

IL-24对细胞因子诱导的杀伤细胞的作用

袁玉涛, 王志华, 秦莉, 张春艳, 马玉彦, 孙喜文

■背景资料

肿瘤生物治疗已有100多年的历史。19世纪末, 国外的一些医生观察到肿瘤患者合并严重的感染, 在感染被控制后肿瘤也明显缩小, 甚至完全消退从而认识到肿瘤和免疫的密切关系, 对免疫治疗寄予厚望并表现出极大的兴趣。目前在过继免疫治疗中用于治疗肿瘤的细胞主要有LAK, TIL, CIK, A-NK等。CIK细胞增殖活性高, 在肿瘤杀伤活性上具有CTL, LAK, TIL细胞所无法比拟的优越特性, 在肿瘤生物治疗上具有巨大的应用潜能, 因此日益受到人们的重视。

袁玉涛, 王志华, 秦莉, 张春艳, 马玉彦, 孙喜文, 哈尔滨医科大学肿瘤医院黑龙江省哈尔滨市 150081
袁玉涛, 哈尔滨医科大学研究生, 主要从事肿瘤的生物治疗的临床和实验研究。
国家自然科学基金资助项目, No.39270765
黑龙江省卫生厅基金资助项目, No.2006-478
通讯作者: 王志华, 150081, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学肿瘤医院。hljwzh000@163.com
电话: 0451-86298393 传真: 0451-86665003
收稿日期: 2006-11-21 接受日期: 2006-12-18

Effects of interleukin-24 on the cytotoxic activity of cytokine-induced killer cells

Yu-Tao Yuan, Zhi-Hua Wang, Li Qin, Chun-Yan Zhang, Yu-Yan Ma, Xi-Wen Sun

Yu-Tao Yuan, Zhi-Hua Wang, Li-Qin, Chun-Yan Zhang, Yu-Yan Ma, Xi-Wen Sun, Cancer Research Institute, Harbin Medical University, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No.39270765, and the Foundation from Health Ministry of Heilongjiang Province, No.2006-478

Correspondence to: Zhi-Hua Wang, Cancer Research Institute of Harbin Medical University, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China. hljwzh000@163.com

Received: 2006-11-21 Accepted: 2006-12-18

Abstract

AIM: To find a new method to enhance the cytotoxic activity of cytokine-induced killer (CIK) cells for clinical immunotherapy.

METHODS: Mononuclear cells were extracted from the peripheral blood of health adults. One group was treated with interferon- γ (IFN- γ) at the 1st day and interleukin-1 (IL-1), CD3 mAb, IL-2 at the 2nd day, and the other group was disposed with IL-24 besides IL-1, CD3 mAb, and IL-2. Cell counting method was used to determine the proliferation of CIK cells, and the cytotoxic activity was detected by MTT assay. Cell phenotype was examined by flow cytometry. The scanning electron microscopy and transmission electron microscopy were used to observe the killing effects of CIK cells on tumor cells as well as the changes of tumor cells.

RESULTS: The proliferation of CIK cells without

IL-24 treatment was higher than that with IL-24 treatment (126.34 ± 2.14 vs 108.87 ± 1.29 , $P < 0.05$). The cytotoxic activities of CIK cells co-cultured with IL-24 were above 90% at different effector-target ratios (10 : 1, 20 : 1, 40 : 1), which were significantly higher than those in the other groups (10 : 1: $95.58\% \pm 2.21\%$ vs $27.31\% \pm 2.69\%$, $8.74\% \pm 2.41\%$, $38.65\% \pm 21.30\%$, all $P < 0.05$; 20 : 1: $91.97\% \pm 4.21\%$ vs $34.27\% \pm 0.85\%$, $11.54\% \pm 2.78\%$, $48.32\% \pm 11.72\%$, all $P < 0.05$; 40 : 1: $91.84\% \pm 9.28\%$ vs $50.67\% \pm 1.30\%$, $23.73\% \pm 11.07\%$, $52.89\% \pm 12.26\%$, all $P < 0.05$). Cell phenotypes were not significantly different between the CIK cells with and without IL-24 treatment ($P > 0.05$). Apoptotic and necrotic cells were obviously increased in after IL-24 treatment under transmission electron microscope.

CONCLUSION: IL-24 can obviously enhance the cytotoxic activity of CIK cell.

Key Words: Cytokine-induced killer cell; Interleukin-24; Cytotoxic activity; Proliferation

Yuan YT, Wang ZH, Qin L, Zhang CY, Ma YY, Sun XW. Effects of interleukin-24 on the cytotoxic activity of cytokine-induced killer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(6):548-553

摘要

目的: 寻求增强CIK细胞的细胞毒活性的有效方法。

方法: 从健康人外周血中提取出单个核细胞, 第1天加入IFN- γ , 第2天加入IL-1, CD3 mAb, IL-2诱导CIK细胞, 另一组与IL-1, CD3 mAb, IL-2同时加入IL-24. 杀伤分为4组: 未加IL-24培养组、单独IL-24杀伤组、加IL-24培养组、未加IL-24的CIK细胞培养组在杀伤时加入IL-24. 细胞计数法测定细胞的增殖、MTT法测定细胞杀伤活性和流式细胞术分析细胞表型. 扫描电镜和透射电镜观察CIK细胞对肿瘤细胞的杀伤和肿瘤细胞的改变。

结果: 未加IL-24培养组CIK细胞增殖高于加IL-24培养组, 两者比较有明显差异(126.34 ± 2.14 vs 108.87 ± 1.29 , $P < 0.05$). 加IL-24培养组细胞各个效靶比杀伤活性均达到90%以上,

明显高于其他各组(效靶比为10:1时95.58%±2.21% vs 27.31%±2.69%, 8.74%±2.41%, 38.65%±21.30%, $P<0.05$; 效靶比为20:1时91.97%±4.21% vs 34.27%±0.85%, 11.54%±2.78%, 48.32%±11.72%, $P<0.05$; 效靶比为40:1时91.84%±9.28% vs 50.67%±1.30%, 23.73%±11.07%, 52.89%±12.26%, $P<0.05$). 不同时间加IL-24培养组各个细胞表型与未加IL-24培养组相比没有差别. 透射电镜下观察加IL-24培养组凋亡和坏死肿瘤细胞比未加IL-24培养组明显增多.

结论: CIK细胞诱导过程中加入IL-24能明显增强其杀伤活性.

关键词: 细胞因子诱导的杀伤细胞; IL-24; 细胞毒性; 增殖活性

袁玉涛, 王志华, 秦莉, 张春艳, 马玉彦, 孙喜文. IL-24对细胞因子诱导的杀伤细胞的作用. 世界华人消化杂志 2007;15(6):548-553
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/548.asp

0 引言

CIK(cytokine-induced killer)细胞是一种非MHC限制性的高效溶肿瘤细胞毒性T淋巴细胞, 其在外周血淋巴细胞中的比例为1%-5%. 1991年Schmidt-Wolf *et al*^[1]首先报道了一类由多种细胞因子诱导的杀伤细胞, 即CIK细胞. 正常人或患者外周血、骨髓单个核细胞中加入细胞因子IFN- γ , IL-1, CD3 mAb, IL-2经2-4 wk的诱导可获得大量的肿瘤杀伤细胞, 他是非MHC限制性的一群异质性细胞, 具有强大的杀瘤活性.

mda-7基因(melanoma differentiation-associated gene 7)是用活跃增生的人HO-1黑色素瘤细胞cDNA文库与 β -IFN和MEZ处理过的HO-1细胞cDNA文库差减杂交发现一个新的与黑色素瘤分化相关基因, 即mda-7, 并初步实验证明了MDA-7具有抑制黑色素瘤增生特性和在黑色素瘤进程中促进终末分化的能力. 随后MDA-7一直作为肿瘤抑制物被研究, 直到2002年, Caudell *et al*^[2]用一系列的实验证实了MDA-7的细胞因子属性, 命名为白细胞介素-24(interleukin-24, IL-24), 归于IL-10家族. 由于IL-24本身对肿瘤细胞具有杀伤力, 本实验旨在研究在CIK诱导过程中加入IL-24对CIK的杀伤肿瘤细胞的活性是否有增强作用.

1 材料和方法

1.1 材料 HepG₂肿瘤细胞株由本所提供, IFN- γ ,

IL-1均为美国Peprotech公司产品, CD3 mAb为北京天广实生物技术有限公司产品, IL-2购自江苏金丝利药业有限公司, IL-24购自R&D systems, Percp结合的鼠抗人CD3、FITC结合的鼠抗人CD4、PE结合的鼠抗人CD8, CD56, CD3均为美国BD公司产品, 胎牛血清为杭州四季青生物责任有限公司产品, RPMI 1640干粉为美国Gibco BRL产品, 健康人外周血由哈尔滨红十字中心血站提供, 淋巴细胞分离液为天津市灏洋生物制品科技有限责任公司产品, MTT为北京索莱宝科技有限公司产品, 流式细胞仪为美国BD公司产品, 酶标分光光度计为BioRAU, 450型, 美国制造. 荧光倒置显微镜为日本OLYMPUS公司产品.

1.2 方法

1.2.1 CIK细胞的诱导 参考文献[3]方法. 细胞计数, 稀释成浓度为 $1 \times 10^9/L$ 于六孔板中培养, 每孔5 mL培养液, 按1000 kU/L加IFN- γ . 24 h后分别按600 kU/L和100 kU/L加IL-2和IL-1, CD3 mAb加75 $\mu g/L$. 另外一组与IL-2, IL-1, CD3 mAb同时加入IL-24 1000 kU/L, 2-3 d后补充新鲜培养液和细胞因子IL-2, CD3 mAb, 以后每2-3 d补充新鲜培养液和IL-2.

1.2.2 光镜下细胞形态观察 在诱导过程中每天于光镜下观察细胞形态变化. 与肿瘤细胞共同培养, 观察两者形态上的差别.

1.2.3 CIK细胞增殖活性的测定 将1 mL用两种方法培养的CIK细胞以 $1 \times 10^9/L$ 铺于24孔板中, 各铺三个平行孔, 每3 d补充新鲜培养液和细胞因子并用台盼蓝计数细胞总数计算平均值, 根据细胞增殖倍数绘制生长曲线.

1.2.4 CIK细胞毒活性的测定 取对数生长期的肿瘤细胞, 调整细胞浓度分别为 $1 \times 10^8/L$ 、 $5 \times 10^7/L$ 、 $2.5 \times 10^7/L$, 每孔100 μL 铺于96孔板中, 每组设4个复孔, 置37 $^{\circ}C$, 50 mL/L CO₂孵箱内培养, 24 h后将效应细胞CIK, 浓度调整为 $1 \times 10^9/L$ 与靶细胞浓度分别为10:1, 20:1, 40:1加入96孔板中, 另设单独靶细胞组(靶细胞+培养液)和单独效应细胞组(效应细胞+培养液)为阴性对照组, 作用48 h后每孔加入MTT 20 $\mu L/孔$, 继续培养4-6 h, 倾斜96孔板吸取上清液, 然后每孔加入100 μL DMSO, 震荡几分钟, 等沉淀全部溶解后用酶标仪(波长570 nm)测定吸光度A值, 计算杀伤率(%)= $\{1-[A(效+靶)-A(效)]/A(靶)\} \times 100\%$.

杀伤分为四组: 未加IL-24培养组; 单独IL-24杀伤组; 加IL-24培养组; 未加IL-24的CIK细胞培养组在杀伤时加入IL-24. IL-24加入浓度均为

■ 研发前沿

CIK在肿瘤生物治疗上具有巨大的应用潜能, IL-24具有显著的抑制肿瘤的作用, 能选择性地抑制多种肿瘤的生长, 诱导肿瘤细胞凋亡, 包括黑色素瘤、神经胶质母细胞瘤、骨肉瘤、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、肺癌、胃癌、鼻咽癌、前列腺癌等, 同时对正常细胞没有影响. IL-24选择性抑制肿瘤机制尚未完全清楚, 目前认为他通过多种途径发挥抑制肿瘤的作用. IL-24抗肿瘤效果十分显著, 成为肿瘤特异治疗药物的研究开发热点. 如何提高CIK细胞的杀伤活性和大批量的增殖, 是现在亟待解决的问题.

■ 相关报道

关于如何提高CIK细胞的杀伤活性国内外有很多相关的报道Marten *et al*将CIK和源于自体外周血单个核细胞的DC共同培养,在与CIK细胞共同培养的DC培养液中,独特型DC及抗原递呈分子的数量明显增加,Finke *et al*应用腺病毒增强增强的CD3受体介导的基因转染方法成功的将IL-7基因转染入CIK细胞内,并证明转染后的CIK细胞增殖活性和细胞毒活性明显增强.另有文献报道双特异性抗体能增强CIK的细胞毒活性.

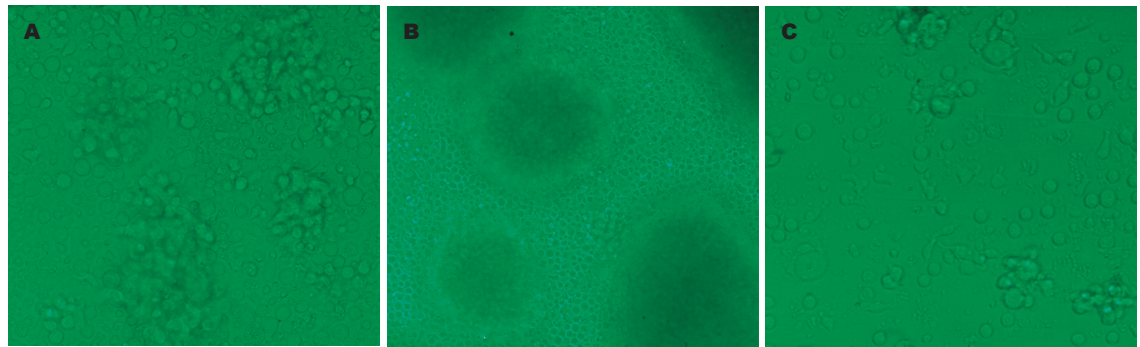


图1 光镜下细胞形态观察. A: 诱导3 d后CIK细胞镜下观察,细胞呈异型性,并有集落生成($\times 400$); B: 光镜下大集落($\times 200$); C: CIK细胞杀伤HepG₂, CIK细胞围绕肿瘤细胞,大细胞为肿瘤细胞,小细胞为CIK细胞($\times 400$).

1000 kU/L.

1.2.5 CIK细胞表型测定 取 2×10^9 /L细胞于流式专用管中,相应抗体混匀避光放置20 min,用PBS洗2遍,1500 r/min离心5 min,10 g/L甲醛固定后待上机测定.两组细胞未加IL-24培养组和加IL-24培养组分别于8, 15, 20 d时测CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD3⁺CD56⁺.

1.2.6 扫描电镜和透射电镜标本的制备 扫描电镜标本的制备在六孔板中放置灭菌载玻片,在紫外线下照射,在六孔板中铺种CIK细胞和HepG₂的混合液,细胞比例大约为10:1,并作单独肿瘤细胞对照组.第2天,用吸管吸出培养液,添加部分生理盐水冲洗细胞,动作要轻柔,然后加戊二醛(25 g/L)固定以漫过玻片为宜,取出玻片,常规HE染色和25 g/L戊二醛脱水、临界点干燥、喷金、扫描电镜观察、照相.

透射电镜标本的制备: 取CIK细胞和HepG₂细胞的混合液于培养瓶中,细胞比例大约为10:1,其中一组加1000 kU/L的IL-24.第2天用细胞刮刀刮取细胞,1000 r/min离心5 min,倒出离心管中培养液,用盐水吹打细胞然后转移到Eppendorf管中,1000 r/min离心5 min,弃去生理盐水,用戊二醛(25 g/L)及10 g/L锇酸固定,经乙醇梯度脱水,超薄切片铅铀染色后置投射电镜下观察、照相,参考文献[4]方法.

统计学处理 采用SPSS10.0数据分析软件,所有数据用mean \pm SD表示,采用方差分析和配对t检验统计学分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 诱导过程中细胞形态的变化 刚提取的单个核细胞大小较均一,折光性较一致,而经3 d培养诱导后的活化细胞中,部分细胞明显增大,可见很多小集落开始生成,胞核密度加强,细胞

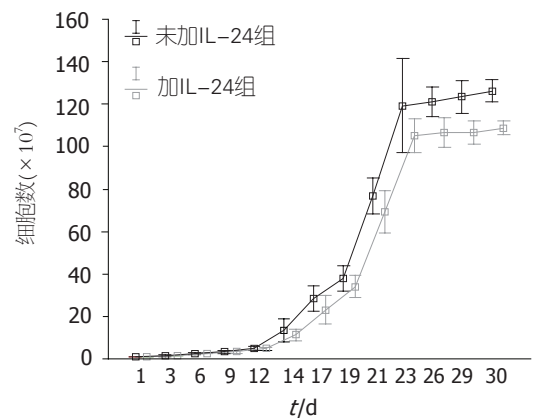


图2 两组细胞生长曲线.

异型性较明显,胞核中可见多量颗粒,为大颗粒淋巴细胞(LGL)(图1A).第6天观察细胞集落明显增多而且增大,在肉眼下即可以看到白色的斑点集落,镜下大集落成黑团,看不清细胞,但围绕集落周围有很多的细胞游出,细胞饱满折光性好,大小形态各异(图1B).观察与肿瘤细胞HepG₂共培养的CIK细胞,CIK细胞明显小于HepG₂(图1C).

2.2 细胞增殖活性 加IL-24培养组和未加IL-24培养组均在培养3 d时开始增殖,在培养14 d时进入快速增殖期,26 d以后增殖趋于缓慢进入平台期,未加IL-24培养组增殖略快于加IL-24培养组(表1,图2),经统计学配对t检验分析,两者有显著差异($t > 3.055$, $P < 0.05$),所以未加IL-24培养组增殖快于加IL-24培养组.

2.3 CIK细胞的杀伤活性 IL-24培养组在效靶比相同时杀伤率均明显高于其他组,方差分析统计分析不加IL-24培养组和未加IL-24的CIK细胞培养组在杀伤时加入IL-24相比均有明显差别($P < 0.05$),但不加IL-24培养组和未加IL-24的CIK细胞培养组在杀伤时加入IL-24组相比没有明显差别.不加IL-24培养组不同效靶比之间抑制率

表 1 不同培养时间两种细胞总数(mean ± SD)

时间(d)	未加IL-24组	加IL-24组
1	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
3	1.60 ± 0.15	1.52 ± 0.03
6	2.47 ± 0.20	2.57 ± 0.12
9	3.25 ± 0.37	3.25 ± 0.27
12	4.93 ± 0.45	4.87 ± 0.34
14	13.42 ± 2.23	11.41 ± 1.12
17	28.31 ± 2.42	23.05 ± 2.69
19	38.04 ± 2.42	34.09 ± 2.17
21	76.79 ± 3.33	69.31 ± 4.06
23	119.36 ± 8.95	105.22 ± 3.29
26	121.21 ± 2.80	106.74 ± 2.77
29	123.37 ± 3.10	106.58 ± 2.18
30	126.34 ± 2.14	108.87 ± 1.29

有显著差异($P < 0.05$), 但加IL-24培养组不同效靶比之间没有明显差异, 加IL-24培养组各个不同效靶比对肿瘤细胞均具有很高的抑制率(表2).

2.4 CIK细胞表型测定 随着诱导时间的延长CD3⁺CD56⁺双阳性细胞所占百分比大幅度升高, 加IL-24培养组和未加IL-24培养组在诱导8, 15, 20 d时分别是6.52% ± 0.7%, 15.8% ± 0.4%, 19.85% ± 1.3%和4.78% ± 0.9%, 14.58% ± 1.6%, 20.18% ± 1.3%. 两组不同诱导时间之间表型均具有显著差异($P < 0.05$). 但两组在相同时间下细胞表型没有明显差异(图3).

2.5 电镜下细胞形态观察 扫描电镜下观察可以看到正常的肿瘤细胞呈不规则形状, 表面微绒毛丰富而且细长(图4A), 杀伤状态下CIK细胞围绕HepG₂, CIK细胞与肿瘤细胞接触, 肿瘤细胞明显变小(图4B), 有的CIK细胞进入肿瘤细胞被肿瘤细胞的微绒毛包裹(图4C), 有的肿瘤细胞已经坏死崩解(图4D). 透射电镜下可以看到肿瘤细胞周围有很多活性淋巴细胞的包围(图5A), 可以看到凋亡肿瘤细胞, 有的肿瘤细胞已进入肿瘤细胞内(图5B). 加IL-24组坏死肿瘤细胞明显增多, 核完全固缩(图5C), 胞质中充满了大量的脂滴颗粒, 线粒体嵴性肿胀, 空泡变性, 部分细胞核完全固缩, 核膜结构不清, 细胞内膜结构完全溶解(图5D).

3 讨论

CIK细胞表面既有T细胞标志细胞标志(CD3), 也有NK细胞的表面标志(CD56), 因而兼有T淋巴细胞抗肿瘤活性和NK细胞非MHC限制性杀瘤的特点. 用传统的手术、化疗、放疗等方法

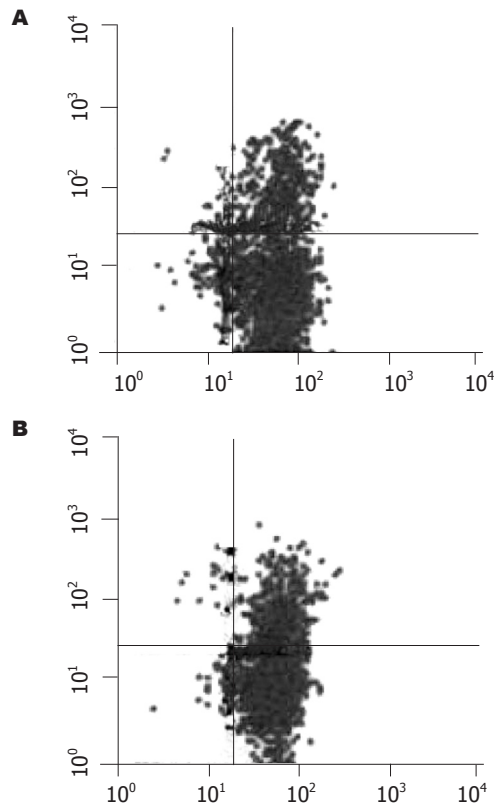


图 3 诱导20 d时两组细胞表型CD3⁺CD56⁺检测结果(横轴为CD3⁺, 纵轴为CD56⁺, 第四象限为双阳性表型CD3⁺CD56⁺细胞). A: 未加IL-24培养组; B: 加IL-24培养组.

常不能彻底治愈肿瘤. 作为免疫治疗的方法之一, 应用细胞因子诱导的杀伤细胞因其可大量扩增, 细胞毒活性强, 可杀伤自体 and 异体多种肿瘤细胞^[5-11], 与免疫细胞TIL, LAK比较有很多的优点, 回输体内后可继续分裂增生且无需外源细胞因子的维持, 副作用少显示了很好的发展前景^[12-16]. 目前, 研究者都在致力于提高CIK杀伤肿瘤细胞的活性^[17-21], 迄今为止已有许多实验证明IL-24具有显著的抑制肿瘤的作用, 能选择性地抑制多种肿瘤的生长, 诱导肿瘤细胞凋亡, 包括黑色素瘤、神经胶质母细胞瘤、骨肉瘤、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、肺癌、胃癌、鼻咽癌、前列腺癌等. 这种抑制作用不依赖p53, Rb和p16等抑癌基因, 且对正常细胞没有影响. IL-24选择性抑制肿瘤机制尚未完全清楚, 目前认为他通过多种途径发挥抑制肿瘤的作用. IL-24抗肿瘤效果十分显著, 成为肿瘤特异治疗药物的研究开发热点^[22]. 本实验中在CIK诱导的过程中加入了IL-24, 两抗肿瘤因素联合作用于肿瘤细胞, 起到了很好的抑瘤作用. IL-24刺激的外周血单个核细胞48 h后有IL-6, TNF- α 和IFN- γ 的高表达同时IL-1 β , IL-12和GM-CSF也有

■ 创新盘点
国内外单独报道CIK细胞和IL-24的文章很多, 但尚未见CIK细胞和IL-24联合应用的相关报道. 本实验中两者联合应用对肿瘤细胞有很高的杀伤力.

■名词解释

CIK(cytokine-induced killer): 正常人或患者外周血、骨髓单个核细胞中加入细胞因子IFN- γ IL-1, CD3 mAb, IL-2经2-4 wk的诱导可获得大量的肿瘤杀伤细胞, 即CIK细胞

表 2 不同细胞组不同效靶比CIK细胞对肿瘤细胞的抑制率(mean \pm SD, %)

细胞分组	10 : 1	20 : 1	40 : 1
不加IL-24培养组	27.31 \pm 2.69	34.27 \pm 0.85	50.67 \pm 1.30
单独IL-24杀伤组	8.74 \pm 2.41	11.54 \pm 2.78	23.73 \pm 11.07
加IL-24培养组	95.58 \pm 2.21	91.97 \pm 4.21	91.84 \pm 9.28
未加IL-24的CIK细胞培养组在杀伤时加入IL-24	38.65 \pm 21.30	48.32 \pm 11.72	52.89 \pm 12.26

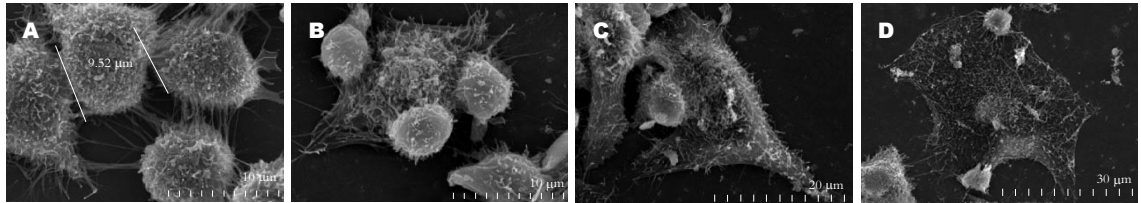


图 4 扫描电镜下细胞形态观察. A: 正常肿瘤细胞直径大约10 μ m (\times 3700); B: CIK细胞围绕HepG₂, 肿瘤细胞明显变小(\times 4000); C: CIK细胞被肿瘤细胞包裹(\times 2700); D: 肿瘤细胞坏死崩解, 周边为CIK细胞(\times 1700).

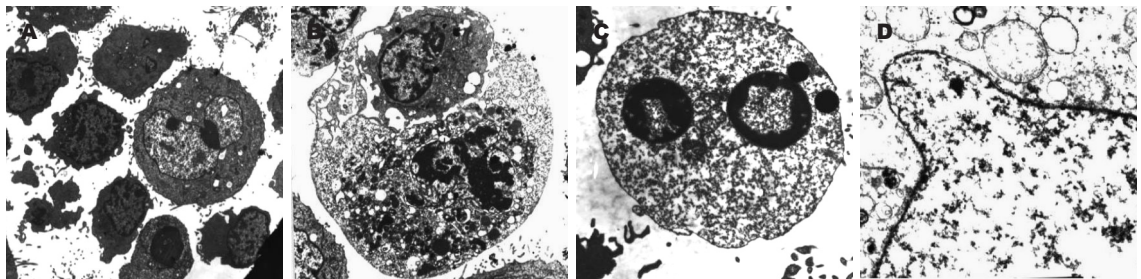


图 5 透射电镜下细胞形态观察. A: CIK细胞包围肿瘤细胞(\times 2500); B: CIK细胞进入肿瘤细胞(\times 5000); C: 核固缩, 核膜不清, 单层膜结构线粒体嵴断裂(\times 6000)(IL-24); D: 双层膜结构部分融合在一起, 增厚, 核融合形成核突(\times 10 000)(IL-24).

一定水平的表达, 这可能是两者联合应用提高抗肿瘤活性的原因.

目前诱导CIK细胞的方案有多种, 其中CD3 mAb和IFN- γ 是每个方案的必选, 前者起到丝裂原活性作用, 可与T细胞表面CD3交联, 诱导其活化, 后者可诱导IL-1等因子的合成. 不同方案的主要差别在于白介素的不同, 常用的有IL-1, IL-2, IL-7, IL-12等. 本实验中除加入CD3 mAb, IFN- γ , IL-1, IL-2外又加入了IL-24. 在细胞表型上与常规诱导方法并没有差别.

本实验中在诱导CIK过程中加入了IL-24虽然对增殖活性有一定的影响, 但并不影响临床的需要. 对细胞表型并无影响而且明显增加了CIK细胞的杀伤活性, 10 : 1, 20 : 1和40 : 1效靶比对肿瘤细胞杀伤率均达到90%以上. 这可能与IL-24对肿瘤细胞具有杀伤力而且IL-24刺激的外周血单个核细胞48 h后有IL-6, TNF- α 和IFN- γ 的高表达同时IL-1 β , IL-12和GM-CSF也有

一定水平的表达有关.

mda-7/IL-24在人体内的生理水平表达主要限定于一些具有免疫功能的细胞, 包括正常的未受刺激的或受LPS刺激的单核细胞、抗CD3抗体刺激的T细胞和正常人的黑色素细胞^[2]. 当超过生理水平表达时, mda-7/IL-24具有抑制多种肿瘤细胞生长的作用, 可诱导多种肿瘤细胞株的生长抑制和凋亡, 而对正常细胞却无作用^[23,25].

总之, 在CIK诱导过程中加入IL-24能明显增强其杀伤活性, 诱导14-21 d时, CIK细胞增殖率和CD3⁺CD56⁺阳性细胞比例均达到高峰, 这一时相的CIK细胞在增殖表型与细胞活力两方面均达到动态平衡, 适合于临床应用.

4 参考文献

- Schmidt-Wolf IG, Negrin RS, Kiem HP, Blume KG, Weissman IL. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity. *J Exp Med* 1991; 174: 139-149
- Caudell EG, Mumm JB, Poindexter N, Ekmekcioglu

- S, Mhashilkar AM, Yang XH, Retter MW, Hill P, Chada S, Grimm EA. The protein product of the tumor suppressor gene, melanoma differentiation-associated gene 7, exhibits immunostimulatory activity and is designated IL-24. *J Immunol* 2002; 168: 6041-6046
- 3 Shi M, Zhang B, Tang ZR, Lei ZY, Wang HF, Feng YY, Fan ZP, Xu DP, Wang FS. Autologous cytokine-induced killer cell therapy in clinical trial phase I is safe in patients with primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1146-1151
- 4 Wang ZH, Wang HY, Zhang Y, Wu CY. The improvement in culture and activation of A-NK cells. *Chin Jour of Immunol* 2005; 21: 431-434
- 5 Chen BA, Li M, Sun ZY, Li CP, Gao C, Sun YY, Wang J, Fu Q, Chen J. Effect of dendritic cells co-cultured with cytokine induced killer cells on cytotoxicity against drug resistant K562 cells. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2005; 26: 355-358
- 6 Chan JK, Hamilton CA, Cheung MK, Karimi M, Baker J, Gall JM, Schulz S, Thorne SH, Teng NN, Contag CH, Lum LG, Negrin RS. Enhanced killing of primary ovarian cancer by retargeting autologous cytokine-induced killer cells with bispecific antibodies: a preclinical study. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1859-1867
- 7 Jiang J, Xu N, Wu C, Deng H, Lu M, Li M, Xu B, Wu J, Wang R, Xu J, Nilsson-Ehle P. Treatment of advanced gastric cancer by chemotherapy combined with autologous cytokine-induced killer cells. *Anticancer Res* 2006; 26: 2237-2242
- 8 Wang FS, Liu MX, Zhang B, Shi M, Lei ZY, Sun WB, Du QY, Chen JM. Antitumor activities of human autologous cytokine-induced killer (CIK) cells against hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 464-468
- 9 Sun S, Li XM, Li XD, Yang WS. Studies on inducing apoptosis effects and mechanism of CIK cells for MGC-803 gastric cancer cell lines. *Cancer Biother Radiopharm* 2005; 20: 173-180
- 10 Leemhuis T, Wells S, Scheffold C, Edinger M, Negrin RS. A phase I trial of autologous cytokine-induced killer cells for the treatment of relapsed Hodgkin disease and non-Hodgkin lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 181-187
- 11 Shi M, Yao L, Wang FS, Lei ZY, Zhang B, Li WL, Liu JC, Tang ZR, Zhou GD. Growth inhibition of human hepatocellular carcinoma xenograft in nude mice by combined treatment with human cytokine-induced killer cells and chemotherapy. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2004; 26: 465-468
- 12 Hongeng S, Petvises S, Worapongpaiboon S, Rerkamnuaychoke B, Pakakasama S, Jootar S. Generation of CD3⁺ CD56⁺ cytokine-induced killer cells and their *in vitro* cytotoxicity against pediatric cancer cells. *Int J Hematol* 2003; 77: 175-179
- 13 Linn YC, Hui KM. Cytokine-induced killer cells: NK-like T cells with cytolytic specificity against leukemia. *Leuk Lymphoma* 2003; 44: 1457-1462
- 14 Alvarnas JC, Linn YC, Hope EG, Negrin RS. Expansion of cytotoxic CD3⁺ CD56⁺ cells from peripheral blood progenitor cells of patients undergoing autologous hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; 7: 216-222
- 15 Maki G. Ex vivo purging of stem cell autografts using cytotoxic cells. *J Hematother Stem Cell Res* 2001; 10: 545-551
- 16 Linn YC, Lau LC, Hui KM. Generation of cytokine-induced killer cells from leukaemic samples with *in vitro* cytotoxicity against autologous and allogeneic leukaemic blasts. *Br J Haematol* 2002; 116: 78-86
- 17 Marten A, Ziske C, Schottker B, Renoth S, Weineck S, Buttgereit P, Schakowski F, von Rucker A, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IG. Interactions between dendritic cells and cytokine-induced killer cells lead to an activation of both populations. *J Immunother* 2001; 24: 502-510
- 18 Zhang S, Wang EZ, Bai CX, Xu YH. The proliferation profile *in vitro* and anti-tumor effects of dendritic cells co-culturing with CIK cells. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao* 2003; 36: 375-380
- 19 Finke S, Trojaneck B, Lefterova P, Csipai M, Wagner E, Kircheis R, Neubauer A, Huhn D, Wittig B, Schmidt-Wolf IG. Increase of proliferation rate and enhancement of antitumor cytotoxicity of expanded human CD3⁺ CD56⁺ immunologic effector cells by receptor-mediated transfection with the interleukin-7 gene. *Gene Ther* 1998; 5: 31-39
- 20 Kornacker M, Verneris M, Kornacker B, Ganten T, Scheffold C, Negrin R. The apoptotic and proliferative fate of cytokine-induced killer cells after redirection to tumor cells with bispecific Ab. *Cytotherapy* 2006; 8: 13-23
- 21 Zhang YS, Yuan FJ, Jia GF, Zhang JF, Hu LY, Huang L, Wang J, Dai ZQ. CIK cells from patients with HCC possess strong cytotoxicity to multidrug-resistant cell line Bel-7402/R. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3339-3345
- 22 Chada S, Mhashilkar AM, Ramesh R, Mumm JB, Sutton RB, Bocangel D, Zheng M, Grimm EA, Ekmekcioglu S. Bystander activity of Ad-mda7: human MDA-7 protein kills melanoma cells via an IL-20 receptor-dependent but STAT3-independent mechanism. *Mol Ther* 2004; 10: 1085-1095
- 23 Fisher PB, Gopalkrishnan RV, Chada S, Ramesh R, Grimm EA, Rosenfeld MR, Curiel DT, Dent P. mda-7/IL-24, a novel cancer selective apoptosis inducing cytokine gene: from the laboratory into the clinic. *Cancer Biol Ther* 2003; 2: S23-S37
- 24 Wang CJ, Xue XB, Yi JL, Chen K, Zheng JW, Wang J, Zeng JP, Xu RH. Melanoma differentiation-associated gene-7, MDA-7/IL-24, selectively induces growth suppression, apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 by replication-incompetent adenovirus vector. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1774-1779
- 25 瞿少刚, 张秀萍, 陈群, 刘仿. IL-24融合蛋白表达载体的构建及其对大小肠癌细胞的生长抑制作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 497-501

■同行评价

本文着重研究了CIK诱导过程中加入IL-24对CIK的杀伤肿瘤细胞活性的增强作用. 研究内容较新颖, 对临床上CIK应用于生物治疗有一定指导意义.

电编 李琪 编辑 张焕兰

CD/5-FC自杀基因体系在正常免疫力动物体内的抑瘤及旁观者效应

刘国彦, 姚娇, 罗琪

■背景资料

基因治疗是一种将外源性遗传物质导入目的器官、组织或细胞并显示出相应的生物学效应, 从而防治疾病的技术方法。其中恶性肿瘤所使用的基因治疗方法包括自杀基因、抑癌基因, 反义核酸序列、细胞因子及免疫相关基因、药物抵抗基因等, 有“分子手术”之称的自杀基因疗法已成为当前基因治疗领域的热点, 具有多种优势。自杀基因/前体药物体系之所以是众多基因治疗方案中较有前途的一种方法, 主要特点是存在旁观者效应, 这种效应明显地增强了自杀基因对肿瘤的杀伤作用, 在相当程度上弥补了基因治疗方法转染效率低的难题。这点的克服对恶性肿瘤的基因治疗尤为重要。

刘国彦, 姚娇, 罗琪, 厦门大学附属中山医院普通外科、厦门大学消化疾病研究所 福建省厦门市 361004
刘国彦, 2004年硕士毕业, 主治医师, 主要从事消化疾病外科研究。

福建厦门卫生局基金资助项, No. wsk0509

通讯作者: 罗琪, 361004, 福建省厦门市, 厦门大学附属中山医院普通外科、厦门大学消化疾病研究所。

luoqi@medmail.com.cn

电话: 0592-2292042

收稿日期: 2006-11-19 接受日期: 2006-12-18

Tumor inhibition and bystander effect of CD/5-FC suicide gene system in normal mice

Guo-Yan Liu, Jiao Yao, Qi Luo

Guo-Yan Liu, Jiao Yao, Qi Luo, Department of General Surgery, Zhongshan Hospital; Research Institute of Digestive Diseases, Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China

Supported by the Foundation from Health Bureau of Xiamen City, No. wsk0509

Correspondence to: Department of General Surgery, Zhongshan Hospital; Research Institute of Digestive Diseases, Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China. luoqi@medmail.com.cn

Received: 2006-11-19 Accepted: 2006-12-18

Abstract

AIM: To investigate the anticancer and distant bystander effect of CD/5-FC suicide gene system combined with γ -IFN in normal mice.

METHODS: H22 cells instantly transfected with cytosine deaminase (CD) gene plasmid (lipo-CD) or empty plasmid, mediated by cation liposome, were subcutaneously inoculated into the left or right axilla of Kunming mice, respectively. Then the mice were injected with 5-FC and γ -interferon (γ -IFN) once per day, and the anticancer effect and distant bystander effects were compared when γ -IFN was used or not.

RESULTS: 5-FC obviously inhibited the growth of tumors transfected with lipo-CD, and the inhibitory efficiency was 79.39%. When in combination with γ -IFN, the inhibitory efficiency

(93.47%) was strengthened significantly ($t = 3.49$, $P = 0.0036$). There was a notable bystander effect in CD/5-FC suicide gene system *in vivo*, and the suppressive rate was 54.42% for the distant tumor cells without transfection. When in combination with γ -IFN, the inhibition rate (88.43%) was strengthened greatly ($t = 2.86$, $P = 0.0212$).

CONCLUSION: CD/5-FC suicide system combined with γ -IFN has more significant anticancer effects and may be used as a promising method in the treatment of liver cancer.

Key Words: Gene therapy; Suicide gene; Bystander effect; Cytosine deaminase; Gamma-interferon

Liu GY, Yao J, Luo Q. Tumor inhibition and bystander effect of CD/5-FC suicide gene system in normal mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(6):554-560

摘要

目的: 观察阳离子脂质体介导的CD/5-FC自杀基因体系协同 γ -IFN在正常免疫力小型动物体内对肿瘤的抑制效应及远端旁观者效应。

方法: 采用阳离子脂质体介导CD基因质粒瞬时转染小鼠肝癌H22及空质粒转染的H22细胞, 分别接种于KM鼠双侧腋下皮下; 向小鼠体内注射5-FC及 γ -IFN, 观察在 γ -IFN协同作用下对转染CD基因瘤体的抑制作用和远距离空质粒转染瘤体的抑制即远端旁观者效应。

结果: 5-FC对转染CD基因侧瘤体抑制明显, 抑制率为79.39%; 在 γ -IFN的协同下CD/5-FC的抑瘤作用得到了增强, 抑制率为93.47%, 与无 γ -IFN协同作用相比, 对癌细胞抑制率明显增强($t = 3.49$, $P = 0.0036$); 存在远端旁观者效应, 远端未转染瘤体的抑制率为54.42%; 在 γ -IFN的协同下远端旁观者效应得到显著增强, 抑制率达到88.43%, 同无 γ -IFN相比有差异有显著性($t = 2.86$, $P = 0.0212$)。

结论: 体内CD/5-FC自杀基因体系联合 γ -IFN对肝癌细胞有更好的抑制效应, 对肝癌的治疗有很好的应用前景。

关键词: 基因疗法; 自杀基因; 旁观者效应; 胞嘧啶脱氨酶基因; 干扰素

刘国彦, 姚娇, 罗琪. CD/5-FC自杀基因体系在正常免疫力动物体内的抑瘤及旁观者效应. 世界华人消化杂志 2007;15(6):554-560

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/554.asp>

0 引言

基因治疗肿瘤是现代医学研究中的前沿课题, 自杀基因治疗是其中的热点之一. “旁观者效应”(bystander effect, BE)使得该治疗被广泛看好和倾注研究热情, CD/5-FC自杀基因体系的研究在体外、裸鼠体内、小型到大型正常免疫力动物体内的实验环境和条件是完全不一样的, 实验结果则可能迥然不同, 正常的免疫力可能会使得旁观者效应进一步增强, 有助于抑杀肿瘤细胞, 我们通过研究CD/5-FC自杀基因体系在正常免疫力的小型动物KM鼠体内对肝癌H22的杀伤及远距离旁观者效应, 并观察在 γ -IFN协同作用下的变化, 提供了更接近临床的自杀基因治疗的实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 小鼠肝癌H22细胞购自中国医学科学院药物研究所. 该细胞株可以对应接种于KM鼠(昆明鼠)体内. 细胞在小鼠体内腹水培养及传代. δ KM(昆明鼠)体质量18-20 g, 购自军事医学科学院实验动物中心. 阳离子脂质体lipofectamine-TM购自Invitrogen公司; 5-FC购自Sigma公司; 干扰素(γ -IFN)购自Sigma公司. 质粒pCDNA3.1-CD由本课题组保存, 包含Neo^r和Amp^r及CD基因(胞嘧啶脱氨酶基因), 具有CMV启动子和来自SV40病毒的启动子、增强子、及终止信号, 转入哺乳动物细胞后能在哺乳动物细胞中获得一定水平的表达. 在真核与原核细胞中分别用含G418和氨苄青霉素的培养基进行选择培养. 转染该质粒的真核细胞可合成真核细胞没有的胞嘧啶脱氨酶, 从而转化5-FC为5-FU.

1.2 方法 将小鼠随机分为A, B, C, D四组. 各小鼠的左侧瘤加编号1区分(转染CD质粒), 右侧加编号2区分(未转染CD质粒), 则接种瘤体可分为A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1, D2八组. 其中A组为对照组, 腹腔及皮下均注射生理盐水; B组腹腔给生理盐水, 皮下给IFN 1WU; C组腹腔给5-FC 500 mg/kg, 皮下给生理盐水; D组腹腔给5-FC 500 mg/kg, 皮下给IFN 1WU. 由肿瘤24 h后开始给药, 均每日1次, 连续注射15 d.

1.2.1 接种的H22细胞 取KM鼠腹水传代的H22细胞, 用生理盐水洗2次, 均分成甲乙两液, 甲液中加入瞬时转染液, 细胞数/脂质体/pCDNA3.1-CD质粒为: 1×10^5 个/20 μ L/10 μ g. 室温放置15 min, 用生理盐水稀释细胞到 1×10^9 /L, 乙液直接加生理盐水配成细胞浓度 1×10^9 /L.

1.2.2 KM鼠H22肝癌模型的建立 小鼠左前肢腋下皮下注射配好的H22细胞甲液0.1 mL, 小鼠右前肢腋下皮下注射配好的H22细胞乙液0.1 mL.

1.2.3 CD/5-FC对H22细胞杀伤效率的测定 按照公式 $a \cdot b^2/2$ 计算体积, 绘制4组小鼠共8组瘤子的生长曲线, 取时间点第3、6、9、12、15天; 称取第16天所有瘤体的质量(g)进行比较. (注: CD⁺, CD⁻分别为转染CD基因及未转染CD基因). 肿瘤抑制率 = [对照组质量(CD⁺)-试验组质量(CD⁺)]/对照组质量(CD⁺); 旁观者效应 = [对照组质量(CD⁻)-试验组质量(CD⁻)]/对照组质量(CD⁻). 比较转基因组A1, B1, C1, D1的肿瘤抑制率; 比较A2, B2, C2, D2四组BE. 将取下的瘤体常规福尔马林浸泡14 d, 做石蜡包埋, HE染色, 比较8组瘤体杀伤的病理学光镜下差异.

统计学处理 用SPSS10.0统计软件包进行处理, 组间采用方差分析后, 双侧 t 检验.

2 结果

2.1 瞬时转染对接种细胞的影响 阳离子脂质体对细胞的毒性很小, 在本实验的A组中, 腹腔和皮下均为给生理盐水, 生长15 d, 最终瘤质量(g): A1 = 1.99 ± 0.48 , A2 = 2.12 ± 0.49 , 两者差异无显著性($t = 0.53$, $P = 0.61 > 0.05$), 病理学观察也无差异. 均为实体瘤组织, 瘤细胞排列紧密, 多呈小圆形, 少数瘤巨细胞, 核分裂像多见, 瘤细胞形态良好. 故瞬时转染对细胞的生长可以认为没有影响(图1A-B).

2.2 5-FC对CD⁺瘤体杀伤效率的比较 A1, B1, C1, D1四组均为接种CD基因瞬时转染的H22细胞, CD⁺的H22细胞能够被5-FC杀死, 而且IFN能对CD⁺的H22细胞产生增强的免疫攻击, 导致H22细胞杀伤. A1组瘤质量(g)为 1.99 ± 0.48 , C1组的瘤质量(g)为 0.41 ± 0.10 , 两者的差异有显著性意义($t = 9.21$, $P < 0.05$), 抑制率为79.39%; IFN可以协同增加5-FC对H22细胞的杀伤效率, D1的瘤质量(g)为 0.13 ± 0.02 , 抑制率为93.47%, 比较C1、D1组差异有显著性意义($t = 3.49$, $P = 0.0036 < 0.01$); IFN可以直接导致CD⁺的H22细胞的杀伤, B1的瘤质量(g)为 0.58 ± 0.21 , 抑制率

■ 研发前沿

CD/5-FC体系是自杀基因研究领域的热点, 目前很多的自杀基因研究集中在新的自杀基因/前体药物的开发上以及基因转染、给药渠道上, 但目前接近临床的相关研究较少, 也是研究的重点和亟待解决的问题.

应用要点

自杀基因治疗进入临床需要大量的正常免疫力动物实验, 现已有较多的体外自杀基因的相关研究和一些体内的相关研究, 本研究针对小型免疫全能动物体内远距离旁观者效应, 并结合 γ -IFN协同加强免疫力研究免疫力对抑杀肿瘤及远距离旁观者效应的作用, 提供了更加接近临床的实验数据.

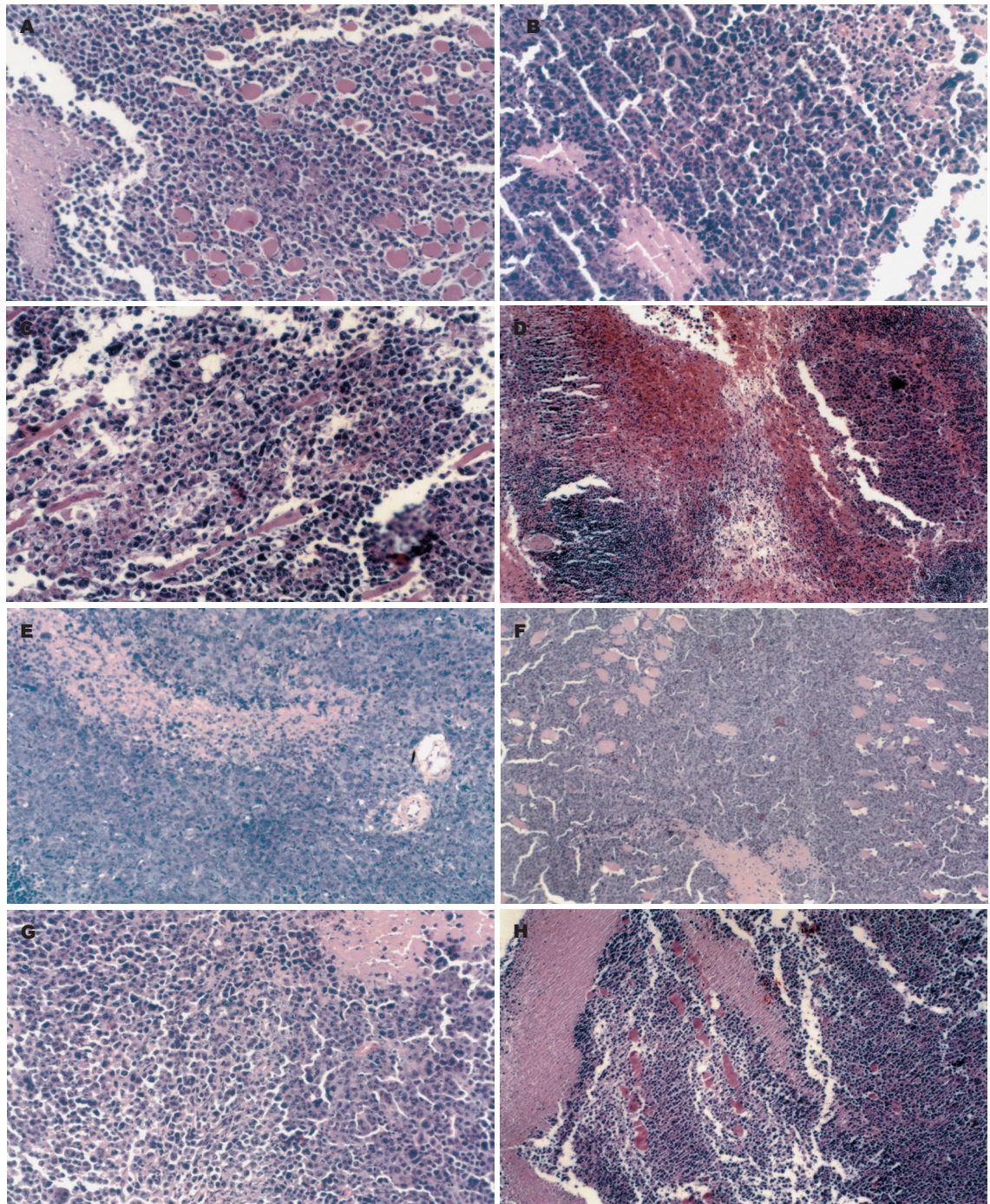


图1 瘤组织病理学光镜下观察结果(H&E $\times 200$). A: A1组(瘤细胞排列稍疏松, 瘤细胞核浓缩深染); B: B1组(瘤细胞核浓缩深染, 少量瘤巨细胞, 多处灶状坏死); C: C1组(部分瘤细胞坏死崩解, 周围瘤细胞变性, 肌细胞变性); D: D1组(瘤细胞广泛坏死, 多发灶状出血, 纤维和脂肪组织增生); E: A2组(瘤细胞密集分布, 形态良好, 核分裂像多见); F: B2组(瘤细胞排列较密集, 灶状坏死); G: C2组(瘤细胞核浓缩深染, 在坏死灶周围较明显, 有小片状坏死灶); H: D2组(瘤细胞排列尚较致密, 片状凝固性坏死, 在坏死灶周围瘤细胞坏死和变性).

为71.02%, 同A1组比较瘤质量差异有显著性($t = 7.97, P < 0.01$), 但同C1相比较差异无显著性意义($t = 1.91, P = 0.0773 > 0.05$). 说明免疫机制对该自杀基因导致肿瘤细胞直接抑杀中的重要作用. 由生长曲线可以直观这种显著的差异: 病理学光镜下可见: B1可见多数瘤细胞变性坏死, 灶状坏死; C1瘤组织部分瘤细胞坏死崩解, 周围瘤细胞变性; D1瘤组织, 瘤细胞广泛坏死, 多发灶

状出血, 纤维组织和脂肪组织增生(图1C-E).

2.3 远端BE的观察 A2, B2, C2, D2四组为右侧前肢腋下皮下种植未瞬时转染的H22细胞, 5-FU对未转染细胞没有杀伤效果. A2组的瘤质量(g)为 2.12 ± 0.49 , C2组瘤质量(g)为 0.97 ± 0.59 , 比较两者差异有显著性($t = 4.26, P = 0.0008 < 0.01$), 可得出CD/-5-FU有较好的远端BE, 抑制率为54.42%; 由A2, B2组比较可以观

观察到IFN对恶性肿瘤有较好的抑制作用, B2组瘤质量(g)为 0.92 ± 0.68 , 同A2相比较差异有显著性($t = 4.02, P = 0.0015 < 0.01$), 抑制率为56.43%, 由D2组可以观察到IFN对远端BE有很好的协同增强效应, D2组的瘤质量(g)为 0.25 ± 0.13 , 同C2组相比较差异有显著性($t = 3.44, P = 0.0108 < 0.05$), 抑制率达到88.43%. B2和C2比较差异无显著性意义($t = 0.3688, P = 0.7232 > 0.05$), 再次说明免疫机制在远距离BE中的重要作用. 由生长曲线可以直观肿瘤的远距离BE. 病理学光镜下可见: B2可见少数灶状或小片状坏死, 瘤细胞形态清晰, 瘤巨细胞数量较多; C2基本类似B2; D2多灶状坏死, 融合成片状(图1G-H).

2.4 BE对瘤体的完全抑制 D2组IFN协同CD/5-FC自杀基因体系对H22瘤体的杀伤作用, 导致D2组的2例完全杀伤效果, 瘤体消失, D2的完全抑制数为该组25%. A2, B2, C2三组则无完全抑制例数.

2.5 A1, B1, C1, D1四组肿瘤完全抑制率的比较 A1(对照组)均全部出瘤, B1组有2例被完全抑制, C1组也有2例被完全抑制, D1组则有6例被完全抑制, A1对比B1、C1组差异有显著性($P < 0.05$), 说明CD/5-FC自杀基因体系在IFN的协同下对肿瘤的抑制有显著的增强(图2).

3 讨论

自杀基因疗法又称酶/药物前体疗法(enzyme prodrug therapy, VDEPT), 是用药物敏感基因感染肿瘤细胞提高肿瘤细胞对药物敏感而杀死肿瘤细胞, 其中CD/5-FC自杀基因体系是目前研究最快, 进展最多的自杀基因体系之一, CD基因编码大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶, 使细胞内无毒性抗真菌药物5-氟胞嘧啶(5-FC)代谢为有细胞毒性的5-氟尿嘧啶(5-FU), 后者有明显的抗肿瘤活性.

CD/5-FC体系治疗肿瘤时可产生具有临床应用实际价值的BE^[1-2], 即肿瘤细胞少量的转染可导致更多的肿瘤细胞被抑杀, 为肿瘤细胞的“根治性抑杀”带来希望. 谭宇蕙 *et al*^[3]构建的大鼠肝癌细胞HSV-tk/GCV自杀基因系统体外旁观者效应的研究中, 当转染率为5%-10%就已有较低的BE. 陈海金 *et al*^[4]研究慢病毒介导的KDR启动子驱动CD/TK双自杀基因系统对大肠肿瘤细胞选择性杀伤作用, 观察到双自杀基因在体外的显著的BE. 张雷 *et al*^[5]研究比较了CD/5-FC系统和HSV-tk/GCV系统对人胰腺癌细胞的疗效, 发现两者都有很好的抗肿瘤活性, 但

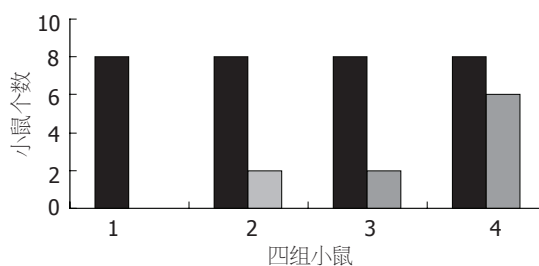


图2 5-FC/CD对瘤体完全抑制比较. 黑色为各组小鼠的个数, 灰色为各组小鼠转CD基因侧瘤体完全抑制消失的个数. 系列1, 2, 3, 4分别为A1, B1, C1, D1四组瘤体.

前者BE要显著大于后者; 其良好的BE与以下一些机制有关^[6]: (1)细胞间缝隙连接(gap junctional intercellular communication GJIC)介导的细胞毒性药物或(和)凋亡小体传递^[7-9]. 多数学者认为GJIC是自杀基因表达产物前药代谢为细胞毒性产物5-FU的良好通道. Kuriyama *et al*和Huber *et al*认为CD/5-FC的BE是由于5-FC的代谢产物5-FU通过非易化扩散自由进出细胞, 并不仅仅依靠GJIC^[10-11]. BE使靶细胞内基因表达产物通过GJIC传递到周围细胞, 在杀伤周围细胞同时延长了自杀基因的表达和其自身的存活时间, 这无疑增强了BE^[12]. (2)激活免疫机制. 肿瘤细胞被自杀基因杀伤后, 其残余碎片含有肽类物质, 这些肽类物质被浸润的巨嗜细胞等抗原递呈细胞摄取加工, 然后递呈给CD4⁺T淋巴细胞, 进而激活CD8⁺T淋巴细胞, 并使其增殖, 扩大其肿瘤杀伤作用及产生杀灭机体远处部位接种的肿瘤细胞. 具有弱免疫原性的靶细胞转入CD基因后, 能被5-FC抑杀, 而且能够产生免疫记忆, 故经5-FC抑杀后的肿瘤细胞可作为抗癌疫苗^[13-14]. 另外有人认为, CD蛋白本身可能是一种超抗原, 可激活免疫介导的抑瘤作用^[15]. Hogge *et al*^[16]和Shi *et al*^[17]的研究表明自杀基因引起肿瘤细胞死亡后, 释放出肿瘤源性肽类被APC摄取, 然后激活CTL细胞, 局部表达的GM-CSF则显著增强这种抗原递呈能力, 从而增强杀伤和BE. Sakai *et al*^[18]在肝细胞癌的HSV-TK/GCV治疗体系中, 联合使用单核趋化蛋白-1基因治疗, 可显著增强GCV的疗效. Chen *et al*^[19]联合IL-2基因和HSV-TK基因用于结肠癌肝转移模型的治疗, 结果表明联合TK和IL-2基因较单个基因具有显著更好的效果. (3)瘤体缺血机制. Ram *et al*^[20]认为处于分裂活跃状态的肿瘤血管内皮细胞, 在应用病毒载体转染时, 极易被导入自杀基因而受到前药的损伤, 导致肿瘤因供血障碍而出现缺血性坏死.

■ 名词解释

自杀基因: 为病毒和细菌等原核生物含有的一类基因, 其编码的酶能将无毒(或低毒)的药物前体转化为细胞毒性药物. 将这类基因导入靶细胞, 使靶细胞对相应的药物前体产生杀伤敏感性的治疗策略被称为“自杀基因疗法”.

旁观者效应: 即转入自杀基因的肿瘤细胞虽只有一部分, 但经药物前体治疗后却引起肿瘤整体抑制, 不但转基因的肿瘤细胞被杀灭, 且周围大量未转染的癌细胞也被杀死.

■同行评价

CD/5-FC自杀基因体系的研究在体外、裸鼠体内、小型到大型正常免疫力动物体内的实验环境和条件是完全不同的,实验结果则可能迥然不同.本试验在小型免疫全能动物体内(KM鼠体内)研究CD/5-FC(腹腔给药)协同鼠 γ -IFN(皮下给药)对H22细胞的杀伤、抑制及远端旁观者效应,实验表明:增强免疫力对提高CD/5-FC直接杀伤癌细胞和远距离旁观者效应有显著性意义,提供了更加接近临床的自杀基因治疗的实验数据,具有重要的临床价值.

在体内试验研究中,很多研究者认为完整的免疫功能对自杀基因的BE是必需的. Freeman *et al*^[21]用HSV-TK转导的肿瘤细胞接种免疫全能的小鼠,随后用GCV处理,近90%的肿瘤细胞消退;相反,免疫缺陷的裸鼠(缺乏T细胞免疫)接种转导HSV-TK的肿瘤细胞并用GCV处理,无明显肿瘤消退效应.有免疫力动物组的免疫组化和RT-PCR则检测到TNF-alpha, IL-1, IL-6的mRNA及GM-CSF的存在; Caruso *et al*^[22]发现在接种了自杀基因的免疫全能的小鼠肿瘤组织周围和肿瘤内有大量的巨噬细胞和T淋巴细胞浸润.本课题在小型正常免疫力动物KM鼠体内CD/5-FC对H22细胞抑制的研究中, B1和C1组的比较、B2和C2组的比较差异无显著性意义,表明正常免疫机制对转染自杀基因细胞的直接抑杀和BE有很强作用, BE的发生同免疫机制存在密切联系.

Consalvo *et al*^[23]首先发现了远距离BE(distant bystander effect),用CD转导的肿瘤细胞接种在鼠的一侧皮下,给予5-FC后,可使肺内的转移灶消退,远距离BE的机制尚未阐明, Kianmanesh *et al*^[24]提出可能与细胞杀死后释放抗原刺激机体的免疫系统有关. Nanni *et al*^[25]的研究表明:联合转染CD及 γ -IFN基因,在体内表达CD及 γ -IFN蛋白,在不给予5-FC前药的条件下,肿瘤细胞就被显著抑制,体内试验远处肺转移癌被显著抑制,但在裸鼠抑制则不明显.这也支持免疫功能的健全在远距离BE中是必要的.本研究就CD/5-FC(腹腔给药)协同鼠 γ -IFN(皮下给药)在KM鼠体内对H22细胞的杀伤、抑制及远端BE做一研究,采用在两个点瞬时转染CD基因和无CD基因的空质粒的方法观察远距离BE的发生,结果表明,在未给予前药5-FC但给予IFN的条件下,体内转CD侧癌细胞被显著抑制,且诱导免疫攻击远距离未转染的癌细胞,也有抑制作用;联合给予5-FC及 γ -IFN,对CD⁺癌细胞的抑制较仅给予5-FC有显著的增强,且远距离BE也较单独因素(单独给5-FC或IFN)显著增强.说明增强免疫力对提高CD/5-FC直接杀伤癌细胞和远距离BE是很有必要的.免疫功能的介导是BE和远距离BE作用的主要机制之一, IFN作为一种已被广泛应用的成熟的廉价的生物因子,可以作为CD/5-FC抑制恶性肿瘤很好的增强因子,两者的联合,对肿瘤的抑杀以及远距离BE的作用,用于晚期恶性肿瘤的“根治性”治疗

具有很好的应用前景.

目前自杀基因的抑癌体系还存在很多不足,如单自杀基因存在细胞及组织特异性和治疗的耐药性,目的基因转染率过低等,针对驱动子选择性的双自杀基因以及新转染方法的研究则成了该研究领域的热点.如利用肿瘤特异性基因调控元件调控自杀基因表达, erbB-2, α -人乳白蛋白(hALA)启动子驱动自杀基因进行乳腺癌基因治疗,甲胎蛋白(AFP)基因启动子用于肝癌自杀基因疗法,癌胚抗原(CEA)基因启动子用于肠道肿瘤自杀基因疗法.又如李强 *et al*^[26]的研究表明:KDR启动子驱动双自杀基因靶向选择性地杀伤人胃癌SCG7901细胞,并存在BE,且较单自杀基因有更好的抑杀效果. Rogulski *et al*^[27]试验表明转导CD/HSV-1TK融合基因的神经胶质瘤细胞易被杀灭,该基因表达具有双重作用的融合蛋白(CDglyTK),他导致的协同细胞毒作用是单用的2-3倍,且可使表达细胞有更好的放射敏感性,是单用CD/5-FC体系的2.44倍. Rogulski *et al*^[28]的研究表明,双自杀基因(CD-HSV-TK)治疗对大的肿瘤组织更加有效,可使其体积减少99%,显著降低肿瘤的压迫效应.新的转染方法研究也是自杀基因治疗研究的热点和难点, Carrio *et al*^[29]在胰腺癌动物模型中,联合使用腺病毒和逆转录病毒两种载体进行HSV-tk/GCV治疗,肿瘤体积缩小更为显著. Kanyama *et al*^[30]使用日本嗜血病毒-脂质体系统携带CD基因重复转染胰腺癌细胞,效果较为理想.在慢病毒载体的研究, Gusella *et al*^[31]已经成功将携带标记基因的慢病毒载体转导到BALB/C小鼠肾脏细胞. Follenzi *et al*^[32]应用改良的慢病毒载体可有效地转导大鼠肝脏实质及非实质细胞、脾脏和骨髓细胞,并可稳定表达标记基因.陈海金 *et al*^[4]则用慢病毒介导转染双自杀基因,并有较高的转染效率和抑杀效果.未来,特异性的启动子、更好的基因转染方法、多自杀基因联合及辅助免疫增强生物因子将大大的提高了自杀基因的应用前景.

4 参考文献

- 1 Moolten FL. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res* 1986; 46: 5276-5281
- 2 Mullen CA. Metabolic suicide genes in gene therapy. *Pharmacol Ther* 1994; 63: 199-207
- 3 谭宇蕙, 吴映雅, 杜标炎, 胡岳山, 赵鹏, 李杰芬. 大鼠肝癌细胞HSV-tk/GCV自杀基因系统的构建及其旁

- 观者效应. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2069-2073
- 4 陈海金, 黄宗海, 苏国强, 吴爱国, 俞金龙. 慢病毒介导的双自杀基因对大肠癌细胞的靶向杀伤作用. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1681-1687
 - 5 张雷, 刘彤华, 崔全才. 不同药物敏感基因对人胰腺癌细胞PC-2的杀伤作用. 中华病理学杂志 1998; 27: 412-415
 - 6 Deonarain MP, Epenetos AA. Targeting enzymes for cancer therapy: old enzymes in new roles. *Br J Cancer* 1994; 70: 786-794
 - 7 Dilber MS, Abedi MR, Christensson B, Bjorkstrand B, Kidder GM, Naus CC, Gahrton G, Smith CI. Gap junctions promote the bystander effect of herpes simplex virus thymidine kinase *in vivo*. *Cancer Res* 1997; 57: 1523-1528
 - 8 Ishii-Morita H, Agbaria R, Mullen CA, Hirano H, Koeplin DA, Ram Z, Oldfield EH, Johns DG, Blaese RM. Mechanism of 'bystander effect' killing in the herpes simplex thymidine kinase gene therapy model of cancer treatment. *Gene Ther* 1997; 4: 244-251
 - 9 Mesnil M, Piccoli C, Tiraby G, Willecke K, Yamasaki H. Bystander killing of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1831-1835
 - 10 Kuriyama S, Masui K, Sakamoto T, Nakatani T, Kikukawa M, Tsujinoue H, Mitoro A, Yamazaki M, Yoshiji H, Fukui H, Ikenaka K, Mullen CA, Tsujii T. Bystander effect caused by cytosine deaminase gene and 5-fluorocytosine *in vitro* is substantially mediated by generated 5-fluorouracil. *Anticancer Res* 1998; 18: 3399-3406
 - 11 Huber BE, Austin EA, Good SS, Knick VC, Tibbels S, Richards CA. *In vivo* antitumor activity of 5-fluorocytosine on human colorectal carcinoma cells genetically modified to express cytosine deaminase. *Cancer Res* 1993; 53: 4619-4626
 - 12 Wygoda MR, Wilson MR, Davis MA, Trosko JE, Rehemtulla A, Lawrence TS. Protection of herpes simplex virus thymidine kinase-transduced cells from ganciclovir-mediated cytotoxicity by bystander cells: the Good Samaritan effect. *Cancer Res* 1997; 57: 1699-1703
 - 13 Mullen CA, Coale MM, Lowe R, Blaese RM. Tumors expressing the cytosine deaminase suicide gene can be eliminated *in vivo* with 5-fluorocytosine and induce protective immunity to wild type tumor. *Cancer Res* 1994; 54: 1503-1506
 - 14 Nielsen CS, Moorman DW, Levy JP, Link CJ Jr. Herpes simplex thymidine kinase gene transfer is required for complete regression of murine colon adenocarcinoma. *Am Surg* 1997; 63: 617-620
 - 15 McLellan AD, Sorg RV, Williams LA, Hart DN. Human dendritic cells activate T lymphocytes via a CD40: CD40 ligand-dependent pathway. *Eur J Immunol* 1996; 26: 1204-1210
 - 16 Hogge GS, Burkholder JK, Culp J, Albertini MR, Dubielzig RR, Yang NS, MacEwen EG. Preclinical development of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transfected melanoma cell vaccine using established canine cell lines and normal dogs. *Cancer Gene Ther* 1999; 6: 26-36
 - 17 Shi FS, Weber S, Gan J, Rakhmilevich AL, Mahvi DM. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) secreted by cDNA-transfected tumor cells induces a more potent antitumor response than exogenous GM-CSF. *Cancer Gene Ther* 1999; 6: 81-88
 - 18 Sakai Y, Kaneko S, Nakamoto Y, Kagaya T, Mukaida N, Kobayashi K. Enhanced anti-tumor effects of herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir system by codelivering monocyte chemoattractant protein-1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther* 2001; 8: 695-704
 - 19 Chen SH, Chen XH, Wang Y, Kosai K, Finegold MJ, Rich SS, Woo SL. Combination gene therapy for liver metastasis of colon carcinoma *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 2577-2581
 - 20 Ram Z, Walbridge S, Shawker T, Culver KW, Blaese RM, Oldfield EH. The effect of thymidine kinase transduction and ganciclovir therapy on tumor vasculature and growth of 9L gliomas in rats. *J Neurosurg* 1994; 81: 256-260
 - 21 Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, Packman CH, Koeplin DS, Moolten FL, Abraham GN. The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res* 1993; 53: 5274-5283
 - 22 Caruso M, Panis Y, Gagandeep S, Houssin D, Salzmann JL, Klatzmann D. Regression of established macroscopic liver metastases after *in situ* transduction of a suicide gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7024-7028
 - 23 Consalvo M, Mullen CA, Modesti A, Musiani P, Allione A, Cavallo F, Giovarelli M, Forni G. 5-Fluorocytosine-induced eradication of murine adenocarcinomas engineered to express the cytosine deaminase suicide gene requires host immune competence and leaves an efficient memory. *J Immunol* 1995; 154: 5302-5312
 - 24 Kianmanesh AR, Perrin H, Panis Y, Fabre M, Nagy HJ, Houssin D, Klatzmann D. A "distant" bystander effect of suicide gene therapy: regression of nontransduced tumors together with a distant transduced tumor. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 1807-1814
 - 25 Nanni P, De Giovanni C, Nicoletti G, Landuzzi L, Rossi I, Frabetti F, Giovarelli M, Forni G, Cavallo F, Di Carlo E, Musiani P, Lollini PL. The immune response elicited by mammary adenocarcinoma cells transduced with interferon-gamma and cytosine deaminase genes cures lung metastases by parental cells. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 217-224
 - 26 李强, 黄宗海, 俞金龙, 苏国强, 厉周, 周光军. KDR启动子驱动双自杀基因靶向杀伤人胃癌细胞的作用. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2997-3001
 - 27 Rogulski KR, Kim JH, Kim SH, Freytag SO. Glioma cells transduced with an Escherichia coli CD/HSV-1 TK fusion gene exhibit enhanced metabolic suicide and radiosensitivity. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 73-85
 - 28 Rogulski KR, Zhang K, Kolozsvary A, Kim JH, Freytag SO. Pronounced antitumor effects and tumor radiosensitization of double suicide gene therapy. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 2081-2088
 - 29 Carrio M, Romagosa A, Mercade E, Mazo A, Nadal M, Gomez-Foix AM, Fillat C. Enhanced pancreatic tumor regression by a combination of adenovirus and retrovirus-mediated delivery of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Gene Ther* 1999; 6: 547-553
 - 30 Kanyama H, Tomita N, Yamano T, Aihara T, Miyoshi Y, Ohue M, Sekimoto M, Sakita I, Tamaki Y, Kaneda Y, Senter PD, Monden M. Usefulness of

- repeated direct intratumoral gene transfer using hemagglutinating virus of Japan-liposome method for cytosine deaminase suicide gene therapy. *Cancer Res* 2001; 61: 14-18
- 31 Gusella GL, Fedorova E, Hanss B, Marras D, Klotman ME, Klotman PE. Lentiviral gene transduction of kidney. *Hum Gene Ther* 2002; 13: 407-414
- 32 Follenzi A, Sabatino G, Lombardo A, Boccaccio C, Naldini L. Efficient gene delivery and targeted expression to hepatocytes *in vivo* by improved lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 2002; 13: 243-260

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,并附光盘或发电子邮件至211zyke@163.com或czs.xiaohua@163.com(尽量以电子邮件发送)。征文请于2007-06-30前邮寄。

2 学习班招收对象

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

3 联系方式

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

以壳聚糖为佐剂的幽门螺杆菌疫苗的免疫治疗作用

谢勇, 龚燕锋, 周南进, 陈江, 吕农华, 梅承誉, 侯晓华

谢勇, 侯晓华, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化科湖北省武汉市 430022
谢勇, 龚燕锋, 陈江, 吕农华, 梅承誉, 南昌大学第一附属医院消化系病研究所 江西省南昌市 330006
周南进, 江西省医学科学研究所生物化学研究室 江西省南昌市 330006
谢勇, 华中科技大学同济医学院附属协和医院在职博士生, 主要从事消化系统疾病的基础与临床研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30460052
江西省学科带头人培养项目, No. K010501
通讯作者: 侯晓华, 430022, 湖北省武汉市, 湖北省武汉市华中科技大学同济医学院附属协和医院消化科。
houxh@public.wh.hb.cn
电话: 0791-8692507
收稿日期: 2006-11-25 接受日期: 2006-12-22

Immune therapeutic effect of *Helicobacter pylori* vaccine with chitosan adjuvant

Yong Xie, Yan-Feng Gong, Nan-Jin Zhou, Jiang Chen, Nong-Hua Lv, Cheng-Yu Mei, Xiao-Hua Hou

Yong Xie, Xiao-Hua Hou, Department of Gastroenterology, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Yong Xie, Yan-Feng Gong, Jiang Chen, Nong-Hua Lv, Cheng-Yu Mei, Institute of Digestive Diseases, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Nan-Jin Zhou, Department of Biochemistry, Jiangxi Institute of Medical Sciences, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30460052, and the Foundation for Subject Leader Program of Jiangxi Province, No. K010501
Correspondence to: Xiao-Hua Hou, Department of Gastroenterology, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. houxh@public.wh.hb.cn
Received: 2006-11-25 Accepted: 2006-12-22

Abstract

AIM: To investigate the roles of *H pylori* vaccine with chitosan as adjuvant in the immunological therapy of *H pylori* infection.

METHODS: Female BALB/c mice infected *H pylori* were randomly divided into group A, B, C, D and E, which were treated with phosphate buffered saline (PBS), *H pylori* antigen, *H pylori*-antigen plus chitosan solution, *H pylori* antigen plus chitosan particles, and *H pylori* antigen plus

cholera toxin (CT), respectively. The vaccine was orally given once a week for 4 weeks. At the 4th week after the last immunization, these mice were killed and gastric mucosa were embedded in paraffin, then assayed with Giemsa and HE staining. At the same time, quantitative *H pylori* culture was performed, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect anti-*H pylori* IgA in saliva and gastric mucosa and anti-*H pylori* IgG in serum.

RESULTS: In the groups with chitosan as adjuvant, the eradication of *H pylori* was achieved in 58.33% mice, which was in accordance with that in the group with CT as adjuvant (45.45%), and the colonization density of *H pylori* in the groups with chitosan as adjuvant was significantly lower than that in the other groups ($F = 24.166, P < 0.05-0.001$). The degrees of acute inflammation in gastric mucosal were significantly lower in mice with adjuvant than those in group A and B ($H = 21.873, P < 0.05-0.001$); the degrees of chronic inflammation in gastric mucosal were significantly lower in the groups with adjuvant chitosan than those in the other groups ($H = 20.213, P < 0.05-0.001$). The levels of specific anti-*H pylori* IgA in gastric mucosa ($60.18 \pm 19.87, 63.01 \pm 20.92, 61.16 \pm 22.25$) and saliva ($3.28 \pm 1.38, 2.81 \pm 1.56, 3.03 \pm 1.52$), and specific anti-*H pylori* IgG ($12.73 \pm 3.95, 12.06 \pm 4.84, 11.83 \pm 4.31$) in sera in the groups with adjuvant were significantly higher than those in group A (saliva: 1.19 ± 0.63 , gastric mucosa: 15.56 ± 6.24 , serum: 6.56 ± 3.50) and group B (saliva: 1.32 ± 0.30 , gastric mucosa: 27.25 ± 6.56 , serum: 7.86 ± 4.02) ($P < 0.05-0.001$).

CONCLUSION: *H pylori* vaccine with chitosan as adjuvant can eradicate or significantly reduce *H pylori* colonization in the gastric mucosa of mice and induce local specific humoral immune response in gastric mucosa successfully.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Chitosan; Therapeutic vaccine; Adjuvant

Xie Y, Gong YF, Zhou NJ, Chen J, Lv NH, Mei CY, Hou XH. Immune therapeutic effect of *Helicobacter pylori* vaccine with chitosan adjuvant. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(6):561-567

■背景资料

*H pylori*治疗性疫苗的研究相对较少。*H pylori*抗原经黏膜免疫需要有效的黏膜佐剂,传统的黏膜佐剂对人体的毒副作用大,不能应用于人类。壳聚糖无毒、无刺激性、无抗原性、组织相容性良好、在体内可降解吸收。研究表明壳聚糖可有有效的促进局部(特别是黏膜局部)的免疫反应,增强抗原传递系统功能,具有免疫佐剂的效应,因此有望成为*H pylori*疫苗的黏膜佐剂。

■ 研发前沿

*H pylori*疫苗的研究是近年来幽门螺杆菌相关性疾病预防研究中的重点和热点,目前*H pylori*蛋白疫苗研究所面临的最大挑战就是选择高效无毒的黏膜佐剂,这一问题一直是限制*H pylori*疫苗发展的“瓶颈”。人们正在积极寻找高效无毒的新型佐剂,以期突破这一限制*H pylori*疫苗发展的“瓶颈”。

摘要

目的: 探讨以壳聚糖为佐剂的*H pylori*疫苗对*H pylori*感染的免疫治疗作用。

方法: 建立BALB/c小鼠*H pylori*感染的动物模型后,随机分为5组:空白对照组、*H pylori*抗原组、*H pylori*抗原+壳聚糖酸溶液组、*H pylori*抗原+壳聚糖颗粒组、*H pylori*抗原+霍乱毒素(CT)组。各组于第0, 7, 14, 21天灌胃免疫1次。4 wk后,采用定量*H pylori*培养和病理改良Giemsa染色法检测胃黏膜内*H pylori*感染情况、HE染色检测胃黏膜炎症程度、用间接ELISA法检测唾液和胃黏膜内抗*H pylori* IgA和血清中抗*H pylori* IgG。

结果: 以壳聚糖为佐剂的*H pylori*疫苗对*H pylori*感染的清除率为58.33%,与以CT为佐剂组相似(45.45%);在*H pylori*未清除小鼠,以壳聚糖为佐剂组*H pylori*的定植密度显著低于其他各组($F = 24.16, P < 0.05-0.001$);含佐剂组胃黏膜急性炎症程度显著低于对照组和单纯*H pylori*抗原组($H = 21.873, P < 0.05-0.001$),以壳聚糖为佐剂组胃黏膜的慢性炎症程度显著低于对照组、单纯*H pylori*抗原组和以CT为佐剂组($H = 20.213, P < 0.05-0.001$)。含佐剂组唾液和胃黏膜内抗*H pylori* IgA(唾液: $3.28 \pm 1.38, 2.81 \pm 1.56, 3.03 \pm 1.52$; 胃黏膜: $60.18 \pm 19.87, 63.01 \pm 20.92, 61.16 \pm 22.25$)及血清抗*H pylori* IgG($12.73 \pm 3.95, 12.06 \pm 4.84, 11.83 \pm 4.31$)显著高于对照组(唾液: 1.19 ± 0.63 , 胃黏膜: 15.56 ± 6.24 , 血清: 6.56 ± 3.50)和单纯抗原组(唾液: 1.32 ± 0.30 , 胃黏膜: 27.25 ± 6.56 , 血清: 7.86 ± 4.02)($P < 0.05-0.001$)。

结论: 以壳聚糖为佐剂的*H pylori*疫苗对*H pylori*感染具有免疫治疗作用,并可成功诱导黏膜局部的特异性体液免疫应答。

关键词: 幽门螺杆菌; 壳聚糖; 治疗性疫苗; 佐剂

谢勇, 龚燕锋, 周南进, 陈江, 吕农华, 梅承誉, 侯晓华. 以壳聚糖为佐剂的幽门螺杆菌疫苗的免疫治疗作用. 世界华人消化杂志 2007;15(6):561-567

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/561.asp>

0 引言

已有研究证实幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)疫苗接种可保护动物免受*H pylori*感染^[1-3],然而治疗性疫苗的研究相对较少。*H pylori*抗原经黏膜免疫需要有效的黏膜佐剂,目前最为有效且最常用的佐剂是霍乱毒素(CT)和大肠杆菌不

耐热毒素(LT),但其对人体的毒副作用大,不能应用于人类,目前尚无一种高效、无毒、完全适用于人类的黏膜佐剂。筛选有效而又无毒副作用的黏膜佐剂是*H pylori*疫苗研究难点与热点。壳聚糖是甲壳素的脱乙酰化产物,他具有良好的生物学特性,无毒、无刺激性、无抗原性、组织相容性良好、在体内可降解吸收^[4]。国外学者研究表明壳聚糖可有效的促进局部(特别是黏膜局部)的免疫反应,增强抗原传递系统功能,具有免疫佐剂的效应^[5-8]。我们以前的研究已证实以壳聚糖为佐剂的*H pylori*疫苗对*H pylori*感染具有免疫保护作用^[9-10],但是他对*H pylori*感染是否具有免疫治疗作用尚不清楚,本研究观察了以壳聚糖为佐剂的*H pylori*疫苗对*H pylori*感染的免疫治疗作用,并初步探讨了其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 ♀清洁级BALB/c小鼠,6-8周龄,平均体质量22.5 g,购自中科院上海实验动物中心,并在SPF级实验室(江西省药物研究所)内饲养。88.5%脱乙酰度壳聚糖,上海其胜生物制品有限公司产品。空肠弯曲菌琼脂基础、布氏肉汤培养基础,中国腹泻病控制上海试剂供应研究中心产品。兔抗鼠IgA和辣根过氧化物标记的羊抗鼠IgA,美国Zymed-Laboratories inc.产品。辣根过氧化物标记的羊抗鼠IgG,美国Sigma-Aldrich inc.产品。链霉卵白素-过氧化物酶系列试剂盒,北京中山生物技术有限公司产品,霍乱毒素(CT),美国Sigma产品。*H pylori*国际标准菌株SS1由中国*H pylori*菌株库提供。

1.2 方法

1.2.1 *H pylori*的培养及*H pylori*抗原的制备 采用*H pylori*标准菌株SS1,将其接种在含75 mL/L无菌绵羊血的空肠弯曲菌选择性培养琼脂基础上,微需氧条件下培养2-3 d,用布氏肉汤洗脱细菌收集,并在660 nm波长下测细菌密度,1A值为 10^{11} CFU/L。*H pylori* SS1标准菌株培养2-3 d后,以PBS洗脱,并洗涤3次,超声粉碎后,在4℃下以8000 g离心30 min,取上清,蛋白定量后,置-85℃冰箱备用。

1.2.2 壳聚糖颗粒和酸溶液的制备 88.5%脱乙酰度壳聚糖与生理盐水配成10 g/L的溶液,再经超声(输出功率80 Hz)处理2次,每次5 min,间隔1 min,以600 r/min离心10 min后取其上清,并以400目网筛过滤,再以1400 g离心10 min后收集其沉淀物,即为壳聚糖小颗粒^[11]。将88.5%脱

表 1 免疫治疗各组 *H pylori* 感染情况

分组	n	<i>H pylori</i> 阳性率(%)	<i>H pylori</i> 清除率(%)	<i>H pylori</i> 组织学定植计分 (n)			
				0	1	2	3
(1)对照组	12	100 ^{ad}	0	0	5	4	3 ^{ad}
(2) <i>H pylori</i> 抗原组	11	90.91 ^c	9.09	2	4	3	2 ^c
(3) <i>H pylori</i> 抗原+ 壳聚糖溶液组	12	41.67	58.33	8	2	2	0
(4) <i>H pylori</i> 抗原+ 壳聚糖颗粒组	12	41.67	58.33	7	4	1	0
(5) <i>H pylori</i> 抗原+CT组	11	54.55	45.45	5	3	1	2

^a $P < 0.05$ vs (5)组; ^b $P < 0.05$ vs (3)和(4)组; ^c $P < 0.01$ vs (3)和(4)组。

乙酰度壳聚糖按30 g/L的比例溶解于8 mL/L乙酸盐水中即成壳聚糖酸溶液^[12]。

1.2.3 BALB/c小鼠*H pylori*感染动物模型的建立 6-8周龄的清洁级的BALB/c小鼠, 给予含 1×10^{12} /L的*H pylori* SS1活菌液, 0.5 mL/只灌胃, 隔日1次, 共5次。末次灌胃12 wk后, 取4只小鼠杀死后取胃黏膜进行病理检查和*H pylori*培养, 二者皆证实*H pylori*感染模型已建立。

1.2.4 免疫治疗 将小鼠按随机表格随机分为5组: 空白对照组: PBS溶液, 12只; *H pylori*抗原组, 11只; *H pylori*抗原+壳聚糖酸溶液组, 12只; *H pylori*抗原+壳聚糖颗粒组, 12只; *H pylori*抗原+CT组, 11只。 *H pylori*抗原1.2 mg/只/次, CT 5 μ g/只/次, 壳聚糖颗粒500 μ g/只/次, 壳聚糖酸溶液在所需各组中配成含壳聚糖5 g/L的终溶液。已确立*H pylori*感染的小鼠, 在末次灌菌12 wk时, 分别按上述分组和剂量于第0, 7, 14, 21天灌胃各免疫1次, 0.4 mL/只/次, 含有壳聚糖颗粒组, 灌胃前先经超声以20 Hz的输出功率混匀^[11]。末次免疫后4 wk, 禁食、禁水24 h后, 先腹腔内注射20 g/L毛果芸香碱0.4 mL, 收集唾液后, 摘除眼球取血, 处死小鼠, 无菌条件下, 取胃黏膜用于*H pylori*培养、免疫学检测和病理学检测。

1.2.5 胃黏膜内*H pylori*的测定 采用定量*H pylori*培养和病理改良Giemsa染色法测定。二者皆阴性记为阴性, 两者之一阳性记为阳性。*H pylori*定量培养: 胃黏膜在无菌条件下称重, 加布氏肉汤0.3 mL匀浆, 按一定比例(1:1, 1:4, 1:8)稀释, 取0.5 mL涂布于含75 mL/L无菌羊血的空肠弯曲菌琼脂基上, 微需氧条件下培养2-3 d。鉴定细菌后, 计算*H pylori*菌落数, 结果以菌落数/g(湿质量组织)表示。Giemsa染色: 胃黏膜石蜡切片改良Giemsa染色。在高倍镜下观察, 根据胃黏膜内

*H pylori*多少分别计0-4分^[13]

1.2.6 胃黏膜病理组织学检测 石蜡切片, HE染色, 根据固有层急性炎症细胞(中性粒细胞)和慢性炎症细胞(淋巴细胞和浆细胞)的浸润程度按Sakagami的标准分为0-3级^[13]。

1.2.7 胃黏膜内和唾液*H pylori*抗体的检测 采用间接ELISA法, 血清1:100稀释, 唾液1:5稀释, 胃黏膜匀浆上清液1:2稀释。结果在血清和唾液以 $A_{\text{待测标本}}/A_{\text{标准阴性}}$ 之比表示。胃黏膜内抗*H pylori* IgA以每g胃黏膜湿质量 $A_{\text{待测标本}}/A_{\text{标准阴性}}$ 表示。

统计学处理 计数资料采用卡方检验(精确概率法), 等级资料采用多个样本比较的秩和检验(Kruskal-Wallis法); 计量资料, 胃黏膜内*H pylori*定量培养的菌落数为偏态分布资料, 采用几何均数, 其余资料为算术均数, 多组间的比较采用方差分析, 两两间的比较采用 q 检验。应用SPSS11.0统计软件处理, P 值 < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

*H pylori*末次灌胃12 wk后, 处死4只小鼠, 取胃黏膜*H pylori*培养和Giemsa染色, *H pylori*均阳性(图1A); 病理学检测证实有胃黏膜炎症存在(图1B), 证实*H pylori*已定植。

2.1 免疫治疗各组*H pylori*感染情况 各组的*H pylori*免疫清除率有显著差异($P < 0.001$), 其中以壳聚糖为佐剂组显著高于对照组和单纯*H pylori*抗原组($P < 0.05$ 和 0.005), 以CT为佐剂组显著高于对照组($P < 0.05$)(表1)。各组的*H pylori*感染程度有明显差异($P < 0.005$), 进一步进行两两比较发现含佐剂*H pylori*定植密度显著低于对照组($P < 0.05-0.001$); 以壳聚糖为佐剂组*H pylori*的定植密度还显著低于单纯*H pylori*抗原组

■应用要点

现已普遍认为*H pylori*疫苗是在全球范围内控制*H pylori*感染的最有效方法, 治疗性*H pylori*的研发具有重要的临床应用价值, 以无毒副作用的壳聚糖为佐剂的*H pylori*疫苗如研制成功将具有良好的应用前景。

■同行评价

治疗性疫苗的研究具有重要的临床应用价值。作者以壳聚糖作为免疫佐剂,成功诱导幽门螺杆菌感染小鼠产生抗 *H pylori* IgG 抗体、抗 *H pylori* IgA, 为今后临床应用提供了前景。设计合理,分析客观。

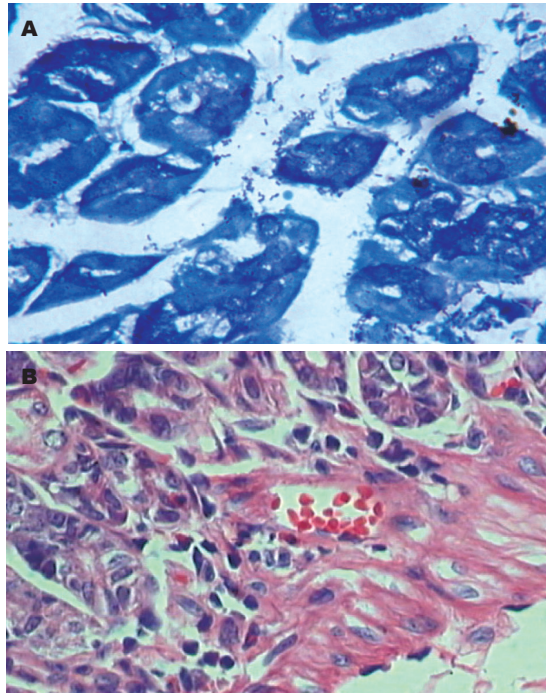


图1 *H pylori*接种12 wk后胃黏膜变化($\times 400$)。A: 胃小凹内见大量 *H pylori* 定植(Giemsa染色); B: 胃黏膜充血, 淋巴细胞和中性粒细胞浸润(HE染色)。

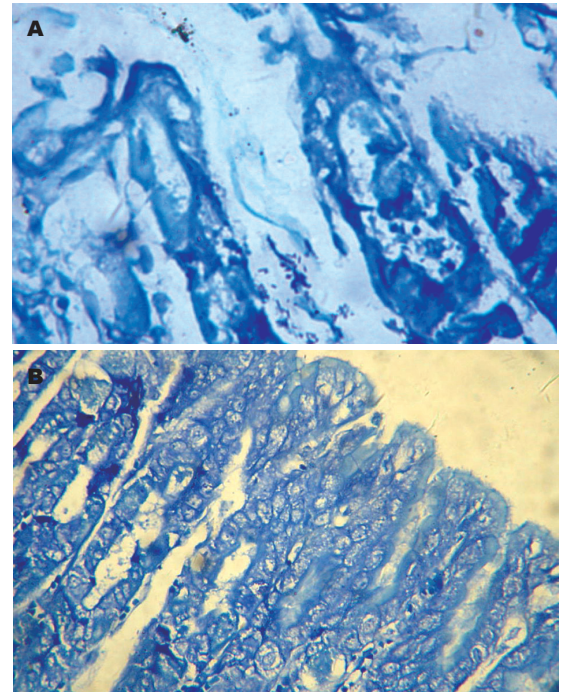


图2 免疫治疗组 *H pylori* 感染情况(Giemsa染色 $\times 400$)。A: 对照组可见胃小凹内有大量 *H pylori* 定植; B: 以壳聚糖为佐剂组在胃黏膜内未见 *H pylori* 定植。

($P < 0.05$)(图2, 表1)。对 *H pylori* 未清除小鼠进行 *H pylori* 定量培养, 各组 *H pylori* 定植密度有显著差异($F = 24.166, P < 0.001$), 进一步进行两两比较发现对照组的 *H pylori* 定植密度显著高于其他各组($P < 0.001$), 以壳聚糖为佐剂各组 *H pylori* 定植密度显著低于单纯 *H pylori* 抗原组和以CT为佐剂组($P < 0.05-0.01$)(表2)。

2.2 免疫治疗各组胃黏膜的炎症程度 各组胃黏膜慢性炎症程度有显著差异($H = 20.213, P < 0.001$), 其中含壳聚糖各组的慢性炎症程度显著低于不含壳聚糖各组($P < 0.05-0.001$)(图3, 表3)。各组胃黏膜急性炎症程度有显著差异($H = 21.873, P < 0.001$), 含佐剂各组的急性炎症程度显著低于对照组和单纯 *H pylori* 抗原组($P < 0.05-0.001$)(表3)。

2.3 免疫治疗各组唾液和胃黏膜内特异性抗 *H pylori* IgA 和血清中特异性抗 *H pylori* IgG 含量比较 各组胃黏膜和唾液内抗 *H pylori* IgA 含量和血清中特异性抗 *H pylori* IgG 含量有显著差异($F = 20.699, P < 0.001; F = 7.609, P < 0.001; F = 5.321, P < 0.001$), 其中含佐剂各组显著高于对照组和单纯 *H pylori* 抗原组($P < 0.01-0.001$)(表4)。

3 讨论

H pylori 疫苗不仅具有免疫保护作用, 有些疫

表2 *H pylori* 未清除小鼠胃黏膜内 *H pylori* 定量培养定植密度的比较

分组	n	<i>H pylori</i> 定植密度(CFU log)
(1)对照组	12	7.74 ± 0.21^d
(2) <i>H pylori</i> 抗原组	10	5.81 ± 1.06^b
(3) <i>H pylori</i> 抗原+壳聚糖溶液组	4	4.44 ± 0.75
(4) <i>H pylori</i> 抗原+壳聚糖颗粒组	5	4.32 ± 0.53
(5) <i>H pylori</i> 抗原+CT组	5	5.77 ± 0.25^c

^a $P < 0.05$ vs (3)和(4)组; ^b $P < 0.01$ vs (3)和(4)组; ^d $P < 0.01$ vs (2)-(5)组。

苗也同时具有免疫治疗作用。动物实验研究发现, 以 *H pylori* 全菌抗原为基础的疫苗对 *H pylori* 感染动物模型有一定的治疗效果^[14-18]。Nystrom et al^[16]用 *H pylori* 的溶解物加CT口服免疫已感染 *H pylori* 小鼠后, 可明显减少 *H pylori* 在胃内定植, 并成功的诱导了抗 *H pylori* 的特异性体液免疫反应和TH1免疫反应。本研究发现以壳聚糖和CT为佐剂的 *H pylori* 疫苗经口服免疫可治疗 *H pylori* 感染, 其对 *H pylori* 感染的清除率达58.33%-45.45%, 并且在 *H pylori* 未根除的小鼠 *H pylori* 在胃黏膜内的定植密度也显著低于对照组和无佐剂组, 表明以壳聚糖和CT为佐剂的

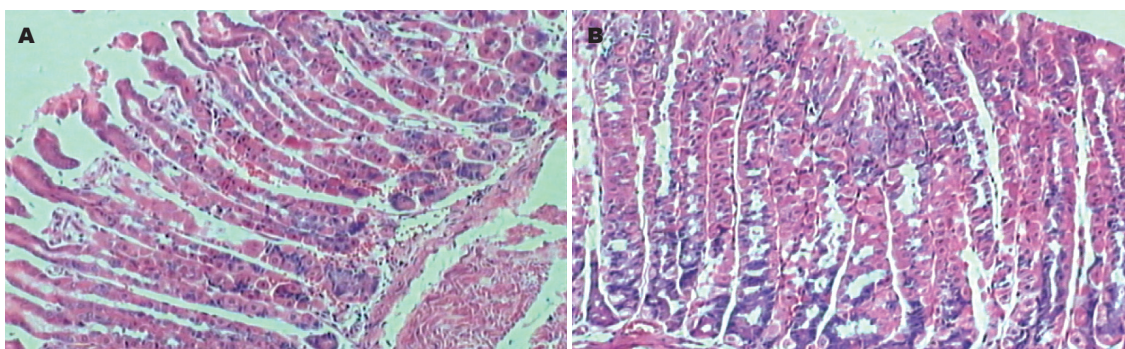


图 3 免疫治疗组胃黏膜的炎症程度(HE染色 × 100). A: 对照组胃黏膜内有较多的炎症细胞浸润; B: 以壳聚糖为佐剂组胃黏膜内轻度炎症细胞浸润.

表 3 免疫治疗各组胃黏膜炎症程度比较

分组	n	慢性炎症程度				急性炎症程度			
		0	1	2	3	0	1	2	3
(1)对照组	12	0	3	4	5 ^b	0	4	5	3 ^f
(2) <i>H. pylori</i> 抗原组	11	0	3	3	5 ^b	1	4	4	2 ^{bc}
(3) <i>H. pylori</i> 抗原+壳聚糖溶液组	12	0	10	2	0	8	3	1	0
(4) <i>H. pylori</i> 抗原+壳聚糖颗粒组	12	0	11	1	0	7	4	1	0
(5) <i>H. pylori</i> 抗原+CT组	11	0	5	4	2 ^a	5	3	2	1

^a*P*<0.05 vs (3)和(4)组, ^b*P*<0.01 vs (3)和(4)组; ^c*P*<0.05 vs (5)组; ^f*P*<0.01 vs (3)–(5)组.

表 4 免疫治疗各组唾液和胃黏膜内抗*H. pylori* IgA及血清中抗*H. pylori* IgG结果

分组	n	IgA		血清IgG
		胃黏膜	唾液	
(1)对照组	12	15.56 ± 6.24 ^f	1.19 ± 0.63 ^f	6.56 ± 3.50 ^f
(2) <i>H. pylori</i> 抗原组	11	27.25 ± 6.56 ^f	1.32 ± 0.30 ^f	7.86 ± 4.02 ^{ad}
(3) <i>H. pylori</i> 抗原+壳聚糖溶液组	12	60.18 ± 19.87	3.28 ± 1.38	12.73 ± 3.95
(4) <i>H. pylori</i> 抗原+壳聚糖颗粒组	12	63.01 ± 20.92	2.81 ± 1.56	12.06 ± 4.84
(5) <i>H. pylori</i> 抗原+CT组	11	61.16 ± 22.25	3.03 ± 1.52	11.83 ± 4.31

^a*P*<0.05 vs (4)组; ^d*P*<0.01 vs (3)和(5)组; ^f*P*<0.01 vs (3)–(5)组.

*H. pylori*疫苗对*H. pylori*感染具有免疫治疗作用. 治疗性免疫的成功有十分重要的意义, 因为他证明了疫苗接种的成功不是因为*H. pylori*感染之前诱导了免疫应答, 而是因为疫苗接种必定诱导了数量上或质量上与*H. pylori*慢性感染所不同的免疫应答, 打破了*H. pylori*感染所致的机体免疫耐受.

迄今为止, 所有证明有效的疫苗都需要一个合适的抗原呈递系统, 即存在佐剂依赖性或者

载体依赖性, 单纯的*H. pylori*抗原不能诱导保护性免疫应答, 目前*H. pylori*疫苗常用的黏膜佐剂是CT和LT, 但其对人体的毒副作用大, 不能应用于人类. 许多研究表明, 壳聚糖可有效促进局部(特别是黏膜局部)免疫应答, 增强抗原呈递系统的功能, 具有免疫佐剂效应. 国外学者报道壳聚糖作为脑膜炎球菌和支气管炎博德特菌疫苗的黏膜佐剂可成功的诱导保护性免疫反应^[19-20]. 本研究发现以壳聚糖为佐剂的*H. pylori*疫苗其对

*H pylori*感染的免疫清除率可达58.33%,与以CT为佐剂的*H pylori*疫苗的免疫清除率(45.45%)相近,明显高于单纯*H pylori*抗原组及对照组,提示壳聚糖可替代CT,作为*H pylori*疫苗的黏膜佐剂。*H pylori*定量检测发现,在*H pylori*未根除小鼠,以壳聚糖为佐剂的*H pylori*疫苗组小鼠胃黏膜内*H pylori*的定植密度显著低于以CT为佐剂组,说明壳聚糖的佐剂效应优于CT。

人体感染*H pylori*后虽可产生免疫应答,血清中可检出高滴度抗*H pylori* IgG抗体,但这种免疫应答不足以清除胃黏膜表面的*H pylori*,感染终身存在。IgG因其可激活补体及诱导粒-单细胞在感染部位聚集,释放炎性介质及活性氧等损害胃上皮细胞,而被认为有引起免疫损伤作用,但近来有学者认为IgG亦具有免疫保护作用^[21],目前尚无定论。我们的研究发现,以壳聚糖和CT为佐剂的*H pylori*疫苗可刺激小鼠产生抗*H pylori* IgG,虽然这一免疫应答是否具有免疫治疗作用有待进一步证实,但说明壳聚糖作为*H pylori*疫苗的免疫佐剂可诱导全身体液免疫应答, Bacon *et al*^[22]将壳聚糖与亚单位流感病毒疫苗合用,发现壳聚糖可明显提高局部和血清抗体反应,这与本研究结果一致。

本研究发现,以壳聚糖为佐剂组唾液和胃黏膜内抗*H pylori* IgA含量显著高于对照组和无佐剂组,与以CT为佐剂组无差别,说明壳聚糖可替代CT作为*H pylori*疫苗的黏膜佐剂。IgA是黏膜免疫应答中的保护性抗体,由黏膜固有层浆细胞分泌,作为机体黏膜屏障可抵御外源抗原分子侵入、中和胞外病原微生物、结合抗原形成免疫复合物由吞噬细胞吞噬清除,他可非特异地针对某一病原体,而发挥局部防御作用, IgA在*H pylori*疫苗的免疫保护作用中也起着重要作用。Goto *et al*^[23]用*H pylori* SS1全菌抗原以不同剂量与CT联合免疫接种于C57BL/6小鼠,并用*H pylori*活菌进行攻击,发现与攻击前相比粪便和唾液中抗*H pylori*特异性IgA水平明显升高,并发现局部sIgA与*H pylori*疫苗的免疫保护作用有良好相关性。Lee *et al*^[24]以LT为佐剂与尿素酶共同作用于小鼠,结果产生抗尿素酶sIgA抗体,使60%-100%小鼠获得保护性免疫而抵御*H felis*攻击。本研究以壳聚糖为佐剂的*H pylori*疫苗,可诱导胃黏膜局部产生特异性抗*H pylori* IgA,这可能在免疫清除*H pylori*感染中起重要作用。

4 参考文献

- Jeremy AH, Du Y, Dixon MF, Robinson PA, Crabtree JE. Protection against *Helicobacter pylori* infection in the Mongolian gerbil after prophylactic vaccination. *Microbes Infect* 2006; 8: 340-346
- 焦志勇, 陈旻湖, 朱森林, 李国庆, 胡品津. 表达ureB/hlyE融合蛋白的重组减毒鼠伤寒沙门疫苗菌预防幽门螺旋杆菌感染. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 787-789
- 陈洁, 陈旻湖, 王锦辉, 朱森林. 幽门螺杆菌疫苗接种小鼠产生免疫后胃炎的影响因素. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2275-2280
- Synowiecki J, Al-Khateeb NA. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2003; 43: 145-171
- van der Lubben IM, Verhoef JC, Borchard G, Junginger HE. Chitosan and its derivatives in mucosal drug and vaccine delivery. *Eur J Pharm Sci* 2001; 14: 201-207
- Huo Z, Sinha R, McNeela EA, Borrow R, Giemza R, Cosgrove C, Heath PT, Mills KH, Rappuoli R, Griffin GE, Lewis DJ. Induction of protective serum meningococcal bactericidal and diphtheria-neutralizing antibodies and mucosal immunoglobulin A in volunteers by nasal insufflations of the *Neisseria meningitidis* serogroup C polysaccharide-CRM197 conjugate vaccine mixed with chitosan. *Infect Immun* 2005; 73: 8256-8265
- Borges O, Borchard G, Verhoef JC, de Sousa A, Junginger HE. Preparation of coated nanoparticles for a new mucosal vaccine delivery system. *Int J Pharm* 2005; 299: 155-166
- Read RC, Naylor SC, Potter CW, Bond J, Jabbal-Gill I, Fisher A, Illum L, Jennings R. Effective nasal influenza vaccine delivery using chitosan. *Vaccine* 2005; 23: 4367-4374
- 谢勇, 龚燕锋, 周南进, 陈江, 周小江, 吕农华, 王崇文. 胃黏膜局部免疫反应在以壳聚糖为佐剂的幽门螺杆菌疫苗免疫保护中的作用. *中华医学杂志* 2005; 85: 2629-2635
- Yong Xie, Yanfeng Gong, Jianng Chen, Shuiyin Xiong, Nonghua Lu, Chongwen Wang. The study of adjuvant efficacy of chitosan in *H pylori* vaccine and its mechanism of immunological protection. *J gastroenterology hepatology* 2004; 19: A367
- Shibata Y, Foster LA, Metzger WJ, Myrvik QN. Alveolar macrophage priming by intravenous administration of chitin particles, polymers of N-acetyl-D-glucosamine, in mice. *Infect Immun* 1997; 65: 1734-1741
- Westerink MA, Smithson SL, Srivastava N, Blonder J, Coeshott C, Rosenthal GJ. ProJuvant (Pluronic F127/chitosan) enhances the immune response to intranasally administered tetanus toxoid. *Vaccine* 2001; 20: 711-723
- Sakagami T, Dixon M, O'Rourke J, Howlett R, Alderuccio F, Vella J, Shimoyama T, Lee A. Atrophic gastric changes in both *Helicobacter felis* and *Helicobacter pylori* infected mice are host dependent and separate from antral gastritis. *Gut* 1996; 39: 639-648
- Losonsky GA, Kotloff KL, Walker RI. B cell responses in gastric antrum and duodenum following oral inactivated *Helicobacter pylori* whole cell (HWC) vaccine and LT(R192G) in *H pylori*

- seronegative individuals. *Vaccine* 2003; 21: 562-565
- 15 Kotloff KL, Szein MB, Wasserman SS, Losonsky GA, DiLorenzo SC, Walker RI. Safety and immunogenicity of oral inactivated whole-cell *Helicobacter pylori* vaccine with adjuvant among volunteers with or without subclinical infection. *Infect Immun* 2001; 69: 3581-3590
- 16 Nystrom J, Raghavan S, Svennerholm AM. Mucosal immune responses are related to reduction of bacterial colonization in the stomach after therapeutic *Helicobacter pylori* immunization in mice. *Microbes Infect* 2006; 8: 442-449
- 17 Chui SY, Clay TM, Lysterly HK, Morse MA. The development of therapeutic and preventive vaccines for gastric cancer and *Helicobacter pylori*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1883-1889
- 18 白杨, 梁燕玲, 刘秀丽, 施理, 王继德, 张兆山, 周殿元, 张亚历. 黏附素保守区疫苗防治鼠幽门螺杆菌感染. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 468-471
- 19 Kang ML, Kang SG, Jiang HL, Shin SW, Lee DY, Ahn JM, Rayamahji N, Park IK, Shin SJ, Cho CS, Yoo HS. *In vivo* induction of mucosal immune responses by intranasal administration of chitosan microspheres containing *Bordetella bronchiseptica* DNT. *Eur J Pharm Biopharm* 2006; 63: 215-220
- 20 Baudner BC, Verhoef JC, Giuliani MM, Peppoloni S, Rappuoli R, Del Giudice G, Junginger HE. Protective immune responses to meningococcal C conjugate vaccine after intranasal immunization of mice with the LTK63 mutant plus chitosan or trimethyl chitosan chloride as novel delivery platform. *J Drug Target* 2005; 13: 489-498
- 21 Bogstedt AK, Nava S, Wadstrom T, Hammarstrom L. *Helicobacter pylori* infections in IgA deficiency: lack of role for the secretory immune system. *Clin Exp Immunol* 1996; 105: 202-204
- 22 Bacon A, Makin J, Sizer PJ, Jabbal-Gill I, Hinchcliffe M, Illum L, Chatfield S, Roberts M. Carbohydrate biopolymers enhance antibody responses to mucosally delivered vaccine antigens. *Infect Immun* 2000; 68: 5764-5770
- 23 Goto T, Nishizono A, Fujioka T, Ikewaki J, Mifune K, Nasu M. Local secretory immunoglobulin A and postimmunization gastritis correlate with protection against *Helicobacter pylori* infection after oral vaccination of mice. *Infect Immun* 1999; 67: 2531-2539
- 24 Lee CK, Weltzin R, Thomas WD Jr, Kleanthous H, Ermak TH, Soman G, Hill JE, Ackerman SK, Monath TP. Oral immunization with recombinant *Helicobacter pylori* urease induces secretory IgA antibodies and protects mice from challenge with *Helicobacter felis*. *J Infect Dis* 1995; 172: 161-172

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 •

中华医学会第七次全国消化系疾病学术会议征文通知

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

1 征文内容

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

2 征文要求

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

骨髓间充质干细胞向肝细胞的诱导分化

钟晓琳, 李昌平, 胡莲, 万居易

■背景资料

肝细胞移植(HCT)是治疗终末期肝功能衰竭的最有效手段之一, 但却受到细胞来源缺乏、免疫排斥反应等多种因素限制而影响其临床应用。骨髓间充质干细胞(MSCs)具有多向分化能力, 可能为肝细胞移植提供丰富的自体肝细胞来源。

钟晓琳, 李昌平, 泸州医学院附属医院消化科 四川省泸州市 646000

胡莲, 宜宾市第一人民医院消化科 四川省宜宾市 644000
万居易, 泸州医学院附属医院心胸外科 四川省泸州市 646000

钟晓琳, 2003年泸州医学院消化内科硕士, 医师, 主要从事肝病研究。

四川省教育厅资助课题, No.2003-A027

通讯作者: 李昌平, 646000, 四川省泸州市太平街25号, 泸州医学院附属医院消化内科. lichangping1965@sina.com
电话: 0830-2392753

收稿日期: 2006-10-30 接受日期: 2006-11-28

Hepatocytic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells

Xiao-Lin Zhong, Chang-Ping Li, Lian Hu, Ju-Yi Wan

Xiao-Lin Zhong, Chang-Ping Li, Department of Digestive Diseases, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Lian Hu, Department of Digestive Diseases, the First People's Hospital of Yibin City, Yibin 644000, Sichuan Province, China

Ju-Yi Wan, Department of Cardiac and Thoracic Surgery, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Supported by the Education Department Foundation of Sichuan Province, No.2003-A027

Correspondence to: Dr. Chang-Ping Li, Department of digestion, The Application Hospital Of Luzhou Medical College, 25 taiping jie, luzhou 646000, Sichuan province, china. lichangping1965@sina.com

Received: 2006-10-30 Accepted: 2006-11-28

Abstract

AIM: To explore the capability and effect of hepatocyte growth factor (HGF) and oncostatin M (OSM) in inducing the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) into hepatocytes *in vitro*.

METHODS: Rat MSCs were isolated and cultured. Passage 3 MSCs were divided into group A, B, C, D and E, which were induced by dulbecco's modified eagle medium-low glucose (DMEM-LG) plus 100 mL/L fetal calf serum (FCS), hepatocyte growth medium (HGM), HGM plus 20 $\mu\text{g/L}$ HGF, HGM plus 20 $\mu\text{g/L}$ OSM, and HGM plus 20 $\mu\text{g/L}$ HGF plus 20 $\mu\text{g/L}$

L OSM, respectively. The expression of alpha-fetoprotein (AFP) and cytokeratin 18 (CK18) were detected by immunocytochemistry; the glycogen deposit was examined by Periodic acid-Schiff (PAS) staining; and the urea content in culture supernatant was determined by glutamate dehydrogenases at different time points.

RESULTS: On the 7th day, the positive expression of AFP emerged in group C and E, and it was lower in the former than that in the latter ($\chi^2 = 6.322, P < 0.05$). With the extension of induction time, the expression of AFP was decreased gradually. The expression of CK18 was found in group E and C on the 7th and 14th day, respectively, and the glycogen deposit was observed on the 7th day both in group E and C. With the extension of induction time, the levels of CK18 and glycogen expression were elevated gradually. At the same time point, the expression rates of CK18 (14 d: $\chi^2 = 4.811, P < 0.05$; 21 d: $\chi^2 = 6.902, P < 0.01$; 28 d: $\chi^2 = 5.771, P < 0.05$) and glycogen (14 d: $\chi^2 = 6.902, P < 0.01$; 21 d: $\chi^2 = 6.818, P < 0.01$; 28 d: $\chi^2 = 6.818, P < 0.01$) were significantly higher in group E than those in group C. The urea concentration increased gradually with the induction time both in group C and E, but it increased faster in the latter. The expression of AFP, CK18, glucogen and the concentration of urea had no significant changes in group A, B, D.

CONCLUSION: HGF can induce the hepatocytic differentiation of MSCs, and its combination with OSM presents a better effect.

Key Words: Bone marrow mesenchymal stem cells; In vitro culture; Differentiation; Hepatocyte growth factor; Oncostatin M; Hepatocyte

Zhong XL, Li CP, Hu L, Wan JY. Hepatocytic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(6):568-573

摘要

目的: 探索肝细胞生长因子(HGF)、制瘤素M(OSM)在体外诱导骨髓间充质干细胞(MSCs)向肝细胞分化的能力及效果。

方法: 分离、培养大鼠MSCs, 取第3代按以下分组诱导其向肝细胞分化: A组: 低糖杜氏改良培养基(DMEM-LG)+100 mL/L胎牛血清(fetal calf, serum, FCS); B组: 肝细胞生长培养基(HGM); C组: HGM+20 $\mu\text{g/L}$ HGF; D组: HGM+20 $\mu\text{g/L}$ OSM; E组: HGM+20 $\mu\text{g/L}$ HGF+20 $\mu\text{g/L}$ OSM, 于不同时间点用免疫细胞化学检测甲胎蛋白(AFP)、细胞角蛋白18(CK18)表达, 高碘酸-希夫氏(PAS)染色检测糖原表达, 谷氨酰胺脱氢酶法检测上清液尿素含量。

结果: C、E组于诱导第7天出现AFP阳性表达, 以后其阳性表达率随诱导时间延长逐渐降低, 诱导第7天E组阳性表达率高于C组($\chi^2 = 6.322$, $P < 0.05$)。C组、E组分别于诱导第7、14天出现CK18阳性表达, 于诱导第7天开始出现糖原阳性表达, 随诱导时间延长表达率逐渐增高, 同一时间点E组CK18(14 d: $\chi^2 = 4.811$, $P < 0.05$; 21 d: $\chi^2 = 6.902$, $P < 0.01$; 28 d: $\chi^2 = 5.771$, $P < 0.05$)及糖原(14 d: $\chi^2 = 6.902$, $P < 0.01$; 21 d: $\chi^2 = 6.818$, $P < 0.01$; 28 d: $\chi^2 = 6.818$, $P < 0.01$)阳性表达率高于C组。C、E组培养上清液中尿素浓度随诱导时间延长逐渐增高, E组增长幅度比C组高。A、B、D组各时间点均未见AFP、CK18、糖原表达及尿素浓度变化。

结论: MSCs具有向肝细胞分化的能力, HGF能够诱导MSCs分化肝样细胞, OSM与HGF联合使用, 能促进MSCs的分化, 明显提高分化率。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 体外培养; 诱导分化; 肝细胞生长因子; 制瘤素M; 肝细胞

钟晓琳, 李昌平, 胡莲, 万居易. 骨髓间充质干细胞向肝细胞的诱导分化. 世界华人消化杂志 2007;15(6):568-573
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/568.asp>

0 引言

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种具有跨胚层多向分化潜能的成体干细胞, 在一定条件下可分化为骨、软骨、脂肪、神经元和造血基质细胞等各种体细胞^[1-4]。近年来, MSCs向肝细胞分化备受关注^[5-9], 我们采用密度梯度离心法联合贴壁培养法分离、纯化MSCs, 分别使用肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、制瘤素M(oncostatin M, OSM)及二者联合诱导MSCs向肝细胞分化, 并通过多种方法评价两种细胞因子的促分化能力。

1 材料和方法

1.1 材料 8-10 wk清洁级♀Wistar大鼠, 由泸州医学院动物实验中心提供。HGF, OSM为美国R&D公司产品, 胎牛血清为杭州四季青公司产品, 低糖杜氏改良培养基(DMEM-LG)、胰岛素-转铁蛋白-亚硒酸钠(insulin-transferrin-selenium, ITS)为美国Gibco公司产品, 淋巴细胞分离液为上海试剂二厂产品, 纤维蛋白连接素(fibronectin, FN)为瑞士Roche公司产品, 小鼠抗大鼠CK18 mAb、山羊抗小鼠SABC试剂盒、DAB试剂盒购自武汉博士德生物工程公司, 山羊抗人AFP多克隆抗体购自Santa Cruz公司, 兔抗山羊SP试剂盒购自北京中山生物技术有限公司, 尿素液体试剂盒购自上海申能-德塞诊断技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 MSCs的分离、培养与鉴定 在无菌条件下取8-10 wk Wistar大鼠股骨和胫骨骨髓细胞, 采用密度梯度离心联合贴壁培养法分离、纯化MSCs, 利用MSCs与其他贴壁细胞的贴壁差异性, 严格控制传代时酶的量 and 消化时间, 传代纯化MSCs, 显微镜下观察细胞形态, 取第3代(passage 3, P3) MSCs, 进行成骨、成脂诱导以鉴定MSCs的多向分化能力。

1.2.2 MSCs向肝细胞的诱导分化 肝细胞生长培养基(HGM)成分: DMEM-LG、100 mL/L FCS、地塞米松(dexamethasone, Dex) 10^{-7} mmol/L、羟乙基哌嗪乙磺酸(hydroxyethyl piperazine ethane-sulfonic acid, HEPES)20 mmol/L、葡萄糖1 g/L、半乳糖2 g/L、ITS 10 mL/L、Vit C1 mmol/L、谷氨酰胺0.73 g/L、青霉素100 kU/L、链霉素100 kU/L。实验分组: A组: DMEM-LG+100 mL/L FCS; B组: HGM; C组: HGM+20 $\mu\text{g/L}$ HGF; D组: HGM+20 $\mu\text{g/L}$ OSM; E组: HGM+20 $\mu\text{g/L}$ HGF+20 $\mu\text{g/L}$ OSM。诱导方法: 取P₃ MSCs, 用2.5 g/L胰蛋白酶消化后, 以 3×10^7 /L接种于预先用50 mg/L FN处理的24孔板中, 按上述分组加入培养基及诱导因子, 于37℃、饱和湿度、50 mL/L CO₂培养箱中进行诱导分化培养, 每4 d全量换液一次, 诱导细胞分化20-28 d。

1.2.3 诱导后MSCs的鉴定 肝细胞特异性标志物检测: 采用免疫细胞化学方法于诱导第0, 7, 14, 21, 28天取细胞爬片检测其AFP、CK18表达情况; 肝细胞糖原合成功能检测: 采用高碘酸-希夫氏(PAS)染色于诱导第0, 7, 14, 21, 28天取细胞爬片, 检测诱导分化细胞糖原储存功能; 肝细胞代谢功能检测: 诱导后每4 d收集各组培养细胞上

■ 研发前沿

MSCs具有多向分化潜能, 其分化方向由其所处的微环境决定, 且MSCs在骨髓中含量很少, 因此, 建立MSCs有效的体外分离、扩增方法, 研究MSCs定向分化的影响因素是实现MSCs向肝细胞分化的前提和关键。细胞因子和生长因子在组织和细胞分化中具有重要作用, 他们在骨髓干细胞向肝细胞分化中的作用的研究是目前的一个热点和难点。

■ 相关报道

近来的研究表明MSCs在一定条件下能分化为肝细胞, HGF, OSM, FGF-4, EGF等多种细胞因子都可能在诱导其向肝细胞分化中起关键作用, 但是各种因素具体的作用及何种因素才是诱导MSCs分化的理想因素目前还不清楚, 因此需进一步明确相关细胞因子在MSCs分化中的作用.

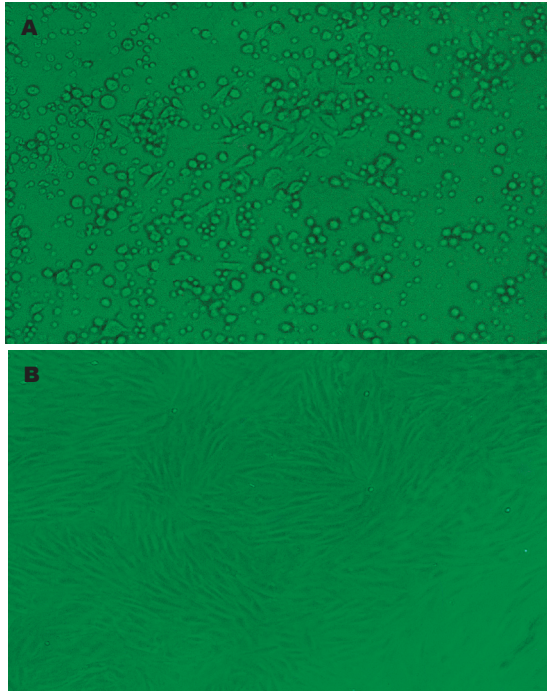


图1 MSCs的形态观察($\times 40$). A: 原代培养72 h; B: P_3 培养4 d.

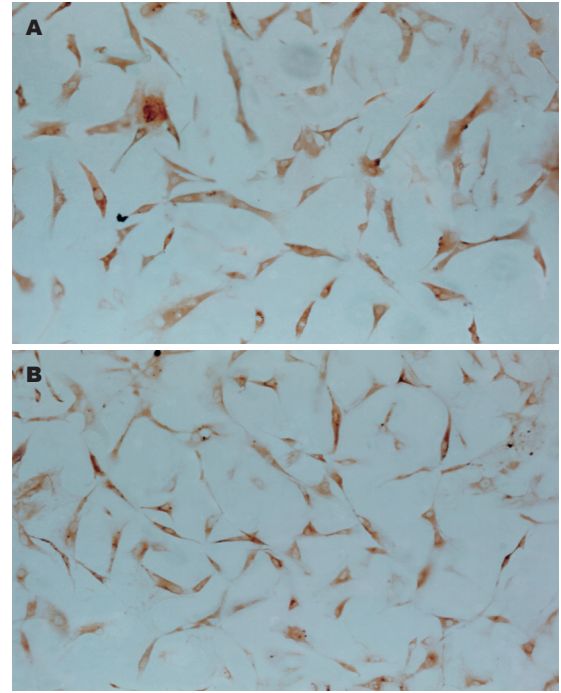


图2 诱导第7天AFP免疫细胞化学检测结果($\times 100$). A: HGF组; B: HGF+OSM组.

清液, 谷氨酸脱氢酶法检测上清液中尿素含量, 观察其动态变化趋势, 绘制尿素含量变化曲线.

统计学处理 实验结果计量资料以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 不同时间点、不同组之间的比较采用重复测量资料的方差分析, 计数资料采用秩和检验, 以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, 利用SPSS13.0软件进行统计分析.

2 结果

2.1 MSCs的形态观察和鉴定 接种4-6 h后可见部分细胞贴壁, 24 h后可见呈梭形、三角形、多角形、不规则形的贴壁细胞, 5-6 d即可形成分散的成纤维细胞集落 (colony-forming units-fibroblastic, CFU-F), 10-14 d相邻集落融合成片达80%左右. 原代细胞形态多样, 分布不均, 含杂细胞多, 随换液和传代次数增多, 细胞纯度提高, P_3 后细胞形态一致, 呈梭形外观的贴壁细胞, 核居中, 有1-2个核仁, 几乎不见杂细胞, 分布均匀, 呈漩涡状、平行状或鱼群状生长细胞排列. 经成骨诱导后, 碱性磷酸酶染色阳性, 成脂诱导后, 油红O染色阳性(图1A-B).

2.2 肝细胞特异性标志物检测 (1)AFP免疫细胞化学检测结果: AFP在诱导第0, 28天各组细胞均为阴性表达, 诱导第7, 14, 21天时C组及E组出现阳性表达, 且表达率逐渐降低($P < 0.05$). 诱导分化第7天, E组AFP表达率高于C组, 差别有

表1 AFP在不同时间点的阳性表达率(%)

分组	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d	χ^2	P
C组	0	62.2	18.2	7.0	0	23.418	0.000
E组	0	67.6 ^a	16.0	1.6 ^b	0	22.617	0.000

$\chi^2 = 6.322$, ^a $P < 0.05$; $\chi^2 = 6.860$, ^b $P < 0.01$ vs C组.

表2 CK18在不同时间点的阳性表达率(%)

分组	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d	χ^2	P
C组	0	0	19.2	50.0	70.6	23.409	0.000
E组	0	5.4	27.4 ^a	65.8 ^b	80.8 ^a	23.274	0.000

$\chi^2 = 4.811$, 5.771, ^a $P < 0.05$; $\chi^2 = 6.902$, ^b $P < 0.01$ vs C组.

统计学意义($P < 0.05$), 诱导分化第21天, E组AFP表达率低于C组, 差别有统计学意义($P < 0.05$). A, B, D组在7-28 d均未见阳性表达. 不加一抗对照为阴性结果(表1, 图2A-B); (2)CK18免疫细胞化学检测结果: CK18在诱导第0天各组细胞均为阴性表达, 诱导第7天E组出现CK18表达, 诱导第14, 21, 28天HGF及E组均出现阳性表达, 随诱导时间延长, 表达率逐渐增高, 差别有统计学意义($P < 0.05$). 在同一时间点, E组表达率均高于C组, 差别有统计学意义($P < 0.05$). A, B, D组在

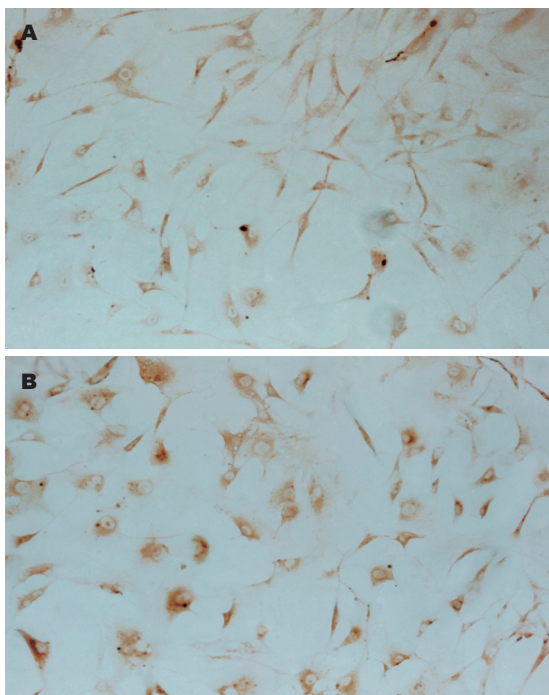


图 3 诱导第28天CK18免疫细胞化学检测结果($\times 100$). A: HGF组; B: HGF+OSM组.

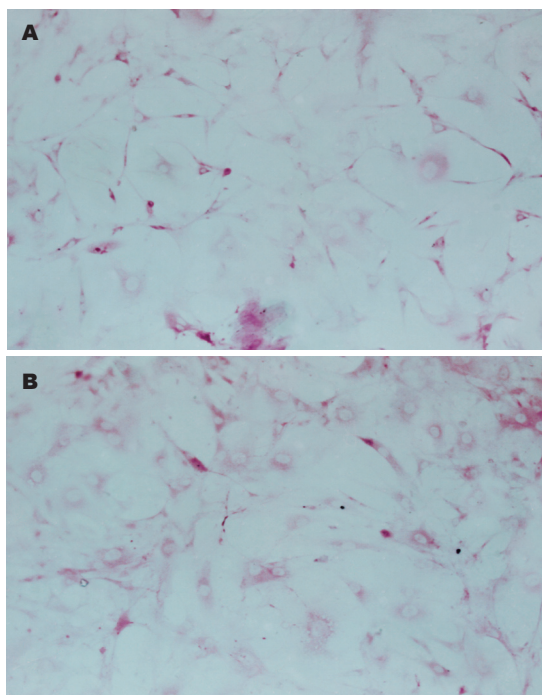


图 4 诱导第28天肝细胞糖元表达($\times 100$). A: HGF组; B: HGF+OSM组.

■ 创新盘点

HGF是肝脏发育及肝再生的过程最基本的细胞因子,也是诱导MSCs向肝细胞分化的可能的有效诱导因子,OSM在肝脏成熟发育过程中起重要作用,与其他细胞因子联合可以诱导MSCs分化,但HGF、OSM单独使用诱导MSCs向肝细胞的分化的能力,以及联合HGF使用能否提高分化效率、促进肝细胞成熟,国内外尚无报道.

分组	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d	χ^2	P
C组	0	0.6	13.6	36.6	56.2	22.855	0.000
E组	0	0.8	24.8 ^b	56.6 ^b	69.4 ^b	22.864	0.000

$\chi^2 = 6.902, 6.818, 6.818, ^b P < 0.01$ vs C组.

7-28 d均未见阳性表达. 不加一抗对照为阴性结果(表2, 图3A-B).

2.3 肝细胞糖原合成功能检测 糖原在诱导第0天各组细胞均为阴性表达, 诱导第7, 14, 21, 28天C组及E组均出现阳性表达, 随诱导时间延长, 表达率逐渐增高, 差别有统计学意义($P < 0.05$). 在同一时间点, E组表达率均高于C组, 差别有统计学意义($P < 0.05$). A, B, D组在7-28 d均未见阳性表达. P₃ MSCs对照为阴性结果(表3, 图4 A-B).

2.4 肝细胞代谢功能检测 将各组各时间点上清液中尿素浓度绘制成折线图, 经统计学分析, 各组间比较差别有统计学意义($P < 0.05$). A, B, D组培养上清液中尿素浓度无明显变化, 各组之间无明显差异($P > 0.05$). 而C组及E组尿素浓度随诱导时间延长逐渐增高, 分别与A, B, D组比较, 差别有统计学意义($P < 0.05$), E组尿素浓度增长幅度比C组高, 差别有统计学意义($P < 0.05$) (图5).

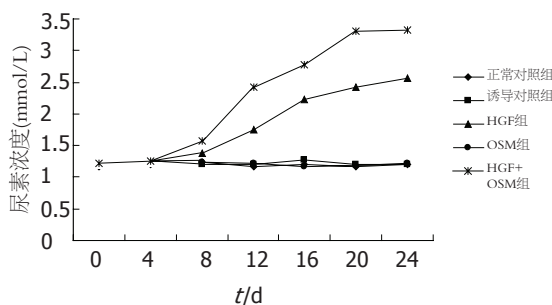


图 5 培养上清液尿素含量(mmol/L).

3 讨论

MSCs在体内含量很少, 骨髓中每10万单核细胞中大约有1个MSCs^[10]. 由于MSCs目前尚无特异性的表面抗原^[11], 故缺乏特异的分离鉴定方法. 现有的分离方法主要有: 免疫筛选法、贴壁培养筛选法、密度梯度离心法. 鉴定方法包括: 形态学观察、联合检测多个表面标志物、多向分化的潜能鉴定等. 我们采用密度梯度离心法联合贴壁培养法简单、有效的分离、纯化MSCs, 并证实其符合MSCs的形态特点, 能分化为成骨细胞和成脂细胞, 说明我们分离培养的细胞是未分化的MSCs, 具有多向分化能力, 可以用于向肝细胞的诱导分化.

细胞因子和生长因子在组织和细胞分化中具有重要作用^[12-14], 他们在骨髓干细胞向肝细胞分化中的作用的研究是目前的一个热点和难

■同行评价

本文探讨MSCs向肝细胞分化的能力及HGF、OSM诱导分化中的作用,立题思路清晰,设计科学,研究方法可靠,结果有创新性和参考意义。

点. HGF是肝脏发育及肝再生的过程最基本的细胞因子,他不仅能促进细胞分裂、迁移,抑制细胞凋亡促进肝细胞增殖,还能促进干细胞的分化^[15]. HGF的受体c-met是一种膜外部分拥有酪氨酸激酶域的跨膜蛋白,与HGF结合后,通过受体酪氨酸激酶信号途径,影响细胞核内的转录机构,通过调控某些特定基因的转录和表达影响细胞增殖、分化^[16-17]. 近年来的研究表明, HGF是诱导MSCs向肝细胞分化的可能的有效诱导因子之一^[18-24]. OSM是IL-6家族成员之一,他能诱导胎肝细胞分化为具有各种代谢功能的成熟肝细胞,在体外诱导肝干细胞分化成为能产生各种代谢酶、合成白蛋白、积累糖原的成熟肝细胞,在肝脏成熟过程中发挥重要作用^[25-26]. OSM与其受体OSMR结合后,通过非受体酪氨酸激酶信号途径发挥其生物学作用^[27-29]. Lee *et al*^[20]和Shi *et al*^[21]的研究提示, OSM与其他细胞因子联合可以诱导骨髓干细胞分化,但是OSM单独使用能否诱导MSCs向肝细胞的分化,与其他细胞因子联合使用能否提高分化效率,以及他在分化中的作用目前尚不清楚。

我们选用这两种细胞因子单独和联合使用诱导MSCs向肝细胞的分化,通过免疫细胞化学检测不成熟肝细胞表型AFP及成熟肝细胞表型CK18的表达,糖原染色检测诱导后细胞糖原合成能力,生化检测培养基上清液中尿素含量的动态变化,从细胞表型、物质合成和代谢功能等方面证实诱导后细胞是否为肝细胞. 结果显示,单独使用HGF能够诱导MSCs向肝细胞的分化,单独使用OSM不能诱导MSCs向肝细胞的分化,二者联合使用能提高MSCs的分化率,促进分化细胞的成熟. 可见, MSCs具有向肝细胞分化的能力,单独使用OSM虽然没有诱导MSCs分化的作用,但是与HGF联合使用能提高MSCs向肝细胞分化的效率、促进肝细胞的成熟. 同时提示我们HGF和OSM的胞内信号转导途径虽然不同^[30],但联合用于MSCs时,其信号转导可能出现了信号交联(cross-talk),从而影响了分化细胞的某些生物学特性,增强了HGF促进MSCs向肝细胞分化的生物学效应. 为我们下一步研究提供了新的思路。

总之, MSCs具有自体取材、体外分离培养容易,增殖、分化能力强等优点,是最具有治疗潜能的种子细胞. 使用HGF与OSM联合诱导MSCs向肝细胞的分化是可行的,可能为肝细胞

移植及生物人工肝提供种子细胞,以期治疗各种终末期肝病。

4 参考文献

- 1 Rojas M, Xu J, Woods CR, Mora AL, Spears W, Roman J, Brigham KL. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 33: 145-152
- 2 Moreau JE, Chen J, Bramono DS, Volloch V, Chernoff H, Vunjak-Novakovic G, Richmond JC, Kaplan DL, Altman GH. Growth factor induced fibroblast differentiation from human bone marrow stromal cells *in vitro*. *J Orthop Res* 2005; 23: 164-174
- 3 Wang Y, Deng Z, Lai X, Tu W. Differentiation of human bone marrow stromal cells into neural-like cells induced by sodium ferulate *in vitro*. *Cell Mol Immunol* 2005; 2: 225-229
- 4 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147
- 5 Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328: 258-264
- 6 Hong SH, Gang EJ, Jeong JA, Ahn C, Hwang SH, Yang IH, Park HK, Han H, Kim H. *In vitro* differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330: 1153-1161
- 7 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
- 8 Zhang Y, Fan Y, Zhao L, Tang H. Differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocyte *in vivo*. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 2005; 22: 521-524
- 9 何念海, 赵文利, 王宇明. 人脐血间充质干细胞体外诱导分化为类肝细胞. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1814-1818
- 10 Ohgushi H, Caplan AI. Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J Biomed Mater Res* 1999; 48: 913-927
- 11 Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 1998; 176: 57-66
- 12 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
- 13 Tang LJ, Gao Y, Zhang Z, Li H, Shan YQ. Human bone marrow multipotent adult progenitor cells differentiate into hepatocyte-like cells with hepatocyte growth factor plus fibroblast growth factor-4 *in vitro*. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2005; 13: 652-655
- 14 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
- 15 Defrances MC, Wolf HK, Michalopoulos GK, Zarnegar R. The presence of hepatocyte growth factor in the developing rat. *Development* 1992; 116: 387-395
- 16 Cartwright JE, Tse WK, Whitley GS. Hepatocyte growth factor induced human trophoblast motility involves phosphatidylinositol-3-kinase, mitogen-activated protein kinase, and inducible nitric oxide synthase. *Exp Cell Res* 2002; 279: 219-226
- 17 Duan HF, Wu CT, Lu Y, Wang H, Liu HJ, Zhang QW, Jia XX, Lu ZZ, Wang LS. Sphingosine kinase activation regulates hepatocyte growth factor induced migration of endothelial cells. *Exp Cell Res* 2004; 298: 593-601
- 18 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
- 19 Fiegel HC, Lioznov MV, Cortes-Dericks L, Lange C, Kluth D, Fehse B, Zander AR. Liver-specific gene expression in cultured human hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 2003; 21: 98-104
- 20 Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. *In vitro* hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004; 40: 1275-1284
- 21 Shi XL, Qiu YD, Li Q, Xie T, Zhu ZH, Chen LL, Li L, Ding YT. Hepatocyte-like cells from directed differentiation of mouse bone marrow cells *in vitro*. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26: 469-476
- 22 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
- 23 安伟德, 胡祥, 曹亮, 王金晶, 刘巨超, 李力, 宋旭华, 徐迎新. 骨髓间充质干细胞定向分化肝细胞基肝内移植研究. *中华实验外科杂志* 2005; 22: 917-919
- 24 Oyagi S, Hirose M, Kojima M, Okuyama M, Kawase M, Nakamura T, Ohgushi H, Yagi K. Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow mesenchymal cells into CCl₄-injured rats. *J Hepatol* 2006; 44: 742-748
- 25 Kamiya A, Kinoshita T, Ito Y, Matsui T, Morikawa Y, Senba E, Nakashima K, Taga T, Yoshida K, Kishimoto T, Miyajima A. Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *EMBO J* 1999; 18: 2127-2136
- 26 Kamiya A, Gonzalez FJ, Nakauchi H. Identification and differentiation of hepatic stem cells during liver development. *Front Biosci* 2006; 11: 1302-1310
- 27 Nightingale J, Patel S, Suzuki N, Buxton R, Takagi KI, Suzuki J, Sumi Y, Imaizumi A, Mason RM, Zhang Z. Oncostatin M, a cytokine released by activated mononuclear cells, induces epithelial cell-myofibroblast transdifferentiation via Jak/Stat pathway activation. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 21-32
- 28 Nakamura K, Nonaka H, Saito H, Tanaka M, Miyajima A. Hepatocyte proliferation and tissue remodeling is impaired after liver injury in oncostatin M receptor knockout mice. *Hepatology* 2004; 39: 635-644
- 29 Gomez-Lechon MJ. Oncostatin M: signal transduction and biological activity. *Life Sci* 1999; 65: 2019-2030
- 30 Kamiya A, Kinoshita T, Miyajima A. Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. *FEBS Lett* 2001; 492: 90-94

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 •

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].

丹芍化纤胶囊对肝纤维化大鼠PDGFR-β和p-ERK1/2的影响

史保生, 侯瑞芳, 吴君, 程明亮

■背景资料

我国乃至世界肝纤维化患者众多, 肝纤维化发生机制复杂, 一直都是肝病研究重点。虽然现代生物医学抗肝纤维化防治研究已经取得了令人鼓舞的成就, 但其往往着眼于发病机制的某个关键环节, 这种寻求单环节阻断的治疗方法与肝纤维化的复杂病理机制难相适应; 相关细胞因子的副作用及基因治疗的安全性也是有待解决的难题, 而中药复方抗肝纤维化治疗显示出明显的优势及价值。

史保生, 侯瑞芳, 鹤壁市传染病医院肝炎科 河南省鹤壁市 458000

吴君, 程明亮, 贵阳医学院第一附属医院感染科 贵州省贵阳市 550004

史保生, 医学硕士, 主治医师, 主要从事病毒性肝炎的临床研究。

通讯作者: 吴君, 550004, 贵州省贵阳市, 贵阳医学院第一附属医院感染科。wuwuj@21cn.com

电话: 0851-6813394

收稿日期: 2006-11-18 接受日期: 2006-12-27

Effect of Danshao Huaxian capsule on the expression of platelet-derived growth factor receptor β and phosphorylation events of the ERK1/2 in rats with experimental hepatic fibrosis

Bao-Sheng Shi, Rui-Fang Hou, Jun Wu, Ming-Liang Cheng

Bao-Sheng Shi, Rui-Fang Hou, Department of Hepatitis, Hebi Hospital of Infectious Diseases, Hebi 458000, He'nan Province, China

Jun Wu, Ming-Liang Cheng, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Corresponding to: Jun Wu, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China.

wuwuj@21cn.com

Received: 2006-11-18 Accepted: 2006-12-27

Abstract

AIM: To investigate the effects of Danshao Huaxian capsule (DSHX) on the expression of platelet-derived growth factor receptor β and phosphorylated ERK1/2 (p-ERK1/2) in rats with experimental hepatic fibrosis, and to explore the anti-fibrosis mechanism of DSHX.

METHODS: A total of 55 male Sprague Dawley rats were randomly divided into group A, B, and C. The rats in group A served as normal controls, and those in group B and C were treated with carbon tetrachloride, ethanol and high-fat diet to establish the model of liver fi-

bro sis. Meanwhile, the rats in group C were intragastrically administered with 0.8 g/kg DSHX once per day for 8 weeks. HE staining was used to observe the pathological changes of liver tissues. The expression of PDGFR-β and p-ERK1/2 in fibrosis tissues were detected by immunohistochemistry and Western blot, respectively. Biochemical examination were performed to determine the serum levels of hyaluronic acid (HA), laminin (LN), type III procollagen peptide (P III P), albumin (ALB), total protein (TP), and the ratio of albumin to globulin (A/G) was also calculated.

RESULTS: Pathological examination confirmed that the model of rat hepatic fibrosis was induced successfully at the end of the 8th week. As compared with those in group A, the expression of PDGFR-β, p-ERK1/2 in liver tissues, the serum levels of HA, LN, and P III P were significantly increased (PDGFR-β: 184.6 ± 8.5 vs 89.6 ± 5.8, *P* < 0.05; p-ERK1/2: 360.0 ± 14.5 vs 15.4 ± 2.1, *P* < 0.05; HA: 517.5 ± 91.5 μg/L vs 254.4 ± 33.1 μg/L, *P* < 0.05; LN: 58.4 ± 11.3 μg/L vs 37.3 ± 9.8 μg/L, *P* < 0.05; P III P: 36.9 ± 5.6 μg/L vs 4.7 ± 1.5 μg/L, *P* < 0.05) in group B, while the serum level of ALB and the value of A/G were markedly decreased (ALB: 27.4 ± 4.9 g/L vs 42.1 ± 1.6 g/L, *P* < 0.05; A/G: 0.89 ± 0.08 vs 1.38 ± 0.09, *P* < 0.05). However, in group C, the expression of PDGFR-β, p-ERK1/2 in liver tissues, the serum levels of HA, LN, and P III P were markedly decreased (PDGFR-β: 91.1 ± 6.3 vs 184.6 ± 8.5, *P* < 0.05; p-ERK1/2: 253.8 ± 18.2 vs 360.0 ± 14.5, *P* < 0.05; HA: 322.9 ± 41.4 vs 517.5 ± 91.5 μg/L, *P* < 0.05; LN: 46.0 ± 9.4 vs 58.4 ± 11.3 μg/L, *P* < 0.05; P III P: 14.5 ± 2.4 vs 36.9 ± 5.6 μg/L, *P* < 0.05), while the serum level of ALB and the value of A/G were notably increased (ALB: 37.2 ± 2.8 g/L vs 27.4 ± 4.9 g/L, *P* < 0.05; A/G: 1.18 ± 0.13 vs 0.89 ± 0.08, *P* < 0.05) in comparison with those in group B.

CONCLUSION: PDGFR-β and p-ERK1/2 may play pivotal roles in the pathogenesis of liver fi-

brosis, and DSHX can prevent liver from fibrosis by decreasing the expression of PDGFR- β and p-ERK1/2.

Key Words: Hepatic fibrosis; Platelet-derived growth factor receptor β ; Phosphorylated ERK1/2; Danshao Huaxian capsule

Shi BS, Hou RF, Wu J, Cheng ML. Effect of Danshao Huaxian capsule on the expression of platelet-derived growth factor receptor β and phosphorylation events of the ERK1/2 in rats with experimental hepatic fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(6):574-579

摘要

目的: 通过观察丹芍化纤胶囊对肝纤维化大鼠PDGFR- β 和p-ERK1/2的影响, 探索其抗肝纤维化的可能机制。

方法: δ SD大鼠55只, 体质量180-220 g, 随机分为正常组、模型组、预防组。除正常组外, 其余均采用四氯化碳、高脂饮食及乙醇复合因素复制肝纤维化模型, 造模同时预防组每日一次予以0.8 g/kg丹芍化纤自来水悬液灌胃, 模型组、正常组予以等体积自来水灌胃, 持续8 wk。造模结束后肝组织HE染色病理检查, 免疫组化检测肝组织PDGFR- β 、蛋白印迹检测肝组织p-ERK1/2在各组表达, 生化法检测各组血清透明质酸(HA)、层黏蛋白(LN)、III型前胶原(P III P)、白蛋白(ALB)、总蛋白(TP), 计算白球比(A/G)。

结果: 造模8 wk后经病理学证实模型大鼠形成典型的肝纤维化, 模型成功。与正常组相比, 模型组肝组织PDGFR- β 、p-ERK1/2及血清HA、LN、P III P均有显著升高, ALB、A/G显著降低(PDGFR- β : 184.6 ± 8.5 vs 89.6 ± 5.8 , $P < 0.05$; p-ERK1/2: 360.0 ± 14.5 vs 15.4 ± 2.1 , $P < 0.05$; HA: 517.5 ± 91.5 $\mu\text{g/L}$ vs 254.4 ± 33.1 $\mu\text{g/L}$, $P < 0.05$; LN: 58.4 ± 11.3 $\mu\text{g/L}$ vs 37.3 ± 9.8 $\mu\text{g/L}$, $P < 0.05$; P III P: 36.9 ± 5.6 $\mu\text{g/L}$ vs 4.7 ± 1.5 $\mu\text{g/L}$, $P < 0.05$; ALB: 27.4 ± 4.9 g/L vs 42.1 ± 1.6 g/L, $P < 0.05$; A/G: 0.89 ± 0.08 vs 1.38 ± 0.09 , $P < 0.05$); 与模型组相比, 预防组肝组织PDGFR- β 、p-ERK1/2及血清HA、LN、P III P均有显著降低, ALB、A/G显著升高(PDGFR- β : 91.1 ± 6.3 vs 184.6 ± 8.5 , $P < 0.05$; p-ERK1/2: 253.8 ± 18.2 vs 360.0 ± 14.5 , $P < 0.05$; HA: 322.9 ± 41.4 $\mu\text{g/L}$ vs 517.5 ± 91.5 $\mu\text{g/L}$, $P < 0.05$; LN: 46.0 ± 9.4 $\mu\text{g/L}$ vs 58.4 ± 11.3 $\mu\text{g/L}$, $P < 0.05$; P III P: 14.5 ± 2.4 $\mu\text{g/L}$ vs 36.9 ± 5.6 $\mu\text{g/L}$, $P < 0.05$; ALB: 37.2 ± 2.8 g/L vs 27.4 ± 4.9 g/L, $P < 0.05$; A/G: 1.18 ± 0.13 vs 0.89 ± 0.08 , $P < 0.05$)。

结论: PDGFR- β 及p-ERK1/2在肝纤维化形成中起重要作用, 丹芍化纤胶囊具有良好的预防肝纤维化形成的作用, 其降低PDGFR- β 及p-ERK1/2在肝组织的表达可能是其作用机制之一。

关键词: 肝纤维化; PDGF- β 受体; 磷酸化ERK1/2; 丹芍化纤胶囊

史保生, 侯瑞芳, 吴君, 程明亮. 丹芍化纤胶囊对肝纤维化大鼠PDGFR- β 和p-ERK1/2的影响. *世界华人消化杂志* 2007;15(6):574-579

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/574.asp>

0 引言

肝纤维化的发生发展过程涉及多种细胞和细胞因子。肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是肝纤维化形成中起关键作用的细胞, 他的激活是整个肝纤维化发生的中心环节^[1]。血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)对多种细胞均有促增殖和趋化作用, 他是HSC最强烈的有丝分裂原^[2], 其信号转导通路在肝纤维化形成过程中起着重要作用。复方中药制剂丹芍化纤胶囊(曾用名汉丹肝乐)是由丹参、赤芍、汉防己、银杏等组成, 大量的实验及临床研究中已经显示出有良好防治肝纤维化作用^[3-19]。我们一方面进一步验证丹芍化纤胶囊抗肝纤维化的作用, 另一方面选取PDGF细胞信号转导途径中PDGFR- β 和p-ERK1/2两个关键点作为研究对象, 对丹芍化纤抗肝纤维化的分子药理机制及药物作用靶点进行深入研究。

1 材料和方法

1.1 材料 δ SD大鼠55只, 体质量180-220 g, 由贵阳医学院动物中心提供; 白蛋白(ALB)、总蛋白(TP)血清学检测试剂盒购自上海复星长征医学科学有限公司; 透明质酸(HA)、层黏蛋白(LN)、III型前胶原(P III P)放射免疫分析测定盒购自北京北方生物技术研究所; 兔抗大鼠PDGFR- β 多克隆抗体及SABC免疫组化试剂盒购自武汉博士德公司; 鼠抗人p-ERK1/2多克隆抗体购自Cell Signaling Technology (CST)公司; 丹芍化纤胶囊(主要由丹参、汉防己碱、赤芍等组成, 棕色粉末状)由贵州贵阳制药厂生产(用自来水配成所需浓度悬液使用); 四氯化碳和乙醇购自贵阳医学院设备科。美国Abbott公司AEROSET2000型全自动生化分析仪; 芬兰WALLAC公司Wizard 1470型 γ 计数器; 德国Eppendorf公司5810R型台

■ 相关报道

国外Pinzani *et al* 的研究表明PDGF和肝纤维化关系密切, 并且对PDGF信号转导途径进行了研究。国内陆翠华 *et al* 的研究均表明PDGF和肝病尤其是肝纤维化关系密切。程明亮 *et al* 研究表明丹芍化纤胶囊可以通过抑制HSC增殖及胶原蛋白合成、增加胶原酶活性、促进胶原降解、增强免疫调节功能、提高MMP-1的表达等多种途径来发挥抗纤维化作用。

■创新盘点

国内有不少学者的研究认为PDGF和肝纤维化的关系密切,但研究点相对孤立,机制阐述有限。我们在已有研究的基础上,选取PDGF信号转导途径中PDGFR- β 和p-ERK1/2两个关键点作为研究对象进行在体研究,使研究点相对连续,对肝纤维化发生机制的研究整体性更强。同时对丹芍化肝胶囊抗肝纤维化的作用和机制提供新的依据。

式冷冻离心机;美国Amersham biosciences公司Ultropro 2100核酸蛋白分析仪;美国Amersham biosciences公司Hoefer TE22小型垂直电泳仪;美国Pall公司Research rodi-50-RE小型实验室纯水系统。

1.2 方法

1.2.1 动物模型复制和给药 该动物模型复制过程中实验动物有一定的死亡率^[20],酌情调整各组大鼠数量:55只大鼠随机分为三组:正常组10只、模型组25只、预防组20只。除正常组外,所有大鼠均饲以由79.5%玉米粉、20%猪油和0.5%胆固醇组成的混合饲料,隔日自由饮用300 mL/L乙醇,按体质量3 mL/kg(首剂5 mL/kg)每周两次皮下注射400 g/L四氯化碳植物油混合液。造模过程中间断出现动物不能耐受实验而死亡,造模结束时正常组、模型组、预防组分别剩余10,13,16只。8 wk末5 g/L异戊巴比妥钠按体质量0.4 mL/kg ip麻醉后股动脉放血处死大鼠,收集肝脏组织,部分于40 g/L的中性甲醛溶液固定24 h后转移到0.1 mmol/L PBS溶液中保存,部分迅速转移至-80℃冰箱冻存。

1.2.2 大鼠血清HA, LN, PIIIIP, Alb, TP检测并计算白球比(A/G) Alb, TP检测由贵阳医学院第一附属医院生化实验室用美国Abbott公司AEROSET2000型全自动生化分析仪完成。HA, LN, PIIIIP检测由贵阳医学院第一附属医院中心实验室用放射免疫检测方法完成。

1.2.3 肝组织病理检测 肝组织石蜡包埋、切片、HE染色由贵阳医学院病理科完成,根据病理切片中纤维组织增生程度,按王宝恩 *et al*的半定量分级法^[21]分为0-VI级:0级:肝组织正常,无胶原纤维增生;I级:胶原纤维从汇管区或中央静脉周围轻度向外延伸;II级:胶原纤维延伸明显,但未相互连接包绕整个肝小叶;III级:胶原纤维延伸明显,相互连接,包绕整个肝小叶;IV级:胶原纤维包绕、分割肝小叶,以至正常肝小叶结构破坏,假小叶形成,但以大、方形假小叶为主;V级:肝小叶结构完全破坏,假小叶形成,大、方形假小叶与小圆形假小叶约各占50%;VI级:肝内布满小圆形假小叶,纤维间隔粗大增生。

1.2.4 免疫组织化学SABC方法检测PDGFR- β 表达 肝组织切片依次经过60℃烤箱、二甲苯脱蜡、酒精梯度水化、30 mL/L过氧化氢溶液、热修复抗原、加正常兔血清封闭液、加一抗(兔抗鼠PDGFR- β)等步骤,4℃冰箱过夜。次日取出切片PBS冲洗3次,依次加二抗(山羊抗兔)、

表1 8 wk后两组大鼠肝组织纤维增生程度及平均R值(n)

分组	n	纤维化分级						平均R值	
		0	I	II	III	IV	V		VI
正常	10	10	0	0	0	0	0	0	0.9056
模型	13	0	0	1	7	6	0	0	0.3309 ^a
预防	16	0	2	7	6	1	0	0	0.5726 ^c

^aP<0.05 vs 正常组; ^cP<0.05 vs 模型组。

SABC、新鲜配制DAB溶液显色,镜下控制显色时间,自来水冲洗终止,苏木素复染、脱水,中性树胶固定封片。以购买标本作阳性对照,用PBS液代替一抗作阴性对照,用图象分析免疫组化图片检测PDGFR- β 的表达。结果判断:细胞质呈棕黄色为阳性细胞。每组取五个视野($\times 400$ 倍),每个视野取5个视场,每个视场面积为443 268 μm^2 ,采用Biomias99彩色高清晰图象分析系统进行分析,测定组织中PDGFR- β 染色光密度值。

1.2.5 蛋白印迹方法检测p-ERK1/2表达 考马斯亮蓝测各标本蛋白浓度。每个标本取25 μg 总蛋白分别加样,电泳(120 V, 0.8 mA/cm²)120 min,转膜(50 V稳压, 4℃)1 h,考马斯亮蓝染色评价转膜效率,5 g/L的脱脂奶粉封闭过夜。加鼠抗人p-ERK1/2(用TBST按1:2000配制)并室温振荡孵育1 h,加二抗羊抗鼠(用TBST按1:2000配制)并室温振荡孵育1 h,曝光及胶片冲洗。美国Bio-Rad公司Quantity one凝胶图象分析系统检测蛋白质条带灰度值。

统计学处理 采用SPSS12.0软件分析,计量资料假设检验用方差分析,等级资料的假设检验采用Ridit分析。

2 结果

2.1 组间纤维增生程度的比较 8 wk后正常组肝小叶结构完整,无变性、坏死、炎性细胞浸润及纤维组织增生,纤维化分级均为0级;模型组可见大量纤维组织增生,部分包绕分割肝细胞形成假小叶,肝细胞广泛脂肪变性,部分未形成假小叶的部位亦可见肝细胞广泛脂肪变性,仅少量肝细胞残存,纤维组织由中央静脉或汇管区向外延伸,增生程度不等,纤维组织增生程度大部分为III-V;预防组纤维增生程度仅为I-III级,以II级为主,较模型组减轻(图1)。经过Ridit分析,模型组和正常组比较有统计学差异,表明模型复制成功,模型组和预防组比较有统计学差异,表明药物干预有效(表1)。

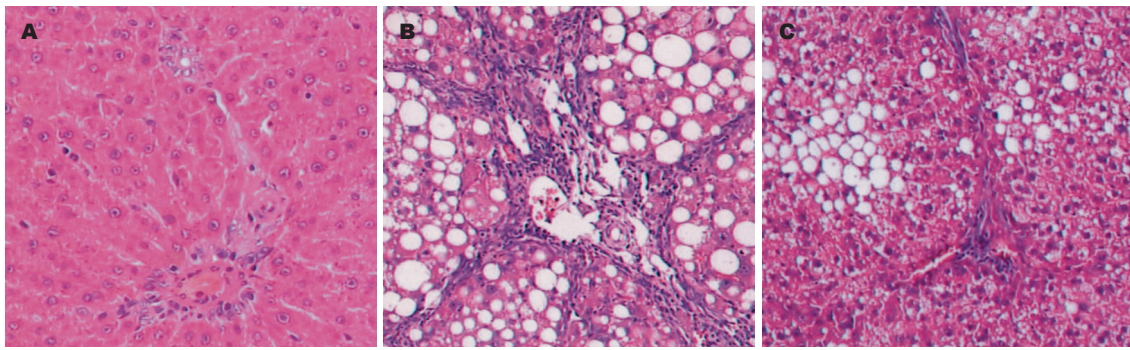


图 1 大鼠肝组织镜下观察(HE × 200). A: 正常组; B: 模型组; C: 预防组.

■应用要点
本文研究结果为肝纤维化的防治提供了新的理论依据和药物作用靶点, 肯定了我国中药复方抗肝纤维化治疗的优势及价值.

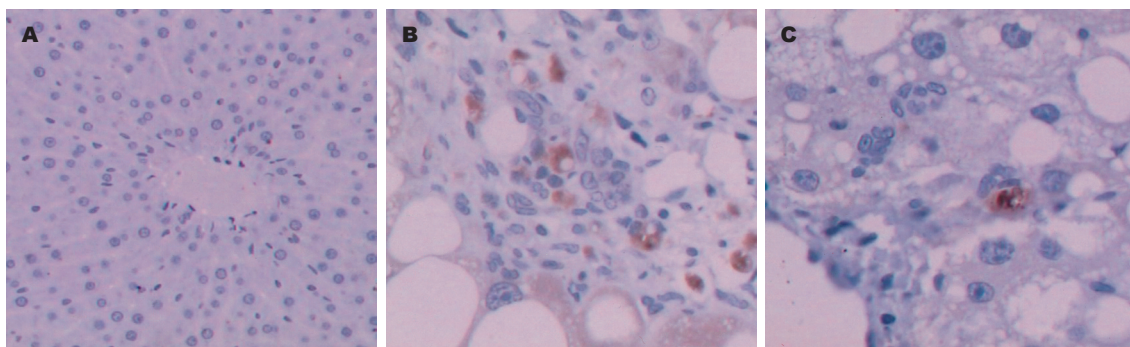


图 2 免疫组化检测肝组织PDGFR-β表达. A: 正常组中央静脉未见棕黄色颗粒表达(× 200); B: 模型组中央静脉区和纤维间隔见大量棕黄色颗粒表达(× 400); C: 预防组中央静脉区见极少量棕黄色颗粒表达(× 400).

表 2 两组间血清ALB, HA, LN, PIIIP及A/G值的比较 (mean ± SD)

分组	n	ALB(g/L)	A/G	HA(μg/L)	LN(μg/L)	PIIIP(μg/L)
正常	10	42.1 ± 1.6	1.38 ± 0.09	254.4 ± 33.1	37.3 ± 9.8	4.7 ± 1.5
模型	13	27.4 ± 4.9 ^a	0.89 ± 0.08 ^a	517.5 ± 91.5 ^a	58.4 ± 11.3 ^a	36.9 ± 5.6 ^a
预防	16	37.2 ± 2.8 ^c	1.18 ± 0.13 ^c	322.9 ± 41.4 ^c	46.0 ± 9.4 ^c	14.5 ± 2.4 ^c

^a $P < 0.05$ vs 正常组; ^c $P < 0.05$ vs 模型组.

表 3 8 wk后两组间大鼠肝组织PDGFR-β表达比较

分组	n	PDGFR-β受体光密度值
正常	10	89.6 ± 5.8
模型	13	184.6 ± 8.5 ^a
预防	16	91.1 ± 6.3 ^c

^a $P < 0.05$ vs 正常组; ^c $P < 0.05$ vs 模型组.

表 4 8 wk后四组大鼠肝组织表达p-ERK1/2比较

分组	n	p-ERK1/2灰度值
正常	10	15.4226 ± 2.1085
模型	14	359.9572 ± 14.4565 ^a
预防	16	253.8261 ± 18.1604 ^c

^a $P < 0.05$ vs 正常组; ^c $P < 0.05$ vs 模型组.

2.2 预防组和模型组间大鼠血清ALB, HA, LN, PIIIP及A/G值的变化 丹芍化纤胶囊预防组与其模型组相比, 大鼠血清ALB及A/G值升高($P < 0.05$), HA, LN, PIIIP水平降低($P < 0.05$, 表2).

2.3 免疫组化检测PDGFR-β的表达 结果显示, PDGFR-β在模型组的表达较正常组增多, 在预防组表达较模型组减少(图2), 均有显著性差异

($P < 0.05$, 表3).

2.4 蛋白印记方法检测p-ERK1/2表达 p-ERK1/2在模型组的表达较正常组增多, 在预防组的表达较模型组减少, 差异具有显著性($P < 0.05$, 表4).

3 讨论

复方中药制剂丹芍化纤胶囊中已经在实验及

临床研究被证实有良好防治肝纤维化作用,本研究在肝纤维化形成过程中给药,进一步观察丹芍化纤胶囊对肝纤维化形成的抑制作用、对肝功能和纤维化血清学指标的改善作用及对PDGF信号转导途径中PDGFR- β 和p-ERK1/2的影响。8 wk后模型组纤维组织增生程度大部分为III-V级,丹芍化纤胶囊组纤维增生程度仅为I-III级,以II级为主,两组间比较有显著性差异,另外丹芍化纤胶囊组血清HA, LN, PIIIP水平较其模型组降低($P < 0.05$),从病理和血清两方面均说明丹芍化纤胶囊可以抑制肝纤维化形成。丹芍化纤胶囊组与其模型组相比,大鼠血清ALB及A/G值升高($P < 0.05$),说明丹芍化纤胶囊对肝功能有明显的改善作用。

PDGF被公认为与肝纤维化形成有密切关系的细胞因子,PDGF必须与细胞膜上的相应受体结合后才能发挥其生物学效应,PDGF受体由两种亚单位 α 及 β 构成,静止的HSC只表达 α 亚单位,激活的HSC才表达 β 亚单位^[22-24],因此认为PDGFR- β 在肝纤维化过程中的作用尤为突出,我国学者也有类似结论^[25]。PDGF可以通过多种途径促进HSC的增殖进而促进肝纤维化的发展,ERK1/2途径是发现的第一个有丝分裂原激活的蛋白激酶途径,也是阐述最经典的经典途径。胞质中ERK1/2被上游激酶磷酸化激活后才能转位入核作用于相应的目的基因,进而促细胞分裂增殖^[24]。国内也有不少学者的研究也认为PDGF和肝纤维化的关系密切^[26-31],但研究点相对孤立,机制阐述有限,有必要进一步深入研究。另外已有的研究显示,丹芍化纤胶囊可以通过抑制HSC增殖及胶原蛋白合成、增加胶原酶活性、促进胶原降解、增强免疫调节功能、提高MMP-1的表达等多种途径来发挥抗纤维化作用^[3-20],但其是否对肝纤维化形成过程中的PDGF信号转导通路有一定的干预作用,有待于探索。基于以上理论和实验研究结果,我们在原有大量研究的基础上,选取PDGF信号转导途径中PDGFR- β 和p-ERK1/2两个关键点作为研究对象,通过探索丹芍化纤胶囊抑制肝纤维化形成过程中PDGFR- β 及p-ERK1/2的变化,对其抗肝纤维化的机制及药物作用靶点进行研究,以期为丹芍化纤胶囊的靶向作用提供理论依据。结果显示,在肝纤维化形成过程中PDGFR- β 和p-ERK1/2在预防组的表达较模型组减少,且均有显著性差异,提示降低PDGFR- β 和p-ERK1/2

在肝组织的表达可能是丹芍化纤胶囊抗肝纤维化重要机制之一。

目前,虽然现代生物医学抗肝纤维化防治研究已经取得了令人鼓舞的成就,但绝大多数还局限在实验室内或停留在动物实验层次,尚无实质意义上抗肝纤维化的药物或方法投入临床应用。现代生物医学抗肝纤维化治疗研究是着眼于发病机制的某个关键环节,这种寻求单环节阻断的治疗方法与肝纤维化的复杂病理机制难相适应;而相关细胞因子的副作用及基因治疗的安全性也是有待解决的难题。而中药复方抗肝纤维化治疗已显示出明显的优势及价值,其多环节、多层次及多靶点的综合药理学作用可能是其优势所在。迄今报道有代表性的复方有强肝软坚汤、扶正化瘀319方、复方861合剂、复方鳖甲软肝片、丹芍化纤胶囊和传统中药大黄蛰虫丸等均有较好防治肝纤维化效果。但目前研究大都采用传统的中药复方,由于天然中药的成分复杂,一味中药即含有十几种甚至数十种以上的化学成分,而复方的成分就更加复杂,难以阐明其确切的作用机制,基础研究相对滞后也就成为阻碍中医药抗肝纤维化应用的难点之一。因此,我们应立足于中医药抗肝纤维化的整体优势,吸收现代生物医学研究精华,进一步揭示中医药抗肝纤维化的作用机制,为中医药抗肝纤维化奠定坚实的理论基础,进而研制出安全有效的抗肝纤维化药物。

4 参考文献

- 1 Li D, Friedman SL. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14: 618-633
- 2 Pinzani M, Marra F, Carloni V. Signal transduction in hepatic stellate cells. *Liver* 1998; 18: 2-13
- 3 吴亚云, 陆彤, 耿晓霞, 程明亮. 丹芍化纤方对CCl₄损伤大鼠原代肝细胞保护作用的研究. *中国现代医学杂志* 2005; 15: 3559-3565
- 4 胡爱荣, 丁一生, 程明亮. 丹芍化纤胶囊对大鼠免疫性肝纤维化的防治作用. *浙江中西医结合杂志* 2005; 15: 538-540
- 5 伍徐嫻, 杨勤, 罗新华, 耿晓霞, 时黛, 李诚秀, 程明亮. 丹芍化纤胶囊对肝细胞线粒体脂质过氧化物的影响. *贵阳医学院学报* 2004; 29: 405-409
- 6 罗新华, 杨勤, 程明亮, 李诚秀. 丹芍化纤胶囊对肝纤维化大鼠肝脏细胞凋亡与凋亡调控基因表达的影响. *贵州医药* 2004; 28: 495-497
- 7 韩冰, 杨勤, 谢汝佳, 罗新华, 耿晓霞, 程明亮. 丹芍化纤胶囊对肝纤维化大鼠肝组织结缔组织生长因子表达的影响. *贵阳医学院学报* 2004; 29: 488-491
- 8 李玲, 罗俊, 黄能慧, 程明亮. 丹芍化纤胶囊对环磷酰胺处理小鼠免疫功能的影响. *贵阳医学院学报* 2004; 29: 209-211
- 9 谢汝佳, 杨勤, 罗新华, 耿晓霞, 韩冰, 李诚秀, 程明亮.

- 中药丹芍化纤胶囊对基质金属蛋白酶-1表达的影响. 贵阳医学院学报 2004; 29: 395-399
- 10 韩冰, 谢汝佳, 罗新华, 杨婷, 方丽, 程明亮, 杨勤. 丹芍化纤胶囊对实验性肝纤维化大鼠肝脏Smad-7表达的影响. 贵州医药 2005; 29: 401-403
 - 11 耿晓霞, 吴亚云, 程明亮. 丹芍化纤胶囊对体外活化HSCs增殖、凋亡及Fas/FasL途径的影响. 中华中医药杂志 2005; 20: 404-408
 - 12 谢汝佳, 杨勤, 耿晓霞, 罗新华, 李诚秀, 程明亮. 中药丹芍化纤胶囊对肝纤维化大鼠金属蛋白酶组织抑制因子-1表达的影响中国中西医结合杂志基础理论研究特集 2005; 25: 54-57
 - 13 杨勤, 罗新华, 耿晓霞, 谢汝佳, 韩冰, 李诚秀, 程明亮. 丹芍化纤胶囊治疗大鼠肝纤维化后肝星状细胞凋亡及细胞周期的变化. 中国病理生理杂志 2005; 21: 975-979
 - 14 程明亮, 张文胜, 陆荫英. 免疫性肝纤维化大鼠结缔组织生长因子、转化生长因子 β 1基因相关表达及汉丹肝乐的影响. 贵州科学 2003; 21: 111-114
 - 15 吴亚云, 耿晓霞, 程明亮. 丹芍化纤方对体外大鼠肝细胞增生、Caspase-3mRNA及白蛋白合成的影响. 世界华人消化杂志 2005; 13: 781-783
 - 16 胡爱荣, 丁一生, 程明亮. 丹芍化纤胶囊对肝纤维化大鼠肝星状细胞增殖、活化及凋亡的影响. 中华肝脏病杂志 2006; 14: 141-143
 - 17 万昌武, 谢汝佳, 韩冰, 罗新华, 杨勤. 肝纤维化大鼠肝组织TGF- β 1表达和细胞外胶原沉积及中药抗肝纤维化治疗影响. 贵州医药 2005; 29: 771-774
 - 18 陆荫英, 陆彤, 程明亮, 丁一生. 汉丹肝乐对猪血清免疫性肝纤维化大鼠胶原酶活性的影响. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 108-109
 - 19 张文胜, 程明亮, 陆荫英. 中药复方对肝纤维化大鼠细胞因子的影响. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 285-287
 - 20 程明亮, 杨长青. 肝纤维化的基础研究及临床. 第二版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 375-376
 - 21 王宝恩, 王惠吉, 朱家璇, 刘尔瑜. 中药复方丹参不同剂型治疗肝纤维化的实验研究与临床观察. 肝脏病杂志 1993: 69-72
 - 22 Friedman SL, Arthur MJ. Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. Direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors. *J Clin Invest* 1989; 84: 1780-1785
 - 23 Wong L, Yamasaki G, Johnson RJ, Friedman SL. Induction of beta-platelet-derived growth factor receptor in rat hepatic lipocytes during cellular activation *in vivo* and in culture. *J Clin Invest* 1994; 94: 1563-1569
 - 24 Marra F, Choudhury GG, Abboud HE. Interferon-gamma-mediated activation of STAT1alpha regulates growth factor-induced mitogenesis. *J Clin Invest* 1996; 98: 1218-1230
 - 25 陆翠华, 陈岳祥, 张忠兵, 谢渭芬, 黄介飞, 倪润洲, 郭亚军, 卫立辛, 金由辛. 肝纤维化大鼠血小板衍生生长因子受体 β 亚单位的表达及其与细胞外基质成分的相关性. 中华肝脏病杂志 2004; 12: 663-665
 - 26 袁农, 王萍, 王宪智, 王苗. 血小板衍生生长因子及其受体在肝纤维化患者肝组织中的表达及意义. 中华肝脏病杂志 2002; 10: 58-60
 - 27 张生君, 陈运新, 陈治新, 王小众. PDGF及白介素-10对大鼠肝星状细胞bcl-2/bax的影响. 福建医科大学学报 2004; 38: 268-274
 - 28 蔡玲, 何浩明. 肝硬化患者PDGF、HA、PⅢP血清水平检测的临床意义. 放射免疫学杂志 2002; 15: 353-354
 - 29 邓红, 付杰, 陈刚, 任喜民. 慢性乙肝患者血清PDGF水平改变临床意义的研究. 临床肝胆病杂志 2002; 18: 207-208
 - 30 彭小斌, 张国安, 刘小鹏, 陈紫榕, 施水兰. 乙型肝炎患者TNF- α 和PDGF水平及其与肝纤维化的关系. 胃肠病学和肝病杂志 2000; 9: 201-202
 - 31 张志安, 黄元成, 石淑仙. 重症病毒性肝炎肝组织胶原蛋白和血小板衍生生长因子-1的表达. 华中科技大学学报 2004; 33: 24-26

■同行评价

本文主要探讨丹芍化纤胶囊对肝纤维化大鼠PDGFR- β 和p-ERK1/2的影响, 有一定研究价值, 研究方法正确, 结果相对可靠.

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 •

世界华人消化杂志被认定为印刷工业市级优质产品

本刊讯 2007-01-12经北京市印刷工业产品质量监督检查站严格审核, 世界华人消化杂志被认定为印刷工业“市级优质产品”. 本杂志由世界胃肠病学杂志社出版, 北京科信印刷厂负责印刷, 在此表示衷心感谢.

肿瘤坏死因子 α 基因启动子区多态性与乙型肝炎病毒感染相关性的荟萃分析

田国保, 曾争, 陆海英, 崔建军, 田地

■背景资料

肿瘤坏死因子 α (TNF- α)作为参与非细胞毒性抗病毒机制的一种重要细胞因子,可以直接通过激活NF- κ B后破坏HBV壳体的完整性而起到抑制HBV复制的作用;TNF- α 表达水平除了与机体本身免疫系统的活化水平等有关外,宿主本身即TNF- α 启动子区基因多态性也可能通过影响其转录活性而使表达水平不同。

■研发前沿

TNF- α 与乙型肝炎病毒(HBV)感染宿主易感性方面近些年来一直是研究的热点,其中主要研究位点为启动子区5个典型的单核苷酸多态性(SNPs)位点,分别是-238G/A、-308G/A、-857C/T、-863C/A和-1031T/C。

田国保, 崔建军, 田地, 北京大学第一医院感染疾病科病毒研究室北京市 100034
曾争, 陆海英, 北京大学第一医院感染疾病科北京市 100034
国家自然科学基金资助项目, No.30671855
田国保, 北京大学第一医院感染疾病科硕士生, 主要从事与乙型肝炎病毒感染相关的易感基因或拮抗基因的研究。
通讯作者: 曾争, 100034, 北京市, 北京大学第一医院感染疾病科, zeng@bjmu.edu.cn
电话: 010-66551799
收稿日期: 2006-11-13 接受日期: 2006-12-08

A meta-analysis on the relationship between tumor necrosis factor- α promoter polymorphisms and chronic hepatitis B virus infection

Guo-Bao Tian, Zheng Zeng, Hai-Ying Lu, Jian-Jun Cui, Di Tian

Guo-Bao Tian, Jian-Jun Cui, Di Tian, Laboratory of Virology, Department of Infectious Diseases, the First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China
Zheng Zeng, Hai-Ying Lu, Department of Infectious Diseases, the First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30671855
Correspondence to: Zheng Zeng, Department of Infectious Diseases, the First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China. zeng@bjmu.edu.cn
Received: 2006-11-13 Accepted: 2006-12-08

Abstract

AIM: To investigate the relationship between the polymorphisms of tumor necrosis factor- α (TNF- α) gene promoter and hepatitis B virus (HBV) infection.

METHODS: A total of 18 case-control studies were indexed from PubMed, Embase and CNKI database, and meta-analysis and meta-regression analysis were performed to explore the relationship between the polymorphisms of TNF- α gene promoter and HBV infection as well as the differences between each study.

RESULTS: The frequency of genotype (TNF- α -308A/G and A/A) was significantly higher in

spontaneously recovered group (904 controls) as compared with that in persistent HBV infection group (2303 cases) in Asian population (Mongoloid) ($P = 0.001$). In European population (Caucasian), the frequency of genotype (TNF- α -238A/G and A/A) was slightly higher in persistent HBV infection group (256 cases) as compared with that in spontaneously recovered group (195 controls) ($P = 0.07$). The ethnicity, sample size, genotyping procedure and geographical location were the influential factors in the case-control study, and the estimated between-study variance was reduced by 0.236.

CONCLUSION: The presence of the genotype (TNF- α -238A/G and A/A) may be associated with persistent HBV infection, while the genotype (TNF- α -308A/G and A/A) may be associated with HBV clearance. The ethnicity, sample size, genotyping procedure and geographical location are factors influencing the results of case-control study.

Key Words: Tumor necrosis factor- α ; Polymorphism; Hepatitis B virus; Meta-analysis

Tian GB, Zeng Z, Lu HY, Cui JJ, Tian D. A meta-analysis on the relationship between tumor necrosis factor- α promoter polymorphisms and chronic hepatitis B virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(6):580-584

摘要

目的: 探讨肿瘤坏死因子 α (TNF- α)基因启动子区多态性与乙型肝炎病毒(HBV)持续感染或清除的关系。

方法: 通过检索PubMed、Embase以及CNKI共纳入18项病例对照研究,采用荟萃分析方法研究TNF- α 基因启动子区基因多态性与HBV持续感染或清除的关系,以及采用荟萃回归分析不同研究之间存在异质性的原因。

结果: 亚洲人群(蒙古人种)中自然痊愈组(904例)-308G/A位点的基因型(GA+AA)频率显著高于持续HBV感染组(2303例)($P = 0.001$),而

欧洲人(高加索人种)中持续HBV感染组(256例)-238G/A位点的基因型(GA+AA)频率略高于自然痊愈组(195例)($P = 0.07$), 样本量、种族、地区以及研究方法均为影响不同研究之间异质性的因素($P < 0.05$), 使研究之间总变异效应降低了约0.236.

结论: TNF- α -308G/A位点多态性可能与感染HBV后的清除有关, 而-238G/A位点多态性可能与HBV的持续感染有关, 并且样本量、种族、地区以及研究方法因素均可能影响病例对照研究的结果.

关键词: 肿瘤坏死因子 α ; 基因多态性; 乙型肝炎病毒; 荟萃分析

田国保, 曾争, 陆海英, 崔建军, 田地. 肿瘤坏死因子 α 基因启动子区多态性与乙型肝炎病毒感染相关性的荟萃分析. 世界华人消化杂志 2007;15(6):580-584
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/580.asp>

0 引言

肿瘤坏死因子 α (TNF- α)作为参与非细胞毒性抗病毒机制中的一种细胞因子, 具有介导多向性炎症反应和免疫调节等生物学作用. 其基因位于白细胞相关抗原(HLA)III类基因簇内, 在其启动子区存在5个典型的单核苷酸多态性(SNPs)位点, 分别是-238G/A、-308G/A、-857C/T、-863C/A和-1031T/C, 关于TNF- α 基因多态性与乙型肝炎病毒(HBV)感染宿主易感性方面近些年来一直是研究的热点, 然而可能由于选择的人群(种族)和样本量等的原因, 研究的结论不尽一致甚至相反^[1-2], 本文运用荟萃分析(meta-analysis)的方法针对-238G/A和-308G/A两个位点(其他位点研究结果很少), 对以往的资料进行初步分析, 为以后进一步的研究提供参考.

1 材料和方法

1.1 材料 病例组即慢性HBV感染组(chronic HBV infection)包括携带者、慢性乙型肝炎、肝硬化以及肝癌, 其诊断标准符合国内《乙型肝炎防治指南》(2000年西安会议)或国际标准(亚太肝病会和欧洲肝病会制订标准); 根据文献进行再分组, 对照组分为感染后自然痊愈组(spontaneously recovered, SR: HBsAb阳性)和正常健康人组(healthy group, HBsAb可能阳性或阴性); 研究为病例-对照研究(case-control), 包括前瞻性研究和回顾性研究, 研究位点至少包括启动子区-238G/A和-308G/A位点中的一个. 病例

组的入选要排除合并HAV、HCV、HIV等病毒的感染以及其他肝胆系统疾病, 病例组样本要能够排除急性感染病例.

检索关于TNF- α 基因启动子区多态性与HBV感染相关的所有病例-对照研究, 两位评价者单独检索并交叉核对. 检索PubMed及Embase(1990/2006-10): 检索词为“tumor necrosis factor”、“hepatitis B virus”和“polymorphism”. 检索中国期刊全文数据库(CNKI, 1994/2006-10): 检索词为“肿瘤坏死因子 α ”和“乙型肝炎病毒”或“多态性”. 仔细查阅所有检出文献的参考文献作为补充, 并与部分作者联系, 以进一步取得全文及更完整的资料, 共有18项研究纳入本研究. 排除的研究包括综述性文章2篇、非病例-对照研究1篇, 重复性的文章2篇, 统计时有不同的文章重复样本的研究时注意排除重复数据等.

1.2 方法 用统一的表格提取所选研究的资料, 包括文章的作者及发表年代、所选择人群(国别和地区分布)、对照组和病例组(所选对象、平均年龄、性别比例及样本量)、基因型检测方法及频数以及发表的杂志. 纳入本荟萃分析研究的人口学统计资料见表1.

统计学处理 参考Ye *et al*^[3]研究基因组多态性荟萃分析的方法, 以类似遗传共显性模型为标准, 针对-238G/A和-308G/A两个位点(G/A+AA为效应变量), 对于病例-对照组之间的差异比(odds ratio, OR)根据研究之间有无异质性分别采用随机效应模型或固定效应模型(RevMan4.2软件)分析, OR以95%置信区间(confidence interval, CI)表示, 以 χ^2 检验分析研究间的异质性, $P < 0.05$ 表示异质性有显著统计学意义; 同时以log OR值为效应变量, 以总样本量, 研究方法, 对照组来源(正常健康或者自然痊愈组对照), 种族(蒙古人以及高加索人)以及地区(东南亚以及欧洲)为协同变量(由于样本年龄以及性别比不是单个研究对象资料, 故无法统计), 采用State8.0软件中荟萃回归分析, 对异质性的原因进行初步分析.

2 结果

以对照组(自然痊愈组或正常健康组)的不同进行分组, 同时以种族(蒙古人种或高加索人种)的不同进行亚组分析, 结果如下:

2.1 慢性HBV感染组与自然痊愈组比较 TNF- α -238G/A位点: 纳入本荟萃分析共6项研究, 异

■ 相关报道

由于选择的人群(种族)和样本量等的原因, 研究的结论不尽一致甚至相反, 如早先德国学者研究发现-238G/A和-308G/A两个位点的基因组多态性与HBV感染后清除有关, 而近来日本学者的研究提示两者之间并无相关.

■创新盘点

本文运用荟萃分析的方法针对-238G/A和-308G/A两个位点(其他位点研究结果很少),对以往的资料进行初步分析后,结果提示亚洲人群(蒙古人种)中自然痊愈组(904例)-308G/A位点的基因型(GA+AA)频率显著高于持续HBV感染组(2303例)($P = 0.001$),而欧洲人(高加索人种)中持续HBV感染组(256例)-238G/A位点的基因型(GA+AA)频率略高于自然痊愈组(195例)($P = 0.07$),且样本量、种族、地区以及研究方法均为影响不同研究之间异质性的因素。

表 1 纳入本荟萃分析研究的基本统计资料

作者	方法	地区	病例		对照		期刊
			样本	n	样本	n	
LI HUI	RFLP	中国北京	CHB	196	SR	143	Journal of Viral Hepatitis 2006
Cho	引物延伸方法	韩国	慢性感染	412	SR	204	Journal of Gastroenterology and Hepatology 2006
Zali	RFLP	伊朗	慢性感染	100	Healthy SR	89 91	Indian Journal of Gastroenterol 2006
LI HUI	RFLP	中国北京	CHB	443	SR	244	Biomedical and Environmental Science 2006
Sarin	RFLP	印度	慢性感染	214	Healthy	408	Journal of Hepatology 2006
王小众	SSP	中国福建	慢性感染	122	Healthy	63	Hepatology Research 2006
Grazia	测序	意大利	慢性感染	184	SR	96	Liver International 2005
LI HUI	RFLP	中国北京	慢性感染	651	SR	244	World Journal of Gastroenterology 2005
王福生	RFLP	中国北京	慢性感染	232	Healthy	103	世界华人消化杂志 2005
鲁猛厚	RFLP	中国湖南	慢性感染		Healthy	90	Clinical Microbiology and Infection 2005
陈红	RFLP	中国甘肃	CHB	156	Healthy	80	临床消化病杂志 2005
张平安	RFLP	中国湖北	CHB	131	Healthy	126	微循环学 2005
张平安	RFLP	中国湖北	CHB	131	SR	165	世界华人消化杂志 2004
LI HUI	RFLP	中国北京	CHB	207	SR	148	World Journal of Gastroenterology 2004
Lee	单碱基延伸	韩国	慢性感染	1109	SR	291	Human Molecular Genetics 2003
Eguchi	RFLP	日本	慢性感染	213	Healthy	52	the American Journal of Gastroenterology 2002
林菊生	RFLP	中国湖北	LC	106	Healthy	108	中华内科杂志 2002
Thomas	杂交	德国	CHB	71	Healthy SR	99 32	Clinical and Experimental Immunology 1998

(CHB: chronic hepatitis B; LC: liver cirrhosis; RFLP: 限制片段长度多态性; 慢性感染: 包括无症状携带、慢性乙型肝炎、肝硬化以及肝细胞癌)。

Comparison Outcome 02:病例组 vs 自然痊愈组 02-238G/A

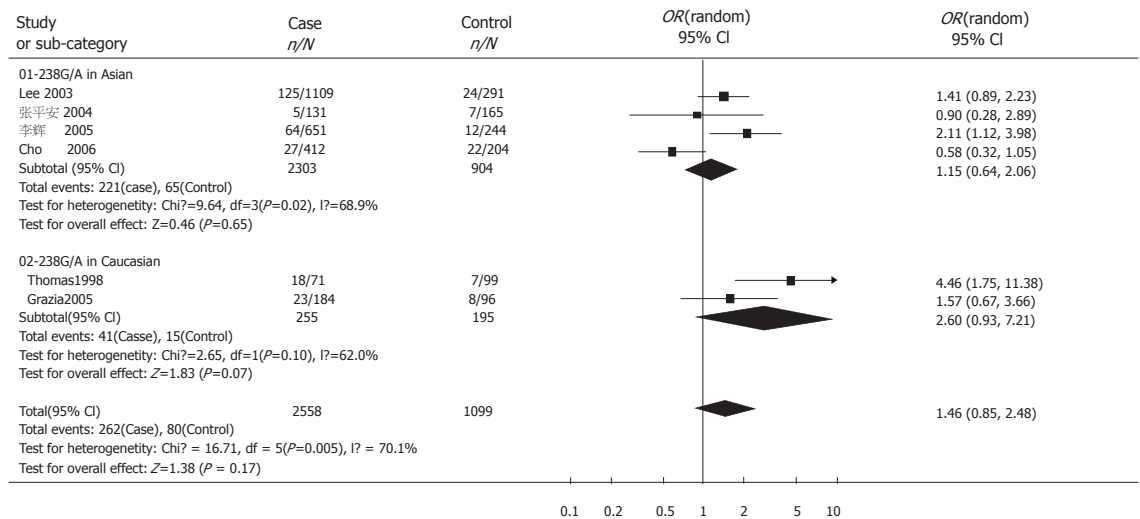


图 1 TNF-α-238G/A位点病例组与自然痊愈组比较的荟萃分析。

质性检验有统计学意义($\chi^2 = 16.71$, $P < 0.05$), 随机效应模型分析在慢性HBV携带组与自然痊愈组之间, -238G/A位点的基因型(GA+AA)频率差异无统计学意义(总效应方差 $Z = 1.38$, $P = 0.17 > 0.05$, 图1)。荟萃亚组和回归分析后提示, 样本量、种族、地区、以及研究方法均为影响研究之间异质性的因素($P < 0.05$), 使组间总变异效应降低约0.236。

TNF-α-308G/A位点: 纳入本荟萃分析共

7项研究, 异质性检验无统计学意义($\chi^2 = 6.27$, $P = 0.39 > 0.05$), 亚组分析采用固定效应模型(研究之间无异质性)结果提示, 亚洲人群(蒙古人种)中自然痊愈组-308G/A位点的基因型(GA+AA)频率显著高于慢性HBV携带组, 差异有统计学意义(总效应方差 $Z = 3.25$, $P = 0.001 < 0.05$); 而欧洲人群(高加索人种)中两组之间差异无统计学意义(总效应方差 $Z = 0.78$, $P = 0.44 > 0.05$)(图2)。

■ 名词解释

荟萃分析: 是一个科学的临床研究活动, 指全面收集所有相关研究并逐个进行严格评价和分析, 再用定量合成的方法对资料进行统计学处理得出综合结论的整个过程; 本质上是一种观察性研究, 应结合研究背景和实际意义进行结果讨论, 必要时也可以比较大样本的单独研究和meta分析结果的一致性。

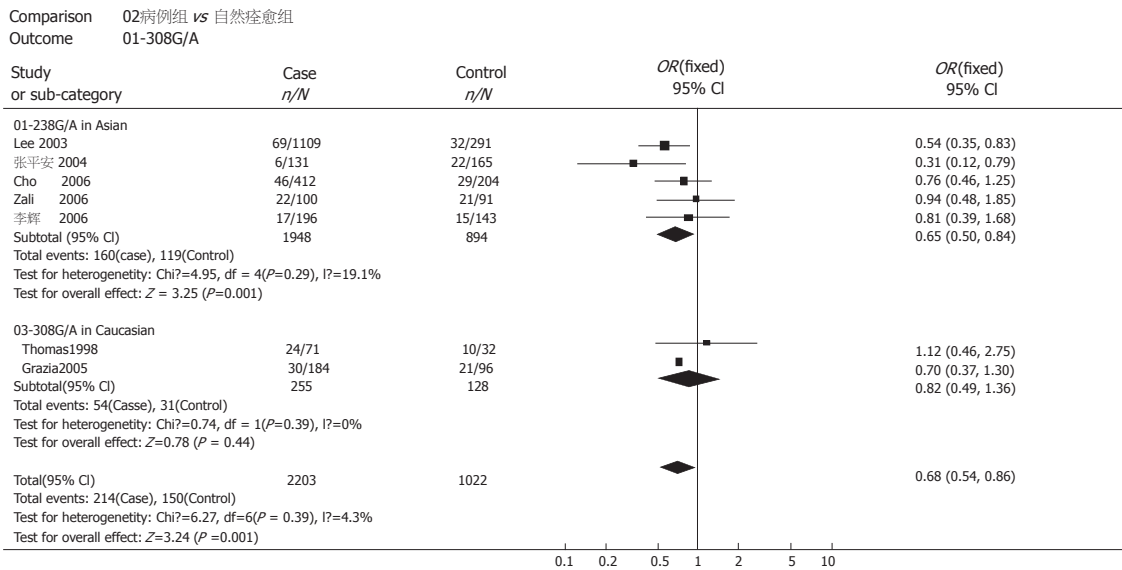


图 2 TNF- α -308G/A位点病例组与自然痊愈组比较的荟萃分析.

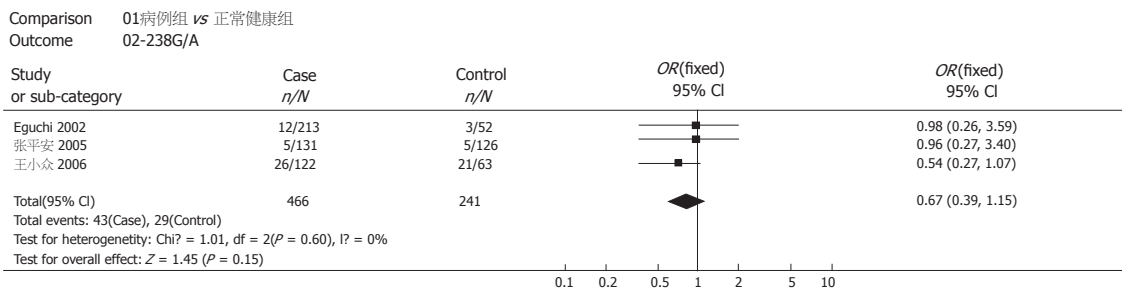


图 3 TNF- α -238G/A位点病例组与正常健康组比较的荟萃分析.

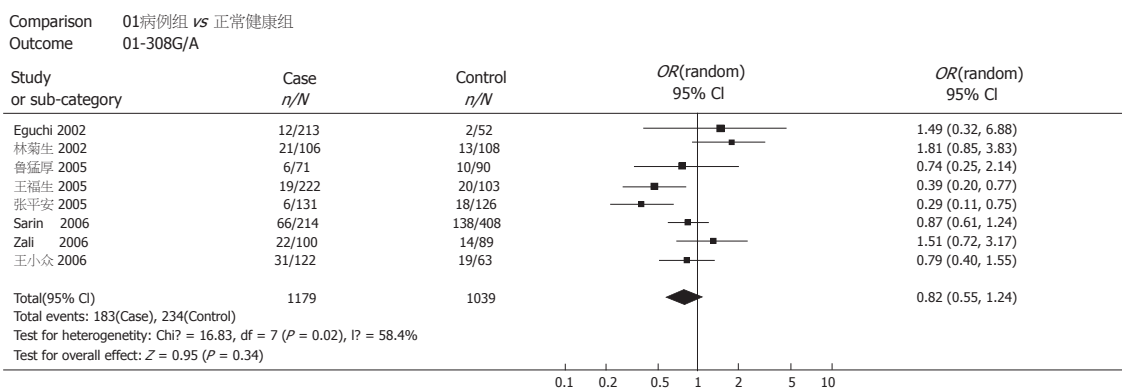


图 4 TNF- α -308G/A位点病例组与正常健康组比较的荟萃分析.

2.2 慢性HBV感染组与正常健康组比较 TNF- α -238G/A位点: 纳入本荟萃分析共3项研究, 异质性检验无统计学意义($\chi^2 = 1.01, P > 0.05$), 亚组分析采用固定效应模型结果提示, 亚洲人群(蒙古人种)中慢性HBV携带组与正常健康组之间-238G/A位点的基因型(GA+AA)频率差异无统计学意义(总效应方差Z = 1.45, P = 0.15 > 0.05)(图3).

TNF- α -308G/A位点: 纳入本荟萃分析共8项研究, 异质性检验有统计学意义($\chi^2 = 16.83, P < 0.05$), 亚组分析采用随机效应模型结果提示, 亚洲人群(蒙古人种)中慢性HBV携带组与正常健康组之间-308G/A位点的基因型(GA+AA)频率差异无统计学意义(总效应方差Z=0.95, P = 0.34 > 0.05, 图4). 荟萃回归分析后提示, 样本量并不是影响该组研究之间异质性的因素(P > 0.05),

■同行评价

不同个体对HBV易感性的差异以及感染的过程与一些免疫分子的应答有重要关系,尤其是肿瘤坏死因子、干扰素等细胞因子,研究其中的机制对于指导临床治疗有重要意义,本文就TNF- α 基因启动子区多态性与HBV感染相关性进行了大样本的科学分析,克服了以往研究中的不足,得到了一些有意义的结果,研究涉及的样本量大,对照合理,分析科学,结论可靠,结果有意义。

可能跟对照组选择本身有关系。

3 讨论

TNF- α 是一种主要有单核/巨噬细胞系分泌的、能够介导多种炎症反应和免疫调节反应的细胞因子,体内适量水平的TNF- α 在维持机体内环境的稳定以及抵抗外来微生物入侵中发挥重要作用,其中TNF- α 可以直接通过激活NF- κ B后破坏HBV壳体的完整性而起到抑制HBV复制的作用。

研究表明TNF- α 表达水平除了与机体本身免疫系统的活化水平等有关外,宿主本身即TNF- α 启动子区基因多态性也可能通过影响其转录活性而使表达水平不同。其中, Gonzalez *et al*^[4]研究表明TNF- α 启动子区-308位核苷酸G被A替换后, TNF- α 基因转录效率显著提高,并且Louis *et al*^[5],发现TNF- α -308A等位基因携带者TNF- α 全血中的表达水平比G等位基因纯合子高,其原因一方面可能与转录因子复合物更易与TNF- α -308A等位基因结合有关(尽管G等位基因和A等位基因均可与转录因子复合物结合)^[6];另一方面可能与激活蛋白2(Activating protein2, AP-2)和TNF- α -308G等位基因的结合(而不与A等位基因结合)后抑制其启动子活性有关^[7]。

TNF- α 基因启动子区多态性与慢性HBV感染相关的研究一直是个热点。早先,德国学者 Hohler *et al*^[8]研究发现, -238G/A和-308G/A两个位点的基因组多态性与HBV感染后清除有关,而近来日本学者Miyazoe *et al*^[9]的研究提示两者之间并无相关;但是可能由于两者之间选择的人群以及对照组等并不一致所致,通过对以往研究按对照组不同以及人种不同亚组荟萃分析后,结果表明仅亚洲人群(蒙古人种)中自然痊愈组-308G/A位点的基因型(GA+AA)频率显著高于慢性HBV携带组,从而提示TNF- α -308G/A位点多态性可能与感染HBV后的清除有关,而仅欧洲人(高加索人种)中慢性HBV携带组-238G/A位点的基因型(GA+AA)频率略高于自然痊愈组($P = 0.07$),提示-238G/A位点多态性可能与HBV的持续感染有关,亚组分析和荟萃回归分析结果提示样本量、种族、地区以及研究方法均为影响不同研究之间异质性的因素。同时病例组与正常健康组的分析结果提示各研究之间异质性较大,并且以上所述因素均不能很好解释不同研究之间存在异质性的原因,其中主要是与样本量大小、对照组选择相关,从而提示以正常健康组作

为对照,研究遗传因素对HBV感染后的结局的影响不但因为是否接触过病原(如HBV)是感染性疾病遗传相关分析的一个重要前提,而且正常健康组人群分层并不严格,会受到混杂因素的影响(如种族,民族,是否有过HBV感染等)。

总之,除了环境因素、病原体(基因型、亚型和准种等)以及感染时宿主的年龄等外,复杂的遗传因素(包括种族、民族等)也是影响HBV感染后结局的重要因素,因此,我们应该在尽可能控制以上所述的混杂因素后,进行病例对照的前瞻性研究,收集大样本、数据以及病历资料,系统研究TNF- α 以及其他可能相关基因多态性与慢性HBV感染的关系,为进一步的疾病易感诊断、早期预防和个体化治疗打下基础。

4 参考文献

- 1 晏泽辉, 邓国宏, 王宇明. 乙型肝炎的宿主遗传易感性的研究进展及前景. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1002-1007
- 2 曾争. 与乙型肝炎病毒感染相关的易感或拮抗基因的研究进展及研究体会. 中华医学杂志 2005; 85: 1163-1165
- 3 Ye Z, Liu EH, Higgins JP, Keavney BD, Lowe GD, Collins R, Danesh J. Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66,155 cases and 91,307 controls. *Lancet* 2006; 367: 651-658
- 4 Gonzalez S, Rodrigo L, Martinez-Borra J, Lopez-Vazquez A, Fuentes D, Nino P, Cadahia V, Saro C, Dieguez MA, Lopez-Larrea C. TNF-alpha-308A promoter polymorphism is associated with enhanced TNF-alpha production and inflammatory activity in Crohn's patients with fistulizing disease. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1101-1106
- 5 Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S, Mahieu P, Malaise M, De Groote D, Louis R, Belaiche J. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol* 1998; 113: 401-406
- 6 Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 1997; 34: 391-399
- 7 Kroeger KM, Abraham LJ. Identification of an AP-2 element in the -323 to -285 region of the TNF-alpha gene. *Biochem Mol Biol Int* 1996; 40: 43-51
- 8 Hohler T, Kruger A, Gerken G, Schneider PM, Meyer zum Buschenfelde KH, Rittner C. A tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) promoter polymorphism is associated with chronic hepatitis B infection. *Clin Exp Immunol* 1998; 111: 579-582
- 9 Miyazoe S, Hamasaki K, Nakata K, Kajiya Y, Kitajima K, Nakao K, Daikoku M, Yatsushashi H, Koga M, Yano M, Eguchi K. Influence of interleukin-10 gene promoter polymorphisms on disease progression in patients chronically infected with hepatitis B virus. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2086-2092

电编 李琪 编辑 张焕兰

银杏叶提取物EGb761对慢性乙型肝炎患者肝纤维化的影响

梁斌, 张春清, 任万华, 主余华

梁斌, 张春清, 任万华, 主余华, 山东大学山东省立医院消化内科 山东省济南市 250021
梁斌, 硕士研究生, 主要从事消化系统疾病的研究.
山东省科委优秀中青年科学家基金, No. 03BS016
通讯作者: 主余华, 250021, 山东省济南市, 山东大学山东省立医院肝病中心. zyh6698@yahoo.com.cn
电话: 0531-85186450
收稿日期: 2006-11-30 接受日期: 2006-12-27

Effect of ginko biloba extract on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B

Bin Liang, Chun-Qing Zhang, Wan-Hua Ren, Yu-Hua Zhu

Bin Liang, Chun-Qing Zhang, Wan-Hua Ren, Yu-Hua Zhu, Department of Gastroenterology, Shandong Provincial Hospital, Shandong University, Ji'nan 250021, Shandong Province, China
Supported by the Foundation of Shandong Provincial Science and Technology Committee for the Excellent Young and Middle-aged Scientists, No. 03BS016
Correspondence to: Yu-Hua Zhu, Center of Hepatopathy, Shandong Provincial Hospital, Shandong University, Ji'nan 250021, Shandong Province, China. zyh6698@yahoo.com.cn
Received: 2006-11-30 Accepted: 2006-12-27

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy of ginko biloba extract (EGb761) in the treatment of patients with liver fibrosis caused by chronic hepatitis B.

METHODS: Sixty patients with chronic hepatitis B were randomly divided into EGb761 treatment group ($n = 32$) and control group ($n = 28$). Liver functions, serum type III precollagen (PCIII), type IV collagen (CIV), hyaluronic acid (HA), laminin (LN), platelet activating factor (PAF), endothelin-1 (ET-1) and transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) levels were measured before and after treatment. Twenty-six cases in EGb group and 21 cases in control group received liver biopsy before and after treatment, and the pathological changes of liver tissues were detected by HE, Masson and Gordon-Sweet staining.

RESULTS: After treatment, the indexes of liver function showed obvious improvement in both groups, and there were no significant difference

between two groups. The value of prothrombin time (13.2 ± 2.1 s vs 15.2 ± 3.4 s, $P < 0.05$), the levels of serum alanine aminotransferase (621.8 ± 271.7 nkat/L vs 1258.6 ± 308.4 nkat/L, $P < 0.05$), total bilirubin (17.1 ± 9.5 μ mol/L vs 39.3 ± 21.2 μ mol/L, $P < 0.01$), PCIII (168 ± 48 μ g/L vs 307 ± 93 μ g/L, $P < 0.05$), CIV (102 ± 35 μ g/L vs 191 ± 35 μ g/L, $P < 0.01$), HA (94 ± 39 μ g/L vs 178 ± 57 μ g/L, $P < 0.05$), LN (101 ± 31 μ g/L vs 193 ± 21 μ g/L, $P < 0.05$), PAF (7.62 ± 6.54 μ g/L vs 13.23 ± 9.79 μ g/L, $P < 0.05$), ET-1 (47.61 ± 15.34 μ g/L vs 68.13 ± 21.71 μ g/L, $P < 0.01$) and TGF- β_1 (17.61 ± 5.06 μ g/L vs 58.43 ± 11.04 μ g/L, $P < 0.05$) were significantly decreased after treatment than those before treatment, while the level of albumin was markedly increased (38.2 ± 5.9 g/L vs 34.9 ± 4.4 g/L, $P < 0.05$). There were also notable differences between EGb761 and control group after treatment in the levels of TGF- β_1 (17.61 ± 5.06 μ g/L vs 61.17 ± 11.45 μ g/L, $P < 0.05$), PAF (7.62 ± 6.54 μ g/L vs 11.65 ± 8.96 μ g/L, $P < 0.05$), ET-1 (47.61 ± 15.34 μ g/L vs 61.17 ± 16.45 μ g/L, $P < 0.01$), PCIII (168 ± 48 μ g/L vs 298 ± 86 μ g/L, $P < 0.05$), CIV (102 ± 35 μ g/L vs 178 ± 61 μ g/L, $P < 0.05$), HA (94 ± 39 μ g/L vs 179 ± 82 μ g/L, $P < 0.05$) and LN (101 ± 31 μ g/L vs 190 ± 39 μ g/L, $P < 0.01$). Liver biopsy demonstrated that tissue injuries and fibrosis degree were evidently alleviated in EGb761 group, and there were no obvious changes in control group.

CONCLUSION: EGb761 has distinct anti-fibrosis effects in patients with chronic hepatitis B.

Key Words: Ginko biloba extract; Chronic hepatitis B; Liver fibrosis

Liang B, Zhang CQ, Ren WH, Zhu YH. Effect of ginko biloba extract on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(6):585-590

摘要

目的: 探讨银杏叶提取物(EGb761)对慢性乙型肝炎患者肝组织纤维化的影响。

方法: 将60例慢性乙型肝炎患者分为EGb761治疗组($n = 32$)及对照组($n = 28$), 治疗前后分

■背景资料

1960年代, 西德对银杏叶的成分进行了分析, 发现银杏叶中的类黄酮物质对动物的循环系统、脑功能改善有良好的作用, 从此开始了银杏叶药理及应用的现代研究。肝纤维化是肝硬化的重要病理特征, 抑制肝纤维化则可阻止乙型肝炎向肝硬化发展。几乎所有肝病均可发生炎症坏死, 而只要有炎症坏死, 肝纤维化即可发生, 阻断肝纤维化发生和发展, 对防治肝硬化具有重要意义。

■ 研发前沿

中药中“活血化痰”药物已被证明对肝纤维化有较好治疗作用。应用“活血化痰”中药为主组成的方剂,被认为是目前可行的治疗方案。银杏叶提取物就是其中之一目前多用于心脑血管和血液系统疾病,其又具有消除自由基、防护及改善肝脏微循环等作用。

别检测肝功能、Ⅲ型前胶原(PCⅢ)、Ⅳ型胶原(CⅣ)、透明质酸(HA)、层黏蛋白(LN)、血小板活化因子(PAF)、内皮素(ET-1)和转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)水平。两组中分别有26例和21例患者于治疗前后进行肝活体术,肝组织行HE、胶原纤维、网织纤维染色观察组织学变化。

结果: 治疗后两组的肝功能水平均较治疗前显著好转,但两组比较无差异。EGb761组治疗后ALT (621.8 ± 271.7 nkat/L vs 1258.6 ± 308.4 nkat/L, $P < 0.05$), TBIL (17.1 ± 9.5 μ mol/L vs 39.3 ± 21.2 μ mol/L, $P < 0.01$), PT (13.2 ± 2.1 s vs 15.2 ± 3.4 s, $P < 0.05$), PCⅢ (168 ± 48 μ g/L vs 307 ± 93 μ g/L, $P < 0.05$), CⅣ (102 ± 35 μ g/L vs 191 ± 35 μ g/L, $P < 0.01$), HA (94 ± 39 μ g/L vs 178 ± 57 μ g/L, $P < 0.05$), LN (101 ± 31 μ g/L vs 193 ± 21 μ g/L, $P < 0.05$), PAF (7.62 ± 6.54 μ g/L vs 13.23 ± 9.79 μ g/L, $P < 0.05$), ET-1 (47.61 ± 15.34 μ g/L vs 68.13 ± 21.71 μ g/L, $P < 0.01$)及TGF- β_1 (17.61 ± 5.06 μ g/L vs 58.43 ± 11.04 μ g/L, $P < 0.05$)水平与治疗前相比均显著下降,而ALB水平显著升高(38.2 ± 5.9 g/L vs 34.9 ± 4.4 g/L, $P < 0.05$)。与对照组相比,EGb761组治疗后血清TGF- β_1 (17.61 ± 5.06 μ g/L vs 61.17 ± 11.45 μ g/L, $P < 0.05$), PAF (7.62 ± 6.54 μ g/L vs 11.65 ± 8.96 μ g/L, $P < 0.05$), ET-1 (47.61 ± 15.34 μ g/L vs 61.17 ± 16.45 μ g/L, $P < 0.01$), PCⅢ (168 ± 48 μ g/L vs 298 ± 86 μ g/L, $P < 0.05$), CⅣ (102 ± 35 μ g/L vs 178 ± 61 μ g/L, $P < 0.05$), HA (94 ± 39 μ g/L vs 179 ± 82 μ g/L, $P < 0.05$)及LN(101 ± 31 μ g/L vs 190 ± 39 μ g/L, $P < 0.01$)指标改善更为明显。治疗组肝活体证实,治疗后肝脏细胞损伤减轻,纤维化程度减轻,而对照组治疗前后均无明显变化。

结论: 银杏叶提取物EGb761对慢性乙肝有明显的抗肝纤维化作用。

关键词: 银杏叶提取物;慢性乙型肝炎;肝纤维化

梁斌, 张春清, 任万华, 主余华. 银杏叶提取物EGb761对慢性乙型肝炎患者肝纤维化的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(6):585-590

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/585.asp>

0 引言

肝纤维化是肝硬化的重要病理特征,抑制肝纤维化则可阻止乙型肝炎向肝硬化发展。我们及其他研究者既往动物实验表明,银杏叶提取物(ginkgo biloba extract, EGb761)可用于治疗肝纤

表 1 两组患者的一般情况

分组	n	年龄(岁)	病程(a)	谷丙转氨酶(ALT nkat/L)
EGb组	32	44.7 \pm 10.8	3.4 \pm 1.8	1258.6 \pm 308.4
对照组	28	42.9 \pm 11.3	3.3 \pm 1.7	1388.6 \pm 190.0

维化,并能取得较好的疗效^[1-4],但相关的临床应用报道较少。我们以慢性乙型肝炎患者为研究对象,观察银杏叶提取物对肝脏纤维化的影响,并对其抗纤维化作用机制进行初步探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 来源于我院2003-05/2006-06的慢性乙型肝炎患者74例,诊断符合2000年病毒型肝炎防治方案的标准^[5]肝炎病史半年以上,HBsAg阳性,HBV-DNA阳性,但半年内ALT水平正常或在正常值3倍以下;治疗前均行肝穿刺活检及静脉抽血备检;肝功能Child A级,无腹水或下肢水肿;超声检查无明显肝硬化征象;无消化道出血病史;无合并其他器质性疾病;年龄 < 65 岁,其中男51例,女23例,年龄17-63(平均41)岁。随机分为银杏叶组(EGb组, $n = 40$)和对照组($n = 34$);试验前3-6 mo内未使用过或合并使用糖皮质激素、免疫调节剂、抗病毒药物及抗肝纤维化药物。对照组静脉滴注易善复930 mg,每日一次,共4 wk,银杏叶组除易善复外加用银杏叶提取物标准品(德国舒培大药厂提供,商品名金纳多)70 mg,静滴,每日一次,共4 wk。治疗过程中因14例患者未能坚持用药或拒绝第二次肝穿刺而退出试验,其中银杏叶组退出8人,对照组退出6人,治疗结束银杏叶组32例、对照组28例;其中取得第二次肝穿刺活检者,银杏叶组26例、对照组21例。两组患者的平均年龄、性别比例、平均病程及肝功能水平等差异均无显著性(表1)。

1.2 方法 两组治疗前后分别抽取空腹血10 mL备检,取其中2 mL置于含100 g/L的二胺四乙酸二钠3 μ L、抑肽酶40 μ L的试管中,混匀后立即在4 $^{\circ}$ C下,3000 r/min离心10 min,取上清液贮存于-20 $^{\circ}$ C冰箱中待测,另8 mL置于普通试管中,离心后留取血清置于-20 $^{\circ}$ C冰箱保存。两组分别有26例和21例于治疗前后行两次肝穿刺活检;肝穿组织40 g/L甲醛固定,石蜡包埋,备光镜观察。

1.2.1 血清肝功能指标检测 完成治疗试验的银杏叶组32例、对照组28例,均留取前后两次血清,

表 2 治疗前后两组肝功能的比较(mean ± SD)

组别	n	ALT(nkat/L)	ALB(g/L)	TBIL(μmol/L)	PT(s)
EGb组					
治疗前	32	1258.6 ± 308.4	34.9 ± 4.4	39.3 ± 21.2	15.2 ± 3.4
治疗后	32	621.8 ± 271.7 ^a	38.2 ± 5.9 ^a	17.1 ± 9.5 ^b	13.2 ± 2.1 ^a
对照组					
治疗前	28	1388.6 ± 190.0	35.1 ± 4.8	38.2 ± 25	15.0 ± 3.5
治疗后	28	586.8 ± 310.0 ^a	38.3 ± 6.1 ^a	17.6 ± 8.1 ^a	13.1 ± 1.9 ^a

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 治疗前。

表 3 治疗前后两组病例血清肝纤维化指标的比较 (mean ± SD, μg/L)

组别	n	PC III	CIV	HA	LN
EGb组					
治疗前	32	307 ± 93	191 ± 35	178 ± 57	193 ± 21
治疗后	32	168 ± 48 ^a	102 ± 35 ^b	94 ± 39 ^a	101 ± 31 ^a
对照组					
治疗前	28	313 ± 110	186 ± 67	188 ± 90	187 ± 21
治疗后	28	298 ± 86 ^c	178 ± 61 ^c	179 ± 82 ^c	190 ± 39 ^d

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 治疗前; ^cP<0.05, ^dP<0.01 vs 治疗组治疗后。

全自动生化检测仪检测ALT, AST, ALB指标。

1.2.2 血清肝纤维化指标检测 血清中PCIII, CIV, HA和LN水平应用放射免疫法。试剂盒购自上海海军医学研究所。

1.2.3 血清血小板活化因子(PAF)的水平检测 应用ELISA法, 美国RapidBio公司提供。

1.2.4 血清转化生长因子β₁(TGF-β₁)的水平检测 应用ELISA法, 试剂盒购自深圳晶美生物工程有限公司(美国Genzyme公司产品分装)。

1.2.5 血清内皮素(ET-1)的测定 采用放射免疫分析法测定血浆ET-1含量, 其放射免疫试剂盒由解放军总医院东亚免疫技术研究所提供。

1.2.6 肝组织光镜观察 26例银杏叶组和21例对照组治疗前后的肝穿刺组织, 石蜡包埋, 4 μm切片, 常规HE染色和胶原染色(Gordon-Sweet法和Masson三色改良法双染网状纤维和胶原纤维); 肝组织损伤程度采用Knodell计数法(HAI), 并按“HAI炎症积分”“HAI纤维化积分”分别进行统计。肝组织胶原及网织纤维图像分析经Leica DFC480及IM50 观察采集图像, Leica Qwin V3图像分析软件进行图像分析, 每张切片随机选取10个视野, 由分析系统测定每一视野中的胶原含量(面密度), 以胶原占全视野面积的百分比表示, 取其平均值。采用双盲分析。

统计学处理 计量资料的各项指标均采用均数±标准差(mean±SD), 使用SPSS11.5软件包

表 4 治疗前后两组病例血清TGF-β₁, PAF, ET-1水平的变化 (mean ± SD, μg/L)

组别	n	TGF-β ₁	PAF	ET-1
EGb组				
治疗前	32	58.43 ± 11.04	13.23 ± 9.79	68.13 ± 21.71
治疗后	32	17.61 ± 5.06 ^a	7.62 ± 6.54 ^a	47.61 ± 15.34 ^b
对照组				
治疗前	28	57.69 ± 10.23	12.44 ± 9.63	65.46 ± 20.67
治疗后	28	61.17 ± 11.45 ^c	11.65 ± 8.96 ^c	61.17 ± 16.45 ^d

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 治疗前; ^cP<0.05, ^dP<0.01 vs 治疗组治疗后。

表 5 两组患者治疗前后病理半定量计分及胶原相对含量的变化(mean ± SD)

组别	n	炎症计分	纤维化计分	胶原相对含量(%)
EGb组				
治疗前	26	15.7 ± 6.3	11.9 ± 6.2	21.6 ± 9.3
治疗后	26	10.7 ± 4.8 ^a	8.3 ± 4.2 ^a	14.7 ± 6.4 ^a
对照组				
治疗前	21	15.6 ± 5.9	11.7 ± 5.4	22.7 ± 9.8
治疗后	21	14.2 ± 6.6 ^c	11.5 ± 5.6 ^c	21.2 ± 9.3 ^c

^aP<0.05 vs 治疗前; ^cP<0.05 vs 治疗组治疗后。进行t检验及χ²检验, P<0.05为有统计学意义。

2 结果

2.1 两组治疗前后肝功能的比较 治疗后两组的ALT, TBIL, PT水平均较治疗前明显下降(P<0.05或P<0.01), ALB水平均较治疗前明显升高(P<0.05)。两组治疗前及治疗后ALT, TBIL, PT, ALB水平比较均无明显差异(P>0.05, 表2)。

2.2 两组治疗前后血清肝纤维化指标水平的比较 治疗组与对照组治疗前PCIII, CIV, HA, LN水平无差异(P>0.05); 治疗组治疗后PCIII, CIV, HA, LN水平较治疗前显著下降(P<0.05或P<0.01), 而对照组PCIII, CIV, HA, LN水平治疗前后比较无明显差异(P>0.05), 治疗后治疗组PCIII, CIV, HA, LN水平明显低于对照组(P<0.05或P<0.01, 表3)。

2.3 两组治疗前后血清TGF-β₁, PAF, ET-1水平的比较 治疗组与对照组治疗前TGF-β₁, PAF, ET-1水平均无明显差异(P>0.05); 治疗组治疗后TGF-β₁, PAF, ET-1水平较治疗前均显著下降(P<0.05或0.01), 而对照组各指标治疗前后比较无明显差异(P>0.05), 治疗组治疗后各指标均明显低于对照组治疗后(P<0.05或0.01, 表4)。

2.4 光镜观察治疗前后肝脏的组织学变化 治疗组治疗后较治疗前炎症及纤维化计分均明显下降, 胶原相对含量亦明显降低, 与对照组比较有

■ 创新盘点

本课题组及其他研究者既往动物实验表明, 银杏叶提取物(ginkgo biloba extract, EGb761)可用于治疗肝纤维化, 并能取得较好的疗效, 但相关的临床应用研究报道较少。本文即以慢性乙型肝炎患者为研究对象, 观察银杏叶提取物对肝脏纤维化的影响, 并对其抗纤维化作用机制进行初步探讨。

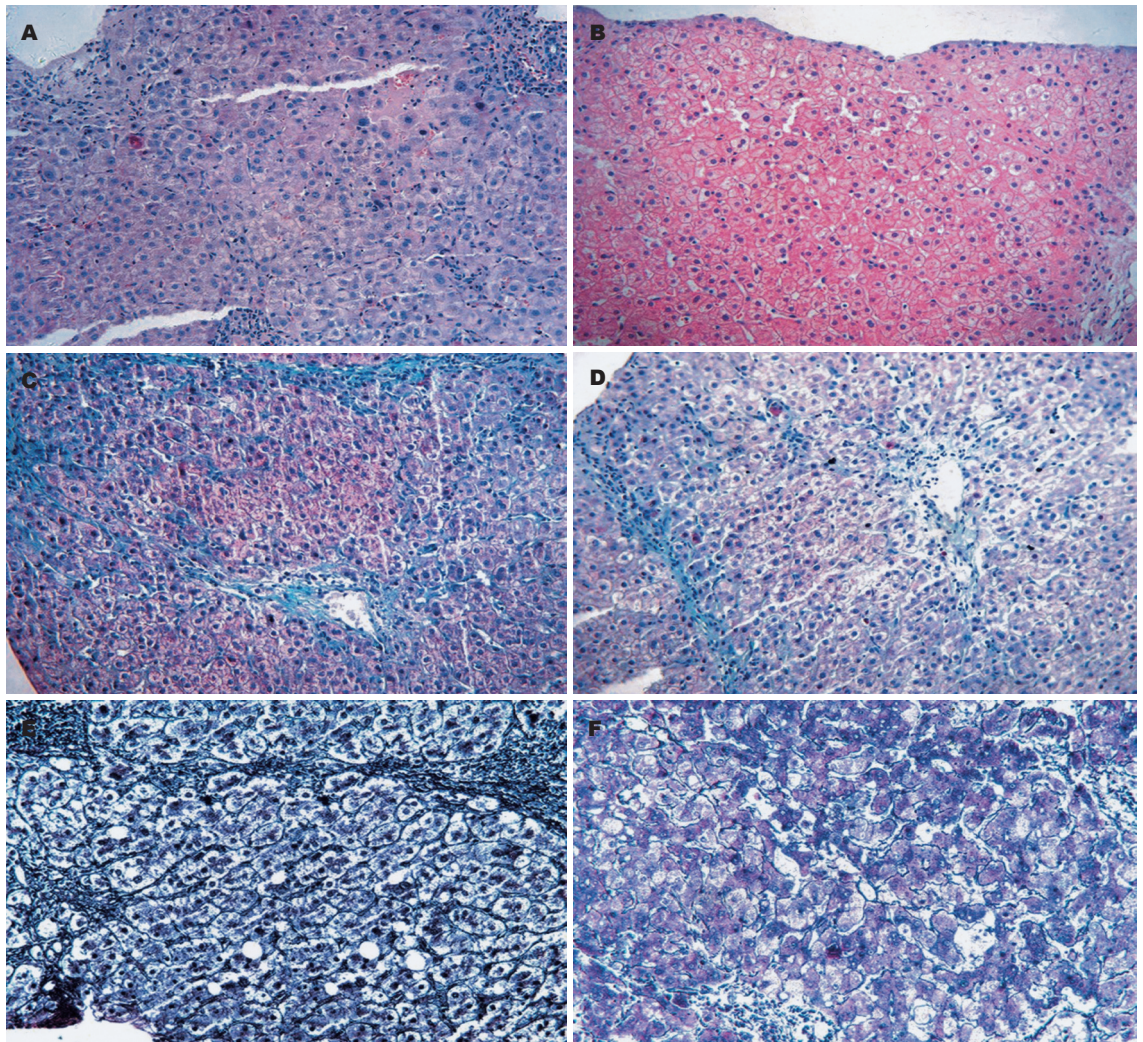


图1 光镜观察治疗前后肝脏的组织学变化。A: 治疗前(HE染色)。肝细胞显著肿胀,呈气球样变,可见点、片状嗜酸性小体,间质中有炎细胞浸润,肝窦腔内红细胞显著聚集;B: 治疗后(HE染色)。肝细胞肿胀减轻,偶见嗜酸性小体,肝窦腔通畅;C: 治疗前(Masson 3色染色)。胶原纤维增生显著,纤维间隔变宽;D: 治疗后(Masson 3色染色)。胶原纤维明显减少,纤维间隔变细;E: 治疗前(网织纤维染色)。网织纤维增生显著,纤维间隔变宽;F: 治疗后(网织纤维染色)。网织纤维明显减少,纤维间隔变细。

显著性差异(表5)。治疗前肝细胞显著肿胀,呈气球样变,可见点、片状嗜酸性小体,间质中有炎细胞浸润,肝窦腔内红细胞显著聚集。治疗后肝细胞损伤减轻,偶见嗜酸性小体,肝小叶结构基本正常,但仍见少许炎细胞浸润(图1A-B)。治疗前胶原纤维及网状纤维增生显著,纤维间隔变宽;治疗后胶原纤维及网状纤维明显减少,纤维间隔变细(图1C-F)。

3 讨论

肝纤维化(hepatic fibrosis)发生机制主要是在某些病理状态下,早期由各种因素造成组织细胞的损伤和炎症,随着损伤的持续和炎症的慢性化,以及多种细胞及细胞因子、自由基之间的相互作用,最终导致肝内细胞外基质(ECM)合成与降解失衡,表现为大量ECM的沉积,形成肝脏

的纤维化^[6-7]。肝纤维化时,ECM的量和质均发生显著变化。以胶原为主的ECM成份可较正常肝增加3-8倍。

目前,国际上标准的银杏提取物EGb761主要可分为两大类:24%黄酮类和6%萜内酯类。现代药理学研究银杏提取物的中萜内酯类主要作用为:改善微循环和解痉、拮抗血小板活化因子、降血脂、抗动脉硬化,其黄酮类有调节免疫、清除自由基、抗氧化的作用^[8-9]。动物实验研究发现,银杏叶提取物可促进大鼠肝纤维化的逆转,使肝组织中 α -SMA、TGF- β_1 、I型胶原、TIMP-1的表达降低;肝功能改善;肝组织纤维化程度分级好转,胶原纤维、网状纤维所占面积显著缩小^[10-11]结果亦证实银杏叶提取物可抑制肝星状细胞表达TGF- β_1 、CTGF、I型胶原、III型胶原,并抑制肝星状细胞的增殖^[12-13]。

作为反应细胞外基质成分的血清纤维化指标PCIII, HA, LN, CIV在反应肝纤维化方面的意义已得到广大学者的认同^[14-15]. 本研究发现Gbe761可明显降低慢性乙型肝炎患者血清中PCIII, CIV, HA, LN的水平, 与对照组相比有明显的差异; 其中透明质酸(HA)是一种氨基多糖, 由肝间质细胞合成, 其与肝窦内皮细胞上的受体相结合, 被其中的透明质酸酶降解代谢. 血清HA水平与肝脏微循环障碍程度、肝窦内皮细胞(SEC)损伤、肝窦毛细血管化均呈显著正相关^[21]. Ueno *et al*^[22]研究证实, 血清HA水平可反映肝窦毛细血管化^[22]. 银杏叶治疗组治疗后患者病理组织学得到了明显的改善, 炎症计分及纤维化计分均明显减轻, 胶原纤维、网织纤维明显减少, 肝窦腔通畅, 纤维化程度明显减轻. 该结果进一步客观地证实银杏叶提取物可有效减轻肝纤维化, 与我们既往动物实验结果相符^[1,17].

银杏叶提取物改善肝脏微循环、减轻肝纤维化, 可能通过以下机制实现: (1) 阻止内皮素(ET)的病理性增加. ET是目前已知的缩血管活性最强的多肽类物质^[18], 文献报道血浆及肝组织ET-1水平升高与肝硬化及门静脉高压的形成有关^[18-19]. ET-1增加HSC上 α -肌动蛋白的表达, 可介导激活的HSC向收缩型HSC转化, 促进细胞外基质分泌, 加剧肝纤维化^[20]. 我们既往动物试验研究发现, 银杏叶提取物可明显降低肝组织中ET-1的含量^[17], 我们发现, 慢性乙型肝炎患者银杏叶治疗组治疗后血清中ET-1水平明显降低, 提示银杏叶提取物可能通过降低ET-1水平, 从而减轻肝纤维化; (2) 拮抗血小板活化因子. 血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)是迄今为止发现的一种最强活性的脂类介质, 活化和增殖的星状细胞是肝纤维化及门脉高压形成的主要效应细胞^[22-23,29]. 银杏叶制剂是很强的PAF受体拮抗剂. 应用EGb761治疗后慢乙肝患者血清中PAF的水平明显下降, 与对照组相比有显著性差异, 说明EGb761可以通过降低PAF水平, 抑制HSC活化减少释放ECM, 中和HSC的收缩, 改善肝脏微循环, 从而有具有抗纤维化作用; (3) 降低TGF- β_1 水平. TGF- β_1 与肝纤维化的发生机制有密切的关系, 是已知最强的肝纤维化促进因子之一, 可以显著促进胶原的合成^[24]. De Bleser *et al*^[25]研究发现, 肝纤维化时, TGF- β_1 在肝星状细胞和肝窦内皮细胞中选择性表达增加. 该结果提示不仅HSC在肝纤维化发生中起了重要作用, 而且肝窦内皮细胞也有重要的作用. 我们通过细胞实验证实银

杏叶提取物可抑制肝星状细胞TGF- β_1 ^[26]; 动物实验发现, 银杏叶提取物可下调CCL₄大鼠肝组织中TGF β_1 mRNA表达并抑制胶原沉积^[1]; 而血清中TGF- β_1 能够作为肝纤维化独立因子用于临床早期肝纤维化的诊断^[27-30]. 我们观察慢性乙型肝炎患者在EGb761治疗后, 患者血清TGF- β_1 水平下降($P < 0.05$), 提示银杏叶提取物能通过降低TGF- β_1 水平抑制HSC活化分泌ECM发挥抗肝纤维化, 可能不仅作用于肝星状细胞, 对肝窦内皮细胞可能也发挥了一定保护作用.

4 参考文献

- 张春清, 朱菊人, 石恒美, 吕晓霞. 银杏叶提取物对大鼠肝组织TGF β_1 mRNA表达及胶原沉积的影响. 中西医结合肝病杂志 2001; 11: 284-286
- 胡伟, 时昭红, 马庭芳, 于皆平. 银杏叶提取物抗大鼠肝纤维化的作用. 世界华人消化杂志 2004; 12: 886-891
- 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
- Sener G, Kabasakal L, Yuksel M, Gedik N, Alican Y. Hepatic fibrosis in biliary-obstructed rats is prevented by Ginkgo biloba treatment. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5444-5449
- 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学会. 病毒性肝炎防治方案. 中华传染病杂志 2001; 19: 56-62
- Bissell DM, Friedman SL, Maher JJ, Roll FJ. Connective tissue biology and hepatic fibrosis: report of a conference. *Hepatology* 1990; 11: 488-498
- Schuppan D. Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: collagens and glycoproteins. *Semin Liver Dis* 1990; 10: 1-10
- 潘宇政. 银杏黄酮对人体免疫机能的影响. 广西医科大学学报 1998; 15: 27-28
- 何美霞, 刘方洲, 赵一, 牛志英. 银杏果袋泡茶抗自由基及改善微循环作用的实验研究. 中国中医药科技 1997; 4: 91-92
- 时昭红, 张介眉, 胡伟, 于皆平, 薛莎, 罗燕军. 银杏叶提取物对实验性大鼠肝纤维化的逆转作用. 中国中西医结合消化杂志 2005; 13: 148-151
- 罗燕军, 于皆平, 罗和生, 刘诗权, 涂希平. 银杏叶提取物对四氯化碳诱发大鼠肝纤维化的预防作用. 中华消化杂志 2004; 24: 307-308
- 主余华, 张春清, 石军, 任万华, 马艳丽. 银杏叶提取物对大鼠肝星状细胞细胞因子和胶原合成及细胞增殖的影响. 实用肝脏病杂志 2006; 9: 129-131
- Zhang C, Zhu Y, Wan J, Xu H, Shi H, Lu X. Effects of Ginkgo biloba extract on cell proliferation, cytokines and extracellular matrix of hepatic stellate cells. *Liver Int* 2006; 26: 1283-1290
- 蔡卫民, 郑敏, 翁红雷, 刘荣华. 慢性肝炎患者血清纤维化指标的检测及意义. 中华内科杂志 2001; 40: 448-451
- 李兵顺, 王继, 刘金星, 孙述强, 魏梅新, 刘晓梅, 王麟士. 联合检测PCIII、HA、LN对肝纤维化的诊断价值. 中华传染病杂志 1998; 16: 85-87
- Reichen J, Gerbes AL, Steiner MJ, Sagesser H, Clozel M. The effect of endothelin and its antagonist Bosentan on hemodynamics and microvascular

■同行评价

本文研究了EGb761对慢乙肝患者肝纤维化的影响, 内容充实, 结果可靠, 有一定学术和实际应用价值.

- exchange in cirrhotic rat liver. *J Hepatol* 1998; 28: 1020-1030
- 17 Zhang C, Zu J, Shi H, Liu J, Qin C. The effect of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on hepatic sinusoidal endothelial cells and hepatic microcirculation in CCl₄ rats. *Am J Chin Med* 2004; 32: 21-31
- 18 Reichen J, Gerbes AL, Steiner MJ, Sagesser H, Clozel M. The effect of endothelin and its antagonist Bosentan on hemodynamics and microvascular exchange in cirrhotic rat liver. *J Hepatol* 1998; 28: 1020-1030
- 19 Hori N, Wiest R, Groszmann RJ. Enhanced release of nitric oxide in response to changes in flow and shear stress in the superior mesenteric arteries of portal hypertensive rats. *Hepatology* 1998; 28: 1467-1473
- 20 韩德五, 赵龙凤. 肠源性内毒素血症在肝炎慢性化中的作用. *基础医学与临床* 1999; 19: 2-7
- 21 郝菁华, 石军, 任万华, 韩国庆, 朱菊人, 王万忠, 王书运, 谢英渤. 血清透明质酸水平与肝脏微循环状况的关系. *临床肝胆病杂志* 2002: 35-37
- 22 Ueno T, Inuzuka S, Torimura T, Tamaki S, Koh H, Kin M, Minetoma T, Kimura Y, Ohira H, Sata M. Serum hyaluronate reflects hepatic sinusoidal capillarization. *Gastroenterology* 1993; 105: 475-481
- 23 Yang Y, Nemoto EM, Harvey SA, Subbotin VM, Gandhi CR. Increased hepatic platelet activating factor (PAF) and PAF receptors in carbon tetrachloride induced liver cirrhosis. *Gut* 2004; 53: 877-883
- 24 Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d793-d807
- 25 De Bleser PJ, Niki T, Rogiers V, Geerts A. Transforming growth factor-beta gene expression in normal and fibrotic rat liver. *J Hepatol* 1997; 26: 886-893
- 26 张春清, 主余华, 任万华, 许洪伟, 秦成勇, 吕晓霞. 银杏叶提取物对肝星状细胞TGF-β1, CTGF及细胞外基质表达的影响. *中国新药与临床杂志* 2006; 25: 184-188
- 27 孙樱, 宣世英, 辛永宁, 吕维红, 初蕾蕾, 李宁, 张健, 张梅. 慢性乙型肝炎患者血清TGF-β1与肝组织纤维化及肝功能相关性的研究. *中华肝脏病杂志* 2002; 10: 221-222
- 28 林羨屏, 王小众. 肝纤维化相关因子及其作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1037-1043
- 29 Mathonnet M, Descottes B, Valleix D, Truffinet V, Labrousse F, Denizot Y. Platelet-activating factor in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2773-2778
- 30 Wu XR, Lv MH, Wang Q, Shi SS, Guo WD. The plasma levels of transforming growth factor beta1 and the protein expressions of alpha-SMA, urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in liver of patients with different grades of hepatic fibrosis. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2004; 12: 400-402

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 •

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2007-02-28)

Ezrin、FAK及E-cadherin在大肠癌组织中的表达及其临床意义

王红建, 史成章, 秦先锋, 黄秋实

王红建, 史成章, 秦先锋, 黄秋实, 郑州大学第一附属医院消化内科 河南省郑州市 450052

王红建, 硕士研究生, 主要从事消化道肿瘤的基础与临床研究。

河南省自然科学基金资助项目, No. 0511044800

通讯作者: 史成章, 450052, 河南省郑州市, 郑州大学第一附属医院消化内科, scz1679@126.com

电话: 0371-65178797

收稿日期: 2006-11-02 接受日期: 2006-11-21

Expression of ezrin, E-cadherin and focal adhesion kinase in colorectal carcinoma and their clinical significances

Hong-Jian Wang, Cheng-Zhang Shi, Xian-Feng Qin, Qiu-Shi Huang

Hong-Jian Wang, Cheng-Zhang Shi, Xian-Feng Qin, Qiu-Shi Huang, Department of Digestive Medicine, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, 450052, He'nan Province, China

Supported by the Natural Science Foundation of He'nan Province, No. 0511044800

Correspondence to: Cheng-Zhang Shi, Department of Digestive Medicine, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, He'nan Province, China. scz1679@126.com

Received: 2006-11-02 Accepted: 2006-11-21

Abstract

AIM: To investigate the expression of ezrin, focal adhesion kinase (FAK) and E-cadherin (E-cad) as well as their correlations with the invasion and metastasis of colorectal carcinoma.

METHODS: Immunohistochemistry was used to detect the expression of ezrin, FAK and E-cad in 50 cases of colorectal carcinoma (including 13 well-differentiated adenocarcinomas, 37 moderately- or poorly-differentiated adenocarcinomas; 30 cases without lymph node metastasis and 20 with lymph node metastasis). The correlations among Ezrin, FAK and E-cadherin expression as well as the clinical and pathological characteristics were analyzed by statistical method.

RESULTS: The expression of ezrin was sig-

nificantly higher in colorectal carcinomas with moderate or poor differentiation, lymph node metastasis and Dukes C+D stages than that in the ones with high differentiation, non-metastasis, and Dukes A+B stages (83.78% vs 46.15%, $P < 0.01$; 95.00% vs 60.00%, $P < 0.01$; 95.00% vs 60.00%, $P < 0.01$), but E-cad expression was in the contrary situation (24.32% vs 69.23%, $P < 0.01$; 10.00% vs 53.33%, $P < 0.01$; 10.00% vs 53.33%, $P < 0.01$). The expression of ezrin and E-cad had no marked correlations with the age and sex of patients ($P > 0.05$). FAK expression was markedly higher in colorectal carcinomas with Dukes C+D stages and lymph node metastasis than that in the ones with Dukes A+B stages and without metastasis (100.00% vs 63.33%, $P < 0.01$; 100.00% vs 63.33%, $P < 0.01$), but it had no significant correlation with the differentiation degree of tumors, the sex and ages of patients ($P > 0.05$). Spearman analysis showed that there existed positive correlation between Ezrin and FAK expression ($r = 0.346$, $P < 0.05$), and negative correlation between E-cadherin and Ezrin ($r = -0.410$, $P < 0.01$) as well as E-cadherin and FAK expression ($r = -0.406$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: The abnormal expression of ezrin, FAK and E-cad are closely correlated with the infiltration and metastasis of colorectal carcinoma, and the combined detection can be used to judge the prognosis of patients with colorectal carcinoma.

Key Words: Colorectal carcinoma; Ezrin; Focal adhesion kinase; E-cadherin; Invasion; Metastasis; Immunohistochemistry

Wang HJ, Shi CZ, Qin XF, Huang QS. Expression of ezrin, E-cadherin and focal adhesion kinase in colorectal carcinoma and their clinical significances. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(6):591-595

摘要

目的: 探讨大肠癌组织中埃兹蛋白(Ezrin), 黏着斑激酶(FAK)及上皮细胞钙黏蛋白(E-cadherin)的表达及其与肿瘤侵袭和转移的关系。

■背景资料

侵袭和转移是影响肿瘤患者治疗效果和预后的重要因素, 控制肿瘤细胞的侵袭和转移仍是当今肿瘤研究中的重要课题。研究表明, 黏附分子对肿瘤细胞的侵袭和转移特性具有调控作用, 但其具体作用机制不明, 对黏附分子及一些影响黏附分子功能的基因产物的深入研究, 可能有助于我们探明恶性肿瘤浸润和转移的机制。

■研发前沿

近年来, Ezrin与肿瘤的发生、增殖、浸润和转移的关系渐被人们所重视, 有关Ezrin与其他肿瘤相关黏附分子在肿瘤发生、发展和转移过程中的相互联系、信号转导及表达调控机制将会成为当今肿瘤研究中的新热点之一。

■相关报道

相关研究表明, Ezrin可与多种细胞黏附分子通过细胞骨架结构相连接, 参与细胞极性的维持, 细胞骨架的收缩和组装, 跨膜信号传导, 并调节基因表达。

方法: 大肠癌组织标本50例, 其中高分化腺癌13例, 中低分化腺癌37例; 无淋巴结转移30例, 淋巴结转移20例。采用免疫组织化学方法检测50例大肠癌组织中Ezrin, FAK及E-cadherin的蛋白表达, 并运用统计学方法分析Ezrin, FAK及E-cadherin的表达与大肠癌各种临床病理特征的关系及三者的相关性。

结果: Ezrin在中低分化、伴有淋巴结转移及Dukes C+D期大肠癌的阳性表达率显著高于高分化、无淋巴结转移及Dukes A+B期大肠癌(83.78% vs 46.15%, $P < 0.01$; 95.00% vs 60.00%, $P < 0.01$; 95.00% vs 60.00%, $P < 0.01$), 而E-cadherin在以上组织中的表达正好相反(24.32% vs 69.23%, $P < 0.01$; 10.00% vs 53.33%, $P < 0.01$; 10.00% vs 53.33%, $P < 0.01$), 其均与患者性别及年龄大小均无关($P > 0.05$)。FAK在Dukes C+D期、伴有淋巴结转移大肠癌组织中的阳性表达显著高于Dukes A+B、无淋巴结转移组织(100.00% vs 63.33%, $P < 0.01$; 100.00% vs 63.33%, $P < 0.01$), 而与肿瘤的分化程度、患者性别及年龄大小均无关($P > 0.05$)。经Spearman相关分析, Ezrin与FAK在大肠癌组织中的表达呈正相关($r = 0.346$, $P < 0.05$), E-cadherin与Ezrin、FAK在大肠癌组织中的表达均呈明显负相关($r = -0.410$, $P < 0.01$; $r = -0.406$, $P < 0.01$)。

结论: Ezrin, FAK及E-cadherin在大肠癌组织中的异常表达与肿瘤组织的浸润和转移密切相关, 联合检测可以作为一组有效的大肠癌肿瘤标记和预后指标。

关键词: 大肠癌; 埃兹蛋白; 黏着斑激酶; 上皮细胞钙黏蛋白; 侵袭; 转移; 免疫组化

王红建, 史成章, 秦先锋, 黄秋实. Ezrin、FAK及E-cadherin在大肠癌组织中的表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2007;15(6):591-595

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/591.asp>

0 引言

埃兹蛋白(Ezrin)是ERM(ezrin-radixin-moesin)蛋白家族的成员之一, 其功能为连接细胞表面受体尤其是黏附分子和肌动蛋白细胞骨架。主要集中表达于细胞表面的顶端, 参与上皮细胞极性的维持。最近研究发现, Ezrin通过调节黏附分子和信号转导途径, 参与细胞与细胞、细胞与基质之间的相互作用, 可能在肿瘤细胞的侵袭和转移过程中起重要作用^[1-2]。黏着斑激酶(FAK)是一种重要的非受体蛋白酪氨酸激酶^[3], 近年来

研究表明, FAK的表达上调对肿瘤的增殖、生存、迁移、侵袭、转移和血管形成等行为起着重要的调控作用^[4-7]。E-钙黏附蛋白(E-cadherin)是钙依赖性细胞间连接的黏附分子, 主要介导同种细胞间的黏附反应, 是维护上皮细胞形态和结构的完整性和极性的重要分子^[8], 并起细胞骨架作用, 当E-cadherin表达失活时可导致细胞间黏附能力下降, 极性紊乱, 促进肿瘤的转移。我们通过检测大肠癌标本中Ezrin, E-cadherin, FAK的表达, 探讨他们的表达水平与各临床病理指标间的关系以及他们之间的相关性, 判断他们在大肠癌发生、浸润、转移中的作用, 为临床预测预后, 选择合适的辅助治疗措施提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 50例大肠癌标本均选自郑州大学第一附属医院2003-01/2004-12手术切除后经病理诊断明确的存档蜡块。患者年龄31-80(中位55.5)岁。男28例, 女22例。结肠癌30例, 直肠癌20例。组织学类型: 高分化腺癌13例, 中分化腺癌20例, 低分化腺癌17例; Dukes分期: A期17例, B期13例, C+D期20例; 伴淋巴结转移20例。鼠抗人Ezrin mAb购自福建迈新生物技术开发有限公司, 鼠抗人FAK mAb购自美国Santa Cruz公司, 鼠抗人上皮性钙黏附蛋白mAb工作液、SP试剂盒、DAB显色剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司。实验步骤按试剂盒说明书进行。阴性对照采用0.01 mmol/L磷酸盐修复液(PBS)代替一抗, 阳性对照为正常结直肠黏膜阳性切片。

1.2 方法 采用免疫组织化学SP法进行染色, 操作过程参照试剂盒说明书。结果判断: Ezrin阳性着色按染色强度和阳性表达数, 参考Mathew *et al*^[9]分级标准: 0分, 无表达; 1分, <50%细胞阳性表达或染色较浅; 2分, ≥50%阳性。0-1分记为阴性, 2分记为阳性。E-cadherin根据阳性细胞所占的百分率参照Gonzalez *et al*^[10]分级标准: 0分, 无着色; 1分, 阳性细胞率<75%; 2分, 阳性细胞率≥75%。0-1分记为阴性, 2分记为阳性。FAK染色结果判定从光镜下分析A: 按切片中细胞染色深浅记分: 0分: 细胞无显色; 1分: 显色为浅黄; 2分: 显色为棕黄; 3分: 显色为棕褐色。B: 按切片中显色细胞的比例评分: 1分: 显色细胞占切片中癌细胞总数的20%以下; 2分: 21%-70%癌细胞显色; 3分: 71%以上癌细胞显色。每例肿瘤积分 = A × B。按积分高低分为阴性: 积分为0分-4

表 1 Ezrin, FAK和E-cadherin在大肠癌组织的表达与临床病理因素的关系 n (%)

病理因素	n	Ezrin	FAK	E-cadherin
性别				
男	28	23(82.14)	24(85.71)	8(28.57)
女	22	14(63.63)	15(68.18)	10(45.45)
年龄(岁)				
<50	19	12(63.16)	13(68.42)	6(31.58)
≥ 50	31	25(80.64)	26(83.87)	12(38.71)
分化程度				
高分化	13	6(46.15) ^b	8(61.54)	9(69.23) ^b
中低分化	37	31(83.78)	31(83.78)	9(24.32)
淋巴结转移				
有	20	19(95.00) ^b	20(100.00) ^b	2(10.00) ^b
无	30	18(60.00)	19(63.33)	16(53.33)
Dukes分期				
A+B	30	18(60.00) ^b	19(63.33) ^b	16(53.33) ^b
C+D	20	19(95.00)	20(100.00)	2(10.00)

^b $P < 0.01$.

表 2 Ezrin, FAK, E-cadherin表达间的关系

检测指标	阳性数	共同阳性表达(%)	阴性数	共同阴性表达(%)
Ezrin和FAK	37	32(86.4) ^a	13	6(46.1) ^a
E-cadherin和Ezrin	18	9(50.0) ^b	32	4(12.5) ^b
FAK和E-cadherin	39	10(25.6) ^b	11	3(27.3) ^b

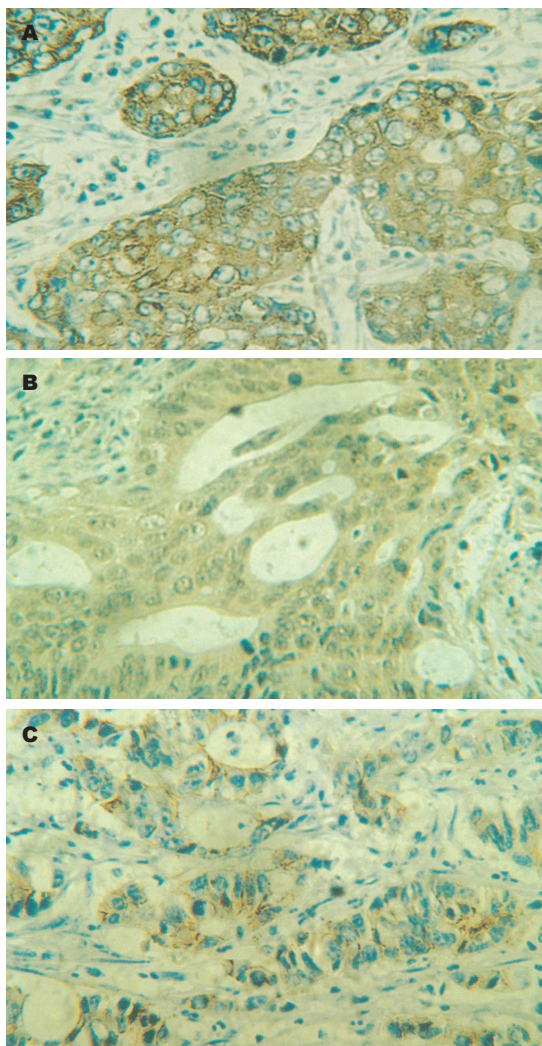
^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.01$.

分; 阳性: 积分大于4分.

统计学处理 采用SPSS10.0软件包进行统计学分析. Ezrin, FAK, E-cadherin与大肠癌临床病理因素之间的分析采用行 \times 列表的 χ^2 检验. Ezrin, FAK, E-cadherin之间相关性检验采用Spearman相关分析. 以 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准.

2 结果

2.1 Ezrin, FAK及E-cadherin在大肠癌组织的表达与临床病理因素的关系 Ezrin的表达与大肠癌的分化程度、淋巴结转移和Dukes分期均密切相关($P < 0.01$, 表1)而与患者性别及年龄大小均无关($P > 0.05$, 图1A). 其中随着大肠癌Dukes分期的增加Ezrin在大肠癌组织中的表达增加, 且Dukes C+D期阳性率明显高于Dukes A+B期, 两组间比较有显著性差异($P < 0.01$, 表1), FAK的表达与大肠癌的淋巴结转移和Dukes分期均密切相关($P < 0.01$, 表1). 而与肿瘤的分化程度、患者性别及年龄大小无关($P > 0.05$, 图1B). 淋巴结转移及Dukes C+D期肿瘤组织中FAK明显高度表达. 其中Dukes C+D期阳性率明显高于Dukes

图 1 大肠癌组织中Ezrin, FAK和E-cadherin蛋白的表达(苏木素复染 $\times 400$). A: Ezrin; B: FAK; C: E-cadherin.

A+B期, 两组间比较有显著性差异($P < 0.01$, 表1). E-cadherin的阳性表达与大肠癌的分化程度、淋巴结转移和Dukes分期等因素均呈明显的负相关($P < 0.01$, 表1)而与患者性别及年龄大小均无关($P > 0.05$, 图1C). 在中低分化, 淋巴结转移及Dukes C+D期的大肠癌组织中E-cadherin的表达明显降低. 其中Dukes C+D期肿瘤组织中E-cadherin的阳性率明显低于Dukes A+B期, 两组间比较有显著性差异($P < 0.01$, 表1).

2.2 Ezrin, FAK 及E-cadherin在大肠癌组织中表达的相互关系 本研究分别对Ezrin, FAK及E-cadherin其中的2个指标进行Spearman相关分析, 结果表明, 50例大肠癌标本中, Ezrin与FAK在大肠癌组织中的表达呈正相关($r = 0.346$, $P < 0.05$, 表2), Ezrin与E-cadherin在大肠癌组织中的表达呈明显负相关($r = -0.410$, $P < 0.01$, 表2). FAK与E-cadherin在大肠癌组织中的表达呈明显

应用要点

Ezrin, FAK及E-cadherin作为影响细胞间及细胞与基质间黏附作用的重要分子, 对他们之间相互作用机制的深入研究将为我们找到抑制肿瘤转移的靶点或为预测肿瘤患者预后的分子标记提供依据.

■名词解释

1 埃兹蛋白: 以往又称cytovillin, p81或villin-2, 是一种膜细胞骨架连接蛋白, 为连接细胞膜与细胞骨架的ERM家族成员之一, 具有维持细胞形态和运动、连接黏附分子及调节信号转导等功能。

2 黏着斑激酶: 是一种非受体酪氨酸激酶, 被认为是整合素依赖性信号转导通路中的基础分子, 具有调节细胞发育、细胞与细胞外基质黏附、细胞骨架重组等多种生物学功能。

负相关($r = -0.406, P < 0.01$, 表2)

3 讨论

侵袭和转移是恶性肿瘤的主要生物学特征, 肿瘤细胞在转移过程中存在细胞黏附分子及其介导的行为改变, 恶性肿瘤发生转移的基础是肿瘤细胞摆脱细胞之间黏附作用对他的控制从而脱离原发灶, 在此过程中肿瘤细胞表面黏附分子的去黏附作用至关重要。

3.1 Ezrin在大肠癌组织中表达的意义 Ezrin是ERM蛋白家族中的成员之一, 近年来研究发现, Ezrin蛋白在肿瘤转移过程中扮演重要角色^[11], Ezrin对骨癌^[12]、乳腺癌^[13]、子宫内膜癌^[14]、前列腺癌^[15]的转移是不可缺少的因素。转移能力较强的肿瘤细胞系常伴有Ezrin的过表达^[16]。Khanna *et al*^[17]和Yu *et al*^[18]通过实验表明, Ezrin在具有高转移特性的鼠横纹肌肉瘤及骨肉瘤细胞株中高度表达, 抑制横纹肌肉瘤细胞及骨肉瘤细胞中Ezrin的表达能显著抑制肿瘤的肺转移。本研究发现, Ezrin在低分化大肠癌组织中的表达明显高于高分化癌组织, 且Ezrin表达强度与肿瘤侵袭性正相关。有淋巴结转移和Dukes C+D期癌组织中Ezrin的表达显著高于无转移和Dukes A和B期癌组织中Ezrin的表达。提示Ezrin的异常表达与恶性肿瘤细胞的侵袭和转移有关。

3.2 FAK在大肠癌组织中表达的意义 FAK是一种非受体蛋白酪氨酸激酶, 分布在细胞黏着斑部位。近年来研究表明, 在多种肿瘤组织中都有FAK表达的显著增加^[19], 且FAK的表达与肿瘤的发生及生物学行为有一定的相关性^[20]。FAK可激活多条信号传导通路, 参与细胞分化、增生、伸展和迁移以及肿瘤的侵袭和转移等过程^[21]。并且在许多上皮组织起源的肿瘤, 肝癌、胃癌、乳腺癌、卵巢癌等组织中都发现有FAK的过表达^[22]。Weiner *et al*^[23]认为, 85%侵袭性肿瘤中都存在有FAK的表达升高, 而伴有转移的肿瘤中100%的存在FAK的表达升高。本研究发现, 有淋巴结转移和Dukes分期C+D期大肠癌组织中FAK的表达显著高于无转移和Dukes A和B期大肠癌组织中FAK的表达。提示FAK在调节癌细胞侵袭和转移方面扮演有重要角色, FAK的过表达可能是各种不同肿瘤细胞侵袭与转移潜能的一个共同通路。

3.3 E-cadherin在大肠癌组织中表达的意义 E-cadherin是一种跨膜糖蛋白分子, 介导同种细胞间黏附, 参与建立和维持细胞间的连接。因此, E-cadherin的表达程度和活性状态可直接影响

细胞间的黏附性。有研究表明, 随肿瘤分期升高E-cadherin的表达呈下降趋势^[24], E-cadherin表达水平的降低与肿瘤细胞的浸润转移能力呈明显的相关性^[25-26]。本研究发现, E-cadherin的表达与肿瘤的分化程度、淋巴结转移、Dukes分期有密切关系。随着肿瘤恶性程度的增高, E-cadherin在大肠癌组织中的表达明显降低。提示, E-cadherin作为一种肿瘤侵袭抑制因子在肿瘤的发生、发展、侵袭、转移过程中起重要作用。对评价肿瘤的恶性程度、预测转移、判断预后具有重要参考价值。

3.4 Ezrin, FAK, E-cadherin之间相互作用 Ezrin主要参与上皮细胞细胞骨架与细胞膜之间的连接, 具有维持细胞形态、连接黏附分子及调节信号转导等功能。FAK分子氨基端含有同整合素 β 亚单位、细胞骨架蛋白和信号传导蛋白结合的位点, 并含有150个氨基酸的黏着斑定位序列, 能将黏着斑与FAK结合起来。Ezrin和FAK通过细胞骨架的连接作用参与细胞黏着斑的形成从而在影响细胞黏附过程中扮演重要角色。有研究表明, Ezrin通过活化RhoA和MAPK途径, 能够促进黏着斑的形成, 促进肿瘤细胞与其他细胞以及间质组织的黏附^[4]。活化的Ezrin蛋白C末端与细胞骨架的肌动蛋白相连, N末端则通过与细胞表面黏附分子E-cadherin、CD44等连接, 调节细胞间及细胞与细胞外基质之间的黏附, 从而影响肿瘤细胞侵袭性等生物学行为^[27-28]。Pujuguet *et al*^[29]研究发现, Ezrin可通过Rho蛋白调节E-cadherin在细胞膜上的表达, 从而参与调节细胞间的黏附。同时, Ezrin在E-cadherin的膜定位也具有重要作用, 具有活化Ezrin结构的细胞能够使细胞内的E-cadherin发生聚集, 从而破坏细胞间接触, 而Ezrin的过度表达同样导致细胞间黏附作用减弱^[30]。因此我们认为, Ezrin, FAK, E-cadherin间通过黏着斑和细胞骨架的连接参与细胞表面复合物的形成, 从而介导细胞间的黏附功能, 并参与肿瘤的侵袭和转移过程。本研究显示, Ezrin和FAK在大肠癌组织中的高度表达与E-cadherin在大肠癌组织中的低表达相互关联, 共同参与了大肠癌的侵袭和转移过程。对Ezrin, FAK, E-cadherin及他们与肿瘤相关性的深入研究将有助于我们进一步揭示肿瘤的浸润和转移机制, 找到抑制肿瘤转移的靶点或预测肿瘤患者预后的指标。

4 参考文献

- 1 Martin TA, Harrison G, Mansel RE, Jiang WG.

- The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003; 46: 165-186
- 2 Fais S. A role for ezrin in a neglected metastatic tumor function. *Trends Mol Med* 2004; 10: 249-250
 - 3 Parsons JT. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci* 2003; 116: 1409-1416
 - 4 Birukov KG, Leitinger N, Bochkov VN, Garcia JG. Signal transduction pathways activated in human pulmonary endothelial cells by OxPAPC, a bioactive component of oxidized lipoproteins. *Microvasc Res* 2004; 67: 18-28
 - 5 Thamilselvan V, Basson MD. Pressure activates colon cancer cell adhesion by inside-out focal adhesion complex and actin cytoskeletal signaling. *Gastroenterology* 2004; 126: 8-18
 - 6 Schlaepfer DD, Mitra SK. Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. *Curr Opin Genet Dev* 2004; 14: 92-101
 - 7 Hecker TP, Gladson CL. Focal adhesion kinase in cancer. *Front Biosci* 2003; 8: s705-s714
 - 8 张志发, 严群, 黄志勇. 黏附分子Cadherin与肝癌生物学特性的关系. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 697-701
 - 9 Mathew J, Hines JE, Obafunwa JO, Burr AW, Toole K, Burt AD. CD44 is expressed in hepatocellular carcinomas showing vascular invasion. *J Pathol* 1996; 179: 74-79
 - 10 Gonzalez MA, Pinder SE, Wencyk PM, Bell JA, Elston CW, Nicholson RI, Robertson JF, Blamey RW, Ellis IO. An immunohistochemical examination of the expression of E-cadherin, alpha- and beta/gamma-catenins, and alpha2- and beta1-integrins in invasive breast cancer. *J Pathol* 1999; 187: 523-529
 - 11 McClatchey AI. Merlin and ERM proteins: unappreciated roles in cancer development? *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 877-883
 - 12 Khanna C, Wan X, Bose S, Cassaday R, Olomu O, Mendoza A, Yeung C, Gorlick R, Hewitt SM, Helman LJ. The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis. *Nat Med* 2004; 10: 182-186
 - 13 Elliott BE, Meens JA, SenGupta SK, Louvard D, Arpin M. The membrane cytoskeletal crosslinker ezrin is required for metastasis of breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res* 2005; 7: R365-R373
 - 14 Ohtani K, Sakamoto H, Rutherford T, Chen Z, Satoh K, Naftolin F. Ezrin, a membrane-cytoskeletal linking protein, is involved in the process of invasion of endometrial cancer cells. *Cancer Lett* 1999; 147: 31-38
 - 15 Valdman A, Fang X, Pang ST, Nilsson B, Ekman P, Egevad L. Ezrin expression in prostate cancer and benign prostatic tissue. *Eur Urol* 2005; 48: 852-857
 - 16 Lamb RF, Ozanne BW, Roy C, McGarry L, Stipp C, Mangeat P, Jay DG. Essential functions of ezrin in maintenance of cell shape and lamellipodial extension in normal and transformed fibroblasts. *Curr Biol* 1997; 7: 682-688
 - 17 Khanna C, Wan X, Bose S, Cassaday R, Olomu O, Mendoza A, Yeung C, Gorlick R, Hewitt SM, Helman LJ. The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis. *Nat Med* 2004; 10: 182-186
 - 18 Yu Y, Khan J, Khanna C, Helman L, Meltzer PS, Merlino G. Expression profiling identifies the cytoskeletal organizer ezrin and the developmental homeoprotein Six-1 as key metastatic regulators. *Nat Med* 2004; 10: 175-181
 - 19 Roy P, Jacobson K. Overexpression of profilin reduces the migration of invasive breast cancer cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 2004; 57: 84-95
 - 20 刘启胜, 于红刚, 齐元玲, 曹俊, 罗和生, 于皆平. 磷酸化黏着斑激酶在结肠癌中表达及意义. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2490-2493
 - 21 杨红军, 丁彦青. FAK在大肠癌中的表达及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 663-665
 - 22 姬宏飞, 孟祥宁, 傅松滨. FAK与肿瘤关系的研究进展. *国外医学遗传学分册* 2005; 28: 350-353
 - 23 Weiner TM, Liu ET, Craven RJ, Cance WG. Expression of focal adhesion kinase gene and invasive cancer. *Lancet* 1993; 342: 1024-1025
 - 24 Piura B, Rabinovich A, Aizenberg N, Wolfson M. Cadherins in malignancies of the female genital tract. *Harefuah* 2005; 144: 261-265
 - 25 Bremnes RM, Veve R, Gabrielson E, Hirsch FR, Baron A, Bemis L, Gemmill RM, Drabkin HA, Franklin WA. High-throughput tissue microarray analysis used to evaluate biology and prognostic significance of the E-cadherin pathway in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2417-2428
 - 26 Wei Y, Van Nhieu JT, Prigent S, Srivatanakul P, Tiollais P, Buendia MA. Altered expression of E-cadherin in hepatocellular carcinoma: correlations with genetic alterations, beta-catenin expression, and clinical features. *Hepatology* 2002; 36: 692-701
 - 27 Hunter KW. Ezrin, a key component in tumor metastasis. *Trends Mol Med* 2004; 10: 201-204
 - 28 Curto M, McClatchey AI. Ezrin...a metastatic determinant? *Cancer Cell* 2004; 5: 113-114
 - 29 Pujuguet P, Del Maestro L, Gautreau A, Louvard D, Arpin M. Ezrin regulates E-cadherin-dependent adherens junction assembly through Rac1 activation. *Mol Biol Cell* 2003; 14: 2181-2191
 - 30 卢航青, 郑杰. 埃兹蛋白: 生物学特征及其在肿瘤转移中的作用. *细胞生物学杂志* 2005; 27: 257-262

■同行评价

本文对深入理解大肠癌病理生物学行为的分子机制有一定的参考价值, 科学性尚可, 具备一定的创新性和可读性。

电编 李琪 编辑 王晓瑜

血管内皮生长因子受体与肝细胞癌血管生成关系的研究进展

赵一鸣, 王鲁

■背景资料

肝癌作为典型的多血管肿瘤和血管生成的关系早已证实, 肿瘤血管生成机制的研究也取得了很大的进展, 这都为肿瘤的抗血管治疗提供了理论基础. 血管生长因子和抗血管生长因子是调控血管生长的主要力量, 很多肿瘤血管生成的研究都是针对他们进行的.

赵一鸣, 王鲁, 复旦大学附属中山医院肝外科 复旦大学肝癌研究所上海市 200032
国家自然科学基金资助项目, No. 30571800
高等学校全国优秀博士学位论文作者专项资金资助项目, No. 200263
上海市科技发展基金资助项目, No. 03QD14008
通讯作者: 王鲁, 200032, 上海市, 复旦大学附属中山医院肝外科, 复旦大学肝癌研究所. wlu@zshospital.net
电话: 021-64041990-3058
收稿日期: 2006-12-12 接受日期: 2007-01-11

Advancement of the relationship between vascular endothelial growth factor receptors and angiogenesis of hepatocellular carcinoma

Yi-Ming Zhao, Lu Wang

Yi-Ming Zhao, Lu Wang, Department of General Surgery, Zhongshan Hospital; Liver Cancer Institute, Fudan University, Shanghai 200032, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30571800, the Foundation for the Author of National Excellent Doctoral Dissertation of China, No. 200263, and the Science and Technology Development Foundation of Shanghai Municipality, No. 03QD14008
Correspondence to: Lu Wang, Department of General Surgery, Zhongshan Hospital; Liver Cancer Institute, Fudan University, Shanghai 200032, China. wlu@zshospital.net
Received: 2006-12-12 Accepted: 2007-01-11

Abstract

Angiogenesis is the basis of tumor growth and metastasis. Hepatocellular carcinoma is a kind of typical multivessel tumor, whose generation, progression and invasion are closely related with the angiogenesis. The angiogenesis is mainly regulated by angiogenins and anti-angiogenins, of which vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (VEGFR) are the most important. Different kinds of VEGFR have various functions *in vivo*, and VEGFR-1 (flt-1) and VEGFR-2 (flk-1) are involved in the angiogenesis HCC. Satisfactory effects have been obtained by the anti-angiogenic therapies targeting on VEGFR in laboratory studies, some of which have been launched in clinical experiments.

Key Words: Vascular endothelial growth factor; Receptor; Angiogenesis; Hepatocellular carcinoma

Zhao YM, Wang L. Advancement of the relationship between vascular endothelial growth factor receptors and angiogenesis of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(6):596-600

摘要

新生血管是肿瘤生长和转移的基础. 肝细胞肝癌是典型的多血管肿瘤, 其发生、发展、转移、侵袭都和血管生成密切相关. 血管的生成主要依靠血管生长因子和血管生长抑制因子的调控, 其中研究最多也是最重要的是血管内皮生长因子(VEGF)及其受体(VEGFR). VEGFR在机体内作用不同, 参与肝癌血管生长的主要是VEGFR-1(flt-1)和VEGFR-2(flk-1). 针对VEGFR的抗肿瘤血管治疗在实验室取得了不错的疗效, 部分已经进入了临床试验.

关键词: 血管内皮生长因子; 受体; 血管生成; 肝细胞肝癌

赵一鸣, 王鲁. 血管内皮生长因子受体与肝细胞癌血管生成关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2007;15(6):596-600
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/596.asp>

0 引言

原发性肝癌(肝细胞癌, 以下简称肝癌)目前是我国第二位癌症杀手^[1]. 根治性切除后, 肝癌的5 a转移复发率为54.1%-61.5%, 根据复发病例分析, 肝癌切除后2-3 a内的复发为原发灶播散, 较晚期的复发为多中心发生, 而2 a内的累积复发数占总复发数的62.4%-77.8%^[2]. 因此肝癌的转移成为限制肝癌生存率的最大障碍. El-Assal *et al*^[3]分析了71位肝癌患者根治性切除的肿瘤标本和癌周肝组织中微血管密度(MVD)和血管内皮细胞生长因子(VEGF)的表达, 小肝癌(≤2 cm)的微血管密度明显低于直径2-5 cm的肝癌, MVD和肝内复发和无瘤生存率有密切关系, 而且通

过多因素分析发现MVD是肝癌无瘤生存的独立预测指标. 因此可以认为肝癌的血管生成和转移复发有密切关系.

1960年代, Folkman^[4]提出“肿瘤生长是血管依赖性的”, 并通过实验证实了肿瘤的转移以致获得致死性和血管生成的密切关系. 之后关于血管生成的研究发现, 血管生成受血管生成刺激因子和血管生成抑制因子的调控, 其中研究最多也是最重要的VEGF. VEGF家族主要有VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PLGF六种亚型, VEGF-A和VEGF-B和血管生成有关. VEGF主要通过位于内皮细胞上的VEGF受体(VEGFR)发挥作用. 下面就VEGFR与肝癌血管生成的关系做一综述.

1 VEGFR概述

1.1 VEGFR的结构和分布 目前发现的VEGFR家族成员有5个, 主要包括VEGFR-1(flt-1), VEGFR-2(KDR/flk-1), VEGFR-3(flt-4), 这三种受体都属于酪氨酸激酶受体超家族(RTKs)^[5]. 另两种受体是神经纤维因子-1(neuropilin-1, NRP-1)和神经纤维因子-2(neuropilin-2, NRP-2), 具体作用还不清楚, 这两种受体不属于RTKs, 不具有7个免疫球蛋白样胞外区, 也不具有酪氨酸激酶胞内区, 因此不能成为单独的受体, 仅起到辅助的作用^[6]. 各种VEGF家族成员特异性地和上述受体结合发挥作用, VEGF-A主要与VEGFR-1和VEGFR-2结合, PIGF和VEGF-B与VEGFR-1结合, VEGF-C和VEGF-D与VEGFR-2和VEGFR-3结合, VEGF-E只与VEGFR-2结合. 两种非酪氨酸激酶受体NRP-1和NRP-2主要和VEGF-B, PIGF和VEGF-A的亚型VEGF165结合^[7].

1.2 VEGFR与肿瘤的关系 VEGFR-1和VEGF的亲合力最强, 是VEGFR-2的10倍. Kanno *et al*^[8]发现VEGFR-1阻断性抗体可以阻止人脐静脉内皮细胞的迁移而不阻止其分裂增殖, 同时发现VEGFR-1通过调节P38MAPK通路而调节肌动蛋白重组. 因此, VEGFR-1比较公认的作用是促进血管内皮细胞的迁移. 上述VEGFR-1基因缺陷的小鼠则显示血管发育的无序紊乱, 显示VEGFR-1在胚胎血管发育中的调节作用. 此外, VEGFR-1还可以通过诱导抗凋亡基因存活而发挥抗凋亡的作用^[9].

VEGFR-2在VEGF调节血管生成中起核心作用. Millauer *et al*^[10]用编码VEGFR-2显性阴性突变体的逆转录病毒转染恶性胶质瘤动物,

发现肿瘤的血管生成明显减少. Zhang *et al*^[11]用逆转录PCR测定胃癌细胞系中VEGF, flt-1, KDR(Flk-1)的表达, 用免疫组化测定石蜡包埋胃癌标本中VEGF, flt-1, KDR的表达, 发现胃癌细胞和组织中VEGF, flt-1, KDR均高表达, 而VEGF直接起作用的是KDR. 陈治 *et al*^[12]用免疫组化法测定各种大肠癌组织和癌周组织中的VEGF和KDR, 发现VEGF和KDR的染色程度和肿瘤区域及病理分型有关, 癌组织边缘区细胞的染色要强于中心区, 按病理分型恶性程度高者较恶性程度低者染色程度为强, 对比两张相邻片, VEGF阳性反映强度明显强于KDR. 此外, VEGFR-2在胚胎发育中与脉管系统和造血系统的发育有关^[13].

VEGFR-3在发育的不同阶段有不同的作用. 在胚胎生长期, VEGFR-3对心血管形成起重要作用, VEGFR-3缺陷的胚胎卵黄膜会出现异常血管网, 胚胎最终死于心血管功能衰竭^[14]. 在胚胎发育后期, VEGFR-3的分布逐步局限于淋巴管内皮细胞, 血管几乎不表达^[15]. Yonemura *et al*^[16]用RT-PCR和免疫组化方法研究了85例原发性胃癌的VEGF-C与VEGFR-3的相关性, 结果证实VEGF-C主要由癌细胞产生, VEGFR-3阳性淋巴管的数量在VEGF-C mRNA阳性的肿瘤中远远超过VEGF-C mRNA阴性的肿瘤. 在肿瘤间质中VEGFR-3阳性的淋巴管数量与胃癌淋巴侵袭程度有较大相关性, 提示VEGF-C可能通过激活VEGFR-3从而在原发性胃癌的间质中导致淋巴增生和淋巴管内皮细胞的表达.

2 VEGFR与肝癌血管生成的关系

目前的研究发现, 在肝癌中和VEGF结合发挥作用的主要是VEGFR-1(flt-1)和VEGFR-2(KDR/flk-1), 其中发挥主要作用的是VEGFR-2^[17]. VEGF/VEGFR系统的上调是肝硬化的必要条件. Yoshiji *et al*^[18]利用四氯化碳(CCl₄)诱导的肝硬化小鼠模型, 通过给予VEGFR-1和VEGFR-2的中和性抗体R-1 mAb和R-2 mAb, 观察两种受体在肝硬化中的作用, 发现经过两种抗体的治疗, 肝内的羟脯氨酸和血清中的肝硬化标志物(透明质酸和III型胶原)的含量都明显降低, 而且, α -肌动蛋白阳性的细胞数量也明显减少, 同时也发现, R-2 mAb的作用要明显强于R-1 mAb. 这说明, VEGFR-1和VEGFR-2的表达和肝癌的癌前病变肝硬化的形成有密切关系.

■ 研发前沿

血管内皮生长因子(VEGF)及其受体(VEGFR)是最重要的血管生长因子系统, 很多研究证明他们和各种肿瘤的生长和转移有直接关系. 实验室研究证实, 阻断VEGFR可以取得更好的抗血管疗效. 如何评价靶向抗血管治疗的效果是亟需解决的问题.

■应用要点

抗肿瘤血管治疗已经成为继手术、化疗、放疗后的第四种抗肿瘤治疗方法,由于其诸多优点,前景相当光明,对VEGFR的研究是抗血管研究的核心部分,受体的阻断比配体的阻断更有效,这符合药效学的观点,很多针对VEGFR的药物已经进入临床实验甚至进入市场。

VEGFR-2和肝癌的分化有关. Yamaguchi *et al*^[19]发现在肝癌组织中, flk-1和flt-1在巨噬细胞和肿瘤血管内皮细胞上均有表达, 而flk-1的表达较强. 在分化中等或分化较差的肝癌组织中, flk-1在内皮细胞管腔面的表达很强而且是连续性的.

VEGFR和肝癌的预后也有密切的关系. 梁军 *et al*^[20]用免疫组化法测定MVD和VEGFR的表达并分析其与肝癌预后的关系, 复发组的MVD, flt-1, flk-1的水平均高于未复发组($P < 0.05$, 0.003 , 0.031 , 0.026), flt-1和flk-1分别与肿瘤直径、分期、分化、癌栓、肿瘤数目、肿瘤薄膜完整情况有关($P < 0.05$). 对flt-1, flk-1与预后的关系进行单因素分析, 并绘制生存曲线, 结果提示各指标与无瘤生存率均相关($P < 0.05$). 因此, flt-1和flk-1可以作为估计无瘤生存的独立预后因素, 有利于选择术后预防性治疗的方式.

近期有学者通过分别给予小鼠肝癌模型VEGFR-1和VEGFR-2的中和性抗体(R-1 mAb和R-2 mAb), 以观察两种受体对肝癌血管生成的作用, 结果发现两种抗体对肝癌模型均有剂量依赖性的抑制血管生成作用, 主要表现在抗体治疗组的肿瘤体积, 血管标记物的表达量均小于对照组, 凋亡细胞数则明显多于对照组, 而且单纯给予R-1 mAb组的抗血管效应小于R-2 mAb组, 同时给予两种抗体组的肿瘤血管生成几乎完全被抑制^[21].

以上试验证实了VEGFR和肝癌的关系, 同时为VEGFR成为肝癌治疗靶点提供了理论依据.

3 以VEGFR为靶点的抗肿瘤血管生成治疗

目前以VEGFR为靶点的抗血管治疗主要集中在以下几个方面.

3.1 反义寡核苷酸 在基因水平用反义寡核苷酸抑制VEGFR基因的表达, 通过降低VEGFR的表达水平, 从而抑制肿瘤的血管生成. Buchler *et al*^[22]应用反义VEGFR基因治疗胰腺癌发现反义VEGFR-2基因可以明显抑制VEGF诱导的肿瘤细胞的过度增长.

3.2 核酶和核酶抑制剂 龚邦东 *et al*^[23]检测了抗VEGF锤头核酶对VEGF基因外显子的作用, 将其导入HLF细胞系后, 发现这种核酶不仅降低了VEGF mRNA的水平, 而且降低VEGF分子的水平, 因而认为他能选择性地抑制肝癌中VEGF的表达, 为其作为靶点治疗肿瘤提供了新思路.

3.3 单克隆抗体(mAb) 对于已表达的VEGFR可以利用抗VEGFR mAb与其结合, 阻断信号传导通路, 达到抑血管生成的目的. 目前针对VEGFR-1研究较多的是其mAb DC101, Kunkel *et al*^[24]应用DC101治疗鼠胶质细胞瘤模型时发现DC101可以明显减低肿瘤内的微血管密度, 抑制瘤体的生长, 进一步研究还发现DC101可以抑制肿瘤细胞的增生, 促进肿瘤细胞的凋亡.

3.4 VEGFR可溶性抗体(sVEGFR) 可溶性的VEGFR(sVEGFR)是通过剪切VEGFR的胞外区或改变胞外区结构而形成, 只具备和VEGF结合的能力, 不能诱发信号传导. Lin *et al*^[25]将鼠VEGFR-2整段胞外功能区与6个组氨酸羧基端融合, 构建了可溶性VEGFR(EXFIK-His), 在体外与VEGF具有高亲和力, 可阻断受体活性, 抑制VEGF诱导的内皮细胞增殖和迁移, 强烈抑制鼠乳腺癌细胞(R3230Ac)培养物诱导的角膜新生血管形成, 与对照组相比, 肿瘤生长抑制率达75%, 血管密度减少了50%. Geng *et al*^[26]构建了可溶性flk-1(sflk-1), 可明显增加某些对放疗不敏感的多形性胶质细胞瘤、黑色素瘤的放疗敏感性, 该发现可能为放疗和抗血管生成联合治疗放射抗拒性肿瘤提供新的理论和方法.

3.5 VEGFR突变体 flk-1突变体是该突变型受体缺乏细胞内结构功能域, 因而引起细胞功能障碍. 内皮细胞经该突变型受体转染后即在突变型受体和内皮细胞自身flk-1受体间出现异二聚体. 此异二聚体不能引起信号传递和内皮细胞激活, 因而破坏了血管生成的级联反应, 使得新生血管无法生成. 李晓明 *et al*^[27]在荷肝癌细胞系LCI-D20肿瘤裸鼠, 皮下接种LCI-D20的裸鼠经过三次flk-1突变体注射后, 肿瘤生长缓慢, 且肿瘤呈乳白色, 表面光滑, 与周围组织无黏连, 肺转移发生率为20%, 较对照组低, 且转移灶数目减少.

3.6 小分子酪氨酸激酶抑制剂 VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3实质上都是酪氨酸激酶亚家族的成员, 因此用特异性的酪氨酸激酶抑制剂(RTKS)亦可以达到抑制VEGFR活性的目的, 从而抑制新生血管的形成及肿瘤的转移.

SU5416是第一个进入临床的亲脂性酪氨酸激酶抑制剂, 主要针对VEGFR-1和VEGFR-2. 通过与激酶区的ATP结合位点结合选择性的抑制VEGF激活的受体磷酸化作用及人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的有丝分裂和组织因子分泌, 抑制信号传导, 从而达到抑制血管生成的目的.

Wang *et al*^[28]发现, SU5416可以抑制肝癌细胞系HepG2的生长和侵袭性, 同时也能抑制肝细胞生长因子诱导的肝细胞生长. 这也说明SU5416也可能有抑制肝细胞生长因子受体的抑制剂. 但是由于其需长期静脉推注所缺点, II期III期临床试验中出现的阴性作用以及其严重的毒性, 现在已经停止了进一步的临床试验^[29].

PTK787是另一种小分子酪氨酸激酶抑制剂, 他能抑制所有VEGF酪氨酸激酶受体的作用, 同时还能影响其他血管生长因子受体的作用, 例如: PDGFR- β 和c-kit酪氨酸激酶. Liu *et al*^[30]利用裸鼠肝癌模型观察PTK787对肝癌的作用, 相对于对照组, PTK787可以明显减小肿瘤体积和微血管的生成, 同时也观察PTK787还能直接抑制肝癌细胞的增殖, 增加肿瘤细胞的凋亡, 所以认为PTK787对肝癌可能有依赖和非依赖血管生成两种作用. PTK787已经进入III期临床试验.

SU6668主要通过抑制VEGFR-2介导的信号传导通路达到阻断血管生长的目的, 另外亦可直接作用于肿瘤细胞周围的基质细胞, 诱导内皮细胞和肿瘤细胞的凋亡, 从而抑制肿瘤的生长, 或通过抑制其信号传导抑制血管生成. Yorozuya *et al*^[31]利用小鼠结肠癌模型及其肝转移模型研究SU6668对肿瘤生长和转移的作用, 治疗组肿瘤组织的血管密度和肿瘤体积均小于对照组, 在肝转移模型中, 治疗组的肝脏重量明显小于对照组的肝脏, 因此认为SU6668明显抑制结肠癌生长和肝脏转移.

SU11248是在SU5416和SU6668研制的基础上人工合成的一种RTKS, 它具有直接抗肿瘤增殖和抗肿瘤生成双重作用. 主要抑制VEGFRs, PDGFR- β 和C-Kit. 荷瘤裸鼠试验证实该药可以明显抑制多种移植瘤的生长, 其镜下表现为肿瘤血管密度及渗透性明显降低, 肿瘤细胞和内皮细胞凋亡显著增加^[32]. SU11248已经进入III期临床试验.

ZD6474主要作用于KDR, 对flt-1也有微弱的作用, 此外对EGFR和RET也有抑制作用. ZD6474通过两条途径抑制肿瘤生长: VEGFR依赖的肿瘤血管生成和EGFR依赖的肿瘤细胞增殖和生存. Giannelli *et al*^[33]发现ZD6474可以抑制肝癌的血管生成和肿瘤细胞的增殖和侵袭. ZD6474已经进入II期临床试验.

总之, 大量实验证明VEGFR和肿瘤(包括肝癌)的生长、转移、侵袭有密切关系. 细胞和动物实验都证实了各种抑制VEGFR产生和效应的

方法都可以有效地抑制肿瘤的血管生成, 从而抑制肿瘤的生长和转移. 市场上也出现很多针对VEGFR的药物, 很多已经进入III期临床, 但是关于应用于肝癌的抗VEGFR药物的报道不多. 可以肯定这类抗肿瘤药物相对于传统化疗药物有很多优点(如: 很少产生耐药性; 因为正常组织中的新生血管很少, 所以不会出现因为血管生成减少而产生的副作用; 一根血管供应的肿瘤细胞成千上万, 所以抗肿瘤血管治疗有很好的放大作用), 针对血管生成的抗肿瘤治疗有很好的临床应用价值.

4 参考文献

- 1 张思维, 李连弟, 鲁凤珠, 牧人, 孙秀娣, 皇甫小梅, 孙杰, 周有尚, 戴旭东. 中国1990-1992年原发性肝癌死亡调查分析. 中华肿瘤杂志 1999; 21: 245-249
- 2 Zhou XD, Tang ZY, Yu YQ, Yang BH, Lu JZ, Lin ZY, Ma ZC, Zhang BH. Recurrence after resection of alpha-fetoprotein-positive hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1994; 120: 369-373
- 3 El-Assal ON, Yamanoi A, Soda Y, Yamaguchi M, Igarashi M, Yamamoto A, Nabika T, Nagasue N. Clinical significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of cirrhotic liver. *Hepatology* 1998; 27: 1554-1562
- 4 Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 4-6
- 5 陈治, 杜钰. 血管内皮细胞特异性受体在肿瘤血管靶向治疗中的应用. 世界华人消化杂志 2001; 9: 702-705
- 6 Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998; 92: 735-745
- 7 Karkkainen MJ, Petrova TV. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene* 2000; 19: 5598-5605
- 8 Kanno S, Oda N, Abe M, Terai Y, Ito M, Shitara K, Tabayashi K, Shibuya M, Sato Y. Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. *Oncogene* 2000; 19: 2138-2146
- 9 Adini A, Kornaga T, Firoozbakht F, Benjamin LE. Placental growth factor is a survival factor for tumor endothelial cells and macrophages. *Cancer Res* 2002; 62: 2749-2752
- 10 Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature* 1994; 367: 576-579
- 11 Zhang H, Wu J, Meng L, Shou CC. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1 in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 994-998
- 12 陈治, 王晓莉, 张莉, 黄宗海, 潘玉先, 曹长安. 血管内

■名词解释

1 微血管密度: 单位体积组织中微血管的数量, 他反映了组织中血供的多少, 是研究肿瘤血管生成的一个重要指标.

2 核酶: 核酶是一种具有酶活性的RNA分子, 可以序列特异性的切割靶RNA分子, 兼有结合mRNA的作用, 可以利用核酶减少特定RNA的表达.

■同行评价

本文分析了血管内皮生长因子受体(VEGFR)的结构和分布、与普通肿瘤的关系、与肝癌血管生成的关系,并对目前几种以VEGFR为靶点的抗肿瘤血管生成方法进行综述。内容重要,提供了许多有用的信息,有一定的新颖性。

- 皮生长因子及其受体在大肠癌组织中的分布、定量和意义. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 472-473
- 13 Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct* 2001; 26: 25-35
 - 14 Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, Breitman M, Alitalo K. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* 1998; 282: 946-949
 - 15 Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, Kaipainen A, Jeltsch M, Joukov V, Alitalo K. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* 1996; 122: 3829-3837
 - 16 Yonemura Y, Fushida S, Bando E, Kinoshita K, Miwa K, Endo Y, Sugiyama K, Partanen T, Yamamoto H, Sasaki T. Lymphangiogenesis and the vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-3 in gastric cancer. *Eur J Cancer* 2001; 37: 918-923
 - 17 Yoshiji H, Kuriyama S, Hicklin DJ, Huber J, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Fukui H. The vascular endothelial growth factor receptor KDR/Flk-1 is a major regulator of malignant ascites formation in the mouse hepatocellular carcinoma model. *Hepatology* 2001; 33: 841-847
 - 18 Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Hicklin DJ, Wu Y, Yanase K, Namisaki T, Yamazaki M, Tsujinoue H, Imazu H, Masaki T, Fukui H. Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis. *Gut* 2003; 52: 1347-1354
 - 19 Yamaguchi R, Yano H, Nakashima Y, Ogasawara S, Higaki K, Akiba J, Hicklin DJ, Kojiro M. Expression and localization of vascular endothelial growth factor receptors in human hepatocellular carcinoma and non-HCC tissues. *Oncol Rep* 2000; 7: 725-729
 - 20 梁军, 于丽, 沈方臻. 肝癌中血管生成VEGF及其受体水平与预后的关系. *中国肿瘤临床* 2004; 31: 197-200
 - 21 Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Yanase K, Namisaki T, Kitade M, Yamazaki M, Tsujinoue H, Masaki T, Fukui H. Involvement of the vascular endothelial growth factor receptor-1 in murine hepatocellular carcinoma development. *J Hepatol* 2004; 41: 97-103
 - 22 Buchler P, Reber HA, Buchler MW, Friess H, Hines OJ. VEGF-R11 influences the prognosis of pancreatic cancer. *Ann Surg* 2002; 236: 738-749; discussion 749
 - 23 龚邦东, 罗文, 杜芳腾, 叶如美, 刘晶美, 余春根, 邹叶青, 张吉翔. 反义寡核苷酸抑制肝癌血管内皮生长因子表达. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 35-37
 - 24 Kunkel P, Ulbricht U, Bohlen P, Brockmann MA, Fillbrandt R, Stavrou D, Westphal M, Lamszus K. Inhibition of glioma angiogenesis and growth *in vivo* by systemic treatment with a monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor receptor-2. *Cancer Res* 2001; 61: 6624-6628
 - 25 Lin P, Sankar S, Shan S, Dewhirst MW, Polverini PJ, Quinn TQ, Peters KG. Inhibition of tumor growth by targeting tumor endothelium using a soluble vascular endothelial growth factor receptor. *Cell Growth Differ* 1998; 9: 49-58
 - 26 Geng L, Donnelly E, McMahon G, Lin PC, Sierra-Rivera E, Oshinka H, Hallahan DE. Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor signaling leads to reversal of tumor resistance to radiotherapy. *Cancer Res* 2001; 61: 2413-2419
 - 27 李晓明, 汤钊猷, 陈方国. 突变型flk-1基因转染抑制肝癌在裸鼠体内血管生成、生长、转移. *中国肿瘤生物治疗杂志* 1998; 5: 160-162
 - 28 Wang SY, Chen B, Zhan YQ, Xu WX, Li CY, Yang RF, Zheng H, Yue PB, Larsen SH, Sun HB, Yang X. SU5416 is a potent inhibitor of hepatocyte growth factor receptor (c-Met) and blocks HGF-induced invasiveness of human HepG2 hepatoma cells. *J Hepatol* 2004; 41: 267-273
 - 29 Morabito A, De Maio E, Di Maio M, Normanno N, Perrone F. Tyrosine kinase inhibitors of vascular endothelial growth factor receptors in clinical trials: current status and future directions. *Oncologist* 2006; 11: 753-764
 - 30 Liu Y, Poon RT, Li Q, Kok TW, Lau C, Fan ST. Both antiangiogenesis- and angiogenesis-independent effects are responsible for hepatocellular carcinoma growth arrest by tyrosine kinase inhibitor PTK787/ZK222584. *Cancer Res* 2005; 65: 3691-3699
 - 31 Yorozuya K, Kubota T, Watanabe M, Hasegawa H, Ozawa S, Kitajima M, Chikahisa LM, Yamada Y. TSU-68 (SU6668) inhibits local tumor growth and liver metastasis of human colon cancer xenografts via anti-angiogenesis. *Oncol Rep* 2005; 14: 677-682
 - 32 Mendel DB, Laird AD, Xin X, Louie SG, Christensen JG, Li G, Schreck RE, Abrams TJ, Ngai TJ, Lee LB, Murray LJ, Carver J, Chan E, Moss KG, Haznedar JO, Sukbuntherng J, Blake RA, Sun L, Tang C, Miller T, Shirazian S, McMahon G, Cherrington JM. *In vivo* antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 327-337
 - 33 Giannelli G, Azzariti A, Sgarra C, Porcelli L, Antonaci S, Paradiso A. ZD6474 inhibits proliferation and invasion of human hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 2006; 71: 479-485

电编 李琪 编辑 张焕兰

原发性肝癌破裂出血的治疗现状

尹大龙, 曲志博, 刘连新, 姜洪池

尹大龙, 曲志博, 刘连新, 姜洪池, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科 黑龙江省哈尔滨市 150001
通讯作者: 刘连新, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科六病房. liulianxin@medmail.com.cn
电话: 0451-53658828
收稿日期: 2006-11-15 接受日期: 2007-01-04

Current status on treatment for spontaneous rupture of primary hepatocellular carcinoma

Da-Long Yin, Zhi-Bo Qu, Lian-Xin Liu, Hong-Chi Jiang

Da-Long Yin, Zhi-Bo Qu, Lian-Xin Liu, Hong-Chi Jiang, Department of General Surgery, the First Clinical College of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China
Correspondence to: Lian-Xin Liu, The Sixth Department of General Surgery, the First Clinical College of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. liulianxin@medmail.com.cn
Received: 2006-11-15 Accepted: 2007-01-04

Abstract

The rupture of tumor with intraperitoneal hemorrhage is one of the life-threatening complications of primary hepatocellular carcinoma (HCC). It is relatively intractable to deal with this syndrome which occurs urgently with high mortality rate and risk of rebleeding during the process of clinical management. Before the 1980s, the treatment of hepatocellular carcinoma rupture is mainly focused on the field of the conservative therapy and surgical methods. As the interventional therapy develops, transarterial embolization (TAE) has become an effective way in controlling bleeding from ruptured hepatocellular carcinoma in acute phase. In recent years, some overseas scholars have successfully cured ruptured hepatocellular carcinoma through radiofrequency ablation (RFA) and bioimmunotherapy. In this paper, we summarized the treatments for the spontaneous rupture of primary hepatocellular carcinoma.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Rupture; Hemorrhage; Treatment

Yin DL, Qu ZB, Liu LX, Jiang HC. Current status on treatment for spontaneous rupture of primary hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(6):601-605

摘要

肝癌破裂出血是原发性肝癌严重的并发症之一,其发病急,病死率及再出血率高,临床治疗较为棘手.1980年以前对肝癌破裂出血的治疗主要集中在保守方法和手术治疗.随着介入技术的发展,肝动脉栓塞术(TAE)成为急性期止血的有效方法.近年有国外学者通过射频消融及生物免疫疗法等技术成功的治疗了肝癌破裂出血.本文即对原发性肝癌自发性破裂出血的治疗作一综述.

关键词: 肝癌; 破裂; 出血; 治疗

尹大龙, 曲志博, 刘连新, 姜洪池. 原发性肝癌破裂出血的治疗现状. *世界华人消化杂志* 2007;15(6):601-605
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/601.asp>

0 引言

原发性肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一,而肝癌破裂出血是原发性肝癌严重的并发症,其发生率约为3%-15%^[1].由于其发病急,病死率高,占肝癌死亡原因的9%-10%^[2];且其再出血率达43%^[3],而且患者出血后可导致肿瘤腹腔广泛转移^[4-7],预后差,因此原发性肝癌破裂出血的治疗仍是目前临床工作中较为棘手的难题.以往对肝癌破裂出血的治疗主要集中在保守方法和手术治疗,随着介入技术的发展,肝动脉栓塞术(transcatheter arterial embolization, TAE)已成为治疗肝癌破裂出血的有效方法之一.近年来,国外有学者通过射频消融及生物免疫疗法等技术成功的治疗了肝癌破裂出血.我们对原发性肝癌自发性破裂出血的治疗作一综述,以期对临床工作有一定的借鉴作用.

1 原发性肝癌破裂出血的病因及诊断

原发性肝癌自发性破裂出血可发生于肿瘤早期,

■背景资料

原发性肝癌破裂出血是肝癌十分严重的并发症,其再出血率及死亡率高,预后较差.目前关于原发性肝癌破裂出血的治疗存在争议,治疗方法也很多,但远期效果都不理想,寻找能确切止血且提高远期存活率的方法具有十分重要的意义.目前国内和国外治疗原发性肝癌破裂出血大多倾向于急诊行肝部分切除术或急诊介入栓塞止血治疗.

■相关报道

关于原发性肝癌破裂出血的报道较多,但其确切发生机制并不十分明确,朱立新 *et al* 关于血管功能障碍在原发性肝癌破裂出血中作用的研究具有十分独特的见解,可以为更明确阐述其发病机制提供一些依据。

也可发生于晚期^[8]。多见于结节型和块状型,弥漫型肝癌少见^[9]。其机制可能与以下多种因素有关^[10-13]: (1)肝癌在生长过程中由于膨胀生长,瘤内压力高,压迫回流静脉,使瘤内瘀血;(2)肿瘤生长迅速,瘤体内供血不足,出现缺血缺氧或坏死;(3)肿瘤直接侵蚀血管出血;(4)肿瘤破溃或液化后合并感染;(5)肿瘤位置表浅,包膜脆而薄弱;(6)肝功能不良凝血因子缺乏导致凝血障碍;(7)弹性蛋白及胶原质表达异常导致血管功能障碍;(8)与肝硬化及门脉高压有一定的关系。对于有肝炎或肝硬化病史患者,在受轻微的外伤或存在咳嗽、呕吐、用力排便等腹内压增高因素后,出现上腹疼痛或头晕、心悸、乏力及不同程度失血性休克症状,或以腹腔积血为首发症状^[14-16],少数患者可表现血胸^[17-19]; 查体有贫血貌,黄疸、肝掌或蜘蛛痣,肝肿大,上腹部有压痛;腹腔穿刺有不凝血液,结合超声、CT或血管造影检查^[20-21]诊断多无困难。

2 原发性肝癌破裂出血的治疗

原发性肝癌破裂出血治疗的关键是选择最适宜的方法,快速有效的止血,然后在状况允许的情况下对肝癌行进一步治疗。

2.1 保守治疗 保守疗法要求患者绝对卧床休息,补液输血扩容,应用各种止血药物如:止血敏、立止血、维生素K等,同时可应用生长抑素,并给予抗感染,保肝,加强营养支持等措施。但保守疗法再出血率及死亡率高。故保守疗法仅适用于^[3,22]: (1)肝癌破裂小,出血少或已自行停止,一般状况良好,生命体征较平稳者;(2)肝功能失代偿,Child分级为C级,不能耐受手术及介入治疗;(3)肝癌晚期已有全身广泛转移。

2.2 手术治疗 手术治疗是肝癌破裂出血的另一种有效疗法^[23-29]。手术治疗主要包括: (1)急诊肝部分切除术;(2)肝动脉结扎术;(3)单纯填塞缝扎止血术;(4)急诊肝移植术。

2.2.1 急诊肝部分切除术 急诊肝部分切除术是通过经腹切除破裂出血的肿瘤,根据情况行肝段、肝叶或半肝切除以达到止血和治疗原发病目的的一种手术疗法。Yeh *et al*^[30]认为,肝切除是控制出血和治疗原发病最有效的方法。此法在有效彻底止血的同时,可以切除原发病灶,部分患者还可以达到根治的目的,可获得较好的远期效果^[31-35]。术后应用蒸馏水、化疗药物等液体灌洗腹腔对改善预后有很大帮助^[36-37]。Liu *et al*^[38]报道,一期肝切除1, 3, 5 a生存率分别为

88%, 54%, 51%。Vergara *et al*^[1]认为,急诊行根治切除与择期手术疗效相当。但由于肝癌破裂出血的患者一般病情较重,肝功能较差,加上手术和麻醉的打击,急诊手术死亡率达40%^[3]。因此行急诊肝部分切除术应具备以下条件^[39-43]: (1)出血前患者一般状况尚可,肝功能为Child A-B级,无肝性脑病、大量腹水和其他脏器功能障碍;(2)肝癌破裂出血不多,或入院后休克症状很快得到纠正;(3)术中所见肝硬化较轻或不明显;(4)术前影像学检查或术中未发现转移性病灶;(5)肿瘤局限于肝脏一叶,行肝部分切除无困难且切除后肝功能可有效代偿。

2.2.2 肝动脉结扎术 肝动脉结扎术是经腹结扎肝动脉或肝固有动脉而达到止血目的的一种手术方法。由于肝癌血液供应90%-95%来自肝动脉,因此行肝动脉结扎在达到止血目的的同时,可以使肿瘤缺血生长受到抑制、退化、缩小,起到姑息治疗的作用,部分患者为二期肝切除创造了手术时机。但由于此法同时也阻断了正常肝脏部分血液供应,可能造成患者肝功能进一步恶化,因肝功能衰竭而死亡^[44],因此目前此法已逐渐被TAE所取代。肝动脉分支结扎对患者肝功能的影响较小,效果优于肝固有动脉结扎。故行肝动脉结扎术适用于^[27,45]: (1)术前估计有手术切除可能,而术中无法切除;(2)估计肝切除术后肝功能代偿不全,且无门静脉癌栓;(3)肝硬化较轻且肝功能损害不重。

2.2.3 单纯缝扎填塞止血术 单纯缝扎填塞止血术一般采用血管缝合线或粗大的肝针线缝合,由于肝癌患者多数合并肝硬化,肝组织质地较脆,故在缝扎时可加用大网膜或其他可吸收止血材料如明胶海绵、速即纱等可加强止血效果。在病情允许情况下,与肝动脉结扎同时使用,可加强止血效果并达到抑制肿瘤生长的目的。此法操作简单,止血效果较好,并可为二期手术或肝动脉栓塞创造时机。但此法再出血率及死亡率高,远期效果差。仅适用于术中发现肿瘤无法切除或无法有效止血时所采用的一种姑息疗法。对于无法缝扎止血的患者也可采用纱布填塞止血,但此方法有合并感染及取出纱布再出血的危险,故一般仅在迫不得已的情况下采用。

2.2.4 急诊肝移植术 急诊肝移植术在临床工作中较为少用。对于肝癌破裂出血本身而言,

肝移植不仅能有效止血,而且切除原发病灶及硬化的肝脏。但由于肝癌破裂出血患者多数一般状况较差,肝功能不良,加上手术和麻醉

的打击风险极大, 且存在无合适供体及术后肝癌复发等问题, 故急诊肝移植应审慎而行。

2.3 介入治疗(TAE) TAE法是采用Seldinger技术穿刺股动脉, 将5F肝管或Yashiro导管置入肠系膜上动脉或腹腔动脉造影, 并间接行门静脉造影, 再将导管插至肝总或肝固有动脉进行造影. 明确肿瘤血供及出血情况后, 在肝左、右动脉或使用超微导管超选择插至肿瘤供应血管, 注入碘化油或明胶海绵行肿瘤供血动脉及出血动脉栓塞, 也可将化疗药物如氟尿嘧啶同时注入血管行经动脉肿瘤化疗. 用栓塞法阻断肝动脉既可阻断出血动脉又可阻断肿瘤大部分血液供应, 达到抑制肿瘤生长的目的. 另外TAE还具有显著的优越性^[46-49]: (1)通过血管造影有利于发现可能存在的寄生性或迷走血管; (2)栓塞能有效防止侧支血管的形成及再通后出血; (3)超选择性栓塞最大程度保证正常肝组织血供, 减少急性肝功能衰竭的发生; (4)手术创伤小, 副作用少, 对患者的打击小; (5)可同时应用化疗药物(TACE)在止血的同时达到治疗原发病的目的. 但有文献报道TACE可引起截瘫和急性肾功衰竭等并发症, 且有导致肿瘤再次破裂出血的危险^[50-51]. 易小敏 *et al*^[52]报道应用生长抑素可减少栓塞术后的不良反应. Nakao *et al*^[53]认为TAE对尾状叶肝癌破裂出血疗效较差. 王海波 *et al*^[54]报道对12例肝癌破裂出血同时行TAE和化疗有效率为83.3%, 院内死亡率为14.3%. 综合多篇文献报道^[55-61]TAE法是目前原发性肝癌破裂出血急性期最有效的止血方法。

2.4 其他疗法

2.4.1 瘤内无水酒精注射 此法通过瘤内注射无水酒精使局部组织变硬、固定, 导致血栓形成, 达到止血目的, 同时使肿瘤组织坏死而治疗原发灶. 有许多学者通过此法成功的治疗了肝癌破裂出血^[33,45].

2.4.2 生物免疫疗法 近年来, 有日本学者指出OK-432作为链球菌提取物不仅可以增强细胞介导的免疫活性, 还可以直接对恶性肿瘤细胞产生毒性, 起到杀伤肿瘤细胞的作用. Shiratori *et al*^[62]应用OK-432(10KE)分次腹腔内注射成功治疗肝癌破裂出血的同时对肝癌起到了治疗作用。

2.4.3 刮吸法 刮吸法是在术中探查发现肿瘤破裂出血部位之后, 通过多功能手术剥离器(MOD)刮切肿瘤表面, 边刮切边吸收边电灼止血, 将瘤组织刮吸干净之后, 再深入正常肝组织1-2 cm, 刮吸后电灼止血或缝扎血管. 此法简便

易行, 可直接刮除癌肿, 不必做肝动脉结扎. 国内学者王大强 *et al*认为此法适应症较宽, 对患者打击小, 止血彻底安全可靠, 同时起到根治肿瘤的作用。

2.4.4 射频消融法 射频消融法(radiofrequency ablation, RFA)是在超声检查明确肿瘤位置后, 在超声引导下将射频电极插入肿瘤内, 确定位置满意后, 释放出小电极, 然后利用射频波进行治疗. 利用射频热效应使肿瘤组织凝固坏死, 在止血的同时治疗原发肿瘤. Ng *et al*^[63]认为射频消融法是治疗肝癌破裂出血的有效抢救措施^[64-65].

总之, 原发性肝癌自发性破裂出血是临床上危及生命的急腹症, 一旦发生往往很难控制, 预后极差, 如抢救不及时死亡率可达100%. 治疗关键是先及时彻底止血, 同时为进一步治疗原发病提供可能, 以提高患者的生存率. 1980年以前国内外学者在内科保守治疗无效的情况下多采用手术治疗, 但由于这些手术方法无法发现寄生及变异血管, 术后容易形成侧支循环而发生再出血. 介入技术的发展弥补了外科手术止血的一些不足之处, 成为目前临床上治疗肝癌破裂出血的有效方法. 虽然目前这些方法都具有一定的疗效, 但患者的死亡率仍然很高, 远期的效果并不十分理想. 梁浩辉认为治疗应遵循“个体化原则”^[66], 根据患者具体情况如肿瘤的部位, 失血多少及速度, 肝功能损害的程度及余肝的储备能力, 患者的全身状况选择简单、可靠、有效、创伤小的最合适的治疗方法. Buczkowski *et al*^[67]认为应多科室协同治疗, 在积极抗休克和内科治疗的同时, 采用TAE快速止血后行一期或二期肝部分切除是治疗肝癌破裂出血最有效的方法, 其疗效优于单纯一种方法治疗, 止血确切, 远期效果较好^[44,68]. 综合治疗有望成为治疗肝癌破裂出血首选治疗措施. 另外, 随着微创外科的发展, 腹腔镜技术可能在肝癌破裂出血行TAE或射频消融及后续治疗中发挥更大的作用^[69-70].

3 参考文献

- Vergara V, Muratore A, Bouzari H, Polastri R, Ferrero A, Galatola G, Capussotti L. Spontaneous rupture of hepatocellular carcinoma: surgical resection and long-term survival. *Eur J Surg Oncol* 2000; 26: 770-772
- 王颖勃, 徐忠立. 原发性肝癌自发性破裂出血. *肝胆外科杂志* 2002; 10: 36-38
- Tanaka A, Takeda R, Mukaiharu S, Hayakawa K, Shibata T, Itoh K, Nishida N, Nakao K, Fukuda Y, Chiba T, Yamaoka Y. Treatment of ruptured

■创新盘点

本文全面介绍了目前治疗原发性肝癌破裂出血各种方法的优缺点及其适应症, 并对一些少用的方法给予了介绍, 尤其是应用OK-432治疗肝癌出血在国内报道十分罕见, 可以使读者对此有初步了解。

■应用要点

本文通过对各种方法进行对比和总结后认为综合治疗的远期疗效优于单一方法治疗,急诊行TAE介入止血后行一期或二期手术治疗可以提高患者生存率,改善预后,综合疗法有望在今后临床工作中提高原发性肝癌破裂出血的远期疗效。

- hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Oncol* 2001; 6: 291-295
- 4 Lin CC, Chen CH, Tsang YM, Jan IS, Sheu JC. Diffuse intraperitoneal metastasis after spontaneous rupture of hepatocellular carcinoma. *J Formos Med Assoc* 2006; 105: 577-582
- 5 Yeh CN, Chen HM, Chen MF, Chao TC. Peritoneal implanted hepatocellular carcinoma with rupture after TACE presented as acute appendicitis. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 938-940
- 6 Kaido T, Arii S, Shiota M, Imamura M. Repeated resection for extrahepatic recurrences after hepatectomy for ruptured hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2004; 11: 149-152
- 7 Terada T, Takeuchi T, Hirano R, Nagata S, Kubota H, Honda S. Spontaneous rupture of peripancreatic lymph node with hepatocellular carcinoma metastasis: report of an autopsy case with massive peritoneal bleeding. *Hepatol Res* 2003; 26: 73-76
- 8 蔡昌豪, 吴本俨, 吴道宏, 王孟薇. 老年肝癌破裂腹腔内出血8例临床分析. *中华肝胆外科杂志* 2004; 10: 418-419
- 9 熊肇明, 蒋逊, 贺健, 张逊, 叶世会. 原发性肝癌自发破裂的诊治16例. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1040-1041
- 10 汪建成, 胡道予, 姚洪亮, 陈代明, 陈建中, 邹晓媚. 原发性肝癌自发性破裂出血介入动脉栓塞治疗. *中国癌症杂志* 2005; 15: 285-287
- 11 Zhu LX, Liu Y, Fan ST. Ultrastructural study of the vascular endothelium of patients with spontaneous rupture of hepatocellular carcinoma. *Asian J Surg* 2002; 25: 157-162
- 12 Nakai M, Sato M, Tanihata H, Sonomura T, Sahara S, Kawai N, Kimura M, Terada M. Ruptured high flow gastric varices with an intratumoral arterioportal shunt treated with balloon-occluded retrograde transvenous obliteration during temporary balloon occlusion of a hepatic artery. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5404-5407
- 13 Zhu LX, Meng XL, Fan ST. Elasticity of small artery in patient with spontaneous rupture of hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2004; 29: 13-17
- 14 Singh RK, Kumar S, Sinha SK, Mishra T, Pachisia SS. Hemoperitoneum as a first manifestation of HCC with bleeding from ruptured aberrant vessel: a case report. *Trop Gastroenterol* 2006; 27: 48-49
- 15 Jayet PY, Frochaux V, Qanadli S, Lamy O. Spontaneous hemoperitoneum: diagnosis, prognosis and possible therapeutics. *Schweiz Rundsch Med Prax* 2006; 95: 1091-1094
- 16 Tung CF, Chang CS, Chow WK, Peng YC, Hwang JI, Wen MC. Hemoperitoneum secondary to spontaneous rupture of metastatic epidermoid carcinoma of liver: case report and review of the literature. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 1415-1417
- 17 Sohara N, Takagi H, Yamada T, Abe T, Mori M. Hepatocellular carcinoma complicated by hemothorax. *J Gastroenterol* 2000; 35: 240-244
- 18 Matsui M, Kojima A, Kakizaki S, Nagasaka K, Sohara N, Sato K, Takagi H, Mori M, Ohno Y. Ectopic varices in a right diaphragm that ruptured into the pleural cavity. *Acta Med Okayama* 2006; 60: 229-232
- 19 Wei YF, Wang HC, Chang YC. Hemothorax due to metastatic hepatocellular carcinoma presenting with massive hemoptysis. *J Formos Med Assoc* 2006; 105: 346-348
- 20 Choi BG, Park SH, Byun JY, Jung SE, Choi KH, Han JY. The findings of ruptured hepatocellular carcinoma on helical CT. *Br J Radiol* 2001; 74: 142-146
- 21 Kim PT, Su JC, Buczkowski AK, Schaeffer DF, Chung SW, Scudamore CH, Ho SG. Computed tomography and angiographic interventional features of ruptured hepatocellular carcinoma: pictorial essay. *Can Assoc Radiol J* 2006; 57: 159-168
- 22 Chen WK, Chang YT, Chung YT, Yang HR. Outcomes of emergency treatment in ruptured hepatocellular carcinoma in the ED. *Am J Emerg Med* 2005; 23: 730-736
- 23 Liu CL, Fan ST, Lo CM, Tso WK, Poon RT, Lam CM, Wong J. Management of spontaneous rupture of hepatocellular carcinoma: single-center experience. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3725-3732
- 24 Tan FL, Tan YM, Chung AY, Cheow PC, Chow PK, Ooi LL. Factors affecting early mortality in spontaneous rupture of hepatocellular carcinoma. *ANZ J Surg* 2006; 76: 448-452
- 25 Marini P, Vilgrain V, Belghiti J. Management of spontaneous rupture of liver tumours. *Dig Surg* 2002; 19: 109-113
- 26 郑进方, 王海东. 肝切除术治疗肝癌破裂出血13例. *中华肝胆外科杂志* 2001; 7: 697-698
- 27 贾明库, 闫秀欣, 王禹. 原发性肝癌自发性破裂出血的治疗. *肝胆外科杂志* 2003; 11: 269-270
- 28 Ariizumi S, Yamamoto M, Ohtsubo T, Katsuragawa H, Katagiri S, Takasaki K. Step classification is useful for the determination of indications for systematized hepatectomy in hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2005; 12: 371-377
- 29 Chen ZY, Qi QH, Dong ZL. Etiology and management of hemorrhage in spontaneous liver rupture: a report of 70 cases. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 1063-1066
- 30 Yeh CN, Lee WC, Jeng LB, Chen MF, Yu MC. Spontaneous tumour rupture and prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 2002; 89: 1125-1129
- 31 Recordare A, Bonariol L, Caratozzolo E, Callegari F, Bruno G, Di Paola F, Bassi N. Management of spontaneous bleeding due to hepatocellular carcinoma. *Minerva Chir* 2002; 57: 347-356
- 32 俞可克, 吴绍峰, 卢伟锋, 刘平果, 吴国洋, 李涌, 熊宇. 急诊肝切除治疗原发性肝癌自发性破裂. *中华急诊医学杂志* 2006; 15: 1021-1023
- 33 闫朝歧, 范鹰, 张滨, 王立平, 郑秋华. 肝癌破裂出血的诊断和治疗(附36例报道). *中国急救医学* 2005; 25: 379-380
- 34 Mizuno S, Yamagiwa K, Ogawa T, Tabata M, Yokoi H, Isaji S, Uemoto S. Are the results of surgical treatment of hepatocellular carcinoma poor if the tumor has spontaneously ruptured? *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 567-570
- 35 Polat KY, Akcay MN, Aydinli B, Erdogan F, Kantarci M, Ozturk G, Peker K. Spontaneous rupture of hepatocellular carcinoma: a case report and review of literature. *Int J Clin Pract Suppl* 2005: 103-105
- 36 刘国清, 皮执民. 原发性肝癌自发破裂术中处理与预后. *中华肝胆外科杂志* 2001; 7: 696-697
- 37 Lin CH, Hsieh HF, Yu JC, Chen TW, Yu CY, Hsieh CB. Peritoneal lavage with distilled water during

- liver resection in patients with spontaneously ruptured hepatocellular carcinomas. *J Surg Oncol* 2006; 94: 255-256
- 38 Hai L, Yong-Hong P, Yong F, Ren-Feng L. One-stage liver resection for spontaneous rupture of hepatocellular carcinoma. *World J Surg* 2005; 29: 1316-1318
- 39 邹伟荣, 黄炜, 余伟民, 许华平. 原发性肝癌自发性破裂出血的临床治疗. *肝胆胰外科杂志* 2005; 17: 156-157
- 40 Ryu JK, Lee SB, Kim KH, Yoh KT. Surgical treatment in a patient with multiple implanted intraperitoneal metastases after resection of ruptured large hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 239-242
- 41 李忠铭, 吴红, 罗满生, 谭洪育, 彭放根, 林志铭. 肝切除治疗原发性肝癌自发性破裂出血. *中国普通外科杂志* 2006; 15: 57-59
- 42 吕新生, 何跃明, 刘志苏, 王志明, 周乐杜. 肝切除治疗原发性肝癌自发性破裂. *中华肝胆外科杂志* 2004; 10: 668-669
- 43 许业传, 熊奇如, 耿小平. 肝切除术治疗肝癌自发性破裂出血. *中国普通外科杂志* 2005; 14: 516-518
- 44 Takebayashi T, Kondo S, Ambo Y, Hirano S, Omi M, Morikawa T, Okushiba S, Katoh H. Staged hepatectomy following arterial embolization for ruptured hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 1074-1076
- 45 傅仁勇, 董昕, 刘祝. 原发性肝癌破裂出血的急诊治疗策略. *腹部外科* 2005; 18: 218-219
- 46 Castells L, Moreiras M, Quiroga S, Alvarez-Castells A, Segarra A, Esteban R, Guardia J. Hemoperitoneum as a first manifestation of hepatocellular carcinoma in western patients with liver cirrhosis: effectiveness of emergency treatment with transcatheter arterial embolization. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 555-562
- 47 孔健, 窦永充, 曹满瑞. 急诊肝动脉化疗栓塞术治疗肝癌破裂出血. *中华急诊医学杂志* 2002; 11: 304-306
- 48 詹世林, 陈建雄, 吴良平, 王伟中. 肝癌隐匿性破裂出血及肝动脉栓塞治疗2例. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 2051-2052
- 49 钦志泉, 卢丽琴, 袁建华, 刘之江. 急诊肝动脉栓塞治疗原发性肝癌自发性破裂出血. *中华急诊医学杂志* 2003; 12: 410-411
- 50 谢峰, 徐峰, 杨甲梅, 阙彤, 黄杨卿. 肝癌栓塞化疗后严重并发症的分析. *肝胆外科杂志* 2006; 14: 252-253
- 51 Choi JH, Kim JH, Won JH, Kim YS, Goo DE, Choi DL. Spontaneous intratumoral hemorrhage into hepatocellular carcinoma during transcatheter arterial embolization: a case report. *J Korean Med Sci* 2004; 19: 895-897
- 52 易小敏, 王云, 陆爱年. 奥曲肽预防肝癌肝动脉化疗栓塞后食管静脉曲张破裂出血. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 469-470
- 53 Nakao A, Matsuda T, Koguchi K, Funabiki S, Mori T, Kobashi K, Takakura N, Isozaki H, Tanaka N. Spontaneous rupture of hepatocellular carcinoma of the caudate lobe. *Anticancer Res* 2000; 20: 2223-2227
- 54 王海波, 王天玉, 刘一强, 王霞, 刘俊忠. 肝动脉化疗栓塞术治疗肝癌破裂出血. *中国微创外科杂志* 2004; 4: 324-325
- 55 杨业发, 程红岩, 徐爱民, 陈栋, 王义, 姚晓平, 陈汉, 吴孟超. 肝动脉插管栓塞治疗原发性肝癌自发破裂出血的疗效评价. *中华肿瘤杂志* 2002; 24: 285-287
- 56 Leung CS, Tang CN, Fung KH, Li MK. A retrospective review of transcatheter hepatic arterial embolisation for ruptured hepatocellular carcinoma. *J R Coll Surg Edinb* 2002; 47: 685-688
- 57 Lai EC, Lau WY. Spontaneous rupture of hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Arch Surg* 2006; 141: 191-198
- 58 Min HJ, Lee OJ, Kang DY, Lee EJ, Lee JH, Kim HJ, Kim TH, Jung WT, Cho JH. The clinical study on spontaneously ruptured hepatocellular carcinoma. *Korean J Gastroenterol* 2004; 44: 160-167
- 59 阎小纺, 魏崇健, 乔英. 肝癌破裂大出血的急诊介入治疗. *中华急诊医学杂志* 2003; 12: 200
- 60 刘嘉林, 李军, 鲍世韵, 余小舫. 急诊肝动脉栓塞治疗原发性肝癌自发性破裂出血(附38例报告). *中国普外基础与临床杂志* 2003; 10: 276-277
- 61 Lau KY, Wong TP, Wong WW, Tan LT, Chan JK, Lee AS. Emergency embolization of spontaneous ruptured hepatocellular carcinoma: correlation between survival and Child-Pugh classification. *Australas Radiol* 2003; 47: 231-235
- 62 Shiratori M, Nagashima I, Takada T, Morofuji S, Motomiya H, Matsuda K, Inaba T, Fukushima J, Okinaga K. Successful treatment of ruptured hepatocellular carcinoma with intraperitoneal injection of OK-432. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2004; 11: 426-429
- 63 Ng KK, Lam CM, Poon RT, Law WL, Seto CL, Fan ST. Radiofrequency ablation as a salvage procedure for ruptured hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 1641-3
- 64 陈敏华, 严昆, 武金玉, 杨薇, 戴莹, 宋一平, 黄信孚. 超声引导射频消融术对131例肝癌的治疗及并发症探讨. *中华普通外科杂志* 2002; 17: 520-522
- 65 Livraghi T, Solbiati L, Meloni MF, Gazelle GS, Halpern EF, Goldberg SN. Treatment of focal liver tumors with percutaneous radio-frequency ablation: complications encountered in a multicenter study. *Radiology* 2003; 226: 441-451
- 66 梁浩辉, 王成友, 张敏杰, 倪勇, 黄文坚. 原发性肝癌破裂出血的诊断和治疗. *肝胆外科杂志* 2004; 12: 36-38
- 67 Buczkowski AK, Kim PT, Ho SG, Schaeffer DF, Lee SI, Owen DA, Weiss AH, Chung SW, Scudamore CH. Multidisciplinary management of ruptured hepatocellular carcinoma. *J Gastrointest Surg* 2006; 10: 379-386
- 68 Fujii M, Miyake H, Takamura K, Tashiro S. Management of spontaneous ruptured hepatocellular carcinoma. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 2004; 105: 292-295
- 69 Lang BH, Poon RT, Fan ST, Wong J. Influence of laparoscopy on postoperative recurrence and survival in patients with ruptured hepatocellular carcinoma undergoing hepatic resection. *Br J Surg* 2004; 91: 444-449
- 70 杨建荣, 梁中骁, 罗建强, 李辛平, 黄栋, 李梦阳, 黄宇. 腹腔镜肝癌切除术15例临床报告. *中国内镜杂志* 2005; 11: 1100-1101, 1104

同行评价

肝癌破裂出血是原发性肝癌严重的并发症之一,发病急,病死率及再出血率高,临床治疗较为棘手.本文对原发性肝癌破裂出血的治疗方法如保守治疗、手术治疗、介入治疗肝动脉栓塞术(TAE)和其他方法如瘤内无水酒精注射、生物免疫疗法、刮吸法、射频消融法等一一综述,并进行展望,较好的反映了我国肝病临床治疗的先进水平.

电编 李琪 编辑 王晓瑜

TNF- α 诱导肝细胞凋亡机制的回顾与展望

李晶媛, 李树臣, 杨维良

■背景资料

肝细胞损伤是一种由多因素介导的复杂生物学过程, 涉及多种学说和机制, 而凋亡是肝损伤的一个基本特征, 在某些急慢性肝病中, 肝细胞凋亡引起的肝细胞损伤可能起主要作用。迄今为止, 对死亡受体活化诱导肝损伤的研究有较飞速的进展。

李晶媛, 李树臣, 哈尔滨医科大学附属第二临床医学院感染科 黑龙江省哈尔滨市150086

杨维良, 哈尔滨医科大学附属第二临床医学院普外三科 黑龙江省哈尔滨市150086

通讯作者: 李树臣, 150086, 黑龙江省哈尔滨市学府路246号, 哈尔滨医科大学附属第二医院感染科. shuchenli@yahoo.com.cn
电话: 0451-86671309 传真: 0451-86605614

收稿日期: 2006-11-09 接受日期: 2006-12-27

Review and prospect on mechanisms of tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in liver injury

Jing-Yuan Li, Shu-Chen Li, Wei-Liang Yang

Jing-Yuan Li, Shu-Chen Li, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Wei-Liang Yang, the Third Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Shu-Chen Li, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 246 Xuefu Road, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. shuchenli@yahoo.com.cn

Received: 2006-11-09 Accepted: 2006-12-27

Abstract

Hepatocyte apoptosis induced by tumor necrosis factor- α (TNF- α) is implicated in a variety of liver diseases. TNF- α exerts various effects in cell apoptosis, which are mainly mediated by TNF-receptor 1 (TNF-R1). The responses of TNF-R1 resulted in the activation of multiple apoptotic pathways involving the activation of the pro-death Bcl-2 family proteins, reactive oxygen species, c-Jun NH2-terminal kinase, cathepsin B, acidic sphingomyelinase and neutral sphingomyelinase. These pathways are closely interlinked, and mainly act on mitochondria, which release the apoptogenic factors and other substances, leading to cell apoptosis. In this article, we reviewed the mechanisms of TNF- α -induced apoptosis of liver cells.

Key Words: Apoptosis; Mitochondria; Bcl-2 family protein; Tumor necrosis factor- α ; Reactive oxygen species; Liver injury

Li JY, Li SC, Yang WL. Review and prospect on mechanisms of tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in liver injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(6):606-611

摘要

在多种肝脏疾病中都涉及到TNF- α 诱导的肝细胞凋亡。TNF- α 在细胞凋亡过程中发挥多种效应, 主要由TNF-R1介导。TNF-R1的激活导致了多种凋亡途径的激活, 包括促凋亡的Bcl-2家族蛋白、活性氧、c-Jun NH2-末端激酶、组织蛋白酶B、酸性鞘磷脂酶及中性鞘磷脂酶。这些途径密切相关并主要作用于线粒体, 线粒体释放致凋亡因子及其他物质, 导致细胞凋亡。

关键词: 凋亡; 线粒体; Bcl-2家族蛋白; TNF- α ; 活性氧; 肝损伤

李晶媛, 李树臣, 杨维良. TNF- α 诱导肝细胞凋亡机制的回顾与展望. *世界华人消化杂志* 2007;15(6):606-611

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/606.asp>

0 引言

肝细胞凋亡参与了多种急慢性肝脏疾病的发生、发展过程, 如病毒性肝炎、酒精性肝病、非酒精性脂肪肝、胆汁淤积性肝病及缺血-再灌注损伤等等, 是肝细胞损伤的重要机制之一^[1]。肝细胞凋亡有二种诱导途径: 死亡受体途径(外源性途径)或线粒体途径(内源性途径)。死亡受体途径主要通过死亡受体配体与死亡受体结合而起动, 这些配体包括TNF- α 、FasL及肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TRAIL)。相比之下, 线粒体途径是由细胞内多种应激反应触发的, 如DNA损伤、生长因子缺乏、代谢紊乱等等。在肝细胞凋亡中, 这两种途径并非相互排斥, 而是密切相连的, 因为由死亡受体诱导的凋亡信号相对较弱, 通常需要通过线粒体途径的放大效应来实现^[2]。本文重点总结了TNF- α 介导肝细胞凋亡的多种作用机制, 以期对进一步的研究及临床应用产生促进作用。

1 TNF- α 在肝病中的作用

TNF- α 是一种多效的促炎症反应细胞因子, 主要由活化的巨噬细胞产生, 还有少部分由其他细胞产生. TNF- α 由TNF-R1和TNF-R2介导发挥多种效应, 但其诱导凋亡效应主要由TNF-R1介导^[3]. TNF- α 可以诱导肉瘤细胞死亡, 因而作为一种抗肿瘤因子首次被人们认识. 然而, 应用TNF- α 进行系统抗肿瘤治疗的努力并未成功, 因为其产生的副作用比其治疗作用来得更快, 其副作用之一就是由于广泛的肝细胞凋亡产生的肝毒性. 随后的研究显示, TNF- α 可能与病毒性肝炎、酒精性肝炎、缺血-再灌注肝损伤及暴发性肝衰竭的发生、发展有关. 暴发性肝炎患者血清中TNF- α 显著升高^[4]. 在病毒性肝炎中, 常常可以观察到血浆中TNF- α 及TNF-R水平有所升高^[5]. 在酒精性肝炎中, 也有若干有力的证据显示TNF- α 与其发病相关: (1)在肠内灌注乙醇的模型中, TNF-R1基因敲除的小鼠肝脏损伤较野生型及TNF-R2基因敲除的小鼠明显减轻^[6]; (2)在酒精性肝炎患者中, 血清TNF- α 水平升高, 其水平与患者的生存率呈负相关^[7]; (3)在慢性乙醇喂饲的小鼠中, TNF- α 的产生有所增加, 慢性乙醇喂饲可以增加肠道对细菌产物(如脂多糖LPS)的通透性^[8]; (4)对患者的遗传学研究显示, 这些患者的TNF- α 启动子中有一个突变, 可增加其活性^[9]. 此外, 肝脏的缺血-再灌注损伤也可以使TNF- α 产生增加^[10].

2 TNF- α 诱导的多种肝细胞凋亡途径

在肝细胞中, TNF- α 可以诱导多种机制来启动凋亡, 导致随后的肝脏损伤. TNF- α 诱导凋亡主要由TNF-R1介导. TNF-R1含有3个功能域, 通过不同的细胞内接头蛋白间的相互作用传导唯一的细胞内信号^[3]. 他们是C-端死亡域、中间的A-SMase(酸性鞘磷脂酶)活化域(ASD)和N-末端N-SMase(中性鞘磷脂酶)活化域(NSD). 死亡域既可以介导促凋亡途径, 也可以介导抗凋亡途径, 而另两种鞘磷脂酶途径主要起调节凋亡及炎症反应的作用. 目前已证实, 以下论及的凋亡信号途径在TNF- α 诱导的肝细胞凋亡及肝损伤中占有重要地位. 然而, 在所有的凋亡途径中, 线粒体似乎是TNF- α 诱导肝细胞凋亡的中心执行者, 因为似乎所有的信号物质均直接或间接地以线粒体为靶目标.

2.1 线粒体凋亡途径 TNF-R1与TNF- α 结合后, 其死亡域募集一种接头分子TRADD, 形成第一个

蛋白复合物(复合物 I), 其中包括TRAF2^[11]. 复合物 I 随后与TNF-R1分离并在胞质溶胶中形成另一种不同的复合物(称为复合物 II), 其中包含FADD, c-FLIP, CIAP1/2, TRAF2及caspase-8^[11]. 然而, 在肝细胞中此种caspase-8复合物的活性相当微弱, 需要经过线粒体途径进一步放大. 线粒体途径由Bcl-2家族蛋白调控^[2]. 抗凋亡Bcl-2家族蛋白(如Bcl-2和Bcl-xL)抑制线粒体凋亡途径, 而促凋亡Bcl-2家族蛋白(如Bid、Bax和Bak)促进线粒体凋亡途径^[2].

caspase-8可以切割Bid(一种仅含BH3结构域的Bcl-2家族蛋白)形成活性片段tBid. tBid随后引起线粒体嵴重组^[12-13], 或者与Bax或Bak相互作用引起线粒体凋亡因子(如细胞色素C和Smac/Diablo)的释放. 特别是线粒体通透性的转变(MPT), 他作为细胞色素C释放的一种重要调控机制同样由TNF- α 诱导, 并在很大程度上依赖于Bid^[14-15]. MPT的发生是由于MPT孔的开放, MPT孔对溶质有较高的传导性, 其分子量约为1500 Da^[16]. 其结果是线粒体去极化, 线粒体通透性转变引起胞内致凋亡蛋白的释放. 此外, MPT的活化可导致活性氧的产生, 而活性氧反过来可进一步增强线粒体通透性转变^[16]. 单独应用环孢菌素A或与其增强剂合用来抑制MPT可以抑制TNF- α 诱导的细胞色素C释放、caspase活化及肝细胞凋亡^[15-16]. 随着细胞色素C的释放, 将会形成一种含有APAF-1, 细胞色素C及caspase-9的高分子量复合物^[17], 此复合物反过来会活化一种重要的执行者, 即caspase-3. 此外, 释放出来的Smac/Diablo与XIAP结合, 使其对caspase-9和caspase-3的抑制作用减弱, 进而导致caspase-9和caspase-3的充分激活^[18-19]. 上述发现可以说明, 线粒体途径或Bid在TNF- α 诱导的肝细胞凋亡中占有重要作用. 此外, Bid非依赖机制也同样存在. 业已证明, 原代培养的Bid基因敲除小鼠的肝细胞对TNF- α /放线菌素具有抵抗力, 然而, 24 h后他们最终死亡^[12,15]. 对Bid基因敲除小鼠给予LPS及GalN, 显示他们对LPS及GalN引起的损伤也仅有部分保护作用^[20]. 这些研究表明, 尽管Bid在TNF- α 诱导的凋亡及肝损伤中有重要的作用, 但Bid非依赖性的凋亡机制也同样参与细胞凋亡.

2.2 Bax及Bak的活化 Bax及Bak是具有多个结构域的促凋亡蛋白, 他们诱导线粒体凋亡途径的发生. 同时去除Bax及Bak(而不是其中一种), 可使细胞对各种引起线粒体死亡的刺激产生完

■ 研发前沿

TNF- α 诱导肝细胞凋亡的作用机制较为复杂. 其中, TNF-R1的激活导致了多种凋亡途径的激活, 直接针对TNF- α 凋亡信号途径的研究可能为未来的肝病治疗提供可行的对策, 具有重要意义.

■创新盘点

本文从Bcl-2家族蛋白、活性氧、c-Jun NH₂-末端激酶、组织蛋白酶B等多种途径出发,较为全面、系统的总结了TNF- α 介导肝细胞凋亡的多种作用机制及其与线粒体凋亡途径的关系。

全的拮抗作用,这些刺激包括DNA损伤、生长因子的缺乏、内质网应激以及由Bid介导的内源性死亡信号^[21]。TNF- α 刺激后,Bax及Bak均可由Bid活化^[12,15,21]。可以观察到,在健康细胞中,Bax通常定位于胞质溶胶内,而在死亡刺激物作用后,Bax向线粒体移位并定位于线粒体中。事实上,在活体肝组织内,经TNF- α /GalN或LPS/GalN处理后,Bax移位至肝线粒体^[20,22]。除了移位,Bax还会改变构象以促进其插入线粒体膜内并启动凋亡机制^[23]。对LPS/GalN模型的研究证实,Bax插入线粒体膜依赖于Bid^[20]。Bax及Bak可能有不同的活化途径,因此他们的功能可能并非完全相同。

2.3 活性氧(ROS) ROS在促凋亡过程中发挥重要作用。ROS可由内质网、核膜及质膜产生,但ROS主要来源于线粒体。在转录抑制剂存在的条件下,还原型谷胱苷肽的缺乏可使小鼠肝细胞对TNF- α 诱导的细胞凋亡更加敏感,提示ROS在TNF- α 诱导的肝损伤中起关键作用^[24-25]。硫氧还蛋白是一种小分子氧化还原剂激活蛋白,具有抗氧化作用,其过量的表达可以减弱LPS/GalN诱导的小鼠肝脏损伤^[26]。这一实验进一步证明了ROS在TNF- α 诱导的肝损伤中的关键作用。Bcl-2家族蛋白在ROS的调控中可能扮演重要作用。Bcl-2及Bcl-xL可能具有抗氧化物作用,因而发挥抗凋亡活性^[27]。Bcl-2基因敲除小鼠对促氧化剂有高度的敏感性,表现出显著增强的氧化应激反应^[28]。另一方面,促凋亡Bcl-2分子可能同促氧化剂发挥同样的功能。Bax的过量表达可使超氧化物的产生增加^[29]。近年发现,Bid与TNF-R1活化后的大多数ROS产生有关,并且ROS主要由线粒体产生^[12]。一种SOD模拟物(MnTBAP)及一种维他命E模拟物(Trolox)可抑制caspase-3、-8、-9的活化,并有效抑制肝细胞的凋亡。ROS可以通过诱导线粒体嵴重组及脂质过氧化反应而促进细胞色素C的释放,而这一过程可被抗氧化物抑制。

2.4 c-Jun NH₂-末端激酶 c-Jun NH₂-末端激酶(JNK)是丝裂原活化蛋白(MAP)激酶家族的一员,并且通过MAP激酶级联由多种细胞外刺激物活化。活化的JNK反过来使c-Jun磷酸化并激活c-Jun及其他靶目标^[30]。c-Jun是转录因子AP-1的一种主要组成成分。JNK活化在介导TNF-R信号输出方面的作用尚存有高度的争议,JNK活化可能促进凋亡,也可能抑制凋亡,亦或二者之间无关^[31]。然而,有力的证据显示,JNK活化可以增

强TNF- α 诱导的肝细胞凋亡^[32-33]。SP600125是一种特异性JNK抑制剂,他可以抑制线粒体通透性的转变,阻断细胞色素C的释放及caspase-3、-8、-9的活化,均提示JNK作用于线粒体的上游环节。然而,JNK活化如何导致线粒体功能失活目前还不清楚。最近,一项关于Hela细胞的研究表明,JNK活化可以导致一种特殊的jBid的形成,jBid是Bid切割后产生的短片段,他可特异的诱导线粒体释放Smac/Diablo来启动caspase-8活化^[34]。此种jBid-Smac/Diablo途径是否存在于肝细胞或其他的细胞尚需进一步证实。另一方面,JNK可能通过其他的促凋亡Bcl-2家族蛋白来激活线粒体途径。最近的研究显示,JNK诱导的细胞凋亡需要Bax的参与,在小鼠胚胎细胞中,通过JNK使Bim及Bmf磷酸化有助于Bax的易位及活化^[35]。然而,此种JNK-Bax途径是否存在于肝细胞中也同样需要证实。鉴于JNK在TNF- α 诱导的肝细胞凋亡中的作用,一种小分子的JNK抑制剂可能具有潜在的治疗价值。

2.5 组织蛋白酶B 组织蛋白酶B是一种溶酶体半胱氨酸蛋白酶,是参与细胞内蛋白降解的关键酶。组织蛋白酶B首先在溶酶体中经过连续的处理加工过程而合成一种分子量为38 kDa的酶原,经过蛋白水解分裂后,形成一种分子量为30 kDa的活性形式^[36]。业已证实,无论在体内还是体外,组织蛋白酶B在TNF- α 诱导的肝损伤中均发挥作用。组织蛋白酶B基因敲除小鼠的离体肝细胞对TNF- α /ActD诱导的细胞凋亡具有明显的抵抗作用^[37-38]。此外,在体外培养的肝细胞中,一种选择性的组织蛋白酶B抑制剂CA-074也可以显著的减轻TNF- α 诱导的肝细胞凋亡。进一步证实显示,组织蛋白酶B通过促进细胞色素C释放及caspase活化而激活线粒体凋亡途径。当用离体的小鼠肝线粒体培养纯化的重组体组织蛋白酶B时,只有适量的细胞色素C从线粒体中释放出来,这提示组织蛋白酶B可能并不直接引起线粒体外膜通透性的增加。然而,在胞质溶胶存在的情况下,组织蛋白酶B诱导的细胞色素C释放明显增加,这提示胞质溶胶中可能存在某些不明的蛋白参与了反应^[37]。因此,此种可以导致线粒体活化的组织蛋白酶B的下游信号尚需进一步证实。

2.6 鞘磷脂酶、神经酰胺和FAN 据报道,TNF与TNF-R1相互作用既可使N-SMase活化,也可使A-SMase活化,从而导致鞘磷脂酶的降解及神经酰胺的合成。神经鞘脂类,尤其是神经酰胺被

认为是一种假定的脂质信号介质, 在应激反应及TNF- α 信号系统中发挥作用. TNF- α 触发的N-SMase活化是由接头蛋白FAN介导的. FAN与NSD(TNF-R1位于细胞内的部分)相连接, 在TNF- α 触发后N-SMase介导的细胞内神经酰胺的产生过程中发挥重要作用. FAN在人成纤维细胞中持续的隐性表达可减弱TNF- α 诱导的神经酰胺的产生, 而此过程是通过鞘磷脂酶水解、减轻caspase反应过程和减轻TNF- α 诱导的凋亡而实现的. 然而, 他并不改变TNF- α 诱导的其他效应^[39]. 此外, 有实验表明FAN基因敲除的小鼠可部分抵抗LPS及TNF- α 诱导的肝损伤^[40]. 进一步的研究发现, 由LPS诱导的血清IL-6水平升高在FAN基因敲除小鼠中有所降低. 有趣的是, IL-6基因敲除的小鼠对内毒素诱导的肝细胞凋亡及致死作用也具有部分的抵制作用^[40]. 由此可见, FAN可能参与内毒素触发的暴发性肝炎的发病机制, 并可能通过调节IL-6的分泌而发挥作用. 此外, 转染表达隐性FAN的带菌体也可阻断组织蛋白酶B的释放及caspase-8的激活. 数据显示, 在信号级联反应中, FAN可能作用于caspase-8/Bid的上游区域. 这些发现表明, 在由TNF- α 触发的凋亡反应中, FAN可通过调节神经酰胺的产生、IL-6的分泌、溶酶体组织蛋白酶B途径及线粒体途径而发挥多种作用.

已证实, 神经酰胺可通过直接激活线粒体通透性转变来诱导肝细胞凋亡^[41]. 以下证据可以说明A-SMase在TNF- α 诱导的肝细胞凋亡中的关键作用: (1)Smase基因敲除的小鼠可以抵制TNF- α 或LPS诱导的肝损伤^[22]; (2)Smase基因敲除的肝细胞经TNF- α 处理后, 细胞内神经酰胺的水平较野生型肝细胞有明显的下降; (3)神经节苷脂(GD3)是一种含有鞘糖脂的唾液酸, 他已被证实是一种脂质死亡效应器, 可直接影响线粒体通透性转变并诱导线粒体凋亡途径; (4)腺苷甲硫氨酸(SAM)由腺苷三磷酸钴胺素腺苷转移酶(MATs)合成. 敲除肝脏特异性MATIA基因可使SAM衰减发生在前, 而caspase-8和caspase-3活化、大面积的肝损伤及小鼠的死亡发生在后. 经TNF- α 处理后, SMase基因敲除的肝组织可显著抑制MATIA的下调, 从而仅引起微弱的SAM衰减、caspase活化及肝组织损伤^[42]. 此外, 在SMase基因敲除的肝细胞中, 细胞内衰减的GSH水平与野生型细胞相比维持在相对较高的水平. 因此, ASMase可能通过促进神经酰胺的生成、GD3依赖的线粒功能失活、MATIA的下调及

GSH的衰减来参与TNF- α 诱导的肝衰竭. 研究数据同样表明, SAM可能在急慢性肝病的治疗中发挥作用.

2.7 NF- κ B的活化 TNF- α /TNF-R1信号系统的一个独特特征是同时激活NF- κ B途径^[43], 此途径可抑制TNF- α 诱导的细胞凋亡过程^[44]. TNF受体衔接可引起TRADD募集TRAF2及RIP. TRAF2可能募集IKK复合物、IKK α 、IKK β 及IKK γ 并与其连接. 随后RIP活化IKK复合物, 此复合物可使I- κ B α 磷酸化并导致其降解. NF- κ B P50/P65二聚体从I- κ B α 中脱离出来并定位于细胞核, 从而引起新的基因转录. NF- κ B抗TNF- α 毒性的作用机制尚未完全清楚. NF- κ B的活化可以增加生存基因产物的表达, 包括IAPs(XIAP, cIAP1/2), TRAF1, TRAF2, A20, A1/Bfl, Bcl-xL, IEX-1L, iNOS, c-FLIP, MnSOD及GADD45 β ^[2]. 然而, 由NF- κ B诱导的此种保护性基因似乎是组织特异性的, 并且在特异的情况下可能只有其中的某些基因参与TNF- α 信号系统. 在肝细胞损伤的范例中, 只对其中的几个保护基因进行过研究, 例如: 已报道一种锌指蛋白A20可对抗TNF- α /GalN而提高小鼠的生存率^[45]. 在体外, iNOS衍生的氮氧化物同样具有保护作用, 而iNOS缺乏的肝细胞则对TNF- α 更加敏感^[46]. 最后, 在IAP家族蛋白中, 只有CIAP2的效应在肝细胞中进行过研究, 研究显示, 他可以对抗TNF- α 而具有保护作用^[47]. 近来, Maeda *et al*^[48]应用肝细胞特异性的IKK β 缺失的小鼠进行研究, 研究显示, 此种小鼠对结合于细胞上的TNF- α (主要由刀豆素A诱导)更加敏感, 而不是循环中的TNF- α (主要由LPS诱导). 有趣的是, IKK β 的缺乏可增强ConA诱导的JNK活化. Maeda *et al*^[48]应用JNK基因敲除的小鼠进一步证实了ConA诱导的肝损害需要JNK的参与. 因此, IKK β (或NF- κ B活化)的抗凋亡效应主要通过抑制JNK的活化, 而此种抗凋亡效应在与细胞结合的TNF- α 诱导的肝细胞凋亡中具有重要的作用. 最后, 其他未知的NF- κ B依赖性基因产物也可能抑制TNF- α 诱导的肝细胞毒性而发挥保护作用.

总之, 无论急慢性肝病, 凋亡是肝损伤的一个基本特征. 过去10 a中, 在肝损伤领域的研究有飞快的进展, 尤其是由死亡受体活化诱导的肝损伤. 在肝细胞凋亡中, TNF- α 似乎并非只引起单一的效应, 本文所总结的证据表明, 在TNF- α 诱导的肝细胞凋亡中有多种途径被激活. 直接针对TNF- α 凋亡信号途径的研究也许会为

■应用要点

TNF- α 介导肝细胞凋亡的确切机制目前尚有争议, 但大量研究表明, TNF- α 介导的肝细胞凋亡与多种肝病的发生发展密切相关, 对其进行较为深入的研究, 有可能为探索肝病的发病机制和防治方法开辟新的途径.

■名词解释

MPT孔: 线粒体膜通透性转变孔, 主要由位于内膜的腺苷转位因子和位于外膜的电压依赖性阴离子通道等蛋白所组成, PT孔开放会引起线粒体跨膜电位下降和细胞色素C释放。

未来的肝病治疗提供可行的对策。例如: 应用环孢素A(MPT抑制剂)、SP600125(JNK抑制剂)和抗氧化物(MnTBAP或Trolox)等化学物质直接作用于线粒体的活化环节, 也许会如动物模型中显示的那样减轻人类的肝损害。此外, 近来研究显示环氧酶2(COX-2)可通过激活死亡受体途径及线粒体途径诱导肝癌细胞发生凋亡或坏死, 从而发挥协同抗肿瘤作用^[49]。

3 参考文献

- Ji C, Kaplowitz N. Hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and alcoholic liver injury. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1699-1708
- Yin XM, Ding WX. Death receptor activation-induced hepatocyte apoptosis and liver injury. *Curr Mol Med* 2003; 3: 491-508
- Wang Y, Singh R, Lefkowitz JH, Rigoli RM, Czaja MJ. Tumor necrosis factor-induced toxic liver injury results from JNK2-dependent activation of caspase-8 and the mitochondrial death pathway. *J Biol Chem* 2006; 281: 15258-15267
- Muto Y, Nouri-Aria KT, Meager A, Alexander GJ, Eddleston AL, Williams R. Enhanced tumour necrosis factor and interleukin-1 in fulminant hepatic failure. *Lancet* 1988; 2: 72-74
- Zylberberg H, Rimaniol AC, Pol S, Masson A, De Groote D, Berthelot P, Bach JF, Brechot C, Zavala F. Soluble tumor necrosis factor receptors in chronic hepatitis C: a correlation with histological fibrosis and activity. *J Hepatol* 1999; 30: 185-191
- Yin M, Wheeler MD, Kono H, Bradford BU, Gallucci RM, Luster MI, Thurman RG. Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology* 1999; 117: 942-952
- Bird GL, Sheron N, Goka AK, Alexander GJ, Williams RS. Increased plasma tumor necrosis factor in severe alcoholic hepatitis. *Ann Intern Med* 1990; 112: 917-920
- Fukui H. Relation of endotoxin, endotoxin binding proteins and macrophages to severe alcoholic liver injury and multiple organ failure. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29: 1725-1795
- Grove J, Daly AK, Bassendine MF, Day CP. Association of a tumor necrosis factor promoter polymorphism with susceptibility to alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1997; 26: 143-146
- Yang YL, Li JP, Xu XP, Dou KF, Yue SQ, Li KZ. Protective effects of tumor necrosis factor alpha antibody and ulinastatin on liver ischemic reperfusion in rats. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3161-3164
- Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 2003; 114: 181-190
- Ding WX, Ni HM, DiFrancesca D, Stolz DB, Yin XM. Bid-dependent generation of oxygen radicals promotes death receptor activation-induced apoptosis in murine hepatocytes. *Hepatology* 2004; 40: 403-413
- Kim TH, Zhao Y, Ding WX, Shin JN, He X, Seo YW, Chen J, Rabinowich H, Amoscato AA, Yin XM. Bid-cardiolipin interaction at mitochondrial contact site contributes to mitochondrial cristae reorganization and cytochrome C release. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 3061-3072
- Bradham CA, Qian T, Streetz K, Trautwein C, Brenner DA, Lemasters JJ. The mitochondrial permeability transition is required for tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis and cytochrome c release. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 6353-6364
- Zhao Y, Ding WX, Qian T, Watkins S, Lemasters JJ, Yin XM. Bid activates multiple mitochondrial apoptotic mechanisms in primary hepatocytes after death receptor engagement. *Gastroenterology* 2003; 125: 854-867
- Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, Herman B. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366: 177-196
- Jiang X, Wang X. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem* 2000; 275: 31199-31203
- Li S, Zhao Y, He X, Kim TH, Kuharsky DK, Rabinowich H, Chen J, Du C, Yin XM. Relief of extrinsic pathway inhibition by the Bid-dependent mitochondrial release of Smac in Fas-mediated hepatocyte apoptosis. *J Biol Chem* 2002; 277: 26912-26920
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000; 102: 33-42
- Zhao Y, Li S, Childs EE, Kuharsky DK, Yin XM. Activation of pro-death Bcl-2 family proteins and mitochondria apoptosis pathway in tumor necrosis factor-alpha-induced liver injury. *J Biol Chem* 2001; 276: 27432-27440
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001; 292: 727-730
- Garcia-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A, Calvo M, Enrich C, Fernandez-Checa JC. Defective TNF-alpha-mediated hepatocellular apoptosis and liver damage in acidic sphingomyelinase knockout mice. *J Clin Invest* 2003; 111: 197-208
- Nechushtan A, Smith CL, Hsu YT, Youle RJ. Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *EMBO J* 1999; 18: 2330-2341
- Nagai H, Matsumaru K, Feng G, Kaplowitz N. Reduced glutathione depletion causes necrosis and sensitization to tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in cultured mouse hepatocytes. *Hepatology* 2002; 36: 55-64
- Matsumaru K, Ji C, Kaplowitz N. Mechanisms for sensitization to TNF-induced apoptosis by acute glutathione depletion in murine hepatocytes. *Hepatology* 2003; 37: 1425-1434
- Okuyama H, Nakamura H, Shimahara Y, Araya S, Kawada N, Yamaoka Y, Yodoi J. Overexpression of thioredoxin prevents acute hepatitis caused by thioacetamide or lipopolysaccharide in mice.

- Hepatology* 2003; 37: 1015-1025
- 27 Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993; 75: 241-251
- 28 Hochman A, Sternin H, Gorodin S, Korsmeyer S, Ziv I, Melamed E, Offen D. Enhanced oxidative stress and altered antioxidants in brains of Bcl-2-deficient mice. *J Neurochem* 1998; 71: 741-748
- 29 Xiang J, Chao DT, Korsmeyer SJ. BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14559-14563
- 30 Liedtke C, Trautwein C. The role of JNK2 in toxic liver injury. *J Hepatol* 2006; 45: 762-764
- 31 Liu ZG. Adding facets to TNF signaling. The JNK angle. *Mol Cell* 2003; 12: 795-796
- 32 Liu H, Lo CR, Czaja MJ. NF-kappaB inhibition sensitizes hepatocytes to TNF-induced apoptosis through a sustained activation of JNK and c-Jun. *Hepatology* 2002; 35: 772-778
- 33 Schwabe RF, Uchinami H, Qian T, Bennett BL, Lemasters JJ, Brenner DA. Differential requirement for c-Jun NH2-terminal kinase in TNFalpha- and Fas-mediated apoptosis in hepatocytes. *FASEB J* 2004; 18: 720-722
- 34 Deng Y, Ren X, Yang L, Lin Y, Wu X. A JNK-dependent pathway is required for TNFalpha-induced apoptosis. *Cell* 2003; 115: 61-70
- 35 Lei K, Nimmual A, Zong WX, Kennedy NJ, Flavell RA, Thompson CB, Bar-Sagi D, Davis RJ. The Bax subfamily of Bcl2-related proteins is essential for apoptotic signal transduction by c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 4929-4942
- 36 Rowan AD, Mason P, Mach L, Mort JS. Rat procathepsin B. Proteolytic processing to the mature form *in vitro*. *J Biol Chem* 1992; 267: 15993-15999
- 37 Guicciardi ME, Deussing J, Miyoshi H, Bronk SF, Svingen PA, Peters C, Kaufmann SH, Gores GJ. Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J Clin Invest* 2000; 106: 1127-1137
- 38 Guicciardi ME, Miyoshi H, Bronk SF, Gores GJ. Cathepsin B knockout mice are resistant to tumor necrosis factor-alpha-mediated hepatocyte apoptosis and liver injury: implications for therapeutic applications. *Am J Pathol* 2001; 159: 2045-2054
- 39 Segui B, Cuvillier O, Adam-Klages S, Garcia V, Malagarie-Cazenave S, Leveque S, Caspar-Bauguil S, Coudert J, Salvayre R, Kronke M, Levade T. Involvement of FAN in TNF-induced apoptosis. *J Clin Invest* 2001; 108: 143-151
- 40 Malagarie-Cazenave S, Segui B, Leveque S, Garcia V, Carpentier S, Altie MF, Bouchet A, Gouaze V, Andrieu-Abadie N, Barreira Y, Benoist H, Levade T. Role of FAN in tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide-induced interleukin-6 secretion and lethality in D-galactosamine-sensitized mice. *J Biol Chem* 2004; 279: 18648-18655
- 41 Arora AS, Jones BJ, Patel TC, Bronk SF, Gores GJ. Ceramide induces hepatocyte cell death through disruption of mitochondrial function in the rat. *Hepatology* 1997; 25: 958-963
- 42 Mari M, Colell A, Morales A, Paneda C, Varela-Nieto I, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Acidic sphingomyelinase downregulates the liver-specific methionine adenosyltransferase 1A, contributing to tumor necrosis factor-induced lethal hepatitis. *J Clin Invest* 2004; 113: 895-904
- 43 Zhou BR, Gumenscheimer M, Freudenberg MA, Galanos C. Lethal effect and apoptotic DNA fragmentation in response of D-GalN-treated mice to bacterial LPS can be suppressed by pre-exposure to minute amount of bacterial LPS: dual role of TNF receptor 1. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3398-3404
- 44 Saitou Y, Shiraki K, Yamanaka T, Miyashita K, Inoue T, Yamanaka Y, Yamaguchi Y, Enokimura N, Yamamoto N, Itou K, Sugimoto K, Nakano T. Augmentation of tumor necrosis factor family-induced apoptosis by E3330 in human hepatocellular carcinoma cell lines via inhibition of NF kappa B. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6258-6261
- 45 Arvelo MB, Cooper JT, Longo C, Daniel S, Grey ST, Mahiou J, Czismadia E, Abu-Jawdeh G, Ferran C. A20 protects mice from D-galactosamine/lipopolysaccharide acute toxic lethal hepatitis. *Hepatology* 2002; 35: 535-543
- 46 Hatano E, Bennett BL, Manning AM, Qian T, Lemasters JJ, Brenner DA. NF-kappaB stimulates inducible nitric oxide synthase to protect mouse hepatocytes from TNF-alpha- and Fas-mediated apoptosis. *Gastroenterology* 2001; 120: 1251-1262
- 47 Kunstle G, Leist M, Uhlig S, Revesz L, Feifel R, MacKenzie A, Wendel A. ICE-protease inhibitors block murine liver injury and apoptosis caused by CD95 or by TNF-alpha. *Immunol Lett* 1997; 55: 5-10
- 48 Maeda S, Chang L, Li ZW, Luo JL, Leffert H, Karin M. IKKbeta is required for prevention of apoptosis mediated by cell-bound but not by circulating TNFalpha. *Immunity* 2003; 19: 725-737
- 49 Kern MA, Haugg AM, Koch AF, Schilling T, Breuhahn K, Walczak H, Fleischer B, Trautwein C, Michalski C, Schulze-Bergkamen H, Friess H, Stremmel W, Krammer PH, Schirmacher P, Muller M. Cyclooxygenase-2 inhibition induces apoptosis signaling via death receptors and mitochondria in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2006; 66: 7059-7066

同行评价

本文对TNF- α 在细胞凋亡过程中发挥多种效应的机制进行了探讨,总结了最新的研究进展,有一定的学术价值,文笔流畅、思路清晰、主题突出,是一篇不错的综述。

电编 李琪 编辑 张焕兰

肺血管扩张在肝肺综合征发病机制中作用的研究进展

张影, 张福奎, 王宝恩

■背景资料

肺血管扩张是肝肺综合征(HPS)的主要发病机制, 然而导致HPS肺血管扩张的机制相当复杂, 至今仍不清楚。目前认为肺血管内巨噬细胞聚积和雌激素升高导致的血管活性因子增多和活性增强可能与此有关。

张影, 张福奎, 王宝恩, 首都医科大学附属北京友谊医院肝病中心 北京市 100050

通讯作者: 张影, 100050, 北京市, 首都医科大学附属北京友谊医院肝病中心. zy730302@yahoo.com.cn

电话: 010-63164411

收稿日期: 2006-11-11 接受日期: 2006-12-08

Advance in the role of pulmonary vasodilatation in the pathogenic mechanism of hepatopulmonary syndrome

Ying Zhang, Fu-Kui Zhang, Bao-En Wang

Ying Zhang, Fu-Kui Zhang, Bao-En Wang, Liver Disease Center, Beijing Friendship Hospital Affiliated to Capital University of Medical Sciences, Beijing 100050, China

Correspondence to: Dr. Ying Zhang, Liver Disease Center, Beijing Friendship Hospital Affiliated to Capital University of Medical Sciences, Beijing 100050, China. zy730302@yahoo.com.cn

Received: 2006-11-11 Accepted: 2006-12-08

Abstract

Pulmonary vasodilatation, whose causes still remain unclear, is a major mechanism in hepatopulmonary syndrome. Recently, many studies reported that the level increase and activity enhancement of vasoactive factors, which resulted in pulmonary intravascular macrophage accumulation and estrogen elevation, were associated with pulmonary vasodilatation. In this review, we clarified these probable mechanisms above.

Key Words: Pulmonary vasodilatation; Hepatopulmonary syndrome; Estrogen; Pulmonary intravascular macrophage accumulation

Zhang Y, Zhang FK, Wang BE. Advance in the role of pulmonary vasodilatation in the pathogenic mechanism of hepatopulmonary syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(6):612-616

摘要

肺血管扩张是肝肺综合征的主要发病机制, 然而导致HPS肺血管扩张的机制相当复杂, 至今仍不清楚。目前认为肺血管内巨噬细胞聚积和雌激素升高导致的血管活性因子增多和活性

增强可能与此有关, 近年来这方面的研究很多, 本文对此作一综述。

关键词: 肺血管扩张; 肝肺综合征; 雌激素; 肺血管内巨噬细胞聚积

张影, 张福奎, 王宝恩. 肺血管扩张在肝肺综合征发病机制中作用的研究进展. *世界华人消化杂志* 2007;15(6):612-616

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/612.asp>

0 引言

肝肺综合征(hepatopulmonary syndrome, HPS)是指肝功能不全引起肺血管扩张、肺气体交换障碍导致的低氧血症及其一系列的病理生理变化和临床表现。肺血管扩张在HPS的发病过程中起重要作用, 是导致低氧血症最重要的原因^[1]。目前对于HPS的肺血管扩张的机制仍不清楚, 近年来的研究表明, 肺血管扩张与肺血管内巨噬细胞聚积和雌激素升高导致的血管活性因子增多和活性增强有关, 本文就相关文献综述如下。

1 肺血管扩张是HPS的主要发病机制

HPS出现低氧血症的原因有: (1)通气/灌注不匹配; (2)肺泡-毛细血管弥散功能障碍; (3)通气功能低下; (4)氧合血红蛋白亲和能力失常; (5)伴随腹水的机械效应。HPS所致低氧血症最主要原因是肺通气/灌注不匹配, 肺血管扩张是引起肺通气/灌注不匹配出现低氧血症的主要原因^[2]。肺泡毛细血管扩张, 来自邻近肺泡的氧不能弥散入扩张的毛细血管血流中央与红细胞血红蛋白结合, 且扩张的毛细血管使得红细胞更快地通过肺实质, 这样就降低了红细胞氧合的时间, 即使吸入纯氧仅能部分改善氧合。肝硬化患者同时伴有的血容量增多和血流量增加, 致使肺泡弥散的容积普遍下降。此外, 扩张的毛细血管因缺乏平滑肌细胞而对外界刺激的反应很小, 肺微循环在慢性肝病时丧失了自我调节的能力, 造成通气/灌注不匹配^[3]。病理学改变普遍认为HPS肺部基本改变为弥漫性肺血管扩张。尸检可见肺循环紊乱, 肺内动-静脉短路, 血管扩张,

肺动脉肌层增厚. 另外, 肝硬化伴低血氧时胸膜或胸膜下常见蜘蛛痣样改变. 在鼠HPS模型中证实毛细血管扩张, 密度增大, 体肺循环连接增多. 对伴有低氧血症的严重肝病患者作尸检可以发现肺毛细血管直径从正常的8-15 μm 扩张至15-160 μm (最大达500 μm)^[4], 异常的动静脉交通支形成, 肺气体交换障碍导致的动脉血液氧合作用异常——肺泡气-动脉血氧分压差(A-APO₂)上升, 甚至低氧血症, 是HPS的重要的病理生理基础.

2 介导肺血管扩张的血管活性因子

2.1 一氧化氮(nitric oxide, NO)与肺血管扩张 NO在HPS发病机制中的作用成为研究的热点. 大量的研究已经证实NO与肝硬化和肝肺综合征患者的肺血管扩张的形成密切相关^[5], HPS时肺内NO生成增多, Rolla *et al*^[6]观察到HPS患者呼出气体中NO含量是正常人的3倍, 肝移植术后3 mo患者呼出气体中NO含量又恢复正常, 可能因为吸收的内毒素刺激产生NO, 由于肝硬化门体分流及网状内皮细胞功能下降而不能有效清除. 使用NO合酶(NO synthase, NOS)抑制剂亚甲蓝, HPS患者的低氧血症得到迅速纠正, 说明HPS肺内NO释放过多导致了低氧血症的发生^[7]. 大多数HPS出现在肝硬化和门静脉高压的患者当中, 因此认为触发HPS肺血管扩张的机制与触发肝硬化高动力循环的血管扩张机制是相同的. 然而HPS的很多临床特征不支持上述观点, 因为HPS肺血管扩张与血液高动力循环导致的内脏血管扩张有明显的区别. 首先, 血液高动力循环发生的内脏血管扩张随着肝脏合成功能的恶化而逐渐加重, 而HPS通常发生于有良好肝脏合成功能储备的肝病患者当中(通常为Child A)^[5]. 第二, 尽管内脏血管扩张的程度随着肝功能的恶化逐步加重, 但只有不到25%的患者最终发展为HPS^[8]. 第三, 尽管HPS罕见于孤立的门静脉高压, 但HPS可以发生在没有发生肝硬化的肝病患者当中^[9]. 这些研究暗示肺NO的过度产生和肝脏损害在HPS发生过程中的作用, 因此推测触发肺NO产生增加的机制与血液高动力循环时的NO产生增加的机制是不同的. 肺血管内皮型NO合酶NOS(endothelial NO synthase, eNOS)和诱生型NO合酶(inducible NO synthase, iNOS)的表达和活性增强是肺内NO产生增加的基础. eNOS活性增强所致低氧血症、过度通气、A-APO₂增加、对新福林反应降低, 这些改变都可被NOS

抑制剂所逆转. 用结扎胆总管(common bile duct ligation, CBDL)制成的HPS动物模型及结扎门静脉(portal vein ligation, PVL)制成的门静脉高压动物模型(无HPS)的研究显示, 大鼠CBDL后的HPS的发生是可预见的, 通常发生于肝硬化形成之前, 并且先于门静脉高压和全身血管扩张完全出现之前, 而在PVL组, 这些动物出现无肝硬化的血液高动力循环状态, 未发生HPS. 同时发现在CBDL组肺内肺血管内皮eNOS的表达和NO活性增加, 这与CBDL后HPS的发生密切相关, 这些研究说明eNOS来源的NO在HPS形成过程中的作用. 通过对CBDL后2 wk内在HPS开始时的肝脏产生和血浆中的ET-1水平观察, 均显著增加. 血浆中ET-1增加的程度与肺血管内皮eNOS的增加显著相关, 同时也与肺血管的扩张程度、气体交换障碍的程度显著相关, 说明肺血管ET-1与肺内eNOS的合成增多有关^[10]. HPS患者体内代谢产物的蓄积也是eNOS合成增多的原因之一. 内皮素1(endothelin-1, ET-1)是一种急性的血管收缩因子, 正常环境下, 由血管内皮细胞产生通过局部的自分泌和旁分泌途径调节血管的紧张度, 他通过ET-A和ET-B受体与血管活性因子包多NO相互作用和相互影响, 但在动物研究中显示结扎门静脉后出现肺eNOS的合成增加和肺血管扩张, 这说明ET-1触发了HPS的NO生成增多和肺血管扩张. ET-1的血管活性作用包括血管收缩和血管舒张, 存在于血管平滑肌细胞上的ET-A受体介导血管收缩, 而存在于血管内皮细胞上的ET-B受体被激活后使内皮细胞释放NO导致血管舒张. 血浆ET-1的浓度直接影响血管的舒缩功能, ET-1低浓度时主要引起血管舒张, ET-1高浓度时主要引起血管收缩. 推测肝硬化时肝脏损害使肝内ET-1增加, 加上肝脏灭活功能减退的侧支循环开放使门静脉血直接流入体循环可能是外周血ET-1增加的原因之一. Morawietz *et al*^[11]发现肝硬化和门静脉高压时肺血管ET-B受体选择性地表达增加, 导致ET-B受体介导的ET-1诱导内源性NO的生成增加, 从而导致HPS肺血管扩张. 另外, Nunes *et al*^[12]用结扎胆总管制成的HPS动物模型研究发现肺内血管内巨噬细胞表达诱生型NOS(iNOS)增加, 这同样认为是内源性NO的重要来源. 减少巨噬细胞聚积可使iNOS正常, 而不是eNOS, 这支持细菌易位在肺内巨噬细胞聚积及肺血管扩张发挥着重要作用^[13]. 然而目前对于HPS时内源性NO产生增加以及其与门静脉高压、高动力循环和肝脏

■应用要点

目前, 针对HPS的药物不多, 针对性不强, 因此通过本综述, 使用抗生素抗感染治疗和降低雌激素的治疗有可能开辟HPS治疗的一个有效的途径.

■名词解释

肝肺综合征(HPS):是指肝功能不全引起肺血管扩张、肺气体交换障碍导致的低氧血症及其一系列的病理生理变化和临床表现。肺血管扩张在HPS的发病过程中起重要作用,是导致低氧血症最重要的原因。

疾病的严重程度关系仍不清楚,有待进一步研究。

2.2 一氧化碳(carbon monoxide, CO)与肺血管扩张 最近的研究用CBDL制成的HPS动物模型研究发现血红素加氧酶-1(HO-1)的表达及CO的生成增加,说明CO与HO-1参与了肺血管扩张^[14-15]。CO与NO的很多作用是相似的,如松弛平滑肌、阻止血小板聚积。血红素加氧酶催化反应和酶的微粒体脂质过氧化反应是体内生成内源性CO的主要来源^[16]。HO的催化反应主要将血红素转化为CO,铁和胆绿素。HO分为HO-1和HO-2两类。HO-1是诱导酶,HO-2是组成性基因表达的酶^[17]。HO-2主要表达于内皮细胞和毗邻的血管神经细胞。HO-1是一种诱导酶,正常情况下极少表达,在多种类型应激情况下表达,如氧化应激、缺血、内毒素、缺血-再灌注损伤、细胞因子、炎症等许多刺激都能诱导此酶的产生,从而增加CO、胆绿素和继之胆红素的产生。HO-1在一些严重炎症反应中的保护性作用也已经被证实。另外,HO-2催化反应产生的内源性CO在维持肝血窦紧张度和远端肺动脉血管紧张度方面发挥着重要作用。CO可作为细胞间和细胞内信号分子,激活鸟苷酸环化酶,增加细胞内cGMP含量,进而表现出舒血管平滑肌的功能,发挥增加血流量,调节血压的作用。这些研究说明CO参与了HPS的肺血管扩张。

3 肺血管内巨噬细胞聚积与肺血管扩张

正常情况下,尽管大鼠和人的肺血管内没有发现巨噬细胞,但在一些动物的肺微血管内却发现了巨噬细胞,许多学者在大鼠HPS模型上发现CBDL后肺血管内皮黏附大量单核吞噬性细胞,其形态和功能与猪和羊体内的肺血管内巨噬细胞相似^[18]。从而证实HPS时,大鼠体内诱导产生了肺血管内巨噬细胞。在炎症反应过程中,由于肝脏解毒功能减退,肺脏代偿性成了清理细菌和毒素主要场所。血液单核细胞黏附、聚积于肺血管内皮,分化成肺血管内巨噬细胞。吞噬功能增强,以清除血液中的肠道菌群和内毒素。通过电镜和放射性核素扫描的定量分析发现CBDL后的2-3 wk可以发现吞噬活性的巨噬细胞。这些巨噬细胞没有随着时间推移而移入肺实质内,同时别的组织也没有发现巨噬细胞聚积^[19]。Rabiller *et al*^[13]研究发现,革兰氏阴性杆菌的肠道菌群易位率与内毒素及肺血管内巨噬细胞内iNOS的水平相关,用诺氟沙星抑制肠道菌

群易位后,附壁的肺血管内巨噬细胞数量减少,iNOS的水平恢复正常,HPS症状缓解。iNOS主要存在于巨噬细胞、中性粒细胞、免疫细胞等。正常状态下,细胞内iNOS表达水平较低,经细胞因子及内毒素等诱导,iNOS表达增多。iNOS的作用时间长,可以催化生成大量NO,这同样认为是内源性NO的重要来源。但大鼠CBDL后肺血管内巨噬细胞表达iNOS是短暂的,3 wk后活性下降,而HO-1的表达则逐渐增强,并伴有CO的产生增多,从而导致肺血管扩张,引起HPS的发生^[16]。用HO-1抑制剂可使迟钝的血管缺氧性收缩反应得到部分纠正,而用NOS抑制剂治疗后,HO-1的表达和血管缺氧性收缩反应均恢复正常^[14]。因此推测可能是NO引起缺氧性收缩反应迟钝,并诱导HO-1产生,进而使CO产生增多,两者协同作用于HPS。肺血管内巨噬细胞可分泌多种炎症因子。TNF- α 是具有广泛生物活性的细胞活化因子。TNF- α 可刺激肺血管内巨噬细胞聚积,活化,分泌更多的HO-1及iNOS,从而间接参与HPS肺血管扩张。如果在CBDL前选择性应用抗生素进行肠道预防感染和抑制TNF- α 治疗可以减少巨噬细胞的数量和HPS的发生,CBDL动物模型肺血管内巨噬细胞聚积与循环系统内的TNF- α 有关^[20]。Sztrymf *et al*^[21]发现给予HPS模型应用TNF- α 抑制剂5 wk后,血液中TNF- α 浓度下降;肺血管内巨噬细胞聚积减弱,肺组织内iNOS表达下降,从而认为抑制巨噬细胞产生肿瘤坏死因子 α (TNF- α)可以改善HPS。然而TNF- α 的作用机制目前仍不清楚,一项近期的研究表明肺内血管巨噬细胞聚积发生在循环系统内TNF- α 增加之前,与循环系统内ET-1的短暂增加相关,并且通过阻断ET-B受体能够减少肺血管内巨噬细胞的聚积,iNOS和HO-1的表达降低,肺血管扩张程度减轻^[16],说明ET-1和TNF- α 的相互作用导致了肺血管扩张^[22]。这些研究表明肺血管内巨噬细胞聚积通过产生NO,CO和炎性细胞因子导致了HPS肺血管扩张。

4 雌激素与肺血管扩张

最近,Yol *et al*^[23]用结扎胆总管制成的大鼠肝硬化动物模型研究发现,肺血管扩张是HPS的标志之一,雌激素在肺血管的形成中发挥着重要作用,同时发现 η 大鼠出现了低氧血症。实验将大鼠分为三组,一组为切除卵巢的雌激素缺陷组,一组为由于肝硬化所致的内源性雌激素增加组及通过注射雌激素所致的外源性雌激素增

加组. 通过对上述三组的研究发现, 外周肺血管包括动脉、毛细血管和静脉的直径随着血清雌激素水平的增加而增加. 动脉血氧分压、动脉血氧饱和度随着血清雌激素水平的增高而减小, 同时发现血清NO的水平也在增高. 因此推测雌激素可能介导肺血管扩张是通过增加NO的产生, 从而导致HPS♀大鼠低氧血症的发生. 临床研究发现HPS血清中雌激素水平的升高可引起肺血管紧张度下降, 肺血管扩张, 导致低氧血症, 抗雌激素的外科治疗可以降低血清中雌激素和NO水平, 减轻肺血管扩张及低氧血症^[24]. 然而, 雌激素对HPS时肺血管扩张和低氧血症形成的直接作用的机制目前仍不清楚. 理论上, 可能是由于肝功能衰竭或门静脉高压导致循环血液中血管活性物质如雌激素、孕酮清除代谢障碍所导致. 雌激素引起肝硬化患者的毛细血管扩张, 同样也可以引起HPS肺血管扩张. Gates *et al*^[25]认为雌激素引起的扩血管效应是由于NO的生成有关. Sumi *et al*^[26]也证实雌激素可刺激内皮细胞NO的生成. McNeill *et al*^[27]给大鼠注射雌激素后出现扩血管效应及血清中NO水平的升高. 使用NOS抑制剂可阻断雌激素的扩血管效应. 雌激素可以经由内皮依赖和非内皮依赖途径导致短暂的血管扩张, 但这种快速扩血管效应并不会改变基因的表达. 雌激素快速扩血管效应的机制已经明确, 一种是通过改变离子通道的功能状态, 另一种是通过内皮细胞产生NO而发挥扩血管效应. 雌激素一方面通过改变细胞膜的L型钙离子通道的功能状态而阻止细胞外的Ca²⁺内流进入血管平滑肌细胞, 另一方面通过NO-CGMP途径引起Ca²⁺激活的K⁺通道开放, 二者作用导致血管平滑肌松弛, 血管扩张. 雌激素的α受体通过不改变基因表达的方式介导eNOS的合成, 引起短暂的扩血管效应, 同时, 也可以通过改变基因表达的方式介导eNOS的合成, 引起长期的扩血管效应. 肝硬化时, 雌激素增加一些重要的扩血管酶如前列环素合成酶、NOS的基因表达引起长期的扩血管效应, 对已经终止长期接受雌激素治疗的卵巢切除动物模型中收集的血管环的研究发现, 其对乙酰胆碱并不产生血管收缩效应, 这些结果说明雌激素至少部分是通过长期增加一种或多种NOS的基因表达介导肺血管扩张. 另外, 雌激素也可增加iNOS的基因表达而提高血管内NO的生物利用度. 这些机制有助于我们解释HPS患者雌激素升高引起肺血管扩张的原因, 雌激素可能是通过增加NOS

的活性而增加NO的生成, 从而引肺血管扩张.

总之, 肺血管扩张是HPS发生的重要机制, 目前的研究认为肺血管内巨噬细胞聚积和雌激素升高导致的血管活性因子增多和活性增强, 然而是否有其他因素参与, 仍有待进一步研究.

5 参考文献

- 1 Castro M, Krowka MJ. Hepatopulmonary syndrome. A pulmonary vascular complication of liver disease. *Clin Chest Med* 1996; 17: 35-48
- 2 Hoepfer MM, Krowka MJ, Strassburg CP. Portopulmonary hypertension and hepatopulmonary syndrome. *Lancet* 2004; 363: 1461-1468
- 3 Alizadeh AH, Fatemi SR, Mirzaee V, Khoshbaten M, Talebipour B, Sharifian A, Khoram Z, Haj-sheikh-oleslami F, Gholamreza-shirazi M, Zali MR. Clinical features of hepatopulmonary syndrome in cirrhotic patients. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1954-1956
- 4 Schraufnagel DE, Kay JM. Structural and pathologic changes in the lung vasculature in chronic liver disease. *Clin Chest Med* 1996; 17: 1-15
- 5 Fallon MB, Abrams GA, Luo B, Hou Z, Dai J, Ku DD. The role of endothelial nitric oxide synthase in the pathogenesis of a rat model of hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology* 1997; 113: 606-614
- 6 Rolla G, Brussino L, Colagrande P, Scappaticci E, Morello M, Bergerone S, Ottobrelli A, Cerutti E, Polizzi S, Bucca C. Exhaled nitric oxide and impaired oxygenation in cirrhotic patients before and after liver transplantation. *Ann Intern Med* 1998; 129: 375-378
- 7 Zhang XJ, Katsuta Y, Akimoto T, Ohsuga M, Aramaki T, Takano T. Intrapulmonary vascular dilatation and nitric oxide in hypoxemic rats with chronic bile duct ligation. *J Hepatol* 2003; 39: 724-730
- 8 Krowka MJ, Wiseman GA, Burnett OL, Spivey JR, Therneau T, Porayko MK, Wiesner RH. Hepatopulmonary syndrome: a prospective study of relationships between severity of liver disease, PaO₂ response to 100% oxygen, and brain uptake after (99m)Tc MAA lung scanning. *Chest* 2000; 118: 615-624
- 9 Gupta D, Vijaya DR, Gupta R, Dhiman RK, Bhargava M, Verma J, Chawla YK. Prevalence of hepatopulmonary syndrome in cirrhosis and extrahepatic portal venous obstruction. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 3395-3399
- 10 姚冬梅, 姚希贤, 杨川杰, 冯志杰, 房红梅, 高军萍. 肝硬化不同病期ET-1, NO对离体肝脏血流动力学的调节作用. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 726-729
- 11 Morawietz H, Talanow R, Szibor M, Rueckschloss U, Schubert A, Bartling B, Darmer D, Holtz J. Regulation of the endothelin system by shear stress in human endothelial cells. *J Physiol* 2000; 525 Pt 3: 761-770
- 12 Nunes H, Lebrec D, Mazmanian M, Capron F, Heller J, Tazi KA, Zerbib E, Dulmet E, Moreau R, Dinh-Xuan AT, Simonneau G, Herve P. Role of nitric oxide in hepatopulmonary syndrome in cirrhotic rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 879-885
- 13 Rabiller A, Nunes H, Lebrec D, Tazi KA, Wartski M, Dulmet E, Libert JM, Mougeot C, Moreau R, Mazmanian M, Humbert M, Herve P. Prevention of

同行评价

本文对肺血管扩张在肝肺综合征中的发病机制与研究进展进行综述, 目的明确, 查阅文献充分, 条理清楚, 有参考价值.

- gram-negative translocation reduces the severity of hepatopulmonary syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 514-517
- 14 Luo B, Liu L, Tang L, Zhang J, Ling Y, Fallon MB. ET-1 and TNF-alpha in HPS: analysis in prehepatic portal hypertension and biliary and nonbiliary cirrhosis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G294-303
- 15 Carter EP, Hartsfield CL, Miyazono M, Jakkula M, Morris KG Jr, McMurtry IF. Regulation of heme oxygenase-1 by nitric oxide during hepatopulmonary syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283: L346-353
- 16 Zhang J, Ling Y, Luo B, Tang L, Ryter SW, Stockard CR, Grizzle WE, Fallon MB. Analysis of pulmonary heme oxygenase-1 and nitric oxide synthase alterations in experimental hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology* 2003; 125: 1441-1451
- 17 姜柳琴, 林琳. 血红素氧合酶/一氧化碳体系在胃肠道的的作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1612-1616
- 18 Brain JD, Molina RM, DeCamp MM, Warner AE. Pulmonary intravascular macrophages: their contribution to the mononuclear phagocyte system in 13 species. *Am J Physiol* 1999; 276: L146-154
- 19 Chang SW, Ohara N. Chronic biliary obstruction induces pulmonary intravascular phagocytosis and endotoxin sensitivity in rats. *J Clin Invest* 1994; 94: 2009-2019
- 20 Miot-Noirault E, Faure L, Guichard Y, Montharu J, Le Pape A. Scintigraphic in vivo assessment of the development of pulmonary intravascular macrophages in liver disease: experimental study in rats with biliary cirrhosis. *Chest* 2001; 120: 941-947
- 21 Sztrymf B, Rabiller A, Nunes H, Savale L, Lebrec D, Le Pape A, de Montpreville V, Mazmanian M, Humbert M, Herve P. Prevention of hepatopulmonary syndrome and hyperdynamic state by pentoxifylline in cirrhotic rats. *Eur Respir J* 2004; 23: 752-758
- 22 Luo B, Liu L, Tang L, Zhang J, Ling Y, Fallon MB. ET-1 and TNF-alpha in HPS: analysis in prehepatic portal hypertension and biliary and nonbiliary cirrhosis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G294-303
- 23 Yol S, Erikoglu M, Toprak SS, Tavli S, Tavli L. The effects of serum estrogen levels on hypoxemia and blood nitric oxide levels in experimental hepatopulmonary syndrome. *Hepatol Res* 2005; 33: 7-13
- 24 Aller R, Moya JL, Avila S, Villa J, Moreira V, Barcena R, Boxeida D, de Luis DA. Implications of estradiol and progesterone in pulmonary vasodilatation in cirrhotic patients. *J Endocrinol Invest* 2002; 25: 4-10
- 25 Gates EJ, Hirschfield L, Matthews RP, Yap OW. Body mass index as a prognostic factor in endometrioid adenocarcinoma of the endometrium. *J Natl Med Assoc* 2006; 98: 1814-1822
- 26 Sumi D, Ignarro LJ. Estrogen-related receptor alpha 1 up-regulates endothelial nitric oxide synthase expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 14451-14456
- 27 McNeill AM, Duckles SP, Krause DN. Relaxant effects of 17 beta-estradiol in the rat tail artery are greater in females than males. *Eur J Pharmacol* 1996; 308: 305-309

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

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加盖公章后,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年5月31日.有关会议的具体事项另行通知.

联系电话:025-83472831, 86086091.

肝源性糖尿病的诊断与治疗

姜丽萍, 赵金满

姜丽萍, 赵金满, 中国医科大学附属第一附属医院消化内科
辽宁省沈阳市 110001
通讯作者: 赵金满, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属
第一附属医院消化内科. ping_ping_j@163.com
电话: 024-83282199
收稿日期: 2006-11-26 接受日期: 2006-12-11

Diagnosis and therapy of hepatogenous diabetes

Li-Ping Jiang, Jin-Man Zhao

Li-Ping Jiang, Jin-Man Zhao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Correspondence to: Jin-Man Zhao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. ping_ping_j@163.com
Received: 2006-11-26 Accepted: 2006-12-11

Abstract

Hepatogenous diabetes, whose occurrence rate was found correlated with the types of hepatitis virus, is regarded as the secondary diabetes due to the damage of liver parenchyma, and it is characterized by high blood sugar and lowered glucose tolerance. Many studies demonstrated that insulin resistance, decrease of serum insulin-like growth factor-1, and elevation of growth hormone existed in patients with hepatogenous diabetes. Both liver damage and diabetes should be considered in the diagnosis and treatment of hepatogenous diabetes, which was different from those of type 2 diabetes, so we concluded the related studies in this article.

Key Words: Liver cirrhosis; Diabetes mellitus; Insulin resistance; Hepatic diabetes; Growth hormone; Diagnosis; Therapy

Jiang LP, Zhao JM. Diagnosis and therapy of hepatogenous diabetes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(6):617-621

摘要

肝源性糖尿病是指继发于肝实质损害的糖尿病, 临床表现以高血糖, 葡萄糖耐量减低为特

征, 其发病率与感染的肝炎病毒类型有关. 研究表明肝源性糖尿病患者多存在胰岛素抵抗, 血清胰岛素样生长因子(IGF-1)降低及生长激素(GH)水平增高. 在诊断与治疗方面与2型糖尿病有所不同, 要兼顾肝损害和糖尿病两个方面, 本文就此方面加以论述.

关键词: 肝硬化; 糖尿病; 胰岛素抵抗; 肝源性糖尿病; 生长激素; 诊断; 治疗

姜丽萍, 赵金满. 肝源性糖尿病的诊断与治疗. 世界华人消化杂志 2007;15(6):617-621

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/617.asp>

0 引言

肝源性糖尿病(hepatogenous diabetes), 是指继发于肝实质损害的糖尿病, 临床表现以高血糖, 葡萄糖耐量减低为特征^[1]. 我国肝源性糖尿病多继发于慢性肝炎、肝硬化. 据统计, 国外有35%-80%的肝硬化患者存在糖耐量异常或糖尿病^[2].

1 肝源性糖尿病的发病率

据报道, 肝源性糖尿病的发病率与感染的肝炎病毒类型有关. Caronia *et al*^[3]对意大利西西里地区1151名患有丙型肝炎致肝硬化患者的研究发现, 其中糖尿病的发病率为23.6%, 与国内报道的发病率27.6%接近^[4]. 埃及和沙特阿拉伯在对丙型肝炎的研究中也分别发现25%, 21%的糖尿病发病率^[5-6]. Lecube *et al*^[7]研究表明, 在慢性肝病患者中, 丙型肝炎感染的患者的空腹糖耐量异常(IFG)是非丙型肝炎感染的3倍; 而丙型肝炎感染患者中既存在IFG又发现糖尿病的是非丙型肝炎感染的2.5倍. Mehta *et al*^[8]对丙型肝炎和糖尿病之间的相关性进行了分析, 发现9841名21岁以上成人中, 40岁以上丙型肝炎患者患2型糖尿病患者数是非丙型肝炎患者的3倍, 而且丙型肝炎比其他肝病更容易患糖尿病^[9-11]. 这与种族、年龄、性别、身高体质量指数、糖尿病家族史、HCV-1b和-2a基因型、胰岛素抵抗

■背景资料

肝源性糖尿病是指继发于肝实质损害的糖尿病, 临床表现以高血糖, 葡萄糖耐量减低为特征. 研究认为其发病率与感染的肝炎病毒类型有关. 目前有关肝源性糖尿病的诊断与治疗的研究较少.

■应用要点

本文对肝源性糖尿病的诊断和治疗进行了总结,在发病机制方面提出了新的见解,可以指导临床进行诊断和治疗,提出治疗的新方案。

及肝病严重程度有关^[3-4,6,8,12-18]。与之相比,乙型肝炎患者中患糖尿病的几率要小得多,统计为9%-16%^[3,6,19],其机制有待进一步研究。

2 肝源性糖尿病的发病机制

肝脏是调节体内糖代谢的重要器官^[20-25],同时它与激素的关系十分密切^[26]。肝脏既是许多激素分解代谢的主要场所,又是许多激素作用的主要靶位。因此,肝脏疾病可以引起机体的代谢紊乱^[27]。研究表明肝源性糖尿病患者多存在胰岛素抵抗,血清胰岛素样生长因子(IGF-1)降低及生长激素(GH)水平增高。

2.1 胰岛素抵抗发生机制 (1)高胰岛素血症:肝病者由于肝脏对胰岛素的摄取减少,出现高胰岛素血症,而不是由于胰腺高分泌^[28-29]。正常情况下50%-80%的胰岛素经肝脏清除^[30]。由于肝硬化时肝细胞数目减少及肝功能减退胰岛素灭活减少,同时伴侧枝循环时部分胰岛素可绕过肝脏进入体循环,使肝脏摄取胰岛素减少,造成高胰岛素血症^[31]。而胰岛素水平的增加可引起外周组织,如肝细胞、脂肪细胞和肌肉细胞胰岛素受体数目的减少和与胰岛素的亲和力降低。C肽和胰岛素是等摩尔分泌的^[32],50%以上的胰岛素通过肝脏首过作用降解,而C肽在肾内降解^[32]。通过对血清中C肽和胰岛素的同时检测,有助于判断胰腺胰岛素分泌情况和肝脏胰岛素摄取水平^[33-34]。胰腺胰岛素分泌异常者,血清中C肽和胰岛素水平往往同步变化;肝脏摄取胰岛素异常者,往往会出现高胰岛素血症,而C肽水平正常。若二者均有异常,血清中C肽和胰岛素水平变化情况有待于进一步的研究。王晶桐 *et al*^[35]对15例肝源性糖尿病患者和20例2型糖尿病患者进行了糖耐量实验(OGTT),结果表明,两组患者空腹胰岛素水平接近,服糖后30, 60, 120及180 min胰岛素水平差异显著;与2型糖尿病患者相比,肝源性糖尿病患者存在明显的高胰岛素血症,而C肽分泌曲线正常,高峰出现在服糖后的120 min;2型糖尿病患者C肽分泌曲线低平,高峰后移至服糖后180 min。故通过OGTT实验可初步鉴别肝源性糖尿病及2型糖尿病;(2)血浆拮抗胰岛素的物质水平升高:如血浆胰高糖素、生长激素及游离脂肪酸(FFA)水平由于肝脏对其灭活减少而升高,从而产生外周组织的胰岛素抵抗。体外细胞培养表明^[36],FFA能促进胰岛细胞增生、分泌胰岛素,并可能通过酪氨酸磷酸酶PTP1B抑制胰岛素的信号传导,导致/加重胰岛素抵抗;(3)其他

原因:如应激、创伤性治疗(如TIPS)等使肝功下降可加重高胰岛素血症^[37-38]。胰岛素抵抗是肝硬化患者糖耐量异常及肝源性糖尿病的最主要原因之一^[39-40]。

2.2 IGF-1与肝源性糖尿病 IGF-1是一种肝脏依赖GH刺激合成的同化激素,由70个氨基酸组成,相对分子质量约为7500 Da,其序列70%与胰岛素同源,与IGF-2一起被称为生长介素(somatomedin)^[41]。他主要由人肝细胞合成和分泌,具有内分泌、自分泌及旁分泌特性。血浆中75% IGF-1与IGF-1结合蛋白-3(IGFBP-3)和酸易变亚单位(acid-labile subunit, ALS)结合为三元复合体^[42-43]。在人体内,IGF-1通过IGF-1受体介导发挥其胰岛素效应,他对糖代谢的主要细胞内代谢途径与胰岛素相似。IGF-1能抑制GH和胰岛素分泌,降低高胰岛素血症,还可以改变自主神经活性,增加骨骼肌血流量,提高胰岛素或胰岛素受体后敏感性^[42],从而降低血糖。肝硬化患者IGF-1显著降低^[44],随病情加重,IGF-1, IGF-2亦随之降低^[41],最终引起糖代谢紊乱导致糖尿病的发生。因此,有学者提出,IGF-1可用来治疗糖尿病和胰岛素抵抗,而加强IGFs, IGFBP-3等应用方面的研究将具有重要的临床价值。

2.3 生长激素升高的发生机制 正常情况下, GH通过肝脏GH受体(GHR)促进肝脏IGF-1基因的表达从而促进IGF-1的合成和释放;IGF-1反馈抑制垂体生长激素的释放,此即GH/IGF-1轴;血清中IGF-1的浓度和血清中GH水平在24 h内大致平行。而肝源性糖尿病患者此轴发生了异常,血清中GH水平增高。张卫卫 *et al*^[45]对40例肝硬化患者进行研究,应用放射免疫法测定空腹GH水平,发现肝硬化患者空腹GH水平增加,并与肝硬化Child-Pugh积分呈显著正相关。

肝源性糖尿病患者产生高GH血症的原因主要有:(1)肝细胞损伤致使肝脏对GH的清除能力下降;(2)垂体前叶分泌GH异常;(3)GH抵抗。Wang *et al*^[46]发现,肝硬化肝细胞表达GHR水平降低;Donaghy *et al*^[47]发现,肝硬化患者肝组织GHR mRNA和酸不稳定亚单位(ALS) mRNA水平降低。同时肝硬化患者存在高胰岛素血症,而胰岛素可抑制外周GH受体,这样GH与有效的GH受体结合减少,使IGF-1水平下降,从而削弱了IGF-1对垂体分泌GH的负反馈调节,使垂体前叶分泌GH增多。高GH血症可使肝脏处理葡萄糖的能力减退,糖原分解和糖异生能力增强;另外可使游离脂肪酸增加,使外周组织对葡萄糖摄

取和氧化降低^[48], 促使周围组织抵抗胰岛素, 从而导致糖代谢异常. 因此检测肝源性糖尿病患者的血GH水平, 有助于了解葡萄糖的代谢情况. Dunger *et al*^[49]指出, 在1型、2型糖尿病患者中, GH/IGF-1轴亦是异常的: GH增高, IGF-1降低. 这与肝源性糖尿病患者血清学中的改变是相同的, 而二者的改变程度是否存在显著性差异需要临床的进一步研究. 随着对GH/IGF-1轴认识的深入, 重组人生长激素(rhGH)及IGF-1可能成为肝源性糖尿病的一种有吸引力的新的治疗手段. 研究表明, 外源性GH可以明显改善肝硬化患者生长激素抵抗现象^[50]和胰岛素抵抗现象^[51].

3 临床表现及诊断

肝源性糖尿病患者的临床表现为有的隐性, 有的显性, 症状轻重不等; 但与原发性糖尿病相比, 典型的“三多”症状多不明显^[52-54], 往往被慢性肝病症状: 乏力、纳差、腹胀、脾大、黄疸及腹水等所掩盖, 极少发生酮症酸中毒等并发症^[55], 同时糖尿病神经及血管并发症的发生率也较2型糖尿病的低^[56]. 肝源性糖尿病患者以空腹血糖正常或轻度升高, 而餐后血糖明显升高为特征^[57].

肝源性糖尿病的诊断: (1)在糖尿病发生之前有明确的肝病史, 有时与肝病同时发生; (2)无糖尿病既往史和家族史, 糖尿病症状轻或无; (3)有明确肝功能损害的临床表现, 血生化检查和影像学检查的证据; (4)符合美国糖尿病协会(ADA)的糖尿病诊断标准: 空腹血糖 ≥ 7.0 mmol/L, 餐后2 h血糖 ≥ 11.1 mmol/L. 但部分患者空腹血糖可轻度升高或正常. OGTT的曲线形态偏高, 表现高峰、高坡或趋高型; 若OGTT示餐前血糖正常或轻度升高, 餐后血糖 ≥ 11.1 mmol/L可确诊糖尿病; 若 >7.8 mmol/L而 <11.1 mmol/L则诊断为糖耐量减退. 因此, 对不能做OGTT的患者应经常测定空腹和餐后2 h血糖值, 以求早期诊断糖尿病; (5)胰岛素释放试验显示, 空腹血浆胰岛素水平偏高, 餐后胰岛素反应不良或反应延迟; 血清C肽释放试验一般正常或下降, C肽与胰岛素的比值明显减少; (6)血糖和糖耐量的好转或恶化与肝功能的改变相关; (7)排除垂体、肾上腺、甲状腺等疾病所引起的继发性糖尿病及原发性糖尿病, 尤其是2型糖尿病.

4 治疗

治疗要兼顾肝损害和糖尿病两个方面, 在治疗原发肝病的同时, 使血糖得到控制. 肝源性糖尿

病的治疗目的: 改善和保护肝功能, 降低高血糖, 缓解症状; 纠正脂代谢紊乱及其他代谢紊乱; 防治肝病及糖尿病各种急、慢性并发症的发生和发展, 降低死亡率; 通过教育, 使患者掌握自我监测, 自我保健的能力, 确保治疗达标^[58]. 肝源性糖尿病降糖治疗的达标标准: 餐后血糖6.7-9.0 mmol/L; 餐后2 h血糖6.7-12.0 mmol/L; 糖化血红蛋白7.0%-9.0%^[59]. 治疗中应注意: (1)尽量避免静脉输注大量葡萄糖及长期大量使用利尿剂, 以免影响糖代谢; (2)糖尿病患者饮食结构以高碳水化合物、低脂肪、低蛋白、高纤维素膳食为主. 肝源性糖尿病的饮食治疗原则与之相似, 但要注意兼顾肝病及糖尿病两方面, 如有食管静脉曲张的肝硬化患者选用适宜的高纤维膳食, 有肝性脑病的则限制蛋白质的摄入等; (3)原则上禁用口服降糖药, 主要是因为多数药物存在肝损害^[60-61]; 应尽量早用胰岛素^[62-63], 不但有效降低血糖, 还可有利肝细胞修复、肝功能恢复. 但对较轻的患者通过饮食治疗和口服 α -葡萄糖苷酶抑制剂可以较好的控制血糖; 若使用胰岛素应尽量选用人源的、短效胰岛素, 剂量由小到大, 并注意监测血糖的变化以调整胰岛素的用量. 若每日胰岛素量超过200 U, 提示体内产生胰岛素抗体^[59]; (4)有极少部分用胰岛素治疗无效的难治病例, 是否可以进行胰腺移植、胰岛细胞移植或是肝移植需要进一步的研究^[64-70].

5 参考文献

- Sibley SD, Palmer JP, Hirsch IB, Brunzell JD. Visceral obesity, hepatic lipase activity, and dyslipidemia in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 3379-3384
- Shetty A, Wilson S, Kuo P, Laurin JL, Howell CD, Johnson L, Allen EM. Liver transplantation improves cirrhosis-associated impaired oral glucose tolerance. *Transplantation* 2000; 69: 2451-2454
- Caronia S, Taylor K, Pagliaro L, Carr C, Palazzo U, Petrik J, O'Rahilly S, Shore S, Tom BD, Alexander GJ. Further evidence for an association between non-insulin-dependent diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1999; 30: 1059-1063
- Chen LK, Hwang SJ, Tsai ST, Luo JC, Lee SD, Chang FY. Glucose intolerance in Chinese patients with chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 505-508
- el-Zayadi AR, Selim OE, Hamdy H, Dabbous H, Ahdy A, Moniem SA. Association of chronic hepatitis C infection and diabetes mellitus. *Trop Gastroenterol* 1998; 19: 141-144
- Akbar DH, Siddique AM, Ahmed MM. Prevalence of Type-2 diabetes in patients with hepatitis C and B virus infection in Jeddah, Saudi Arabia. *Med Princ*

■同行评价

本文在发病机制上提出了新的见解, 有一定的新颖性, 通过这篇文章, 可以使读者更好的了解该疾病, 有助于临床的指导.

- Pract* 2002; 11: 82-85
- 7 Lecube A, Hernandez C, Genesca J, Esteban JI, Jardi R, Simo R. High prevalence of glucose abnormalities in patients with hepatitis C virus infection: a multivariate analysis considering the liver injury. *Diabetes Care* 2004; 27: 1171-1175
 - 8 Mehta SH, Brancati FL, Sulkowski MS, Strathdee SA, Szklo M, Thomas DL. Prevalence of type 2 diabetes mellitus among persons with hepatitis C virus infection in the United States. *Ann Intern Med* 2000; 133: 592-599
 - 9 Zein NN, Abdulkarim AS, Wiesner RH, Egan KS, Persing DH. Prevalence of diabetes mellitus in patients with end-stage liver cirrhosis due to hepatitis C, alcohol, or cholestatic disease. *J Hepatol* 2000; 32: 209-217
 - 10 Knobler H, Stagnaro-Green A, Wallenstein S, Schwartz M, Roman SH. Higher incidence of diabetes in liver transplant recipients with hepatitis C. *J Clin Gastroenterol* 1998; 26: 30-33
 - 11 王毅, 宋民喜, 蒋海燕, 郭广炎. 肝硬化与肝源性糖尿病关系探讨. *陕西医学杂志* 2003; 32: 711-713
 - 12 Zein CO, Levy C, Basu A, Zein NN. Chronic hepatitis C and type II diabetes mellitus: a prospective cross-sectional study. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 48-55
 - 13 Hui JM, Sud A, Farrell GC, Bandara P, Byth K, Kench JG, McCaughan GW, George J. Insulin resistance is associated with chronic hepatitis C virus infection and fibrosis progression [corrected]. *Gastroenterology* 2003; 125: 1695-1704
 - 14 Mehta SH, Brancati FL, Strathdee SA, Pankow JS, Netski D, Coresh J, Szklo M, Thomas DL. Hepatitis C virus infection and incident type 2 diabetes. *Hepatology* 2003; 38: 50-56
 - 15 Petit JM, Bour JB, Galland-Jos C, Minello A, Verges B, Guiguet M, Brun JM, Hillon P. Risk factors for diabetes mellitus and early insulin resistance in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2001; 35: 279-283
 - 16 Conjeevaram HS, Kleiner DE, Everhart JE, Hoofnagle JH, Zacks S, Afdhal NH, Wahed AS. Race, insulin resistance and hepatic steatosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2007; 45: 80-87
 - 17 Castera L. Steatosis, insulin resistance and fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2006; 52: 125-134
 - 18 Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Tsukamoto K, Kimura S, Moriya K, Koike K. Hepatitis C virus infection and diabetes: direct involvement of the virus in the development of insulin resistance. *Gastroenterology* 2004; 126: 840-848
 - 19 Knobler H, Schihmanter R, Zifroni A, Fenakel G, Schattner A. Increased risk of type 2 diabetes in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C virus infection. *Mayo Clin Proc* 2000; 75: 355-359
 - 20 Petersen KF, Krssak M, Navarro V, Chandramouli V, Hundal R, Schumann WC, Landau BR, Shulman GI. Contributions of net hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis to glucose production in cirrhosis. *Am J Physiol* 1999; 276: E529-535
 - 21 Custro N, Carroccio A, Ganci A, Scafidi V, Campagna P, Di Prima L, Montalto G. Glycemic homeostasis in chronic viral hepatitis and liver cirrhosis. *Diabetes Metab* 2001; 27: 476-481
 - 22 孟晓光, 王艳梅, 祝彦, 刘丽娜, 孟华. 肝硬化合并糖尿病60例临床分析. *大连医科大学学报* 2002; 24: 37-38
 - 23 Picardi A, D'Avola D, Gentilucci UV, Galati G, Fiori E, Spataro S, Afeltra A. Diabetes in chronic liver disease: from old concepts to new evidence. *Diabetes Metab Res Rev* 2006; 22: 274-283
 - 24 Roden M, Bernroider E. Hepatic glucose metabolism in humans-its role in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003; 17: 365-383
 - 25 Barthel A, Schmoll D. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285: E685-692
 - 26 Baruch Y. The liver: a large endocrine gland. *J Hepatol* 2000; 32: 505-507
 - 27 Brodanova M. Diabetes mellitus and the liver. *Vnitr Lek* 2001; 47: 238-244
 - 28 Kruszynska YT, Home PD, McIntyre N. Relationship between insulin sensitivity, insulin secretion and glucose tolerance in cirrhosis. *Hepatology* 1991; 14: 103-111
 - 29 Bonora E, Coscelli C, Orioli S, Cambi R, Buzzelli G, Gentilini P, Butturini U. Hyperinsulinemia of chronic active hepatitis: impaired insulin removal rather than pancreatic hypersecretion. *Horm Metab Res* 1984; 16: 111-114
 - 30 韩红梅, 朴云峰. 肝源性糖尿病发病机制的研究现状. *临床肝脏病杂志* 2006; 22: 152-153
 - 31 王亚民. 肝性糖尿病内源性胰岛素与C肽测定. *放射免疫学杂志* 1995; 8: 207-208
 - 32 Polonsky KS, Rubenstein AH. C-peptide as a measure of the secretion and hepatic extraction of insulin. Pitfalls and limitations. *Diabetes* 1984; 33: 486-494
 - 33 Johnson DG, Alberti KG, Faber OK, Binder C. Hyperinsulinism of hepatic cirrhosis: Diminished degradation or hypersecretion? *Lancet* 1977; 1: 10-13
 - 34 Iwasaki Y, Ohkubo A, Kajinuma H, Akanuma Y, Kosaka K. Degradation and secretion of insulin in hepatic cirrhosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1978; 47: 774-779
 - 35 王晶桐, 张雪松, 刘玉兰, 王智峰. 肝硬化患者糖代谢异常的临床研究. *医师进修杂志* 2001; 24: 23-25
 - 36 Nakai T, Tanimura H, Hirokawa F, Tamaki T. Altered hepatic hemodynamics and improved liver function following intrahepatic vascular infusion of prostaglandin E1. *J Gastroenterol* 1998; 33: 362-367
 - 37 Siegel EG, Seidenstucker A, Gallwitz B, Schmitz F, Reinecke-Luthge A, Kloppel G, Folsch UR, Schmidt WE. Insulin secretion defects in liver cirrhosis can be reversed by glucagon-like peptide-1. *J Endocrinol* 2000; 164: 13-19
 - 38 Kaser S, Foger B, Waldenberger P, Nachbauer K, Propst A, Jaschke W, Vogel W, Patsch JR. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS) augments hyperinsulinemia in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2000; 33: 902-906
 - 39 Petrides AS. Hepatogenic diabetes: pathophysiology, therapeutic options and prognosis. *Z Gastroenterol* 1999; Suppl 1: 15-21
 - 40 李伟民, 徐魁, 彭少华, 夏忠胜. 肝源性糖尿病及其胰岛素抵抗临床观察. *临床荟萃* 2003; 18: 547-548
 - 41 陈仕珠. 注重神经肽在肝硬化营养障碍和糖代谢紊乱中的作用. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 835-839
 - 42 Moller S, Juul A, Becker U, Henriksen JH. The acid-labile subunit of the ternary insulin-like growth factor complex in cirrhosis: relation to liver dysfunction. *J Hepatol* 2000; 32: 441-446
 - 43 Pascual M, Castilla-Cortazar I, Urdaneta E, Quiroga

- J, Garcia M, Picardi A, Prieto J. Altered intestinal transport of amino acids in cirrhotic rats: the effect of insulin-like growth factor-I. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G319-324
- 44 郭新会, 陈义森, 金荣华, 汪雯, 郭雁宾, 高冀蓉, 姜太一. 重组人生长激素治疗肝炎后肝硬化患者低蛋白血症的实验与临床研究. *中华实验和临床病毒学杂志* 2001; 15: 339-341
- 45 张卫卫, 王学清, 李岩. 肝硬化胰岛素抵抗及血清生长激素水平的研究. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 1180-1183
- 46 Wang H, Chen S, Ou Q, Deng M, Liu X. Expression of growth hormone receptor and its mRNA in cirrhotic livers. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2002; 82: 168-171
- 47 Donaghy AJ, Delhanty PJ, Ho KK, Williams R, Baxter RC. Regulation of the growth hormone receptor/binding protein, insulin-like growth factor ternary complex system in human cirrhosis. *J Hepatol* 2002; 36: 751-758
- 48 Ferre P. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes* 2004; 53 Suppl 1: S43-50
- 49 Dunger DB, Cheetham TD. Growth hormone insulin-like growth factor I axis in insulin-dependent diabetes mellitus. *Horm Res* 1996; 46: 2-6
- 50 向海平, 金荣华, 郭新会, 陈义森, 高冀蓉, 姜太一. 重组人生长激素对肝炎肝硬化患者生长激素抵抗状况改善的研究. *临床肝胆病杂志* 2004; 20: 93-95
- 51 Wallace JD, Abbott-Johnson WJ, Crawford DH, Barnard R, Potter JM, Cuneo RC. GH treatment in adults with chronic liver disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over study. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2751-2759
- 52 张霞, 沈薇, 沈鼎明. 肝病伴糖代谢异常患者的临床分析. *中华肝脏病杂志* 2006; 14: 289-292
- 53 王华宁, 温伟波. 肝源性糖尿病临床研究进展. *实用肝脏病杂志* 2003; 6: 59-60
- 54 刘淑娥, 肖丹. 肝源性糖尿病临床分析. *中日友好医院学报* 2003; 17: 153-155
- 55 Dhahbi JM, Mote PL, Cao SX, Spindler SR. Hepatic gene expression profiling of streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes Technol Ther* 2003; 5: 411-420
- 56 Fujiwara F, Ishii M, Taneichi H, Miura M, Toshihiro M, Takebe N, Ishida W, Kaneko Y, Kato A, Suzuki K, Satoh J. Low incidence of vascular complications in patients with diabetes mellitus associated with liver cirrhosis as compared with type 2 diabetes mellitus. *Tohoku J Exp Med* 2005; 205: 327-334
- 57 陈成伟, 方晓云, 茹素娟, 沈稚舟, 徐一甄, 朱禧星, 倪鑫达, 王月兰. 肝脏疾病的糖代谢异常研究. *中华消化杂志* 1995; 15: 295-296
- 58 Edvardsson U, von Lowenhillem HB, Panfilov O, Nystrom AC, Nilsson F, Dahllof B. Hepatic protein expression of lean mice and obese diabetic mice treated with peroxisome proliferator-activated receptor activators. *Proteomics* 2003; 3: 468-478
- 59 李莉, 成军, 纪冬. 肝源性糖尿病的治疗研究进展. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1659-1662
- 60 郭锡明, 陈建荣. 肝硬化合并糖尿病临床分析. *实用临床医学* 2006; 7: 49-50
- 61 刘春华, 马保凤, 王晓彬. 肝源性糖尿病40例临床特点及治疗分析. *实用肝脏病杂志* 2005; 8: 302-303
- 62 张义红, 张义卫. 慢性肝病并发肝性糖尿病的临床分析. *实用肝脏病杂志* 2005; 8: 291-292
- 63 周喜汉, 黄赞松, 方文珠. 肝硬变糖代谢异常的临床研究. *中国综合临床* 2003; 19: 804-805
- 64 Perseghin G, Mazzaferro V, Sereni LP, Regalia E, Benedini S, Bazzigaluppi E, Pulvirenti A, Leao AA, Calori G, Romito R, Baratti D, Luzi L. Contribution of reduced insulin sensitivity and secretion to the pathogenesis of hepatogenous diabetes: effect of liver transplantation. *Hepatology* 2000; 31: 694-703
- 65 庞翠军, 肖常青, 彭民浩. 与肝移植有关的糖尿病. *国外医学内分泌学分册* 2001; 21: 260-262
- 66 范小玲, 刘景院, 沈中阳, 刘振文, 徐道振, 王宇, 陈京龙. 终末期肝病合并糖尿病与肝移植的临床研究. *中华医学研究杂志* 2003; 3: 593-594
- 67 Steinmuller T, Stockmann M, Jonas S, Muller A, Settmacher U, Langrehr J, Ulrich F, Bechstein W, Neuhaus P. The impact of liver transplantation on diabetes mellitus. *Transplant Proc* 2001; 33: 1393
- 68 Shetty A, Wilson S, Kuo P, Laurin JL, Howell CD, Johnson L, Allen EM. Liver transplantation improves cirrhosis-associated impaired oral glucose tolerance. *Transplantation* 2000; 69: 2451-2454
- 69 Perseghin G, Mazzaferro V, Sereni LP, Regalia E, Benedini S, Bazzigaluppi E, Pulvirenti A, Leao AA, Calori G, Romito R, Baratti D, Luzi L. Contribution of reduced insulin sensitivity and secretion to the pathogenesis of hepatogenous diabetes: effect of liver transplantation. *Hepatology* 2000; 31: 694-703
- 70 李相成, 王学浩. 成人活体肝移植的现状. *中国实用外科杂志* 2005; 25: 119-121

电编 张敏 编辑 王晓瑜

建立大鼠部分肝移植动脉化模型的技术改进

黄新立, 张峰, 张业伟, 王学浩

■背景资料

活体部分肝移植的研究由于供肝来源的缺乏而日益受到重视, 与活体部分肝移植相关的重要研究是建立稳定的动物模型。

黄新立, 张峰, 张业伟, 王学浩, 南京医科大学第一附属医院肝脏移植中心 江苏省南京市 210029
江苏省重点学科建设基金资助项目(苏卫科教), No. [2001]31
通讯作者: 王学浩, 210029, 江苏省南京市, 南京医科大学第一附属医院肝脏移植中心. wangxuehao8713@163.com
收稿日期: 2006-11-30 接受日期: 2006-12-18

Technique modification in establishing rat model of partial liver transplantation with hepatic rearterialization

Xin-Li Huang, Feng Zhang, Ye-Wei Zhang, Xue-Hao Wang

Xin-Li Huang, Feng Zhang, Ye-Wei Zhang, Xue-Hao Wang, Liver Transplantation Center, the First Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by the Key Subject Program Foundation of Health and Science Education Department of Jiangsu Province, No. [2001]31

Correspondence to: Xue-Hao Wang, Liver Transplantation Center, the First Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. wangxuehao8713@163.com

Received: 2006-11-30 Accepted: 2006-12-18

Abstract

AIM: To develop and modify a rat model of partial liver transplantation with hepatic rearterialization.

METHODS: Two-cuff technique, described by Kamada and Howden, was applied with some modification and hepatic rearterialization between the donor's celiac artery and the recipient's right renal artery was performed in Sprague Dawley rats. The graft reduction was performed *ex situ* by resecting the left lateral lobe, the left portion of the median lobe, and the caudate lobes.

RESULTS: Of the 48 rats received liver transplantation, 5 cases died during operation, and the warm ischemia time for the donor liver was 1.0 ± 0.5 minutes. The 1-week survival rate of the recipients was 85.4%.

CONCLUSION: The modification used in this study provides a more practical and stable ex-

perimental model.

Key Words: Liver transplantation; Model; Rat

Huang XL, Zhang F, Zhang YW, Wang XH. Technique modification in establishing rat model of partial liver transplantation with hepatic rearterialization. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(6):622-624

摘要

目的: 建立大鼠部分肝移植动脉化模型的技术改进。

方法: 采用改良二袖套法建立大鼠部分肝移植模型, 并进行供体的腹腔动脉与受体的右肾动脉端端吻合。供肝予以切除尾叶、肝左叶及肝中叶的左半。

结果: 48例正式实验中, 有5例于术中死亡, 供肝热缺血时间为 1.0 ± 0.5 min。大鼠部分肝移植术后1 wk存活率为85.4%。

结论: 通过技术改进, 提高了模型建立的稳定性。

关键词: 肝移植; 模型; 大鼠

黄新立, 张峰, 张业伟, 王学浩. 建立大鼠部分肝移植动脉化模型的技术改进. *世界华人消化杂志* 2007;15(6):622-624
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/622.asp>

0 引言

临床上肝移植已成为治疗终末期肝病和先天性肝胆疾病的有效治疗手段^[1-3], 活体部分肝移植也由于临床上供肝来源匮乏的原因而得到关注和不断发展, 与活体部分肝移植相关的重要研究是建立稳定的动物模型。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ SD大鼠, 体质量260-280 g, 购于江苏省动物实验中心, 术前禁食20 h, 不禁水, 术前称体质量, 使每对供、受体大鼠体质量相差 ≤ 10 g。手术显微镜(镇江光学仪器厂生产)下清

洁手术, 胆总管支架管采用硬膜外导管制成, 长约5.0 mm, 外径0.8 mm. 肝下下腔静脉及门静脉袖套管采用输液皮条拉制而成, 直径分别为2.4-2.6 mm和1.8-2.0 mm, 长约3.0 mm, 袖套管外壁刻烙痕.

1.2 方法

1.2.1 供体手术 盐酸氯胺酮ip麻醉(100 mg/kg), 仰卧位, 十字切口进腹, 离断镰状韧带、左三角韧带及肝胃韧带, 结扎左膈下静脉以及左肝至食管的交通血管, 游离肝下下腔静脉至左肾静脉平面, 游离右肾静脉并用9-0丝线紧贴腔静脉将其单独结扎切断, 游离右肾动脉并结扎, 结扎右肾上腺静脉, 离断肝右后侧所有韧带. 将肝向头侧翻起, 游离胆总管, 在左右肝管汇合处以下约5 mm处切开前壁并行胆总管插管, 游离门静脉, 结扎切断幽门静脉, 用9-0丝线紧贴门静脉结扎脾静脉并切断, 游离肝固有动脉, 肝总动脉及腹腔干, 结扎切断胃十二指肠动脉, 胃左动脉以及脾动脉. 在腹腔干分支上方阻断腹主动脉, 在肠系膜上动脉分支下方切开腹主动脉前壁并插管, 以每毫升含10 U肝素的4℃生理盐水灌注, 灌注总量约40 mL, 同时在左肾静脉平面横断下腔静脉使血液排出, 剪断肝上下腔静脉并保留其周围膈肌环, 依次剪断左肝至食管的交通血管、右肾上腺静脉、胆总管、肠系膜上静脉及腹腔干, 取出供肝, 放入4℃的生理盐水中.

1.2.2 供肝准备 在4℃的生理盐水中修肝, 修整门静脉及肝下下腔静脉, 并分别外翻套在袖套管上, 5-0丝线结扎固定, 在外翻血管的过程中应注意避免血管扭曲, 靠近袖套管下端用小血管夹夹住肝下下腔静脉, 修剪肝上下腔静脉周围多余的膈肌, 但应保持膈肌腔静脉孔的完整, 用8-0的无损伤缝线在腔静脉左右两侧各悬吊一针, 以备吻合用. 用血管夹在肝固有动脉处阻断, 从腹腔干端注入生理盐水, 如有渗漏则予以吻合结扎. 结扎尾叶的肝蒂并切除尾叶, 缝扎切除肝左叶及肝中叶的左半^[4]. 修肝结束后供肝置4℃的生理盐水中并放入冰箱冷藏.

1.2.3 受体手术 麻醉后仰卧位, 碘伏消毒腹部, 正中切口入腹, 剪断肝周韧带, 结扎左膈静脉及左肝至食管的交通血管, 于左右肝管汇合处结扎切断胆总管, 结扎切断肝固有动脉, 游离门静脉左右分叉处至幽门静脉水平, 游离肝下下腔静脉, 右肾静脉及右肾动脉, 结扎右肾上腺静脉, 以血管夹阻断门静脉和肝下下腔静脉, 自门静脉左右分叉处穿刺推注生理盐水2 mL, 随即用

小Satsinsky钳将肝上下腔静脉连同部分膈肌一起夹住, 在门静脉左右分叉处剪断门静脉, 保留3 mm肝后段下腔静脉, 剪断肝下下腔静脉, 紧贴肝脏剪断肝上下腔静脉, 靠肝侧剪断右肾上腺静脉及左肝至食管的交通血管, 移去肝脏. 然后原位置入供肝, 用悬吊在供肝腔静脉左右两侧的缝线与受体腔静脉相应部位各缝一针并结扎, 行腔内连续缝合后壁至对侧与另一悬吊缝线在血管腔外打结, 然后同法连续缝合前壁, 缝合结束前用生理盐水排出血管腔内空气, 将供肝门静脉袖套管插入受体门静脉, 5-0丝线结扎固定, 移去门静脉血管夹和Satsinsky钳, 结束无肝期. 肝下下腔静脉袖套管插入受体下腔静脉, 5-0丝线结扎固定, 松开肝下下腔静脉血管夹, 将胆总管支架管插入受体胆总管中并结扎固定. 靠近肝下下腔静脉结扎切断右肾静脉, 血管夹阻断右肾动脉, 近肾门处剪断右肾动脉, 结扎并剪断右侧输尿管, 摘除右肾, 行供体腹腔动脉干与受体右肾动脉端端吻合, 移去右肾动脉血管夹, 恢复肝动脉血流. 冲洗腹腔后关腹, 阴茎背静脉推注乳酸钠林格溶液2 mL, 肌注青霉素40万单位, 灯照复温20 min, 术后自由饮水, 12 h后进食.

2 结果

48例正式实验中, 供体手术时间 35 ± 2.4 min, 供肝热缺血时间 1.0 ± 0.5 min, 体外修肝时间 11 ± 1.2 min, 受体无肝期时间 17 ± 2.5 min, 受体手术时间 80 ± 9.5 min. 有5例于术中死亡, 其中2例死于肝上下腔静脉吻合口出血, 1例死于腹腔动脉干吻合口出血, 1例死于门静脉气体栓塞, 1例死于供肝断面出血, 存活率为89.6%. 43例成活大鼠2例分别于术后第5天和第6天死于胆汁性腹膜炎, 术后1 wk存活率为85.4%. 术后1 wk处死大鼠时仅发现2例腹腔动脉栓塞.

3 讨论

1973年Lee *et al*^[5]首次建立了大鼠原位肝移植模型, 此模型包含肝动脉重建. Kamada *et al*^[6]采用袖套技术并不进行肝动脉重建, 大大简化了肝移植模型的建立, 并取得较高的手术成功率, 以后此模型被广泛采用. 由于临床肝移植需行肝动脉重建, 因此理论上讲, 未行肝动脉重建的肝移植模型所得到的实验结果不能照搬于临床^[7-8]. 参照Kamada *et al*^[6]和Howden *et al*^[9]介绍的大鼠肝移植模型建立的方法并作改进, 建立了较稳定的大鼠部分肝移植动脉化模型, 并且获得了

■同行评价

本研究采用改良二袖套法建立大鼠部分肝移植模型, 并进行供体的腹腔动脉与受体的右肾动脉端端吻合, 研究表明通过技术改进, 提高了模型建立的稳定性, 本技术改进对活体部分肝移植研究有指导参考价值.

89.6%的成活率和85.4%的术后1 wk存活率,这与其他文献报道相一致^[10-11]。相关文献报道建立部分肝移植静脉化模型的成活率为90%,术后1 wk存活率为83.3%^[12]。建立肝移植动脉化模型比建立肝移植静脉化模型手术难度大,手术时间长,成活率会受到一定影响,而我们较高的术后1 wk存活率可能与肝动脉重建有关,恢复供肝的完整血流对移植肝的长期存活及减少胆道系统并发症会有一定的好处^[13-15]。

建立的大鼠部分肝移植动脉化模型在以下方面做了技术改进:(1)供体手术时肝动脉的血供维持到灌注前的最后时刻,减少了供肝的缺血损伤;(2)供体腹腔动脉干与受体右肾动脉端端吻合,其与腹主动脉吻合比较避免了肾脏的急性缺血损伤;(3)在用小Sattinsky钳将肝上下腔静脉连同部分膈肌一起夹住时应稍提起肝脏以便能够夹住肝上下腔静脉下缘的膈肌,有利于肝上下腔静脉的吻合,提高吻合的速度,缩短无肝期;(4)供肝准备时,无损伤缝线在肝上下腔静脉左右两侧各悬吊一针,有利于受体手术时腔静脉吻合的完整,提高吻合的速度;(5)尽量少游离供肝胆管周围的组织,留短供肝胆管的长度,有利于避免术后胆管坏死;(6)采用腹主动脉灌注,有利于避免肝动脉术后栓塞,较门静脉灌注缩短了热缺血时间,灌注更均匀彻底;(7)切除肝左叶时结扎点不能过与靠近左叶的根部,我们采取缝扎的方式,避免了静脉回流的受阻;(8)吻合动脉时尽量不损伤内膜,行连续吻合,以免术后动脉血栓形成。

4 参考文献

1 陈知水,王海瀛. 中国肝癌肝移植的现状与展望. 世界

- 华人消化杂志 2006; 14: 939-941
- 2 夏穗生. 我国肝移植现状. 世界华人消化杂志 1999; 7: 645-646
- 3 汤钊猷. 肝癌外科治疗的进展. 世界华人消化杂志 2003; 11: 249-254
- 4 Omura T, Ascher NL, Emond JC. Fifty-percent partial liver transplantation in the rat. *Transplantation* 1996; 62: 292-293
- 5 Lee S, Charters AC, Chandler JG, Orloff MJ. A technique for orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation* 1973; 16: 664-669
- 6 Kamada N, Calne RY. Orthotopic liver transplantation in the rat: technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage. *Transplantation* 1979; 28: 47-50
- 7 Gao W, Lemasters JJ, Thurman RG. Development of a new method for hepatic rearterialization in rat orthotopic liver transplantation. Reduction of liver injury and improvement of surgical outcome by arterialization. *Transplantation* 1993; 56: 19-24
- 8 Reck T, Steinbauer F, Steinbauer M, Schwillle PO, Wittekind C, Hohenberger W, Kockerling F. Impact of arterialization on hepatic oxygen supply, tissue energy phosphates, and outcome after liver transplantation in the rat. *Transplantation* 1996; 62: 582-587
- 9 Howden B, Jablonski P, Grossman H, Marshall VC. The importance of the hepatic artery in rat liver transplantation. *Transplantation* 1989; 47: 428-431
- 10 周学平, 杜隽铭, 李济宇, 杨勇, 陆炯炯, 全志伟. 大鼠原位肝移植模型制作的术后稳定存活率. 上海交通大学学报(医学版) 2006; 26: 603-606
- 11 陈耿, 张玉君, 杨程, 郑树国, 李昆, 董家鸿. 重建肝动脉血液供应和胆道外引流的大鼠原位肝移植模型的建立. 中华器官移植杂志 2006; 27: 40-43
- 12 钱晓峰, 王学浩, 张峰, 李相成, 王科, 成峰, 刘军. 大鼠减体积肝移植模型的技术改进及肝再生的初步观察. 南京医科大学学报(自然科学版) 2003; 23: 221-223
- 13 孙鹏, 蔡端, 张群华, 芮晓晖. 非协调性异种肝移植动物模型的建立: 动脉化模型与静脉化模型比较. 中华肝胆外科杂志 2001; 7: 422-424
- 14 王国栋, 马毅, 陈规划. 改良的套叠缝合重建肝动脉的大鼠原位肝移植模型. 中华实验外科杂志 2006; 23: 1088-1089
- 15 马毅, 何晓顺, 陈规划, 陈细桃, 黄洁夫. 重建肝动脉血供大鼠原位肝移植模型的术式探讨. 中华实验外科杂志 2004; 21: 110-111

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。

缺血-再灌注时卡巴胆碱对大鼠肠上皮细胞的保护作用

邹晓防, 林凯, 吕艺, 黎君友, 陆江阳, 胡森, 盛志勇

邹晓防, 林凯, 吕艺, 黎君友, 陆江阳, 胡森, 盛志勇, 中国人民解放军总医院第一附属医院烧伤研究所 北京市 100037
林凯, 空军总医院临床检验中心 北京市 100037
军队十一五医药卫生专项课题项目, No. 06z055
通讯作者: 胡森, 100037, 北京市, 中国人民解放军总医院第一附属医院烧伤研究所. hs82080@yahoo.com.cn
电话: 010-66867397 传真: 010-68989139
收稿日期: 2006-11-17 接受日期: 2006-12-27

Protective effects of carbachol on intestinal epithelial cells in rats with gut ischemia-reperfusion

Xiao-Fang Zou, Kai Lin, Yi Lv, Jun-You Li, Jiang-Yang Lu, Sen Hu, Zhi-Yong Sheng

Xiao-Fang Zou, Kai Lin, Yi Lv, Jun-You Li, Jiang-Yang Lu, Sen Hu, Zhi-Yong Sheng, Burn Research Institute, the First Affiliated Hospital of General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100037, China
Kai Lin, Center of Clinical Laboratory, General Hospital of Chinese PLA Air Force, Beijing 100037, China
Supported by the Special Foundation of the 11th Five-Year Plan for Military Medical Project, No. 06z055
Correspondence to: Sen Hu, Burn Research Institute, the First Affiliated Hospital of General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100037, China. hs82080@yahoo.com.cn
Received: 2006-11-17 Accepted: 2006-12-27

Abstract

AIM: To investigate the protective effects of carbachol on intestinal epithelial cells in rats with gut ischemia and reperfusion (I/R).

METHODS: Blood flow of superior mesenteric artery was blocked to establish I/R model in Wistar rats, and then the rats were treated with carbachol for 30, 60, 120 and 240 minutes, respectively. The content (nkat/g pro) of diamine oxidase (DAO) in gut tissue was determined by biochemical method, and the expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in intestinal epithelial cells was examined by immunohistochemistry. The injuries of gut epithelial cells were assessed using Chiu's scores.

RESULTS: The pathological changes were obviously relieved in rats treated with carbachol. The

content of DAO was markedly higher in carbachol-treated rats than that in the saline controls (0 min: 42.01 ± 7.17 vs 18.50 ± 7.83 ; 30 min: 44.51 ± 8.00 vs 20.00 ± 5.83 ; 60 min: 35.67 ± 7.00 vs 16.34 ± 8.17 ; 120 min: 39.00 ± 7.33 vs 21.84 ± 6.67 ; 240 min: 53.34 ± 8.17 vs 45.68 ± 6.00 ; all $P < 0.01$), while the number of TNF- α -positive cells was significantly lower (0 min: 204.4 ± 12 vs 246.4 ± 15.6 ; 30 min: 198.4 ± 11.2 vs 230.4 ± 14.4 ; 60 min: 234.4 ± 12.1 vs 270.4 ± 17.1 ; 120 min: 225.4 ± 10.2 vs 260.4 ± 18.5 ; 240 min: 196.4 ± 10.8 vs 220.4 ± 18.2 ; all $P < 0.01$).

CONCLUSION: Enteral administration of carbachol can protect intestinal epithelial cells from ischemia-reperfusion injury by decreasing the production of TNF- α .

Key Words: Ischemia/reperfusion; Carbachol; Intestinal epithelial cell; Rat

Zou XF, Lin K, Lv Y, Li JY, Lu JY, Hu S, Sheng ZY. Protective effects of carbachol on intestinal epithelial cells in rats with gut ischemia-reperfusion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(6):625-628

摘要

目的: 研究缺血/再灌注(I/R)时卡巴胆碱(Ca)对肠上皮细胞的保护作用及可能机制。

方法: 阻断Wistar大鼠SMA血量建立I/R模型, 并以肠袋内注射卡巴胆碱进行处理。采用病理学方法观察不同时间肠上皮细胞损伤指数, 免疫组化法检测肠上皮细胞TNF- α 表达的变化; 生化法检测肠组织中DAO含量(nkat/g pro)的变化。

结果: I/R+Ca组再灌注各时间点肠上皮细胞病理变化较I/R+NS组轻($P < 0.01$); I/R+Ca组再灌注各时间点肠袋组织DAO含量较I/R+NS组显著增加(0 min: 42.01 ± 7.17 vs 18.50 ± 7.83 ; 30 min: 44.51 ± 8.00 vs 20.00 ± 5.83 ; 60 min: 35.67 ± 7.00 vs 16.34 ± 8.17 ; 120 min: 39.00 ± 7.33 vs 21.84 ± 6.67 ; 240 min: 53.34 ± 8.17 vs 45.68 ± 6.00 ; 均 $P < 0.01$), 而I/R+Ca组再灌注各时间点肠上皮细胞中呈TNF- α 阳性细胞数较

■背景资料

缺血-再灌注后肠屏障功能的改变会引起内毒素的移位, 从而触发脓毒症和MODS。因此, 维持缺血-再灌注后肠屏障功能, 减少细菌和内毒素移位一直是临床防治脓毒症和MODS亟待研究的重要课题。肠上皮细胞是肠屏障功能的重要组成部分, 减轻肠上皮细胞损害是临床上防治脓毒症和MODS重要措施之一。采用炎症介质拮抗剂治疗脓毒症和MODS, 但效果均不理想。因此, 保护肠道屏障功能、抑制炎症介质的释放是治疗脓毒症和MODS的关键。

■应用要点

本文结果显示应用卡巴胆碱的抗炎作用,能减轻肠上皮细胞的损害,维持肠黏膜的屏障功能,为临床治疗脓毒症和MODS提供有效的途径。

I/R+NS组明显减少(0 min: 204.4 ± 12 vs 246.4 ± 15.6 ; 30 min: 198.4 ± 11.2 vs 230.4 ± 14.4 ; 60 min: 234.4 ± 12.1 vs 270.4 ± 17.1 ; 120 min: 225.4 ± 10.2 vs 260.4 ± 18.5 ; 240 min: 196.4 ± 10.8 vs 220.4 ± 18.2 ; 均 $P < 0.01$)。

结论:卡巴胆碱能抑制缺血-再灌注时肠上皮细胞中TNF- α 表达,减轻病理损害,对肠上皮细胞具有保护作用。

关键词:缺血/再灌注;卡巴胆碱;肠上皮细胞;大鼠

邹晓防, 林凯, 吕艺, 黎君友, 陆江阳, 胡森, 盛志勇. 缺血-再灌注时卡巴胆碱对大鼠肠上皮细胞的保护作用. 世界华人消化杂志, 2007;15(6):625-628

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/625.asp>

0 引言

缺血-再灌注是烧(创)伤后常见的病理生理过程,持续缺血-再灌注造成肠上皮细胞损害,引起肠黏膜通透性的改变,减少细菌和内毒素移位,后者与脓毒症和MODS的发生有密切关系^[1-4]。如何在细胞水平减轻损伤因子的损伤作用,减少细菌和内毒素移位一直是临床防治脓毒症和MODS亟待研究的重要课题。

胆碱能抗炎通路是近年来发现治疗脓毒症和MODS潜在的新途径^[5]。研究表明,拟胆碱药-卡巴胆碱不但能增加肠黏膜血流,促进胃肠运动,而且还具有强大的抗炎作用,可以通过多途径减轻肠道缺血-再灌注损伤^[6]。本文探讨肠道缺血-再灌注时卡巴胆碱对肠上皮细胞的作用,初步探讨其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Wistar大鼠96只,由军事医学科学院实验动物中心提供,体质量230-250 g。实验前适应性饲养1 wk,术前12 h禁食,自由饮水。30 g/L戊巴比妥钠腹腔麻醉(30 mg/kg),麻醉成功后,仰卧固定于手术台上,常规备皮消毒铺无菌洞巾。取腹部正中切口长约3-4 cm,将肠管外置并覆盖温盐水纱布,外用烤灯加温,保持肠管的湿润和温度。在距离十二指肠悬韧带后10 cm和18 cm处,分别用两根一号丝线结扎肠管,造成长约8 cm肠袋。无损伤动脉夹夹闭肠系膜上动脉起始部,阻断SMA血流45 min后,松夹恢复肠系膜血流,制成肠缺血-再灌注模型。

动物随机分为I/R+NS组、I/R+Ca组和假手术组。I/R+Ca组阻断SMA血流45 min后肠袋内注

射卡巴胆碱(0.1 mg/kg,山东正大福瑞达制药有限公司),I/R+NS注射等体积生理盐水。假手术组行上述操作,而未夹闭SMA(每时间点8只)。

以上各组分别在再灌注后0, 30, 60, 120和240 min处死动物取肠袋组织。一部分肠袋组织迅速取出后,又去离子水冲洗3次, -80℃冰冻保存,用于组织匀浆的制备。另一部分冲洗后用40 g/L的甲醛溶液固定48 h,脱水,常规石蜡包埋,切片。

1.2 方法 石蜡切片常规脱蜡至水后,进行HE染色,用于光镜下观察病理变化和肠黏膜损伤。每份切片光镜下随机选择10视野(400×)由病理医师观察,根据Chiu's^[7]的方法进行肠黏膜损伤测定。

1.2.1 肠组织DAO含量的测定 取肠袋组织1 mg,采用黎君友 *et al*^[8]建立的分光光度法测定肠组织中DAO含量。

1.2.2 免疫组化检测肠上皮细胞内TNF- α 的表达 采用Power Vision TM两步法进行免疫组织化学检测,试剂盒购自北京天来生物医学科技公司,操作按说明书进行。石蜡切片常规脱蜡至水,经过氧化氢处理后,进行酶修复,然后用1:100稀释的抗体,4℃过夜孵育,DAB显色,苏木素复染,常规脱水,透明,封片,显微镜下观察。以PBS代替一抗作为阴性对照。在同一放大倍数下观察,细胞将棕色者为阳性,每个时相点随机取10个视野(400×)进行计数,计算阳性细胞数。

统计学处理 数据均以均数±标准差(mean±SD)表示,用SPSS11.0软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 光镜下病理改变 正常组肠上皮细胞呈柱状,刷状缘清晰,排列整齐,连接紧密。I/R+NS组从再灌注开始时肠上皮细胞略有肿胀,随再灌注时间延长,肠上皮细胞肿胀逐渐加重,并出现坏死,脱落。黏膜层炎症细胞浸润,固有层红细胞增多。I/R+Ca组损伤变化趋势同I/R+NS组,但病变程度明显减轻。

2.2 Chiu's评分变化 I/R+NS组肠黏膜组织的损伤主要发生在缺血-再灌注120 min和240 min,以再灌注120 min组最明显。I/R+Ca组的损伤的变化趋势与I/R+NS的基本相同,但损伤程指数要远低于I/R+NS组($P < 0.01$)(表1)。

2.3 肠组织DAO含量的变化 I/R+NS组肠组织DAO含量再灌注后前30 min稍有升高,后迅速

表 1 缺血再灌流期间各项指标的Chiu's评分变化(mean ± SD, n = 8)

分组	再灌流时间				
	0 min	30 min	60 min	120 min	240 min
Chiu's评分					
假手术组	0.40 ± 0.12	0.43 ± 0.13	0.41 ± 0.12	0.49 ± 0.10	0.31 ± 0.17
I/R+NS组	2.64 ± 0.34 ^b	2.54 ± 0.25 ^b	2.40 ± 0.10 ^b	2.91 ± 0.11 ^b	2.90 ± 0.13 ^b
I/R+Ca组	1.59 ± 0.34 ^{bd}	1.14 ± 0.23 ^{bd}	1.04 ± 0.31 ^{bd}	1.75 ± 0.11 ^{bd}	1.62 ± 0.42 ^{bd}
DAO(nkat/g)					
假手术组	59.01 ± 16.34	58.68 ± 14.17	59.68 ± 16.00	59.51 ± 14.34	59.68 ± 14.84
I/R+NS组	18.50 ± 7.83 ^b	20.00 ± 5.83 ^b	16.34 ± 8.17 ^b	21.84 ± 6.67 ^b	45.68 ± 6.00 ^b
I/R+Ca组	42.01 ± 7.17 ^{bd}	44.51 ± 8.00 ^{bd}	35.67 ± 7.00 ^{bd}	39.00 ± 7.33 ^{bd}	53.34 ± 8.17 ^{bd}
TNF-α阳性细胞					
假手术组	157.4 ± 10.7	154.9 ± 9.9	155.9 ± 10.4	158.4 ± 9.4	155.4 ± 8.8
I/R+NS组	246.4 ± 15.6 ^b	230.4 ± 14.4 ^b	270.4 ± 17.1 ^b	260.4 ± 18.5 ^b	220.4 ± 18.2 ^b
I/R+Ca组	204.4 ± 12 ^{bd}	198.4 ± 11.2 ^{bd}	234.4 ± 12.1 ^{bd}	225.4 ± 10.2 ^{bd}	196.4 ± 10.8 ^{bd}

^bP<0.01 vs 假手术组, ^dP<0.01 vs I/R+NS组.

降低, 再灌流后60 min后最低, 后逐渐上升, 到再灌流240 min, 基本接近正常. I/R+Ca组肠组织DAO含量变化基本同I/R+NS组相同, 但程度要较I/R+NS组低(P<0.01)(表1).

2.4 肠上皮细胞TNF-α表达的变化 正常组有少量TNF-α阳性的肠上皮细胞, 主要位于绒毛的顶端. 肠道缺血期开始, I/R+NS组TNF-α阳性的肠上皮细胞数量逐渐增多, 且染色逐渐加深, 部位由绒毛顶端向基部部扩展. I/R+Ca组TNF-α阳性的肠上皮细胞的变化同I/R+NS组, 但阳性细胞数较I/R+NS组少(表1), 更接近绒毛顶端, 且染色较浅.

3 讨论

肠缺血-再灌流是烧(创)伤后常见的病理生理过程, 也是诱发MODS的始动因素. 肠上皮细胞是肠黏膜屏障的重要组成部分, 对缺血、缺氧十分敏感. 缺血、缺氧可引起肠上皮细胞结构、功能的改变, 而肠上皮细胞结构、功能的改变必然引起肠黏膜通透性的改变, 引起细菌和内毒素的移位, 同时启动肠道炎症和免疫反应, 而这一过程在烧(创)伤后全身炎症反应和MODS的过程中起重要作用^[9-11]. 为此, 寻找减轻肠上皮细胞的损害的方法, 对于临床上治疗全身炎症反应和MODS有重要的意义. 胆碱能抗炎通路是最近提出的一条新的神经-内分泌抗炎途径. 刺激迷走神经传出支可抑制大鼠内毒素血症时的全身炎症反应^[2]. 副交感神经主

要递质乙酰胆碱在体外能有效地抑制LPS刺激外周巨噬细胞释放致炎介质TNF-α^[12].

卡巴胆碱是一种胆碱能激动剂, 作用于M和N胆碱受体, 在体内不易被水解. 卡巴胆碱除具有促进胃肠动力、增加腺体分泌等作用外, 还具有强大抗炎作用, 其效应适于防治过度全身性炎症反应和改善肠功能障碍. 在兔部分肠缺血-再灌流模型中观察到卡巴胆碱可保护缺血-再灌流动物肝、肾和心功能, 减轻全身性炎症反应^[13].

DAO是人类和哺乳动物肠黏膜上皮细胞代谢不可缺少的酶, 是肠上皮细胞的标志酶, 其活性与上皮细胞的核算和蛋白合成有密切关系, 因此通过测定DAO在肠组织中的变化, 可以反映肠黏膜上皮细胞的损伤和修复情况^[8]. 本实验发现I/R+NS大鼠肠组织中DAO含量显著降低. 其原因可能是缺血-再灌流时, 肠上皮细胞损伤、坏死, 肠上皮细胞脱落进入肠腔. I/R+Ca肠组织中DAO含量较I/R+NS显著升高, 提示卡巴胆碱能减轻肠缺血-再灌流损伤, 从而对肠上皮细胞起保护作用.

国内外研究表明肠缺血-再灌流时, 肠组织可分泌TNF-α, 引起局部和全身的炎症, 导致远隔器官的损伤, 促进MODS的发生^[14-16]. TNF-α在局部可以加重肠上皮细胞的损害. Van Lanschot *et al*研究发现, 给大鼠注射外源性重组TNF-α可引起肠上皮细胞剥落、坏死, 肠黏膜固有层中性粒细胞浸润. 如果应用小鼠抗人

■名词解释

胆碱能抗炎通路: 神经系统通过迷走神经及其递质乙酰胆碱能够迅速、显著地抑制巨噬细胞释放TNF-α, 减轻全身炎症反应, 这一生理机制称为胆碱能抗炎通路. 此通路可以抑制炎症细胞因子的合成反馈监控和调节炎症反应.

■同行评价

临床上脓毒症和MODS的治疗一直是一个研究的热点和难点, 本实验方法较合理, 结果可靠, 表达简洁准确, 选题有一定临床意义和应用价值。

TNF- α mAb被动免疫大鼠1 h后再注射TNF- α , 则肠上皮细胞损害明显减轻, 说明TNF- α 可引起肠上皮细胞的损伤. 本实验结果显示, I/R+Ca组大鼠肠组织TNF- α 阳性细胞数明显低于I/R+NS, 显示减少肠上皮细胞TNF- α 的分泌和释放是卡巴胆碱减轻肠上皮细胞损伤的一条重要途径。

本实验结果显示: I/R+Ca组与I/R+NS组相比DAO含量明显升高, 且I/R+Ca组的TNF- α 阳性细胞数明显低于I/R+NS组, 说明卡巴胆碱可通过抑制炎症介质的释放减轻肠缺血-再灌注时肠上皮细胞的损害, 从而保护肠上皮细胞. 因此卡巴胆碱在防治肠缺血-再灌注引起的失控炎症反应和脓毒症中具有潜在的临床应用前景。

4 参考文献

- 1 盛新华, 石汉平. 肠道在多器官功能障碍综合征中的作用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2029-2032
- 2 Mole DJ, Taylor MA, McFerran NV, Diamond T. The isolated perfused liver response to a 'second hit' of portal endotoxin during severe acute pancreatitis. *Pancreatology* 2005; 5: 475-485
- 3 Closa D, Folch-Puy E. Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. *IUBMB Life* 2004; 56: 185-191
- 4 张喜平, 张宇. 急性胰腺炎肠道屏障损害机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2006; 14: 417-421
- 5 Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to

- 6 endotoxin. *Nature* 2000; 405: 458-462
- 6 吕艺, 姜小国, 曹卫红, 白玉梅, 孙丹, 胡森, 盛志勇. 卡巴胆碱对肠缺血-再灌流动物脏器功能的保护作用. 中华急诊医学杂志 2006; 15: 228-231
- 7 Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg* 1970; 101: 478-483
- 8 黎君友, 吕艺, 付小兵, 晋桦, 胡森, 孙晓庆, 盛志勇. 二胺氧化酶在创伤后肠道损伤种变化及意义. 中国危重病急救医学 2000; 12: 482-484
- 9 Mitsuoka H, Schmid-Schonbein GW. Mechanisms for blockade of in vivo activator production in the ischemic intestine and multi-organ failure. *Shock* 2000; 14: 522-527
- 10 Boros M, Takaichi S, Hatanaka K. Ischemic time-dependent microvascular changes and reperfusion injury in the rat small intestine. *J Surg Res* 1995; 59: 311-320
- 11 李晓芳. 严重烧伤后胃肠道功能障碍的机制和防治. 世界华人消化杂志 2006; 14: 888-893
- 12 姜小国, 石德光, 胡森, 盛志勇. 迷走神经及其递质乙酰胆碱的抗炎作用的研究. 中国危重病急救医学 2003; 15: 59-61
- 13 胡森, 曹卫红, 孙丹, 吕艺, 白玉梅, 盛志勇. 卡巴胆碱对部分缺血-再灌流所致全身炎症和多器官功能障碍的影响. 中国危重病急救医学 2005; 17: 49-52
- 14 Wang Z, Castresana MR, Detmer K, Newman WH. An IkappaB-alpha mutant inhibits cytokine gene expression and proliferation in human vascular smooth muscle cells. *J Surg Res* 2002; 102: 198-206
- 15 Theuer J, Dechend R, Muller DN, Park JK, Fiebeler A, Barta P, Ganten D, Haller H, Dietz R, Luft FC. Angiotensin II induced inflammation in the kidney and in the heart of double transgenic rats. *BMC Cardiovasc Disord* 2002; 2: 3
- 16 van Lanschot JJ, Mealy K, Wilmore DW. The effects of tumor necrosis factor on intestinal structure and metabolism. *Ann Surg* 1990; 212: 663-670

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 •

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2007-02-28)

应用基因表达谱芯片技术筛选GABA作用下肝星状细胞差异表达基因

肖凡, 魏红山, 李国力, 张剑平, 宋川

肖凡, 魏红山, 李国力, 张剑平, 宋川, 北京地坛医院病毒研究所 北京市 100011

通讯作者: 魏红山, 100011, 北京市安外大街地坛公园13号, 北京地坛医院病毒研究所. cindy2358@163.com
电话: 010-64211031-2358 传真: 010-64211031-2306
收稿日期: 2006-12-13 接受日期: 2007-01-04

Screening of genes differentially expressed in hepatic stellate cells acted by gamma aminobutyric acid with microarray assay

Fan Xiao, Hong-Shan Wei, Guo-Li Li, Jian-Ping Zhang, Chuan Song

Fan Xiao, Hong-Shan Wei, Guo-Li Li, Jian-Ping Zhang, Chuan Song, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China

Correspondence to: Hong-Shan Wei, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, 13 Ditan Park, Anwai Street, Beijing 100011, China. cindy2358@163.com
Received: 2006-12-13 Accepted: 2007-01-04

Abstract

AIM: To screen genes regulated by gamma aminobutyric acid (GABA) in hepatic stellate cells (HSC) using microarray assay, and to investigate GABA biological function.

METHODS: HSC-T6 was co-cultured with 100 $\mu\text{mol/L}$ GABA for 48 hours, and then mRNA was extracted from the cells to reversely transcribe into cDNA. HSC-T6 co-cultured with phosphate buffer saline (PBS) was used as controls. The cDNA profile was analyzed by microarray assay.

RESULTS: For the profile of 4096 genes, 37 genes were found differentially expressed, of which 11 were up-regulated while 26 were down-regulated significantly.

CONCLUSION: Differentially expressed genes under the action of GABA are successfully screened by microarray technique, demonstrat-

ing that GABA can affect the gene profile of HSC.

Key Words: Gamma aminobutyric acid; Hepatic stellate cell; Microarray assay

Xiao F, Wei HS, Li GL, Zhang JP, Song C. Screening of genes differentially expressed in hepatic stellate cells acted by gamma aminobutyric acid with microarray assay. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(6):629-632

摘要

目的: 应用基因芯片技术检测 γ -氨基丁酸(GABA)对肝星状细胞(HSC-T6) 基因表达谱的影响。

方法: 10 $\mu\text{mol/L}$ 的GABA作用于HSC-T6细胞48 h, 提取mRNA, 逆转录为cDNA. 以PBS作用的HSC-T6细胞为对照, 进行cDNA 芯片分析。

结果: 在4096个基因表达谱的筛选中, 发现有11个基因表达水平显著上调, 26个基因表达水平显著下调。

结论: 成功地应用基因芯片筛选GABA作用下肝星状细胞差异表达基因, 证明GABA对肝星状细胞的表达谱有显著作用。

关键词: γ -氨基丁酸; 肝星状细胞; 基因芯片技术

肖凡, 魏红山, 李国力, 张剑平, 宋川. 应用基因表达谱芯片技术筛选GABA作用下肝星状细胞差异表达基因. *世界华人消化杂志* 2007;15(6):629-632

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/629.asp>

0 引言

γ -氨基丁酸(GABA)是一种非蛋白质组成的天然氨基酸. GABA是哺乳动物中枢神经系统中重要的抑制性神经递质, 具有重要的生理功能^[1]. 已经研究报道的生理活性有诸如降低血压、促使精神安定、促进脑部血流、增进脑活力、营养神经细胞、增加生长激素分泌、健肝利肾、改

■背景资料

γ -氨基丁酸(GABA)是哺乳动物中枢神经系统中重要的抑制性神经递质, 具有重要的生理功能. 目前针对GABA的研究主要集中在神经方面.

表1 表达显著增强的基因

序号	GenBank登录号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	M27812	突触蛋白Ia(synapsin Ia)	2.018
2	AF121265	β -连锁蛋白(beta-catenin)	2.030
3	J05214	5'-核苷酸酶(5'-nucleotidase)	2.086
4	BC062235	异种核蛋白-a1(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1)	2.09
5	BC081810	法尼基转移酶1 (farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1)	2.120
6	U34843	细胞周期相关蛋白(cell cycle progression related D123)	2.129
7	BC062034	醛类还原酶(Aldehyde reductase 1)	2.209
8	AF476963	结合珠蛋白(haptoglobin-like protein)	2.364
9	L27111	刺激激活的蛋白激酶(stress activated protein kinase alpha I)	2.435
10	BC078869	CTL靶抗原(CTL target antigen)	2.460
11	BC060556	核糖核蛋白体结合蛋白(ribophorin II)	2.725

善更年期综合症等^[2-3]. GABA广泛存在于大脑内, 是大脑的主要抑制性介质. 正常时GABA来源肠道, 由谷氨酸盐脱羧而来. GABA能与 α -酮戊二酸反应生成谷氨酸, 抑制谷氨酸的脱羧反应, 使血氨浓度有效降低, 还能促使更多的谷氨酸与氨结合生成尿素排出体外, 解除氨毒, 增进肝功能. 而肝功能不全以及肝硬化时, 肝脏的解毒能力降低. 肝昏迷时, GABA在血中滞留, 血浆及脑脊液中其浓度明显增高, 造成大脑功能的紊乱^[4]. 肝纤维化的发生是以肝窦和门静脉周围细胞外基质过量沉积为特点. 激活的肝星状细胞被认为是肝纤维化发生过程中细胞外基质的主要来源^[5]. 因此本实验应用基因芯片技术筛选GABA作用肝星状细胞HSC-T6后差异表达的基因, 为进一步阐明GABA可能的生物学功能提供依据.

1 材料和方法

1.1 材料 HSC-T6细胞由本室保存. 细胞培养相关试剂、总RNA提取试剂TRIzol均购自Invitrogen公司. 人类基因组分类I芯片包括原癌基因和抑癌基因、离子通道和运输蛋白、细胞周期蛋白类、细胞受体、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、细胞信号转导相关基因等4096个cDNA, 由上海联合基因有限公司提供. mRNA纯化试剂Oligotex mRNA Midi Kit购自Qiagen公司.

1.2 方法 在35 mm培养皿中常规培养HSC-T6细胞, 细胞生长至对数期时, 分别将PBS和10 μ mol/L GABA加入细胞, 48 h后收获细胞, 每5 $\times 10^6$ 个细胞加入1 mL TRIzol 试剂, 立即于液

1 2 3 4

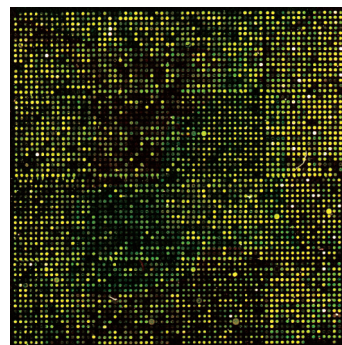
图1 RNA电泳图. 1, 2: GABA-10 μ mol/L; 3,4: Control.

图2 双色荧光标记叠加图.

氮中保存. TRIzol试剂一步法提取总RNA(分别标记为实验组和对照组), 样品经分光光度计检测吸光度A值, 经琼脂糖凝胶电泳检测28S、18S条带变化. 纯化mRNA并行电泳检测. 常规方法逆转录标记cDNA探针并纯化. Cy3-dUTP标记对照组细胞mRNA(5 μ g), Cy5-dUTP标记实验组细胞mRNA(5 μ g). 将探针置于95 $^{\circ}$ C水浴中变性2 min; 玻片置于95 $^{\circ}$ C水浴中变性30 s, 玻片取出浸无水乙醇30 s, 探针取出后迅速置于冰上. 将探针置于芯片上, 用盖玻片覆盖, 置于杂交舱

表 2 表达显著下降的基因

序号	GenBank登录号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	L27084	果糖-2, 6-磷酸酶(fructose-6-phosphate, 2-kinase: fructose-2, 6-bisphosphatase)	0.206
2	BC088090	视黄醇脱氢酶3(retinol dehydrogenase type III)	0.213
3	BC081844	岩藻糖苷酶 α -L-1(fucosidase, α -L-1)	0.239
4	BC088847	磷酸果糖激酶(phosphofructokinase)	0.268
5	AY323237	辅酶Q结合蛋白(low molecular mass ubiquinone-binding protein)	0.274
6	AB039663	孔蛋白2(VDAC2)	0.281
7	AY177703	r-酪氨酸磷酸酶(receptor-like protein tyrosine phosphatase gamma A-type isoform)	0.304
8	BC079369	丙酮酸脱氢酶E1 (pyruvate dehydrogenase E1)	0.338
9	BC088166	α 1-微球蛋白 (α 1 microglobulin/bikunin)	0.339
10	U17253	转录抑制因子NAB1(transcriptional repressor NAB1)	0.342
11	AF461496	柠檬酸合酶前体(citrate synthase precursor)	0.368
12	BC061819	甘露糖苷酶2(mannosidase 2)	0.378
13	AB097077	核蛋白UKP83(nuclear protein UKp83)	0.383
14	U76714	细胞黏附调节因子(cell adhesion regulator)	0.385
15	M11185	髓磷脂蛋白(myelin proteolipid protein)	0.397
16	J02679	甲萘醌氧化还原酶(menadione oxidoreductase)	0.397
17	BC091363	维甲类受体(retinoid X receptor gamma)	0.400
18	BC078838	肾特异性膜蛋白(kidney-specific membrane protein)	0.425
19	AB180485	核受体联合激活蛋白P120(nuclear receptor coactivator p120)	0.426
20	BC081855	磷脂结合蛋白(annexin A5)	0.430
21	AF121217	前- α -2胶原蛋白(pro- α -2(I) collagen)	0.437
22	BC088191	短链脱氢还原酶(short-chain dehydrogenase/reductase)	0.444
23	BC062066	硫辛酰胺脱氢酶(diaphorase)	0.452
24	BC085739	3-羟邻氨基苯丙酸-3, 4-加双氧酶(3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase)	0.472
25	BC088146	C细胞色素P450(cytochrome P450)	0.481
26	M83560	谷氨酸受体5-1(glutamate receptor subunit 5-1)	0.485

■同行评价

本文应用基因表达谱芯片技术筛选GABA作用下肝星状细胞差异表达基因, 方法先进, 结果可信, 但讨论部分欠深入.

中, 用Parafilm密封, 放入42℃杂交箱内杂交过夜(16-18 h). 洗片后, 晾干扫描. 用General Scanning公司的ScanArray 4000扫描芯片. 用预先选定的内参照基因(24条管家基因, 每个基因点2个点, 共48个点)对Cy3和Cy5的原始提取信号进行均衡和修正. 用ImaGene310软件分析Cy3, Cy5两种荧光信号的强度, 计算Cy5/Cy3比值. 阳性结果判断: Cy5/Cy3>2.0, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3<0.5, 为绿色荧光, 显示表达减弱.

2 结果

2.1 总RNA及mRNA的定性、定量分析 电泳条带比较, 显示28S条带无明显降解, 电泳结果证实已抽提高纯度的总RNA(图1).

2.2 芯片杂交体系验证及结果分析 在芯片上共有4096个cDNA. 为了监控芯片杂交技术体系的整个过程, 在芯片上设置阴性对照(8条水稻基

因, 共8个点), 这些点的杂交信号均很低, 证实了数据的可靠性. 由于实验组探针标记Cy5荧光素(呈红色), 对照组探针标记Cy3荧光素(呈绿色), 红绿颜色的差异就显示该基因在实验组和对照组中基因表达水平上的差异, 黄色代表表达水平无差异. 按阳性标准, 从4096个基因中筛选出差异表达基因共27条, 其中11条基因表达增强, 26条基因表达降低(图2, 图3).

2.3 差异表达基因分析 在基因芯片的扫描分析中, 如果荧光染料的Cy5/Cy3比值在2.0以上, 就判断为上调基因, 在本研究中发现有11种基因的表达水平上调(表1). 如果荧光染料的Cy5/Cy3比值在0.5以下, 就判断为下调基因, 在本研究中发现有26种基因的表达水平下调(表2).

3 讨论

基因芯片技术充分利用生物科学、信息学等前

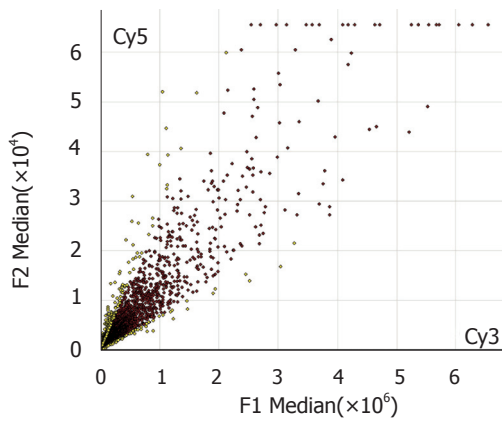


图3 杂交信号强度散点图。

沿学科的先声成果,其具有高通量、微型化和自动化等特点,广泛应用于医学科研的各个领域,为后基因组时代的生命科学研究提供了一种强有力的工具。本研究采用的微矩阵基因芯片是以联合基因科技集团发现的4096条基因为靶基因,制备成cDNA芯片。对两种对照组细胞总RNA逆转录产生的cDNA进行杂交检测,寻找和筛选GABA作用于HSC-T6细胞后,基因表达变化。37条基因在HSC-T6细胞中均有差异表达,其中上调基因11条,下调基因26条。

上调基因中突触蛋白I在将突触泡与包括肌丝、微管和血影蛋白在内的几种细胞骨架元素的结合中发挥作用^[6]。胞质蛋白中 β -连锁蛋白是致癌蛋白的多功能蛋白质,在细胞连接处他与钙黏素相互作用,参与形成黏合带,而游离的 β -连锁蛋白可进入细胞核,调节基因表达,提示该基因表达上调可能与HSC增殖加速有关^[7]。当肝细胞受损或肝内外梗阻时,5'-核苷酸酶释放入血液中,是诊断肝脏疾病的一项较为敏感的生化指标^[8]。法尼基转移酶1活化Ras信号转导通路,促进细胞增殖^[9]。应激活化蛋白激酶是细胞外信号转导至细胞内4大信号转导途径之一^[10]。下调基因中孔蛋白是线粒体外膜上的通道蛋白^[11]。代谢型谷氨酸受体激活后通过胞内信号转导系统调制离子通道活动^[12]。电压依赖性通道调节活性是HSC功能调节的重要方式。细胞色素P450主要分布在内质网和线粒体内膜上,作为一种末端加氧酶,参与了生物体内的甾醇类激素合成等过程。P450可能是人肝细胞内质网中一种重要的磷脂酶D,有改变膜的性质和信号功能等作用^[13]。磷脂结合蛋白是一类被钙离子活化后可与膜磷脂结合的蛋白,参与膜转运及膜表

面其他一系列依赖于钙调蛋白的活动^[14]。维甲类受体调控细胞生长、分化、凋亡等生命活动中起重要作用^[15]。该基因的下调表达可能与HSC的增殖相关。

总之,GABA可能参与调控肝星状细胞的增殖。该芯片的结果还需要进一步的验证,其具体的生物学功能还需深入的研究。

4 参考文献

- Barker JL, Behar T, Li YX, Liu QY, Ma W, Maric D, Maric I, Schaffner AE, Serafini R, Smith SV, Somogyi R, Vautrin JY, Wen XL, Xian H. GABAergic cells and signals in CNS development. *Perspect Dev Neurobiol* 1998; 5: 305-322
- Fizman ML. Insights into GABA functions in the developing cerebellum. *Int Rev Neurobiol* 2005; 71: 95-112
- Jelitai M, Madarasz E. The role of GABA in the early neuronal development. *Int Rev Neurobiol* 2005; 71: 27-62
- Katayama K. Ammonia metabolism and hepatic encephalopathy. *Hepatol Res* 2004; 30S: 73-80
- Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218
- Yamagata Y. New aspects of neurotransmitter release and exocytosis: dynamic and differential regulation of synapsin I phosphorylation by acute neuronal excitation *in vivo*. *J Pharmacol Sci* 2003; 93: 22-29
- Gonzalez FJ. Role of beta-catenin in the adult liver. *Hepatology* 2006; 43: 650-653
- Sotil EU, Jensen DM. Serum enzymes associated with cholestasis. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 41-54
- Rowinsky EK, Windle JJ, Von Hoff DD. Ras protein farnesyltransferase: A strategic target for anticancer therapeutic development. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3631-3652
- Swanek JL, Cobb MH, Geppert TD. Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 6274-6282
- Shoshan-Barmatz V, Israelson A, Brdiczka D, Sheu SS. The voltage-dependent anion channel (VDAC): function in intracellular signalling, cell life and cell death. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 2249-2270
- Dhami GK, Ferguson SS. Regulation of metabotropic glutamate receptor signaling, desensitization and endocytosis. *Pharmacol Ther* 2006; 111: 260-271
- Soars MG, McGinnity DF, Grime K, Riley RJ. The pivotal role of hepatocytes in drug discovery. *Chem Biol Interact* 2006; 18
- Oancea M, Mazumder S, Crosby ME, Almasan A. Apoptosis assays. *Methods Mol Med* 2006; 129: 279-290
- Klopper JP, Hays WR, Sharma V, Baumbusch MA, Hershman JM, Haugen BR. Retinoid X receptor-gamma and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression predicts thyroid carcinoma cell response to retinoid and thiazolidinedione treatment. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 1011-1020

电编 李琪 编辑 王晓瑜

ECi/ECiQ和AxSYM全自动免疫系统的性能比较

曾争, 于敏, 张乃临, 公维波

曾争, 于敏, 张乃临, 北京大学第一医院感染疾病科病毒研究室 北京市 100034

公维波, 中山大学达安基因股份有限公司 广东省广州市 510665

通讯作者: 曾争, 100034, 北京西城区西什库大街8号, 北京大学第一医院感染疾病科病毒研究室. zeng@bjmu.edu.cn

电话: 010-66551799 传真: 010-66551799

收稿日期: 2006-12-03 接受日期: 2007-01-17

Laboratory evaluation of the ECi/ECiQ and AxSYM automatic immunoassay system for detection of HBsAg and anti-hepatitis C virus

Zheng Zeng, Min Yu, Nai-Lin Zhang, Wei-Bo Gong

Zheng Zeng, Min Yu, Nai-Lin Zhang, Laboratory of Virology, Department of Infectious Diseases, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

Wei-Bo Gong, Da An Gene Corporation Limited, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510665, Guangdong Province, China

Correspondence to: Zheng Zeng, Laboratory of Virology, Department of Infectious Diseases, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China. zeng@bjmu.edu.cn

Received: 2006-12-03 Accepted: 2007-01-17

Abstract

AIM: To compare two automatic immunoassay systems (ECi/ECiQ and AxSYM) for monitoring serum HBsAg and anti-HCV, and to investigate the influencing factors on the clinical detection results.

METHODS: Twenty HBsAg- or anti-HCV-positive samples were mixed with normal healthy sera to Cut-Off value and the detection was repeated 40 times. After 50 μ L gas was injected into the samples, bubble-detection test was performed 20 times. Linear correlation was analyzed by diluting HBsAg-positive samples with normal healthy sera in series.

RESULTS: The reproducibility (CV%) of ECi/ECiQ and AxSYM system was 3.57% and 3.87% for HBsAg, and 5.05% and 17.01% for anti-HCV, respectively. The bubble-detection rate of ECi/ECiQ and AxSYM system was 100% and 55%

for HBsAg, and 35% and 15% for anti-HCV, respectively. There was no false-negative result for HBsAg with these two systems. There was also no false-negative result for anti-HCV with ECi/ECiQ system, but there was a false-negative rate of 70.6% for anti-HCV with AxSYM system. For linear analysis, positive HBsAg was still detected when diluted at a ratio of 1 to 40000 with ECi/ECiQ system or 1 to 10000 with AxSYM system, and their correlation coefficients were 0.996 and 0.938, respectively.

CONCLUSION: Both of ECi/ECiQ and AxSYM system are suitable for detecting HBsAg and anti-HCV in clinical laboratory. However, ECi/ECiQ system needs samples with a higher quality. For the "problem samples", AxSYM system produced a higher false-negative rate. Generally, ECi/ECiQ system is superior to AxSYM system in sensitivity, accuracy and reproducibility.

Key Words: HBsAg; Anti-hepatitis; Automatic immunoassay; Performance

Zeng Z, Yu M, Zhang NL, Gong WB. Laboratory evaluation of the ECi/ECiQ and AxSYM automatic immunoassay system for detection of HBsAg and anti-hepatitis C virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(6):633-637

摘要

目的: 比较ECi/ECiQ和AxSYM系统对样品检测的重复性、气泡检出率及线性范围, 讨论其对临床检测结果的影响。

方法: HBsAg/抗-HCV强阳性样品各20份, 正常人血清标本中分别加入一定比例的上述样品至S/Co比值在阈值(Cut-Off)并重复检测40次作重复性实验; 气泡检出试验是在样品中加入50 μ L气体并重复检测20次; 正常人血清连续系列稀释HBsAg强阳性标本并检测线性范围试验。

结果: ECi/ECiQ和AxSYM系统HBsAg重复性(CV%)各为3.57%和3.87%; ECi/ECiQ和AxSYM系统抗-HCV各为5.05%和17.01%。

■背景资料

样本检验前的质量控制是保证检验结果准确性的关键, 也是保证检验结果互认的关键, 虽然检测试剂及系统的稳定性、灵敏度及准确性不断提高, 但由于从样品收集到检测的过程涉及的环节较多, 如不注意将会产生不合格样品而影响检测的结果。

■同行评价

本文通过“问题样本”，比较目前常用的两台全自动免疫检测系统性能，以说明这两个系统对“问题样本”的检测能力及其对结果的影响，在临床上有一定价值。

ECi/ECiQ和AxSYM系统HBsAg气泡检出率各为100%和55%；ECi/ECiQ和AxSYM系统抗-HCV各为35%和15%。ECi/ECiQ系统和AxSYM系统HBsAg均未出现假阴性；ECi/ECiQ系统抗-HCV未出现假阴性，而AxSYM系统为70.6%。ECi/ECiQ在稀释1:40000时仍阳性，其线性相关系数为0.9957，而AxSYM系统在稀释1:10000时阳性，其线性相关系数为0.9384。

结论：ECi/ECiQ和AxSYM两系统均适用于临床检测，但ECi/ECiQ系统对整个检测流程质量控制要求高，而AxSYM系统对样品的质量要求相对较低，在低值标本检测中容易造成假阴性，ECi/ECiQ系统的敏感性和重复性比AxSYM系统好。

关键词：HBsAg；抗HCV；全自动免疫检测系统；性能比较

曾争，于敏，张乃临，公维波. ECi/ECiQ和AxSYM全自动免疫系统的性能比较分析. 世界华人消化杂志 2007;15(6):633-637
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/633.asp

0 引言

我国是乙型肝炎及丙型肝炎的高流行区，乙型肝炎病毒(HBV)感染后尤其是丙型肝炎病毒(HCV)感染后，易转变为慢性，甚至肝硬化及肝癌，随着抗病毒治疗的进展，对临床检测技术的自动化程度、灵敏性、准确性的要求越来越高，同时检测系统对样品的质量控制的要求也越来越高，如果检测前样品出现问题，如运送样品过程中，由于颠簸、震荡等原因造成样品出现气泡，从而导致出现“问题样品”，如果不注意样品前的质控处理，则会产生错误的结果，从而导致临床医生对患者的治疗效果判断产生困惑或错误。而目前在临床上常用于检测乙、丙型肝炎抗原、抗体的全自动免疫系统为ECi/ECiQ系统和AxSYM系统，因此，我们对这两个系统的性能及对“问题样品”的检测进行初步的临床比较分析。

1 材料和方法

1.1 材料 美国强生公司的ECi/ECiQ全自动免疫系统及雅培公司的AxSYM全自动免疫系统均由我科病毒研究室提供，各系统的专用试剂盒均购自其经销商(北京键峰生物技术有限公司和北京圣卓生物医学技术有限公司)，检测操作及结果判断均按照各系统及其试剂盒的要求进行(两

台系统及其试剂盒每年均通过卫生部临检中心的质评)。

1.2 方法

1.2.1 重复性试验 选择我科实验室外观正常标本(指无溶血、黄疸、高血脂等)。取HBsAg/抗-HCV/抗-HIV/抗-HBs均阴性的正常人血浆/血清(>20 mL)，在其中加入一定比例的HBsAg强阳性标本，经充分混匀后，分别应用ECi/ECiQ和AxSYM测定HBsAg，使其各自的测定结果(S/Co比值)在1.5-2.5之间；同理，再用HBsAg/抗-HCV/抗-HIV/抗-HBs均阴性的正常人血浆/血清(>10 mL)，在其中加入一定比例的抗-HCV强阳性标本，经充分混匀后，分别应用ECi/ECiQ和AxSYM测定抗-HCV，使其各自的测定结果(S/Co比值)在1.5-2.5之间。取上述S/Co比值在1.5-2.5之间的标本，同时在ECi/ECiQ和AxSYM两个系统上分别进行HBsAg和抗-HCV的测定；每种项目各自测定40次。

1.2.2 气泡检出试验 样品选择同1.2.1，在0.5 mL样品中加入50 μL气体使样品产生肉眼可见的气泡，同时分别在两个系统中进行HBsAg和抗-HCV的测定，各自测定20次。

1.2.3 线性范围试验 取HBsAg、抗-HCV、抗-HIV和抗-HBs均阴性的正常人血浆/血清标本作为稀释液，对一高浓度的HBsAg样品进行系列稀释(原浓、1:100、1:1000、1:10000、1:20000、1:40000、1:80000和1:160000倍稀释)。分别利用以上两个系统对所有稀释样品进行检测。

统计学处理 结果采用均数±标准差、变异系数百分数(CV%)、S/Co值表示，统计学分析采用相关系数及回归分析。

2 结果

2.1 重复性试验 对HBsAg的检测，ECi/ECiQ系统均值为1.655±0.591，其CV%为3.57%；而AxSYM系统均值为2.620±0.101，其CV%为3.87%。对抗-HCV的检测，ECi/ECiQ系统均值为1.141±0.0576，其CV%值为5.05%；而AxSYM系统均值为1.207±0.205，其CV%为17.01%。

2.2 气泡检出试验 对HBsAg样本中的气泡检测，ECi/ECiQ系统对所检测的20份样本中的气泡全部检出(20/20)；而AxSYM系统只检出11份(11/20)。对抗-HCV样本中的气泡检测，ECi/ECiQ系统对所检测的20份样本中的气泡检出7份(7/20)，AxSYM系统检出3份(3/20)(表1)。

表 1 气泡检测试验 ($n=20$)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
HBsAg	ECi/ECiQ	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	AxSYM	NR	NR	2.34	NR	NR	2.67	NR	NR	2.4	2.31
Anti-HCV	ECi/ECiQ	1.57	NR	NR	NR	1.61	NR	NR	1.66	1.7	1.68
	AxSYM	1.04	1.17	NR	0.14	0.11	NR	0.14	1.09	0.48	NR
		11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
HBsAg	ECi/ECiQ	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	AxSYM	2.47	NR	NR	NR	NR	NR	2.45	2.28	2.45	2.49
Anti-HCV	ECi/ECiQ	NR	1.71	1.71	1.7	1.66	1.68	1.66	1.66	NR	1.68
	AxSYM	0.21	0.37	0.87	0.11	0.11	0.15	1.23		0.45	0.2

NR: No Result(即已经检出气泡).

表 2 ECi/ECiQ, AxSYM系统的稀释试验 (S/Co)

稀释度	1	1/100	1/1000	1/10000	1/20000	1/40000	1/80000	1/160000
ECi/ECiQ ¹	8550	655	65.9	6.89	3.17	1.42	0.63	0.26
AxSYM ²	355.24	94.01	14.76	2.45	1.62	1.2	1.14	1.05

¹ECi/ECiQ系统的阳性判定界值为S/Co>1.00, 其相关系数(r^2)=0.9957; ²AxSYM系统的阳性判定界值为S/Co>2.00, 其相关系数(r^2)=0.9384.

假阴性率: 对气泡检测中ECi/ECiQ系统、AxSYM系统未检出气泡的HBsAg样本, 两系统均未出现假阴性; 对气泡检测中未检出气泡的抗-HCV样本, ECi/ECiQ中未出现假阴性, 而AxSYM系统在未检出气泡的17例样本中有12例样本为假阴性, 其假阴性率为70.6%(12/17)(表1)

2.3 线性范围试验ECi/ECiQ系统在样品稀释1:40 000时仍检测出HBsAg, 其相关系数(r^2)为0.9957; 而AxSYM系统则可在样品稀释1:10 000时检测出HBsAg, 其相关系数(r^2)为0.9384(表2).

3 讨论

病毒性乙型肝炎是全球的一个较严重的公共健康问题, 全球大约有3.5亿人患慢性乙型肝炎^[1], 其中在我国有约1.3亿人被HBV感染, 其中约3000万人为慢性肝炎, 而其中约25%的患者发展为肝硬化和肝癌^[2], 给国家、社会及个人家庭带来沉重的经济负担. 对于HCV感染, 我国的流行率约为3%, 而大多数(85%以上)为无症状感染, 通常发展为慢性丙型肝炎、肝硬化及肝癌, 因此, 临床上筛查HBsAg和抗-HCV很重要. 而HBV、HCV的传播途径主要是通过血液(包括血制品、注射等)和性活动传播. 在HBV感

染早期, HBsAg是最早出现于血液中的病毒标志物之一, 他在肝功能异常和出现黄疸之前即可检出, 在成年时感染HBV, 通常是自限性的, 约95%以上的成年人通过机体产生抗-HBsAg(表面抗体)清除病毒而痊愈, 而少部分成人及婴幼儿时期感染HBV者, HBsAg持续阳性超过6 mo, 即转为慢性HBV感染, 最终可能发展为肝硬化及肝癌, 尽管目前已开发出第三代的酶联免疫法检测HBsAg和anti-HCV, 但在我国其假阴性结果的发生率仍可能会很高^[3-4]; 我们的结果也提示如样本中含有气泡, 则易出现假阴性, 在对HBsAg的检测, ECi/ECiQ及AxSYM系统均未出现假阴性, 但在对抗-HCV的检测, ECi/ECiQ系统未出现假阴性, 而AxSYM系统的假阴性率为70.6%, 这结果与Dufour *et al*^[5]报道的结果酶免法(EIA)假阴性率高相似; 另外ECi/ECiQ系统在稀释1:40 000时仍能测出HBsAg, 而AxSYM系统在1:10 000时测出HBsAg, 提示ECi/ECiQ系统的灵敏度高, 与Ismail *et al*^[6]报道的结果相似, 因此, 必须注意样本分析前的质量控制, 如采血时注意不要抽血速度过快、注入采血管时不要太用力、真空采血管负压不能过大, 而且运送标本时应避免震荡, 样本检测前注意离心等.

AxSYM免疫分析系统是采用荧光偏振原

理的免疫分析系统,这是一种均相荧光免疫分析法,即用荧光素标记的示踪物与分析物的复合体经单一平面偏振光照射后,可发出单一平面的525-550 nm偏振荧光,此荧光在特定偏振面的强度与复合体受激发时的转动速度成反比,而转动速度与分子量的大小成反比.游离的荧光素标记复合体,分子小,转动速度快,激发后发射的光子散向四面八方,因此通向偏振仪的光信号很弱,因此当荧光标记的示踪物与分析物的复合体结合后,与相应大分子抗体进行竞争性结合,使游离的复合体增多,而复合体转动速度较高,这样在特定偏振面上检测到的荧光强度较低,反之检测到的荧光强度就会较高.因此通过检测在特定偏振面上的荧光强度的高低就可得到待检血清中分析物的浓度.这种方法的优点是灵敏度高,线性范围广,有较好的精确度.而ECi/ECiQ系统则是采用增强化学发光方法的免疫分析系统,即将生物素化的第一抗体通过链霉亲和素包被于反应杯内表面上,当待测物与之结合后,再加入用辣根过氧化物酶标记的第二抗体,并采用一种特殊的催化剂三氯四羟基乙酰苯胺与发光剂(luminol)及其他试剂一道加入后,可使辣根过氧化物酶氧化发光剂的反应速度提高百倍以上,这种化学发光强度比单独鲁米诺发光强,持续时间长,而且稳定,易于测定,从而使方法学的灵敏度大大提高.从我们的实验结果来看,这两系统的重复性,其CV%均在20%之内,但对HBsAg的检测,ECi/ECiQ系统为3.57%,而AxSYM系统为3.87%;对抗-HCV的检测,ECi/ECiQ系统为5.05%,而AxSYM系统为17.01%.提示ECi/ECiQ系统的重复性要比AxSYM系统好;从线性实验结果来看,ECi/ECiQ系统的相关系数为0.9957,而AxSYM系统为0.9384;提示临床上应用ECi/ECiQ系统的结果进行治疗前后比较可能比应用AxSYM系统的结果好.由于目前尚未有直接杀病毒的药物,尤其是慢性乙型肝炎病毒感染者,其肝细胞核内存在乙肝病毒的复制模版-共价闭环状DNA(cccDNA),目前尚无药物直接作用于他,而是靠长期使用抑制乙肝病毒复制的药物抑制肝细胞质中的HBV DNA的复制,使其cccDNA无来源而耗竭,出现HBsAg, HBeAg的血清转换,达到临床治愈(病毒整合到人基因组、变异除外).因此在长期抗乙肝病毒治疗的过程中,检测病毒标志物的滴度,准确地了解

抗原抗体的转化,尤其是对HBsAg、HBeAg的血清转换的动态观察,对评价药物抗病毒的作用、疗效及疗程(如停药指标)起到一定的帮助作用^[2,7-15].另外,应用全自动免疫检测系统在血站、血库进行全自动、快速、大样本、准确地筛查献血员的HBsAg及抗HCV也将在预防乙型肝炎和丙型肝炎的输血后传播方面发挥较大的作用.

4 参考文献

- 1 World Health Organization: Hepatitis B. http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisB_whocdscsrlryo2002_2.pdf
- 2 中华医学会肝病学会、中华医学会感染病学分会:慢性乙型肝炎防治指南. 中华传染病杂志 2005; 23: 421-431
- 3 Shan H, Wang JX, Ren FR, Zhang YZ, Zhao HY, Gao GJ, Ji Y, Ness PM. Blood banking in China. *Lancet* 2002; 360: 1770-1775
- 4 吕岳峰,尹澎,刘桃英. 湖南省采供血机构五年血液质量检定情况分析. 中华流行病学杂志 2003; 24: 574-576
- 5 Dufour DR, Talastas M, Fernandez MD, Harris B. Chemiluminescence assay improves specificity of hepatitis C antibody detection. *Clin Chem* 2003; 49: 940-944
- 6 Ismail N, Fish GE, Smith MB. Laboratory evaluation of a fully automated chemiluminescence immunoassay for rapid detection of HBsAg, antibodies to HBsAg, and antibodies to hepatitis C virus. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 610-617
- 7 Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update of recommendations. *Hepatology* 2004; 39: 857-861
- 8 EASL International Consensus Conference on Hepatitis B. 13-14 September, 2002: Geneva, Switzerland. Consensus statement (short version). *J Hepatol* 2003; 38: 533-540
- 9 Liaw YF, Leung N, Guan R, Lau GK, Merican I, McCaughan G, Kane E, Kao JH, Omata M. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2005 update. *Liver Int* 2005; 25: 472-489
- 10 McMahon BJ. Selecting appropriate management strategies for chronic hepatitis B: who to treat. *Am J Gastroenterol* 2006; 101 Suppl 1: S7-S12
- 11 Kurihara T, Imazeki F, Yokosuka O, Fukai K, Kanda T, Kawai S, Saisho H. Effect of lamivudine in HBeAg-positive chronic hepatitis B: discordant effect on HBeAg and HBV DNA according to pretreatment ALT level. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3346-3350
- 12 Liu CJ, Huang WL, Chen PJ, Lai MY, Kao JH, Chen DS. End-of-treatment virologic response does not predict relapse after lamivudine treatment for chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3574-3578
- 13 ter Borg MJ, van Zonneveld M, Zeuzem S, Senturk H, Akarca US, Simon C, Hansen BE, Haagmans BL, de Man RA, Schalm SW, Janssen HL. Patterns of viral decline during PEG-interferon alpha-2b therapy in HBeAg-positive chronic hepatitis B:

- relation to treatment response. *Hepatology* 2006; 44: 721-727
- 14 You J, Zhuang L, Cheng HY, Yan SM, Yu L, Huang JH, Tang BZ, Huang ML, Ma YL, Chongsuvivatwong V, Sriplung H, Geater A, Qiao YW, Wu RX. Efficacy of thymosin alpha-1 and interferon alpha in treatment of chronic viral hepatitis B: a randomized controlled study. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6715-6721
- 15 Flink HJ, van Zonneveld M, Hansen BE, de Man RA, Schalm SW, Janssen HL. Treatment with Peg-interferon alpha-2b for HBeAg-positive chronic hepatitis B: HBsAg loss is associated with HBV genotype. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 297-303

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 •

2005年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序表¹

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

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

缩胆囊素和胰泌素对负鼠胰管压力和胰腺血流量的影响

石承先, Chen JWC, Toouli J

■背景资料

急性胆源性胰腺炎(ABP)常存在不同程度的胰管梗阻和胰管高压与胰腺血液循环障碍,暴饮暴食常是诱发ABP的重要原因之一。饮食中的脂肪或蛋白质等可刺激肠道分泌,其中缩胆囊素和胰泌素是重要的胃肠道激素,已知这两种激素可引起胰液分泌和胆囊收缩等,但是,缩胆囊素和胰泌素在胰管梗阻下是否对胰管压力和胰腺血流量有影响尚不清楚,并在饮食诱发ABP的发生与发展方面的作用有待研究。

石承先, 贵州省人民医院普通外科 贵州省贵阳市 550002
Chen JWC, Toouli J, 澳大利亚弗林德斯大学普通和消化外科 5042
通讯作者: 石承先, 550002, 贵州省贵阳市中山东路, 贵州省人民医院普通外科. chengxianl@yahoo.com.cn
收稿日期: 2006-10-18 接受日期: 2006-12-18

Effects of cholecystokinin and secretin on pancreatic duct pressure and pancreatic blood flow in Australian brush-tailed possums

Cheng-Xian Shi, JWC Chen, J Toouli

Cheng-Xian Shi, Department of General Surgery, Guizhou Provincial Hospital, Guiyang 550002, Guizhou Province, China

JWC Chen, J Toouli, Department of General and Digestive surgery, Flinders University, 5042, Australia

Correspondence to: Cheng-Xian Shi, Department of General Surgery, Guizhou Provincial Hospital, Guiyang 550002, China. chengxianl@yahoo.com.cn

Received: 2006-10-18 Accepted: 2006-12-18

Abstract

AIM: To investigate the effects of cholecystokinin (CCK) and secretin on pancreatic duct pressure (PDP) and pancreatic blood flow (PBF) in Australian brush-tailed possums.

METHODS: CCK and secretin (5 µg/kg) were intravenously injected into 6 brush-tailed possums respectively. Pancreatic duct of the possums were cannulated and PDP was measured by Maclab recording system separately. PBF was measured using laser Doppler flowmetry.

RESULTS: Five minutes after CCK and secretin injection, PDP increased from 16.2 ± 1.8 and 16.8 ± 1.7 mmHg to 18.9 ± 2.1 and 25.6 ± 1.9 mmHg, and maintained high levels (17.6 ± 2.4 mmHg and 21.5 ± 2.5 mmHg) at the 15th minute ($P < 0.002$ and $P < 0.001$); PBF increased from 0.58 ± 0.09 and 0.55 ± 0.04 mL/100 g to 0.75 ± 0.11 and 0.85 ± 0.12 mL/100 g, respectively, at the beginning after CCK and secretin injection. However, CCK and secretin made a continual PDP increase along with PBF decrease till maintaining

a low level (0.51 ± 0.09 mL/100 g and 0.39 ± 0.11 mL/100 g, $P < 0.001$) within 15 minutes, but the influence of secretin was more significant than that of CCK ($P < 0.05$).

CONCLUSION: PDP can be increased by CCK and secretin injection, resulting in an increase of PBF, which may be the initial factor in the pathogenesis and development of acute biliary pancreatitis.

Key Words: Cholecystokinin; Secretin; Pancreatic duct pressure; Pancreatic blood flow; Possums

Shi CX, Chen JWC, Toouli J. Effects of cholecystokinin and secretin on pancreatic duct pressure and pancreatic blood flow in Australian brush-tailed possums. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(6):638-640

摘要

目的: 观察缩胆囊素和胰泌素对胰管压力及胰腺血流量的影响,以探讨急性胆源性胰腺炎的发病机制。

方法: 6只负鼠静脉灌注缩胆囊素和胰泌素 5 µg/kg, 分别胰管插管,并连接到压力感受器上测定胰管压力,激光多普勒测定胰腺血流量。

结果: 在注射缩胆囊素和胰泌素后5 min, 胰管压力分别由16.2 ± 1.8 mmHg和16.8 ± 1.7 mmHg上升到18.9 ± 2.1 mmHg和25.6 ± 1.9 mmHg, 在随后的5-15 min期间, 胰管压力在此水平缓慢的下降并维持在较高的水平, 分别为17.6 ± 2.4 mmHg和21.5 ± 2.5 mmHg ($P < 0.002$ 和 $P < 0.001$); 胰腺血流量分别由0.58 ± 0.09 mL/100 g和0.55 ± 0.04 mL/100 g上升到0.75 ± 0.11 mL/100 g和0.85 ± 0.12 mL/100 g, 在随后的5-15 min期间, 随着胰管压力上升, 胰腺血流量反而缓慢的下降并维持在较低的水平, 分别为0.51 ± 0.09 mL/100 g和0.39 ± 0.11 mL/100 g ($P < 0.001$), 与缩胆囊素相比, 胰泌素的这种作用更为明显($P < 0.05$)。

结论: 缩胆囊素和胰泌素可增加胰管压力, 并使胰腺血流量在开始增加, 增加的胰管压力反而使胰腺血流量下降, 提示在胰管有梗阻的情

况下, 这两种激素可能是急性胆源性胰腺炎发生并发展的重要始动因素之一。

关键词: 缩胆囊素; 胰泌素; 胰管压力; 胰腺血流量; 负鼠

石承先, Chen JWC, Toouli J. 缩胆囊素和胰泌素对负鼠胰管压力和胰腺血流量的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15(6):638-640
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/638.asp

0 引言

研究发现, 急性胆源性胰腺炎(ABP)常存在胰管高压和胰腺血液循环障碍, 并且ABP的类型与胰管压力有关^[1-3], 胰腺血液循环障碍又可能是导致ABP时胰腺坏死的主要原因之一^[3]. 我们的实验显示, 胰管压力与胰腺血流量有关^[4-5]. 暴饮暴食常是诱发ABP的重要原因之一. 饮食中的脂肪或蛋白质等可刺激肠道分泌缩胆囊素(cholecystokinin)和胰泌素(secretin), 两者均可增加胰液分泌^[6]. 但是, 缩胆囊素和胰泌素是否对胰管压力和胰腺血流量有影响尚不清楚. 在本研究中, 我们观察缩胆囊素和胰泌素对负鼠胰管压力和胰腺血流量是否有作用, 以探讨ABP的某些发病机制.

1 材料和方法

1.1 材料 6只负鼠按报道的方法^[7]准备. 首先使用氯胺酮20 mg/kg(澳大利亚卡特兰公司)和Xylazine 10 mg/kg(澳大利亚卢木普公司)肌肉注射麻醉负鼠, 然后左下肢静脉插管, 作为应用输液泵静脉输入戊巴比妥钠15-20 mg/(kg·h)维持麻醉. 左股动脉插管并将此连接到压力感受器(爱尔兰共和国全斯派克公司)术中监测血压. 气管插管并用小动物呼吸机(美国菲力蒲公司)维持负鼠通气. 用电热毯(美国哈维德仪器公司)保温. 剖腹探查, 分别将十二指肠和胰腺轻轻固定于平板上, 以利于作胰管插管和测定胰腺血流量. 6只负鼠胰管的直径1-1.5 mm, 近Oddi括约肌一侧切开, 向胰腺侧插入外直径1.2 mm内直径0.8 mm的聚乙烯导管, 其周用9-0的尼龙线固定, 并连接到压力感受器上, 以测定胰管压力. 右下肢静脉插管用于灌注缩胆囊素和胰泌素.

1.2 方法

1.2.1 测定胰管压力 聚乙烯导管一端插入胰管内, 另一端连接到压力感受器上, 并在胰腺水平调整零点. 准备60 min稳定后, 开始分别灌注缩

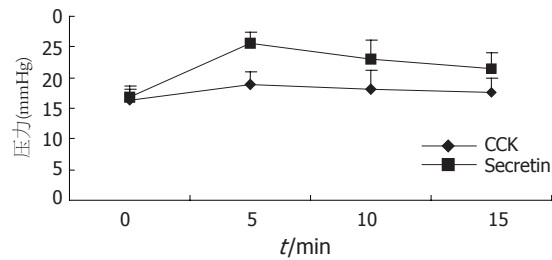


图1 使用缩胆囊素和胰泌素后胰管压力的变化.

胆囊素和胰泌素, 缩胆囊素和胰泌素用量分别为5 μg/kg, 分开静脉灌注, 再分别观察30 min, 同时记录胰管压力.

1.2.2 测定胰腺血流量 在实验中, 使用激光多普勒(瑞典派力麦德公司)测定胰腺血流量. 首先用Vetland胶将该仪器的探头黏附于胰头表面, 在调整25%的基础水平和保持温度的条件下测定. 该仪器的输出端连接到记录系统. 准备60 min稳定后, 开始分别灌注缩胆囊素和胰泌素, 再分别观察30 min, 同时记录胰腺血流量. 胰腺血流量以每100 g组织mL/min表示. 所有感受器都连接到Maclab记录系统(澳大利亚爱迪仪器公司). 实验结束时, 使用致死量的戊巴比妥钠处死动物.

统计学处理 所有资料以平均数±标准差(mean±SD)表示. 比较用t检验.

2 结果

2.1 实验数据的采集 从Maclab记录系统中采集1 min记录的平均值, 采集点分别在注射缩胆囊素和胰泌素后5, 10和15 min 3个点.

2.2 缩胆囊素和胰泌素对胰管压力的作用 在胰管梗阻(胰管插管)的情况下, 分别在注射缩胆囊素和胰泌素后5 min, 胰管压力分别由16.2±1.8 mmHg和16.8±1.7 mmHg上升到18.9±2.1 mmHg和25.6±1.9 mmHg, 在随后的5-15 min期间, 胰管压力在此水平缓慢的下降并维持在较高的水平, 分别为17.6±2.4 mmHg和21.5±2.5 mmHg, 与使用缩胆囊素和胰泌素前相比明显升高($P<0.002$ 和 $P<0.001$), 与缩胆囊素相比, 胰泌素的这种增加胰管压力的作用更为明显($P<0.05$)(图1).

2.3 缩胆囊素和胰泌素对胰腺血流量的影响 在胰管梗阻(胰管插管)的情况下, 分别在注射缩胆囊素和胰泌素后5 min, 胰腺血流量分别由5.8±0.9 mL/kg和5.5±0.4 mL/kg上升到7.5±1.1 mL/kg和8.5±1.2 mL/kg, 在随后的5-15 min期间, 随着胰管压力上升, 胰腺血流量在此水平反而下降

■ 研究前沿

研究发现, 引起ASP的主要原因, 一方面可能是胰腺炎诱发细胞因子与炎症介质的释放和胰腺血液循环障碍发生作用, 另一方面肠细菌移位导致感染引起的二次打击. 此外, 重型ABP的胰管压力比轻型ABP的胰管压力高, 胰管减压使可能发生ASP者仅为轻型ABP, 说明胰管压力在ASP的发生与发展方面起着一定的作用.

■同行评价

本文观察缩胆囊素和胰泌素对负鼠胰管压力和胰腺血流量的影响,有比较重要的发现,对探讨ABP的发病机制有理论意义。

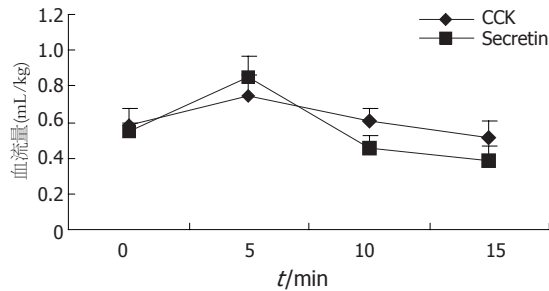


图2 使用缩胆囊素和胰泌素后胰血流量的变化。

并维持在较低的水平,分别为 5.1 ± 0.9 mL/kg和 3.9 ± 1.1 mL/kg,与使用缩胆囊素和胰泌素前相比显著降低($P < 0.001$),与缩胆囊素相比,胰泌素的这种作用更为明显($P < 0.05$)(图2)。

3 讨论

ABP常存在胰管高压,重型ABP的胰管压力比轻型ABP的胰管压力高^[1-2]。暴饮暴食是ABP的主要原因之一。暴饮暴食尤其是其中的脂肪或蛋白质等可刺激肠道分泌缩胆囊素和胰泌素。缩胆囊素和胰泌素可以促使胰腺分泌^[6]。本实验显示,在胰管梗阻(胰管插管)的情况下,缩胆囊素和胰泌素可明显增加胰管压力,其中胰泌素的这种增加胰管压力的作用更为明显。这提示暴饮暴食诱发ABP,其中的重要原因之一可能是食物中的脂肪等可刺激肠道分泌缩胆囊素和胰泌素,在胰管梗阻的情况下,可能通过增加胰腺分泌进而增加胰管压力,从而诱发ABP。

ABP有较低的胰腺血流量,一般减少30%-50%^[3,8]。除了细胞因子的作用外^[11-14],胰腺坏死的主要原因之一可能是胰腺血流量减少^[9-10,15]。本研究表明,缩胆囊素和胰泌素在开始时可以增加胰腺血流量,但是,在胰管有梗阻时缩胆囊素和胰泌素使胰管压力增加的同时反而减少了胰腺血流量,这可能是ABP时发生胰腺血液循环障碍的另一重要原因。这与我们过去的实验证明胰管压力与胰腺血流量呈相反关系相一致^[4-5]。这些结果提示,缩胆囊素和胰泌素可增加胰管压力,由此而使胰腺血流量下降,在胰管有梗阻的情况下,这两种激素可能是餐后ABP发

生并发展的重要始动因素之一。

4 参考文献

- Fujiwara H. Pressure measurement in pancreatic duct and biliary duct system in dogs with acute pancreatitis. *Kobe J Med Sci* 1991; 37: 47-55
- 方传发, 石承先, 剧永乐. 猫胰管压力与急性胆源性胰腺炎病理类型的关系. *贵州医药* 2003; 27: 37-39
- Yotsumoto F, Manabe T, Ohshio G. Bradykinin involvement in the aggravation of acute pancreatitis in rabbits. *Digestion* 1993; 54: 224-230
- 石承先, 余舰, 杨新华, 舒涛, 谢博遥. 胰管压力对犬胰血流量、胰酶释放及胰组织的影响. *贵州医药* 1996; 20: 138-139
- Shi CX, Chen JW, Carati CJ, Schloithe AC, Toouli J, Saccone GT. Effects of acute pancreatic duct obstruction on pancreatic perfusion: implication of acute pancreatic duct decompression. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 1328-1333
- Soicia E. The pathology of the gastrointestinal endocrine system. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1993; 22: 796
- Chen JW, Shi CX, Teng MJ, Schloithe AC, Toouli J, Saccone GT. Scorpion venom stimulates biliary/duodenal motility and pancreatic exocrine secretion. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16: 447-454
- Klar E, Messmer K, Warshaw AL, Herfarth C. Pancreatic ischaemia in experimental acute pancreatitis: mechanism, significance and therapy. *Br J Surg* 1990; 77: 1205-1210
- Spormann H, Sokolowski A, Letko G. Effect of temporary ischemia upon development and histological patterns of acute pancreatitis in the rat. *Pathol Res Pract* 1989; 184: 507-513
- Yotsumoto F, Manabe T, Ohshio G, Imanishi K, Ando K, Kyogoku T, Hirano T, Tobe T. Role of pancreatic blood flow and vasoactive substances in the development of canine acute pancreatitis. *J Surg Res* 1993; 55: 531-536
- 张莹, 石承先, 黄平, 任娟娟, 李玉祥. 丹参对重症急性胰腺炎内皮素-1mRNA的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 35-38
- 张莹, 石承先, 黄平, 任娟娟, 李玉祥. 丹参对重症急性胰腺炎大鼠诱导型一氧化氮合成酶mRNA的表达与器官损伤的影响. *中国中西医结合杂志* 2005; 25: 1012-1015
- 许威, 夏时海, 陈虹. 炎症介质与急性胰腺炎相关性肺损伤. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1188-1192
- Cosen-Binker L, Binker M, Cosen R, Negri G, Tiscornia O. Relaxin prevents the development of severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1558-1568
- Demirag A, Pastor C, Morel P, Jean-Christophe C, Sielenkamper A, Guvener N, Mai G, Berney T, Frossard JL, Buhler LH. Epidural anaesthesia restores pancreatic microcirculation and decreases the severity of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 915-920

电编 张敏 编辑 王晓瑜

外周血单个核细胞TRAIL mRNA和血清sTRAIL水平与HBV感染肝损伤的相关性

毛丽萍, 王惠民, 张子玉, 吴月平, 章幼奕, 鞠少卿, 王陆军, 陈育凤

毛丽萍, 张子玉, 吴月平, 章幼奕, 王陆军, 陈育凤, 南通大学附属南通第三医院检验科 江苏省南通市 226006
王惠民, 鞠少卿, 南通大学附属医院检验科 江苏省南通市 226001
南通市社会发展基金资助课题, No. S2006043
通讯作者: 毛丽萍, 226006, 江苏省南通市, 南通大学附属南通第三医院检验科. maoliping70@163.com
电话: 0513-85116068
收稿日期: 2006-11-09 接受日期: 2006-12-01

Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mRNA in peripheral blood mononuclear cells and serum soluble tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in liver injury caused by chronic hepatitis B

Li-Ping Mao, Hui-Min Wang, Zi-Yu Zhang, Yue-Ping Wu, You-Yi Zhang, Shao-Qing Ju, Lu-Jun Wang, Yu-Feng Chen

Li-Ping Mao, Zi-Yu Zhang, Yue-Ping Wu, You-Yi Zhang, Lu-Jun Wang, Yu-Feng Chen, Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Third Hospital of Nantong University, Nantong 226006, Jiangsu Province, China
Hui-Min Wang, Shao-Qing Ju, Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China
Supported by Social Development Foundation of Nantong City, No. S2006043
Correspondence to: Li-Ping Mao, Department of Clinical Laboratory, the the Affiliated Third Hospital of Nantong University, Nantong 226006, Jiangsu Province, China. maoliping70@163.com
Received: 2006-11-09 Accepted: 2006-12-01

Abstract

AIM: To explore the correlations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) mRNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and serum soluble TRAIL (sTRAIL) in liver injury during chronic hepatitis B (CHB).

METHODS: Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (FQ-RT-PCR) and

sandwich enzyme-linked immunosorbent assay were used to detect the expression of TRAIL mRNA in the PBMCs and the level of sTRAIL in serum of 58 CHB patients, respectively. Then correlation analysis was performed between the results and serum HBV DNA titer, albumin, alanine aminotransferase (ALT) and total bilirubin (TBIL) levels.

RESULTS: The serum level of sTRAIL in patients with CHB (except for the light type) was significantly lower than that in the healthy controls ($t = 2.91, P < 0.05$), but there were no significant differences among patients with various types of CHB. The level of sTRAIL was positively correlated with serum albumin ($r = 0.426, P < 0.05$), but it had no relationship with HBV DNA titer, TBIL and ALT. The expression of TRAIL mRNA in PBMCs was obviously higher in all the CHB patients than that in the healthy controls ($t = 28.31, P < 0.001$), and it had no marked relationship with liver function and HBV DNA titer.

CONCLUSION: Lower level of serum sTRAIL may be correlated with CHB-caused liver injury, which indicates that up-regulation of TRAIL expression on the membranes of PBMCs is involvement in the delayed course of hepatitis B.

Key Words: Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction; Peripheral blood mononuclear cell; Chronic hepatitis B

Mao LP, Wang HM, Zhang ZY, Wu YP, Zhang YY, Ju SQ, Wang LJ, Chen YF. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mRNA in peripheral blood mononuclear cells and serum soluble tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in liver injury caused by chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(6):641-645

摘要

目的: 探讨慢性乙型肝炎(CHB)患者外周血单个核细胞(PBMCs)肿瘤坏死因子相关调

■背景资料

TRAIL为继TNF, FasL之后发现的第3个TNF超家族凋亡分子. 已发现TRAIL的受体有5种DR4, DR5, DcR1, DcR2, OPG, 其中DR4, DR5与TRAIL结合能诱导靶细胞凋亡. 膜结合型TRAIL和sTRAIL均可与TRAIL死亡受体结合, 并三聚体化而引起细胞凋亡.

■ 相关报道

Mundt *et al*发现腺病毒感染鼠肝炎模型中,病毒感染可以激活TRAIL诱导肝细胞凋亡,并推测TRAIL诱导细胞凋亡可能在病毒性肝炎中发挥重要作用,他们还发现HBV感染的患者肝组织TRAIL表达增高,DR4不及DR5上调明显。

亡诱导配体(TRAIL) mRNA及血清可溶性TRAIL(sTRAIL)水平与HBV感染肝损伤的关系。

方法: 采用TaqMan实时荧光定量RT-PCR(FQ-RT-PCR)检测58例慢性肝炎患者外周血PBMCs中TRAIL mRNA水平,采用夹心酶联免疫吸附法分析其血清sTRAIL水平,同时与血清HBV DNA滴度和肝功能相关指标,进行相关性分析。

结果: 除轻度慢性乙肝外,其他各型慢性乙型肝炎患者血清sTRAIL水平均显著低于健康对照组($t = 2.91, P < 0.05$),各型慢性乙肝之间无显著性差异,与白蛋白(ALB)呈显著正相关($r = 0.426, P < 0.05$),与TBIL、ALT及HBV DNA滴度无相关性。各型慢性乙肝患者PBMCs中TRAIL mRNA水平显著高于健康对照组($t = 28.31, P < 0.001$),与肝功能指标及血清HBV DNA滴度无相关性。

结论: 血清sTRAIL水平降低与肝损伤相关,提示单个核细胞膜结合型TRAIL增高与肝损害及乙肝病程迁延不愈有关。

关键词: 荧光定量PCR; 外周血单个核细胞; 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体; 慢性乙型肝炎

毛丽萍, 王惠民, 张子玉, 吴月平, 章幼奕, 鞠少卿, 王陆军, 陈育凤. 外周血单个核细胞TRAIL mRNA和血清sTRAIL水平与HBV感染肝损伤的相关性. 世界华人消化杂志 2007;15(6):641-645

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/641.asp>

0 引言

肿瘤坏死因子(TNF)相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis inducing ligand, TRAIL)仅能诱导肿瘤细胞、转化细胞或病毒感染细胞凋亡,而不诱导正常细胞凋亡^[1],在肿瘤、病毒性感染性疾病中有重要作用^[2-7],TRAIL是典型的II型跨膜蛋白,全长形式TRAIL第109位有一个潜在的N-糖基化位点,可被金属蛋白酶从膜上切下而产生114-281位可溶的活性肽段称为可溶性肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(sTRAIL)。全长形式的膜结合型TRAIL和sTRAIL均具有相同的生物学活性^[8]。有研究显示外周血单个核细胞(PBMCs)中TRAIL mRNA水平与多种疾病有关^[9-10]。为了探索TRAIL在慢性病毒性乙型肝炎发病中的作用,我们建立了TaqMan实时荧光定量RT-PCR(FQ-RT-PCR)检测外周血单个核细

胞中TRAIL mRNA含量的方法,并检测了慢性乙肝(CHB)、肝炎后肝硬化(LC)患者PBMC中TRAIL mRNA的含量,采用ELISA法检测血清中的sTRAIL,同时检测肝功能相关指标,进行相关性分析。

1 材料和方法

1.1 材料 2006-07/2006-10南通大学附属南通第三医院住院患者58例,诊断符合2000年全国病毒性肝炎会议制定的诊断标准,且无其他疾病并存,所有患者研究前均未使用免疫抑制剂和免疫调节剂,男44例,年龄18-56岁,女14例,年龄24-75岁,其中慢性肝炎组轻度13例,中度16例,慢性重度-重型肝炎组7例,肝硬化组22例。20例健康献血者作为正常对照,其中男12名,女8名,年龄23-48岁。人可溶性TRAIL双抗体夹心(ELISA)法试剂盒由美国Biosource公司提供。Ficoll淋巴细胞分离液购自上海SCRC国药集团化学试剂有限公司。TRIzol试剂、SuperScriptTMIII逆转录试剂盒购自美国Invitrogen公司。pGEMT-easy载体、质粒抽提试剂盒、IPTG、X-gal、dNTPS均购自Promega公司。LightCycler循环仪及专用毛细管由Roche公司提供。PTC-200PCR循环仪由美国BIO-RAD公司提供。胶回收试剂盒由上海华舜生物工程公司提供。DNA和RNA定量采用日立U0080D型紫外分光光度计。凝胶成像分析采用美国Wealtec公司Dolphin-Doc成像仪。血清HBV DNA测定试剂盒由上海浩源生物有限公司提供,HBV DNA的PCR扩增采用PE9600PCR扩增仪,产物分析采用美国安杰伦公司Caliper1000微流芯片检测仪及配套软件。肝功能检测:采用日立7170型生化分析仪检测丙氨酸转氨酶(ALT)、血清白蛋白(ALB)、血清总胆红素(TBIL)。

1.2 方法 采集静脉血5 mL, 3 mL置EDTA-K₂抗凝管内,用Ficoll淋巴细胞分离液尽快分离单个核细胞,并用新开瓶的生理盐水1.5 mL洗涤3遍后弃尽上清,加入1 mL TRIzol试剂,震荡使单个核细胞悬起, -70℃冻存备检。另2 mL尽快分离血清,冻存于-70℃备检。

1.2.1 引物、探针设计及合成 依据GenBank所收录的TRAIL-mRNA全序列NM003810和内参 β_2 微球蛋白(β_2 M)mRNA全序列NM004048,用Beacon Designer2.1软件设计引物和探针,由上海生工生物工程公司合成(表1)。

1.2.2 TRAIL, β_2 M定量质粒标准品的构建 按Invitrogen的TRIzol试剂说明书抽提HBV DNA

表 1 引物和探针序列

引物和探针	序列	位置
TRAIL S	5'-CCCAATGACGAAGAGAGTATGAAC-3'	270nt
AS	5'-TGTAGAAATGGTTTCCTCAGAGGT-3'	377nt
Probe	5'-FAM-CTGGCAAGTCAAGTGGCAACTCCGT-TAMRA-3'	302nt
β_2 M S	5'-TCCATCCGACATTGAAGTTGAC-3'	213nt
AS	5'-ACTATCTTGGGCTGTGACAAAG-3'	398nt
Probe	5'-FAM-TGGTTCACACGGCAGGCATACTCA-TAMRA-3'	371nt

■应用要点

本文建立的Taq-Man实时荧光定量检测TRAIL mRNA的方法可应用于临床检测不同组织来源细胞中TRAIL mRNA水平,为进一步探讨TRAIL在其他疾病发病中的作用提供可靠的方法。

表 2 各型肝病患者PBMCs中TRAIL mRNA水平、血清sTRAIL水平与肝功指标相关分析(mean \pm SD)

分组	<i>n</i>	血清sTRAIL(ng/L)	PBMCs TRAIL mRNA	ALB(g/L)	TBIL (μ mol/L)	ALT(nkat/L)	
慢性肝炎	轻度	13	571.5 \pm 314.9	0.785 \pm 0.036 ^b	43.4 \pm 3.9	15.4 \pm 5.0	1478.6 \pm 1477.0
	中度	16	533.4 \pm 139.9 ^a	0.765 \pm 0.032 ^b	41.3 \pm 4.3	20.3 \pm 11.8	4525.9 \pm 5957.9
	重度-重型	7	496.9 \pm 106.4 ^b	0.761 \pm 0.049 ^b	38.0 \pm 4.9	71.2 \pm 69.3	16751.7 \pm 9083.5
肝硬化	22	436.8 \pm 130.2 ^b	0.780 \pm 0.041 ^b	33.1 \pm 5.8	43.4 \pm 54.3	1138.6 \pm 833.5	

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.001$ vs 健康对照组.

表 3 血清sTRAIL水平、PBMCs中TRAIL mRNA水平与血清HBV DNA浓度相关分析(mean \pm SD)

血清HBV DNA(copies/L)	<i>n</i>	PBMCs TRAIL mRNA	血清sTRAIL(ng/L)
阴性	14	0.786 \pm 0.039	508.8 \pm 173.6
$4 \times (10^6 - 10^8)$	10	0.781 \pm 0.023	466.8 \pm 110.2
$10^8 - 10^9$	21	0.764 \pm 0.037	499.0 \pm 285.8
$> 10^9$	13	0.762 \pm 0.025	514.8 \pm 167.9

阳性乙肝患者的外周血单个核细胞的总RNA,紫外分光分析仪测定总RNA浓度和纯度,按SuperScriptTMIII试剂说明书进行逆转录。取cDNA 2 μ L,分别用TRAIL和 β_2 M上下游引物于Bio-Rad PTC-200进行PCR扩增,94 $^{\circ}$ C 3 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s共35个循环,72 $^{\circ}$ C 5 min。回收PCR产物,与pGEM-Teasy载体4 $^{\circ}$ C连接过夜。CaCl₂法常规制备感受态大肠杆菌DH5 α ,连接产物转化感受态细胞,涂布于经20 g/L X-gal和200 g/L IPTG处理的含100 mg/L氨苄青霉素的LB平皿上,37 $^{\circ}$ C培养12-16 h。经蓝白斑筛选,白色菌落经PCR初步鉴定,阳性克隆进一步测序分析(由上海基康生物公司完成)。将筛选出的阳性菌株扩增,抽提质粒,准确定量,计算拷贝数,10倍系列稀释,分装,作为标准品-20 $^{\circ}$ C保存。

1.2.3 单个核细胞TRAIL mRNA的定量检测按1.2.2步抽提总RNA并进行逆转录,cDNA置-20 $^{\circ}$ C保存。将2 μ L cDNA模板加入23 μ L PCR反应液,PCR反应体系为:1 \times PCR Buffer,2.6 mmol/L MgCl₂,0.2 mmol/L dNTPs,TRAIL或 β_2 M上下游引物各0.1 μ mol/L,TRAIL或 β_2 M

荧光探针各0.12 μ mol/L,DNA聚合酶1.5 U。混匀后加入Roche专用毛细管中,并设空白管、阴性对照和TRAIL或 β_2 M 6个质粒标准品对照(浓度分别为10¹²,10¹¹,10¹⁰,10⁹,10⁸,10⁷ copies/L)。PCR扩增参数为:93 $^{\circ}$ C预变性3 min,93 $^{\circ}$ C 5 s,64 $^{\circ}$ C 30 s,40个循环。根据各自标准品建立标准曲线,由软件自动计算待测样本中TRAIL或 β_2 M的含量。为了确证TRAIL反应的特异性,TRAIL的TaqMan荧光PCR产物进行20 g/L的琼脂糖凝胶电泳,均与预期大小108 bp符合。同时为消除标本处理、逆转录和PCR反应差异,以TRAIL mRNA和 β_2 M mRNA含量比值作为评价TRAIL表达水平指标。

1.2.4 人可溶性TRAIL检测 取出血清标本,室温下融化后严格按试剂盒说明书操作。

统计学处理 采用统计Sdata7.0软件,均数比较用成组设计均数 t 检验(双侧),相关分析采用双侧 F 检验。

2 结果

2.1 健康对照组与各型肝病患者血清sTRAIL的

■同行评价

本文建立了Taq-Man实时荧光定量检测TRAIL mRNA的方法,在未经活化刺激的外周血PBMCs中检出了TRAIL mRNA,发现慢性乙肝患者可溶性TRAIL水平显著低于健康对照组.文章的科学性和可读性能较好地反映我国或国际胃肠病学临床和基础研究的较先进水平.

水平 健康者和慢性肝炎患者血清sTRAIL的水平分别为 633.4 ± 119.3 , 500.9 ± 191.0 ng/L,二者比较 $t = 2.91$, $P < 0.05$; CHB(轻、中度)、重度-慢性重型肝炎、LC患者血清sTRAIL的水平分别为 571.5 ± 314.9 , 533.4 ± 139.9 , 496.9 ± 106.4 和 436.8 ± 130.2 ng/L,与健康对照组比较分别为 $P > 0.1$, $P < 0.05$, $P < 0.001$, $P < 0.001$ (表2).慢性乙肝患者血清中sTRAIL与其肝功能指标的相关性分析,血清sTRAIL水平与ALB呈正相关($r = 0.426$, $P < 0.05$).与TBIL、ALT无相关性.

2.2 健康对照组及慢性肝病患者外周血单个核细胞TRAIL mRNA的水平 健康者和慢性肝病患者外周血单个核细胞TRAIL mRNA的水平分别为 0.528 ± 0.014 和 0.775 ± 0.038 ,二者比较 $t = 28.31$, $P < 0.001$. CHB(轻度、中度)、重度-慢性重型肝炎、LC患者外周血单个核细胞TRAIL mRNA的水平分别为 0.785 ± 0.036 , 0.765 ± 0.032 , 0.761 ± 0.049 , 0.780 ± 0.041 ,与健康对照组比较有显著性差异(P 均小于0.01);但各组间无显著性差异.慢性肝病患者外周血单个核细胞TRAIL mRNA的水平与肝功能指标的相关性分析见表2,统计学分析表明,外周血单个核细胞TRAIL mRNA的水平与血清sTRAIL, ALB, TBIL水平均无相关性.

2.3 慢性乙肝患者血清中sTRAIL, PBMCs中TRAIL mRNA水平与血清HBV DNA滴度的相关性分析,统计学分析表明,血清中sTRAIL和PBMC中TRAIL mRNA的水平与不同HBV DNA滴度均无相关性(表3).

3 讨论

近年来,国内外学者研究证实HBV除具有嗜肝细胞性外,还可侵犯外周血单个核细胞形成隐性感染^[11],外周血单个核细胞中的HBV复制中间体HBV cccDNA的检测更能预测抗病毒治疗的疗效^[12],各型慢性乙型肝炎外周血CD4⁺, CD8⁺细胞膜TRAIL表达水平随疾病加重而明显增高^[13].为了进一步探索乙型肝炎患者外周血PBMCs的TRAIL mRNA水平与肝脏免疫病理的关系,我们根据TaqMan基本原理在TRAIL基因的第二个外显子区设计上游引物,在第三个外显子区设计下游引物,建立了TaqMan实时荧光定量检测TRAIL mRNA的方法.上下游引物间跨越第二个内含子,有效地避免了基因组DNA污染所致的假阳性,增加了PCR反应的特异性,同时TaqMan实时荧光定量PCR产物进行凝胶电泳,进一步确

证PCR反应的特异性.根据已知含量TRAIL标准品的标准曲线,由软件计算出样品中起始模板含量,同时为了消除样本处理、逆转录以及PCR反应的差异,以TRAIL mRNA和 β_2M mRNA对数值的比值作为评价TRAIL表达水平的指标,使结果更为客观可靠.本研究发现,在健康者及慢性乙肝患者外周血中均能检测出TRAIL mRNA,但健康者PBMC的TRAIL mRNA水平比文献^[10]报道的以GAPDH为内标的比值略低,这可能与所用引物及内参不同所致.有研究结果提示,乙型肝炎患者外周血淋巴细胞凋亡增加,凋亡率与乙型肝炎的慢性化、机体的免疫状态和血清HBV病毒载量相关^[14-15].本研究发现各型慢性肝病患者PBMC的TRAIL mRNA水平与健康者相比显著增高,但各型慢性肝病患者之间无显著性差异,提示慢性乙肝患者外周血单个核细胞凋亡增加,减弱了机体的抗原提呈功能及特异性免疫反应,导致病程迁延不愈.

TRAIL是1995年由Wiley *et al*^[16]首次发现并克隆成功,为继TNF、FasL之后发现的第3个TNF超家族的凋亡分子.已发现TRAIL的受体有5种: DR4(death receptor-4)、DR5(death receptor-5)、DcR1(decoy receptor-1)、DcR2(decoy receptor-2)、OPG(osteoprotegerin),其中DR4, DR5与TRAIL结合能诱导靶细胞凋亡.膜结合型TRAIL和sTRAIL均可与TRAIL死亡受体结合,并三聚体化而引起细胞凋亡. Mundt *et al*^[17]发现腺病毒感染鼠肝炎模型中,病毒感染可以激活TRAIL诱导肝细胞凋亡,并推测TRAIL诱导细胞凋亡可能在病毒性肝炎中发挥重要作用,他们还发现HBV感染的患者肝组织TRAIL表达增高,DR4不及DR5上调明显.本研究发现,慢性乙肝患者外周血单个核细胞TRAIL mRNA水平比健康者显著增高,但与血清HBV DNA滴度间无相关性.

本研究表明,除轻度型慢性乙肝外,其余各型慢性乙肝患者的血清sTRAIL与健康者相比显著降低,与血清白蛋白呈正相关,而慢性乙肝患者PBMC中TRAIL mRNA水平却显著升高.可能的推断为外周血单个核细胞的膜结合型TRAIL表达增加,与文献^[13]报道的CD4⁺, CD8⁺细胞膜TRAIL表达水平随疾病加重而明显增高一致,与文献^[18]报道的慢性乙肝患者的血清sTRAIL与健康者相比显著升高不相符.也有报道T细胞膜TRAIL上调可促进淋巴细胞增生及IFN- γ 产生,从而引起机体受病毒刺激的免疫反

应^[19]. 研究结果提示单个核细胞通过TRAIL信号参与HBV感染肝细胞的免疫病理.

4 参考文献

- Liedtke C, Groger N, Manns MP, Trautwein C. Interferon-alpha enhances TRAIL-mediated apoptosis by up-regulating caspase-8 transcription in human hepatoma cells. *J Hepatol* 2006; 44: 342-349
- Yamamoto T, Nagano H, Sakon M, Wada H, Eguchi H, Kondo M, Damdinsuren B, Ota H, Nakamura M, Wada H, Marubashi S, Miyamoto A, Dono K, Umeshita K, Nakamori S, Yagita H, Monden M. Partial contribution of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/TRAIL receptor pathway to antitumor effects of interferon-alpha/5-fluorouracil against Hepatocellular Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 7884-7895
- Tsai WS, Yeow WS, Chua A, Reddy RM, Nguyen DM, Schrupp DS, Nguyen DM. Enhancement of Apo2L/TRAIL-mediated cytotoxicity in esophageal cancer cells by cisplatin. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 2977-2990
- Lee TJ, Jung EM, Lee JT, Kim S, Park JW, Choi KS, Kwon TK. Mithramycin A sensitizes cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis by down-regulation of XIAP gene promoter through Sp1 sites. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 2737-2746
- Huang Y, Erdmann N, Peng H, Herek S, Davis JS, Luo X, Ikezu T, Zheng J. TRAIL-mediated apoptosis in HIV-1-infected macrophages is dependent on the inhibition of Akt-1 phosphorylation. *J Immunol* 2006; 177: 2304-2313
- Yano Y, Hayashi Y, Nakaji M, Nagano H, Seo Y, Ninomiya T, Yoon S, Wada A, Hirai M, Kim SR, Yokozaki H, Kasuga M. Different apoptotic regulation of TRAIL-caspase pathway in HBV- and HCV-related hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Med* 2003; 11: 499-504
- Chou AH, Tsai HF, Wu YY, Hu CY, Hwang LH, Hsu PI, Hsu PN. Hepatitis C virus core protein modulates TRAIL-mediated apoptosis by enhancing Bid cleavage and activation of mitochondria apoptosis signaling pathway. *J Immunol* 2005; 174: 2160-2166
- Trabzuni D, Famulski KS, Ahmad M. Functional analysis of tumour necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): cysteine-230 plays a critical role in the homotrimerization and biological activity of this novel tumoricidal cytokine. *Biochem J* 2000; 350 Pt 2: 505-510
- Okuyama S, Komatsuda A, Wakui H, Aiba N, Fujishima N, Iwamoto K, Ohtani H, Sawada K. Up-regulation of TRAIL mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with minimal-change nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: 539-544
- Yndestad A, Damas JK, Geir Eiken H, Holm T, Haug T, Simonsen S, Froland SS, Gullestad L, Aukrust P. Increased gene expression of tumor necrosis factor superfamily ligands in peripheral blood mononuclear cells during chronic heart failure. *Cardiovasc Res* 2002; 54: 175-182
- Hu KQ. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. *J Viral Hepat* 2002; 9: 243-257
- 郭皓宇, 谭德明, 徐旭雯. 慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞中HBV cccDNA预测拉米夫定的治疗效果. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1202-1205
- 陈公英, 何剑琴, 吕国才, 李敏伟, 徐陈槐, 范滩滩, 陈智. 乙型肝炎患者CD4+、CD8+T淋巴细胞TRAIL增高与肝损伤相关性的研究. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 284-286
- 刘征波, 范学工, 胡国龄. TRAIL及TRAIL受体在慢性乙型肝炎患者外周血淋巴细胞的表达. *中华微生物学和免疫学杂志* 2004; 24: 897-900
- 宋蕊, 王玉梅, 石理兰, 冯国和, 马力, 窦晓光. HBV慢性感染患者PBMC凋亡与血清病毒载量. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1574-1577
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995; 3: 673-682
- Mundt B, Kuhnel F, Zender L, Paul Y, Tillmann H, Trautwein C, Manns MP, Kubicka S. Involvement of TRAIL and its receptors in viral hepatitis. *FASEB J* 2003; 17: 94-96
- Han LH, Sun WS, Ma CH, Zhang LN, Liu SX, Zhang Q, Gao LF, Chen YH. Detection of soluble TRAIL in HBV infected patients and its clinical implications. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 1077-1080
- Barber GN. Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death Differ* 2001; 8: 113-126

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 •

世界华人消化杂志的同行评议

本刊讯 《世界华人消化杂志》对所有文章进行在线同行评议, 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.

胃黄色瘤临床病理分析312例

崔荣丽, 金珠

■背景资料

随着胃镜的普及, 黄色瘤的检出率逐年升高。黄色瘤虽然是临床工作中常见的一种组织学表现, 但在内镜诊断中易与肠化结节混淆。

崔荣丽, 金珠, 北京大学第三医院消化科 北京市 100083
通讯作者: 崔荣丽, 100083, 北京市海淀区花园北路49号, 北京大学第三医院消化科. rl_cui@126.com
电话: 010-62017691-2527
收稿日期: 2006-12-10 接受日期: 2007-01-10

Histopathological and clinical analysis on 312 cases of gastric xanthelasma

Rong-Li Cui, Zhu Jin

Rong-Li Cui, Zhu Jin, Department of Gastroenterology, the Third Hospital of Peking University, Beijing 100083, China
Correspondence to: Rong-Li Cui, Department of Gastroenterology, the Third Hospital of Peking University, Beijing 100083, China. rl_cui@126.com
Received: 2006-12-10 Accepted: 2007-01-10

Abstract

AIM: To explore the histopathological and clinical characteristics of gastric xanthelasma (lipid island).

METHODS: Histopathological and clinical analyses were performed on 312 cases of gastric xanthelasma.

RESULTS: The detectable rate of endoscopy for gastric xanthelasma was 0.59% in our hospital. Gastric xanthelasma was most frequently found in the antrum (229/312, 73.4%). Of the 312 cases with gastric xanthelasma, 192 cases (61.5%) were diagnosed with superficial gastritis, 93 cases (29.8%) with atrophic gastritis, 106 cases (34.0%) with intestinal metaplasia, and 108 cases (34.6%) with *H pylori* infection.

CONCLUSION: Multiple factors such as mucosal inflammation, atrophy, intestinal metaplasia and *H pylori* infection are involved in the occurrence of gastric xanthelasma, and inflammation may play a dominant role.

Key Words: Gastric xanthelasma; Chronic gastritis; Intestinal metaplasia; *Helicobacter pylori*

Cui RL, Jin Z. Histopathological and clinical analysis on

312 cases of gastric xanthelasma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(6):646-648

摘要

目的: 探讨胃黄色瘤(脂质岛)的临床病理特征及其与胃黏膜病变的关系。

方法: 收集1997-2006年我院胃黏膜活检资料, 并对胃镜活检诊断为胃黄色瘤的312个病例进行病理分析。

结果: 10 a间我院胃镜活检中胃黄色瘤的检出率为0.59%。312例患者中, 病变位于胃窦部229例(73.4%); 伴发浅表性胃炎192例(61.5%), 萎缩性胃炎者93例(29.8%), 肠上皮化生者106例(34.0%), 幽门螺杆菌阳性者108例(34.6%)。

结论: 胃黄色瘤中老年人好发, 可能是胃黏膜炎症、萎缩、肠上皮化生、幽门螺杆菌感染、残胃、多次活检等多种因素协同作用的结果, 其中胃黏膜的炎症可能起主要作用。

关键词: 胃黄色瘤; 慢性胃炎; 肠上皮化生; 幽门螺杆菌

崔荣丽, 金珠. 胃黄色瘤的临床病理分析312例. *世界华人消化杂志* 2007;15(6):646-648
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/646.asp>

0 引言

胃黄色瘤又称脂质小岛, 胃镜下表现为黄白色结节样隆起, 属于良性病变。他是胃黏膜活检病理诊断中较为常见的一种组织学表现, 其确切病因目前尚不清楚。本文通过对我院胃镜活检组织经病理确诊为黄色瘤的病例进行回顾性分析, 旨在探讨其临床病理特征及与胃黏膜病变的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 收集1997/2006-10我院胃黏膜活检的资料共52 805例, 其中共有病理诊断为黄色瘤者312例。

1.2 方法 组织固定于40 g/L福尔马林, 石蜡包埋, HE染色, 并做Warthin-Starry染色(简称WS)检查 *H pylori*.

统计学处理 统计分析采用STATA5.0软件分析, 进行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

10 a间我院胃镜并取活检者52 805例, 经病理诊断为黄色瘤者共312例, 检出率为0.59%; 其中, 男162例, 女150例, 男:女之比为1.03:1; 年龄24-90(平均59.1)岁, 其中50岁以上者为243例(77.9%). 20-30岁者6例, 31-40岁者22例, 41-50岁者41例, 51-60岁者79例, 61岁以上者164例.

2.1 胃镜特点 黄色瘤病灶多为浅黄色、黄白色, 斑片状, 直径0.1-1.5 cm, 单发或多发, 单发者:多发者 = 15:1. 在312例患者中, 病变位于胃窦部229例(73.4%), 且其中有两例患者在胃窦和十二指肠同时检出黄色瘤, 位于体部47例(15.1%), 位于贲门部22例(7.1%), 残胃的14例(4.5%). 其中做过两次以上胃镜者121人(38.8%).

2.2 病理结果 诊断为黄色瘤的312例患者的胃镜活检组织的病理观察中, 可见胃黏膜浅层固有层内巢状聚集的大小不等的泡沫细胞, 这些细胞是吞噬了脂类物质的巨噬细胞, 细胞呈圆形或多边形, 胞质丰富, 呈泡沫状, 胞核小、圆形、核染色质细且均匀, 核多位于细胞中央, 有的偏于一侧, AB-PAS染色阴性.

312例黄色瘤的病例中并发浅表性胃炎(chronic surface gastritis, CSG)者192例(61.5%), 萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)者93例(29.8%), 两组进行统计学分析, 差异有显著性($P < 0.01$); 伴发肠上皮化生(intestinal metaplasia, IM)者106例(34.0%), 幽门螺杆菌(*H pylori*)阳性者108例(34.6%), 异型增生(atypical dysplasia, ATP)者10例(3.2%), 胃癌(gastric cancer, GC)者7例(2.2%).

3 讨论

黄色瘤在光镜下可见数量不等的圆形或椭圆形含有脂质的泡沫细胞聚集, 他是一种非肿瘤性反应性增生病变, 属于良性病变, 多发生于皮肤及深部内脏. 胃黄色瘤的发病机制目前尚不清楚, 文献报道可能与以下因素有关^[1-5]: 慢性炎症刺激、原发或继发性血脂过高、年龄、*H pylori*感染等.

黄色瘤的发病率各家报道不尽相同, 我国报道的胃镜检出率为0.33%-0.8%^[1,6], 国外报道也不尽相同, Rasim *et al*通过对7320例行上消化内镜检查的患者的研究表明, 黄色瘤在上消化道的检出率为0.23%, 其中胃部占76%^[7]. 本文连续10 a共52 805例胃镜中检出312例黄色瘤, 其检出率为0.59%, 与文献报道相近. 本文中黄色瘤的检出率有逐年增高的趋势, 可能与人口老龄化, 及内镜和病理医师对该病的认识增高有关.

本文中312例患者中, 随着年龄的增加其检出率也增加, 其中50岁以上者为243例(77.9%). 据黄色瘤病例中老年患者的比例增高可以推测该病与年龄呈正相关. 纪小龙 *et al*对150例“正常”老年人的大肠黏膜的研究中, 检出泡沫细胞的占11.3%, 提示年龄升高可能是胃肠道黄色瘤的病因之一^[8]; 有文献报道血脂增高可能是黄色瘤的诱发因素之一^[5], 而高脂血症也是中老年人好发疾病之一, 因此这也可能是黄色瘤在中老年人群中的检出率增高的原因之一.

黄色瘤其基础病变为CSG者与CAG者两组间比较, CSG者192例(61.5%), CAG者93例(29.8%), 两组间差异有统计学意义($P = 0.00$), 同时我们发现黄色瘤多伴有糜烂, 且多发生于黏膜浅层, 故我们认为黄色瘤的发生与慢性炎症的刺激造成胃黏膜损伤有关, 在国内外均有类似的报道^[1,5,9]. 炎症的作用常从胃黏膜的浅层开始, 随着炎症的加重, 逐步向深层发展. 机体的炎症反应产生的细胞碎屑等产物, 经巨噬细胞吞噬后如果所吞噬的脂类物质较多, 而又无法代谢出去, 即可形成泡沫细胞. 但文献上较多见的报道是黄色瘤的发病与CAG关系更为密切^[4,10], 本文作者认为在黄色瘤的发生来说, 慢性炎症的刺激造成的黏膜损伤作用要比萎缩性胃炎的作用机制更为明显. 但还有待于更大的样本量及进一步的深入研究.

有学者认为黄色瘤的形成与IM有关系^[1,5]. 因IM上皮的吸收细胞也具有吸收功能, IM的黏膜可以吸收胃内的脂质, 但伴有IM的胃黏膜没有中央乳糜管, 故不能将吸收的脂质排出而由巨噬细胞吞噬形成泡沫细胞. 同时IM可促进胃黏膜损伤, 而损伤等炎性刺激与黄色瘤发病有关. 本文312例中106例病灶中同时有IM发生, 占34.0%, 虽然较之IM在人群中的检出率高(20.45%-33.12%^[11-13]), 但剩下的66%黄色瘤发生在无IM的区域, 故单纯以IM还不能解释其发生, 可能是包括IM在内的多种因素协同作用的结果.

同行评价

本文总结了黄色瘤组织学改变与可能相关因素的关系, 虽然未能得到新结果, 但是对广大读者了解相关内容有帮助, 文章资料可靠, 文字流利, 结果可信.

在内镜诊断中黄色瘤与淡黄色结节型IM尚需仔细辨别,两者均为淡黄色结节,但前者表面及边界常较光滑;而后者多为轻度不规则型,表面呈细颗粒状或绒毛状。

本文中*H pylori*在黄色瘤的检出率仅为34.6%,而*H pylori*在自然人群中的检出率为47.07%-54.9%^[14-16],不能证实二者是否相关,与现有的文献结果不同^[4],但*H pylori*感染可使胃黏膜炎症加重,而炎症造成的胃黏膜损伤可能影响胃黏膜上皮的正常功能,从而造成黄色瘤的形成。故*H pylori*的感染与黄色瘤的发生的关系还有待进一步研究。本文中312例黄色瘤患者做过两次以上胃镜者121人(38.8%),推测可能与胃镜活检造成胃黏膜损伤,在损伤修复的过程中,脂类物质产生增加,从而增加黄色瘤的发病率。

黄色瘤可发生于胃内任何部位,本文中病变位于胃窦部229例(73.4%),其中有两例伴有十二指肠的黄色瘤;位于体部47例(15.1%),位于贲门部22例(7.1%),残胃的14例(4.5%),胃窦部与其他部位相差异有显著性($P = 0.00$),提示胃窦部发病率较高,与文献报道一致。胃窦部是慢性胃炎和IM等胃黏膜病变的高发部位,而后两者可加速黄色瘤的形成,故可能是胃窦部高发的原因之一。本文中有14例为残胃发生的黄色瘤,可能与胃切除手术对胃黏膜的损伤有关,文献中也有相关报道^[17]。有7例黄色瘤同时伴有胃癌,10例黄色瘤同时伴发异型增生,但胃癌和异型增生与黄色瘤的关系还有待进一步的研究。在临床病理诊断中需要注意的是黄色瘤在组织学形态上要与胃印戒细胞癌相鉴别^[18,19]:泡沫细胞大小较一致,胞质呈泡沫状,细胞核小圆形,无异型性及核分裂像,核多居中;而印戒细胞大小不一致,胞质内有黏液,核大,有异型性,深染,多偏位,细胞排列松散或密集,AB-PAS染色阳性。内镜下黄色瘤多为淡黄色隆起,呈良性表现,而印戒细胞癌多呈糜烂、溃疡、皱襞粗大等恶性表现,故在诊断时可参考临床信息。

总之,胃黄色瘤中老年人好发,他可能是胃黏膜炎症、萎缩、残胃、多次活检等多种因素协同作用的结果,其中胃黏膜的炎症可能起主要作用,而*H pylori*感染对与黄色瘤发生尚无明确关系,这与其他文献报道不一致,尚有待进一步研究;在临床病理诊断时黄色瘤要与印戒细胞癌相鉴别。

4 参考文献

- 唐忠辉,李钟峰.胃黄色瘤临床病理分析.临床荟萃. 2000; 15: 206
- Covotta A, Covotta L, D'Ambra G, Paoletti M, Urbano V, Midiri G, Bertolotti A. Gastric xanthomatosis in a patient with severe lipid metabolic disorder. *G Chir* 1994; 15: 29-31
- Naito M, Miura S, Funaki C, Tateishi T, Kuzuya F. Gastric xanthomas in the elderly. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi* 1991; 28: 683-687
- Isomoto H, Mizuta Y, Inoue K, Matsuo T, Hayakawa T, Miyazaki M, Onita K, Takeshima F, Murase K, Shimokawa I, Kohno S. A close relationship between *Helicobacter pylori* infection and gastric xanthoma. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 346-352
- 任长庆,高梦先,童明超.胃黏膜黄色瘤21例临床病理学研究.河北医药 2001; 23: 204-205
- Chen YS, Lin JB, Dai KS, Deng BX, Xu LZ, Lin CD, Jiang ZG. Gastric xanthelasma. *Chin Med J (Engl)* 1989; 102: 639-643
- Gencosmanoglu R, Sen-Oran E, Kurtkaya-Yapicier O, Tozun N. Xanthelasmas of the upper gastrointestinal tract. *J Gastroenterol* 2004; 39: 215-219
- 纪小龙,富桂华,王孟薇.正常老年人大肠黏膜的病理变化.新消化病学杂志 1995; 3: 154-155
- Arevalo F, Cerrillo G. Gastric xantoma: histological findings and clinico endoscopic characteristics in the "Hospital Nacional 2 de Mayo" (1999-2005). *Rev Gastroenterol Peru* 2005; 25: 268-271
- 张晓明,郑春大.胃黏膜黄色瘤112例.新消化病学杂志 1997; 5: 255
- 郑天荣,陈建顺,王振宇,林兆鑫.幽门螺杆菌与胃病变的关系.中国肿瘤 2000; 9: 537
- 马峻岭,张联,潘凯枫,刘卫东,冯国双,游伟程.幽门螺杆菌与胃癌发生进程的10年队列研究.中华医学杂志 2005; 85: 2758-2761
- 柯昌庶,李道芬,王伟,王一鸣.慢性糜烂性胃炎的临床病理学及免疫组织化学研究.新消化病学杂志 1997; 5: 241-242
- Zhou L, Sung JJ, Lin S, Jin Z, Ding S, Huang X, Xia Z, Guo H, Liu J, Chao W. A five-year follow-up study on the pathological changes of gastric mucosa after *H pylori* eradication. *Chin Med J (Engl)* 2003; 116: 11-14
- 郭晓临,王立娥,王兰,董明,袁媛.胃癌高发区高危人群血清HpCagA毒素相关蛋白检测的意义.世界华人消化杂志 2001; 9: 595-596
- 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
- Khachaturian T, Dinning JP, Earnest DL. Gastric xanthelasma in a patient after partial gastrectomy. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 1588-1589
- Kumar PV, Monabati A, Naini MA, Lankarani KB, Fattahi MR, Asadilari M. Gastric xanthoma: a diagnostic problem on brushing cytology smears. *Acta Cytol* 2006; 50: 74-79
- 王莉,古丽娜·阿不拉江,王铁新,刘霞.胃黄色瘤与印戒细胞癌.新疆医科大学学报 2004; 27: 173-174

电编 李琪 编辑 张焕兰

中国检验幽门螺杆菌感染方法诊断效能的分析

张丽, 张建中

张丽, 张建中, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 北京市 102206
通讯作者: 张建中, 102206, 北京昌平流字5号, 中国疾病预防控制中心(传染病预防控制所). helico99@sina.com
电话: 010-61739319 传真: 010-61730233
收稿日期: 2006-03-18 接受日期: 2006-06-21

Analysis of different diagnostic methods of *Helicobacter pylori* infection in China

Li Zhang, Jian-Zhong Zhang

Li Zhang, Jian-Zhong Zhang, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China
Correspondence to: Professor Jian-Zhong Zhang, National Institute for communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, P.O.Box 5, Changping District, Beijing 102206, China. helico99@sina.com
Received: 2006-03-18 Accepted: 2006-06-21

Abstract

AIM: To analyze the literatures about diagnostic methods for *H pylori* infection in China, and to evaluate the values of different diagnostic methods.

METHODS: The literatures, published from 1994 to 2005 on this topic, were collected. The sensitivity, specificity, and accuracy of 10 diagnostic methods for *H pylori* infection were generally analyzed.

RESULTS: A total of 56 related papers were included according to the selective standard. The sensitivity, specificity and accuracy were 78.39%, 89.13%, and 86.51% for *H pylori* culture test; 91.47%, 93.98%, and 91.89% for pathological examination; 95.49%, 94.76%, and 95.53% for ¹³C-urea breath test; 96.38%, 90.80%, and 94.34% for ¹⁴C-urea breath test; 92.04%, 87.70%, and 98.83% for anti-*H pylori*-IgG test (using enzyme-linked immunosorbent assay); 88.14%, 89.08%, and 88.42% for rapid urease test; 94.53%, 95.56%, and 96.65% for gastric mucosa smear; 97.57%, 89.09%, and 95.44% for polymerase chain reaction; 95.57%, 93.17%, and 94.24% for stool-anti-

gen test; 93.06%, 86.96%, and 91.32% for anti-*H pylori*-IgG test in saliva, respectively.

CONCLUSION: Advantages and disadvantages co-exist in the different diagnostic methods for *H pylori* infection at present, and the choice should be made depending on the actual situation and demands.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Diagnostic method; Evaluation; Analysis

Zhang L, Zhang JZ. Analysis of different diagnostic methods of *Helicobacter pylori* infection in China. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(6):649-654

摘要

目的: 对有关幽门螺杆菌(*H pylori*)感染诊断方法的研究文献进行分析, 评价感染*H pylori*诊断方法的诊断效能。

方法: 检索1994-2005的*H pylori*感染诊断方法的文献资料, 对检索到的相关文献按诊断方法种类分别进行原始数据合并, 然后对10种诊断方法的灵敏度(*Se*)、特异度(*Sp*)、正确率(π)进行分析。

结果: 有56项研究符合选择标准, 综合评价结果如下, *H pylori*培养试验: *Se*为78.39%, *Sp*为89.13%, π 为86.51%; 病理组织学切片检查: *Se*为91.47%, *Sp*为93.98%, π 为91.89%; ¹³C-尿素呼吸试验: *Se*为95.49%, *Sp*为94.76%, π 为95.53%; ¹⁴C-尿素呼吸试验: *Se*为96.38%, *Sp*为90.80%, π 为94.34%; 血清抗*H pylori*-IgG的ELISA法试验: *Se*为92.04%, *Sp*为87.70%, π 为98.83%; 快速尿素酶诊断: *Se*为88.14%, *Sp*为89.08%, π 为88.42%; 胃黏膜涂片法诊断试验: *Se*为94.53%, *Sp*为95.56%, π 为96.65%; PCR法试验: *Se*为97.57%, *Sp*为89.09%, π 为95.44%; *H pylori*粪便抗原试验(*H pylori* SA)-酶免疫法: *Se*为95.57%, *Sp*为93.17%, π 为94.24%; 唾液抗*H pylori*-IgG试验*Se*为93.06%, *Sp*为86.96%, π 为91.32%。

结论: 目前临床常用的各种诊断方法诊断效

背景资料

我国学者对幽门螺杆菌感染诊断方法开展了大量研究, 取得积极成果, 但缺乏系统性和可比性。Meta分析属于观察性研究方法, 评价指标包括灵敏度(*Se*)、特异度(*Sp*)、正确率(π)、阳性预测值[PV(+)]、阴性预测值[PV(-)]等5项。

■同行评价

本文对有关幽门螺杆菌感染诊断方法的研究文献进行Meta分析,评价了幽门螺杆菌感染的诊断方法的诊断效能,选题准确,有一定的临床指导意义。

能对比显示,各种诊断方法各有优缺点。临床上采用何种诊断方法,应根据具体情况和不同要求来决定。

关键词: 幽门螺杆菌; 诊断方法; 分析

张丽, 张建中. 中国检验幽门螺杆菌感染方法诊断效能的分析. 世界华人消化杂志 2007;15(6):649-654

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/649.asp>

0 引言

多年来我国学者对幽门螺杆菌(*H pylori*)感染诊断方法开展了大量研究,取得积极成果。但因研究受条件限制,所观察的样本各自独立且样本量较小,诊断标准也不尽相同,所以结论往往不完全一致,缺乏系统性和可比性。本文将就我国有关*H pylori*感染诊断方法的研究文献进行回顾综合分析,以期对目前临床常用的多种*H pylori*感染诊断方法做出比较系统的综合评价,为临床选用诊断方法提供一些参考数据。

1 材料和方法

1.1 材料 以“幽门螺杆菌”、“诊断”、“检测”、“检查”和“*H pylori*”主题词联合检索CHKD期刊全文库核心期刊或源期刊,全国幽门螺杆菌会议论文汇编,获得1994-2005有关*H pylori*感染诊断方法的研究文献。筛选目前临床上常用的10种诊断方法的数据完整的相关文献资料进行分析。未包含香港、台湾和澳门地区资料。

1.2 方法

1.2.1 资料选择 各篇文献均为研究*H pylori*诊断方法内容,研究对象为中国人,包括各类特征人群。*H pylori*感染诊断方法包括:*H pylori*培养试验、病理组织学切片、¹³C-尿素呼气试验(¹³C-UBT)、¹⁴C-尿素呼气试验(¹⁴C-UBT)、血清抗*H pylori*抗体(血清抗*H pylori*-IgG)、快速尿素酶(RUT)、胃黏膜涂片镜检、PCR、*H pylori*粪便抗原(*H pylori* SA)与唾液抗*H pylori*抗体(唾液抗*H pylori*-IgG)等10种诊断方法。共检索到411篇摘要,阅读后有280篇入选,鉴于一些研究没有原始数据、计算有误差或研究的诊断方法诊断标准不符合要求等原因,最后有56项研究符合选择标准。

剔除标准: 重复发表的论文; 综述、评论或讲座不能提取统计学内容的研究。

1.2.2 Meta分析 首先,对检索到的相关文献按诊

断方法种类分别进行原始数据合并,得到每一种诊断方法的综合评价指标,然后对10种诊断方法的综合评价指标进行比较。因所选择文献报道的诊断方法采用的金标准相同或类似,并且每篇文献报道的灵敏度(*Se*)、特异度(*Sp*)、正确率(π)等指标与金标准方法比较无显著性差异($P>0.05$),因此可进行原始数据的合并。合并公式为:

$$\sum Se = \sum_{i=1}^n Ai / \sum_{i=1}^n (Ai + Ci)$$

$$\sum Sp = \sum_{i=1}^n Di / \sum_{i=1}^n (Di + Bi)$$

$$\sum \pi = \sum_{i=1}^n (Ai + Di) / \sum_{i=1}^n (Ai + Bi + Ci + Di)$$

其中:A为诊断试验的真阳性例数,B为假阳性例数,C为假阴性例数,D为真阴性例数。下标*i*为文献序号。

2 结果

2.1 *H pylori*培养 *H pylori*培养试验共检索到相关文献10篇,经过计算根据前面所述的3个公式,计算得到病理组织学检查的综合评价结果:*Se*为78.39%,*Sp*为89.13%, π 为86.51%(表1)。

2.2 病理组织学切片检查 病理组织学切片检查共检索到相关文献16篇,计算得到(详细列表略^[2,5,7,10,14,22,24,31-32,37,39-40,46,48,49,51,53,55])病理组织学切片检查的综合评价结果:*Se*为91.47%,*Sp*为93.98%, π 为91.89%。

2.3 ¹³C-尿素呼吸试验(¹³C-UBT) ¹³C-UBT共检索到相关文献13篇,经过计算(详细列表略^[2,11,13-14,18,20-22,32,34,36,55-56])得到¹³C-UBT的综合评价结果:*Se*为95.49%,*Sp*为94.76%, π 为95.53%。

2.4 ¹⁴C-尿素呼吸试验(¹⁴C-UBT) ¹⁴C-UBT共检索到相关文献15篇,经过计算(详细列表略^[5-6,11,19,23-29,38-39,43-44])¹⁴C-UBT综合评价结果:*Se*为96.38%,*Sp*为90.80%, π 为94.34%。

2.5 血清抗*H pylori*-IgG的ELISA法试验 关于血清抗*H pylori*-IgG诊断试验共检索到相关文献10篇,经过计算(详细列表略^[1-2,4-7,35-36,44-45,53-55])ELISA法诊断试验综合评价结果:*Se*为92.04%,*Sp*为87.70%, π 为98.83%。

2.6 快速尿素酶试验 快速尿素酶诊断试验相关文献共检索到29篇(表2),快速尿素酶诊断综合评价结果:*Se*为88.14%,*Sp*为89.08%, π 为88.42%。

表 1 *H pylori*培养试验之相关文献及统计数字

序号 <i>i</i>	<i>H pylori</i>				合计	<i>Se</i> (%)	<i>Sp</i> (%)	π (%)	PV(+)(%)	PV(-)(%)
	+		-							
	A	C	B	D						
1 ^[2]	130	42	0	17	189	75.58	100.0	77.78	100.0	28.81
2 ^[3]	30	1	7	53	91	96.77	88.33	91.21	81.08	98.15
3 ^[9]	61	53	8	115	237	53.51	93.50	74.26	88.41	68.45
4 ^[12]	360	40	102	443	945	90.00	81.28	84.97	77.92	91.72
5 ^[15]	47	15	4	34	100	75.81	89.47	81.00	92.16	69.39
6 ^[17]	175	26	0	58	259	87.06	100.0	89.96	100.0	69.05
7 ^[31]	41	2	0	33	76	95.35	100.0	97.37	100.0	94.29
8 ^[32]	264	107	3	221	485	71.16	98.66	100.0	98.88	67.38
9 ^[35]	40	39	0	16	95	50.63	100.0	58.95	100.0	29.09
10 ^[51]	60	8	0	27	95	88.24	100.0	91.58	100.0	77.14
合计	1208	333	124	1017	2572	78.39	89.13	86.51	90.69	75.33

2.7 胃黏膜涂片镜检 涂片法诊断试验共检索到相关文献7篇, 经过计算(详细列表略^[35,37,43-44,46,51,54])涂片法诊断试验综合评价结果: *Se*为94.53%, *Sp*为95.56%, π 为96.65%。

2.8 PCR法试验 PCR法诊断试验共检索到相关文献4篇, 经过计算(详细列表略^[4,7-8,49])PCR法诊断试验综合评价结果: *Se*为97.57%, *Sp*为89.09%, π 为95.44%。

2.9 *H pylori*粪便抗原试验(*H pylori*SA)-酶免疫法 *H pylori* SA法诊断试验共检索到相关文献10篇, 经过计算(详细列表略^[5,9,13,33,41,47-48,50,52,56])*H pylori* SA法诊断试验综合评价结果: *Se*为95.57%, *Sp*为93.17%, π 为94.24%。

2.10 唾液抗*H pylori*-IgG试验 关于唾液抗*H pylori*-IgG法诊断试验共检索到相关文献3篇, 经过计算(详细列表略^[4,36-37])唾液抗*H pylori*-IgG诊断试验综合评价结果: *Se*为93.06%, *Sp*为86.96%, π 为91.32%。

2.11 各种*H pylori*诊断方法综合评价结果统计表(表3)。

3 讨论

Meta分析属于观察性研究方法, 在设计、资料收集、统计分析过程中难免存在偏倚。我通过多种途径尽可能全面收集了我国1994-2005年发表的56篇有关*H pylori*的文献资料, 力求控制多种偏倚使Meta分析获得可靠的结果。虽然论文数量存在地区差异, 但确实呈现了一定时期内我国对*H pylori*感染诊断方法研究的现状, 研究结果在一定程度上反映出国内各诊断方法效能。

按临床常用的10种诊断方法种类分别进行统计综合评价, 评价指标包括灵敏度(*Se*)、特异度(*Sp*)、正确率(π)、阳性预测值[PV(+)]、阴性预测值[PV(-)]等5项。这10种诊断方法都具有较高的灵敏度、特异度和正确率, 其中灵敏度最高的诊断方法是PCR法, 正确率和特异度最高的诊断方法是胃黏膜涂片镜检。

总的看来, *H pylori*感染的这些诊断方法, 最简便的, 成本最低廉的, 仅有极小侵袭性的是血清学ELISA法检测*H pylori*-IgG, 可是, 血清学阳性只能说曾感染过或现在正在感染, 不能用于对近期*H pylori*根除效果的判断; ¹³C-尿素呼吸诊断试验是完全无损伤性的, 且能检测即时整个胃的感染情况, 是比较理想的, 可是由于受设备限制, 费用较贵难于普遍推广; ¹⁴C-尿素呼吸诊断试验虽然大医院有条件可做, 价格比¹³C-尿素呼吸诊断试验便宜, 但有放射性损害; 快速尿素酶试验(RUT)属间接试验, 其强度取决于活检标本中细菌的密度; PCR法用于*H pylori*感染诊断与其他方法比较更为敏感, 而且PCR可检出常规方法不能检出的*H pylori*, 目前已用于各种临床标本的检测。*H pylori*培养试验费时且灵敏度不高, 病理组织学切片, 胃黏膜涂片镜检均需要较高的检验经验且对取材部位也有相当高的要求, 但值得注意的是, 鉴于细菌耐药情况日趋严重, *H pylori*培养方法的采用对今后的菌株耐药性评价具有重要意义。

发现问题: (1)诊断方法多, 试剂不统一。从本研究看来, 目前*H pylori*感染诊断方法较多, 每

表 2 快速尿素酶诊断试验之相关文献及统计数字

序号 <i>i</i>	<i>H. pylori</i>				合计	Se(%)	Sp(%)	π (%)	PV(+)(%)	PV(-)(%)
	+		-							
	A	C	B	D						
1 ^[2]	151	15	18	90	274	90.96	83.33	87.96	89.35	85.71
2 ^[4]	49	4	4	33	90	92.45	89.19	91.11	92.45	89.19
3 ^[5]	80	7	9	21	117	91.95	70.00	86.32	89.89	75.00
4 ^[6]	48	4	2	14	68	92.31	87.50	91.18	96.00	77.78
5 ^[7]	130	12	4	40	186	91.55	90.91	91.40	97.01	76.92
6 ^[8]	59	2	3	82	146	96.72	96.47	96.58	95.16	97.62
7 ^[9]	50	3	4	41	98	94.34	91.11	92.86	92.59	93.18
8 ^[20]	42	11	11	36	100	79.25	76.60	78.00	79.25	76.60
9 ^[21]	45	1	3	33	82	97.83	91.67	95.12	93.75	97.06
10 ^[22]	45	8	2	10	65	84.91	83.33	84.62	95.74	55.56
11 ^[24]	33	11	1	12	57	75.00	92.31	78.95	97.06	52.17
12 ^[25]	81	15	6	58	160	84.38	90.63	86.88	93.10	79.45
13 ^[29]	53	4	3	20	80	92.98	86.96	91.25	94.64	83.33
14 ^[30]	31	1	2	53	87	96.88	96.36	96.55	93.94	98.15
15 ^[31]	151	50	0	58	259	75.12	100.0	80.69	100.0	53.70
16 ^[32]	41	2	0	33	76	95.35	100.0	97.37	100.0	94.29
17 ^[37]	62	3	5	13	83	95.38	72.22	90.36	92.54	81.25
18 ^[39]	55	4	7	53	119	93.22	88.33	90.76	88.71	92.98
19 ^[42]	36	3	3	20	62	92.31	86.96	90.32	92.31	86.96
20 ^[43]	79	9	3	35	126	89.77	92.11	90.48	96.34	79.55
21 ^[44]	228	31	3	98	360	88.03	97.03	90.56	98.70	75.97
22 ^[45]	44	8	4	34	90	84.62	89.47	86.67	91.67	80.95
23 ^[46]	119	12	5	49	185	90.84	90.74	90.81	95.97	80.33
24 ^[48]	71	23	25	61	180	75.53	70.93	73.33	73.96	72.62
25 ^[49]	64	15	3	13	95	81.01	81.25	81.05	95.52	46.43
26 ^[51]	65	3	1	26	95	95.59	96.30	95.79	98.48	89.66
27 ^[53]	241	29	10	104	384	89.26	91.23	89.8	96.02	78.20
28 ^[54]	61	8	0	31	100	88.41	100.0	92.00	100.0	79.49
29 ^[55]	46	6	4	12	70	88.46	75.00	82.86	92.00	66.67
合计	2260	304	145	1183	3894	88.14	89.08	88.42	93.97	79.56

表 3 不同诊断方法综合评价结果比较^[57]

序号	论文数量	诊断方法	Se(%)	Sp(%)	π (%)	PV(+)(%)	PV(-)(%)
1	10	<i>H. pylori</i> 培养试验	78.39	89.13	86.51	90.69	75.33
2	16	病理组织学切片	91.47	93.98	91.89	97.19	82.87
3	13	¹³ C-尿素呼气试验	95.49	94.76	95.53	96.49	93.29
4	15	¹⁴ C-尿素呼气试验	96.38	90.80	94.34	94.80	93.52
5	10	血清抗 <i>H. pylori</i> -IgG	92.04	87.70	98.83	95.08	81.01
6	29	快速尿素酶	88.14	89.08	88.42	93.97	79.56
7	7	胃黏膜涂片镜检	94.53	95.56	96.65	98.36	86.12
8	4	PCR	97.57	89.09	95.44	96.40	92.45
9	10	<i>H. pylori</i> SA	95.57	93.17	94.24	94.23	94.75
10	3	唾液抗 <i>H. pylori</i> -IgG	93.06	86.96	91.32	94.71	83.33

一种方法都各有优劣. 即便是同一种方法也可能因为选用的试剂不同而存在较大差异. (2)金

标准的使用差异大。从所选中的论文看, 各研究所使用的金标准很难统一, 同一研究选用不同的诊断方法当标准都可能得出同一诊断方法几种不同诊断效能指标。在已制定的 *H pylori* 诊断标准里, 对相关问题细化不足, 应当制定一些使用细则。例如做临床诊断实验效能研究时, 怎样取舍阳性和阴性标准。可以制定成当使用3种方法诊断时, 留下二项阳性者做为患者组, 三项全部阴性都为非患者组。(3)统计方法使用问题。有一些研究做了许多工作, 但是许多原始数据没有保留或使用, 没有充分利用数据进行分析; 有的文献使用数据有错误, 均造成论文质量受损, 未能纳入本研究。

4 参考文献

- 1 王虹, 杨建华, 屠柏强, 汪明, 肖正达, 郭映明, 付志君, 孙振兴, 张兴荣, 张宗祁, 姚光弼. 动态观察特异性血清IgG、IgA对幽门螺杆菌的诊断和疗效的意义. 中华消化杂志 1998; 18: 127-129
- 2 姜葵, 潘国宗, 温淑豪, 杨晓鸥, 贝濂, 江骥, 张承训. 幽门螺杆菌感染诊断方法的比较. 胃肠病学 1997; 2: 150-152
- 3 伊妮, 华冰, 王昕蕾, 吴瑞华. 3种幽门螺杆菌的检测方法评价. 上海医学检验杂志 2001; 16: 304-305
- 4 陈玉丽, 陈奕贵, 吴婷, 林经安, 刘豫瑞, 王承党, 潘玉凤. 几种幽门螺杆菌检测方法比较. 中国人兽共患病杂志 2001; 17: 56-58
- 5 林惠, 郑登滋, 叶火铨, 魏霖, 王启国, 唐福康. 酶免疫等5种方法对幽门螺杆菌检测比较. 海峡预防医学杂志 2001; 7: 38-39
- 6 夏先考, 车世友, 唐家新. 幽门螺杆菌检测方法临床应用调查. 中国现代医学杂志 2000; 10: 57
- 7 杨朝国, 许建, 刘洪学. 幽门螺杆菌检测方法的评价. 中华检验医学杂志 2000; 23: 39
- 8 袁济民, 向祖琼, 陈颖, 萧树东, 张达荣, 刘文忠. ¹⁴C-尿素呼气试验对胃幽门螺杆菌感染的诊断价值. 中华核医学杂志 1998; 18: 86-88
- 9 祁小鸣, 李萍, 毛志东. 粪便抗原检测对幽门螺杆菌感染的诊断价值. 临床荟萃 2003; 18: 61-63
- 10 陈江, 谢勇, 吕农华, 祝金泉, 张昆和, 黄德强. Giemsa染色对幽门螺杆菌感染的诊断价值. 实用临床医学 2003; 4: 28
- 11 常巨平, 张厚德. 尿素呼气试验对血液透析患者幽门螺杆菌感染诊断准确性评价. 中华肾脏病杂志 2001; 17: 178-180
- 12 胡伟国, 黄爱芬, 黄开宇, 徐辉, 程芹芹, 李向阳, 王宗敏. 细菌培养在幽门螺杆菌感染诊断及治疗中的作用. 实用儿科临床杂志 2000; 15: 213-214
- 13 曾志荣, 胡品津, 陈旻湖, 陈为, 胡胜. 幽门螺杆菌粪便抗原检测在幽门螺杆菌感染诊断及随访中的价值. 中华消化杂志 2001; 21: 713-715
- 14 朱永良, 陈国弟, 钱可大, 杜勤, 吴勤动, 凌世生, 李葆华, 李君, 冯燕飞. 幽门螺杆菌抗体测定在幽门螺杆菌感染诊断中的价值. 中华医学杂志 2001; 81: 1209-1210
- 15 张振华, 黄雪萍, 杨贵珍, 郭晓奎. 幽门螺杆菌感染诊断方法的比较. 中国微生态学杂志 2004; 16: 80-82
- 16 王凯娟, 王润田. 中国幽门螺杆菌感染流行病学Meta分析. 中华流行病学杂志 2003; 24: 443-446
- 17 卢葵花, 徐魁. 无创性手段检测HP的意义. 咸宁学院学报(医学版) 2003; 17: 263-265
- 18 杨根妹, 沈江帆. 探讨¹³C尿素呼气试验检测HP感染的临床价值. 上海医学 2000; 23: 619-620
- 19 吴勤动, 钱可大, 朱永良, 孙丽萍, 唐训球, 杜勤. ¹⁴C-尿素呼气试验诊断HP感染临床价值探讨. 浙江医学 1998; 20: 729-730, 733
- 20 许长德, 陈绍亮, 刘文官. ¹³C-UBT诊断Hp的临床价值. 同位素 2004; 17: 250-252
- 21 吴叔明, 施尧, 刘文忠, 张德中, 箫树东, 向祖琼, 袁济民, 王慧娟, 沈凤英. ¹³C-尿素呼气试验诊断幽门螺杆菌感染的研究. 胃肠病学 1997; 2: 153-155
- 22 张林, 戴翔, 刘岩, 江骥, 胡蓓, 李晓明. ¹³C-尿素呼气试验诊断幽门螺杆菌感染的临床意义. 山东医药 2000; 40: 1-2
- 23 徐海燕, 黄智铭. ¹⁴C-尿素呼气试验诊断幽门螺杆菌感染. 第四军医大学学报 2003; 24: 2145
- 24 刘建滨, 王明月, 郑飞波, 林崇茂. ¹⁴C-尿素呼气试验诊断幽门螺杆菌的评价. 中华核医学杂志 2000; 20: 275
- 25 江中林. ¹⁴C-尿素呼气试验诊断幽门螺杆菌的评价. 放射免疫学杂志 2002; 15: 126
- 26 杨兵, 韩永群, 武希润, 张瑞, 郭文栋. ¹⁴C-尿素呼吸试验诊断幽门螺杆菌感染的研究. 山西临床医药杂志 2000; 9: 20-21
- 27 刘文忠, 萧树东, 施尧, 向祖琼, 袁济民. ¹⁴C-尿素呼吸试验诊断幽门螺杆菌感染. 上海第二医科大学学报 1997; 17: 395-396
- 28 斯镡, 欧阳钦, 匡安仁, 陈代云. ¹⁴C-尿素呼吸试验半定量诊断幽门螺杆菌感染. 中国实验诊断学 1999; 3: 113-115
- 29 张达荣, 胡桂和, 吴帆, 萧树东, 袁济民, 向祖琼. ¹⁴C-尿素呼吸试验诊断幽门螺杆菌感染的应用. 上海医学 1996; 19: 373-375
- 30 张厚德, 马永健. 0.75uCi胶囊法¹⁴C-UBT诊断幽门螺杆菌感染. 胃肠病学和肝病学杂志 1997; 6: 261-263
- 31 焦建华, 徐顺福, 袁建平, 张红杰, 张小勇, 赵志泉. 3种方法不同组合诊断幽门螺杆菌感染的比较. 南京医科大学学报 1999; 19: 406-408
- 32 吴叔明, 高琴琰, 张德中, 萧树东. 红外能谱仪检测¹³C-尿素呼气试验诊断幽门螺杆菌感染. 胃肠病学 2001; 6: 206-208
- 33 郝波, 徐顺福, 赵志泉, 王宏娣. 检测粪便抗原诊断幽门螺杆菌感染. 江苏医药杂志 2002; 28: 44-45
- 34 郑青, 陈晓宇, 潘熾, 施尧. 两种¹³C-尿素呼气试验试剂诊断幽门螺杆菌感染临床可靠性比较. 胃肠病学 2004; 9: 210-212
- 35 陈瑞川, 张长弓, 方莹, 颜江华. 人胃粘膜活检标本测氨法诊断幽门螺杆菌感染. 浙江肿瘤 1997; 3: 85-87
- 36 郝志明, 周秦蜀, 吴玉娥. 唾液IgG抗体测定诊断幽门螺杆菌感染. 中国实验诊断学 1999; 3: 115-116
- 37 李子俊, 邹伟民, 蒋涛. 唾液抗幽门螺杆菌IgG检测诊断幽门螺杆菌感染的评价. 临床内科杂志 1999; 16: 88-89
- 38 骆子义, 关丽娟, 胡湘海. 微量¹⁴C-尿素呼气试验诊断幽门螺杆菌的研究. 中国内镜杂志 2000; 6: 11-13
- 39 黄勃栋, 郑培奋, 程玲, 程家欣, 赵力. 微量¹⁴C-尿素呼吸试验诊断幽门螺杆菌感染的评价. 临床内科杂志 1999; 16: 80-81
- 40 李惠珍, 袁福业, 侯晓华. 胃组织HE染色诊断幽门螺杆菌感染. 临床消化病杂志 1999; 11: 19-20
- 41 成虹, 胡伏莲. 幽门螺杆菌粪便抗原免疫卡在诊断幽门螺杆菌现症感染和判断其在根除治疗中的价值. 中华医学杂志 2004; 84: 1166-1170
- 42 赖铭裕, 唐国都, 陈振依, 洪瑞香. ¹³C-尿素呼气试验检测幽门螺杆菌感染的评价. 广西医学 2005; 27: 475-477
- 43 江庭彪, 林慧玲. 昏迷并股骨骨折16例治疗体会. 广西医学 2003; 25: 599-601

- 44 邢广栋, 王晓娟, 李雷花, 刘亚普. ^{14}C -尿素呼气试验检测幽门螺杆菌感染的临床应用. 河北医学 2003; 9: 188-189
- 45 钟宏良, 程亦陵, 殷秋华. 5种检测幽门螺杆菌方法的比较. 中国公共卫生 1997; 13: 396-397
- 46 胡继军, 方向明, 熊碧芳, 柳亢宗. 5种检测幽门螺杆菌感染方法的应用评价. 中华医学杂志 1999; 23: 封3
- 47 李宜辉, 郭红, 张朋彬, 达四平, 王雷, 柏建鹰, 赵晓晏. HpSA免疫快检卡检测幽门螺杆菌粪便抗原的临床价值. 重庆医学 2004; 33: 79-80
- 48 姜贵君, 方慧祺, 林静霓, 何洁, 邓燕, 聂明, 郑启忠. 多种方法联合检测幽门螺杆菌对诊治中重度萎缩性胃炎的意义. 中国中西医结合消化杂志 2004; 12: 172-173
- 49 屈汉庭, 房振环, 刘勇, 杨晓林. 改良式聚合酶链反应检测幽门螺杆菌. 中华消化内镜杂志 1997; 14: 207-210
- 50 曾志荣, 胡品津, 陈旻湖, 何瑶, 陈为. 检测幽门螺杆菌粪便抗原的临床价值. 新医学 2000; 31: 587-588
- 51 张利, 曾明新, 徐惠芳. 检测幽门螺杆菌感染几种方法的比较. 衡阳医学院学报 1994; 22: 25-27
- 52 李颢, 王亚, 贾魏, 张晓举, 王金柱. 酶免疫法检测幽门螺杆菌粪便抗原及临床意义. 中国全科医学 2002; 5: 445-446
- 53 方向明, 谢誓宏, 熊碧芳, 黄经. 三种常用检测幽门螺杆菌感染方法的临床应用评价. 武汉医学杂志 1996; 20: 190
- 54 吕宗舜, 黄乃侠, 吴琳, 黄象谦. 试条法检测幽门螺杆菌感染. 中华医学检验杂志 1999; 22: 169-170
- 55 戈红进, 戈之铮, 向祖琼, 刘颀, 任伟平, 萧树东. 四种检测幽门螺杆菌感染方法的评价. 中华消化杂志 1998; 18: 260-262
- 56 王化冰, 林三仁, 周丽雅, 许乐, 田自然. 幽门螺杆菌粪便抗原试验检测幽门螺杆菌感染的临床评价. 中华消化杂志 2005; 25: 15-18
- 57 姜建辉, 徐勇勇, 白玉祥. 幽门螺杆菌感染诊断效果的统计综合评价. 第四军医大学学报 2002; 23: 1029-1033

电编 张敏 编辑 潘伯荣

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.

胃镜辅助放置鼻胃管和空肠营养管

欧希龙, 孙为豪, 曹大中, 俞谦, 俞婷, 产松苗, 陈国胜, 颜芳, 张有珍, 吴自英, 刘顺英

欧希龙, 曹大中, 俞谦, 俞婷, 产松苗, 陈国胜, 颜芳, 张有珍, 吴自英, 刘顺英, 东南大学附属中大医院消化科 江苏省南京市 210009
孙为豪, 南京医科大学附属第一医院老年医学科 江苏省南京市 210009
通讯作者: 欧希龙, 210009, 江苏省南京市, 东南大学附属中大医院消化科. ouxilong@126.com
电话: 025-83272024
收稿日期: 2006-11-29 接受日期: 2006-12-22

Endoscopically assisted nasogastric tube and nasojejunal tube placement

Xi-Long Ou, Wei-Hao Sun, Da-Zhong Cao, Qian Yu, Ting Yu, Song-Miao Chan, Guo-Sheng Chen, Fang Yan, You-Zhen Zhang, Zi-Ying Wu, Shun-Ying Liu

Xi-Long Ou, Da-Zhong Cao, Qian Yu, Ting Yu, Song-Miao Chan, Guo-Sheng Chen, Fang Yan, You-Zhen Zhang, Zi-Ying Wu, Shun-Ying Liu, Department of Gastroenterology, Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China
Wei-Hao Sun, Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Xi-Long Ou, Department of Gastroenterology, Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China. ouxilong@126.com
Received: 2006-11-29 Accepted: 2006-12-22

Abstract

AIM: To investigate the path of enteral nutrition by endoscopic placement of nasogastric or nasojejunal tubes.

METHODS: The nasogastric tubes were placed in the gastric cavity of 8 patients by pushing endoscope after being clipped by foreign body forceps, and 3 patients by guide wire. Clipped by foreign body forceps, the nasojejunal tubes were placed in 46 patients by pushing endoscopy through the Treitz ligament.

RESULTS: Nasogastric tubes placement were performed successfully in all the 11 patients. The success rate of nasojejunal tube placement was also 100% after using modified methods. Of the 46 cases, 29 received nasointestinal tubes while 17 received triple-lumen tubes. Curvature,

snapping-back and looping occurred in 7 cases, but the tubes were re-placed successfully after backing off. When the endoscope was retired, 3 nasointestinal tubes dropped off. The placement was performed successfully with a modified method in 2 cases at the 2nd time and 1 case at the 3rd time. There were no severe complications. The level of amylase rose in only 1 case after placement.

CONCLUSION: Endoscopic placement of nasogastric tubes is simple, feasible, and suitable for the patients difficult to be placed by routine method. The modified method can achieve one-time placement of nasointestinal tube under Treitz ligament with less side effect and high success rate.

Key Words: Endoscopy; Nasogastric tube; Nasojejunal feeding tube; Placemen method

Ou XL, Sun WH, Cao DZ, Yu Q, Yu T, Chan SM, Chen GS, Yan F, Zhang YZ, Wu ZY, Liu SY. Endoscopically assisted nasogastric tube and nasojejunal tube placement. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(6):655-658

摘要

目的: 探讨胃镜下放置鼻胃管和空肠营养管建立肠内营养途径的方法。

方法: 11例鼻胃管, 其中8例患者在胃镜下用异物钳夹鼻胃管推送胃镜将其送至胃腔, 3例在胃镜下放入导丝, 通过导丝放入鼻胃管。46例空肠营养管, 在胃镜下用异物钳夹胃腔内空肠营养管, 推送胃镜将其送至Treitz韧带以下。

结果: 胃镜下11例鼻胃管全部放置成功。通过改良胃镜直接置管方法, 空肠营养管放置成功率例为100%, 其中鼻肠管29例, 三腔鼻肠管17例。鼻肠管弯曲, 折回, 打圈7例, 后退鼻肠管头端重新放置成功, 退出胃镜后鼻肠管脱出3例, 改进方法后, 2例2次, 1例3次放置成功。1例胰腺炎置管后血淀粉酶增高。

结论: 对常规放置困难的鼻胃管, 胃镜下放置

背景资料

肠内营养是21世纪初营养领域最引人注目的课题。营养学家认为, 胃肠有功能就要使用他, 有部分功能就要使用他的部分功能。鼻胃管适用于短期不能经口进食而有胃肠功能的患者, 有部分患者直接经鼻放入困难, 临床医生常放弃鼻胃管鼻饲, 鼻肠管适用于胰腺炎, 无胃动力或胃动力减弱者, 有返流, 高位瘘患者。目前放置方法有: 常规方法, 透视下, 内镜下3种方法, 其成功率有限。

■同行评价

本文进行了胃镜辅助放置鼻胃管和空肠营养管的研究,科学性及其实用性较好,具有一定的指导意义。

简单可行,改良方法后可一次使空肠营养管头端到达空肠,此方法副作用小,成功率高,操作技术简单安全。

关键词: 胃镜; 空肠营养管; 鼻胃管; 置管方法

欧希龙, 孙为豪, 曹大中, 俞谦, 俞婷, 产松苗, 陈国胜, 颜芳, 张有珍, 吴自英, 刘顺英. 胃镜辅助放置鼻胃管和空肠营养管. 世界华人消化杂志 2007;15(6):655-658

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/655.asp>

0 引言

临床上直接放置鼻胃管方法简单,成功率高,但也有极少部分不能吞咽,食管狭窄患者放置易失败,此时临床医生往往放弃放置鼻胃管,我们在胃镜下放置鼻胃管,方法简单可行;对动力障碍或食管反流等不适合放置鼻胃管者,常用空肠营养管,近年来内镜下放置空肠营养管方法逐渐增多,但成功率报道不一,为此,我们采取胃镜下直接置管方法,取得了满意效果。

1 材料和方法

1.1 材料 鼻胃管11例,男7例,女4例;年龄56-77(平均62.2)岁。球麻痹3例,食管-气管瘘支架置入术后2例,食管支架置入术后再狭窄1例,脑血管病3例,重症肺炎2例。其中4例神志不清楚,4例行气管切开。空肠营养管46例,男30例,女16例;年龄32-81(平均58.6)岁。胰腺炎15例,胰腺十二指肠术后高位瘘2例,胆囊切除术后高位瘘1例,胃手术后高位瘘2例,上腹部手术后胃功能障碍5例,食管手术后胃功能障碍3例,胃手术后输出袢梗阻3例,感染性休克5例,食管气管瘘2例,脑血管病置管后吸入性肺炎5例,脑外伤3例。其中22例神志不清楚,19例行气管切开、插管。Olympus240,160电子胃镜,复尔凯鼻胃管和带导丝的鼻胃管,空肠营养管选用华瑞鼻肠管和复尔凯鼻肠管,外径0.33 cm,长130 cm;华瑞三腔鼻肠管,外径0.33 cm,长150 cm;异物钳,导丝。

1.2 方法 危重患者吸氧、心电监护、血氧饱和度监测,神志清楚并能配合的患者口服利多卡因胶浆,神志不清楚或不能配合的患者静脉推注丙泊酚,口腔张开受限,可加大丙泊酚用量,也可选用儿童牙垫,体位常用左侧卧位,有利于操作,但本组意识不清患者,大多数患者使用辅助呼吸,保持左侧卧位较困难,可在患者右侧稍垫高,操作时助手随时吸出口腔分泌物,以防误吸。

1.2.1 鼻胃管放置 分3种方法,食管无狭窄者,鼻胃管放置前先将其润滑后从鼻孔插入,约进入15 cm,进胃镜,在咽喉部可见鼻胃管,用异物钳夹住鼻胃管头端,应后退异物钳使其靠近胃镜头端便于胃镜推送,轻柔推送胃镜带鼻肠管过食管上口至食管,推送胃镜至胃腔,此时助手固定鼻肠管,松开异物钳,后退异物钳和胃镜。食管有狭窄者,进胃镜,见狭窄近端,如能通过胃镜,则胃镜过狭窄进入胃腔,放置导丝,如不能通过胃镜,则直接放置导丝,尽可能深放,退出胃镜留置导丝,引导管经鼻将口腔外导丝部分从鼻孔拉出,在导丝引导下通过鼻腔将胃管置入胃腔。

1.2.2 鼻肠管放置 先将其润滑后从鼻孔插入,约进入25 cm,进胃镜,胃镜进入会自动将其带至胃腔,观察食管胃十二指肠有无病变及梗阻,在胃腔内用异物钳钳夹鼻肠管头端,轻柔操作推送胃镜带鼻肠管至十二指肠降部,此时助手固定鼻肠管,异物钳钳夹鼻肠管保持原位,后退胃镜至胃腔,松开异物钳,后退异物钳至胃腔,第2次及以后推送鼻肠管时,异物钳钳夹胃腔内鼻肠管管身,同前推送胃镜送鼻肠管至十二指肠降部并后退胃镜及异物钳,通常3-4次就可将其送至Treitz韧带以下约20-40 cm,此时助手固定鼻肠管,边吸气边后退胃镜,退出胃镜后,抽出鼻肠管导丝。为提高成功率需要注意以下几点:对气管切开患者进咽喉时,可能有阻力,此时可适当抽出气管插管球囊的气体,以便于胃镜进入;每次后退胃镜时,助手要固定鼻肠管,否则鼻肠管很容易脱出;钳夹胃腔内鼻肠管时,胃镜位置应与鼻肠管垂直,便于异物钳钳夹胃腔内鼻肠管,钳夹鼻肠管后,应后退异物钳使其靠近胃镜头端便于胃镜推送;操作应轻柔,尤其在第二次及以后推送鼻肠管时,此时异物钳钳夹不再是鼻肠管头端,而是胃腔内鼻肠管管身,稍遇阻力,操作者应后退胃镜,调整后再进镜,因为鼻肠管头端柔软润滑,肠黏膜光滑,推送鼻肠管,其头端会自然随之向下滑入小肠,操作轻柔不损伤肠黏膜。如果推送鼻肠管出现弯曲、折回、打圈,此时可后退鼻肠管使其重新在十二指肠降部变直,再重新调整送入。本组有3例后退胃镜鼻肠管脱出;其中1例为毕罗Ⅱ式手术3次才放置成功,考虑患者肠道直,退镜易脱出,退胃镜时在十二指肠降部或小肠钳夹鼻肠管后,抽出约20 cm鼻肠管导丝,退胃镜至胃腔内,钳夹胃腔内鼻肠管,保持异物钳钳夹固定位置,缓慢退

出胃镜.

1.2.3 术后处理 判断胃管是否置入胃腔, 注气时听诊上腹部有无水泡音, 或者在透视下, 胃管内注入造影剂. 如为三腔鼻肠管, 术后立即行持续胃肠减压, 摄片了解鼻肠管是否在Treitz韧带以下, 胰腺炎及高位瘘患者鼻肠管过Treitz韧带以下40 cm开始肠内营养, 其他患者鼻肠管过Treitz韧带以下开始肠内营养, 喂养前后用生理盐水冲洗鼻肠管以防堵塞. 置管后观察腹部情况、有无食物返流及消化道出血等, 胰腺炎患者置管后3 h及24 h测血淀粉酶.

2 结果

患者耐受性好, 11例鼻胃管均放置成功, 空肠营养管放置成功率为100%, 其中鼻肠管29例, 三腔鼻肠管17例, 其中1例摄片报告鼻肠管未过Treitz韧带, 2 d后再次摄片报告鼻肠管未过Treitz韧带, 再次胃镜见鼻肠管在幽门以下约40 cm, 球部、降部、横部未见折回, 估计已过Treitz韧带, 但乃重新放置鼻肠管成功, 误诊原因考虑为床边摄片, 效果欠佳, 内置钢丝显示不清, 同时片小, 摄片部位过高也是其原因. 鼻肠管在十二指肠降部、横部弯曲, 折回, 打圈7例, 后退鼻肠管头端重新放置成功, 退出胃镜后鼻肠管脱出3例, 改进方法后, 2例2次, 1例3次放置成功. 置管后均没有咽痛、呛咳、呕吐、食物返流等, 无腹痛、穿孔及消化道出血等, 1例胰腺炎置鼻肠管后出现无症状性血淀粉酶增高, 但病情稳定, 很快恢复正常.

3 讨论

过去长期禁食患者常采用肠外营养, 但是长期禁食引起肠黏膜萎缩、肠屏障功能受损、消化道细菌易位增加感染. 而肠内营养既能支持全身营养又能保护黏膜屏障^[1], 促进肠道功能的恢复^[2-4], 价格便宜, 肠内营养效果与肠外营养相似^[5], 只要消化道功能存在, 应提倡早期经肠道营养支持. 不适合经口进食者, 常用鼻胃管管饲, 鼻胃管适用于短期不能经口进食的患者, 有胃肠功能, 无禁忌症, 均可使用, 是临床上不能经口进食的患者最常用方法, 常直接经鼻放入, 但也有部分患者直接经鼻放入困难, 临床医生常放弃鼻胃管鼻饲, 如球麻痹引起吞咽困难, 往往直接经鼻放置很困难, 患者不能配合, 食管狭窄、食管-气管瘘支架置入术后, 直接放置阻力大, 盲目放入鼻胃管常置于支架与食管之间, 我

们对直接经鼻放入失败的患者, 我们用胃镜下协助放入, 成功率达100%.

小肠营养管放置常分为手术及非手术方法, 手术放置^[6]常常为胸腹部手术后考虑到患者胃动力减弱, 胃动力恢复较慢, 患者情况差需长时间营养支持, 医生在手术中顺便放置. 非手术方法有常规方法、透视下、内镜下等3种方法, 常规方法经鼻腔将鼻肠管放于胃内, 靠胃的蠕动使营养管头端到送至Treitz韧带以下, 但需放置鼻肠管者有些为胃动力减弱者, 即使通过改良鼻肠管, 如螺旋管, 其成功率也有限, Lai *et al*^[7]报道, 无胃动力患者螺旋管成功率57%, 直管0%. 透视下放置鼻肠管, 患者及医生需在放射线下放置, 因而报道较少. 内镜下放置的方法较多, 一种是胃镜下直视, 用活检夹住营养管的头端, 将其置于十二指肠降部, 靠胃的蠕动使营养管头端到送至Treitz韧带以下^[8], 需多次X光下定位, 不适用; 借助导丝放置, 首先经口将胃镜头端置于十二指肠降段并拉直镜身, 再经活检孔将导丝放置于Treitz韧带以下, 退出内镜留置导丝, 经导管将导丝的口腔外的部分从鼻孔拉出, 在导丝引导下通过鼻腔将空肠营养管置入空肠^[9], 用此法导丝易在胃腔内打圈, 空肠营养管置入时导丝易滑出, 有时需在透视下放置, 其成功率也有限; 内镜下直接放置鼻肠管过Treitz韧带, 因为胃镜太短, 不能到达Treitz韧带, 故常用十二指肠镜、小肠镜、甚至结肠镜, 用异物钳夹住营养管的头端, 将其头端送至Treitz韧带以下, 但退镜时营养管易同时脱出. 我们采用经胃镜直接置管法, 此方法可一次使空肠营养管头端到达空肠, 通过改良方法成功率达100%, 置管后即刻能行早期肠内营养, 该技术要求不高, 只需熟练掌握胃镜的操作技术即可.

鼻肠管应用报道最多为胰腺炎, 有研究表明, 急性重症胰腺炎主要死因是胰腺局部的继发感染, 而感染90%以上是肠源性, 同时导管相关感染率也高, 空肠营养在胰腺炎早期应用已广泛开展, 取得较好的疗效^[10-12], 鼻肠管适用于无胃动力或胃动力减弱者^[13-15], 如本组选择的上腹部、食管手术后及感染性休克胃功能障碍患者就是其适应征, 本组8例手术后胃功能障碍患者, 放置了三腔鼻肠管, 胃管行减压引流, 鼻肠管行肠内营养, 胃功能很快恢复恢复正常; 在2例食管气管瘘在放支架后, 为了防止胃液及食物返流影响瘘口愈合, 放置了鼻肠管, 起到了减压和营养作用, 瘘口很快愈合, 因而对高位瘘患

者如食管穿孔、食管一气管瘘、胆瘘、胰瘘、十二指肠瘘、吻合口瘘适应放置三腔鼻肠管,本组上腹部手术后高位瘘5例,放置了三腔鼻肠管,除1例腹腔内大出血死亡外,4例均未手术治疗,通过肠内营养及胃减压而治愈.本组3例胃毕罗Ⅱ式手术反复呕吐10余天,不能进食,胃镜见吻合口输出袢闭塞,无明显水肿,胃扩张,无蠕动,第1例患者我们考虑为黏连或上提过大,需要手术,但我们仍放置了三腔鼻肠管,胃管行减压引流,鼻肠管行肠内营养,半月后拔管完全恢复进食,后2例患者我们也取得同样效果,究其原因可能为肠壁、腹膜水肿及外压,说明此种情况尽量保守治疗.

以上外科患者多选择用三腔鼻肠管,三腔鼻肠管与普通鼻肠管的区别是其既能进行肠内营养,又能进行胃肠减压,胃肠减压效果佳,不需要再放置胃管,便于护理,减小对鼻咽喉食管刺激,患者耐受性好,适用需要胃肠减压患者.对放置胃管后伴有胃食管反流患者或有吸入性肺炎患者,此时也应选择鼻肠管,可防止胃食管反流.本组未出现严重并发症,其中1例胰腺炎置管后血淀粉酶增高,可能与鼻肠管放置时胃镜对胃十二指肠刺激及反复注气有关.可见胃镜下放置空肠营养管拓展了肠内营养应用范围,此改良方法也可一次使空肠营养管头端到达空肠,副作用小,成功率高,操作技术简单可行.

4 参考文献

- 1 吴文溪,许勤,华一兵,沈历宗.结直肠切除术后早期肠内营养的前瞻性研究.世界华人消化杂志 1999; 7: 1024-1028
- 2 秦环龙,林擎天.肠内营养支持在急性重症胰腺炎中

- 3 的应用.肠外与肠内营养 2000; 7: 140-142
- 3 卢晓明,牛彦锋,王国斌,陈道达.肠内营养对胃癌术后近期的免疫和营养状况的影响.世界华人消化杂志 2004; 12: 2225-2227
- 4 姜英俊,孔心涓,程广,田字彬.术前合理营养支持对胃癌及结直肠癌患者术后恢复的影响.世界华人消化杂志 2006; 14: 1928-1932
- 5 Boulton-Jones JR, Lewis J, Jobling JC, Teahon K. Experience of post-pyloric feeding in seriously ill patients in clinical practice. *Clin Nutr* 2004; 23: 35-41
- 6 谭文军,吴金生,赖大年.经腹贲门癌术后肠道内和肠道外营养支持115例.世界华人消化杂志 1999; 7: 325
- 7 Lai CW, Barlow R, Barnes M, Hawthorne AB. Bedside placement of nasojejunal tubes: a randomised-controlled trial of spiral- vs straight-ended tubes. *Clin Nutr* 2003; 22: 267-270
- 8 Rives DA, LeRoy JL, Hawkins ML, Bowden TA Jr. Endoscopically assisted nasojejunal feeding tube placement. *Am Surg* 1989; 55: 88-91
- 9 张克俭,王远新,王晓娣,施光美,李广仁.经胃镜快速放置空肠营养管.中华消化内镜杂志 2002; 19: 53
- 10 Olah A, Pardavi G, Belagyi T, Nagy A, Issekutz A, Mohamed GE. Early nasojejunal feeding in acute pancreatitis is associated with a lower complication rate. *Nutrition* 2002; 18: 259-262
- 11 Kaushik N, O'Keefe SJ. Severe acute pancreatitis: nutritional management in the ICU. *Nutr Clin Pract* 2004; 19: 25-30
- 12 杨建军,耿翔,高志光,秦环龙.益生菌及肠内外营养对重症急性胰腺炎大鼠肠道黏附分子及免疫屏障的影响.世界华人消化杂志 2006; 14: 953-957
- 13 Hauenschild A, Schnell-Kretschmer H, Teichmann J, Hardt PD, Santosa B, Reiter D, Brendel M, Vollerthun M, Scheu R, Klor HU. Prospective evaluation of novel system for jejunal feeding. *Surg Endosc* 2003; 17: 452-456
- 14 Sefton EJ, Boulton-Jones JR, Anderton D, Teahon K, Knights DT. Enteral feeding in patients with major burn injury: the use of nasojejunal feeding after the failure of nasogastric feeding. *Burns* 2002; 28: 386-390
- 15 Davies AR, Froomes PR, French CJ, Bellomo R, Gutteridge GA, Nyulasi I, Walker R, Sewell RB. Randomized comparison of nasojejunal and nasogastric feeding in critically ill patients. *Crit Care Med* 2002; 30: 586-590

电编 张敏 编辑 王晓瑜

一氧化氮、白介素、肿瘤坏死因子与肝硬化患者预后的关系

孙群, 张强, 朱金水, 陈玮, 陈尼维

孙群, 张强, 朱金水, 陈玮, 陈尼维, 上海交通大学附属第六人民医院消化科 上海市 200233
通讯作者: 朱金水, 200233, 上海市宜山路600号, 上海交通大学附属第六人民医院消化科. zhujs1803@hotmail.com
电话: 021-64369181-8969 传真: 0021-64837019
收稿日期: 2006-11-09 接受日期: 2006-12-01

Correlations of serum nitric oxide, interleukin-6, interleukin-10 and tumor necrosis factor levels with the prognosis of patients with liver cirrhosis

Qun Sun, Qiang Zhang, Jin-Shui Zhu, Wei Chen, Ni-Wei Chen

Qun Sun, Qiang Zhang, Jin-Shui Zhu, Wei Chen, Ni-Wei Chen, Department of Gastroenterology, the Sixth People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China

Correspondence to: Jin-Shui Zhu, Department of Gastroenterology, the Sixth People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, 600 Yishan Road, Shanghai 200233, China. zhujs1803@hotmail.com

Received: 2006-11-09 Accepted: 2006-12-01

Abstract

AIM: To study the roles of serum nitric oxide (NO), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10) and tumor necrosis factor (TNF) in the prognosis of patients with liver cirrhosis.

METHODS: Nitrate reductase assay and double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay were used to examine the serum levels of NO, IL-6, IL-10 and TNF in 56 patients with liver cirrhosis before and after treatment, and 30 healthy individuals served as controls.

RESULTS: High levels of NO, IL-6, and TNF and low level of IL-10 were observed in patients with cirrhosis. After treatment, the serum levels of NO ($129.21 \pm 27.32 \mu\text{mol/L}$ vs $92.18 \pm 25.68 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$), IL-6 ($198.5 \pm 23.2 \text{ mg/L}$ vs $147.0 \pm 19.1 \text{ mg/L}$, $P < 0.05$), and TNF ($179.2 \pm 23.5 \text{ pg/dL}$ vs $121.4 \pm 17.5 \text{ pg/dL}$, $P < 0.05$) were

significantly elevated while the level of IL-10 ($33.4 \pm 7.2 \text{ mg/L}$ vs $51.6 \pm 18.5 \text{ mg/L}$, $P < 0.05$) was markedly decreased in patients with aggravated hepatic function as compared with those before therapy. However, the levels of NO ($58.63 \pm 12.25 \mu\text{mol/L}$ vs $94.36 \pm 23.45 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$), IL-6 ($90.3 \pm 12.7 \text{ mg/L}$ vs $148.5 \pm 15.8 \text{ mg/L}$, $P < 0.05$) and TNF ($78.2 \pm 14.3 \text{ pg/dL}$ vs $124.9 \pm 20.1 \text{ pg/dL}$, $P < 0.05$) were decreased while the level of IL-10 ($89.3 \pm 18.9 \text{ mg/L}$ vs $48.8 \pm 9.5 \text{ mg/L}$, $P < 0.05$) was elevated in patients with improved hepatic function after treatment in comparison with those before treatment.

CONCLUSION: The serum levels of NO, IL-6, IL-10 and TNF are correlated with the prognosis of patients with liver cirrhosis.

Key Words: Liver cirrhosis; Nitric Oxide; Interleukin-6; Interleukin-10; Tumor necrosis factor; Prognosis

Sun Q, Zhang Q, Zhu JS, Chen W, Chen NW. Correlations of serum nitric oxide, interleukin-6, interleukin-10 and tumor necrosis factor levels with the prognosis of patients with liver cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(6):659-662

摘要

目的: 探讨血清一氧化氮(NO)、IL-6、IL-10、肿瘤坏死因子(TNF)水平与肝硬化患者预后之间的关系。

方法: 采用硝酸还原酶法、ELISA法、双抗体夹心酶联免疫分析法分别测定30例健康对照者和56例肝硬化患者治疗前后的血清NO、IL-6、IL-10及TNF水平。

结果: 肝硬化患者的NO、IL-6、TNF水平显著升高, IL-10水平明显降低。治疗后肝功能减退组的NO ($129.21 \pm 27.32 \mu\text{mol/L}$ vs $92.18 \pm 25.68 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$)、IL-6 ($198.5 \pm 23.2 \text{ mg/L}$ vs $147.0 \pm 19.1 \text{ mg/L}$, $P < 0.05$)、TNF ($179.2 \pm 23.5 \text{ pg/dL}$ vs $121.4 \pm 17.5 \text{ pg/dL}$, $P < 0.05$)水平较治疗前有显著升高, IL-10

■背景资料

肝硬化患者的治疗后疗效及预后判断是临床医生非常关注的话题, 已有大量的研究报道。而通过检测血清NO, 肿瘤坏死因子及细胞因子水平作为判断肝硬化预后、治疗效果的指标方法简便易行。

■同行评价

本研究了一氧化氮、白介素、肿瘤坏死因子对肝硬化患者预后的影响,具备一定科学性、创新性和可读性,但有待于更多例数的进一步证实。

水平则明显下降(33.4 ± 7.2 mg/L vs 51.6 ± 18.5 mg/L, $P < 0.05$), 而治疗后肝功能恢复组NO (58.63 ± 12.25 $\mu\text{mol/L}$ vs 94.36 ± 23.45 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$)、IL-6 (90.3 ± 12.7 mg/L vs 148.5 ± 15.8 mg/L, $P < 0.05$)、TNF (78.2 ± 14.3 pg/dL vs 124.9 ± 20.1 pg/dL, $P < 0.05$)水平较治疗前降低($P < 0.05$), IL-10水平则明显升高(89.3 ± 18.9 mg/L vs 48.8 ± 9.5 mg/L, $P < 0.05$)。

结论: NO, IL-6, IL-10, TNF与肝硬化患者预后有关。

关键词: 肝硬化; 一氧化氮; 白细胞介素; 肿瘤坏死因子; 预后

孙群, 张强, 朱金水, 陈玮, 陈尼维. 一氧化氮、白介素、肿瘤坏死因子与肝硬化患者预后的关系. 世界华人消化杂志 2007;15(6):659-662

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/659.asp>

0 引言

肝硬化患者可出现一系列并发症, 严重危及人群健康, 如何判断其预后并给予积极治疗是临床医生关注的问题^[1]. 一氧化氮(nitric oxide, NO)作为一种新型的细胞信使分子和氧自由基, 可能介导许多疾病的发生与发展^[2]. IL-6, IL-10, TNF是一组细胞因子, 有实验表明, 他们在肝硬化的发生、发展中起着重要的作用, 而且其血清水平与肝硬化患者的Child-Pugh分级呈正相关^[3]. 近年来, NO、细胞因子与肝硬化的关系正在受到越来越多的关注, 本研究旨在探讨血清NO, IL-6, IL-10和TNF水平与肝硬化患者预后之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 2003-09/2005-09本科住院的肝硬化患者56例, 其中男38例, 女18例, 年龄32-78(平均50.5)岁, 均经CT和内镜证实为肝硬化伴食道静脉曲张, 其中Child-Pugh B级26人, C级30人, 均采用古拉定、易善复及支链氨基酸等保肝治疗, 治疗后2 mo根据肝功能情况分成两组: 治疗后肝功能减退组32例, 治疗后肝功能好转或无变化组24例. 健康(HS)对照组共30例, 男16例, 女14例, 年龄范围25-60(平均45.3)岁. 对照组无消化系统疾病史及胃肠道症状; 无累及食管的全身体疾病, 精神状态良好。

1.2 方法 血清NO采用硝酸还原酶法, 受试者清晨空腹于肘静脉采血4 mL, 分离血清, 置-20℃冻存

待测, 血清IL-6, IL-10采用ELISA法测定, TNF采用双抗体夹心酶联免疫分析法测定^[3-4]; NO根据试剂盒(南京建成生物工程研究所提供)说明及方法检测^[4].

统计学处理 采用SPSS10.0软件中的 t 检验进行统计分析, $P < 0.05$ 为有差异, $P < 0.01$ 为差异有显著性。

2 结果

所有肝硬化患者的血清NO, IL-6, IL-10和TNF水平与正常对照组及治疗前后比较见表1. 肝硬化患者的NO, IL-6, TNF水平较正常对照组显著升高(93.8 ± 26.83 $\mu\text{mol/L}$ vs 34.60 ± 10.71 $\mu\text{mol/L}$, 147.8 ± 26.3 mg/L vs 71.8 ± 11.4 mg/L, 122.6 ± 22.3 pg/dL vs 30.8 ± 14.3 pg/dL), 差异有显著性($P < 0.01$). IL-10水平则较正常对照组低(47.3 ± 27.9 mg/L vs 118.3 ± 11.3 mg/L), 差异有显著性($P < 0.01$). 治疗后肝功能减退组的NO, IL-6, TNF水平较治疗前有显著升高(129.21 ± 27.32 $\mu\text{mol/L}$ vs 92.18 ± 25.68 $\mu\text{mol/L}$, 198.5 ± 23.2 mg/L vs 147.0 ± 19.1 mg/L, 179.2 ± 23.5 pg/dL vs 121.4 ± 17.5 pg/dL, $P < 0.05$), IL-10水平则明显下降(33.4 ± 7.2 mg/L vs 51.6 ± 18.5 mg/L), 均有差异($P < 0.05$). 而治疗后肝功能恢复组NO, IL-6, TNF水平较治疗前降低(58.63 ± 12.25 $\mu\text{mol/L}$ vs 94.36 ± 23.45 $\mu\text{mol/L}$, 90.3 ± 12.7 mg/L vs 148.5 ± 15.8 mg/L, 78.2 ± 14.3 pg/dL vs 124.9 ± 20.1 pg/dL, $P < 0.05$), IL-10水平则明显升高(89.3 ± 18.9 mg/L vs 48.8 ± 9.5 mg/L), 治疗前后有差异($P < 0.05$).

3 讨论

NO是一种具有多种生物活性的物质, 在体内的生物活性与机体疾病的生理、病理有关, 它参与细胞的信息传递、充当神经递质、介导炎症反应, NO的变化与肝损伤的关系密切^[5-6]. 白细胞介素是一组有多种细胞产生的小分子量活性多肽, 在炎症和免疫过程中起重要作用^[7], IL-6主要由单核细胞和巨噬细胞产生, 与肝脏局部炎症反应有关, 参与炎症损伤过程, IL-6具有刺激细胞生长, 促进细胞分化和加速肝细胞急性期蛋白合成的作用^[8-9]; 在肝纤维化过程中, IL-6水平的升高与肝脏对细胞因子的清除能力下降有关, 而他的产生维持不变^[10]. IL-10具有细胞因子合成抑制作用, 是负反馈系统中抑制各种前炎症细胞因子及菌落刺激因子合成的主要因子^[11]. IL-10释放

表 1 肝硬化患者的血清NO, IL-6, IL-10和TNF水平与正常对照组及治疗前后比较(mean ± SD)

分组	n	NO(μmol/L)	IL-6(mg/L)	IL-10(mg/L)	TNF(pg/dL)
对照组	30	34.60 ± 10.71	71.8 ± 11.4	118.3 ± 11.3	30.8 ± 14.3
肝硬化组	56	93.80 ± 26.83 ^b	147.8 ± 26.3 ^b	47.3 ± 27.9 ^b	122.6 ± 22.3 ^b
肝功能减退组					
治疗前	32	92.18 ± 25.68	147.0 ± 19.1	51.6 ± 18.5	121.4 ± 17.5
治疗后	32	129.21 ± 27.32 ^c	198.5 ± 23.2 ^c	33.4 ± 7.2 ^c	179.2 ± 23.5 ^c
肝功能好转或无变化组					
治疗前	24	94.36 ± 23.45	148.5 ± 15.8	48.8 ± 9.5	124.9 ± 20.1
治疗后	24	58.63 ± 12.25 ^c	90.3 ± 12.7 ^c	89.3 ± 18.9 ^c	78.2 ± 14.3 ^c

^bP<0.01 vs 对照组; ^cP<0.05 vs 治疗前。

增强能抑制早期的炎症反应, 并能对TNF有抑制作用, 有研究表明, IL-10可抑制肝纤维化形成^[12]。TNF是由巨噬细胞和激活的淋巴细胞等分泌的细胞因子, 具有广泛的生物活性。Ataseven *et al*^[13]研究了45例乙肝或丁肝病毒感染的肝硬化或肝癌的患者, 证明其血清IL-6, TNF水平显著高于健康人群。Ciecko-Michalska *et al*^[14]分析了24例酒精性肝炎或肝硬化的患者, 发现IL-6, IL-8和TNF高血清表达是预后不良的相关因素。

我们的研究表明, 肝硬化患者的NO, IL-6和TNF水平较正常对照组显著升高, IL-10水平则较正常对照组降低, 证实了血清一氧化氮及细胞因子浓度与肝脏损伤有关; 研究结果还发现, 肝硬化患者治疗后肝功能减退组的NO, IL-6和TNF水平较治疗前有显著升高, IL-10水平则明显下降, 反映了肝组织细胞不断受病毒或内毒素刺激后, 肝内单核巨噬细胞系统不断产生大量TNF, 促使细胞因子连续反应, 导致IL-6产生增加, 同时单核巨噬细胞系统也分泌NO, IL-6, TNF α 和IFN(干扰素), 后者也可促使内皮细胞产生NO, 并在局部发挥其生物学作用, 加重了肝硬化门脉血流动力学的紊乱, 从而单独或共同发挥持续性肝损害作用, 继而导致肝纤维化, 促进肝硬化形成和发展。肝硬化患者治疗后肝功能好转或无变化组的NO, IL-6, TNF水平较治疗前明显降低, 而IL-10水平则明显升高, 与许多学者研究发现的肝硬化患者血清NO、细胞因子升高与肝硬化严重程度呈正相关的报道相符, 也从侧面证实细胞因子与肝纤维化的程度相关^[15]。我们发现, 经治疗后肝功能好转或无变化组的IL-10水平亦显著升高, 说明IL-10的升高对肝硬化患者的肝功能恢复有利。

总之, 血清NO、细胞因子水平与肝炎后肝

硬化严重程度及预后密切相关^[16], 可通过检测血清NO及细胞因子水平作为判断肝硬化预后、治疗效果的指标之一。

4 参考文献

- 1 Heidelbaugh JJ, Sherbondy M. Cirrhosis and chronic liver failure: part II. Complications and treatment. *Am Fam Physician* 2006; 74: 767-776
- 2 Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142
- 3 朱金水, 余小虎, 俞华芳. 细胞因子水平与肝纤维化患者治疗和预后的相关研究. *检验医学* 2004; 19: 101-103
- 4 孙永年, 龚守军, 徐斌. 慢性乙型肝炎患者血清TNF- α 、IL-6、IL-8对肝纤维化及肝功能的影响. *武警医学* 2002; 13: 716-719
- 5 邢奔春, 王守义. 一氧化氮在肝损伤中的作用. *中华传染病杂志* 1999; 16: 61-63
- 6 Malaguarnera M, Di Fazio I, Trovato BA, Pistone G, Mazzoleni G. Alpha-interferon (IFN-alpha) treatment of chronic hepatitis C: analysis of some predictive factors for the response. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2001; 39: 239-245
- 7 Panasiuk A, Zak J, Maciorkowska E, Panasiuk B, Prokopowicz D. Expression of beta2-integrin on leukocytes in liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6193-6197
- 8 Soresi M, Giannitrapani L, D'Antona F, Florena AM, La Spada E, Terranova A, Cervello M, D'Alessandro N, Montalto G. Interleukin-6 and its soluble receptor in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2563-2568
- 9 Pena LR, Hill DB, McClain CJ. Treatment with glutathione precursor decreases cytokine activity. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1999; 23: 1-6
- 10 Kakumu S, Okumura A, Ishikawa T, Yano M, Enomoto A, Nishimura H, Yoshioka K, Yoshika Y. Serum levels of IL-10, IL-15 and soluble tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptors in type C chronic liver disease. *Clin Exp Immunol* 1997; 109: 458-463
- 11 Malaguarnera M, Di Fazio I, Laurino A, Ferlito L, Romano M, Trovato BA. Serum interleukin 6 concentrations in chronic hepatitis C patients before and after interferon-alpha treatment. *Int J Clin*

- Pharmacol Ther* 1997; 35: 385-388
- 12 王继见, 高根五, 刘长安. 肿瘤坏死因子、内皮素和一氧化氮在肝硬化大鼠门静脉高压高动力循环综合症中作用的研究. *中华肝胆外科杂志* 2002; 8: 45-48
- 13 Ataseven H, Bahcecioglu IH, Kuzu N, Yalniz M, Celebi S, Erensoy A, Ustundag B. The levels of ghrelin, leptin, TNF-alpha, and IL-6 in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma due to HBV and HDV infection. *Mediators Inflamm* 2006; 2006: 78380
- 14 Cieccko-Michalska I, Szczepanek M, Cibor D, Owczarek D, Skulina D, Szczepanski W, Michalski M. Serum cytokine concentration as prognostic factor in patients with alcoholic liver disease. *Przeegl Lek* 2006; 63: 249-252
- 15 Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol* 2006; 147 Suppl 1: S193-S201
- 16 Malaguarnera M, Restuccia S, Motta M, Ruello P, Trovato BA, Pistone G. Interferon, cortisone, and antivirals in the treatment of chronic viral hepatitis: a review of 30 years of therapy. *Pharmacotherapy* 1997; 17: 998-1005

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 •

欢迎行阅 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》2006年由北京报刊发行局发行,国际标准刊号 ISSN 1009-3079,国内统一刊号CN 14-1260/R,邮发代号82-262,出版日期每月8, 18, 28日,月价72.00,年价864元。欢迎广大消化科医务工作者及科教人员、各大图书馆订阅。联系地址: 100023,北京市2345信箱,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。