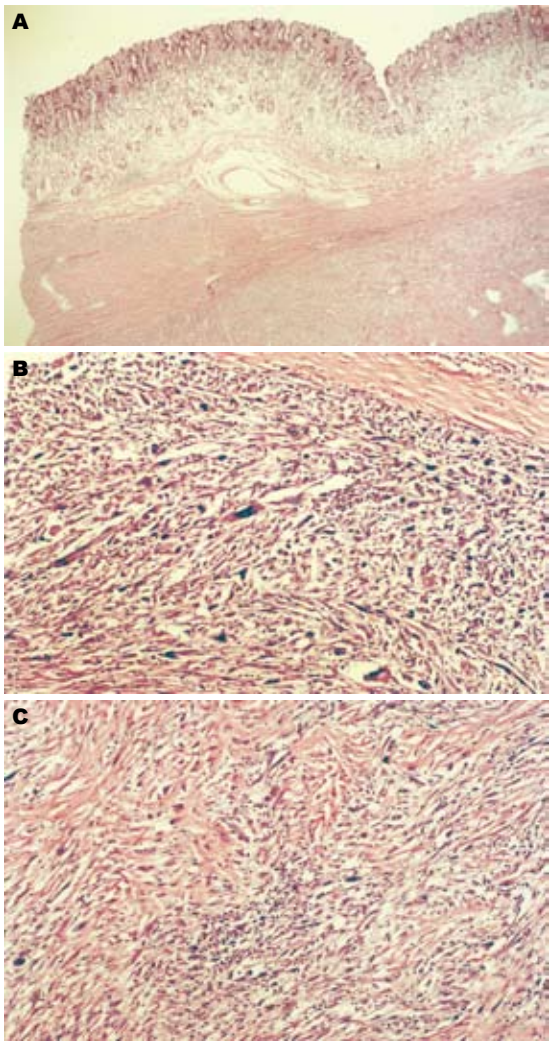


图 1 胃MFH组织学特征. A: 肿物位于黏膜下(HE×100); B: 肿瘤细胞呈交织状及束状排列, 核明显异型, 见较多单核及多核瘤巨细胞(HE×200); C: 肿瘤组织间见数量不等的炎细胞散在分布(HE×200).

3 讨论

MFH来源于原始间叶细胞, 以往认为是由组织细胞和成纤维细胞组成的高度恶性肿瘤, 在软组织恶性肿瘤中发病率居首位[1,10], 又称纤维组织细胞肉瘤或恶性纤维黄色瘤、软组织恶性巨细胞瘤、恶性黄色肉芽肿和恶性组织组织细胞瘤. 1963年Ozell *et al*[11]首次报道该肿瘤, 1970年代初期被公认[12]. 随着免疫组织化学和电镜技术的应用, 诊断为MFH的病例越来越少, 其作为一个独立疾病类型的地位受到质疑[12-15]. 2002年, 最新版WHO分类[16]将MFH和未分化多形性肉瘤视为同义词, 变成一种排除性诊断, 占成人肉瘤的5%以下. MFH好发于中老年人的四肢、躯干及腹膜后, 也见于肺、肝、骨等处. 原发于消化道, 特别是胃的MFH则非常罕见, 国内外仅

■应用要点

本文采用最新MFH定义报道了2例胃原发性MFH病例, 有助于规范胃肠道间叶源性肿瘤, 特别是MFH的诊断.

表 1 12例胃MFH临床特点

序号	性别	年龄(岁)	临床症状	部位	最大径(cm)	组织类型	预后
[1]1[3]	男	21	上腹部胀, 便血、贫血	胃小弯高位前壁	4.5	多形性型	术后2 a肺转移
2[4]	男	35	上腹部胀痛	胃小弯近贲门	20	未描述	未提供
[2]3	男	71	上腹不适、黑便、贫血	胃体后壁近小弯	8	多形性型	术后13 mo死亡
[2]4	男	34	上腹不适伴进食呕吐	胃体后壁	12	多形性型	术后5 mo存活
5[7]	女	60	–	–	3.5	未描述	术后7 mo死亡
6[5]	男	60	上腹不适、黑便	胃窦大弯	4.5	多形性型	术后3 mo死亡
7[6]	男	42	黑便、贫血	贲门、胃底后壁	5.0	多形性型	术后17 mo死亡
8[7]	男	51	–	–	–	多形性型	术后1 wk死亡
9[7]	男	78	上腹痛, 体质量减轻	胃体后壁	5.0	多形性型	术后2 a存活
10[7]	男	77	贫血、发热、上腹痛	胃窦前壁近大弯	4.0	多形性型	术后4 a死亡
11[8]	女	37	孕期贫血	胃后壁	10.0	多形性型	术后38 mo存活
12[9]	男	57	上腹疼痛伴黑便	胃角后壁	7.5	多形性型	术后6 mo死亡

[1]该病例为国内首次报道, 但未经免疫组化证实; [2]为本文报道病例.

见10余例报道[3-9].

复习文献及我们报道的病例(表1)发现, 胃MFH发病年龄较大, 多为中老年男性, 年龄21-78(平均51.9)岁, 与软组织MFH相似[2]. 肿瘤大多位于黏膜下, 常见溃疡形成, 个别呈息肉样突入胃腔(病例6, 12). 肿瘤一般较大, 最大径3.5-20 cm, 中位数5.0 cm. 临床症状多为上腹部不适, 贫血和黑便也较常见, 部分病例有持续发热或无明显症状. 因临床症状没有特异性, 术前主要依靠胃镜和影像学检查发现, 但确诊困难, 只能依靠术后病理检查.

原发于胃的MFH病理特征与软组织MFH相同, 肿瘤细胞多样化. 纤维母细胞样肿瘤细胞呈梭形, 细胞呈特征性的束状或轮辐状排列, 可见其向纤维细胞过渡. 组织细胞样肿瘤细胞, 胞质丰富, 体积较大, 有吞噬现象, 可吞噬脂质、细胞碎片、含铁血黄素颗粒等. 并可见多核巨细胞及单核瘤巨细胞, 核大而形态不规则, 染色深. 上述各种细胞都有不同程度的异型性, 核分裂像多见. 病理学依据瘤体中肿瘤细胞的主要成分将MFH分为多形性型、巨细胞型和炎症性型[16], 其中多形性MFH最多见, 约占总病例的75%[10]. 本文报道的病例形态学均符合多形性型, 即肥大的梭形纤维细胞样肿瘤细胞呈特征性的束状或轮辐状排列, 组织细胞样肿瘤细胞散在分布, 并见少量炎细胞灶性或散在分布. 文献报道的病例也均为多形性型(表1). 该肿瘤易复发和转移, 10例中2例复发[6-7], 转移多通过血道途径, 2例发生肺转移[3,9], 1例发生脑转移[5], 但也有1例报道胃周淋巴结转移[7].

免疫组化标记有助于胃的MFH的诊断和鉴别诊断. 该肿瘤Vimentin恒定弥漫阳性, 过去认为α1-抗胰蛋白酶(α1AT)、α1ACT、溶菌酶(lysozyme)和CD68是恶性纤维组织细胞理想的标记物, 现在认为对MFH诊断无帮助[16]. 原发于胃的MFH主要需与以下肿瘤鉴别诊断: 胃肠道间质瘤(CD34和C-Kit阳性)、平滑肌肿瘤(desimin和SMA阳性)、神经源性肿瘤(S-100阳性)、间皮肿瘤(MCA和CR阳性), 恶性黑色素瘤(S-100和HMB45阳性)和梭形细胞癌(EMA和CK阳性). 以上各类肿瘤均有特异性标志物, 因此通过免疫组化标记较易鉴别. 本文报道的病例免疫组化标记结果已排除上述肿瘤, 符合MFH的诊断标准[1].

同时, 免疫标记发现肿瘤细胞PDGFRA阳性, 与Yamamoto *et al*[17]报道一致, 提示PDGFRA及其相关因子在MFH的发生和发展中可能起着重要作用. 但是, 因为PDGFRA在间叶组织的发育过程中广泛发挥作用, 在多种类型的间叶肿瘤中均有不同程度的表达, 所以其抗体不能作为MFH的诊断标记物. 有报道显示P53蛋白在MFH中多呈较高水平表达, 且存在P53基因的突变, 提示P53基因在MFH的发病中可能起关键作用[18-20], 本文病例P53蛋白也均呈高水平表达.

胃MFH应尽早手术切除, 并辅以放化疗[1]. 由于原发于胃的MFH病例数有限, 有关预后研究资料不足. 综合文献及我们报道的病例(表1)发现, 有随访的11个病例中8例在手术后1 wk-4 a

内死亡, 其中7例在手术后2 a内死亡, 提示原发于胃的MFH预后不良. 但也有2例随访2 a以上良好生存.

4 参考文献

1 Bosmans B, de Graaf EJ, Torenbeek R, Tetteroo GW. Malignant fibrous histiocytoma of the sigmoid: a case report and review of the literature. *Int J Colorectal Dis* 2006
2 Weiss SW, Enzinger FM. Malignant fibrous histiocytoma: an analysis of 200 cases. *Cancer* 1978; 41: 2250-2266
3 金健行, 孙和国, 夏国平. 胃恶性纤维组织细胞瘤一例报告. 中华内科杂志 1983; 22: 411
4 王德明. 金迪. 胃恶性纤维组织细胞瘤1例. 泰山卫生 2001; 25: 56-57
5 Shibuya H, Azumi N, Onda Y, Abe F. Multiple primary malignant fibrous histiocytoma of the stomach and small intestine. *Acta Pathol Jpn* 1985; 35: 157-164
6 Wright JR Jr, Kyriakos M, DeSchryver-Kecskemeti K. Malignant fibrous histiocytoma of the stomach. A report and review of malignant fibrohistiocytic tumors of the alimentary tract. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112: 251-258
7 Wada Y, Matsushita T, Sarumaru S, Ryo J, Isobe H, Satoh B, Kanaya S, Katayama T, Ohtoshi M. Malignant fibrous histiocytoma of the stomach: report of two cases. *Surg Today* 1998; 28: 296-300
8 Wiersema AM, Wobbes T, Pruszczynski M, van der Sluis RF. Malignant fibrous histiocytoma of the stomach during pregnancy: a case report. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998; 80: 71-73
9 张汝鹏, 梁寒, 李强, 王殿昌, 郝希山. 原发性胃恶性纤维组织细胞瘤一例. 中华胃肠外科杂志 2006; 9: 7
10 Enjoji M, Hashimoto H, Tsuneyoshi M, Iwasaki H. Malignant fibrous histiocytoma. A clinicopathologic study of 130 cases. *Acta Pathol Jpn* 1980; 30: 727-741
11 Ozzello L, Stout AP, Murray MR. Cultural characteristics of malignant histiocytomas and fibrous xanthomas. *Cancer* 1963; 16: 331-344
12 Erlandson RA, Antonescu CR. The rise and fall of malignant fibrous histiocytoma. *Ultrastruct Pathol* 2004; 28: 283-289
13 Randall RL, Albritton KH, Ferney BJ, Layfield L. Malignant fibrous histiocytoma of soft tissue: an abandoned diagnosis. *Am J Orthop* 2004; 33: 602-608
14 Daugaard S. Current soft-tissue sarcoma classifications. *Eur J Cancer* 2004; 40: 543-548
15 Lagace R, Aurias A. Does malignant fibrous histiocytoma exist? *Ann Pathol* 2002; 22: 29-34
16 Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Soft Tissue and Bone. Lyon: IARC Press. 2002: 109-126
17 Yamamoto T, Akisue T, Marui T, Fujita I, Matsumoto K, Kawamoto T, Hitora T, Nakatani T, Nagira K, Kurosaka M. Immunohistochemical analysis of platelet-derived growth factor and its receptors in soft tissue malignant fibrous histiocytoma. *Anticancer Res* 2003; 23: 4325-4328
18 Yoo J, Lee HK, Kang CS, Park WS, Lee JY, Shim SI. p53 gene mutations and p53 protein expression in human soft tissue sarcomas. *Arch Pathol Lab Med* 1997; 121: 395-399
19 Jiao YF, Nakamura S, Sugai T, Habano W, Uesugi N, Oikawa M, Sato T. p53 gene mutation and MDM2 overexpression in a case of primary malignant fibrous histiocytoma of the jejunum. *APMIS* 2002; 110: 165-171
20 Reid AH, Tsai MM, Venzon DJ, Wright CF, Lack EE, O'Leary TJ. MDM2 amplification, P53 mutation, and accumulation of the P53 gene product in malignant fibrous histiocytoma. *Diagn Mol Pathol* 1996; 5: 65-73

■同行评价
本文对胃恶性纤维组织细胞瘤临床病理特征进行了描述, 创新性较好, 科学性强, 有较高的临床指导意义.

电编 张敏 编辑 张焕兰

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

• 消息 •

世界华人消化杂志电子杂志的开放存取出版

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年2月18日; 15(5): 522-527
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

乙肝III号内外合用治疗慢性乙型肝炎后肝纤维化63例

邢宇锋, 张 希, 邵 丽, 王丽娜, 童光东

■背景资料
抗纤维化的治疗目前主要包括两个方面: 针对原发病的病因治疗, 如抗肝炎病毒等; 其次是抑制炎症反应和ECM沉积, 针对抗肝纤维化本身的治疗, 如抑制HSC的激活、抑制胶原的增生、促进胶原的降解等. 但是, 除了抗病毒以外, 目前临床抗纤维用药多处于试验阶段, 尚未取得重大性突破进展. 中医药抗肝纤维化近年来显示较好的疗效, 包括中药单味、复方等, 但这些研究样本量小, 方法单一, 疗效不一, 缺乏远期疗效观察.

邢宇锋, 张希, 邵丽, 王丽娜, 童光东, 广州中医药大学附属深圳医院肝病科 广东省深圳市 518033
深圳市科技资助项目, NO. 200204239
通讯作者: 童光东, 518033, 广东省深圳市福华路1号, 广州中医药大学附属深圳医院肝病科. tgd755@163.com
电话: 0755-88359666-1005
收稿日期: 2006-11-20 接受日期: 2006-12-18

Long-term efficacy of combined internal and external application of Ganyan Sanhao in treatment of liver fibrosis resulted from chronic hepatitis B

Yu-Feng Xing, Xi Zhang, Li Shao, Li-Na Wang, Guang-Dong Tong

Yu-Feng Xing, Xi Zhang, Li Shao, Li-Na Wang, Guang-Dong Tong, Department of Hepatology, Shenzhen Hospital, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518033, Guangdong Province, China
Correspondence to: Guang-Dong Tong, Department of Hepatology, Shenzhen Hospital, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518033, Guangdong Province, China. tgd755@163.com
Received: 2006-11-20 Accepted: 2006-12-18

Abstract

AIM: To observe the prospective efficacy of integrated internal and external application of Yigan Sanhao (YGSH) in the treatment of liver fibrosis resulted from chronic hepatitis B (CHB).

METHODS: A total of 240 inpatients with CHB-induced liver fibrosis were randomly divided into group A (n = 58), B (n = 62), C (n = 63) and D (n = 57). External, internal and integrated external and internal treatments of YGSH were performed on the patients of group A, B, and C, respectively. The patients of group D served as controls. The clinical symptoms, liver function, fibrosis and PGA parameters, and hemodynamic changes were observed 3 months after treatment.

RESULTS: The clinical symptoms were improved, especially in group C. The liver function, fibrosis and PGA parameters were also ameliorated 3 months after treatment in all the groups, especially in group C (t = 6.1201, P = 0.000; t = 20.8201, P = 0.000; t = 20.5154, P = 0.000). Hemodynamic examination showed that the diameters of splenic and portal vein as well as the blood flow were decreased in all the groups (t = 3.6153, P = 0.0004; t = 6.8052, P = 0.000), especially significant in group C (t = 6.3969, P = 0.000). A 12-month following-up demonstrated that combination of external and internal application had the most favorable effect. However, the anti-viral efficacy was not markedly different between the four groups.

CONCLUSION: Integrated internal and external application of YGSH has a favorable long-term efficacy, and it is superior to the single use. Three-month course is considered the most optimal.

Key Words: Chronic hepatitis B; Liver fibrosis; Traditional Chinese medicine; Combined treatment

Xing YF, Zhang X, Shao L, Wang LN, Tong GD. Long-term efficacy of combined internal and external application of Ganyan Sanhao in treatment of liver fibrosis resulted from chronic hepatitis B. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(5):522-527

摘要

目的: 观察乙肝Ⅲ号内外合用治疗慢性乙型肝炎后肝纤维化的远期疗效.

方法: 随机选择乙肝肝纤维化患者240例, 分为乙肝Ⅲ号外用膏组(n = 58), 内服组(n = 62), 内外合用组(n = 63), 对照组(n = 57). 治疗后3 mo, 观察各组临床症状、肝功能、肝纤维化指数、PGA参数、血液动力学等.

结果: 4组皆能改善临床症状, 但以内外合用组为著; 4组改善肝功能、肝纤三项、PGA参数, 治疗后3 mo以内外合用组疗效显著(t = 6.1201, P = 0.000; t = 20.8201, P = 0.000; t = 20.5154, P = 0.000); 血液动力学检测显示, 各治疗组治疗后门、脾静脉血管直径、血流量皆有下降(t = 3.6153, P = 0.0004; t = 6.8052, P = 0.000), 内外合用组血流量下降明显(t =

6.3969, $P = 0.000$). 随访12 mo后仍是内外合用组疗效为优. 但各组在抗病毒指标上, 无统计学意义.

结论: 乙肝Ⅲ号内外合用治疗乙肝后肝纤维化有一定远期疗效, 且较单一方法疗效明显, 疗程以3 mo为优.

关键词: 慢性乙型肝炎; 肝纤维化; 中药; 内外合用

邢宇锋, 张希, 邵丽, 王丽娜, 童光东. 乙肝Ⅲ号内外合用治疗慢性乙型肝炎后肝纤维化63例. 世界华人消化杂志 2007;15(5):522-527
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/522.asp

0 引言

肝纤维化(hepatic fibrosis)是指肝脏内弥漫性的、过量的细胞外基质(ECM)沉积, 他不是一个独立的疾病, 而是许多慢性肝病的共同病理过程[1]. 目前仍认为肝星状细胞(HSC)在肝纤维化发生、发展中起主导作用[2-3]. 抗纤维化的治疗目前主要包括两个方面: 针对原发病的病因治疗, 如抗肝炎病毒等; 其次是抑制炎症反应以及ECM沉积, 针对抗肝纤维化本身的治疗, 如抑制HSC的激活、抑制胶原的增生、促进胶原的降解等. 除了抗病毒以外, 目前临床抗纤维化用药多处于试验阶段, 尚未取得重大性突破进展.

中医药抗肝纤维化近年来显示较好的疗效, 包括中药单味、复方等[4-5], 但这些研究样本量小, 方法单一, 疗效不一, 缺乏远期疗效观察. 我科10余年来长期使用乙肝Ⅲ号方(批准文号: 粤药制字Z03030167)内外合用治疗慢性乙型肝炎后肝纤维化, 即在原内服的基础上加穴位外敷[6], 试图采用多途径干预乙肝肝炎肝纤维化的形成. 现将我科于2002-11/2005-11, 运用乙肝Ⅲ号内外合用防治慢性乙型肝炎后肝纤维化, 临床资料总结如下.

1 材料和方法

1.1 材料 2002-11/2005-11在我科住院治疗的乙型肝炎肝纤维化患者240例, 将患者随机分为4组(随机号由SAS软件编制), 包括外用膏组, 内服组、内外合用组、对照组. 其中外用膏组58例, 男49例, 女9例, 年龄(39.8±6.4)岁, 平均病程(6.5±1.3)年; 内服组62例, 男48例, 女14例, 年龄(40.9±7.2)岁, 平均病程(5.8±2.2)年; 内外合用组63例, 男55例, 女8例, 年龄(42.9±5.8)岁, 平均病程(6.0±3.4)年; 对照组57例, 男51例, 女6例, 年龄(41.4±7.0)岁, 平均病程(5.5±3.8)年. 4组患者入院时的肝功能以及相关指标如肝纤三项及一般情况(年龄、性别、职业、文化程度、原发疾病、病程等)经统计学检验, 无显著性差异(P>0.05), 具有可比性. 观察期间所有的患者, 不使用其他抗病毒治疗.

乙肝Ⅲ号外用膏(1)组成: 醋制鳖甲20 g, 黄芪、半枝莲各15 g, 炮穿山甲、桃仁、白术、茯苓、郁金、三七、五味子各10 g, 丹参、广东叶下珠、枳壳各15 g; (2)制剂: 黄芪、醋制鳖甲、桃仁、茯苓、半枝莲、广东叶下珠, 加水煎煮2次, 浓缩为比重为1∶1的稠膏; 炮穿山甲、丹参、白术、枳壳、五味子、三七、郁金, 粉碎后, 制成80目的细粉, 与稠膏混合, 制成10目的颗粒, 烘干, 加入赋形剂做成3 cm×3 cm巴布贴, 置入密封袋, 4℃冰箱保存; (3)质量控制[7]: 药材来自深圳市中医院中药房, 按《中华人民共和国药典》要求的品系, 用薄层色谱法对黄芪、丹参、三七、白术等中药进行药品质量定性鉴别, 所用的药品薄层色谱必须与标准品一致.

乙肝Ⅲ号内服方(1)组成: 乙肝Ⅲ号内服组成同外用膏; (2)制剂: 醋制鳖甲、炮穿山甲打碎先煎0.5-1 h, 其余中药加水500 mL, 浸泡20-30 min, 文火煎煮0.5-1 h, 取汁服用; (3)质量控制: 同外用膏.

1.1.1 诊断标准 2000-09中华医学会传染病及寄生虫学会, 肝病学会联合制定的《病毒性肝炎防治方案》[8]予以确诊: (1)慢性病毒性乙型肝炎病变; (2)B超检查表现: 肝实质回声增强, 肝表面不光滑, 边缘变钝, 肝脏、脾脏可增大, 肝表面尚无颗粒状, 实质尚无结节样改变; (3)其中肝纤三项: 透明质酸(HA)、层黏蛋白(LN)、Ⅳ型胶原(IV-C)指标异常或任意一项指标高于正常值的2倍以上.

1.1.2 排除标准 有下列之一者, 不作选择: (1)合并酒精性肝硬化; (2)合并心血管、肾脏和造血系统等严重原发性疾病, 精神病患者; (3)不符合纳入标准, 未按规定用药, 无法判断疗效或资料不全等影响疗效者.

1.2 方法

1.2.1 分组治疗 对照组: 单用基础治疗[第1个月, 甘利欣(甘草酸二胺)30 mL+凯西莱(硫普罗宁)0.3 g, 1次/d; 第2, 3个月, 单用五酯胶囊(五味子甲素), 2片/次, 3次/d]; 外用膏组: 外用膏+基础治疗; 内服组: 内服方+基础治疗; 内外合用组: 外用膏+内服方+基础治疗.

■研发前沿
采用益气活血化瘀抗乙肝肝炎后肝纤维化是目前中医药抗肝纤维化研究的热点, 而使用多途径, 多靶点、多成分的给药, 如内服加穴位外敷联合使用, 以提高疗效的研究尚未见报道.

■创新盘点
本研究采用多环节、多靶点、多成分的中药内服外加穴位敷贴治疗慢性乙肝后肝纤维化的新方法. 并采用较大样本的随机、多组对照, 以及远期疗效随访, 为中医药防治肝纤维化提供循证医学依据.

1.2.2 用法、用量和疗程 (1)用法、用量: 外用巴布贴, 选用期门、日月、足三里穴, 可辨证加减: 腹胀加中脘, 腹水加神阙、水分, 下腹痛加气海, 虚弱加关元, 每日外敷1次, 每次4-12 h, 其中每外敷7 d, 停用2 d; 内服方日1剂, 分2次服; (2)疗程: 使用1 mo为1个疗程, 检测各项指标, 连续使用3个疗程; 随访12 mo, 每3 mo复查1次.

1.2.3 疗效观察 (1)临床症状与体征: 临床症状主要包括疲劳、胁痛、腹胀、尿黄等; 体征主要包括肝大、脾大、肝区叩击痛、墨菲征阳性等; (2)肝功能: 主要包括丙氨酸转氨酶(ALT) 、天冬氨酸转氨酶(AST)、γ-谷氨酰转肽酶(γ-GGT)、总胆红素(TB)等, 用Olympus2700型全自动生化仪检测; (3)乙肝两对半: 采用ELISA方法, 试剂由上海科华生物工程股份有限公司提供. HBV DNA定量: 采用实时荧光定量PCR法, 试剂由深圳市匹基生物工程股份有限公司提供, 仪器采用美国ABI PRISM 7000荧光定量PCR仪; (4)肝纤3项: HA, LN, IV-C用放射免疫法测定, 试剂由上海海研生物医学中心提供; (5)血液动力学检测: 采用美国泰索尼公司生产的Fynergy型彩色双功能多普勒, 探头频率35 mHz, 常规测量门静脉主干(PVD, cm)、脾门处脾静脉的内径(SVD, cm), 最大血流速度(Vp, cm/s), 根据血管截面积和平均血流速度计算血流量, 用公式[Vmean×$(D/2)^2\pi\times60$](D: 表示血管直径, Vmean表示平均血流速度), 计算门、脾静脉血流量(PVQ和SVQ, mL/min)[9]; (6)PGA参数[10]: PT, 用凝血仪检测, γ-GGT, Apo-A1, 用全自动生化仪测定. 根据PGA参数的判断标准, 每例患者根据3项指标的积分之和得出PGA指数, 其值为0-12.

统计学处理 采用SAS6.12版统计分析软件进行统计学处理, 计数资料采用χ^2检验、计量资料采用*F*检验.

2 结果

2.1 临床表现 4组临床症状改善情况见表1. 各组患者临床症状在治疗后第2周、第4周均有改善; 治疗后第4周, 内外合用组与外用膏药组、内服组、对照组比较, 差异有显著性(*P*<0.01).

2.2 肝功能 4组患者治疗前后ALT, AST, γ-GGT, TB改变情况分别见表2. 各组治疗前后1 mo ALT, AST, γ-GGT, TB比较, 差异皆有显著性(*P*<0.01或*P*<0.05). 但组间无显著性(*P*>0.05); 至治疗后3 mo, 内外合用组与其他各组比较, 差异有显著性(*P*<0.01或*P*<0.05), 但其他各组间无统计学意义(*P*>0.05).

表 1 4组临床症状改善情况(*n*, %)

分组	*n*	症状消失者	
		2 wk后	4 wk后
乙肝Ⅲ号外用膏组	58	25(43.1)	33(56.9)[b]
乙肝Ⅲ号内服组	62	29(46.8)	39(62.9)[b]
内外合用组	63	39(61.9)	55(87.3)
对照组	57	16(28.1)	22(38.6)[b]

[b]*P*<0.01 *vs* 内外合用组.

2.3 乙肝两对半和HBV DNA定量 各组治疗前后HBsAg, HBV DNA均无阴转; 各组治疗前后HBeAg血清学转换率、HBV DNA定量(正常值<5.0×10^2 copies/mL)结果见表3, 治疗组HBeAg血清学转换率以及HBV DNA定量值与对照组相比, 无统计学意义(*P*>0.05).

2.4 肝纤三项 4组患者治疗后3 mo血清肝纤维化指标变化见表4. 3治疗组治疗前后皆有统计学意义, 而对照组只有HA差异有显著性(*P*<0.05), 内外合用组与其他各组比较指标变化明显, 差异有显著性(*P*<0.01).

2.5 血液动力学检测 4组治疗后3 mo门、脾静脉血流量比较见表5. 各治疗组治疗后门、脾静脉D, Q值皆有下降、差异具有显著性(*P*<0.01或*P*<0.05), 各治疗组与对照组比较D, Q值差异具有显著性(*P*<0.01), 内外合用组与其他各组比较Q值有统计学意义(*P*<0.05); 对照组治疗后D, Q值无明显变化, 差异无显著性(*P*>0.05); 对照组与各治疗组治疗前后门、脾Vp皆无差异(*P*>0.05).

2.6 PGA参数 4组治疗前后PGA指数变化见表6. 治疗组治疗前后1 mo差异无显著性(*P*>0.05), 治疗后3 mo皆有显著性(*P*<0.05); 对照组差异均无显著性(*P*>0.05). 对照组与治疗组治疗后1 mo比较, 差异无显著性(*P*>0.05); 但治疗后3 mo, 对照组与治疗组比较, 差异有显著性(*P*<0.01), 治疗组间比较, 内外合用组与外用膏药组、内服组比较, 差异有显著性(*P*<0.05), 以内外合用组为优.

2.7 不良反应与随访结果 不良反应主要发生在乙肝Ⅲ号外用膏药组和内外合用组, 121例患者有9例局部出现有少许的丘疹, 皮肤红肿, 搔痒等, 局部涂抹皮炎平膏后, 可以继续使用, 未发现全身过敏与其他不良反应. 随访共12 mo, 每3 mo检测肝功、肝纤三项、PGA指数等指标,

表 2 4组治疗前后肝功能指标(mean ± SD)

分组	时间	ALT(nkat/L)	AST(nkat/L)	γ-GGT(nkat/L)	TB(μmol/L)
乙肝Ⅲ号	治疗前	1876.38 ± 809.66	1745.52 ± 862.51	1628.93 ± 756.15	47.35 ± 25.68
外用膏组	治疗后1 mo	1388.11 ± 623.12[b]	1309.10 ± 637.46[b]	1153.73 ± 625.79[b]	27.28 ± 15.34[b]
(*n* = 58)	治疗后3 mo	1488.13 ± 675.30[bd]	1377.61 ± 692.64[ad]	1255.25 ± 670.97[bc]	29.31 ± 18.67[bc]
乙肝Ⅲ号	治疗前	1821.20 ± 838.67	1815.53 ± 617.79	1686.00 ± 713.98	49.50 ± 23.54
内服组	治疗后1 mo	1189.24 ± 676.47[b]	1153.73 ± 588.12[b]	1039.21 ± 645.63[b]	28.42 ± 18.52[b]
(*n* = 62)	治疗后3 mo	1257.58 ± 723.48[bd]	1209.58 ± 641.80[bc]	1162.73 ± 608.46[bd]	31.20 ± 17.33[bd]
内外	治疗前	1890.38 ± 758.65	1837.38 ± 678.87	1657.33 ± 654.30	50.10 ± 20.88
合用组	治疗后1 mo	1173.90 ± 697.14[b]	1055.88 ± 612.12[b]	920.68 ± 530.77[b]	22.73 ± 17.38[b]
(*n* = 63)	治疗后3 mo	820.66 ± 585.45[b]	873.17 ± 494.10[b]	755.15 ± 461.43[b]	18.44 ± 9.85[b]
对照组	治疗前	1840.03 ± 774.65	1789.36 ± 673.13	1726.01 ± 654.30	46.58 ± 23.61
(*n* = 57)	治疗后1 mo	1427.29 ± 689.14[b]	1256.58 ± 675.30[b]	1174.07 ± 627.13[b]	30.51 ± 18.74[b]
	治疗后3 mo	1506.47 ± 642.13[ad]	1490.63 ± 627.46[ac]	1422.29 ± 615.96[ad]	37.33 ± 19.24[ad]

[a]*P*<0.05, [b]*P*<0.01 *vs* 治疗前; [c]*P*<0.05, [d]*P*<0.01 *vs* 内外合用组.

表 3 4组治疗前后HBeAg血清学转换率、HBV DNA定量结果比较(*n*)

分组	HBeAg(+)			HBV DNA(+)		
	治疗前(*n*)	治疗后(*n*)	阴转率(%)	治疗前(*n*)	治疗后下降2lgcopy(*n*)	有效率(%)
乙肝Ⅲ号外用膏组	51	49	3.9	50	3	6.0
乙肝Ⅲ号内服组	53	51	3.8	48	3	6.2
内外合用组	50	48	4.0	52	5	9.6
对照组	48	46	4.2	46	3	6.5

表 4 4组治疗后3 mo血清肝纤维化指标(mean ± SD)

分组	时间	HA(μg/L)	LN(μg/L)	IV-C(μg/L)
乙肝Ⅲ号外用	治疗前	391.23 ± 69.57	154.38 ± 42.16	185.53 ± 51.26
膏组(*n* = 58)	治疗后3 mo	155.36 ± 75.91[bd]	131.57 ± 33.29[bd]	144.82 ± 46.11[bd]
乙肝Ⅲ号内服	治疗前	346.82 ± 91.34	167.21 ± 34.52	179.54 ± 58.27
组(*n* = 62)	治疗后3 mo	142.67 ± 35.25[bd]	135.39 ± 29.61[bd]	139.45 ± 48.23[bd]
内外合用组	治疗前	366.19 ± 89.53	160.97 ± 39.23	190.18 ± 49.71
(*n* = 63)	治疗后3 mo	109.11 ± 47.38[b]	105.41 ± 25.28[b]	106.22 ± 32.48[b]
对照组	治疗前	356.24 ± 75.36	149.58 ± 45.61	180.33 ± 48.47
(*n* = 57)	治疗后3 mo	325.39 ± 65.72[ad]	138.63 ± 39.78[d]	160.32 ± 42.51[d]

[a]*P*<0.05, [b]*P*<0.01 *vs* 治疗前; [d]*P*<0.01 *vs* 内外合用组.

彩色双功能多普勒, 结果如下, 见表7. 肝功能、肝纤三项、PGA指数等指标, 乙肝III号内外合用组与对照组、内服组、外用膏组比较, 差异有显著性(*P*<0.05或*P*<0.01); 血液动力学检测: 门、脾静脉D, Q值下降值比较, 乙肝III号外用膏组、对照组、内服组各组间比较, 差异无显著性(*P*>0.05), 而与内外合用组比较, 差异有显著性(*P*<0.05或*P*<0.01).

3 讨论

中医学则认为肝纤维化属“积聚”、“臌胀”等范畴, 其病机主要湿、热、郁、瘀、虚所致肝经脉络瘀阻[11]. 所以肝纤维化的治则多以活血化瘀为主, 兼以疏肝理气, 益气养血柔肝或滋补肝肾等. 目前研究表明, 中药抗肝纤维化的分子机制可能是促进或抑制某些关键基因的表达, 抑制肝纤维化病变的种种异常生物效应, 延缓

■同行评价
本文研究了乙肝Ⅲ号内外合用治疗慢性乙型肝炎后肝纤维化远期疗效, 有一定的科学性、创新性和可读性, 能较好的反映本领域基础研究的水平.

表 5 4组治疗后3 mo门、脾静脉血流量比较(mean ± SD)

分组	时间	PV(门静脉)			SV(脾静脉)		
		D(cm)	Vp(cm/s)	Q(mL/min)	D(cm)	Vp(cm/s)	Q(mL/min)
乙肝Ⅲ号外用	治疗前	1.43 ± 0.15	14.19 ± 3.13	1251.4 ± 418.4	1.21 ± 0.23	15.19 ± 4.07	892.7 ± 313.2
膏组(*n* = 58)	治疗后3 mo	1.23 ± 0.30[a]	14.83 ± 3.37	902.3 ± 342.5[bc]	1.05 ± 0.19[b]	15.21 ± 3.82	603.7 ± 210.5[bc]
乙肝Ⅲ号内服	治疗前	1.42 ± 0.18	14.21 ± 3.28	1263.3 ± 427.2	1.18 ± 0.22	14.85 ± 4.13	898.6 ± 309.1
组(*n* = 62)	治疗后3 mo	1.19 ± 0.22[a]	14.71 ± 3.21	897.6 ± 311.7[bc]	1.06 ± 0.17[b]	15.12 ± 3.65	595.2 ± 207.5[bc]
内外合用组	治疗前	1.41 ± 0.19	14.23 ± 3.19	1258.2 ± 409.4	1.20 ± 0.18	14.94 ± 4.09	889.2 ± 315.7
(*n* = 63)	治疗后3 mo	1.13 ± 0.11[b]	15.13 ± 3.35	831.2 ± 283.6[b]	1.02 ± 0.21[b]	15.14 ± 3.97	503.7 ± 198.3[b]
对照组	治疗前	1.44 ± 0.21	14.30 ± 2.98	1247.6 ± 410.9	1.21 ± 0.24	14.86 ± 2.94	897.4 ± 317.6
(*n* = 57)	治疗后3 mo	1.39 ± 0.31[d]	14.37 ± 3.15	1228.9 ± 393.6[d]	1.18 ± 0.23[d]	15.01 ± 3.42	877.3 ± 320.1[d]

[a]*P*<0.05, [b]*P*<0.01 *vs* 治疗前; [c]*P*<0.05, [d]*P*<0.01 *vs* 内外合用组.

表 6 4组治疗前后PGA指数(mean ± SD)

分组	*n*	PGA指数		
		治疗前	治疗后1 mo	治疗后3 mo
乙肝Ⅲ号外用膏组	58	4.54 ± 0.75	3.91 ± 0.67	2.83 ± 0.54[ac]
乙肝Ⅲ号内服组	62	4.63 ± 0.82	3.84 ± 0.79	2.91 ± 0.61[ac]
内外合用组	63	4.77 ± 0.89	3.64 ± 0.57	1.79 ± 0.52[a]
对照组	57	4.42 ± 0.63	3.96 ± 0.83	3.85 ± 0.58[d]

[a]*P*<0.05 *vs* 治疗前; [c]*P*<0.05, [d]*P*<0.01 *vs* 内外合用组.

表 7 随访12 mo后4组各项指标对比

分组	随访(*n*)	脱漏(*n*)	肝功能		肝纤三项		PGA指数		门、脾静脉D, Q值	
			明显改善(*n*)	有效率(%)	明显改善(*n*)	有效率(%)	明显改善(*n*)	有效率(%)	明显下降(*n*)	有效率(%)
外用膏组(*n* = 58)	56	2	20	34.5[a]	22	37.9[a]	18	31.0[b]	12	20.7[b]
内服组(*n* = 62)	60	2	23	37.1[a]	25	40.3[a]	22	35.5[a]	15	24.2[a]
内外合用组(*n* = 63)	59	4	35	55.6	37	58.7	36	57.1	27	42.9
对照组(*n* = 57)	52	5	11	19.3[b]	8	14.0[b]	9	15.8[b]	5	8.8[b]

[a]*P*<0.05, [b]*P*<0.01 *vs* 内外合用组.

或阻止肝纤维化的发展[12].

乙肝Ⅲ号方是我科治疗肝病的院内制剂, 方中炮穿山甲、醋制鳖甲、丹参、桃仁、三七以化瘀软坚, 白术、茯苓、黄芪、五味子以健脾化湿、益气补阴, 枳壳、郁金以疏肝止痛, 半枝莲、广东叶下珠以清热解毒. 诸药相配, 共奏疏肝健脾、益气活血之效, 对消除胁痛、纳差、乏力、腹胀等诸症有较好的疗效[6]. 其后, 我科将乙肝Ⅲ号制成外用膏, 局部辨证穴位敷贴, 观察结果, 对消除胁痛与降低门脉血流量也有一定的疗效[13]. 为了提高疗效, 增加肝脏的药物浓度, 观察其远期疗效, 我们设计将乙肝Ⅲ号制成内外剂合用, 并与单用组作对照研究.

我们知道, 乙肝纤维化是HBV所致的肝脏炎症的病理结果, 临床上有胁痛、乏力、纳差、腹胀等症. 观察结果显示, 在消除临床症状方面各组皆有一定的疗效, 但以内外合用组疗效更为显著; 在肝功能改善方面, 各治疗后组间虽然差异不明显(*P*>0.05), 而治疗后3 mo结果提示内外合用组比其他各组皆优(*P*<0.01或*P*<0.05).

由于肝穿有创伤性, 患者的依从性差, 近年来, 学者们多从血清学和影像学寻找对肝纤维化有意义的诊断研究, 以评估肝纤维化疗效. 其

中血清HA, LN, PC联合监测能很好地反映肝脏损伤病变的严重程度及肝脏纤维化的活动程度[14], PGA指数有研究证明与肝纤维化严重程度相一致[15]. 肝脏具有3条血流通道, 即肝动脉、门静脉和肝静脉, 正常状态下, 入肝血流量和出肝血流量维持着生理性的动态平衡. 超声波用于检查肝脏血管, 不仅可观察其形态, 而且可进行血流的测量, 具有一定的诊断和研究价值[16]. 本组观察结果表明, 治疗后3 mo各组肝纤维化指标内外合用组与其他各组比有统计学意义(P<0.01或P<0.05); PGA指数的检测表明, 治疗后1 mo各组差异无显著性(P>0.05), 但治疗后3 mo, 内外合用组与其他各组比较, 差异均有显著性(P<0.01或P<0.05); 各组在血液动力学检测中, 治疗组治疗后3 mo门、脾静脉D, Q值皆有下降, 差异具有显著性(P<0.05或P<0.01), 治疗组与对照组比较D, Q值差异具有显著性(P<0.01), 内外合用组与外用膏组、内服组比较Q值有统计学意义(P<0.05). 随访是Mete统计学的重要内容, 被研究者随访是否完整对研究结果的可靠性是十分重要的, 本研究失访率7.5%, 通过随访12 mo可以发现, 内外合用组无论在改善肝功能、肝纤指标、PGA指数还是在血液动力学方面, 均明显高于对照组、内服组和外用膏组, 差异具有显著性(P<0.05或P<0.01). 各组治疗疗程来看, 治疗后3 mo明显优于治疗后1 mo.

另外, 各组治疗前后HBsAg, HBV DNA均无阴转, 治疗组HBeAg血清学转换率以及HBV DNA定量值与对照组相比, 无统计学意义(P>0.05), 提示乙肝Ⅲ号无抗病毒作用, 其降低肝纤维化与抗病毒无关, 其主要机制可能为: 通过乙肝Ⅲ号方内外合用, 既可以从内调理脏腑功能, 又可以从外通过经络渗透作用, 到达疏肝理气、活血化瘀、软肝散结之功效, 从多方位作用于肝脏, 直接有效地改善肝脏血液循环, 加速肝脏代谢, 减轻肝内炎性坏死, 抑制肝星状细胞(HSC)的激活, 抑制胶原的增生, 促进胶原的降解, 从而阻断及逆转肝纤维化[17].

通过本研究提示, 中药抗肝纤维化的主要环节是抑制炎症与ECM形成阶段, 如需从病因上治疗, 还需要与抗病毒药物联合使用, 以提高疗效.

4 参考文献

1 王宝恩, 张定凤. 现代肝脏病学. 第1版. 北京: 科学出版社, 2003: 513-533
2 Carpino G, Franchitto A, Morini S, Corradini SG, Merli M, Gaudio E. Activated hepatic stellate cells in liver cirrhosis. A morphologic and morphometrical study. *Ital J Anat Embryol* 2004; 109: 225-238
3 Safadi R, Friedman SL. Hepatic fibrosis-role of hepatic stellate cell activation. *MedGenMed* 2002; 4: 27
4 胡义扬. 中医药抗肝纤维化的研究. 实用临床医药杂志 2005; 9: 18-22
5 蒋业贵, 李兆申. 肝星状细胞与肝纤维化研究进展. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1443-1446
6 周大桥, 高辉, 郑晓瑛, 周小舟, 彭立生, 周师, 邱梅, 徐文军, 周静, 邹映珍. 软肝冲剂抗肝纤维化的临床研究. 中国中西医结合脾胃杂志 1998; 6: 87-89
7 刘纪青, 张尚斌, 曾斌. 乙肝Ⅲ号质量标准的研究. 河北中医药学报 2003; 18: 33-34
8 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 324-329
9 梁扩寰, 李绍白. 门静脉高压症. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 1999: 322
10 Poynard T, Aubert A, Bedossa P, Abella A, Naveau S, Paraf F, Chaput JC. A simple biological index for detection of alcoholic liver disease in drinkers. *Gastroenterology* 1991; 100: 1397-1402
11 朱佑民, 杨明炜. 中医药抗肝纤维化研究综述. 中国药师2006; 9: 67-69
12 吴晓玲, 曾维政, 王丕龙. 中药干预肝纤维化的分子机制. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2849-2852
13 童光东, 周大桥, 漆艳平, 刘纪青, 高辉, 贺劲松, 饶伟良, 谢三英, 彭立生. 乙肝Ⅲ号合近红外信息辐照治疗乙型肝炎肝纤维化的临床研究. 安徽中医学院学报 2003; 22: 17-20
14 罗家齐, 陈淑清, 王方. 血清HA, PCⅢ, LN联合检测诊断肝纤维化的临床意义. 华人消化杂志 1998; 6: 444
15 Lu LG, Zeng MD, Mao YM, Li JQ, Qiu DK, Fang JY, Cao AP, Wan MB, Li CZ, Ye J, Cai X, Chen CW, Wang JY, Wu SM, Zhu JS, Zhou XQ. Relationship between clinical and pathologic findings in patients with chronic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2796-2800
16 Oguzkurt L, Yildirim T, Torun D, Tercan F, Kizilkilic O, Niron EA. Hepatic vein Doppler waveform in patients with diffuse fatty infiltration of the liver. *Eur J Radiol* 2005; 54: 253-257
17 Brandao DF, Ramalho LN, Ramalho FS, Zucoloto S, Martinelli AD, Castro E Silva OD. Liver cirrhosis and hepatic stellate cells. *Acta Cir Bras* 2006; 21: 54-57

电编 张敏 编辑 王晓瑜

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年2月18日; 15(5): 528-532
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

亚硒酸钠对慢性乙型肝炎患者外周血树突状细胞的作用及机制

陈显兵, 管小琴

■背景资料
HBV感染所形成的免疫功能低下是HBV感染慢性化的因素之一, 因此打破HBV感染后的免疫低下状态是治疗慢性乙型肝炎的关键. 目前认为, DC是至今发现的抗原呈递细胞中功能最为强大的一类, 慢性乙型肝炎患者外周血的DC功能往往是有缺陷性的, DC功能的缺陷是造成慢性病毒性肝炎感染者体内缺乏有效的CTL应答.

陈显兵, 湖北民族学院医学院病理教研室 湖北省恩施市 445000
管小琴, 重庆医科大学病理教研室 重庆市 400016
重庆市教委资助项目(渝教科), No. 010109
通讯作者: 陈显兵, 445000, 湖北省恩施市学院路, 湖北民族学院医学院病理教研室. chenxianbing7612@163.com
电话: 0718-8964728
收稿日期: 2006-11-09 接受日期: 2006-12-01

Effect of sodium selenite on the function of dendritic cells from patients with chronic hepatitis B and its mechanism

Xian-Bing Chen, Xiao-Qin Guan

Chen Xian-Bing, Department of Pathology, College of Medicine, Hubei Institute for Nationalities, Enshi 445000, Hubei Province China
Xiao-Qin Guan, Department of Pathology, College of Basic Medicine, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China
Supported by the Fund from Education Committee of Chongqing Municipality, No. 010109
Correspondence to: Xian-Bing Chen, Department of Pathology, College of Medicine, Hubei Institute for Nationalities, Enshi 445000, Hubei Province, China. chenxianbing7612@163.com
Received: 2006-11-09 Accepted: 2006-12-01

Abstract

AIM: To observe the changes of dendritic cells separated from patients with chronic hepatitis B (CHB) after treatment of sodium selenite in order to find out an effective way for improving the function of dendritic cells.

METHODS: The peripheral blood was collected from 28 CHB patients, and each share of blood sample was assigned into 2 shares, one of which was treated with sodium selenite (group A) and the other served as positive control (group B). The blood from healthy individuals was used as normal control (group C). The effect of dendritic cells on the proliferation of allogeneic lymphocytes was examined by MTT assay using mixed lymphcyte reaction, and the secretion of interleukin-12 (IL-12) was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Colorimetry was used to detect glutathione peroxidase (GSH-Px) activity, malondialdehyde content and membrane fluidity.

RESULTS: In comparison with those in group C, the level of IL-12 secretion (12.46 ± 0.17 ng/L *vs* 21.43 ± 0.43 ng/L, $P < 0.05$) and the proliferation of lymphocytes were significantly decreased in group A; however, as compared with those in group A, the level of IL-12 secretion (16.93 ± 0.32 ng/L *vs* 12.46 ± 0.17 ng/L, $P < 0.05$) and the proliferation of lymphocytes were increased in group B. The activity of GSH-Px in group A was markedly lower in group A (65.35 ± 5.37 U/10^6 cells *vs* 94.73 ± 4.81 U/10^6 cells, $P < 0.05$) than that in group C, and it was also remarkably higher in group B than that in group A or C (107.13 ± 3.42 U/10^6 cells *vs* 65.35 ± 5.37, 94.73 ± 4.81 U/10^6 cells, $P < 0.05$). MDA content was notably higher in group A than that in group B or C (1.75 ± 0.21 U/10^6 cells *vs* 1.09 ± 0.17, 0.82 ± 0.13 U/10^6 cells, $P < 0.05$). The membrane fluidity was relatively maintained in group B as compared with that in group A.

CONCLUSION: Dendritic cells treated with sodium selenite can effectively stimulate the proliferation of lymphocytes, enhance the secretion of IL-12, maintain the membrane fluidity, and increase the resistance of tissues to free radical-induced injury.

Key Words: Chronic hepatitis B, Dendritic cell; Sodium Selenite

Chen XB, Guan XQ. Effect of sodium selenite on the function of dendritic cells from patients with chronic hepatitis B and its mechanism. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(5):528-532

摘要

目的: 探讨慢性肝炎患者经过亚硒酸钠作用前后树突状细胞(DC)功能的改变及机制, 寻求改善DC功能的途径.

方法: 慢性乙肝患者28例外周血, 每份血分成2份, 不加亚硒酸钠处理的为A组, 加亚硒酸钠者为B组. 健康献血者12例为对照组(C). 采用MTT法通过MLR检测DC对同种异体淋巴细胞的增殖能力及ELISA法检测细胞因子IL-12的分泌. 用比色法检测3组DC内GSH-Px活性、MDA含量和膜流动性.

结果: A组与C组相比, DC分泌IL-12水平(12.46±0.17 ng/L *vs* 21.43±0.43 ng/L, $P<0.05$)和刺激自身淋巴细胞反应能力明显降低; B组比A组相比显著升高(16.93±0.32 ng/L *vs* 12.46±0.17 ng/L, $P<0.05$). DC细胞内GSH-Px活性A组明显低于C组(65.35±5.37 U/10^6细胞 *vs* 94.73±4.81 U/10^6细胞, $P<0.05$), B组高于A组和C组(107.13±3.42 U/10^6细胞 *vs* 65.35±5.37, 94.73±4.81 U/10^6细胞, $P<0.05$). MDA含量A组明显高于B组和C组(1.75±0.21 U/10^6细胞 *vs* 1.09±0.17, 0.82±0.13 U/10^6细胞, $P<0.05$). B组膜流动性与A组相比保持良好.

结论: 体外经亚硒酸钠作用后的乙肝患者的DC可有效的刺激淋巴细胞增殖反应, 并可提高IL-12分泌水平, 保持膜流动性, 增强对自由基损伤的抵抗能力.

关键词: 慢性乙型肝炎; 亚硒酸钠; 树突状细胞

陈显兵, 管小琴. 亚硒酸钠对慢性肝炎患者外周血树突状细胞的作用及机制. 世界华人消化杂志 2007;15(5):528-532
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/528.asp

0 引言

慢性乙型肝炎是乙肝病毒(HBV)持续感染造成的, 机体免疫功能低下是造成HBV持续感染的原因之一. 研究发现, 乙肝患者外周血单核细胞来源的树突状细胞(dendritic cells, DC)在数量、成熟状态和免疫功能上存在缺陷, 与HBV特异性的T细胞耐受形成有关[1]. 我们比较慢性乙型肝炎患者外周血单核细胞经常规细胞因子诱导的DC经硒处理后在免疫功能及丙二醛(MDA)、谷光甘肽过氧化物酶(GSH-PX)含量等方面的差别. 初步探讨慢性乙型肝炎患者DC功能缺陷的机制, 为以后基于DC的慢性乙型肝炎的免疫治疗提供理论基础. 硒又称抗肝细胞坏死因子, 在保护肝细胞、抗病毒、抗肿瘤等方面研究很多, 但对DC的保护和功能影响方面国内外尚未见公开报道.

1 材料和方法

1.1 材料 本院附属医院、州传染病医院就诊慢性乙型肝炎患者28例, 年龄21-45(平均38.1)岁, 男17例, 女11例. 慢性乙型肝炎诊断符合2000年西安中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订标准[2], 排除HAV, HCV, HDV, HEV等病毒及其他原因(药物、酒精、中毒)造成的急慢性肝损伤. 健康自愿者12例, 年龄23-37(平均29.2)岁, 男8例, 女4例. 研究对象均无心脑肾等疾病, 及其他器官合并症. 所有患者及健康志愿者血液采集均经本人知情同意. 人重组粒细胞-单核细胞刺激集落因子(rhGM-CSF)、人重组白细胞介素4(rhIL-4)、干扰素α(IFN-α)、无血清培养基AIM-V购自美国Gibco公司, 淋巴细胞分离液(1.077 kg/L)购自天津TBD公司. 鼠抗人CD80(FITC)、CD86(PE) mAb, IL-12p^{70}ELISA试剂盒购自晶美公司. 亚硒酸钠购自北京中联试剂公司AR级试剂. MDA, GSH-PX试剂盒购自南京建成公司. 荧光探剂DPH购自Sigma公司.

1.2 方法 把乙肝患者外周血来源的DC分成2份, 一份直接培养诱导为乙肝组; 另一份加入亚硒酸钠(0.3 mmol/L)共培养为加硒组, 健康人外周血DC为对照组. 从外周血单核细胞中分离培养DC, 具体方法参照Romani *et al*[3]方法.

1.2.1 DC功能测定 同种混合淋巴细胞反应(MLR): 每一标本均取同一个体淋巴细胞, 调整细胞浓度. 将收获的DC细胞, 用AIM-V悬浮, 先用丝裂霉素25 mg/L处理45 min, Hank's洗3遍, 调整浓度为1×10^8/L, 加入效应细胞孔中, 淋巴细胞: DC数量分别为10∶1, 20∶1, 50∶1, 阴性孔不加DC, 每组设5个复孔, 培养3 d. MTT法检测细胞活性: 加入MTT(5 g/L) 20 μL, 培养4 h, 吸去上清加入150 μL二甲亚砜(DMSO), 振荡10 min, 使结晶充分溶解, 用酶联免疫检测仪于570 nm处, 测*A*值并记录结果, 用5孔均值表示DC刺激淋巴细胞增殖能力表示. IL-l2P^{70}检测: 采用IL-12P^{70}ELISA试剂盒检测, 严格按照说明书操作, 酶标仪读数, 作标准曲线, 确定含量.

1.2.2 MDA和GSH-Px活力测定 第7天培养的DC调整细胞浓度为1×10^9/L. 取100 μL加入900 μL的PBS缓冲液, 置-70℃冰箱中反复冻融2次, 致细胞完全破裂, 然后于4℃下8000 *g*离心15 min, 去胞核碎片, 取上清液分别按MDA和GSH-Px试剂盒说明书操作, 分别532 nm(MDA)和412 nm(GSH-Px)波长下测光密度(*A*值), 计算GSH-Px活力单位(GSH-PX活力 = (非酶管*A*值-酶管*A*值)/(标准管*A*值-空白管*A*值)×标准管浓度 × 稀释倍数 × 样本测试前稀释倍数). GSH-

■同行评价
DC如何打破HBV感染后的免疫低下状态是治疗慢性乙型肝炎的研究课题之一, 本研究认为补硒可以提高DC的抗氧化损伤的作用, 从而改善DC的功能. 结果可信, 结论较科学.

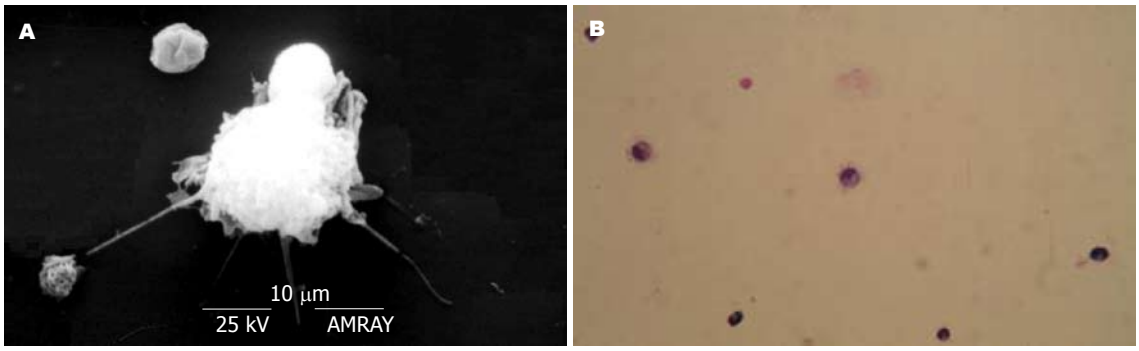


图 1 DC形态学观察. A: 扫描电镜×4500; B: 瑞氏染色×400.

表 1 DC分泌IL-12P70的水平及其对同种异体淋巴细胞刺激作用

分组	*n*	*A*值			IL-12P70 (ng/L)
		1∶10	1∶20	1∶50	
乙肝	28	0.127±0.025	0.202±0.021	0.365±0.038	12.46±0.17
加硒	28	0.168±0.013[b]	0.273±0.017[b]	0.471±0.012[b]	16.93±0.32[b]
对照	12	0.173±0.016[b]	0.287±0.015[b]	0.487±0.022[b]	21.43±0.43[b]

[b]*P*<0.01 *vs* 乙肝组.

Px活力单位规定为: 1×10^{5}个DC细胞的上清液在37℃反应5 min, 扣除非酶反应, 使GSH浓度降低1 μg分子为一个酶活力单位.

MDA的值表示为1×10^{5}个DC细胞的上清液的含量. MDA含量计算公式: MDA含量(μmol/L) = (测定管吸光度-测定空白管吸光度)/(标准管吸光度-标准空白管吸光度)×标准品浓度×样本测试前稀释倍数.

1.2.3 DC膜流动性的测定 收集各组细胞, 用Beccerica[4]法测定膜流动性. 各组细胞悬于AIM-V培养基中, 细胞浓度为1×10^9/L. 加等量2×10^6 mol/L的荧光探剂DPH(Sigma产品), 于25℃温育30 min, 在MPF-4型荧光分光光度计上, 432 nm(发射光)/362 nm(激发光)条件下, 测定荧光偏振度(ρ), 并计算成微黏度(η). η值与膜流动性呈反比.

统计学处理 用SAS9.0程序进行方差分析, 结果以均数±标准差(mean±SD)表示, *P*<0.05表示差异显著, *P*>0.05表示无显著差异.

2 结果

2.1 DC形态学观察 倒置显微镜下观察诱导的DC呈悬浮生长, 于培养的1-2 d可见细胞呈单层均匀分布, 于3-4 d, 可见细胞呈积聚趋势, 簇状生长, 形成大小不等的DC细胞集落, 形态较不规则, 可见DC细胞表面有许多“毛刺”. 培养至7 d, 可见到大量具有树突状突起的悬浮细胞. 并随着培养时间的延长, 细胞变大, 突起更明显. 同时观察到贴壁拉长的“巨噬细胞”, 同样也随培养时间的延长, 细胞逐渐变大. 透射电镜观察到成熟的DC表面有多量突起, 胞核偏位, 核内染色质疏松, 常染色质多, 异染色质少, 附于核膜下及核仁周围, 核仁明显. 胞质有丰富线粒体和粗面内质网. 扫描电境观察到DC表面呈沟回状, 具有较多的细长突起. Wright-Giemsa染色见DC细胞大小不一、细胞体有明显突起, 细胞核较大, 形态各异, 细胞核内染色质疏松程度不一(图1).

表 2 乙肝组、加硒组、对照组细胞内GSH-Px和MDA的活性比较

分组	*n*	MDA(nkat/10^6 cells)	GSH-PX(nkat/10^6 cells)
乙肝	14	29.17±3.50	1089.38±89.52
加硒	14	18.17±2.83	1785.86±57.01
对照	12	13.67±2.17	1579.15±80.18

[a]*P*<0.05 *vs* 乙肝组; [c]*P*<0.05 *vs* 对照组.

表 3 亚硒酸钠对DC膜流动性的影响

分组	*n*	ρ/10^6 cells	η/10^6 cells
对照组	14	0.196±0.018	0.139±0.009
乙肝组	14	0.241±0.017[b]	0.172±0.008[b]
加硒组	12	0.201±0.014[c]	0.151±0.012[c]

[b]*P*<0.01 *vs* 对照组; [c]*P*<0.05 *vs* 乙肝组.

2.2 慢性乙型肝炎患者DC分泌IL-12及刺激同种异体淋巴细胞增殖作用 同种混合淋巴细胞

反应时, 少量的DC即可刺激自身淋巴细胞增殖, *A*值明显高于未加DC组. 乙肝组在在不同的比例下(1∶10、1∶20、1∶50)刺激自身淋巴细胞增殖的能力比对照组明显降低, 加硒组明显高于乙肝组(P<0.01). 乙肝组DC分泌的IL-l2P^{70}的水平明显低于对照组, 加硒组IL-l2P^{70}的水平高于乙肝组(P<0.01)(表1).

2.3 DC细胞内GSH-Px和MDA的活性 乙肝组DC细胞内的GSH-Px的活性明显低于对照组(P<0.05); 加硒组高于乙肝组(P<0.05). MDA的活性乙肝组明显高于加硒组、对照组(P<0.05)(表2).

2.4 亚硒酸钠对DC膜流动性的影响 DC经亚硒酸钠预作用后, 可明显对抗脂质过氧化损伤, 保持较好的膜流动性(表3).

3 讨论

我国是HBV感染的高发区, 约3千万为慢性乙型肝炎患者. HBV感染所形成的免疫功能低下是HBV感染慢性化的因素之一, 因此打破HBV感染后的免疫低下状态是治疗慢性乙型肝炎的关键[5]. 目前认为, DC是至今发现的抗原呈递细胞中功能最为强大的一类, 且是一种专职的抗原提呈细胞, 能对抗原进行捕获、加工、处理, 并通过外周血或淋巴管从淋巴组织中迁徙至靶器官中, 诱导活性T淋巴细胞的增殖, 进而形成有效的免疫保护力[6]. 研究发现, 慢性乙型肝炎患者外周血的DC功能往往是有缺陷性的, DC功能的缺陷是造成慢性病毒性肝炎感染者体内缺乏有效的CTL应答[7-8], 其DC在增殖数量和刺激淋巴细胞增殖能力上较正常人明显降低, 产生的IL-12水平亦下降, 认为DC功能损害是造成免疫反应低下、HBV持续感染的重要原因之一[9-10].

Arima *et al*[11]原位杂交PCR和原位RT-PCR检测发现慢性乙型肝炎患者约占20%-40%DC中含有HBV DNA和HBV RNA. HBV DNA在DC中定位表明, 在慢性乙型肝炎患者体内DC是HBV的肝外储存场所之一; DC中HBV RNA的定位则表明, DC可能也是HBV相关蛋白质合成场所. 病毒性肝炎的发病机制非常复杂, 自由基及其引发的脂质过氧化反应也是其分子病理学基础之一. 自由基参与了机体生理活动的某些有益环节, 如参与吞噬细胞杀菌过程以及核糖核苷的还原等, 但过多的自由基会导致细胞、亚细胞和分子结构的破坏, 并随着破坏层次逐渐扩展造成功能损伤, 因此构成很多疾病的病理学基础[12]. 大量研究发现, 自由基可诱导巨噬细胞、T细胞、B细胞凋亡. 影响Th1细胞产生IL-2; 而对Th2细胞产生的IL-4, IL-10则影响不大[13]. 慢性肝炎患者血中脂质过氧化物(LPO)含量明显升高, 外周血单个核细胞(PBMC)产生IL-2活性水平及其膜上IL-2受体表达能力下降, 而自由基攻击、脂质过氧化损伤可能是产生上述现象的原因之一[13-14]. 我们在实验中发现, 乙肝组DC细胞内脂质过氧化产物-丙二醛与对照组比较明显升高, 与上述观点相符. 另有文献报道硒可以改善肝脏的过氧化状态, 提高DC的抗氧化能力, 提示过量自由基与DC功能下降有一定的联系. 临床流行病学研究表明, 各型肝病患者均不同程度缺硒或血硒水平低下, 并与病情相关[14]. 有学者提出HBV、HCV存在及表达硒蛋白GSH-PX基因的理论[15-16], 进一步从基因及蛋白质水平证明HCV、HBV感染DC细胞后, 改变硒蛋白GSH-PX表达, 与硒结合蛋白相互作用从而干扰脂质过氧化作用, 影响DC的功能. 硒既能通过GSH-PX活性降低分解过氧化物及利用谷胱苷肽的还原作用发挥抗氧化作用, 又能增强维生素E的抗氧化功能, 从而阻止过氧化物对细胞膜、线粒体、及溶酶体膜上的脂质产生破坏性的过氧化反应, 保护细胞膜的完整性、稳定性及细胞的正常生理功能.

本实验显示, 慢性乙肝患者DC细胞内的GSH-PX活性降低, 从而进一步印证了HBV感染DC存在过氧化损伤及抗氧化损伤的能力减弱; 体外加入适当剂量的硒后GSH-PX活性升, 高提示补硒可以提高DC的抗氧化损伤的作用, 从而改善DC的功能. 我们在体外培养慢性乙型肝炎患者外周血DC中加硒后, 结果显示, 经硒作用后的乙肝患者的DC在刺激自身淋巴细胞增殖反应的中显示硒能够明显提高DC对淋巴细胞的增殖反应. 同时经硒作用后的DC分泌的细胞因子IL-12的量也明显升高. 提示硒在一定程度上能够恢复DC的功能. 有关硒的作用机制目前尚不清楚, 有研究认为, 硒通过改善免疫功能(如NK细胞活性, 细胞毒性、细胞活性及抗体形成)增加宿主的抵抗力,主要通过以下两个方面影响免疫细胞的功能[17-18]: 一方面, 硒可能直接在mRNA转录水平影响免疫活性细胞表面某些受体, IL-2R、转铁蛋白受体等表达; 另一方面与硒的抗氧化作用有关,硒和含硒酶可抑制细胞膜脂质过氧化损伤, 保护细胞的结构及膜的流动性, 维护细胞的功能表达.

近年来硒与免疫的关系日益受到大家重视.

硒对机体的非特异性免疫、细胞免疫和体液免疫均存在重要影响. 硒的摄入量如果不足时可损坏机体免疫系统的发育和功能. 补充适当剂量的硒可使细胞免疫, 体液免疫, 非特异性免疫功能得到改善, 有利于细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的诱导, 并明显加强CTL的细胞毒活性, 能刺激蛋白质及抗体的产生, 还可以影响吞噬细胞的杀菌活力, 显著提高吞噬过程中吞噬细胞的存活率和吞噬率.

此外, 国内外有研究发现反转录病毒含有编码硒蛋白的UGA密码子, 提示硒与病毒复制有关[19]. 在病毒复制过程中, 硒的需要量增加导致硒缺乏时细胞的抗氧化作用降低, 并产生过量的毒害宿主细胞的氧自由基. 同时硒缺乏导致病毒基因组的氧化性损害, 诱导病毒致病性的突变. 认为补硒可预防某些病毒的复制, 还可能预防或调节病毒性疾病的病程[20].

4 参考文献

1 汪晓莺, 朱俊, 汤伟, 张学光, 刘玲. 慢性乙型肝炎患者外周血来源树突状细胞的功能状态. 上海免疫学杂志 2002; 22: 329-331

2 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 324-329

3 Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 1996; 196: 137-151

4 Beccerica E, Piergiacomi G, Curatola G, Ferretti G. Changes of lymphocyte membrane fluidity in rheumatoid arthritis: a fluorescence polarisation study. *Ann Rheum Dis* 1988; 47: 472-477

5 Lok AS. Chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2002; 346: 1682

6 Coombes BK, Mahony JB. Dendritic cell discoveries provide new insight into the cellular immunobiology of DNA vaccines. *Immunol Lett* 2001; 78: 103-111

7 李用国, 罗云萍, 梁增伟, 任红. 慢性乙型肝炎患者外周血树突状细胞HbsAg的提呈作用. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 330-333

8 于建武, 王贵强, 吕淑兰. 慢性乙型肝炎患者外周血树突状细胞功能的研究. 中华传染病杂志 2001; 19: 144-147

9 Abe M, Kajino K, Akbar SM, Yamamura K, Onji M, Hino O. Loss of immunogenecity of liver dendritic cells from mouse with chronic hepatitis. *Int J Mol Med* 2002; 9: 71-76

10 Wang FS, Xing LH, Liu MX, Zhu CL, Liu HG, Wang HF, Lei ZY. Dysfunction of peripheral blood dendritic cells from patients with chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 537-541

11 Arima S, Akbar SM, Michitaka K, Horiike N, Nuriya H, Kohara M, Onji M. Impaired function of antigen-presenting dendritic cells in patients with chronic hepatitis B: localization of HBV DNA and HBV RNA in blood DC by in situ hybridization. *Int J Mol Med* 2003; 11: 169-174

12 陈万芳. 家畜病理生理学. 北京: 中国农业出版社, 1997: 59-63

13 Taylor-Robinson AW, Liew FY, Severn A, Xu D, McSorley SJ, Garside P, Padron J, Phillips RS. Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. *Eur J Immunol* 1994; 24: 980-984

14 王志新, 李梦东, 徐华模, 丁波. 病毒性肝炎患者血硒、过氧化脂质和谷胱甘肽过氧化物酶活力测定的临床意义. 中华传染病杂志 1990; 8: 209-210

15 Zhang W, Cox AG, Taylor EW. Hepatitis C virus encodes a selenium-dependent glutathione peroxidase gene. Implications for oxidative stress as a risk factor in progression to hepatocellular carcinoma. *Med Klin (Munich)* 1999; 94 Suppl 3: 2-6

16 Chrobot AM, Szaflarska-Szczepanik A, Drewa G. Antioxidant defense in children with chronic viral hepatitis B and C. *Med Sci Monit* 2000; 6: 713-718

17 Foster LH, Sumar S. Selenium in health and disease: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1997; 37: 211-228

18 Kiremidjian-Schumacher L, Roy M. Selenium and immune function. *Z Ernahrungswiss* 1998; 37 Suppl 1: 50-56

19 Aho H, Schwemmer M, Tessman D, Murphy D, Mattei G, Engel W, Adham IM. Isolation, expression, and chromosomal localization of the human mitochondrial capsule selenoprotein gene (MCSP). *Genomics* 1996; 32: 184-90

20 Levander OA, Beck MA. Interacting nutritional and infectious etiologies of Keshan disease. Insights from coxsackie virus B-induced myocarditis in mice deficient in selenium or vitamin E. *Biol Trace Elem Res* 1997; 56: 5-21

电编 李琪 编辑 张焕兰

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年2月18日; 15(5): 533-536
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

谷胱甘肽转硫酶T1基因型与溃疡性结肠炎易感性的关系

王文星, 夏宣平, 蒋 益, 林李淼, 张定亮, 曹曙光

王文星, 夏宣平, 蒋益, 林李淼, 张定亮, 曹曙光, 温州医学院附属第二医院消化科 浙江省温州市 325027
温州市科技局资助项目, No. W2004A065
通讯作者: 王文星, 325027, 浙江省温州市, 温州医学院附属第二医院消化科. jaccostar@163.com
电话: 0577-88816311 传真: 0577-88816411
收稿日期: 2006-11-09 接受日期: 2006-12-18

Association between genetic polymorphism of glutathione S-Transferase T1 and the susceptibility to ulcerative colitis

Wen-Xing Wang, Xuan-Ping Xia, Yi Jiang, Li-Miao Lin, Ding-Liang Zhang, Shu-Guang Cao

Wen-Xing Wang, Xuan-Ping Xia, Yi Jiang, Li-Miao Lin, Ding-Liang Zhang, Shu-Guang Cao, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang Province, China
Supported by the Fund from Science and Technology Bureau of Wenzhou City, No. W2004A065
Correspondence to: Wen-Xing Wang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, Zhejiang Province, China. jaccostar@163.com
Received: 2006-11-09 Accepted: 2006-12-18

Abstract

AIM: To investigate the association between the genetic polymorphism of glutathione S-Transferase T1 and the susceptibility to ulcerative colitis.

METHODS: Polymerase chain reaction (PCR) was used to study the genetic polymorphisms of GSTT1 gene, then the discrepancies of GSTT1 gene polymorphism between the patients with ulcerative colitis and the healthy controls were analyzed using chi-square test.

RESULTS: The frequency of null genotype for GSTT1 was significantly higher in the patients with ulcerative colitis than that in the controls (64.7% *vs* 47.1%, P = 0.007, OR = 2.050, 95%CI: 1.208-3.480). Further analysis showed that the frequency of GSTT1 null genotype was also higher in the patients with distal colitis than that in the cases with total colitis (71.8% *vs* 31.3%, P = 0.002, OR = 5.408, 95%CI: 1.698-17.231). There was no correlation between the frequency of GSTT1 null genotype and the severity degree of ulcerative colitis (P > 0.05).

CONCLUSION: GSTT1 genotype is closely correlated with the incidence of ulcerative colitis in Han Chinese of Zhejiang Province.

Key Words: Glutathione S-transferase T1; Genotype; Ulcerative colitis; Susceptibility

Wang WX, Xia XP, Jiang Y, Lin LM, Zhang DL, Cao SG. Association between genetic polymorphism of glutathione S-Transferase T1 and the susceptibility to ulcerative colitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(5):533-536

摘要

目的: 探讨谷胱甘肽转硫酶(GST)T1基因型与中国浙江汉族人群溃疡性结肠炎(UC)易感性的关系.

方法: 应用聚合酶链反应技术检测99例溃疡性结肠炎(UC)患者和140例健康对照中的GSTT1基因型, 采用χ^2检验, 分析比较GSTT1基因型在UC患者和健康人群中的分布差异.

结果: GSTT1(-)基因型频率在UC组和对照组分布有显著性差异(64.7% *vs* 47.1%, P = 0.007, OR = 2.050, 95%CI: 1.208-3.480); 根据UC临床特征进一步分层分析, GSTT1(-)基因型在远端UC中的分布频率高于广泛结肠UC(71.8% *vs* 31.3%, P = 0.002); GSTT1(-)基因型与UC病情严重程度无关(P>0.05).

结论: GSTT1基因型与中国浙江汉族人群UC相关.

关键词: 谷胱甘肽转硫酶; 基因型; 溃疡性结肠炎; 易感性

王文星, 夏宣平, 蒋益, 林李淼, 张定亮, 曹曙光. 谷胱甘肽转硫酶T1基因型与溃疡性结肠炎易感性的关系. 世界华人消化杂志 2007;15(5):533-536
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/533.asp

■背景资料
炎症性肠病(IBD)是一组病因至今不明的慢性肠道非特异性炎症, 主要包括溃疡性结肠炎(UC)和克罗恩病(CD), 其病因主要涉及环境、遗传、免疫等因素的综合作用, 这些因素导致肠黏膜免疫反应过度而损伤肠黏膜. 谷胱甘肽转硫酶(GST)是一组同工酶, 可催化一些外源性致癌物和体内正常代谢产生的亲脂性物质与谷胱甘肽(GSH)结合, 从而增强这些物质的极性, 有利于被灭活或清除, 从而提高机体对外来化合物的解毒作用.

■**创新盘点**
本文研究了谷胱甘肽转硫酶T1基因型与中国浙江汉族人群溃疡性结肠炎易感性的相关性, 表明GSTT1基因型多态性与中国浙江人群UC明显相关, 空白GSTT1基因型与UC病情严重程度无相关性.

0 引言

毒物代谢酶谷胱甘肽转硫酶(glutathione s-transferase, GST)是一组同工酶, 是外源性化合物代谢过程中一种重要的Ⅱ相代谢酶, 能催化多种Ⅰ相酶代谢活化产生的具致癌活性的亲电性或亲脂性致癌物质与谷胱甘肽(GSH)巯基(-SH)共轭结合, 形成亲水性物质排出体外, 从而提高机体对外来化合物的解毒作用. GST几乎广泛存在于人体所有的细胞和组织, 尤其在生殖腺、肝脏、结肠中表达较高. GSTT1是θ类GST, 在人群中存在遗传多态性, 这种多态性与人体对环境中毒性物质的解毒能力相关, 从而影响到个体对疾病尤其是对肿瘤的易感性. 炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一组病因至今不明的慢性肠道非特异性炎症, 主要包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn'disease, CD). IBD的病因主要涉及环境、遗传、免疫等因素的综合作用, 这些因素导致肠黏膜免疫反应过度而损伤肠黏膜. 国内外尚未见GST基因多态性与IBD相关性的研究报道, 本研究通过比较GSTT1基因型在中国浙江汉族正常人群和UC患者之间的分布差异, 旨在阐明UC的遗传易感性.

1 材料和方法

1.1 *材料* UC病例99例来自2000-01/2006-05在温州医学院附属二医院以及温州市其他大型综合性医院住院或门诊患者, 诊断标准参照2001年中华医学会关于“对炎症性肠病诊断治疗规范的建议”[1], 经临床、实验室、放射学、内镜及组织学综合性诊断确立. 其中男56例, 女43例, 发病年龄16-68(平均36.2±1.3)岁. 病变范围: 单纯累及直肠40例、累及直肠乙状结肠26例、累及左半结肠17例、累及全结肠16例(将累及直肠和/或乙状结肠归为远端组; 累及左半结肠或全结肠归为广泛结肠组). 所有UC病例按照临床症状及纤维结肠镜下表现分为: (1)轻度58例: 全身情况好, 无发热贫血, 腹泻<4次/d, 病变主要在直肠和/或乙状结肠, 镜检见黏膜充血水肿或表面呈现颗粒状, 质脆. (2)中度29例: 食欲正常或减少, 体质量下降, 腹泻5-9次/d, 脓血便明显, 镜检见肠黏膜除充血水肿外尚有糜烂溃疡或渗出物, 病变累及左半结肠、右半结肠或全结肠. (3)重度12例: 全身衰竭、消瘦、发热或体温正常、贫血脉速、血沉快、腹泻>10次/d, 黏液血便明显, 镜检肠黏膜表面充血、糜烂、溃疡形成或伴有黏膜坏死、脱落, 右半结肠或全结肠受累. 对照组140例, 系同期我院门诊健康体检者, 其中男78例, 女62例, 年龄20-65(平均43.8±6.7)岁. 全部研究对象均为无血缘关系的浙江汉族人.

1.2 *方法* 取静脉血5 mL, EDTA抗凝, 蛋白酶K消化, 酚/氯仿法抽提DNA. 紫外分光光度计定量, 4℃保存备用. 采用聚合酶链反应技术扩增GSTT1目的基因. β球蛋白(268 bp)作为内对照(由上海生物工程有限公司合成PAGE纯化). 参照文献[2-3]设计基因扩增引物序列如下: GSTT1: 上游5'TCACCGGATCATGGCCAGCA3'; 下游5'TTCCTTACTTGGTCCTCACATCTC3'; β球蛋白引物: 5'CAACTTCATCCACGTTCACATCC3'; 5'GAAGAGCCAAGGACAGGTAC3'. 50 μL PCR反应总体系中含10×PCR缓冲液10 μL; 2.5 mmol/L Mg^{2+}, 200 μmol/L dNTPs, 引物各100 pmol, DNA聚合酶2.5 U, 模板DNA 40 ng. 反应条件, 95℃预变性7 min, 然后94℃ 30 s, 60℃ 40 s, 72℃ 60 s, 共35个循环, 最后72℃延伸10 min. 用50 g/L聚丙烯酰胺凝胶电泳及1.8 g/L硝酸银染色检测PCR产物, GSTT1扩增后产物长度分别为480 bp. 若有480 bp片段者为GSTT1(+), 而无相应的扩增产物者为GSTT1(-).

统计学处理 所有数据输入SPSS11.5统计软件包, 采用χ^2检验分析数据, 计算*OR*值和95%可信区间, $P<0.05$有显著性差异.

2 结果

空白GSTT1基因型在UC患者组中的分布频率均高于正常对照组, 有显著统计学差异(64.7% *vs* 47.1%, $P = 0.007$, $OR = 2.050$, 95%CI: 1.208-3.480). 在UC组中以病变部位、病情严重程度进一步分层分析, 采用χ^2检验, 分析空白GSTT1基因型在不同临床特征的UC患者中的分布差异. 结果发现空白GSTT1基因型在远端UC中的分布频率高于全结肠UC(71.8% *vs* 31.3%, $P = 0.002$, $OR = 5.408$, 95%CI: 1.698-17.231), 有显著统计学差异; 根据临床症状及结肠镜下表现将UC病情分为轻、中、重三度, 并分成轻型(包括轻、中度患者)、重型两组, 发现空白GSTT1基因型在两组中分布无差异($P>0.05$), 表明空白GSTT1基因型与UC病情严重程度无相关性(表1). GSTT1(-)基因型在UC患者中出现频率显著高于正常组, 并且GSTT1(-)基因型虽与UC的病情严重程度无关, 但与发生部位相关, 表明GSTT1基因型多态性与中国浙江人群UC明显相关.

3 讨论

目前认为, IBD属自身免疫性疾病范畴, 主要包括UC和CD, 在病理组织学上共同表现为肠黏膜的慢性非特异性炎症. IBD具有遗传易感性, 主要表现为IBD患者一级亲属发病率增高, 单卵双生子发病率高于双卵双生子以及犹太人发病率高于其他人种等[4]. UC发病机制涉及环境、遗传、免疫、肠黏膜屏障功能等因素, 这些因素综合作用于遗传易感者, 导致肠黏膜免疫反应异常, 引起肠黏膜损伤, 其中遗传免疫因素在UC发病机制中的作用最为肯定[5-7]. UC有癌变倾向, 其发生肠癌的危险性与疾病持续时间和病变范围有关. GSTs是人体内重要的毒物代谢酶, 能催化多种Ⅰ相酶代谢活化产生的毒性致癌物与GSH巯基(-SH)结合, 增加其水溶性, 从而促进毒性物质的排出. GSTs家族包括四个主要成员: GSTsα(GSTA), GSTsμ(GSTM), GSTsπ(GSTP), GSTsθ(GSTT), 均具有遗传多态性[8]. GSTs在人体内广泛存在, 不仅对毒性代谢产物起解毒作用, 而且在保护人体DNA避免损伤及促进DNA修复方面也有重要影响[9]. GSTs酶的活性降低或缺失能增加正常细胞的突变, 促进肿瘤形成[10]. GSTs在人体中的重要生理作用与GSTs活性密切相关, 而GSTs的活性是由GST基因多态性所决定, GST基因多态性使不同人群GSTs对毒性代谢产物清除能力发生差异, 从而影响人体对多种疾病尤其是肿瘤的易感性[11].

人类GSTs编码基因易缺失, 表现为GST空白基因型[GSTM1(-), GSTT1(-), GSTP1(-)], 携带GST空白基因型的个体, 肝脏中不能表达相应的GSTs蛋白, 导致对化学致癌物解毒能力的下降, 增加对肿瘤等疾病的易感性. 空白GSTT1基因型频率在不同人群中存在分布差异: 12%-62%[12-13]. GSTT1酶主要参与人体对烟草中所含毒物的代谢, 如甲烷、氧化乙烯等. 空白GSTT1纯合子基因型者由于体内所有组织缺乏GSTT1酶, 导致人体对某些疾病的易感性增加. 现有关于空白GSTT1基因与疾病相关性的研究报道, 其结果都不尽相同: Kelsey *et al*[14]发现空白GSTT1基因型者发生少突神经胶质细胞瘤的危险性增加. 另有报道, 空白GSTT1基因型者中发生脑脊髓膜瘤和星型细胞瘤的频率增高[15]; 也有研究发现空白GSTT1基因型与大肠癌和肺癌的发病相关[8], 而与乳腺癌无相关性[16]. 而Trizna *et al*[17]在研究中发现空白GSTT1基因型频率在神经胶质细胞瘤患者与正常对照组之间分布无差异. 分析造成上述研究结果不同的原因可能与人种、样本的大小、实验方法等因素有关.

表 1 GSTT1基因型在UC患者和健康对照组中的分布比较

分组	*n*	GSTT1	
		(+)	(–)
UC组	99	35(35.3%)	64(64.7%)[b]
远端UC	83		59(71.8%)[d]
全结肠UC	16		5(31.3%)
轻型	87		55(63.2%)
重型	12		9(75.0%)
对照组	140	74(52.9%)	66(47.1%)

[b]*P* = 0.007 *vs* 对照组; [d]*P*=0.002 *vs* 全结肠组.

本研究发现, 浙江汉族正常人群中, 空白GSTT1基因型频率为47.1%, 与已有的流行病学调查结果[18](49%)相符. 而UC患者中空白GSTT1基因型频率明显增高, 为64.7%. 采用χ^2检验, 发现空白GSTT1基因型频率在UC组和正常对照组之间存在统计学差异(P<0.05), 表明GSTT1基因多态性与中国人群UC存在相关性. 根据临床特征, 进一步对UC进行分层分析, 发现空白GSTT1基因型在远端UC中的分布频率高于广泛结肠UC(P<0.05), 有显著统计学差异. 根据临床症状结合结肠镜下表现将UC病情分为轻、中、重三度, 并分成轻型(包括轻、中度患者)、重型两组, 发现空白GSTT1基因型在两组中分布无差异(P>0.05), 表明空白GSTT1基因型与UC病情严重程度无关. 在我们的前期研究工作中, 曾经探讨过N-乙酰转移酶2(NAT2)基因与UC的相关性, 研究没有发现NAT2基因多态性与中国人群UC有相关性, 但却发现慢型乙酰化基因型患者服用SASP(柳氮磺胺吡啶)后, 比快、中型乙酰化基因型者容易出现SASP相关性副反应, 因此通过对UC患者NAT2基因型进行检测, 可以预见该患者服药后发生副反应的几率[19]. 谷胱甘肽转硫酶和N-乙酰转移酶都是人体内重要的毒物代谢酶, 两类酶的活性分别受GST基因和NAT基因多态性的影响. 由于毒物代谢酶的活性在不同种族和个人之间存在差异, 结果将导致不同人群对多种疾病的易感性有所不同. 本研究结果发现, 空白GSTT1基因型与中国汉族UC明显相关, 空白GSTT1基因型者中发生UC的易感性增加.

■应用要点

本研究将GST基因多态性与IBD联系起来, 研究GSTT1基因型与UC易感性的关系, 阐明UC的遗传易感性提供依据, 具有重要的科学意义与临床价值.

4 参考文献

1 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
2 Bell DA, Taylor JA, Paulson DF, Robertson CN, Mohler JL, Lucier GW. Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1159-1164
3 Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B, Taylor JB. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 1994; 300 (Pt 1): 271-276
4 Xia B, Crusius JB, Wu J, Zwiers A, van Bodegraven AA, Pena AS. CTLA4 gene polymorphisms in Dutch and Chinese patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 1296-1300
5 李晶珏, 胡刚正, 林连捷, 郑长青. 溃疡性结肠炎的易感基因. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1570-1573
6 刘慧荣, 郑昱, 吴焕淦, 费晓燕. 溃疡性结肠炎相关基因研究. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1631-1637
7 任宏宇, 宋军, 易粹琼. IBD的病理生理和病因学进展. 世界华人消化杂志 2004; 12: 177-179
8 Hirvonen A. Polymorphisms of xenobiotic-metabolizing enzymes and susceptibility to cancer. *Environ Health Perspect* 1999; 107 Suppl 1: 37-47
9 Deakin M, Elder J, Hendrickse C, Peckham D, Baldwin D, Pantin C, Wild N, Leopard P, Bell DA, Jones P, Duncan H, Brannigan K, Alldersea J, Fryer AA, Strange RC. Glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cancer: studies of interactions with GSTM1 in lung, oral, gastric and colorectal cancers. *Carcinogenesis* 1996; 17: 881-884
10 Rebbeck TR. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6: 733-743
11 Curran JE, Weinstein SR, Griffiths LR. Polymorphisms of glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and breast cancer susceptibility. *Cancer Letters* 2000; 153: 113-120
12 Nelson HH, Wiencke JK, Christiani DC, Cheng TJ, Zuo ZF, Schwartz BS, Lee BK, Spitz MR, Wang M, Xu X. Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. *Carcinogenesis* 1995; 16: 1243-1245
13 Lee EJ, Wong JY, Yeoh PN, Gong NH. Glutathione S transferase-theta (GSTT1) genetic polymorphism among Chinese, Malays and Indians in Singapore. *Pharmacogenetics* 1995; 5: 332-334
14 Kelsey KT, Wrensch M, Zuo ZF, Miike R, Wiencke JK. A population-based case-control study of the CYP2D6 and GSTT1 polymorphisms and malignant brain tumors. *Pharmacogenetics* 1997; 7: 463-468
15 Elexpuru-Camiruaga J, Buxton N, Kandula V, Dias PS, Campbell D, McIntosh J, Broome J, Jones P, Inskip A, Alldersea J. Susceptibility to astrocytoma and meningioma: influence of allelism at glutathione S-transferase (GSTT1 and GSTM1) and cytochrome P-450 (CYP2D6) loci. *Cancer Res* 1995; 55: 4237-4239
16 Helzlsouer KJ, Selmin O, Huang HY, Strickland PT, Hoffman S, Alberg AJ, Watson M, Comstock GW, Bell D. Association between glutathione S-transferase M1, P1, and T1 genetic polymorphisms and development of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 512-518
17 Trizna Z, de Andrade M, Kyritsis AP, Briggs K, Levin VA, Bruner JM, Wei Q, Bondy ML. Genetic polymorphisms in glutathione S-transferase mu and theta, N-acetyltransferase, and CYP1A1 and risk of gliomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7: 553-555
18 Lin GF, Ma QW, Zha YL. Genetic polymorphism of glutathione S-transferase T1 and M1 in Shanghai "indigene" population. *Teratog Carcinog Mutagen* 2001; 13: 10-12
19 蒋益, 薛战雄, 郑君杰, 夏宣平, 王文星, 陈浩, 林李淼. N-乙酰转移酶2基因型多态性与柳氮磺胺吡啶治疗炎症性肠病所产生不良反应的关系. 中国临床药学杂志 2006; 15: 223-226

电编 张敏 编辑 张焕兰

■同行评价
关于谷胱甘肽转硫酶T1基因型频率在不同人群分布的研究已经很多, 在溃疡性结肠炎患者中分布研究还不多, 通过作者研究, GSTT1(-)基因型在UC患者中出现频率显著高于正常组, 与发生部位相关, 表明GSTT1基因型多态性与中国人群UC可能有一定相关, 结论可靠, 有较好的科学性.

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

• 消息 •

世界华人消化杂志的同行评价

本刊讯 《世界华人消化杂志》对所有文章进行在线同行评价, 采用匿名方式. 通常每篇文章邀请2-3位专家审阅, 至少2人通过方可录用, 否则退稿. 每期最后一页致谢本期所有审稿人(含退稿). 文章等级评定: ○A级 ○B级 ○C级 ○D级 ○E级 ○不清楚. 其中A和B属于很好, C和D不算太好, E是很差, 还有一部分是不清楚. (世界胃肠病学杂志社2007-02-18)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年2月18日; 15(5): 537-540
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

运脾润肠法对慢传输型功能性便秘胃肠激素的影响

姜国平, 何 凌, 霍岭霞, 胡 珂, 徐友妹

姜国平, 何凌, 胡珂, 江西中医学院附属医院消化内科 江西省南昌市 330006
霍岭霞, 江西中医学院2003级硕士研究生 江西省南昌市 330006
徐友妹, 江西中医学院附属医院检验科 江西省南昌市 330006
通讯作者: 姜国平, 330006, 江西省南昌市八一大道445号, 江西中医学院附属医院消化内科. jgp4707@163.com
电话: 0791-6363357 传真: 0791-6363357
收稿日期: 2006-07-11 接受日期: 2006-10-18

Effect of spleen activation and intestine moistening on gastrointestinal hermone in slow-transit constipation

Guo-Ping Jiang, Ling He, Ling-Xia Huo, Ke Hu, You-Mei Xu

Guo-Ping Jiang, Ling He, Ke Hu, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Ling-Xia Huo, Postgraduate of 2003 Class from Jiangxi University of Traditional of Chinese Medicine, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
You-Mei Xu, Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Correspondence to: Guo-Ping Jiang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, 445 Bayi Road, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. jgp0712@sina.com
Received: 2006-07-11 Accepted: 2006-10-18

Abstract

AIM: To assess the therapeutic efficacy of spleen activation and intestine moistening for solw-transit constipation as well as its effect on the levels of gastrointestinal neurotic mediators such as serum nitric oxide (NO) and plasma substance P (SP).

METHODS: A total of 90 patients with slow-transit constipation were divided into group A (n = 60) and B (n = 30), treated with Mitong (a Chinese medicine for spleen activation and intestine moistening) and mosapride, respectively. Another 30 healthy individuals served as controls. Radioimmunoassay was used to examine the levels of serum NO and plasma SP before and after treatment.

RESULTS: The total efficacy rate for clinical symptom was significantly higher in group A than that in group B (93.3% *vs* 73.3%, $P < 0.05$), and the cure rate was also significantly higher in group A (20% *vs* 0%, $P < 0.05$). Before treatment, the serum level of NO was higher while the plasma level of SP was lower than that group C. After treatment, NO and SP levels in group B were still significant different from those in group C (NO: 70.53 ± 9.48 μmol/L *vs* 62.56 ± 10.01 μmol/L, $P < 0.05$; SP: 30.15 ± 5.25 μmol/L *vs* 34.55 ± 4.39 μmol/L, $P < 0.05$), but they were not markedly different between group A (NO: 66.24 ± 14.09 μmol/L; SP: 34.36 ± 6.35 μmol/L) and C.

CONCLUSION: The therapy of spleen activation and intestine moistening is effective for slow-transit constipation, and it can regulate the levels of serum NO and plasma SP.

Key Words: Spleen activation; Intestine moistening; Slow-transit comstipation; Nitrc oxide; Substance P

Jiang GP, He L, Huo LX, Hu K, Xu YM. Effect of spleen activation and intestine moistening on gastrointestinal hermone in slow-transit constipation. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(5):537-540

摘要

目的: 观察中医运脾润肠法治疗慢传输型便秘(slow-transit constipation, STC)的临床疗效及对血清一氧化氮(NO)、血浆P物质(SP)水平的影响.

方法: 选择确诊为STC患者90例随机分为2组, 应用秘通治疗60例, 莫沙必利治疗30例, 并设正常对照组30例, 采用放射免疫法(RIA)测定中药治疗组及西药对照组治疗前、后空腹状态血清NO和血浆SP水平.

结果: 中药治疗组临床症状总有效率为93.3%, 西药对照组为73.3%, 两组对比有显著性差异(P<0.05), 且前者临床痊愈率为20%, 明显高于西药对照组0%(P<0.05). 治疗前, 中药治疗组和西药对照组血浆SP水平低于正常组, 血

■背景资料
功能性胃肠病是目前国内外研究的热点及难点, 其中功能性便秘是临床常见病, 慢性传输型便秘占功能性便秘总发生率的45.5%, 目前其病因及发病机制尚不完全明了, 治疗也较为棘手, 尚无安全有效的西药, 探索中医药治疗有非常重要的价值.

■**创新盘点**
本文采用具有运脾润肠作用的中药治疗本病, 探索其作用机制是否与调节胃肠激素有关.

清NO水平高于正常组. 治疗后, 西药对照组NO及SP与正常组对比仍有显著性差异(NO: 70.53±9.48 μmol/L *vs* 62.56±10.01 μmol/L, *P*<0.05; SP: 30.15±5.25 μmol/L *vs* 34.55±4.39 μmol/L, *P*<0.05), 而中药组(NO: 66.24±14.09 μmol/L; SP: 34.36±6.35 μmol/L)与对照组无显著差异(*P*>0.05).

结论: 采用中医运脾润肠法治疗STC患者疗效显著, 能调节血清NO和血浆SP浓度, 推动肠道蠕动, 促进肠道排空, 从而改善患者临床症状.

关键词: 运脾润肠法; 慢传输型便秘; 一氧化氮; P物质

姜国平, 何凌, 霍岭霞, 胡珂, 徐友妹. 运脾润肠法对慢传输型功能性便秘胃肠激素的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(5):537-540
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/537.asp

0 引言

功能性便秘(functional constipation, FC)是临床常见病. 慢传输型便秘(slow-transit constipation, STC)为FC的一型, 是指肠内容物从肠近端到结肠和直肠远端的通过时间较正常减慢, 其发病率约占FC总发病率的45.5%[1]. STC的病因及发病机制尚不完全明了, 肠神经元病变、平滑肌变性、中枢神经病变、胃肠激素异常等都只能做出部分解释; 目前国内外统一认为, 肠神经系统(ENS)中肠神经递质的异常是STC发病的重要机制之一. 目前, 在其治疗方面仍存在较大困难, 现代医学采用分级治疗, 首先是药物治疗, 但西药副作用大, 复发率高, 最终求助于手术, 但手术属有创疗法, 患者一般难以接受, 且其疗效尚不完全肯定. 所以, 探索中医药治疗STC无疑是有价值的.

1 材料和方法

1.1 *材料* 入选病例90例来源于江西中医学院附属医院消化内科门诊及住院患者, 所有病例均符合1999-06罗马国际胃肠大会制定的RomeⅡ标准[1]及2003-09在南昌召开的全国便秘专题讨论会制订的“慢性便秘的诊治指南”制定的标准. 将90例患者按2∶1比例随机分为中药治疗组60例和西药对照组30例, 其中中药治疗组男16例, 女44例, 平均年龄50.30岁, 西药对照组男10例, 女20例, 平均年龄47.90岁. 另设正常对照组30名[无任何胃肠、肝、胆、胰等消化系统疾病及其他任何下腹部不适的健康志愿者, 仅空腹抽血查一氧化氮(NO)及血浆P物质(SP)]. 各组性别、年龄比较, 经统计学处理, 无显著差异(*P*>0.05); 中药治疗组和西药对照之间, 病程、症状积分比较, 经统计学处理, 无显著差异(*P*>0.05). SP试剂盒为北京海科锐生物技术中心提供, NO试剂盒为南京建成生物工程研究所提供.

1.2 *方法*

1.2.1 *治疗方法* 中药治疗组口服秘通, 基本药物有生白术、枳实、炙黄芪、玄参、郁李仁、杏仁、桃仁、生车前子、炒莱菔子、蜂蜜等, 制成煎膏剂, 规格为500 mL/瓶, 由江西中医学院附属医院制剂室提供, 30 mL/次, 2次/d, 早晚空腹服用; 西药对照组给予枸橼酸莫沙必利5 mg, 3次/d, 饭前30 min服用.

1.2.2 *检测方法* 临床疗效观察: 两组均治疗4 wk, 停药后分别观察其临床痊愈、显效、有效、无效的患者数及总有效率, 疗效判定标准参照1993年卫生部主编《中药新药治疗便秘的临床研究指导原则》[2]制订的标准. 检测严格按照药盒规定方法进行.

1.2.3 *诊断标准* 西医诊断标准符合1999-06罗马国际胃肠大会制定的RomeⅡ标准及2003-09在南昌召开的全国便秘专题讨论会制订的“慢性便秘的诊治指南”制定的标准; 中医诊断标准符合1993年卫生部主编《中药新药治疗便秘的临床研究指导原则》的诊断标准(表1).

1.2.4 *临床疗效标准* 临床痊愈: 大便正常, 或恢复至病前水平(疗效指数在90%以上, 保持2 wk以上), 其他症状消失; NO和SP水平恢复到正常水平. 显效: 便秘明显改善(90%>疗效指数≥70%, 保持2 wk以上), 其他症状大部分消失; NO和SP水平接近正常水平. 有效: 便秘有所缓解(70%>疗效指数≥30%, 保持2 wk以上), 其他症状均有好转; NO和SP水平有明显趋向正常水平. 无效: 便秘及其他症状均无改善(疗效指数<30%); NO和SP水平无明显变化或偏离正常范围方向改变.

统计学处理 指出均数、标准差, 结果用均数±标准差表示. 等级资料用Ridit分析, 计数资料用χ^2检验, 分组资料中计量资料及治疗前后配对资料用*t*检验及*F*检验. 采用SPSS11.5 for Windows进行统计处理. *P*<0.05者将被认为所检验的判别有统计意义.

表 1 临床症状分级

分级	排便间隔时间	便质	排便费力情况	每次排便时间
0级(各0分)	正常或病前水平	正常或病前水平	正常或病前水平	正常或病前水平
1级(各1分)	超过自己习惯1 d或每3 d排便1次	先干后软	费力伴不适感或排便不尽感, 但只在劳累后发生	15–20 min
2级(各2分)	超过自己习惯1 d或每4 d排便1次	干结成块似腊肠状	费力伴不适感或排便不尽感, 时有发生	21–30 min
3级(各3分)	超过自己习惯3 d以上或每5 d排便1次	干结如羊屎状或大便带血	费力伴不适感或排便不尽感, 经常发生	>30 min

表 2 治疗后两组疗效比较

分组	*n*	临床痊愈	显效	有效	无效	总有效率
中药治疗组	60	12(20%)	24	20	4	93.3%[a]
西药对照组	30	0(0%)	9	13	8	73.3%

[a]*P*<0.05 *vs* 西药对照组.

表 3 治疗前各组NO, SP比较(μmol/L, mean ± SD)

胃肠神经递质	中药治疗组	西药对照组	正常组
NO	89.37 ± 8.76[a]	88.20 ± 9.91[a]	62.56 ± 10.01
SP	24.91 ± 5.98[c]	22.40 ± 6.17[c]	34.55 ± 4.39

[a]*P*<0.05 *vs* 正常组; [c]*P*<0.05 *vs* 正常组.

表 4 治疗后各组NO, SP比较(μmol/L, mean ± SD)

胃肠神经递质	中药治疗组	西药对照组	正常组
NO	66.24 ± 14.09	70.53 ± 9.48[a]	62.56 ± 10.01
SP	34.36 ± 6.35	30.15 ± 5.25[c]	34.55 ± 4.39

[a]*P*<0.05 *vs* 正常组; [c]*P*<0.05 *vs* 正常组.

表 5 治疗前后两组积分比较

积分	中药治疗组	西药对照组
治疗前	14.80 ± 1.67	14.50 ± 1.57
治疗后	4.30 ± 3.01[a]	6.33 ± 3.54

[a]*P*<0.05 *vs* 西药对照组.

2 结果

2.1 临床疗效比较 治疗后中药治疗组明显优于西药对照组, 差异有显著性意义(*P*<0.05, 表2).

2.2 NO, SP的变化 治疗前中药治疗组、西药对照组的血清NO均高于正常对照组, 血浆SP均低于正常对照组, 差异有显著性意义(*P*<0.05), 中、西药组之间无显著差异(*P*>0.05, 表3), 治疗后中药治疗组、西药对照组的血清NO均明显降低, 血浆SP均明显升高, 但中药治疗组血清NO、血浆SP水平与正常对照组之间无显著性差异(*P*>0.05), 而西药对照组与正常对照组之间仍有显著性差异(*P*<0.05, 表4).

2.3 临床症状变化 治疗前后各组积分均明显改善, 但中药治疗组积分改善优于西药对照组, 差异有显著性意义(*P*<0.05, 表5).

3 讨论

STC属中医“便秘”、“阴结”等范畴, 与虚秘较为相近, 常见于中老年人. 中医认为脾运无力、阴寒凝滞、热灼津液、气滞不行、风气壅滞、下元虚冷、血虚津枯、肾阳失煦, 以及情志不舒、嗜食精良厚味、久坐少动、久病卧床等都是引发此类便秘的原因[3]. 其发病与大肠、肺、脾、肾等脏腑有关, 其中以脾、大肠为主, 关键病机在于脾虚, 且虚实夹杂, 以虚为主. 《伤寒论》提出: “小便利而大便硬不可攻下, 脾约丸润之”及《医学入门》中记载“气虚者, 参仁丸”, 都是指脾气虚而便秘的治法. 总之, 我们认为: 虽然导致STC发病的因素较多, 但脾失健运、大肠传导无力是STC发病的根本原因, 而脾虚为其发病之本, 大肠传导无力为其发病之标. 广州中医药大学发现, 脾气虚便秘患者餐后常不出现收缩性复合肌电, 提示推进性结肠运动减弱、肠腔内容物传送延缓, 属结肠无力型便秘[4]. 在STC与NO, SP关系方面, 郑雪平 *et al*[5]研究表明, STC患者肠肌间从NOS密度增加, 其血清NO含量明显高于正常人, 且与便秘程度呈线性相关. 尤汉宁 *et al*[6]用放免法测定慢性便秘患者胃肠激素变化时发现, 慢性便秘患者血清SP水平较对照组明显降低. 杜立峰 *et al*[7]应

■同行评价
功能性便秘是临床上较为棘手的一种疾病, 本文探讨了运脾润肠法对慢传输型功能性便秘胃肠激素的影响, 有较高的临床参考价值, 可在更多病例中试用来验证其确切的疗效.

用放射免疫方法测定了22名健康志愿者、28名慢传输患者血浆及结肠组织中的SP和血管活性肠肽(VIP)质量浓度, 发现, STC患者血浆及结肠组织中SP和VIP的质量浓度较正常者低. 以上所得结果与本研究基本相符.

目前, 西医治疗STC采用分级治疗[1]. 首先是药物治疗, 首选促动力药, 常用5-HT4受体激动剂, 如西沙必利、莫沙必利等. 但西沙必利疗程较长, 停药易复发, 且其副作用也有较多报道[8], 莫沙必利、普卡必利较西沙必利副作用小, 但疗效尚不尽人意, 张晓慧 *et al*[9]用莫沙必利治疗STC 56例, 总有效率89.5%. 其他药物如渗透性泻剂聚乙二醇4000(福松)据报道[10]有较好疗效, 但只适于轻型STC患者; 而一些刺激性泻剂及含蒽醌类药物对结肠的损害作用已被公认. 因此, 探索中医药治疗STC无疑是有价值的.

秘通方用枳术丸合五仁丸加减而成, 方以健脾行气药为主, 润肠通便之剂为辅. 其中白术、枳实二者共为君药, 既健脾益气, 又行气除胀, 消补并施, 主治脾虚不运致食积不消、脘腹胀满. 桃仁、杏仁、郁李仁三者均富含脂肪油, 能润肠通便, 尽《世医得效方》之五仁丸意, 亦为君药. 炙黄芪助枳术运气补脾肺二脏, 是为佐药; 车前子、莱菔子二者含较多的脂肪油, 能润滑肠道, 合玄参“增水行舟”, 三者共助润肠通便之功, 亦为佐药. 蜂蜜调补脾胃、润肺止咳、润肠通便, 是为使药. 全方以健脾益气、行气除胀、润肠通便为主, 兼顾理肺, 共奏运气健脾, 润肠通便之功效. 其作用机制, 可能与其调节血浆SP和血清NO有关.

4 参考文献

1 中华医学会消化病学分会胃肠动力学组. 我国慢性便秘的诊治指南. 中华消化杂志 2002; 22: 684-687
2 中华人民共和国卫生部. 中药新药治疗便秘的临床研究指导原则. 第1辑. 1993: 131-133
3 荣文舟. 便秘. 第1辑. 北京: 科学技术文献出版社, 2001, 287
4 危北海. 中西医结合消化病学. 北京: 人民卫生出版社, 2003, 3
5 郑雪平, 丁义江, 郑妙贞. 结肠慢传输型便秘患者血清一氧化氮水平检测及其临床意义. 中国肛肠病杂志 2003; 23: 6-7
6 尤汉宁, 许幼如, 王彝康, 孙依萍, 李定国. 慢性便秘胃肠激素的变化. 中国医师杂志 2002; 4: 1081-1083
7 杜立峰, 展淑琴, 郭新奎. P物质、血管活性肠肽与异常胃肠通过的关系. 西安交通大学学报(医学版) 2003; 24: 363-364, 376
8 黄世淬. 西沙必利的临床安全应用. 实用医学进修杂志 1999; 27: 184-188
9 张晓慧. 莫沙必利治疗慢传输型便秘疗效观察. 中原医刊 2003; 30: 43
10 刘诗, 谢小平, 侯晓华. 福松对慢性功能性便秘肛门直肠运动的作用及疗效观察. 临床消化病杂志 2003; 15: 71-72

电编 张敏 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

世界华人消化杂志关于作者署名的声明

本刊讯 世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 第一方面是直接参与, 包括: (1)酝酿和设计实验; (2)采集数据; (3)分析/解释数据. 第二方面是文章撰写, 包括: (1)起草文章; (2)对文章的知识性内容作批评性审阅. 第三方面是工作支持, 包括: (1)统计分析; (2)获取研究经费; (3)行政、技术或材料支持; (4)指导; (5)支持性贡献. 每个人必须在第一至第三方面至少具备一条, 才能成为文章的署名作者. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者. (世界胃肠病学杂志社2007-02-18)