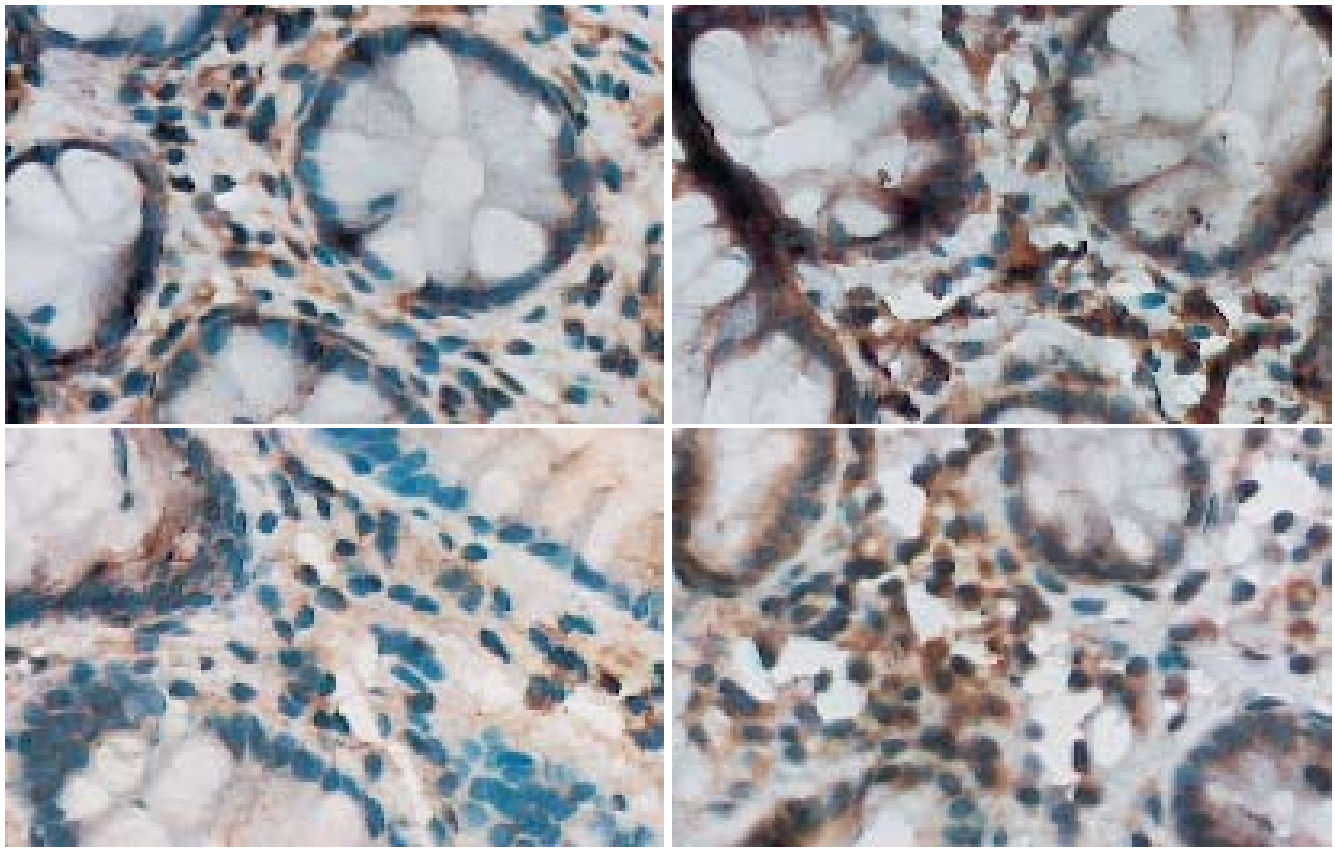
ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2007 年 3 月 18 日　第 15 卷　第 8 期　(Volume 15 Number 8)



8 | 2007

世界华人消化杂志
www.wjgnet.com
二零零七年三月十八日　第十五卷　第八期
世界胃肠病学杂志社

名誉总编辑
潘伯荣
总编辑
马连生

《世界华人消化杂志》对所有来稿均进行同行评议，是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》，荷兰《医学文摘库/医学文摘》，俄罗斯《文摘杂志》收录.

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2006-01-01/2008-12-31
wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问
陈可冀教授
黄象谦教授
黄志强教授
裘法祖教授
王宝恩教授
危北海研究员
吴孟超教授
杨春波教授
周殿元教授

名誉总编辑
潘伯荣教授

社长/总编辑
马连生教授

副总编辑
陈士葆教授
房殿春教授
纪小龙教授
姜洪池教授
王苑本教授
吴云林教授
徐克成教授
杨思凤教授
姚希贤教授
岳茂兴教授
张万岱教授
周学文教授

常务编委
成军教授
程英升副教授
范学工教授
高毅主任医师
江学良主任医师
李岩教授
刘连新教授
吕宾教授
罗和生教授
聂青和副教授
王小众教授

编委
白爱平主治医师
白文元教授
白玉贤教授
别平教授
蔡淦教授
蔡开琳副教授
蔡三军主任医生
曹洁副教授
曹志成院士
陈国凤主任医师
陈公琰主任医师
陈海龙教授
陈红松副研究员
陈积圣教授
陈建杰教授
陈建荣副教授
陈立波副教授
陈凛教授
陈其奎教授
陈强谱教授
陈仕珠主任医师
陈卫昌教授
陈耀凯副教授
陈贻胜教授
陈知水教授
陈治水主任医师
陈祖林副教授
程爱国教授
程爱群主任医师
程红岩教授
程树群副教授
迟宝荣教授
崔云甫教授
代文杰教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
党双锁副教授
邓长生教授
董蕾教授
董明主任医师
杜群副研究员
樊红副教授
范建高教授
范小玲主任医师
范志宁主任医师
房静远教授
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
傅红副教授
傅志仁主任医师
高成新教授
高春芳研究员
高峰教授
高润平教授
戈之铮教授
龚国忠教授
龚建平教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师
关玉盘教授
管冬元副教授
郭克建教授
郭晓钟教授
郭新宁教授
韩天权教授
韩新巍教授
郝春秋副教授
郝俊鸣副主任医师
何超教授
何裕隆教授
何振平教授
洪天配教授
侯晓华教授
胡伏莲教授
胡和平主任医师
黄恒青主任医师
黄金华副教授
黄晓东副主任医师
黄颖秋教授
黄裕新教授
黄志勇副教授
季国忠副教授
季加孚教授
姜慧卿教授
蒋龙元副教授
金瑞教授
匡安仁教授
兰平教授
蓝宇教授
劳绍贤教授
李定国教授
李东辉教授
李方儒教授
李国威教授
李华山副主任医师
李继强教授
李靖副教授
李军祥教授
李奇林教授
李胜研究员
李淑德 教授
李涛主治医师
李晓宇主任医师
李旭副教授
李延青教授
李永哲副研究员
李玉民教授
李瑗教授
李增山副教授
李兆申教授
李志霞教授
李宗芳教授
梁力建教授
林胜璋副教授
林勇讲师
刘宝瑞教授
刘彬彬副研究员
刘冰熔教授
刘成海研究员
刘海林主任医师
刘平教授
刘杞教授
刘铁夫教授
刘颖斌副教授
刘占举教授
刘正稳教授
刘作金副教授
龙致贤教授
鲁华玉研究员
陆才德教授
陆伦根教授
陆云飞教授
禄韶英主治医师
吕明德教授
吕宁主任医师
吕云福教授
吕志武 教授
马大烈教授
茅爱武主任医师

世界华人消化杂志®
编辑委员会

梅林教授
孟庆华教授
宁琴教授
牛建昭教授
欧希龙副教授
潘林娜教授
潘兴华副主任医师
潘秀珍教授
彭波副教授
彭吉润主任医师
彭曦副研究员
彭心宇教授
彭志海教授
朴熙绪主任医师
钱建民教授
钱林学主任医师
秦波教授
秦成勇教授
秦华东教授
秦环龙教授
秦仁义教授
邱宝安主任医师
邱双健副教授
邱伟华副主任医师
曲智威副主任医师
任超世研究员
任建安教授
任建林教授
邵成浩讲师
邵先玉教授
邵永孚教授
沈洪教授
沈琳副教授
沈薇教授
施诚仁教授
施瑞华教授
石统东副教授
宋世兵主任医师
宋于刚 教授
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙殿兴主任医师
孙家邦教授
孙秀发教授
孙学英教授
孙延平副主任医师
郃升副教授
谭学瑞教授
汤展宏副教授
唐采白副教授
唐芙爱教授
唐霓副研究员
唐文富主治医师
唐文皓副主任医师
唐旭东主任医师
唐志鹏副研究员
田素礼教授
屠红副研究员
万军教授
汪波副主任医师
汪思应教授
王承党副教授
王春友教授
王广义教授
王吉耀教授
王健生副教授
王鲁副教授
王晓艳副教授
王效民教授
王新月教授
王学美研究员
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
卫洪波教授
魏经国教授
魏来教授
闻勤生教授
吴德全教授
吴建国教授
吴健雄教授
吴君主任医师
吴萍主任医师
吴志勇教授
席启主任医师
夏建川研究员
向德兵讲师
肖恩华教授
谢晓华副教授
徐爱民副教授
徐存拴教授
徐大华主任医师
徐德忠教授
徐列明教授
徐小元教授
徐迎新研究员
徐智教授
许春舫主任医师
许玲副教授
许文燮教授
许亚平副教授
宣世英教授
闫惠平研究员
严律南教授
严以群主任医师
阎晓初副教授
杨冬华教授
杨广顺教授
杨建勇教授
杨林副研究员
杨维良教授
杨希山教授
杨云生教授
杨昭徐教授
姚登福教授
姚树坤教授
·
阴赪宏研究员
殷正丰教授
于恩达教授
于红刚副教授
于健春教授
于颖彦教授
余宏宇教授
郁宝铭教授
喻荣彬副教授
展玉涛副主任医师
张柏和教授
张方信主任医师
张吉翔教授
张锦生教授
张军教授
张明辉副主任医师
张青云研究员
张群华教授
张水军教授
张小晋主任医师
张晓岚教授
张绪清副教授
张学教授
张占卿主任医师
张宗明教授
赵桂珍教授
赵景民教授
赵连三教授
赵平副教授
赵增仁副主任医师
郑民华教授
郑鹏远教授
智发朝教授
周伯平教授
周丁华主任医师
周国雄主任医师
周士胜教授
周伟平教授
周霞秋教授
周晓东研究员
周晓武副主任医师
朱传武副主任医师
朱春兰主任医师
朱立元教授
朱人敏教授
庄林主任医师
邹小明教授
左国营副主任药师

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目　次 ●　2007 年 3 月 18 日　第 15 卷　第 8 期　(总第196期)

述　评

791 慢性乙型肝炎的Th细胞亚群及相关细胞因子网络失衡　游晶, 庄林, 马永良, 唐宝璋

基础研究

800 双齿围沙蚕蛋白酶的纯化及其性质
汪靖超, 赵峰, 李荣贵, 王斌

807 乳酸杆菌对幽门螺旋杆菌脂多糖作用下的SGC-7901细胞p38MAPK磷酸化水平和凋亡率的影响
周超, 马洪升

813 脂质体介导核因子-κB诱捕物寡聚脱氧核苷酸对重症急性胰腺炎大鼠胰腺炎症因子mRNA表达和胰腺损伤的影响
钟荣德, 周杰, 廖柳清, 符方勇, 李湘竑, 林艺雄

820 白花丹参根制剂对胃癌细胞增殖和凋亡的影响
焦鹏, 常起, 杨明峰, 张凤, 赵晓民, 夏作理

824 血管生成素-1基因对人胃癌细胞增殖与凋亡的影响
颜芳, 欧希龙, 关云艳, 产松苗, 陈国胜, 杨柳, 孙为豪

831 活血化瘀注射液I号预处理与缺血预处理改善肝缺血再灌注损伤
毕旭东, 郭伟, 赵晶, 赵连根, 付晓光

838 志贺菌基因转移耐多药相关蛋白初步分析
宋春花, 黄志刚, 郗园林, 张梅喜, 段广才

临床研究

844 感染后肠易激综合征与溃疡性结肠炎缓解期患者肠黏膜细胞因子表达的相关性
鞠辉, 刘希双, 王光兰, 尹晓燕, 刘华, 戴素美

文献综述

849 肝素酶: 一种新的广谱的肿瘤转移相关抗原在中晚期肿瘤免疫治疗中的作用研究进展
杨仕明, 汤旭东, 陈婷, 熊震, 陈陵, 蔡永国, 房殿春

855 基因盒-整合子系统与志贺菌耐药
郑晓燕, 温艳, 阴赪宏, 王婧

860 胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤的临床研究进展
王宁, 傅强, 王雅杰

869 TGF-β1与慢性乙型肝炎的关系
游晶, 袁丽芳, 陈红英, 唐宝璋, 王辉

873 肝星状细胞激活与信号转导
申月明, 朱萱

879 肠道致病菌群体感应研究进展
田辉

研究快报

885 小檗碱对胰岛素抵抗大鼠肝脏葡萄糖激酶及其调节蛋白的影响
欧阳礼枝, 陆付耳, 刘文军, 高志强, 徐丽君

890 结扎速血管闭合系统闭合实验狗血管的可靠性
王永来, 陈双, 苏华, 刘彩刚

临床经验

893 恶性浆膜腔积液脱落细胞中P21 ras蛋白表达状况及其意义
宋荣峰, 张焜和, 靳文剑, 陈 江, 祝金泉, 吕农华

897 法莫替丁及西咪替丁对Oddi括约肌压力变化的影响
张小薄, 吴硕东, 孔静, 王伟

901 联合应用埃索美拉唑、铝碳酸镁和莫沙比利治疗难治性胃食管反流病
王战波, 陈玲玲, 游旭东

905 胸腔胃-气道瘘的临床表现与螺旋CT诊断
韩新巍, 吴刚, 赵明, 马骥, 管生, 水少锋, 马南, 王艳丽
909 二十岁以下慢性HBV感染者HBV DNA与HBeAg的定量关系
吴殿磊, 徐光华, 冯继红, 樊霞, 苗乃周, 刘晓斌, 陈天艳, 张树林

病例报告

913 以下消化道出血为首发症状的急性巨核细胞白血病1例
杜桂芹, 丁秀明, 邵晶莹, 黄立娟, 徐洪伟, 齐桂云

附　　录

915 致谢世界华人消化杂志编委

致　　谢

920 世界华人消化杂志投稿须知

消　　息

799 中华医学会第七次全国消化系疾病学术会议征文通知
806 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
812 第十九届全国中西医结合消化会议征文通知
819 中国学术期刊综合引证报告(2006)
823 世界华人消化杂志被认定为印刷工业市级优质产品
830 欢迎订阅2007年《世界华人消化杂志》
843 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
868 世界华人消化杂志关于作者署名的声明
889 全国肝病防治学术研讨会征文通知
896 世界华人消化杂志的同行评议
900 关于2006年度山西省期刊质量评估结果的通报
904 世界华人消化杂志在线办公系统
908 2007年国际会议
914 第三届全国肝移植学术研讨会通知

封面故事

鞠辉, 刘希双, 王光兰, 尹晓燕, 刘华, 戴素美. 感染后肠易激综合征与溃疡性结肠炎缓解期患者肠黏膜细胞因子表达的相关性. 世界华人消化杂志 2007;15(8):844-848
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/844.asp

国际会议

9th World Congress on Gastrointestinal Cancer
20-23 June 2007
Barcelona
Imedex
meetings@imedex.com

世界華人消化雜志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平　题写封面刊名
陈可冀　题写版权刊名
(旬刊)
创　刊 1993-01-15
改　刊 1998-01-25
出　版 2007-03-18
原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣　社长总编辑 马连生
编辑部主任 张海宁　英文编辑 张海宁
中文编辑 潘伯荣 张焕兰 王晓瑜
电子编辑 张 敏 李 琪
本期责任编辑 王晓瑜

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
出版 世界胃肠病学杂志社
100023，北京市2345信箱
E-mail: wcjd@wjgnet.com
http://www.wjgnet.com
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893
印刷 北京科信印刷厂
发行 国内: 北京报刊发行局
国外: 中国国际图书贸易总公司
(100044，北京市399信箱)
订购 全国各地邮电局
邮购 世界胃肠病学杂志社发行部
(100023，北京市2345信箱)
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893

《世界华人消化杂志》对所有来稿均进行同行评议，是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》，荷兰《医学文摘库/医学文摘》，俄罗斯《文摘杂志》收录.

特别声明
本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点，除非特别声明.本刊如有印装质量问题，请向本刊编辑部调换.

2007年版权归世界胃肠病学杂志社所有

ISSN 1009-3079	邮发代号	国外代号	国内定价	广告经营许可证
CN 14-1260/R	82-262	M 4481	每期24.00元 全年864.00元	1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

March 2007 Contents in Brief Volume 15 Number 8

EDITORIAL

791 Research advances in the imbalance of helper T lymphocyte subpopulations and cytokine network in patients with chronic hepatitis B
You J, Zhuang L, Ma YL, Tang BZ

BASIC RESEARCH

800 Purification and properties of the protease from *Perinereis aibuhitensis* Grube
Wang JC, Zhao F, Li RG, Wang B

807 Effects of *lactobacillus* on phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase and apoptosis in SGC-7901 cells treated with lipopolysaccharide of *Helicobacter pylori*
Zhou C, Ma HS

813 Effect of liposome-mediated nuclear factor κB decoy oligodeoxynucleotide on the mRNA expression of inflammatory factors and injury of pancreas in rats with severe acute pancreatitis
Zhong RD, Zhou J, Liao LQ, Fu FY, Li XH, Lin YX

820 Effects of *Salvia miltiorrhiza Bge.f.alba* root preparation on the proliferation and apoptosis of gastric cancer cells
Jiao P, Chang Q, Yang MF, Zhang F, Zhao XM, Xia ZL

824 Effect of angiopoietin-1 gene on the proliferation and apoptosis of human gastric cancer cells
Yan F, Ou XL, Guan YY, Chan SM, Chen GS, Yang L, Sun WH

831 Effects of Huoxue Huayu injection I pretreatment and ischemic preconditioning on liver ischemia and reperfusion injury in rats
Bi XD, Guo W, Zhao J, Zhao LG, Fu XG

838 Primary analysis on conjugational transfer multidrug resistance-related proteins of *Shigella flexneri* strain
Song CH, Huang ZG, Xi YL, Zhang MX, Duan GC

CLINICAL RESEARCH

844 Correlation between post-infective irritable bowel syndrome and cytokine expression in intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis in remission
Ju H, Liu XS, Wang GL, Yin XY, Liu H, Dai SM

REVIEW

849 Heparanase: a new universal metastasis-associated antigen in the immunotherapy for the advanced cancers
Yang SM, Tang XD, Chen T, Xiong Z, Chen L, Cai YG, Fang DC

855 Integrons and gene cassettes in antibiotic-resistant *Shigella*
Zheng XY, Wen Y, Yin CH, Wang J

860 Advances on the treatment of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma
Wang N, Fu Q, Wang YJ

869 Relationship between transforming growth factor β1 and chronic hepatitis B
You J, Yuan LF, Chen HY, Tang BZ, Wang H

873 Signal transduction and activation of hepatic stellate cells
Shen YM, Zhu X

879 Quorum sensing in intestinal pathogens
Tian H

RAPID COMMUNICATION

885 Effect of berberine on hepatic glucokinase and its regulatory protein in insulin-resistant rats
Ou-Yang LZ, Lu FE, Liu WJ, Gao ZQ, Xu LJ

890 Reliability of hemostasis with ligasure vessel sealing system in experimental dogs
Wang YL, Chen S, Su H, Liu CG

CLINICAL PRACTICE

893 Expression of P21 ras protein in malignant serous cavity effusions and its significance
Song RF, Zhang KH, Jin WJ, Chen J, Zhu JQ, Lv NH

897 Effects of famotidine and cimetidine on human sphincter of Oddi pressure
Zhang XB, Wu SD, Kong J, Wang W

901 Efficacy of esomeprazole combined with hydrotalcite and mosapride in treatment of refractory gastroesophageal reflux disease
Wang ZB, Chen LL, You XD

905 Clinical manifestations and computed tomography diagnosis for thoracostomach-airway fistula
Han XW, Wu G, Zhao M, Ma J, Guan S, Shui SF, Ma N, Wang YL

909 Correlation between hepatitis B virus DNA levels and HBeAg quantity in patients under 20 years old with chronic hepatitis B virus infection
Wu DL, Xu GH, Feng JH, Fan X, Miao NZ, Liu XB, Chen TY, Zhang SL

CASE REPORT

913 Acute megakaryoblastic leukemia with the first symptoms of lower gastrointestinal hemorrhage: one case analysis
Du GQ, Ding XM, Shao JY, Huang LJ, Xu HW, Qi GY

APPENDIX

915 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology

ACKNOWLEDGMENT

920 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology

COVER

Ju H, Liu XS, Wang GL, Yin XY, Liu H, Dai SM. Correlation between post-infective irritable bowel syndrome and cytokine expression in intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis in remission.
Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(8):844-848
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/844.asp

INTERNATIONAL MEETINGS

9th World Congress on Gastrointestinal Cancer
20-23 June 2007
Barcelona
Imedex
meetings@imedex.com

Indexed/Abstracted by Chemical Abstracts, EMBASE/ Excerpta Medica and Abstract Journals

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi
World Chinese Journal of Digestology
Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date March 18, 2007
Honorary-Editor-in-Chief
Bo-Rong Pan
President and Editor-in-Chief
Lian-Sheng Ma

Edited by Editorial Board of
World Chinese Journal of Digestology
PO Box 2345, Beijing 100023, China
Published by The WJG Press
PO Box 2345, Beijing 100023, China
Overseas Distributor
China International Book Trading Corporation
PO Box 399, Beijing 100044, China

Code No.M4481
Mail-Order Circulation Section, The WJG Press
PO Box 2345, Beijing 100023, China
Telephone: +86-10-85381901
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com
http://www.wjgnet.com
ISSN 1009-3079 **CN** 14-1260/**R**
Copyright © 2007 by The WJG Press

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月18日; 15(8): 791-799
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

述评 EDITORIAL

慢性乙型肝炎的Th细胞亚群及相关细胞因子网络失衡

游 晶, 庄 林, 马永良, 唐宝璋

游晶, 唐宝璋, 昆明医学院第一附属医院感染病科 云南省昆明市 650032
庄林, 马永良, 昆明市第三人民医院肝病科 云南省昆明市 650041
游晶, 博士, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事病毒性肝炎及感染性疾病的基础与临床研究.
通讯作者: 游晶, 650032, 云南省昆明市, 昆明医学院第一附属医院感染病科. jingyoukm@126.com
电话: 0871-5324888
收稿日期: 2006-11-23 接受日期: 2006-12-27

Research advances in the imbalance of helper T lymphocyte subpopulations and cytokine network in patients with chronic hepatitis B

Jing You, Lin Zhuang, Yong-Liang Ma, Bao-Zhang Tang

Jing You, Bao-Zhang Tang, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China
Lin Zhuang, Yong-Liang Ma, Department of Hepatopathy, the Third Municipal People's Hospital of Kunming, Kunming 650041, Yunnan Province, China
Correspondence to: Dr. Jing You, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China. jingyoukm@126.com
Received: 2006-11-23 Accepted: 2006-12-27

Abstract

Helper T (Th) lymphocytes, important immune regulating cells of organism, could be divided into four functional subsets, Th0, Th1, Th2, Th3, on the basis of the immunoregulatory cytokines that these clones produced. Most of the current work in this field is exploratory and focuses on Th1 and Th2 subsets. Th1 cells secrete interferon-γ (IFN-γ), interkeukin-2 (IL-2) and tumor necrosis factor-β and are principally involved in cell-mediated immunity. They play an important role in the protection against intracellular pathogens, including a variety of viruses. Th2 cells secret interleukin-4 (IL-4), IL-5, IL-6 and IL-10 and regulate the humoral immune response. Th0 cells are naive Th cells, secreting Th1/Th2 phenotype cytokines at low levels. However, Th3 cells, which secrete active transforming growth factor-β, exert a negative immunoregulatory action on the immune response. The cross-regulatory properties of Th1 and Th2 subset cells and relevant cytokines network are very important to maintain normal immunity of organisms. HBV can destroy the balance of Th lymphocytes and cytokines network. The imbalance of pro-inflammatory Th1 and anti-inflammatory Th2 cytokine production play an important role in the immunopathogenesis of hepatitis B virus infection and alter chronic liver disease development, progression and outcome.

Key Words: Chronic hepatitis B; Hepatitis B virus; Helper T lymphocytes; Cytokines network; Immune

You J, Zhuang L, Ma YL, Tang BZ. Research advances in the imbalance of helper T lymphocyte subpopulations and cytokine network in patients with chronic hepatitis B. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(8):791-799

摘要

辅助性T细胞(helper T cell, Th细胞)是根据功能分类的一个T细胞亚群, 根据所分泌细胞因子的不同, Th细胞可分为Th0、Th1、Th2和Th3 4种亚群, 其中研究最多的是Th1和Th2两个亚群. Th1/Th2细胞及其细胞因子网络的调节对维持机体正常的免疫功能至关重要. 乙型肝炎病毒(HBV)感染机体后, 多种因素影响Th细胞增殖并且调节其亚型比例, 细胞因子网络受到破坏, 在细胞因子介导下便可造成肝脏等组织和器官的损害, 直接或间接地影响到乙型肝炎发病及其转归.

关键词: 慢性乙型肝炎; 乙型肝炎病毒; 辅助性T细胞; 细胞因子网络; 免疫

游晶, 庄林, 马永良, 唐宝璋. 慢性乙型肝炎的Th细胞亚群及相关细胞因子网络失衡. 世界华人消化杂志 2007;15(8):791-799
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/791.asp

■背景资料
国内外学者普遍认为, Th1免疫应答与胞内感染的免疫性和防御性有关, 同时导致组织损伤, 而Th2应答则与感染慢性化, 甚至疾病进展有关. Th细胞亚群及相关细胞因子网络失衡与乙型肝炎的发病有密切的相关性, 研究他们之间的关系对乙型肝炎发病机制的探讨、病情评估、治疗药物的选择、预后的判断具有重要意义.

0 引言

近年来, 随着蛋白质多肽纯化技术的日臻完善, mAb技术日趋完美, 分子生物学技术的迅速发展及其与免疫学的结合, 推动了细胞免疫功能和细胞因子研究的进程. 细胞免疫功能和细胞

■研发前沿
目前, HBV感染相关肝病患者肝组织内Th细胞亚群及相关细胞因子变化的研究以及细胞因子的应用性治疗研究已成为研究的热点, 关于病毒性肝炎细胞因子的应用性治疗的研究尚处于初期探索阶段, 值得进一步深入研究和探讨.

因子的核心是T细胞及其亚群, 同时自然杀伤细胞(NK)及NKT细胞也同样发挥重要作用. 辅助性T细胞是根据功能分类的一个T细胞亚群, 根据所分泌细胞因子的不同, Th细胞可分为Th0, Thl, Th2和Th3 4种亚群, 其中研究最多的是Thl和Th2两个亚群.

细胞因子既是免疫系统的信息传递介质, 又是神经、内分泌及其他系统和免疫系统相互联系的重要桥梁. 细胞因子的生物活性及受体表达均具有网络特点, 即一种细胞因子可与多种靶细胞作用及/或一种靶细胞可受多种细胞因子的调节, 不同细胞因子之间可彼此诱生、增减受体表达、相互协同或拮抗进行调节和影响生物学效应. 由于细胞因子来源复杂, 种类繁多和作用广泛, 他们所组成的细胞因子网络(network of cytokine)就极为复杂. 通过细胞因子网络, 体细胞相互交流信息, Th细胞能协助B细胞产生抗体, 也能促进其他T细胞的分化成熟, 是机体内一类重要的免疫调节细胞, 在机体的防御机制中起着重要作用. 乙型肝炎病毒(HBV)感染机体后, 在细胞免疫导致的肝损伤中T细胞及其所释放的细胞因子起着重要的作用, 多种因素影响Th细胞增殖并且调节其亚型比例, 细胞因子网络受到破坏, 在细胞因子介导下便可造成肝脏等组织和器官的损害, 直接或间接的影响到乙型肝炎发病及其转归. 我们就近年来慢性乙型肝炎发生、发展进程中的Th细胞亚群及相关细胞因子网络失衡方面的研究作一综述.

1 Th细胞亚群的概念、分类及功能

1.1 Th细胞亚群 细胞免疫功能和细胞因子的核心是T细胞及其亚群. T细胞是由一群功能不同的异质性淋巴细胞组成, 在胸腺内分化成熟, 获得其功能及学习识别自我, 胸腺完成阳性选择(让识别抗原/MHC的克隆增殖, 成熟并移行至周围)和阴性选择(排除能将自身抗原作为异物起反应的克隆)的双重功能. T细胞抗原识别受体(TCR)是T细胞识别蛋白抗原的特异性受体, 不同的T细胞克隆其抗原识别受体的分子结构也是不相同的. CD4和CD8分子可同时表达于胸腺内早期胸腺细胞, 称为双阳性胸腺细胞(CD4+、CD8+, DP). 而在成熟T细胞这二种分子是互相排斥的, 只能表达一种分子, 故可将成熟T细胞分为二类, 即TCRαβTCD4+细胞(CD4+细胞)和TCRαβTCD8+(CD8+细胞)细胞亚群. 在外周淋巴组织中CD4+T细胞约占65%, CD8+T细胞约占35%. 前者又称为辅助性/诱导性T细胞(TH/I), 后者又称为抑制性/细胞毒性T细胞(Ts/c), 因而Th细胞是根据功能分类的一个T细胞亚群.

1.2 细胞因子网络 细胞因子是由淋巴细胞和单核巨噬细胞等产生的多肽类因子, 具有广泛的生物学活性, 包括促进靶细胞的增殖和分化, 增强抗感染和细胞杀伤效应, 促进炎症过程等. 由于细胞因子来源复杂, 种类繁多和作用广泛, 他们所组成的细胞因子网络就极为复杂. 这个细胞因子网络包括所有白细胞介素(interleukines, ILs)、干扰素(interferon, IFN)、集落刺激因子(colony stimulating factor, CSF)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、生长因子(growth factor, GF)和趋化因子(chemokine)等. 当病毒侵袭肝脏时, 会激活机体的免疫系统, 刺激巨噬细胞释放一系列细胞因子, 各种细胞因子在机体内构成统一的网络, 相互协调又相互拮抗, 保护机体, 抵抗侵袭, 保持机体正常的免疫应答. 如果某种细胞因子产生或其受体表达异常, 无论是亢进还是缺乏, 细胞因子网络平衡被打破, 都会导致病理性改变或加重炎症、坏死或促进炎症慢性化.

1.3 Th细胞亚群的分类和免疫学功能 Th细胞在细胞免疫应答过程中起着重要的辅助作用, Th细胞的功能分化是近几年来基础免疫学的一大研究热点. 大部分学者认为, Th1或Th2本身是一个功能性的概念[1-10]. 根据所分泌细胞因子的不同, CD4+Th细胞可分为Th0, Th1, Th2和Th3 4种亚群. 4种亚群的功能是不同的, Th0细胞是天然T细胞, 是未成熟的Th前体细胞(Th cell precursor, Thp), 主要分泌IL-2, IL-4, IL-5和IFN-γ, 接受刺激后可转变成Th1或Th2[11-14]. Th1细胞主要分泌IFN-γ, IL-2, TNF-β和IL-12, 他们有利于B细胞产生有调理作用的抗体(IgG, IgA)和与补体相结合的抗体(IgM, IgG); 促进巨噬细胞的活化; 引起T淋巴细胞介导的细胞毒(CTL)作用和细胞免疫. 以Th1为主的免疫应答主要引起依赖于吞噬细胞的炎症, 因而, Th1细胞在机体抗胞内病原体感染中发挥重要作用. Th2细胞主要分泌IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10和IL-13, 主要功能为促进体液免疫反应, 他们引起较强的抗体反应(包括IgE), 促进嗜酸性粒细胞的分化与活化, 产生一种不依赖于吞噬细胞的炎症, 中和细胞外病原体并与细胞内病原所致的进展性疾病相关联[15-18]. IL-10在小

鼠被归于一种Th2细胞因子, 但在人类, Th1和Th2亚群都能分泌IL-10. 在实际研究中一般只以高表达IFN-γ和IL-4分别代表Th1细胞和Th2细胞. Th3细胞除分泌大量IL-10外, 主要高表达转化生长因子β(TGF-β), 但是不或低表达IL-2, IL-4和IFN-γ, 可以下调抗原递呈细胞(antigen presenting cells, APC), 并能抑制Th1/Th2细胞的活化增生, 起免疫抑制作用, 在诱导免疫耐受中起重要作用[19-25]. Th1, Th2, Th3细胞分泌的细胞因子可以相互下调对方的生长分化, 刺激自身增殖. Th1细胞分泌的IFN-γ可抑制Th2细胞增殖, Th2细胞产生的IL-4, IL-10以及Th3细胞分泌的TGF-β则均可抑制Th1细胞生长分化.

1.4 CD8+T细胞的类Th细胞样功能 CD8+T细胞常规认为仅具有杀伤功能, 被称为细胞毒性T细胞(CTL). 近年来大量CD8+T细胞被克隆, 并通过体内外实验证实CD8+T细胞可大量分泌细胞因子, 可行使许多类似于传统Th细胞的功能, 并将这些细胞按分泌细胞因子谱系的不同分为Tc0, Tc1, Tc2几个亚群. 绝大多数的CD8+T细胞分泌IL-2, IL-12与IFN-γ而不产生IL-4, 为Tc1亚群, 少部分只产生IL-4, 而不产生IL-2, IL-12与IFN-γ, 为Tc2亚群; 或者是既分泌IL-2 与IFN-γ, 又产生IL-4的为Tc0亚群. CD8+T细胞的Tc细胞亚群与CD4+T细胞的Th细胞亚群非常相似: Tc1与Th1均分泌IL-2, IFN-γ, IL-12等Ⅰ型细胞因子, 而Tc2与Th2均分泌IL-4, IL-5, IL-6, IL-9和IL-10等Ⅱ型细胞因子[26-32]. IL-12和IFN-γ促进Tc1细胞分化, IL-4则诱导Tc2的产生, 在初始阶段, CD8+T细胞较CD4+T细胞需要更高剂量的IL-4才能诱使其分化为Tc2群细胞. CD8+T细胞在分化为Tc1或Tc2形式后, 互相均不可发生逆转. 研究表明, 分泌Ⅰ和Ⅱ型细胞因子的CD4+和CD8+细胞存在于各种患者发病的不同阶段, 而Ⅰ、Ⅱ型细胞因子反应的相对平衡似乎影响着许多感染性疾病的临床过程, 分泌Ⅰ型细胞因子的细胞亚群(Th1、Tc1细胞)与抗感染过程相关, 而分泌Ⅱ型细胞因子的细胞亚群(Th2、Tc2细胞)则与疾病的进一步发展相关[26-32]. 此外, 自然杀伤(NK)细胞可产生IFN-γ、IL-2和肿瘤坏死因子(TNF), 属于Th1样细胞, 肥大细胞、B细胞、嗜碱性粒细胞、CD3+CD4+ NK1.1+细胞可合成IL-4, IL-5, IL-10等Ⅱ型细胞因子, 可见一些细胞的类型已经超出Th1或Th2的分型. 有人建议合称为Ⅰ型或Ⅱ型细胞, 目前似以Th1样细胞及Th2样细胞称谓更佳. Chen *et al*[33]发现, CD4+和CD8+T细胞均能分泌TGF-β, 作为胃肠黏膜产生IgA的辅助或启动因素, 参与肠黏膜免疫, 并抑制Th1/Th2细胞的功能, 建议称此类细胞为Th3亚型, 并得到Mosmann *et al*[34]的支持.

1.5 Thl/Th2平衡 Th1/Th2细胞的调节对维持机体正常的免疫功能至关重要. 体内体外试验均证实Th1细胞与Th2细胞能相互拮抗, Th1细胞通过分泌IFN-γ抑制Th2极化, Th2细胞也能通过分泌IL-4 限制Th1型反应. 另一方面, IL-12与IFN-γ能分别促使天然的CD4+ T细胞和CD8+ T细胞转化为Th1和Tc1细胞, 而IL-4则能促使T细胞分化为Th2和Tc2细胞, 并使CTL杀伤效力下降和IFN-γ减少, 因此, Ⅰ型和Ⅱ型的T细胞反应常常是交叉调节的. Th1细胞可分泌IFN-γ而不分泌IL-4, Th2细胞可分泌IL-4 而不分泌IFN-γ, Th3细胞可分泌TGF-β, 但不分泌IL-2和IFN-γ, 通常以这3种细胞因子作为鉴别Thl, Th2和Th3的标志. 除了细胞因子产物, 一些细胞表面标记也可用来辨别Thl和Th2, 如Th1细胞表达两条IL-2受体链(β1和β2), 而Th2细胞仅表达IL-2受体β1链, 相反, Th2细胞表达两条IFN-γ受体肽链(α和β), 而Th1细胞仅表达IFN-γ受体α链. 当机体受到异己抗原攻击时, Th1和Th2细胞中某一亚群功能升高, 另一亚群功能降低, 该现象即为Th1/Th2漂移. Th1/Th2的失衡与自身免疫病、过敏性疾病、肿瘤、移植排斥反应以及感染性疾病的发生、发展有着密切的关系.

■应用要点
Th细胞亚群及相关细胞因子网络失衡参与了HBV感染后多种疾病状况的发生、发展, 深入了解HBV感染中Th1/Th2平衡状况与发病的关系, 寻找调节和平衡Th1/Th2应答的措施, 诱导适宜有效的免疫应答, 就有可能达到治疗慢性乙型肝炎的目的.

2 Th细胞亚群、细胞因子与HBV清除和感染的慢性化

HBV感染机体时, 细胞免疫在肝细胞损害及病毒清除中起重要作用, 而Th应答类型与机体的免疫状态密切相关, Th1/Th2的不平衡可造成疾病的不同病理状态, Th1/Th2比例是否平衡是机体能否有效清除病毒和病毒感染细胞的主要因素之一. 在HBV特异性抗原的刺激下, CD4+T细胞在不同细胞因子作用下分化为Th1和Th2两种类型, 并因此而影响细胞因子网络之间的平衡[35-36]. 如果Th1细胞亚群占优势, 将促进细胞免疫反应, 增强CD8+T细胞的活性, 从而清除细胞内病毒, 但同时增加了肝脏的炎症反应从而加重肝细胞的损伤. 如果Th2细胞占优势, 将促进体液免疫反应, 并抑制细胞免疫反应, CTL细胞活性减弱, 肝细胞损伤减轻. 抗病毒反应的减弱是病毒持续存

■名词解释
辅助性T细胞(Th细胞): 是根据功能分类的一个T细胞亚群, 根据所分泌细胞因子的不同, Th细胞可分为Th0, Thl, Th2和Th3 4种亚群, Th0细胞是天然T细胞, 是未成熟的Th前体细胞, 接受刺激后可转变成Th1或Th2, Th1细胞在机体抗胞内病原体感染中发挥重要作用, Th2细胞主要功能为促进体液免疫反应, 中和细胞外病原体并与细胞内病原所致的进展性疾病相关联, Th3细胞能抑制Th1/Th2细胞的活化增生, 起免疫抑制作用, 在诱导免疫耐受中起重要作用, Th1, Th2和Th3细胞分泌的细胞因子可以相互下调对方的生长分化, 刺激自身增殖.

在的主要原因. 适宜的Th1/Th2应答最终能清除病毒. 由HBcAg诱导的免疫应答侧重于Th1细胞, 而HBeAg是非颗粒性分泌抗原, 分泌性HBeAg诱导的免疫应答侧重于Th2细胞. Milich *et al*[37]体外试验观察到, HBeAg和HBcAg刺激PBMC后产生的细胞因子种类不同, HBeAg引起IL-4(和少量的γ干扰素) 升高, HBcAg则引起IL-2、γ干扰素(和少量的IL-4)增加. 急性自限性乙肝患者表现为强烈的、多克隆和非特异性的CTL和Th1细胞反应, 相反在慢性乙肝病毒感染者, 免疫反应很弱, 不能检测到特异性的T细胞反应, 而以Th2细胞反应占据优势. 慢性乙肝病毒感染免疫耐受患者外周血中有大量HBeAg, 而HBeAg作为耐受原, 优先清除外周血对HBcAg特异的Th1细胞, 从而阻碍了Th1细胞对细胞免疫应答的辅助作用, 而使免疫应答转为Th2类[38], Th2细胞占优势时倾向于发生持续性的HBV感染. Bozkaya *et al*[39]研究表明, 循环中的HBeAg下调机体抗病毒清除机制正是由于引起了抗炎性的Th2型细胞因子产量的增加所致. 邢汉前 *et al*[40]对HBV慢性感染免疫耐受期患者的研究表明, 免疫耐受期患者肝内浸润的CD3+, CD4+, CD8+T淋巴细胞数量明显多于正常肝组织, 但明显少于免疫活动期患者, 肝脏汇管区CD4/CD8比值也明显少于免疫活动期患者, 肝细胞内HBcAg阳性表达明显高于免疫活动期患者, 而外周血及肝细胞内HBV高复制, 外周血HBeAg高表达, 肝组织无炎症或轻微炎症损伤, 提示免疫耐受期患者肝内浸润的T淋巴细胞数量虽增多, 但不足以产生有效的免疫应答以清除HBV病毒, 与免疫耐受期患者肝组织内CD4+T淋巴细胞增多以Th2类为主, 肝组织内Th1/Th2细胞比例失调有关. Hodgson *et al*[41]研究发现, 急性病毒性肝炎恢复后的患者, 其血清及肝组织中IFN-γ水平会升高, 并且肝脏中的IFN-γ水平升高会持续多年, 提示IFN-γ可能在肝脏中的潜伏性肝DNA病毒的长期控制治疗上起着重要作用. 在黑猩猩中也发现HBV DNA水平的下降伴随着IFN-γ的增加[42]. 近年来研究发现, 急性HBV感染的病毒清除主要是通过非细胞病变的抗病毒机制, 即细胞非裂解机制病毒清除过程来完成[43]. Guidotti *et al*[44]研究发现, HBV急性感染的黑猩猩, 在肝脏T淋巴细胞浸润的高峰之前, 就出现了肝脏和血清的HBV DNA的清除. 效应细胞分泌表达的IFN γ和TNFα细胞因子是介导非细胞裂解病毒清除机制的重要因素. Penna *et al*[45]检测了13例急性自限性乙型肝炎急性期和恢复期患者外周血Th细胞分泌的细胞因子, 急性期产生Th1样细胞因子明显比对照组高, 恢复期患者Th细胞表现为Th0功能, 同时分泌Th1和Th2细胞因子, 但水平下降. Bertoletil *et al*[46]通过对慢性乙型肝炎肝组织内Th细胞分泌的细胞因子的研究证实, CD4+T细胞不但产生IFN-γ, IL-2等Th1样细胞因子, 而且还产生IL-4, IL-5和IL-10等Th2样细胞因子. Th2样细胞因子可抑制Th1细胞功能, 使Th1样细胞因子(IL-2、IFN-γ)分泌减少, 机体免疫反应的效应降低, 清除病毒能力减弱, 导致病毒持续性感染. 有研究显示[47], Th2样细胞与Th1样细胞相比更容易被诱导免疫耐受, 而HBeAg可以充当耐受原耗竭Th1样细胞, 使得Th2样细胞占优势, 此时和HBeAg共存的HBeAg特异性的Th2细胞是低活性的[48], 不能清除HBeAg, 这样可产生慢性感染的状态并且持续下去. Angus *et al*[49]曾报道, 在HBeAg转基因小鼠中, IFN-α能够使HBeAg特异的Th1/Th 2细胞的动态平衡倾向于Th1亚群. Rossol *et al*[50]动态检测了应用IFN-α治疗的33例慢性乙型肝炎患者的细胞因子含量, 发现与对照组比较, 慢性乙肝患者血清中IL-12水平较高. 在清除了HBV和发生HBe转换的患者中, IL-12和Th1样细胞因子的活性明显增强, 而在持续感染者中无变化. 说明干扰素能通过调节Th1/Th2细胞的平衡而发挥其治疗作用. Xing *et al*[51]、Lohr *et al*[52]对慢性乙型肝炎患者IFN-α治疗的随访研究, 结果表明对IFN-α治疗产生完全应答并最终清除HBV的患者体内Th1样细胞因子浓度显著升高, 同时Th2样细胞因子浓度明显下降, Th细胞由'Th2优势型向'Th1优势型转换. Cavanaugh *et al*[53]、Kimura *et al*[54]、Milich *et al*[37]给HBV转基因小鼠注射IL-12, IL-18后, 发现其不仅抑制HBV在转基因小鼠肝脏中的复制. 也抑制HBV在肾脏的复制, 发现IL-12、IL-18能使HBeAg特异的Th2细胞亚群向Th1细胞亚群转变, IL-12、IL-18的抗病毒作用是与其诱导Th1样细胞因子如IL-2、IFN-γ的产生能力密切相关. Sugahara *et al*[55]用1.2 mg/d的胸腺肽-α1治疗7例慢性乙型肝炎患者, 持续24 wk, 结果显示, 其中2例HBV DNA转阴, ALT下降, IFN-γ诱导产生的Th1样外周白细胞反应上升, 肝脏中NK细胞和CD8+T细胞显著增殖. 结果表明, 胸腺肽治疗慢性乙型肝炎患者可以通过Th1样反应诱导NK细胞和CD8+T细胞显著增殖, 起到清除HBV、控制感染的作用.

调控Th1/Th2平衡的因素很多, 但IL-12, IFN-γ, IL-4发挥的作用更加突出. 利用T细胞受体(TCR)转基因T细胞研究Th1/Th2的相互转换, 发现Th1能转化为Th2, 但Th2不能直接逆转化为Th1, 进一步的分析发现, Th1和Th2都能表达IL-12受体β1链, 但仅Th1能表达β2链, 缺乏β2链的Th2自然不能逆转为Th1, 但当Th2分泌IL-4、IL-10的能力被中和后, 可以产生IFN-γ, 后者再促进IL-12受体β2的表达, 导致Th2对IL-12的应答[56]. 机体抗病毒感染应以Th1介导的细胞免疫为主, 一旦发生Th2漂移, 状况较差. 临床上曾用IFN-γ或IL-2治疗病毒感染性疾病, 并获得成功, 推测与此类细胞因子能间接逆转Th2至Th1有一定关系, 是否当机体处在Th1状态时, 不必考虑使用IFN-γ或IL-2进行治疗, 值得探讨.

总之, 无论是机体通过自身免疫反应清除HBV, 最终成为急性自限性乙型肝炎, 还是通过外源性的免疫调节剂(如IFN-α、IL-12、胸腺肽-α1等)激发免疫反应清除慢性肝炎患者体内的HBV, Th1样细胞占主导地位是两者的共同特点, 说明Th1样细胞和HBV的清除密切相关.

3 Th细胞亚群、细胞因子与肝细胞损伤

HBV对感染肝细胞的直接细胞毒作用是有限的, 肝细胞损伤与宿主的免疫反应有关. 病毒在宿主细胞内复制, 产生病毒蛋白, 细胞内的主要组织相容性复合体(MHC-I)类分子选择性的与之结合, 并输送到细胞表面形成复合物, 此复合物被TCR所识别, 激活CD8+T细胞, 产生穿孔索和颗粒酶, 将靶细胞破坏, 这是HBV引起肝细胞损伤的主要原因, 也是机体清除细胞内病毒的主要机制. 许多研究发现, 乙肝患者体内存在的Th1/Th2细胞因子失衡, 且此失衡可能与T细胞本身的功能缺陷有关, 但是也有学者不赞同并提出此失衡与APC功能缺陷有关[57-58]. HBsAg和HBcAg/HBeAg具有刺激不同细胞亚群, 分泌不同细胞因子的作用, HBsAg激发IL-2, IL-10和IFN-γ的分泌, 而HBcAg/HBeAg促进IL-10, TNF-α、IFN-γ的产生. HBV感染, Th1、Th2总量和Th1/Th2的比率都是低下的[59]. 病毒感染PBMC时都对Th1, Th2细胞产生直接或间接的破坏作用, 其中Th1破坏多, 数量少, 功能低下, 使HBV不能得到清除, 导致持续感染、肝细胞损伤. 乙型肝炎患者在急性期或慢性活动期时, ALT, AST, TB等上升显著, 表明此时肝脏受损, 当损伤达到一定的程度就成为重症肝炎. Fukuda *et al*[60]研究发现, 在乙型肝炎的活动期, Th1样细胞因子IL-2和IFN-γ mRNA表达上升, 并且与ALT的上升水平呈正相关. Lohr *et al*[52]研究表明, 重症乙型肝炎患者的Th1细胞增殖反应比非重症的急性乙型肝炎患者强, 类似的结果也在慢性重症肝炎患者中获得证实. Franco *et al*[61]把HBsAg特异性Th1类细胞输入HBsAg转基因小鼠体内, 结果产生了一过性的肝脏炎症性坏死, 并且显示对IFN-γ敏感性较高的品系肝损害较为显著. 上述结果均表明, Th1样细胞和肝损伤有密切联系, Th1细胞分泌的细胞因子通过直接或间接作用增强NK细胞、巨噬细胞, 特别是CD8+T细胞活性, 促进细胞免疫反应, 加重肝细胞的炎症损伤.

4 Th细胞亚群、细胞因子与肝纤维化

肝纤维化和/或肝硬化是由于胶原或其他细胞外基质(ECM)的合成、降解失衡导致在肝内过量沉积[62-63]. 近年来大量研究表明, TGF-β1与肝纤维化的关系主要涉及其促进细胞外基质的产生并抑制其降解、抑制肝细胞的再生, 其基因多态性与肝纤维化也存在一定的关系[64-72]. 慢性乙肝由于肝组织的炎性反应, 被激活的肝脏间质细胞大量表达TGF-β, 其既有促进肝脏纤维组织沉积的作用也有免疫抑制作用, 免疫抑制作用表现在抑制T细胞增殖、抑制CTL成熟, 抑制IL-2、IFN-γ等细胞因子的产生、抑制多型核细胞和血管内皮的炎性反应等. Dong *et al*[73]发现, HBV转基因感染引起的小鼠肝纤维化中, 肝组织中细胞因子IL-10明显高于正常, 而IL-2与IFN-γ则下降. Louis *et al*[74]给Balb/c小鼠每周1次注射刀豆蛋白A, 发现在注射第2次时, 血清IL-2和IFN-γ水平升高, 但从第3次注射后迅速降低, 而IL-10水平在注射20 wk后比第1周上升7倍, 同时出现明显肝纤维化, 而裸鼠则在注射6 wk后仍未出现任何纤维化改变, 强烈提示Th1/Th2在肝纤维化的发病机制中有重要作用. IL-10能下调特定的免疫应答, 他可抑制T细胞炎性趋化, 从而减轻炎性因子对肝细胞的损害, 调节肝细胞增生以及抑制肝纤维化; 但同时IL-10作为一种免疫下向调节因子,

■同行评价
本文综述了慢性乙型肝炎的Th细胞亚群及相关细胞因子网络失衡, 文章内容较丰富, 科学性较高, 带有普及性的特点, 具有一定的实际应用价值.

可以抑制Th1活性, 抑制IFN-γ与IL-2分泌. 研究表明, IFN-γ是一种很强的抗纤维化因子, 可显著抑制细胞外ECM合成, 同时促进胶原降解[75-78]. 因此, 肝纤维化的发生可能是体内Th1/Th2相关因子合成谱失调及多种细胞因子通过旁分泌或自分泌影响靶细胞异常代谢的结果, 众多免疫因子通过调节肝细胞及星状细胞促进或抑制肝纤维化的形成和发展.

5 Th细胞亚群、细胞因子与肝细胞癌

慢性HBV感染患者Th1/Th2细胞及细胞因子网络的失衡与肝癌的发生与发展有着十分密切的关系[79-80]. 曹志新 *et al*[81]研究发现, 人肝癌组织中Th1类细胞因子表达弱, Th2类细胞因子表达强, 呈现Th2细胞因子表达模式, 肝癌组织局部微环境处于免疫抑制状态, 肿瘤细胞易发生免疫逃逸. 陈群 *et al*[82]、孙晓玲 *et al*[83]研究发现, 原发性肝癌患者血清和血单个核细胞培养液中TNF含量均明显升高, TNF导致机体细胞因子网络调节紊乱, 过量的TNF不仅可以抑制IgG和IgM的产生, 而且影响某些克隆细胞的分化, 使T细胞不能对肿瘤细胞发挥正常的免疫反应之效[84]. 研究表明, 肝细胞肝癌时, 机体细胞免疫功能下降, 表现为淋巴细胞减少和T细胞亚群及NK细胞的数量与功能的异常, 血清IL-2水平, CD4+/CD8+比值明显低于正常人群, 而SIL-2R, IL-6, TNFα, IL-10水平则较正常人明显为高[85-88]. HBV相关性肝硬化患者发生肝癌的机会很大, 有人认为是由于Th2型细胞因子抑制Th1型细胞活化, 使其不能产生有效的抗肿瘤免疫. TGF-β1是控制肝脏细胞生长和增殖的重要细胞因子, 但发现在肝细胞癌患者肝组织中, TGF-β1的表达不是减弱而是增强. 许佳平 *et al*[89]测定了119例急、慢性肝炎、肝硬化、肝癌患者TGF-β1的含量, 结果显示肝癌患者TGF-β1水平明显高于其他各组, 5例肝癌患者经治疗后1个月内TGF-β1水平较治疗前有明显降低.

总之, Th细胞亚群和细胞因子网络失衡参与了HBV感染后多种疾病状况的发生、发展. 多种因素影响Th细胞增殖并且调节其亚型比例, 细胞因子网络受到破坏, 在细胞因子介导下便可造成肝脏等组织和器官的损害, 直接或间接的影响到乙型肝炎的发病及其转归.

6 参考文献

1 Grogan JL, Mohrs M, Harmon B, Lacy DA, Sedat JW, Locksley RM. Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity* 2001; 14: 205-215

2 Glimcher LH, Murphy KM. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev* 2000; 14: 1693-1711

3 Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000; 85: 9-18; quiz 18, 21

4 Lohr J, Knoechel B, Abbas AK. Regulatory T cells in the periphery. *Immunol Rev* 2006; 212: 149-162

5 London CA, Abbas AK, Kelso A. Helper T cell subsets: heterogeneity, functions and development. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 63: 37-44

6 Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 2005; 175: 5-14

7 Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-173

8 Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med* 2002; 8: 567-573

9 吴厚生, 秦慧莲. 特异免疫应答细胞: T淋巴细胞与特异性细胞免疫. 陈慰峰. 医学免疫学. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 89-97

10 Dong C, Flavell RA. Th1 and Th2 cells. *Curr Opin Hematol* 2001; 8: 47-51

11 Jiang R, Feng X, Guo Y, Lu Q, Hou J, Luo K, Fu N. T helper cells in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Chin Med J (Engl)* 2002; 115: 422-424

12 Colantonio L, Recalde H, Sinigaglia F, D'Ambrosio D. Modulation of chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness during differentiation of human naive T cells into Th1 or Th2 cells. *Eur J Immunol* 2002; 32: 1264-1273

13 Ebner S, Hofer S, Nguyen VA, Furhapter C, Herold M, Fritsch P, Heufler C, Romani N. A novel role for IL-3: human monocytes cultured in the presence of IL-3 and IL-4 differentiate into dendritic cells that produce less IL-12 and shift Th cell responses toward a Th2 cytokine pattern. *J Immunol* 2002; 168: 6199-6207

14 Albanesi C, Scarponi C, Cavani A, Federici M, Nasorri F, Girolomoni G. Interleukin-17 is produced by both Th1 and Th2 lymphocytes, and modulates interferon-gamma- and interleukin-4-induced activation of human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 81-87

15 Garcia G, Weiner HL. Manipulation of Th responses by oral tolerance. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 238: 123-145

16 Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 2001; 182: 207-214

17 Marth T, Ring S, Schulte D, Klensch N, Strober W, Kelsall BL, Stallmach A, Zeitz M. Antigen-induced mucosal T cell activation is followed by Th1 T cell suppression in continuously fed ovalbumin TCR-transgenic mice. *Eur J Immunol* 2000; 30: 3478-3486

18 Liu L, Rich BE, Inobe J, Chen W, Weiner HL. Induction of Th2 cell differentiation in the primary immune response: dendritic cells isolated from adherent cell culture treated with IL-10 prime naive CD4+ T cells to secrete IL-4. *Int Immunol* 1998; 10:

1017-1026
19 Inobe J, Slavin AJ, Komagata Y, Chen Y, Liu L, Weiner HL. IL-4 is a differentiation factor for transforming growth factor-beta secreting Th3 cells and oral administration of IL-4 enhances oral tolerance in experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 1998; 28: 2780-2790
20 Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000; 100: 655-669
21 Szabo SJ, Sullivan BM, Stemmann C, Satoskar AR, Sleckman BP, Glimcher LH. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science* 2002; 295: 338-342
22 Neurath MF, Weigmann B, Finotto S, Glickman J, Nieuwenhuis E, Iijima H, Mizoguchi A, Mizoguchi E, Mudter J, Galle PR, Bhan A, Autschbach F, Sullivan BM, Szabo SJ, Glimcher LH, Blumberg RS. The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J Exp Med* 2002; 195: 1129-1143
23 Fantini MC, Becker C, Tubbe I, Nikolaev A, Lehr HA, Galle P, Neurath MF. Transforming growth factor beta induced FoxP3+ regulatory T cells suppress Th1 mediated experimental colitis. *Gut* 2006; 55: 671-680
24 Levings MK, Bacchetta R, Schulz U, Roncarolo MG. The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 129: 263-276
25 Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997; 389: 737-742
26 Maggi E, Manetti R, Annunziato F, Cosmi L, Giudizi MG, Biagiotti R, Galli G, Zuccati G, Romagnani S. Functional characterization and modulation of cytokine production by CD8+ T cells from human immunodeficiency virus-infected individuals. *Blood* 1997; 89: 3672-3681
27 Vukmanovic-Stejic M, Vyas B, Gorak-Stolinska P, Noble A, Kemeny DM. Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. *Blood* 2000; 95: 231-240
28 Halverson DC, Schwartz GN, Carter C, Gress RE, Fowler DH. *In vitro* generation of allospecific human CD8+ T cells of Tc1 and Tc2 phenotype. *Blood* 1997; 90: 2089-2096
29 Chipeta J, Komada Y, Zhang XL, Deguchi T, Sugiyama K, Azuma E, Sakurai M. CD4+ and CD8+ cell cytokine profiles in neonates, older children, and adults: increasing T helper type 1 and T cytotoxic type 1 cell populations with age. *Cell Immunol* 1998; 183: 149-156
30 Berner B, Akca D, Jung T, Muller GA, Reuss-Borst MA. Analysis of Th1 and Th2 cytokines expressing CD4+ and CD8+ T cells in rheumatoid arthritis by flow cytometry. *J Rheumatol* 2000; 27: 1128-1135
31 Ochi H, Wu XM, Osoegawa M, Horiuchi I, Minohara M, Murai H, Ohyagi Y, Furuya H, Kira J. Tc1/Tc2 and Th1/Th2 balance in Asian and Western types of multiple sclerosis, HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and hyperIgEaemic myelitis. *J Neuroimmunol* 2001; 119: 297-305
32 Thomas MJ, Noble A, Sawicka E, Askenase PW, Kemeny DM. CD8 T cells inhibit IgE via dendritic cell IL-12 induction that promotes Th1 T cell counter-regulation. *J Immunol* 2002; 168: 216-223
33 Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994; 265: 1237-1240
34 Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17: 138-146
35 Bertoletti A, Gehring AJ. The immune response during hepatitis B virus infection. *J Gen Virol* 2006; 87: 1439-1449
36 Mizukoshi E, Sidney J, Livingston B, Ghany M, Hoofnagle JH, Sette A, Rehermann B. Cellular immune responses to the hepatitis B virus polymerase. *J Immunol* 2004; 173: 5863-5871
37 Milich DR, Schodel F, Hughes JL, Jones JE, Peterson DL. The hepatitis B virus core and e antigens elicit different Th cell subsets: antigen structure can affect Th cell phenotype. *J Virol* 1997; 71: 2192-2201
38 Rosenberg W. Mechanisms of immune escape in viral hepatitis. *Gut* 1999; 44: 759-764
39 Bozkaya H, Bozdayi M, Turkyilmaz R, Sarioglu M, Cetinkaya H, Cinar K, Kose K, Yurdaydin C, Uzunalimoglu O. Circulating IL-2, IL-10 and TNF-alpha in chronic hepatitis B: their relations to HBeAg status and the activity of liver disease. *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 1675-1679
40 邢汉前, 辛绍杰, 赵景民, 陈黎明, 李保森, 游绍莉, 赵军, 周光德, 潘登. HBV慢性感染患者免疫耐受期肝组织内T、B淋巴细胞的变化. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1529-1534
41 Hodgson PD, Michalak TI. Augmented hepatic interferon gamma expression and T-cell influx characterize acute hepatitis progressing to recovery and residual lifelong virus persistence in experimental adult woodchuck hepatitis virus infection. *Hepatology* 2001; 34: 1049-1059
42 Pancholi P, Lee DH, Liu Q, Tackney C, Taylor P, Perkus M, Andrus L, Brotman B, Prince AM. DNA prime/canarypox boost-based immunotherapy of chronic hepatitis B virus infection in a chimpanzee. *Hepatology* 2001; 33: 448-454
43 成军, 李莉. 清除乙型肝炎病毒的非细胞裂解机制. 世界华人消化杂志 2002; 10: 73-76
44 Guidotti LG, Rochford R, Chung J, Shapiro M, Purcell R, Chisari FV. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science* 1999; 284: 825-829
45 Penna A, Del Prete G, Cavalli A, Bertoletti A, D'Elios MM, Sorrentino R, D'Amato M, Boni C, Pilli M, Fiaccadori F, Ferrari C. Predominant T-helper 1 cytokine profile of hepatitis B virus nucleocapsid-specific T cells in acute self-limited hepatitis B. *Hepatology* 1997; 25: 1022-1027
46 Bertoletti A, D'Elios MM, Boni C, De Carli M, Zignego AL, Durazzo M, Missale G, Penna A, Fiaccadori F, Del Prete G, Ferrari C. Different cytokine profiles of intraphepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Gastroenterology* 1997; 112: 193-199
47 Milich DR. Influence of T-helper cell subsets and crossregulation in hepatitis B virus infection. *J Viral*

Hepat 1997; 4 Suppl 2: 48-59
48 Chen M, Sallberg M, Thung SN, Hughes J, Jones J, Milich DR. Nondeletional T-cell receptor transgenic mice: model for the CD4(+) T-cell repertoire in chronic hepatitis B virus infection. *J Virol* 2000; 74: 7587-7599
49 Angus PW, Locarnini SA, McCaughan GW, Jones RM, McMillan JS, Bowden DS. Hepatitis B virus precore mutant infection is associated with severe recurrent disease after liver transplantation. *Hepatology* 1995; 21: 14-18
50 Rossol S, Marinos G, Carucci P, Singer MV, Williams R, Naoumov NV. Interleukin-12 induction of Th1 cytokines is important for viral clearance in chronic hepatitis B. *J Clin Invest* 1997; 99: 3025-3033
51 Xing T, Zhang L, Lu Q, Hou J, Feng X, Luo K. Th1/Th2 type cytokines in hepatitis B patients treated with interferon-alpha. *Chin Med J (Engl)* 2001; 114: 921-924
52 Lohr HF, Krug S, Herr W, Weyer S, Schlaak J, Wolfel T, Gerken G, Meyer zum Buschenfelde KH. Quantitative and functional analysis of core-specific T-helper cell and CTL activities in acute and chronic hepatitis B. *Liver* 1998; 18: 405-413
53 Cavanaugh VJ, Guidotti LG, Chisari FV. Interleukin-12 inhibits hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol* 1997; 71: 3236-3243
54 Kimura K, Kakimi K, Wieland S, Guidotti LG, Chisari FV. Interleukin-18 inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. *J Virol* 2002; 76: 10702-10707
55 Sugahara S, Ichida T, Yamagiwa S, Ishikawa T, Uehara K, Yoshida Y, Yang XH, Nomoto M, Watanabe H, Abo T, Asakura H. Thymosin-alpha1 increases intrahepatic NKT cells and CTLs in patients with chronic hepatitis B. *Hepatol Res* 2002; 24: 346-354
56 Lamont AG, Adorini L. IL-12: a key cytokine in immune regulation. *Immunol Today* 1996; 17: 214-217
57 Tsai SL, Sheen IS, Chien RN, Chu CM, Huang HC, Chuang YL, Lee TH, Liao SK, Lin CL, Kuo GC, Liaw YF. Activation of Th1 immunity is a common immune mechanism for the successful treatment of hepatitis B and C: tetramer assay and therapeutic implications. *J Biomed Sci* 2003; 10: 120-135
58 Beckebaum S, Cicinnati VR, Zhang X, Ferencik S, Frilling A, Grosse-Wilde H, Broelsch CE, Gerken G. Hepatitis B virus-induced defect of monocyte-derived dendritic cells leads to impaired T helper type 1 response *in vitro*: mechanisms for viral immune escape. *Immunology* 2003; 109: 487-495
59 Freeman AJ, Marinos G, Ffrench RA, Lloyd AR. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Immunol Cell Biol* 2001; 79: 515-536
60 Fukuda R, Ishimura N, Nguyen TX, Chowdhury A, Ishihara S, Kohge N, Akagi S, Watanabe M, Fukumoto S. The expression of IL-2, IL-4 and interferon-gamma (IFN-gamma) mRNA using liver biopsies at different phases of acute exacerbation of chronic hepatitis B. *Clin Exp Immunol* 1995; 100: 446-451
61 Franco A, Guidotti LG, Hobbs MV, Pasquetto V, Chisari FV. Pathogenetic effector function of CD4-positive T helper 1 cells in hepatitis B virus transgenic mice. *J Immunol* 1997; 159: 2001-2008
62 Friedman SL. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993; 328: 1828-1835
63 Pinzani M, Rombouts K. Liver fibrosis: from the bench to clinical targets. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 231-242
64 Pierce GF, Tarpley JE, Yanagihara D, Mustoe TA, Fox GM, Thomason A. Platelet-derived growth factor (BB homodimer), transforming growth factor-beta 1, and basic fibroblast growth factor in dermal wound healing. Neovessel and matrix formation and cessation of repair. *Am J Pathol* 1992; 140: 1375-1388
65 Si XH, Yang LJ. Extraction and purification of TGFbeta and its effect on the induction of apoptosis of hepatocytes. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 527-531
66 Valdes F, Murillo MM, Valverde AM, Herrera B, Sanchez A, Benito M, Fernandez M, Fabregat I. Transforming growth factor-beta activates both pro-apoptotic and survival signals in fetal rat hepatocytes. *Exp Cell Res* 2004; 292: 209-218
67 Schonherr E, Hausser HJ. Extracellular matrix and cytokines: a functional unit. *Dev Immunol* 2000; 7: 89-101
68 Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 76-99
69 Akpolat N, Yahsi S, Godekmerdan A, Demirbag K, Yalniz M. Relationship between serum cytokine levels and histopathological changes of liver in patients with hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3260-3263
70 Gao CF. Transforming growth factor beta 1 and liver cirrhosis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2005; 85: 1074-1077
71 Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d793-807
72 Bauer M, Schuppan D. TGFbeta1 in liver fibrosis: time to change paradigms? *FEBS Lett* 2001; 502: 1-3
73 Dong Y, Xi H, Yu Y, Wang Q, Jiang K, Li L. Effects of oxymatrine on the serum levels of T helper cell 1 and 2 cytokines and the expression of the S gene in hepatitis B virus S gene transgenic mice: a study on the anti-hepatitis B virus mechanism of oxymatrine. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 1299-1306
74 Louis H, Le Moine A, Quertinmont E, Peny MO, Geerts A, Goldman M, Le Moine O, Deviere J. Repeated concanavalin A challenge in mice induces an interleukin 10-producing phenotype and liver fibrosis. *Hepatology* 2000; 31: 381-390
75 Weng HL, Cai WM, Liu RH. Animal experiment and clinical study of effect of gamma-interferon on hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 42-48
76 Weng HL, Cai WM, Wang BE, Jia JD, Zhou XQ, Shi DM, Zhang DF, Zhao YR, Hao LJ, Wang SY, Wu WF, Xian JZ. Clinical study of anti-hepatic fibrosis effect of IFN-gamma in patients with chronic hepatitis B. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2003; 83: 943-947
77 Du X, Weng H, Cai W. Histological changes in

20 hepatic fibrosis patients with chronic hepatitis B after recombinant human interferon-gamma treatment. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2001; 9: 273-275
78 Weng HL, Wang BE, Jia JD, Wu WF, Xian JZ, Mertens PR, Cai WM, Dooley S. Effect of interferon-gamma on hepatic fibrosis in chronic hepatitis B virus infection: a randomized controlled study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 819-828
79 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 115
80 邢同京, 章廉, 骆抗先, 侯金林, 张明霞, 冯筱榕. TH1/TH2类细胞因子对慢性乙型肝炎患者淋巴细胞凋亡的影响. 解放军医学杂志 2000; 25: 16-19
81 曹志新, 陈孝平, 吴在德. 肝癌组织辅助性T细胞-2细胞因子强势分泌研究. 中华实验外科杂志 2003; 20: 935-936
82 陈群, 王胜春, 汤斌. 慢性肝病、肝癌患者IL-6、IL-8和TNFα活性测定及意义. 临床肝胆病杂志 1998; 14: 177-179
83 孙晓玲. 原发性肝癌患者手术前后血清NO/NOS、TNF检测的临床意义. 放射免疫学杂志 2005; 18: 271-272
84 张风蕴. 炎性细胞因子. 国外医学免疫学分册 1992; 15: 261
85 孔丽, 姚树坤, 刘金星, 王娜. 原发性肝癌患者细胞免疫功能变化及其与转归的关系. 中华肝脏病学杂志 2005; 13: 194-195
86 曹驰, 李彩霞. 原发性肝癌的免疫状态与预后的相关性分析. 肿瘤防治杂志 2004; 11: 127-130
87 Shin HD, Park BL, Kim LH, Jung JH, Kim JY, Yoon JH, Kim YJ, Lee HS. Interleukin 10 haplotype associated with increased risk of hepatocellular carcinoma. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 901-906
88 Tseng LH, Lin MT, Shau WY, Lin WC, Chang FY, Chien KL, Hansen JA, Chen DS, Chen PJ. Correlation of interleukin-10 gene haplotype with hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Tissue Antigens* 2006; 67: 127-133
89 许佳平, 白宪光. 肝炎、肝硬化、肝癌患者外周血TGF-β1的监测. 中华试验和临床病毒学杂志 2002; 16: 235

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 •

中华医学会第七次全国消化系疾病学术会议征文通知

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

1 征文内容

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

2 征文要求

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月18日; 15(8): 800-806
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

双齿围沙蚕蛋白酶的纯化及其性质

汪靖超, 赵 峰, 李荣贵, 王 斌

■背景资料
沙蚕广泛分布在我国沿海, 但目前国内外对沙蚕药用价值的开发和利用却并不多见. 同属环节动物的蚯蚓中提取的蚓激酶已经作为溶栓药品推向了市场, 本研究从双齿围沙蚕中分离纯化出了一种蛋白酶.

汪靖超, 赵峰, 李荣贵, 青岛大学医学院生物系 山东省青岛市 266071
王斌, 青岛大学医学院微生物学教研室 山东省青岛市 266021
汪靖超, 硕士, 讲师, 主要从事分子生物学研究.
国家重点基础研究前期专项基金资助项目, No. 2004CCA02400
通讯作者: 汪靖超, 266071, 山东省青岛市, 青岛大学医学院生物系. wangjc@qdu.edu.cn
电话: 0532-85953710
收稿日期: 2006-11-10 接受日期: 2007-01-10

Purification and properties of the protease from *Perinereis aibuhitensis* Grube

Jing-Chao Wang, Feng Zhao, Rong-Gui Li, Bin wang

Jing-Chao Wang, Feng Zhao, Rong-Gui Li, Department of Biology, Qingdao University Medical College, Qingdao 266071, Shandong Province, China
Bin Wang, Department of Microbiology, Qingdao University Medical College, Qingdao 266021, Shandong Province, China
Correspondence to: Jing-Chao Wang, Department of Biology, Qingdao University Medical College, Qingdao 266071, Shandong Province, China. wangjc@qdu.edu.cn
Received: 2006-11-10 Accepted: 2007-01-10

Abstract

AIM: To purify a new protease from the clamworm *Perinereis aibuhitensis* Grube, and study its properties.

METHODS: After homogenization, Superdex-75 chromatography, MonoQ™ chromatography, and SP-Sepharose 4B chromatography were used ordinally to purify the protease from the clamworm *Perinereis aibuhitensis* Grube. A new gelatin zymography method was used to study the proteolytic activity of the protease: protease separated by non-reductive SDS-PAGE was electrophoretically transferred to a gel containing gelatin, and the proteolytic activity of the protease was determined by the clear zone of the electrophoretic protein band. The effect of pH value, temperature, protease inhibitor, organic solvents and metal ions on the proteolytic activity of the protease was studied.

RESULTS: After purification, one kind of protease was obtained, which showed two protein bands with molecular weights of 34 900 and 33 900 separately by reductive SDS-PAGE, while three bands with molecular weights of 65 600, 57 900, and 43 500 separately by non-reductive SDS-PAGE. Gelatin zymography showed that the proteolytic activity mainly appeared around the band of M_r 66 000. The protease was stable and displayed high proteolytic activity within the range of pH 8 to 10 and at 20-35℃ It was strongly inhibited by phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF), while stable in the presence of organic solvents.

CONCLUSION: The protease is composed of two subunits, whose molecular weights are 33 900 and 34 900, respectively. Gelatin zymography is sensitive and effective in studying the proteolytic activity of proteases.

Key Words: Purification; protease; Perinereis aibuhitensis Grube; properties

Wang JC, Zhao F, Li RG, Wang B. Purification and properties of the protease from *Perinereis aibuhitensis* Grube. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(8):800-806

摘要

目的: 纯化双齿围沙蚕(*Perinereis aibuhitensis* Grube)蛋白酶, 并对其性质进行研究.

方法: 将沙蚕匀浆液先后进行Superdex-75凝胶柱层析、MonoQ™阴离子交换柱层析及SP-Sepharose 4B阳离子交换层析进行纯化. 将经过非还原性SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的蛋白酶电转移至含明胶的SDS-聚丙烯酰胺凝胶中, 通过观察明胶的分解来确定电泳条带的蛋白酶活性. 对纯化后蛋白酶的最适pH值, 热稳定性, 最适温度, 蛋白酶抑制剂的影响, 有机溶剂的稳定性, 金属离子对酶活性的影响等性质进行了测定.

结果: 纯化后得到的一种蛋白酶, 还原性SDS-PAGE显示纯化的蛋白酶为两条带, 分子量分别为M_r 34 900和M_r 33 900, 而非还原性SDS-

PAGE出现了分子量分别为M_r 65 600、M_r 57 900、M_r 43 500的三条蛋白带, 明胶蛋白酶活性图谱检测显示酶活性主要在约M_r 66 000处. 该蛋白酶具较好的热稳定性, 在pH 8-10和20-35℃的情况下有较高活性. PMSF对该酶有较强抑制作用, 而有机溶剂对该酶没有明显的影响.

结论: 该蛋白酶由两个通过二硫键连接在一起的亚基构成, 两亚基的分子量分别为M_r 33 900和M_r 34 900; 本文所采用的新的明胶蛋白酶活性图谱检测法是一种非常灵敏和有效的蛋白酶活性检测方法.

关键词: 纯化; 蛋白酶; 纯化双齿围沙蚕; 性质

汪靖超, 赵峰, 李荣贵, 王斌. 双齿围沙蚕蛋白酶的纯化及其性质. 世界华人消化杂志 2007;15(8):800-806
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/800.asp

0 引言

双齿围沙蚕(*Perinereis aibuhitensis* Grube)属环节动物, 俗称海蜈蚣、青虫, 广泛分布在我国沿海滩涂, 平常被用作钓饵和对虾养殖的优质饵料[1]. 关于沙蚕的性质研究, 很多学者也进行了大量的工作[2-5], Takahashi *et al*[6]从沙蚕中分离出了多种具有生物活性的多肽, 这些多肽对环节动物的食管具有较强的收缩作用, Takahashi认为, 可以开发为新型胃动力药; Pan *et al*[7]从双齿围沙蚕体内分离出了具有广谱抗菌活性的一种抗菌肽; Li *et al*[8]从双齿围沙蚕体内克隆出了一种蛋白酶的cDNA, 插入表达载体后转化大肠杆菌, 得到了重组的沙蚕蛋白酶; 张伟云 *et al*[9]从沙蚕体内分离出了一种蛋白酶. 我们从双齿围沙蚕体内分离纯化了一种蛋白酶, 具酪蛋白酶活性, 有望开发为一种新型的助消化药物. 我们在实验过程中还对传统的明胶蛋白酶图谱检测方法进行了改进.

1 材料和方法

1.1 材料 双齿围沙蚕产于山东青岛. ÄKTA Purifier、SP-Sepharose 4B树脂为Amersham Biosciences产品, Superdex-75 树脂、MonoQ^{TM}阴离子交换树脂为Pharmacia公司产品, 其他试剂均为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 沙蚕蛋白酶的分离纯化 称取约5 g新鲜活沙蚕, 加入25 mL TRIs-HCl缓冲液(20 mmol/L, pH8.0), 组织匀浆机中匀浆, 匀浆液于高速冷冻离心机中10 000 *g*离心30 min, 取上清液. 以20 mmol/L TRIs-HCl缓冲液(pH8.0)平衡Superdex-75凝胶柱(1.6 cm×60 cm), 上样2 mL上清液, 用同样的缓冲液洗脱, 流速设置为0.5 mL/min, 分部收集器收集, 每管3 mL, 280 nm处检测. 取峰值样品进行蛋白酶活性检测. 将凝胶过滤后收集的Ⅳ号峰样品进一步经过MonoQ^{TM}阴离子交换树脂分离纯化, 首先用TRIs-HCl缓冲液(20 mmol/L, pH8.0)平衡层析柱, 取样品20 mL上样, 以含0.01-0.5 mol/L NaCl的相同缓冲溶液进行NaCl连续梯度洗脱, 流速0.5 mL/min, 分部收集器自动收集, 每管0.5 mL, 280 nm处检测. 取峰值样品进行蛋白酶活性检测. 取SP-Sepharose 4B树脂100 μL于1.5 mL eppendorf管中, 用TRIs-HCl (20 mmol/L, pH8.0)缓冲液平衡树脂. 将500 μL上一步中收集的第22管样品稀释至1 mL, 加入平衡好的树脂, 充分悬浮后低速离心, 弃上清. 再依次用250 μL含0.1, 0.2, 0.25, 0.3, 0.45 mol/L NaCl的TRIs-HCl (20 mmol/L, pH8.0)洗脱缓冲液进行不连续梯度洗脱, 每次洗脱后均低速离心, 收集上清, 并进行蛋白酶活性检测.

1.2.2 蛋白酶活性的测定 20 mL TRIs-HCl缓冲液(20 mmol/L, pH8.0)中加入0.2 g琼脂糖、0.3 g脱脂奶粉, 混匀, 加热煮沸, 倒平板, 静置冷却, 用打孔器在平板上打直径约3 mm的孔. 在每个孔中点样20 μL蛋白酶样品, 于28℃恒温培养箱中保温12 h, 测量透明圈垂直的两直径, 取两值的乘积.

1.2.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 配制150 g/L的SDS-聚丙烯酰胺凝胶(50 g/L浓缩胶, 150 g/L分离胶)对蛋白样品进行电泳[10], 考玛斯亮蓝R-250染色, 电泳时分别使用还原与非还原(不含β-巯基乙醇)的载样缓冲液, 观察条带位置与数目的变化.

1.2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE) 配置150 g/L的聚丙烯酰胺凝胶对样品进行电泳, 观察并记录条带的数目, 与上述SDS-PAGE结果进行比较分析.

1.2.5 明胶蛋白酶图谱检测 制备150 g/L的SDS-聚丙烯酰胺凝胶一块(含1 g/L明胶), 待用. 配制SDS-聚丙烯酰胺凝胶(50 g/L浓缩胶, 150 g/L分离胶), 取分离纯化的蛋白酶样品1 μL, 加15 μL非还原性载样缓冲液(不含β-巯基乙醇), 进行SDS-PAGE. 电泳后取下凝胶, 浸在印迹缓冲

■研发前沿
关于沙蚕蛋白酶的研究国内外目前都较少, 沙蚕蛋白酶有相当大的开发前景和空间, 其药理、毒理、临床反应等方面的研究是本领域的研究热点.

■相关报道
Li *et al*从双齿围沙蚕体内克隆出一种蛋白酶的cDNA, 插入表达载体后转化大肠杆菌, 得到了重组的沙蚕蛋白酶; 利用分子生物学技术, 克隆出沙蚕蛋白酶的基因, 利用基因工程菌发酵生产重组沙蚕蛋白酶, 这种途径可以大量、持久的得到沙蚕蛋白酶.

液(25 mmol/L TRIs-HCl, 192 mmol/L甘氨酸, 200 mL/L甲醇, pH8.3), 120 mA恒流条件下电转移1 h, 将凝胶中的蛋白转印至已制备好的含1 g/L明胶的SDS-聚丙烯酰胺凝胶中. 蒸馏水冲洗后浸入复性缓冲液(50 mmol/L TRIs-HCl, 25 g/L TritonX-100, pH 8.0), 室温振荡30 min(期间更换一次复性缓冲液), 倒掉复性缓冲液, 加入培育缓冲液(TRIs-HCl, 50 mmol/L, pH7.5, 5 mmol/L $CaCl_2$, 200 mmol/L NaCl), 28℃温育约3 h. 然后用考玛斯亮蓝R-250染色液充分染色, 脱色后观察电泳条带的蛋白酶活性.

1.2.6 蛋白酶性质的研究 沙蚕蛋白酶的最适pH值: 以pH3.0-pH10.0的缓冲液(pH3.0-pH6.0为NaAC-HAC缓冲液, pH7.0-pH10.0为TRIs-HCl缓冲液)配制蛋白平板测蛋白酶活性. 沙蚕蛋白酶的最适温度: pH8.0的蛋白平板, 加样后20℃, 25℃, 30℃, 35℃, 40℃下保温4 h, 测蛋白酶活性. 沙蚕蛋白酶的热稳定性: 将纯化的沙蚕蛋白酶置于10-80℃的水浴中保温30 min, 4℃下静置片刻, 测蛋白酶活性. 蛋白酶抑制剂的影响: 选用丝氨酸蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(PMSF). 测PMSF终浓度分别为2.5, 5, 10, 20 mmol/L的纯化蛋白酶的酶活性. 沙蚕蛋白酶对有机溶剂的稳定性: 在纯化的沙蚕蛋白酶样品中分别加入3倍体积的甲醇、1,2-丙二醇、正己烷、丙酮4℃保存, 每10 d取样一次, 测蛋白酶活性. 金属离子对酶活性的影响: 检测Zn^{2+}, Cu^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+}, Ni^{2+}, K^{+}, Ca^{2+}, Mg^{2+} 8种金属离子对沙蚕蛋白酶活性的影响.

2 结果

2.1 沙蚕蛋白酶粗酶的提取 沙蚕经匀浆后, 匀浆上清液滴加到含脱脂奶粉的平板上, 28℃放置12 h后, 滴样孔周围有明显的透明圈(图1), 说明沙蚕匀浆上清液有酪蛋白水解活性, 所以断定沙蚕粗提液中有能水解酪蛋白的蛋白酶.

2.2 蛋白酶纯化

2.2.1 凝胶过滤柱层析 沙蚕匀浆上清液经Superdex-75凝胶层析分离后, 共有9个紫外吸收峰(图2), 经蛋白平板检测Ⅳ号吸收峰的样品有明显蛋白酶活性, 对照管数合并Ⅳ号吸收峰样品, 进行阴离子交换层析.

2.2.2 阴离子交换柱层析 经MonoQ™阴离子交换树脂进一步分离纯化, 结果见图3. 经蛋白平板检测12-28号管中样品有活性, 对应的相对电导率(cond%)范围为3.2%-23.7%, 其中22号管中

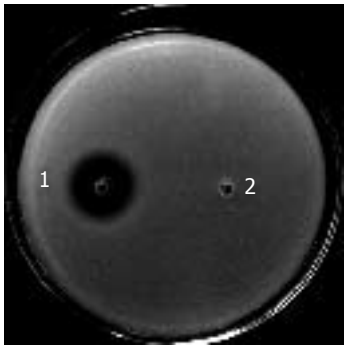


图 1 沙蚕匀浆上清液的蛋白水解酶活性. 1: 沙蚕匀浆上清液; 2: 对照.

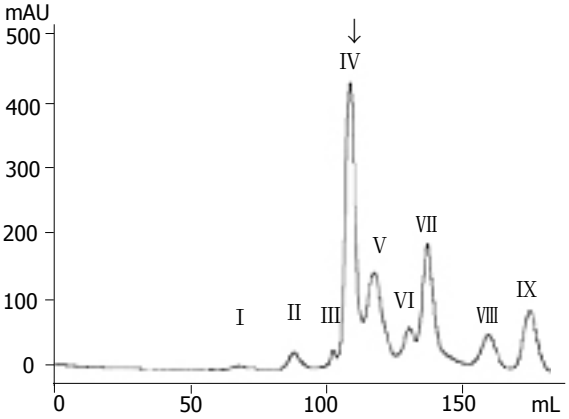


图 2 Superdex-75凝胶过滤层析洗脱曲线.

的样品酶活性最高(图3中箭头所示). 取22号管样品再进行阳离子交换层析.

2.2.3 阳离子交换层析 经SP-Sepharose 4B阳离子交换层析后发现, 未与SP-Sepharose 4B树脂结合的流出液有明显的蛋白酶活性, 而由各浓度盐离子洗脱下的蛋白样品并没有水解酪蛋白平板的蛋白酶活性(图4). 这说明该蛋白酶在pH8.0的缓冲液中带有负电荷.

2.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 经以上多步纯化后, 还原性SDS-PAGE显示纯化的蛋白酶为分子量分别为M_r34 900和M_r 33 900的两条带(图5, 2), 两条带靠的很近且条带很弱. 我们怀疑这两条带是纯化出的蛋白酶的两个亚基, 在电泳过程中, 两亚基分开, 所以显为两条带. 为了研究还原性SDS-PAGE电泳中M_r 34 900和M_r 33 900的两条带是独立的两个蛋白质, 还是一个蛋白质的两个亚基, 我们又进行了非还原性SDS-PAGE. 结果显示, 在M_r 35 000分子量左右并没有再出现蛋白质条带, 而出现了分子量分别为M_r 65 600、M_r 57 900、M_r 43 500的3条蛋白带(图5, 3). 将纯化的蛋白酶在4℃保存10 d后,

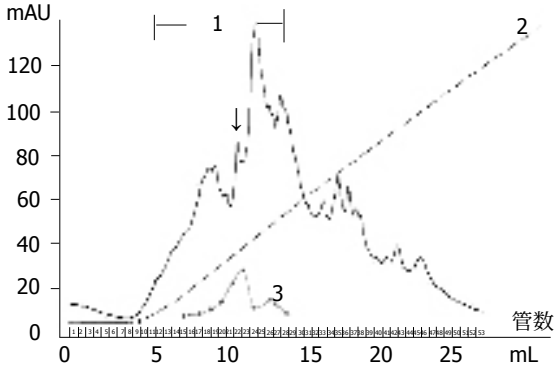


图 3 阴离子交换柱层析洗脱曲线和蛋白酶活力曲线. 1: 活性区域(12 - 28管); 2: 百分电导率(cond%); 3: 活性曲线.

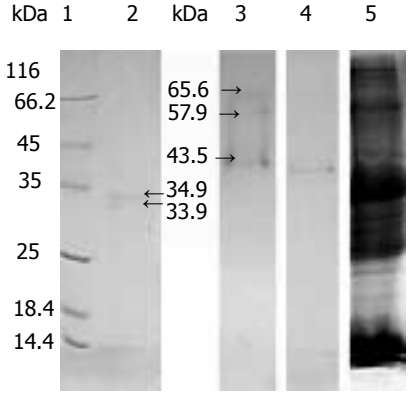


图 5 纯化蛋白酶的SDS–PAGE分析. 1: 标准蛋白; 2: 还原SDS - PAGE; 3, 4: 非还原SDS - PAGE; 5: 沙蚕全蛋白.

■创新盘点
本文提纯的蛋白酶是一种新型的蛋白酶, 同时本文还创新的使用了一种新的检测蛋白酶活性的明胶蛋白酶活性图谱检测法.

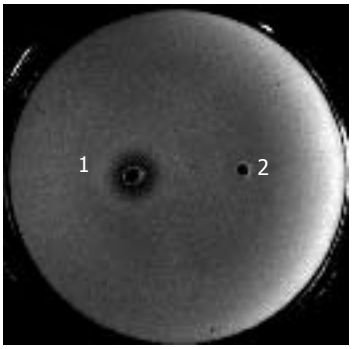


图 4 阳离子交换层析后活性对比. 1: 样品流出液; 2: 0.3 mol/L NaCl洗脱下的蛋白样.

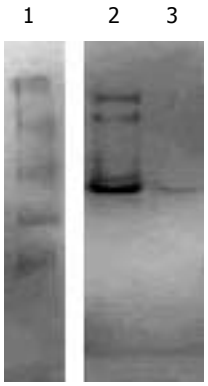


图 6 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE). 1: 标准蛋白; 2: 蛋白酶样品; 3: 保存10 d后蛋白酶.

再次进行非还原性SDS-PAGE, 结果显示, (图5, 3)中的两条大分子量蛋白条带均减弱, 只在M_r40 000左右有一条清晰蛋白条带(图5, 4). 在进行非还原SDS-PAGE时, 使用的载样缓冲液中不添加β-巯基乙醇, 并且上样样品不进行煮沸处理, 因此蛋白间的二硫键不能被打开, 以二硫键相连的亚基也不会分开, 既然非还原SDS-PAGE电泳图中没有还原SDS-PAGE电泳图分子量为M_r 35 000左右的两条带, 而是出现了分子量更大的条带, 所以我们推断, 还原SDS-PAGE电泳图谱中M_r 34 900和M_r 33 900的两条带不应该是两个独立的蛋白, 而应该是一个蛋白质的两个亚基, 这个蛋白质的分子量应当在M_r 60 000-70 000之间. 非还原性SDS-PAGE图谱中出现了3条蛋白条带, 而保存10 d后再次进行的非还原SDS-PAGE图谱中仅剩一条分子量约为M_r 40 000的条带. 这两次电泳出现的差异我们认为可能是由于蛋白酶发生降解而引起的结果.

2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测图谱见图6, 与非还原SDS-PAGE(图5, 3-4)的结果基本吻合. 为了探讨M_r57 900与M_r 43 500两条带的出现是否是由于肽链间弱相互作用(如疏水性相互作用)的结果, 我们又进行了聚丙烯酰胺凝胶电泳, 聚丙烯酰胺凝胶电泳体系(电极缓冲液、凝胶、载样缓冲液)中没有SDS, 并且载样缓冲液中也不添加β-巯基乙醇, 因此蛋白经聚丙烯酰胺凝胶电泳时既不会打开二硫键, 也不会破坏亚基间的疏水性的相互作用, 电泳结果与非还原SDS-PAGE的结果基本吻合, 可以推断在蛋白亚基之间除二硫键以外并不存在疏水相互作用等弱连接. 对于M_r 57 900与M_r 43 500两条带出现原因, 我们推测可能是由于蛋白酶降解造成的.

2.5 明胶蛋白酶图谱检测 非还原SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 将蛋白电转移到含明胶的聚丙烯酰胺凝胶上, 检测蛋白条带的明胶蛋白酶活性, 结果见图7. 刚纯化出的蛋白(图7, 2), 其酶活性只在约M_r 66 000处, 但随蛋白保存时间的延长, 出现了分子量小于M_r 66 000的有酶活性的蛋白带(图7, 3-4), 尽管保存10 d后的蛋白在非还原SDS-PAGE、PAGE中均只显示为一条带, 但由于明胶蛋白酶图谱检测法的敏感性, 仍

■名词解释
明胶蛋白酶活性图谱检测法: 为了检测电泳蛋白条带的蛋白酶活性, 将电泳后的蛋白电转移至含明胶的聚丙烯酰胺凝胶中, 考玛斯亮蓝R-250染色后观察电泳条带的蛋白酶活性.

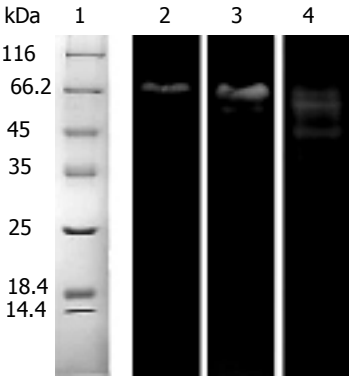


图 7 蛋白酶活性染色. 1: 标准蛋白; 2-4: 保存0, 5, 10 d后的蛋白酶.

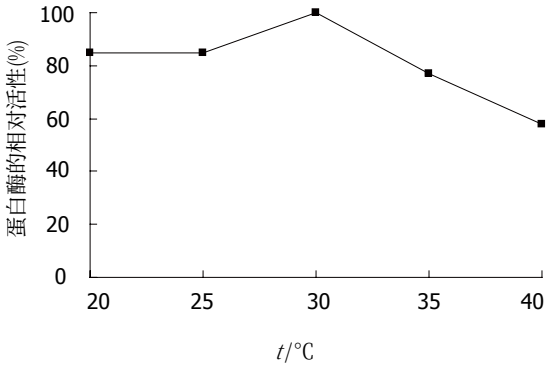


图 9 温度对沙蚕蛋白酶活性的影响.

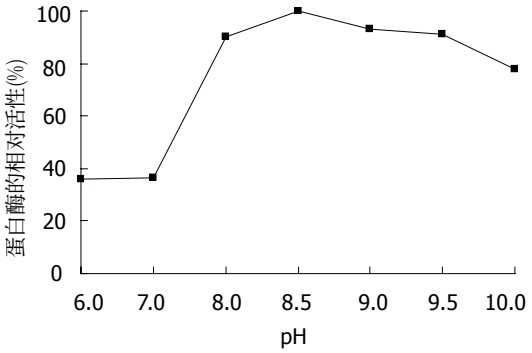


图 8 pH对沙蚕蛋白酶活性的影响.

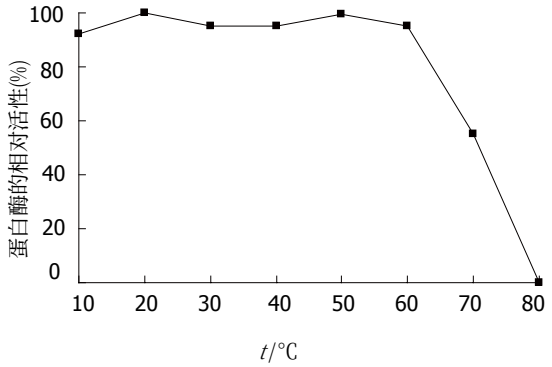


图 10 沙蚕蛋白酶的热稳定性.

可显现出M_r 66 000与M_r 57 900左右的两条带来, 此时M_r 66 000处条带明显变弱, 小分子量蛋白增多(图7, 4). 至此, 我们断定M_r 57 900和M_r 43 500的两条带是由M_r 65 600的蛋白自溶产生的, 该蛋白由M_r 34 900和M_r 33 900的两个亚基组成. 蛋白酶的分子量约为M_r 65 600, 也与该蛋白在凝胶过滤层析中的出峰位置(图2)基本吻合. 在最初进行明胶蛋白酶活性图谱检测时, 我们是参照文献[11]中介绍的方法进行的: 将蛋白样品直接在含1 g/L明胶的SDS-聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳, 然后复性、温浴、考玛斯亮蓝R-250染色、脱色. 但效果并不好, 这是由于该蛋白酶的活性非常高, 伴随着电泳的进行蛋白酶已将凝胶板中的明胶水解, 活性染色时从加样孔至蛋白条带间出现大片的白色区域, 且分辨不清不同的蛋白条带, 我们也尝试了用冰浴法进行电泳、减少蛋白酶的上样量、缩短温浴时间等多种方法, 试图降低电泳时蛋白酶对明胶的分解, 但效果并不显著. 后来受Western blot实验原理的启发, 我们创造性的采用了电转移法来进行蛋白酶活性检测. 结果证明用该方法检测蛋白酶活性, 一方面避免了在电泳过程中蛋白酶就对明胶进行分解, 影响了最终结果的观察, 同时用该方法检测蛋白酶活性也极为敏感, 对条带的分辨率很高(图7).

2.6 沙蚕蛋白酶性质的研究 pH值对沙蚕蛋白酶活性的影响见图8, 沙蚕蛋白酶属碱性蛋白酶, 在碱性条件下有较高活性, 而在中性和酸性条件下活性较低, 最大酶活的pH值为8.5. 沙蚕蛋白酶在20-35℃间都有较高活性, 最适温度为30℃, 随着温度的升高, 酶活下降较快(图9). 沙蚕蛋白酶在不同温度下保温30 min后的酶活性见图10, 该沙蚕蛋白酶有较好的热稳定性, 60℃处理30 min对酶活性并没有影响, 70℃时酶活性才有显著降低, 80℃时酶则完全失活. PMSF对沙蚕蛋白酶具有明显的抑制作用(图11), 随PMSF浓度的升高抑制作用逐步加强, 20 mmol/L的PMSF能对此酶完全抑制. 这同时表明该沙蚕蛋白酶属于丝氨酸蛋白酶家族. 实验用各有机溶剂对沙蚕蛋白酶的稳定性并没有显著的影响(图12), 沙蚕蛋白酶对有机溶剂有较好的稳定性. 金属离子对沙蚕蛋白酶活性的影响见表1, Zn^{2+}的存在对沙蚕蛋白酶有明显抑制作用, 随离子浓度的升高抑制作用也明显加强. Cu^{2+}对沙蚕蛋白酶活性有一定抑制作用, 但离子浓度升高时, 抑制作用并不显著. Mn^{2+}、Ni^{2+}、K^{+}对沙蚕蛋白酶活性

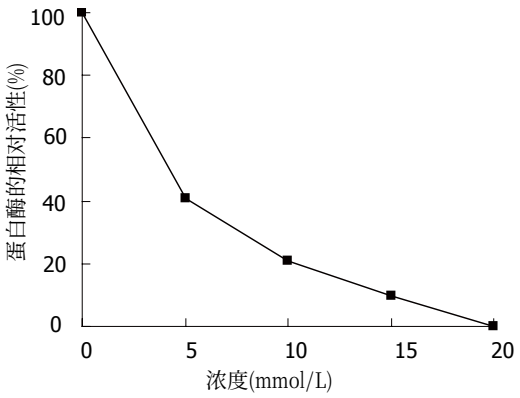


图 11 PMSF对沙蚕蛋白酶的抑制作用.

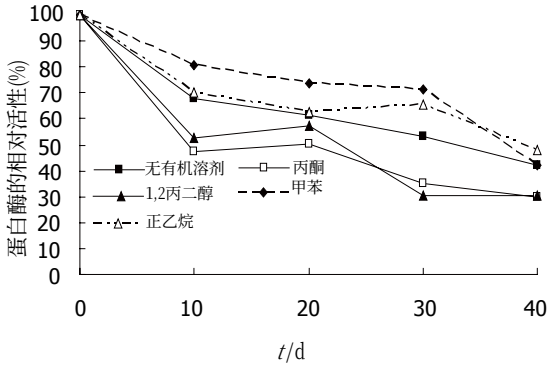


图 12 有机溶剂对沙蚕蛋白酶稳定性的影响.

■同行评价
本文研究了双齿围沙蚕蛋白酶的纯化及性质, 文章新颖度高、方法可靠、结果可信、有一定的实际应用价值.

有微弱的抑制作用, Fe^{2+}、Ca^{2+}对沙蚕蛋白酶活性则完全没有影响, 而Mg^{2+}在低离子浓度的情况下对沙蚕蛋白酶有激活作用.

3 讨论

近年来, 蛋白酶及其抑制剂已成为研究热点. 众多研究表明, 蛋白酶在许多重要的生命活动过程中发挥着十分重要的作用. 蛋白酶参与蛋白质的水解、消化、血液凝固与血栓溶解、血管形成、炎症、受精以及细胞生长和维持细胞的形态等. 蛋白酶及其抑制剂与许多疾病的发病机制有关, 在人类疾病的治疗与诊断中也发挥着重要的作用[12-15].

沙蚕与蚯蚓同属环节动物, 人们对从蚯蚓中提取的蚓激酶已经做了大量的研究[16-21], 并作为溶栓药品推向了市场[22]. 沙蚕虽然广泛分布在我国沿海, 但目前国内外对沙蚕药用价值的开发和利用却并不多见. 我们采用Superdex75凝胶过滤柱层析、MonoQ™阴离子交换柱层析、SP-Sepharose 4B阳离子交换柱层析等方法从双齿围沙蚕中分离纯化出了一种蛋白酶, 该蛋白酶有很强的体外水解酪蛋白活性, 有较好的热稳定性, 有机溶剂对该酶没有明显的影响. 该蛋白酶有望开发为一种新型溶栓药物或新型的助消化药物.

我们推断, 本次纯化的蛋白酶由两个亚基组成, 两亚基的分子量分别约为M_r 33 900和M_r 34 900, 两亚基间通过二硫键相连. 张伟云 *et al*[9]曾从双齿围沙蚕中提取出一种沙蚕纤溶酶, Li *et al*[8]从双齿围沙蚕体内克隆出一种蛋白酶的cDNA, 插入表达载体后转化大肠杆菌, 得到了重组的沙蚕蛋白酶, 但他们所得蛋白酶的分子量与我们提纯的蛋白酶分子量并不相同, 所以本文所报道的双齿围沙蚕蛋白酶是一种新型的蛋白酶. 在实验中进行明胶蛋白酶活性图谱检测时, 我们先是参照Noritaka *et al*[11]的方法进行的, 但由于该蛋白酶的活性非常高, 该方法并不可行, 后来我们创新性的采用了电转移法来进行蛋白酶活性检测. 结果证明我们的方法极其灵敏, 检出限极低, 是一种检测蛋白酶活性与纯度的好方法. 下一步我们将深入研究该蛋白酶的功能, 对其进行药理、毒理、临床反应等方面的研究, 为其作为一种新型药物的应用奠定基础.

4 参考文献

1 顾晓英, 蒋霞敏, 郑忠明, 金春华. 双齿围沙蚕(*Perinereis aibuhitensis Grube*)的生物学特征和开发利用现状. 现代渔业信息 2002; 17: 33-34
2 张永靖, 童丽娟, 郑周数, 庄丁丁. 养殖环境中底栖生物丰度与双齿围沙蚕生化组成的相关性研究. 水产科学 2005; 24: 5-8
3 Tsuneshige A, Imai K, Hori H, Tyuma I, Gotoh T. Spectrophotometric, electron paramagnetic resonance and oxygen binding studies on the hemoglobin from the marine polychaete Perinereis aibuhitensis (Grube): comparative physiology of hemoglobin. *J Biochem (Tokyo)* 1989; 106: 406-417
4 Yamaki M, Kubota K, Matsubara K, Ebina S, Gotoh T. Carbohydrate gluing is a strategy for supramolecular clamping of submultiples in annelid extracellular multi-subunit hemoglobin. *Arch Biochem Biophys* 1998; 355: 119-123
5 Chen CA, Chen CP, Fan TY, Yu JK, Hsieh HL. Nucleotide sequences of ribosomal internal transcribed spacers and their utility in distinguishing closely related Perinereis polychaets (Annelida; Polychaeta; Nereididae). *Mar Biotechnol (NY)* 2002; 4: 17-29
6 Takahashi T, Furukawa Y, Muneoka Y, Matsushima O, Ikeda T, Fujita T, Minakata H, Nomoto K. Isolation and characterization of four novel bioactive peptides from a polychaete annelid, Perinereis vancaurica. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1995; 110: 297-304
7 Pan W, Liu X, Ge F, Han J, Zheng T. Perinerin, a novel antimicrobial peptide purified from the

clamworm Perinereis aibuhitensis grube and its partial characterization. *J Biochem (Tokyo)* 2004; 135: 297-304
8 Li RG, Qian DM, Guo DS, Du GC, Yan ZY, Wang B. Isolation of a cDNA encoding a protease from Perinereis aibuhitensis Grube. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2006; 38: 543-548
9 张伟云, 陈颢, 汪水娟, 夏仲豪, 谭仁祥. 沙蚕纤溶酶的一种纯化方法 中草药 2001; 32: 673-674
10 Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 27-30
11 Noritaka H, Naoko U, Akimasa H. Akashi K. Characterization of serine proteases in the monogenean *Neobenedenia girellae*. *Aquaculture* 2006; 255: 188-195
12 乔镇, 汪丽燕, 关景明. 组织蛋白酶B与结肠腺瘤和结肠癌的关系. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2446-2449
13 范玉晶, 韩明子. 基质金属蛋白酶和消化道肿瘤的相关性. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2174-2176
14 郑伟达, 王小众. 基质金属蛋白酶及其抑制物与实验性肝纤维化. 世界华人消化杂志 2004; 12: 428-431
15 汪丽燕, 乔镇, 关景明. 基质金属蛋白酶与其抑制剂在消化道肿瘤中的研究进展. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2674-2678
16 严宜明, 孔键, 李红, 石男, 隋红艳. 蚯蚓纤溶酶原激活剂的分离纯化及其性质. 中国生物化学与分子生物学报 2005; 21: 537-545
17 Hu Y, Meng XL, Xu JP, Lu W, Wang J. Cloning and expression of earthworm fibrinolytic enzyme PM(246) in Pichia pastoris. *Protein Expr Purif* 2005; 43: 18-25
18 Nakajima N, Sugimoto M, Ishihara K. Stable earthworm serine proteases: application of the protease function and usefulness of the earthworm autolysate. *J Biosci Bioeng* 2000; 90: 174-179
19 Wang F, Wang C, Li M, Zhang JP, Gui LL, An XM, Chang WR. Crystal structure of earthworm fibrinolytic enzyme component B: a novel, glycosylated two-chained trypsin. *J Mol Biol* 2005; 348: 671-685
20 Cho IH, Choi ES, Lee HH. Molecular cloning, sequencing, and expression of a fibrinolytic serine-protease gene from the earthworm Lumbricus rubellus. *J Biochem Mol Biol* 2004; 37: 574-581
21 Wang C, Wang F, Li M, Tang Y, Zhang JP, Gui LL, An XM, Chang WR. Structural basis for broad substrate specificity of earthworm fibrinolytic enzyme component A. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325: 877-882
22 胡燕, 孟小林, 徐进平, 张俊杰, 王健, 鲁伟. 蚯蚓纤溶酶基因的cDNA克隆及其序列分析. 武汉大学学报(理学版) 2004; 50: 211-215

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 •

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盖公章后, 寄南京市紫竹林3号《中华消化内镜杂志》编辑部卜小乐、赵在文同志收. 邮编: 210003. 信封左下脚注“征文”字样, 同时汇寄审稿费10元. 请自留底稿, 恕不退稿. 截稿日期: 2007-05-31. 有关会议的具体事项另行通知. 联系电话: 025-83472831, 86086091.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月18日; 15(8): 807-812
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

乳酸杆菌对幽门螺旋杆菌脂多糖作用下的SGC-7901细胞p38MAPK磷酸化水平和凋亡率的影响

周 超, 马洪升

周超, 马洪升, 四川大学华西医院消化内科 四川省成都市 610041
周超, 在读博士, 主要从事胃内微生态及胃肠多肽的研究.
四川省科技厅应用基础研究项目, No.04JY029-090-1
通讯作者: 马洪升, 610041, 四川省成都市国学巷37号, 四川大学华西医院消化内科. mhswch@163.com
电话: 028-85422296
收稿日期: 2006-12-16 接受日期: 2007-01-10

Effects of *lactobacillus* on phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase and apoptosis in SGC-7901 cells treated with lipopolysaccharide of *Helicobacter pylori*

Chao Zhou, Hong-Sheng Ma

Chao Zhou, Hong-Sheng Ma, Department of Gastroenterology, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Supported by the Basic Research Project of Science and Technology Office of Sichuan Province, No. 04JY029-090-1
Correspondence to: Hong-Sheng Ma, Department of Gastroenterology, West China Hospital of Sichuan University, 37 Guoxue Alley, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. mhswch@163.com
Received: 2006-12-16 Accepted: 2007-01-10

Abstract

AIM: To investigate effects of *lactobacillus bulgaricus* (LBG) on the levels of phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase (P-p38MAPK) and apoptosis index (AI) in gastric cancer cell line SGC-7901 treated with lipopolysaccharide of *H pylori* Sydney strain 1 (*H pylori*SS1-LPS).

METHODS: Human gastric cancer cell line SGC-7901 was treated with *H pylori*SS1-LPS at the concentration of 2.5×10^3, 2.5×10^4, 2.5×10^5 EU/L, respectively, after pretreatment for 1 hour with 10 μmol/L SB203580 (blocker of p38MAPK) or 1×10^{13} CFU/L LBG. The level of P-p38MAPK was analyzed by immunocytochemistry after 2 hours of H pyloriSS1-LPS treatment. The cell activity was detected by MTT assay after 4, 5 and 6 hours of treatment, and the apoptosis was measured by flow cytometry at the 6th hour.

RESULTS: *H pylori*SS1-LPS inhibited cell activity (0.164 ± 0.028 *vs* 0.622 ± 0.068, $P < 0.05$) and up-regulated the level of P-p38MAPK (79.771 ± 1.424 *vs* 4.075 ± 0. 135, $P < 0.01$) and AI value (10.000% ± 0.510% *vs* 4.175% ± 0.206%, $P < 0.05$) in a dose-dependent manner. The level of P-p38MAPK and AI value in SGC-7901 cells were not significantly different between LBG pretreatment group and the controls, and the cell activity and AI value were not markedly different between SB203580 pretreatment group and the controls.

CONCLUSION: *H pylori*SS1-LPS may induce the apoptosis of SGC-7901 cells by activating the phosphorylation of p38MAPK, while LBG can prevent *H pylori*SS1-LPS-induced apoptosis of SGC-7901 cells by inhibiting the phosphorylation of p38MAPK.

Key Words: *Lactobacillus*; *Helicobacer pylori*; Lipopolysaccharide; SGC-7901; p38 mitogen-activated protein kinase; Cell apoptosis

Zhou C, Ma HS. Effects of *lactobacillus* on of phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase and apoptosis index in SGC-7901 cells treated with lipopolysaccharide of *Helicobacer pylori*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(8):807-812

摘要

目的: 探讨保加利亚乳酸杆菌(*lactobacillus bulgaricus*, LBG)对幽门螺旋杆菌悉尼株脂多糖(*H pylori*SS1-LPS)作用下SGC-7901细胞的p38有丝分裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)磷酸化水平和凋亡率的影响.

方法: 使用LBG(1×10^{13} CFU/L)或p38MAPK通路阻滞剂SB203580(10 μmol/L)预处理SGC-7901细胞, 1 h后分别加入2.5×10^3, 2.5×10^4, 2.5×10^5 EU/L的*H pylori*SS1-LPS, 干预2 h后使用免疫细胞化学方法检测各组细胞磷

■背景资料
正常胃黏膜上皮细胞自我更新极快, 并始终维持凋亡与增殖的动态平衡, 以保持黏膜上皮的正常结构与功能. *H pylori*感染诱导上皮细胞过度凋亡, 是*H pylori*促使胃黏膜发生一系列病理变化的重要途径. 其中, *H pylori*-LPS起了重要作用, 他主要通过激活p38MAPK通路,生成P-p38-MAPK, 进而诱导胃黏膜上皮细胞凋亡.

■研发前沿
近年来, 乳酸杆菌、幽门螺杆菌等组成的胃内微生态系统是研究的热点, 乳酸杆菌制剂能从多个方面对抗*H pylori*感染, 但对于其中所涉及的细胞信号传导, 尤其是MAPK通路的研究较少, 这亦是目前研究的热点之一.

酸化p38MAPK(P-p38MAPK)的水平, 4, 5, 6 h后使用MTT法检测细胞活性, 6 h后使用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率.

结果: 与对照组比较, *H pylori*SS1-LPS直接干预后, SGC-7901细胞的活性明显下降(0.164±0.028 *vs* 0.622±0.068, $P<0.05$), 凋亡率(10.000%±0.510% *vs* 4.175%±0.206%, $P<0.05$)和P-p38MAPK水平明显上升(79.771±1.424 *vs* 4.075±0. 135, $P<0.01$), 呈剂量依赖性; LBG预处理各组的细胞凋亡率和P-p38MAPK水平无明显改变; SB203580预处理各组的细胞活性和细胞凋亡率无明显改变.

结论: *H pylori*SS1-LPS可诱导SGC-7901细胞凋亡, 其机制可能包括诱导生成P-p38MAPK; 而LBG能对抗*H pylori*SS1-LPS的促凋亡作用, 其机制可能抑制*H pylori*SS1-LPS诱导生成P-p38MAPK.

关键词: 乳酸杆菌; 幽门螺旋杆菌; 脂多糖; SGC7901细胞; p38丝裂原活化蛋白激酶; 细胞凋亡

周超, 马洪升. 乳酸杆菌对幽门螺旋杆菌脂多糖作用下的SGC-7901细胞p38MAPK磷酸化水平和凋亡率的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(8):807-812
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/807.asp

0 引言

体内体外的研究显示[1-16]: *H pylori*感染能诱导胃黏膜上皮细胞凋亡, 进而削弱黏膜屏障功能, 促进胃炎、胃溃疡的发生, 并增加胃黏膜上皮细胞的丢失, 促进向萎缩性胃炎的演进, 上调上皮细胞的代偿性增殖, 增加发生胃腺癌的风险. 幽门螺旋杆菌脂多糖(lipopolysaccharide of *Helicobacter pylori*, *H pylori*-LPS)其中起了重要作用, 他主要通过激活p38MAPK通路, 生成P-p38MAPK, 进而诱导胃黏膜上皮细胞凋亡[15,17-19]. 最近研究显示[20-27], 乳酸杆菌能明显抑制*H pylori*的生长繁殖、黏附定植和毒素生成能力, 抑制*H pylori*诱导的细胞因子和炎症介质的生成. 但是, 目前尚未见到关于乳酸杆菌是否能阻止*H pylori*-LPS对胃黏膜上皮细胞的诱导凋亡作用的研究报道. 本研究旨在通过体外试验, 研究LBG是否能抑制*H pylori*-LPS诱导的胃黏膜上皮细胞凋亡以及p38MAPK磷酸化途径在其中所起的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 *H pylori*SS1, LBG及人胃腺癌上皮细胞株SGC7901均由四川大学公共卫生学院医检教研室提供. MRS培养基粉、空肠弯曲菌培养基粉购自江苏宜兴市永信生物有限公司. RPMI1640培养液购自成都哈里公司. LPS提取试剂盒购自捷瑞生物工程(上海)有限公司(intron biotechnology公司生产); LPS定量检测试剂盒购自上海伊华临床医学科技公司. SB203580购自晶美生物(Alexis公司). 抗P-p38MAPK抗体购自基因公司(Cell Signaling公司生产), 为兔抗人; 链亲和素(streptavidin, SP)法免疫化学试剂盒购自武汉博士德公司.

1.2 方法

1.2.1 SGC-7901细胞的培养 常规复苏细胞后, 悬液转入25 cm^2培养瓶, 使用生长液(100 mL RPMI培养液中, 加入100 kU/L青霉素、100 mg/L链霉素, 并加入小牛血清至100 mL/L浓度制得)于含50 mL/L CO_2的37℃细胞培养箱中培养, 约48 h换液一次, 细胞生长至覆盖约70%-80%培养瓶底面时传代.

1.2.2 LBG的培养 常规解冻复苏菌种后, 使用MRS肉汤于37℃烛缸中培养24-48 h; 收集MRS肉汤, 5000 r/min离心10 min, 弃上清, PBS重悬, 比浊管调浓度到1×10^{10} CFU/mL, 5000 r/min离心10 min洗涤两次后, 等量单纯RPMI1640重悬, 为LBG菌液.

1.2.3 *H pylori*SS1的培养 常规解冻复苏菌种后, 接种于含*H pylori*液体培养基的带侧口三角烧瓶中, 使用换气法使瓶内为含50 mL/L O_2、100 mL/L CO_2和850 mL/L N_2的混合气, 置于振荡培养箱中于37℃下, 约100 r/min振荡培养48 h.

1.2.4 *H pylori*SS1-LPS的制备 完成1.2.3中步骤后, 收集液体培养基, 4℃下, 10 000 *g* 离心10 min, 弃上清, 所得沉淀菌团通过湿涂片及革兰氏染色片的镜下观察和尿素酶、H_2O_2触酶及氧化酶的生化反应鉴定, 确定为*H pylori*, 其后参照LPS提取试剂盒说明书操作, 制得*H pylori*SS1-LPS原液.

1.2.5 *H pylori*SS1-LPS原液浓度的测定 参照LPS定量检测试剂盒说明书操作, 为基质显色法; 用单纯RPMI1640稀释*H pylori*SS1-LPS原液, 获得不同浓度LPS工作液.

1.2.6 实验分组及各组预处理和干预过程 1 mg SB203580溶于133 μL DMSO中, 为20 000 μmol/L, 用单纯RPMI1640按1∶2000稀释, 为10 μmol/L SB工作液. 采用3-4代培养细胞, 常规消化后, 分别接种于96孔板、六孔板(内含盖玻片)、6 cm

培养皿, 培养24 h后, 换用维持液同步化24 h后进行实验. 分为: NC组(对照组, 不加任何预处理及干预措施, 与其余各组同时测定实验数据)、LPS1组、LPS2组及LPS3组(此3组中, 干预所用*H pylori* SS1-LPS的工作浓度分别为2.5×10^3, 25×10^3和250×10^3 EU/L)、LBG-LPS1组、LBG-LPS2组及LBG-LPS3组(此3组中, 上述LBG菌液预处理细胞1 h后, 再使用*H pylori* SS1-LPS干预, 工作浓度分别为2.5×10^3, 25×10^3和250×10^3 EU/L)、SB-LPS1组、SB-LPS2组及SB-LPS3组(此3组中, 上述SB工作液预处理细胞1 h后, 再使用*H pylori* SS1-LPS干预, 工作浓度分别为2.5×10^3, 25×10^3和250×10^3 EU/L).

1.2.7 MTT法检测细胞活性 LPS1, LPS2及LPS3, SB-LPS1, SB-LPS2及SB-LPS3各组均干预4 h, 5 h和6 h, 各组96孔板均在干预终止前4 h加入MTT液50 μL/每孔继续培养, 干预终止时, 吸掉原有液体, 每孔加入DMSO 100 μL, 振荡10 min, 酶标仪490 nm波长测量*A*值.

1.2.8 免疫细胞化学检测各组细胞P-p38MAPK的水平 干预2 h后, 使用40 g/L PBS多聚甲醛固定各组六孔板中的细胞爬片, 室温30 min, SP法检测P-p38MAPK.

1.2.9 流式细胞术检测各组细胞凋亡率 干预6 h后, 消化各组6 cm培养皿中细胞, 收集细胞悬液, 1000 r/min离心5 min洗涤2次, 1800 r/min离心3 min洗涤2次, 加入4℃预冷的700 mL/L乙醇固定30 min, 使用碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)溶液, 流式细胞仪上, 488 nm氩离子激光下, 对样本进行检测, Multcycle DNA软件观察凋亡峰, 测定凋亡峰的面积分析凋亡细胞百分数.

统计学处理 所有数据输入计算机利用SPSS13.0软件进行统计分析. 计量资料用均数±标准差表示, 主要用多个样本均数间两两比较的One-Way ANOVA的LSD法及Tukey法. 检验水准$\alpha = 0.05$, 以$P<0.05$时, 认为具有统计学意义.

2 结果

2.1 MTT法检测细胞活性 以*A*值代表细胞活性. 在同一时间点, *H pylori* SS1-LPS直接干预各组活性明显低于NC组($P<0.05$), 且LPS1, LPS2, LPS3 3组活性逐渐降低($P<0.05$), 各组活性随干预时间的延长而逐渐降低($P<0.05$); SB203580预处理各组活性与同一时间点的NC组活性相比, 均无明显变化($P>0.05$)(表1).

表 1 各组各干预时间点MTT法*A*值

分组	*A*值		
	4 h	5 h	6 h
NC	0.628±0.070	0.624±0.074	0.622±0.068
SB-LPS1	0.588±0.056	0.590±0.065	0.592±0.068
SB-LPS2	0.586±0.046	0.582±0.038	0.585±0.056
SB-LPS3	0.582±0.054	0.584±0.064	0.576±0.046
LPS1	0.434±0.056[a]	0.381±0.046[a]	0.338±0.038[a]
LPS2	0.352±0.048[a]	0.304±0.042[a]	0.262±0.035[a]
LPS3	0.246±0.042[a]	0.202±0.032[a]	0.164±0.028[a]

[a]$P<0.05$ *vs* NC组.

2.2 流式细胞术检测各组细胞凋亡率 *H pylori* SS1-LPS直接干预各组AI明显高于NC组($P<0.05$), LPS1, LPS2和LPS3 3组AI逐渐升高($P<0.05$); LBG预处理各组及SB203580预处理各组AI与NC组AI相比, 均无明显变化($P>0.05$)(表2).

2.3 免疫细胞化学检测P-p38MAPK的水平 各组每张爬片随机选取5个视野照像, 每张照片使用Image-Pro Plus 5.0软件测量IOD值(integrated optical density, 积分吸光度), 以照片IOD值的均数±标准差形式表示各组P-p38MAPK水平. *H pylori* SS1-LPS直接干预各组P-p38MAPK水平明显高于NC组($P<0.05$), LPS1, LPS2, LPS3 3组P-p38MAPK水平逐渐升高($P<0.05$); LBG预处理各组P-p38MAPK水平与NC组相比, 均无明显变化($P>0.05$)(表3, 图1).

3 讨论

既往的研究[17]已经证实, *H pylori*-LPS结合于胃黏膜上皮细胞表面的Toll样受体-4(Toll-like receptor-4, TLR-4), 进而顺序激活白细胞介素-1受体相关激酶(interleukin-1 receptor associated kinase, IRAK)、TNF受体相关因子-6(tumor necrosis factor receptor associated factor-6, TRAF-6)、转化生长因子β活化激酶1(transforming growth factor-β-activated kinase 1, TAK1)、TAK1结合蛋白2/1(TAK1-binding protein 1/2,TAB2/1)、MAPK激酶3/6(mitogen-activated protein kinase kinase 3/6, MKK3/6), 最终磷酸化p38MAPK. Kawahara *et al*[18]的研究显示, *H pylori*-LPS诱导生成的P-p38MAPK能激活caspase-8, 进而促进细胞色素C的释放, 再激活caspase-9、3, 诱导豚鼠胃黏膜上皮细胞凋亡. p38MAPK通路抑制剂SB203580并不阻断上游激酶磷酸化p38MAPK, 而是结合于P-p38MAPK

■相关报道
相关报道显示, *H pylori*-LPS结合于胃黏膜上皮细胞表面的TLR-4, 激活相关信号转导, 诱导生成P-p38MAPK, 通过细胞色素C途径促使细胞凋亡.而最近报道显示, 乳酸杆菌菌体蛋白或可溶性分泌物能抑制TNF-α等细胞因子诱导的肠上皮细胞凋亡, 其机制包括抑制P-p38MAPK的生成.

■应用要点
本文有助于进一步研究乳酸杆菌抑制*H pylori*-LPS诱导凋亡作用的位点及其具体成分.

表 2 各组SGC-7901细胞凋亡率

分组	AI(%)			
	1	2	3	4
NC	4.175±0.206			
LBG-LPS1	4.350±0.412			
LBG-LPS2	4.300±0.082			
LBG-LPS3	4.625±0.457			
SB-LPS1	4.200±0.141			
SB-LPS2	4.375±0.310			
SB-LPS3	4.350±0.480			
LPS1		7.050±0.129[a]		
LPS2			7.975±0.250[a]	
LPS3				10.000±0.510[a]

[a]$P<0.05$ *vs* NC组.

表 3 各组SGC-7901细胞免疫细胞化学IOD值的比较

分组	IOD			
	1	2	3	4
NC	4.075±0.135			
LBG-LPS1	4.538±0.078			
LBG-LPS2	4.749±0.067			
LBG-LPS3	4.973±0.049			
LPS1		25.064±1.107[a]		
SB-LPS1		23.872±0.986[a]		
LPS2			45.678±0.512[b]	
SB-LPS2			43.896±0.674[b]	
LPS3				79.771±1.424[b]
SB-LPS3				78.456±1.123[b]

[a]$P<0.05$, [b]$P<0.01$ *vs* NC组.

的106位苏氨酸位点, 使P-p38MAPK丧失结合ATP的能力, 进而不能磷酸化其下游因子来发挥作用. SB203580预处理各组的P-p38MAPK水平与对应各干预组相比, 并无明显差异.

本研究显示, *H pylori* SS1-LPS通过促进P-p38MAPK的生成进而抑制细胞活性及诱导细胞凋亡. 这与之前的报道[15,18-19]一致. 在本实验中, P-p38MAPK通过何种下游因子和机制介导了SGC-7901细胞凋亡有待于进一步的研究. 本研究还显示, LBG通过抑制*H pylori*-LPS诱导P-p38生成的能力而抑制其诱导细胞凋亡的作用. Yan *et al*[28]的研究表明, 乳酸杆菌活菌及其培养上清液能阻止TNF-α, 干扰素γ(interferon-γ, IFN-γ)和IL-1α诱导小鼠结肠黏膜上皮细胞株YAMC细胞发生凋亡, 其机制包括抑制3者诱导P-p38MAPK生成的能力; 在乳酸杆菌的培养肉汤中, 存在分子量分别为80 kDa和42 kDa的两种蛋白质, 他们能阻止TNF-α、IFN-γ和IL-1α诱导生成P-p38MAPK. 晚近的研究[29-30]证明了上述机制的存在. 那么, LBG抑制P-p38MAPK生成的机制是什么呢? 是LBG分泌物或菌体蛋白与*H pylori* SS1-LPS竞争TLR-4上的结合位点, 还是通过激活其他通路进而抑制IRAK, TRAF-6, TAK1, TAB2/1及MKK3/6等位点? 还有待于进一步的研究.

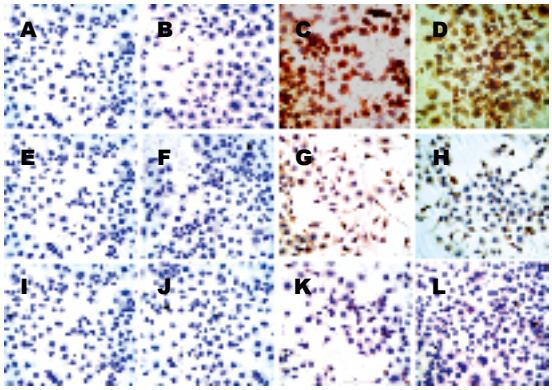


图 1 免疫细胞化学检测各组细胞P-p38MAPK水平(SP法, DAB显色×400). A: NC组; B: LBG-LPS3组; C: LPS3组; D: SB-LPS3组; E: NC组; F: LBG-LPS2组; G: LPS2组; H: SB-LPS2组; I: NC组; J: LBG-LPS1组; K: LPS1组; L: SB-LPS1组.

进一步的研究应着眼于动物模型, 观察乳酸杆菌在体内的作用, 并探讨与胃黏膜炎症的关系; 并进行LBG培养上清液、热灭活LBG等的相关作用研究, 进一步了解乳酸杆菌抑制p38MAPK磷酸化的机制, 并能由此继续探讨乳酸杆菌有益作用的分子生物学机制.

4 参考文献

1 Wagner S, Beil W, Westermann J, Logan RP, Bock CT, Trautwein C, Bleck JS, Manns MP. Regulation of gastric epithelial cell growth by *Helicobacter pylori*: offdence for a major role of apoptosis. *Gastroenterology* 1997; 113: 1836-1847

2 Wu YY, Tsai HF, Lin WC, Chou AH, Chen HT, Yang JC, Hsu PI, Hsu PN. Helicobacter pylori enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in human gastric epithelial cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2334-2339

3 Fan X, Crowe SE, Behar S, Gunasena H, Ye G, Haeberle H, Van Houten N, Gourley WK, Ernst PB, Reyes VE. The effect of class II major histocompatibility complex expression on adherence of *Helicobacter pylori* and induction of apoptosis in gastric epithelial cells: a mechanism for T helper cell type 1-mediated damage. *J Exp Med* 1998; 187: 1659-1669

4 Bland DA, Suarez G, Beswick EJ, Sierra JC, Reyes VE. H pylori receptor MHC class II contributes to the dynamic gastric epithelial apoptotic response. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4689-4693

5 Suzuki H, Seto K, Mori M, Suzuki M, Miura S, Ishii H. Monochloramine induced DNA fragmentation in gastric cell line MKN45. *Am J Physiol* 1998; 275: G712-G716

6 Shirin H, Sordillo EM, Oh SH, Yamamoto H, Delohery T, Weinstein IB, Moss SF. *Helicobacter pylori* inhibits the G1 to S transition in AGS gastric epithelial cells. *Cancer Res* 1999; 59: 2277-2281

7 Jones NL, Day AS, Jennings HA, Sherman PM. *Helicobacter pylori* induces gastric epithelial cell apoptosis in association with increased Fas receptor expression. *Infect Immun* 1999; 67: 4237-4242

8 Kim JM, Kim JS, Jung HC, Song IS, Kim CY. Apoptosis of human gastric epithelial cells via caspase-3 activation in response to *Helicobacter pylori* infection: possible involvement of neutrophils through tumor necrosis factor alpha and soluble Fas ligands. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 40-48

9 Houghton J, Macera-Bloch LS, Harrison L, Kim KH, Korah RM. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta up-regulate gastric mucosal Fas antigen expression in *Helicobacter pylori* infection. *Infect Immun* 2000; 68: 1189-1195

10 Fan X, Gunasena H, Cheng Z, Espejo R, Crowe SE, Ernst PB, Reyes VE. *Helicobacter pylori* urease binds to class II MHC on gastric epithelial cells and induces their apoptosis. *J Immunol* 2000; 165: 1918-1924

11 Igarashi M, Kitada Y, Yoshiyama H, Takagi A, Miwa T, Koga Y. Ammonia as an accelerator of tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis of gastric epithelial cells in *Helicobacter pylori* infection. *Infect Immun* 2001; 69: 816-821

12 Kuck D, Kolmerer B, Iking-Konert C, Krammer PH, Stremmel W, Rudi J. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS. *Infect Immun* 2001; 69: 5080-5087

13 Zhang ZW, Dorrell N, Wren BW, Farthingt MJ. *Helicobacter pylori* adherence to gastric epithelial cells: a role for non-adhesin virulence genes. *J Med Microbiol* 2002; 51: 495-502

14 Zhang ZW, Patchett SE, Farthing MJ. Role of *Helicobacter pylori* and p53 in regulation of gastric epithelial cell cycle phase progression. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 987-995

15 Slomiany BL, Slomiany A. Disruption in gastric mucin synthesis by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide involves ERK and p38 mitogen-activated protein kinase participation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294: 220-224

16 Bagchi D, McGinn TR, Ye X, Bagchi M, Krohn RL, Chatterjee A, Stohs SJ. *Helicobacter pylori*-induced oxidative stress and DNA damage in a primary culture of human gastric mucosal cells. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 1405-1412

17 Slomiany BL, Piotrowski J, Slomiany A. Up-regulation of endothelin-converting enzyme-1 in gastric mucosal inflammatory responses to *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 267: 801-805

18 Kawahara T, Teshima S, Kuwano Y, Oka A, Kishi K, Rokutan K. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide induces apoptosis of cultured guinea pig gastric mucosal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G726-G734

19 Bhattacharyya A, Pathak S, Datta S, Chattopadhyay S, Basu J, Kundu M. Mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB regulate *Helicobacter pylori*-mediated interleukin-8 release from macrophages. *Biochem J* 2002; 368: 121-129

20 Cruchet S, Obregon MC, Salazar G, Diaz E, Gotteland M. Effect of the ingestion of a dietary product containing Lactobacillus johnsonii La1 on *Helicobacter pylori* colonization in children. *Nutrition* 2003; 19: 716-721

21 Pantoflickova D, Corthesy-Theulaz I, Dorta G, Stolte M, Isler P, Rochat F, Enslen M, Blum AL. Favourable effect of regular intake of fermented milk containing Lactobacillus johnsonii on *Helicobacter pylori* associated gastritis. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 805-813

22 Sheu BS, Wu JJ, Lo CY, Wu HW, Chen JH, Lin YS, Lin MD. Impact of supplement with Lactobacillus- and Bifidobacterium-containing yogurt on triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 1669-1675

23 Sun WH, Ou XL, Cao DZ, Yu Q, Yu T, Hu JM, Zhu F, Sun YL, Fu XL, Su H. Efficacy of omeprazole and amoxicillin with either clarithromycin or metronidazole on eradication of *Helicobacter pylori* in Chinese peptic ulcer patients. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2477-2481

24 Armuzzi A, Cremonini F, Bartolozzi F, Canducci F, Candelli M, Ojetti V, Cammarota G, Anti M, De Lorenzo A, Pola P, Gasbarrini G, Gasbarrini A. The effect of oral administration of Lactobacillus GG on antibiotic-associated gastrointestinal side-effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 163-169

25 Mukai T, Asasaka T, Sato E, Mori K, Matsumoto M, Ohori H. Inhibition of binding of *Helicobacter pylori* to the glycolipid receptors by probiotic Lactobacillus reuteri. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; 32: 105-110

26 Oh Y, Osato MS, Han X, Bennett G, Hong WK. Folk yoghurt kills *Helicobacter pylori*. *J Appl Microbiol* 2002; 93: 1083-1088

27 Aiba Y, Suzuki N, Kabir AM, Takagi A, Koga Y. Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter*

■名词解释

p38MAPK: p38有丝分裂原活化蛋白激酶, 是有丝分裂原活化蛋白激酶家族的一员, 分子量为38 kDa, 应激、多种炎症介质和细胞因子及LPS等通过各种信号途径使p38MAPK磷酸化, P-p38MAPK可转移进入细胞核, 磷酸化多种转录因子, 作用涉及细胞因子的生成、细胞的生长发育、增殖分化和凋亡等.

■同行评价
本研究所做的工作在体外水平证实了*H pylori* SS1-LPS可诱导SGC-7901细胞凋亡, 并对其机制在已有的实验数据基础上进行了推测, 具有一定的学术意义.

pylori by the oral administration of Lactobacillus salivarius as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 2097-2101
28 Yan F, Polk DB. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 50959-50965
29 Tao Y, Drabik KA, Waypa TS, Musch MW, Alverdy JC, Schneewind O, Chang EB, Petrof EO. Soluble factors from Lactobacillus GG activate MAPKs and induce cytoprotective heat shock proteins in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290: C1018-C1030
30 Resta-Lenert S, Barrett KE. Probiotics and commensals reverse TNF-alpha- and IFN-gamma-induced dysfunction in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2006; 130: 731-746

电编 李琪 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

第十九届全国中西医结合消化会议征文通知

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

1 征文内容和要求

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

2 学习班招收对象

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

3 联系方式

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月18日; 15(8): 813-819
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

脂质体介导核因子-κB诱捕物寡聚脱氧核苷酸对重症急性胰腺炎大鼠胰腺炎症因子mRNA表达和胰腺损伤的影响

钟荣德, 周 杰, 廖柳清, 符方勇, 李湘竑, 林艺雄

钟荣德, 周杰, 符方勇, 李湘竑, 林艺雄, 广州市南方医科大学南方医院肝胆血管外科 广东省广州市 510515
廖柳清, 增城市妇幼保健院 广东省广州市 511300
钟荣德, 医学硕士, 主要从事肝胆、胰脾系统疾病的临床及基础研究.
广东省自然科学基金项目, No. 32859
通讯作者: 周杰, 510515, 广东省广州市广州大道北1838号, 广州市南方医科大学南方医院肝胆血管外科.
jacky@fimmu.edu.cn
电话: 020－61641701
收稿日期: 2006-09-28 接受日期: 2007-01-04

Effect of liposome-mediated nuclear factor κB decoy oligodeoxynucleotide on the mRNA expression of inflammatory factors and injury of pancreas in rats with severe acute pancreatitis

Rong-De Zhong, Jie Zhou, Liu-Qing Liao, Fang-Yong Fu, Xiang-Hong Li, Yi-Xiong Lin

Rong-De Zhong, Jie Zhou, Fang-Yong Fu, Xiang-Hong Li, Yi-Xiong Lin, Department of Hapetobiliary and Vascular Surgery, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China
Liu-Qing Liao, Zengcheng Hospital of Maternal and Child Health Care, Guangzhou 511300, Guangdong Province, China
Supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 32859
Correspondence to: Dr. Jie Zhou, Department of Hapetobiliary and Vascular Surgery, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. jacky@fimmu.edu.cn
Received: 2006-09-28 Accepted: 2007-01-04

Abstract

AIM: To investigate the influences of liposome-mediated nuclear factor κB (NF-κB) decoy oligodeoxynucleotide (ODN) on the NF-κB activation, inflammatory factor mRNA expression and pancreatic injury in rats with severe acute pancreatitis (SAP).

METHODS: Except for those in sham operation group, the rest rats were injected with sodium taurocholate to establish the model of SAP, and then intravenously injected with naked ODN, liposome/decoy ODN complexes, liposome/scrambled ODN complexes, and normal saline, respectively, 1 hour later. Four hours after injection, the NF-κB activity was analyzed by electrophoretic mobility shift assay (EMSA), and the mRNA expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), interleukin-1α (IL-1α), IL-2, tumor necrosis factor-α (TNF-α) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) were assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Meanwhile, the serum amylase level, pancreatic wet/dry weight ratio and myeloperoxidase (MPO) content were detected.

RESULTS: The NF-κB activity and its related inflammatory factors were observably inhibited in liposome/decoy ODN group as compared with those in normal saline group, liposome/scrambled ODN group and naked ODN group (NF-κB activation: $P < 0.05$; ICAM-1: 0.75 ± 0.13 *vs* 1.39 ± 0.15, 1.37 ± 0.16, 1.32 ± 0.17, all $P < 0.05$; IL-1α: 0.64 ± 0.09 *vs* 1.34 ± 0.20, 1.30 ± 0.14, 1.25 ± 0.20, all $P < 0.05$; IL-2: 0.23 ± 0.08 *vs* 0.74 ± 0.13, 0.71 ± 0.12, 0.69 ± 0.14, all $P < 0.05$; TNF-α: 0.41 ± 0.13 *vs* 1.30 ± 0.17, 1.26 ± 0.17, 1.23 ± 0.20, all $P < 0.05$; VCAM-1: 0.21 ± 0.06 *vs* 0.68 ± 0.13, 0.69 ± 0.15, 0.63 ± 0.13, all $P < 0.05$). In comparison with normal saline, liposome/scrambled ODN and naked ODN group, the level of serum amylase, the ratio of pancreaic wet/dry weight, and the MPO content of pancreatic tissues in liposome/decoy ODN group were remarkably decreased (amylase: 50931.85 ± 22432.15 nkat/L *vs* 188024.26 ± 38659.56, 188412.68 ± 37988.26, 183119.95 ± 33636.23 nkat/L, $P < 0.05$; wet/dry weight ration: 5.76 ± 0.20 *vs* 6.77 ± 0.18, 6.72 ± 0.18, 6.35 ± 0.12, $P < 0.05$; MPO: 46.68 ± 3.00 nkat/g *vs* 99.02 ± 2.50, 98.19 ± 2.83, 98.52 ± 2.50 nkat/g, $P < 0.05$).

CONCLUSION: NF-κB decoy ODN is effective in alleviating pancreatic injury during SAP through suppressing the activation of NF-κB and mRNA expression of ICAM-1, IL-1α, IL-2, TNF-α and VCAM-1.

■背景资料
重症急性胰腺炎是常见危重疾病之一, 并发症多, 死亡率高, 仍然是临床上的一大难题, 虽然生长抑素和生长激素在治疗急性胰腺炎上取得了明显的疗效, 但是其作用机制仍然不明确, 是否推广应用仍存在争议. 脂质体已广泛的用作载体进行各方面的研究和疾病的治疗, 转染人工合成的NF-κB结合位点寡聚脱氧核苷酸(ODN)可有效的抑制其调控的下游因子.

■应用要点
核转录因子NF-κB是炎症反应的关键角色. 因此, 脂质体转染人工合成的NF-κB结合位点寡聚脱氧核苷酸(ODN)为研究重症急性胰腺炎提供了可以利用的新的基因治疗策略.

Key Words: Liposome; Nuclear factor-κB; Severe acute pancreatitis; Decoy; Pancreatic injury; Electrophoretic mobility shift assay; Reverse transcription-polymerase chain reaction

Zhong RD, Zhou J, Liao LQ, Fu FY, Li XH, Lin YX. Effect of liposome-mediated nuclear factor κB decoy oligodeoxynucleotide on the mRNA expression of inflammatory factors and injury of pancreas in rats with severe acute pancreatitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(8):813-819

摘要

目的: 探讨脂质体(liposome)介导核因子-κB (nuclear factor κB, NF-κB)诱捕物(decoy)寡聚脱氧核苷酸(ODN)对重症急性胰腺炎大鼠胰腺NF-κB活性及受其调控炎症因子基因mRNA表达和胰腺损伤的影响.

方法: 除假手术组(n = 10)外, 其余SD大鼠以牛磺胆酸钠(STC)诱导建立重症急性胰腺炎模型后, 分别于建模后1 h静脉注射裸ODN(n = 10)、脂质体/decoy ODN复合物(n = 10)、脂质体/scrambled ODN复合物(n = 10)和生理盐水(n = 10), 注射4 h后应用电泳迁移率变动分析(EMSA) NF-κB的活性, 利用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测胰腺组织ICAM-1, IL-1α, IL-2, TNF-α, VCAM-1 mRNA表达, 同时检测血淀粉酶、胰腺组织湿/干重比率和胰腺组织髓过氧化物酶(MPO).

结果: EMSA显示, 脂质体/decoy ODN复合物组NF-κB活性明显低于生理盐水组、脂质体/scrambled ODN复合物组和裸ODN组, 均有显著性差异(P<0.05). RT-PCR结果显示, 脂质体/decoy ODN复合物组ICAM-1, IL-1α, IL-2, TNF-α和VCAM-1 mRNA表达低于生理盐水组、脂质体/scrambled ODN复合物组和裸ODN组, 均有显著性差异(ICAM-1: 0.75±0.13 *vs* 1.39±0.15, 1.37±0.16, 1.32±0.17, P<0.05; IL-1α: 0.64±0.09 *vs* 1.34±0.20, 1.30±0.14, 1.25±0.20, P<0.05; IL-2: 0.23±0.08 *vs* 0.74±0.13, 0.71±0.12, 0.69±0.14, P<0.05; TNF-α: 0.41±0.13 *vs* 1.30±0.17, 1.26±0.17, 1.23±0.20, P<0.05; VCAM-1: 0.21±0.06 *vs* 0.68±0.13, 0.69±0.15, 0.63±0.13, P<0.05). 与生理盐水组、脂质体/scrambled ODN复合物组和裸ODN组相比, 脂质体/decoy ODN复合物组淀粉酶、胰腺组织湿/干重比率和胰腺组织MPO活性显著性降低(淀粉酶: 50931.85±22432.15 nkat/L *vs* 188024.26±38659.56, 188412.68±37988.26, 183119.95±33636.23 nkat/L, all P<0.05; 湿/干重比率: 5.76±0.20 *vs* 6.77±0.18, 6.72±0.18, 6.35±0.12, P<0.05; MPO活性: 46.68±3.00 nkat/g *vs* 99.02±2.50, 98.19±2.83, 98.52±2.50 nkat/g, P<0.05).

结论: NF-κB decoy ODN可特异性抑制胰腺NF-κB活性及其调控的炎症因子ICAM-1, IL-1α, IL-2, TNF-α和VCAM-1 mRNA的表达, 减轻胰腺损害.

关键词: 脂质体; 核转录因子; 重症急性胰腺炎; 诱捕物; 胰腺损伤; 电泳迁移率变动分析; 逆转录-聚合酶链反应

钟荣德, 周杰, 廖柳清, 符方勇, 李湘竑, 林艺雄. 脂质体介导核因子-κB诱捕物寡聚脱氧核苷酸对重症急性胰腺炎大鼠胰腺炎症因子mRNA表达和胰腺损伤的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(8):813-819
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/813.asp

0 引言

重症急性胰腺炎(SAP)导致患者早期死亡的主要原因是严重的炎症反应. SAP及其伴发的急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、多器官功能不全综合症(MODS)与多种细胞因子的作用有关[1-2], 然而促炎性细胞因子、趋化因子、黏附因子等基因的活化和表达均受到核转录因子(NF-κB)调控[3-5]. 转染人工合成的NF-κB结合位点寡聚脱氧核苷酸(ODN)可有效的抑制其调控这些因子. 由于脂质体结构与细胞膜类似, 无副作用, 无免疫原性, 可生物降解, 使用方便等优点, 已广泛的用作载体进行各方面的研究和疾病的治疗, 如药物载体、基因介导等治疗感染性疾病、心血管疾病和皮肤疾病等[6-7]. 因此, 脂质体与寡聚脱氧核苷酸相结合阻断NF-κB对下游基因的调控无疑是一条研究治疗SAP器官损伤的新途径.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂洁级健康SD大鼠50只, 体质量300-400 g, 购自南方医院动物实验中心. 引物和ODN由上海生工生物工程有限公司合成和全硫代修饰, NF-κB decoy ODN: 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3'; 3'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5', Scrambled ODN: 5'-TTG CCG TAC CTG ACT TAG CCG T-3'; 3'-AAC GGC ATG GAC TGA ATC GGC A-5'[8]. 牛磺胆酸钠(Sodium taurocholate, STC), 购自Sigma公司. EMSA试剂盒, 购自Promega公司. *In vivo* GeneShuttle™ Transfection Reagent[9-11], 购自Qbiogene公司. RT-PCR试剂盒购自Fermentas. Tri

表 1 大鼠引物序列(5'-3')

引物	有意义链	反意义链	大小(bp)
IL-1α	CTAAGAACTACTTCACATCCGCA	CTGGAATAAAACCCACTGAGGTAGG	623
IL-2	TCAACAGCGCACCCACTTCAAG	GTTGAGATGATGCTTTGACAGA	403
TNF-α	TACTGAACTTCGGGGTGATTGGTCC	CAGCCTTGTCCCTTGAAGAGAACC	295
ICAM-1	GGGTTGGAGACTAACTGGA	CCTCTGGCGGTAATAGGTG	201
VCAM-1	TTGGCTCCTGATGTTTACCC	GCACCCTCATGTAGCCTTGT	308
β-actin	TTGTAACCAACTGGGACGATATGG	GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG	764

■同行评价
本文探讨了脂质体介导NF-κB decoy ODN对重症急性胰腺炎大鼠胰腺炎症因子mRNA表达和胰腺损伤的影响, 文章有深度, 设计合理, 有较高的理论价值.

Reagent Ls购自美国MRC. 大鼠引物系列见表1.

1.2 方法

1.2.1 脂质体/ODN复合物配制 参考*In vivo* GeneShuttle™ Transfection Reagent说明书进行配制, 脂质体/ODN复合物A_{400}值为0.8, 含ODN浓度为50 g/L. 裸ODN的浓度同样为50 g/L.

1.2.2 SAP模型制作 50 g/L戊巴比妥钠溶液0.1 mL/kg ip麻醉, 在无菌操作下行腹正中切口切开SD大鼠腹部, 结扎胆总管末端, 于肝门处肝近端穿绕丝线, 扎紧插入胆总管内的3号输液针头, 继而于胆总管内缓慢注射药物50 g/L STC 1 mL/kg速度0.25 mL/min, 然后撤除输液针头和丝线, 缝合腹部切口.

1.2.3 实验分组 假手术对照组为开腹翻动胰腺, 未作任何处理组; SAP模型分为裸ODN组、生理盐水组、脂质体/scrambled ODN复合物组、脂质体/decoy ODN复合物组. 脂质体/ODN复合物1 mL, 裸ODN 1 mL, 生理盐水1 mL, 分别于SAP模型建立后1 h经尾静脉注射. 各组均在注射4 h后抽取血标本和切取胰腺组织. 在腹主动脉抽取血样本进行淀粉酶检测, 由南方医院检验科检测.

1.2.4 胰腺组织湿/干重比值测定 取大鼠胰腺固定部位大约100 g, 称取湿重W1, 65℃烘箱烘烤24 h, 再称干重W2, W1/W2即为湿/干比值.

1.2.5 胰腺髓过氧化物酶(MPO)活性测定 取胰腺组织约100 mg, 加5 g/L HTAB 2 mL制备匀浆, 反复冻融3次并超声粉碎(10 s, 3次), 4℃ 40 000 *g*离心30 min, 取上清0.1 mL加反应液2.9 mL, 保持温度于25℃, 立即在分光光度计460 nm波长下进行2 min的扫描, 记录第30 s和第90 s的光密度差值, 以此1 min内吸光度的变化代表酶活力的改变, 酶的活力可反应中性白细胞的数目.

1.2.6 电泳迁移率变动分析法(EMSA)检测NF-κB活性[12] 核蛋白抽提, 取冰冻保存的胰腺标本100 mg先用预冷的PBS液洗涤3次, 吸干水分, 以下操作全部在4℃冰浴下进行: 加入Buffer A 1 mL [10 mmol/L Hepes-NaOH (pH7.8); 15 mmol/L KCl; 1 mmol/L $MgCl_2$; 0.1 mmol/L EDTA; 1 mmol/L DTT; 1 mmol/L PMSF; 1 μg/L leupeptin; 1 mg/L pepstatin]混匀, 剪碎匀浆, 把匀浆移至1.5 mL EP管中加入100 g/L NP-40 100 μL, 涡动1 min, 10 000 *g*、4℃离心1 min, 仔细弃全部上清, 加入Buffer B 1 mL [20 mmol/L Hepes-NaOH (pH7.9); 1.5 mmol/L $MgCl_2$; 0.42 mol/L NaCl; 0.2 mmol/L EDTA; 250 g/L甘油; 0.5 mmol/L DTT; 0.5 mmol/L PMSF; 1 mg/L Leupeptin; 1 mg/L pepstatin; 1 mg/L Aprotinin]混悬, 4℃冰浴30 min, 间隔搅拌, 12 000 *g*、4℃离心4 min, 吸取上清, 分装, -70℃保存. 核蛋白定量, 用Bradford酶标仪蛋白定量法测定核蛋白浓度. 探针标记、纯化、探针与核蛋白的结合及电泳, 按照EMSA试剂盒说明进行. 显影、图像分析用保鲜膜包好, 暗室内压片, -70℃过夜后, 显影. 凝胶成像系统分析X胶片上的滞后条带.

1.2.7 凝胶电泳迁移率竞争性试验检验NF-κB与DNA结合的特异性 即在EMSA探针与核蛋白的结合及电泳过程中加入两组竞争性对照, 一组在反应系中加入100倍特异性标记的探针, 另一组加入100倍非特异性未标记的SP1探针, 其余步骤同EMSA.

1.2.8 RT-PCR方法检测胰腺组织mRNA表达用Tri Reagent Ls提取总RNA, RT-PCR试剂盒行PCR. PCR反应条件为: 94℃预变性2 min, 94℃ 30 s, 50-60℃ 30-45 s, 72℃ 30-45 s, 扩增25-35个循环, 72℃延伸7 min. 将PCR产物5 μL在15 g/L琼脂糖凝胶中电泳, 在紫外灯下观查、照相, 然后用凝胶图象扫描仪测算每条带的光密度值与β-actin光密度值之比表示每个样本mRNA的表达水平.

统计学处理 采用SPSS13.0进行方差齐性检验、单因数方差分析和LSD法两两比较(显著性

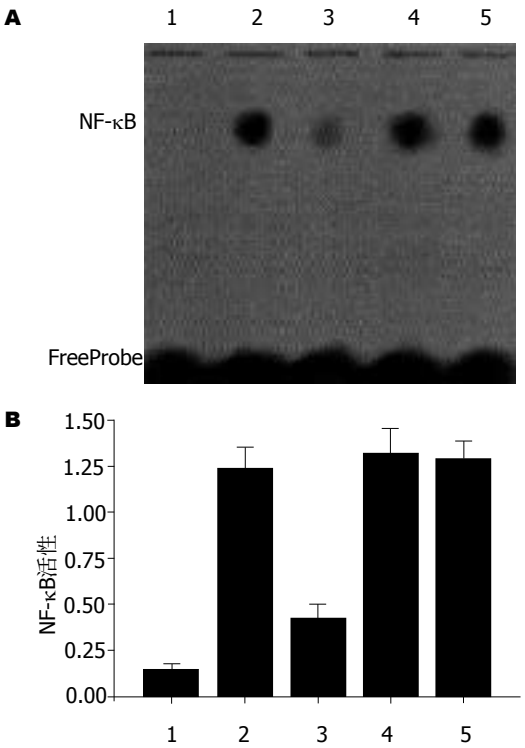


图 1 NF-κB的活性. 1: 假手术对照组; 2: 裸ODN组; 3: 脂肪/decoy ODN复合物组; 4: 脂质体/scrambled ODN复合物; 5: 生理盐水组; 3与1、2、4、5相比差异有统计学意义(P<0.05); 2与4、5相比差异无统计学意义(P>0.05).

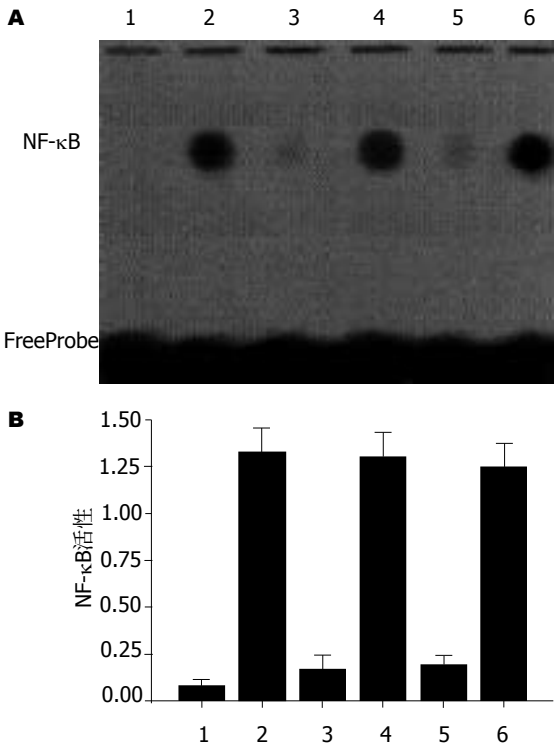


图 2 NF-κB decoy ODN与NF-κB结合的特异性. 1: 对照组(无核蛋白); 2: 生理盐水(有核蛋白); 3: 核蛋白加100倍特异性探针; 4: 核蛋白加100倍非特异性; 5: 核蛋白加decoy ODN; 6: 核蛋白加scrambled ODN; 5与2、4、6相比差异有统计学意义(P<0.05), 与1、3相比差异无统计学意义(P>0.05).

水准α = 0.05). 全部数据以均数±标准差(mean ±SD)表示, 以P<0.05为差异有显著性.

2 结果

2.1 淀粉酶、胰腺组织湿/干重比值、MPO活性 脂质体/decoy ODN复合物组淀粉酶、胰腺组织湿/干重比值和MPO活性与假手术对照组、生理盐水组、脂质体/scrambled ODN复合物组和裸ODN组均有显著性差异(P<0.05). 裸ODN组淀粉酶、胰腺组织湿/干重比值和MPO活性与生理盐水组和脂质体/scrambled ODN复合物组相比无显著性差异(P>0.05)(表2).

2.2 NF-κB decoy ODN对NF-κB活性的影响和NF-κB与DNA结合的特异性的检测 EMSA显示脂质体/decoy ODN复合物组NF-κB活性受到明显抑制, 与假手术对照组比较仍有显著性差异(P<0.05). 生理盐水组、脂质体/scrambled ODN复合物组和裸ODN组NF-κB活性均处于活化状态, 裸ODN组NF-κB活性与生理盐水组和脂质体/scrambled ODN复合物组比较无显著性差异(P>0.05)(图1). 细胞的核蛋白与特异性探针反应后, NF-κB与DNA的结合活性被抑制; 与非特异性SP1探针反应后, NF-κB与DNA的结合活性则不被抑制(图2).

2.3 炎症基因mRNA表达的变化 脂质体/decoy ODN复合物组ICAM-1, IL-1α, TNF-α mRNA的表达与假手术对照组、生理盐水组、脂质体/scrambled ODN复合物组和裸ODN组有显著性差异(P<0.05); IL-2, VCAM-1 mRNA的表达与假手术对照组相比无显著性差异(P>0.05), 与生理盐水组、脂质体/scrambled ODN复合物组和裸ODN组相比有显著性差异(P<0.05). 裸ODN组ICAM-1, IL-1α, IL-2, TNF-α, VCAM-1 mRNA的表达与生理盐水组和脂质体/scrambled ODN复合物组相比无显著性差异(P>0.05, 图3, 表3)

3 讨论

目前普遍认为, SAP时, 异常激活的胰酶在引起胰腺细胞本身损伤的同时, 引起局部及全身炎症反应, 致使炎症介质被大量释放, 导致集体过度的炎症反应(即所谓“瀑布样效应”), 这些炎性介质促成了全身炎症反应综合症(SIRS), 继而引起多器官功能损害, 是导致患者死亡的主要原因. 为何腹部的其他炎症(如急性阑尾炎等)极少并发SIRS, 而胰腺炎往往会合并如此严重

表 2 淀粉酶、胰腺组织湿/干重比值、MPO活性(mean ± SD)

分组	淀粉酶(nkat/L)	胰腺组织湿/干重比值	MPO活性(nkat/g)
假手术对照组	16 604.99±4126.66	5.36±0.11	17.00±2.00
裸ODN组	183 119.95±33 636.23	6.35±0.12	98.52±2.50
脂质体/decoy ODN复合物组	50 931.85±22 432.15	5.76±0.20	46.68±3.00
脂质体/scrambled ODN复合物组	188 412.68±37 988.26	6.72±0.18	98.19±2.83
生理盐水组	188 024.26±38 659.56	6.77±0.18	99.02±2.50

表 3 各组炎症基因mRNA的表达(mean ± SD)

	假手术对照组	裸ODN组	脂质体/decoy ODN复合物组	脂质体/scrambled ODN复合物组	生理盐水组
ICAM-1	0.47±0.14	1.32±0.17	0.75±0.13	1.37±0.16	1.39±0.15
IL-1α	0.40±0.13	1.25±0.20	0.64±0.09	1.30±0.14	1.34±0.20
IL-2	0.11±0.02	0.69±0.14	0.23±0.08	0.71±0.12	0.74±0.13
TNF-α	0.20±0.11	1.23±0.20	0.41±0.13	1.26±0.17	1.30±0.17
VCAM-1	0.09±0.02	0.63±0.13	0.21±0.06	0.69±0.15	0.68±0.13

的SIRS呢? 核转录因子NF-κB在胰腺炎发展中所起的作用逐渐引人关注[13].

核转录因子NF-κB是由可诱导的3个亚基组成的复合物, 3个亚基分别为转录因子二聚体(p50和p65)和抑制亚基Ⅰ-κB. NF-κB由于ⅠκB的抑制作用主要以非活性形态存在于细胞质. 转录因子NF-κB在许多领域受到研究者的关注基于以下的几点: 罕见和快速的调节性, 控制的基因范围广, 在免疫过程处于中枢的角色, 亚基的复杂性和牵涉若干个疾病. 控制NF-κB的基本水平是通过与抑制蛋白ⅠκB的相互作用. 最近的证据证实了不同机制调节NF-κB的I κB多样形态存在. NF-κB可以被脂肪酶、脂多糖或者炎症细胞因子激活例如TNF、IL-1、病毒感染、某一个病毒基因产物的表达、紫外线照射、B或T细胞活化、其他生理学的和非生理学的刺激物. NF-κB激活转移至细胞核是通过ⅠκB定向磷酸化、降解, 与NF-κB解离进行的. NF-κB一旦转入细胞核即结合同族DNA序列和激活特异靶基因转录, 大多数是编码免疫和炎症的重要蛋白. NF-κB/Rel因子控制大范围的基因表达, 例如编码免疫球蛋白、细胞因子、化学增活素、干扰素、主要组织相容性复合物蛋白质、生长因子、细胞黏附分子. NF-κB可与许多基因的启动子结合, 包括炎症应答例如ICAM-1、E-选择蛋白、VCAM、TNF-α、IL-1、IL-2、IL-6、IL-8、COX 2和iNOS[14-19]. 因此, 核转录因子NF-κB是炎症反应的关键角色. 转染人工合成与NF-κB结合位点具高度亲和力的寡聚脱氧核苷酸也就是诱捕物寡核苷酸(decoy ODN)已被认为是基因治疗策略的有效工具, 并应用于心肌梗塞和肾小球肾炎等许多相关的疾病, 可导致特异性的抑制效果, 无非特异性的细胞毒性[20-21]. 此实验的脂质体/decoy ODN复合物组也提示decoy ODN对重症急性胰腺炎SD大鼠胰腺NF-κB的活性有特异性的抑制效果. NF-κB的活性被有效抑制后, 其控制的下游炎症因子ICAM-1、IL-1α、IL-2、TNF-α、VCAM-1的表达也相应被抑制. 由于相应的炎症因子被抑制后, 胰腺损伤也明显改善, 表现为淀粉酶明显下降、胰腺水肿减轻如胰腺组织湿/干重比率降低和炎症减轻、中性白细胞的数目侵润减少如胰腺组织髓过氧化物酶(MPO)降低等.

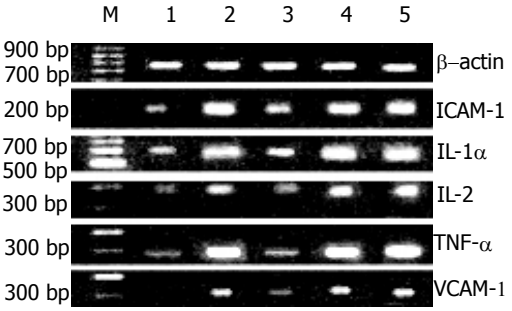


图 3 各组炎症基因mRNA的表达. M: 为Marker; 1: 假手术组; 2: 裸ODN组; 4: 脂质体/scrambled ODN复合物组; 5: 生理盐水组.

脂质体在1960年代被英国Bangham *et al*[22]

发现, 1970年代Gregoriadis *et al*[23]依据脂质体的特点, 首次提出应用脂质体作为β-半乳糖苷酶载体治疗糖原积累疾病. 经过长期多方面的研究显示脂质体具有减少药物剂量毒性、降低副作用; 改善被包裹药物的化学稳定性, 增加药物在肿瘤的积聚, 延缓药物的暴露时间; 传递基因; 增强寡脱氧核苷酸抵抗核酸酶的能力, 延长半衰期, 提高在靶细胞的摄取等优点[24-27], 人们开始应用脂质体作为载体进行各方面的研究和疾病的治疗, 如药物载体、基因介导、以及治疗感染性疾病、心血管疾病和皮肤疾病等[6-7]. 脂质体诱导反义寡核苷酸在胃癌、胰腺癌、肝癌的研究也正在蓬勃发展[28-31]. 随着脂质体诱导治疗安全性和效率的提高已经在药物治疗领域取得成功[32]. *In vivo* GeneShuttle™ Transfection Reagent是一种新型的阳离子脂质体转染试剂, 极大的提高了体内的转染效率, 其转染效果与病毒载体相近[9-11]. 在此实验显示, ODN经脂质体介导能较好的在重症急性胰腺炎SD大鼠胰腺转染并达到治疗胰腺炎的目的, 不经脂质体转染的裸ODN只有少量到达胰腺未达到治疗胰腺炎的目的.

总之, 核转录因子NF-κB是炎症反应的关键角色, 脂质体可以有效的转染NF-κB decoy ODN进入体内抑制其活性, 无任何毒性作用. 脂质体转染人工合成寡聚脱氧核苷酸为研究重症急性胰腺炎提供了可以利用的新的基因治疗策略.

4 参考文献

1 Denham W, Norman J. The potential role of therapeutic cytokine manipulation in acute pancreatitis. *Surg Clin North Am* 1999; 79: 767-781

2 Karne S, Gorelick FS. Etiopathogenesis of acute pancreatitis. *Surg Clin North Am* 1999; 79: 699-710

3 Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 141-179

4 Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 1995; 9: 899-909

5 Brand K, Page S, Walli AK, Neumeier D, Baeuerle PA. Role of nuclear factor-kappa B in atherogenesis. *Exp Physiol* 1997; 82: 297-304

6 Kita Y, Tanaka T, Yoshida S, Ohara N, Kaneda Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Takai H, Okada C, Fukunaga Y, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Inoue Y, Takemoto Y, Naito M, Yamada T, Matsumoto M, McMurray DN, Cruz EC, Tan EV, Abalos RM, Burgos JA, Gelber R, Skeiky Y, Reed S, Sakatani M, Okada M. Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine* 2005; 23: 2132-2135

7 Aleshin AN, Sawa Y, Kitagawa-Sakakida S, Bando Y, Ono M, Memon IA, Tohyama M, Ogawa S, Matsuda H. 150-kDa oxygen-regulated protein attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 38: 517-525

8 Vos IH, Govers R, Grone HJ, Kleij L, Schurink M, De Weger RA, Goldschmeding R, Rabelink TJ. NFkappaB decoy oligodeoxynucleotides reduce monocyte infiltration in renal allografts. *FASEB J* 2000; 14: 815-822

9 Templeton NS, Lasic DD, Frederik PM, Strey HH, Roberts DD, Pavlakis GN. Improved DNA: liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression. *Nat Biotechnol* 1997; 15: 647-652

10 Gaensler KM, Tu G, Bruch S, Liggitt D, Lipshutz GS, Metkus A, Harrison M, Heath TD, Debs RJ. Fetal gene transfer by transuterine injection of cationic liposome-DNA complexes. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 1188-1192

11 Templeton NS, Lasic DD. New directions in liposome gene delivery. *Mol Biotechnol* 1999; 11: 175-180

12 王勇, 黄文华. 一种改进的核转录因子的电泳迁移率改变分析法. 第三军医大学学报 2001; 23: 119-120

13 Vaquero E, Gukovsky I, Zaninovic V, Gukovskaya AS, Pandol SJ. Localized pancreatic NF-kappaB activation and inflammatory response in taurocholate-induced pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G1197-G1208

14 Chen X, Ji B, Han B, Ernst SA, Simeone D, Logsdon CD. NF-kappaB activation in pancreas induces pancreatic and systemic inflammatory response. *Gastroenterology* 2002; 122: 448-457

15 Rakonczay Z Jr, Jarmay K, Kaszaki J, Mandi Y, Duda E, Hegyi P, Boros I, Lonovics J, Takacs T. NF-kappaB activation is detrimental in arginine-induced acute pancreatitis. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 696-709

16 Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 649-683

17 Chen Z, Hagler J, Palombella VJ, Melandri F, Scherer D, Ballard D, Maniatis T. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 1995; 9: 1586-1597

18 Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D, Miyamoto S. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* 1995; 9: 2723-2735

19 Li X, Massa PE, Hanidu A, Peet GW, Aro P, Savitt A, Mische S, Li J, Marcu KB. IKKalpha, IKKbeta, and NEMO/IKKgamma are each required for the NF-kappa B-mediated inflammatory response program. *J Biol Chem* 2002; 277: 45129-45140

20 Tomita N, Morishita R, Lan HY, Yamamoto K, Hashizume M, Notake M, Toyosawa K, Fujitani B, Mu W, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC, Kaneda Y, Higaki J, Ogihara T. In vivo administration of a nuclear transcription factor-kappaB decoy suppresses experimental crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 1244-1252

21 Yeh SH, Lin CH, Lee CF, Gean PW. A requirement of nuclear factor-kappaB activation

in fear-potentiated startle. *J Biol Chem* 2002; 277: 46720-46729
22 Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 1965; 13: 238-252
23 Gregoriadis G, Ryman BE. Liposomes as carriers of enzymes or drugs: a new approach to the treatment of storage diseases. *Biochem J* 1971; 124: 58
24 Langner M, Kral TE. Liposome-based drug delivery systems. *Pol J Pharmacol* 1999; 51: 211-222
25 Kaneda Y. Virosomes: evolution of the liposome as a targeted drug delivery system. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 43: 197-205
26 Dass CR. Liposome-mediated delivery of oligodeoxynucleotides *in vivo*. *Drug Deliv* 2002; 9: 169-180
27 Park JW, Benz CC, Martin FJ. Future directions of liposome- and immunoliposome-based cancer therapeutics. *Semin Oncol* 2004; 31: 196-205
28 俞丽芬, 吴云林, 乔敏敏, 钟捷, 涂水平. Stat3反义寡核苷酸对人胃腺癌MKN45细胞相关信号传导影响的研究. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1527-1530
29 王亚利, 宋天保, 王西京, 王中卫, 宋潍, 郝小静. Survivin mRNA反义寡核苷酸诱导胰腺癌细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1872-1874
30 俞建雄, 袁静, 王春友, 陈立波, 周峰. 组织因子途径抑制物2对胰腺癌细胞浸润能力的影响. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1884-1888
31 高鹏, 张刚庆, 严政, 方驰华. Survivin反义寡核苷酸抑制肝癌移植瘤生长的作用. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1627-1630
32 Lian T, Ho RJ. Trends and developments in liposome drug delivery systems. *J Pharm Sci* 2001; 90: 667-680

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] .

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月18日; 15(8): 820-823
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

白花丹参根制剂对胃癌细胞增殖和凋亡的影响

焦 鹏, 常 起, 杨明峰, 张 凤, 赵晓民, 夏作理

■背景资料
临床上, 丹参是具有活血化瘀活性的常用中药, 其药物有效成分远高于《中国药典》中的紫花丹参, 尤其对血栓闭塞性脉管炎有特效. 因此, 白花丹参具有重要的医药和经济价值, 医家一直将其视为珍品. 目前, 已有些研究认为丹参有抑癌作用, 但对胃癌细胞的作用报道不多.

焦鹏, 杨明峰, 张凤, 赵晓民, 泰山医学院生命科学研究所 山东省泰安市 271000
常起, 泰山医学院附属医院人事科 山东省泰安市 271000
夏作理, 泰山医学院微循环重点实验室 山东省泰安市 271000
焦鹏, 2005年福建师范大学硕士, 主要从事细胞生物学的科研和教学工作.
通讯作者: 夏作理, 271000, 山东省泰安市迎胜东路2号, 泰山医学院微循环重点实验室. xiaminzhao@163.com
传真: 0538-6222600
收稿日期: 2006-12-06 接受日期: 2007-01-10

Effects of *Salvia miltiorrhiza Bge.f.alba* root preparation on the proliferation and apoptosis of gastric cancer cells

Peng Jiao, Qi Chang, Ming-Feng Yang, Feng Zhang, Xiao-Min Zhao, Zuo-Li Xia

Peng Jiao, Ming-Feng Yang, Feng Zhang, Xiao-Min Zhao, Institute of Life Sciences, Taishan Medical College, Tai'an 271000, Shandong Province, China
Qi Chang, Department of Personnel, the Affiliated Hospital of Taishan Medical College, Tai'an 271000, Shandong Province, China
Zuo-Li Xia, Key Laboratory of Microcirculatory, Taishan Medical College, Tai'an 271000, Shandong Province, China
Correspondence to: Zuo-Li Xia, Key Laboratory of Microcirculatory, Taishan Medical College, 2 Yingsheng East Road, Tai'an, 271000, Shandong Province, China. xiaminzhao@163.com
Received: 2006-12-06 Accepted: 2007-01-10

Abstract
AIM: To investigate the effects of *Salvia miltiorrhiza Bge.f.alba* root preparation (SMRP) on the proliferation and apoptosis of human gastric cancer cell line BGC823 cultured *in vitro*.

METHODS: Human gastric cancer cells BGC823 cultured *in vitro* were treated with different concentrations of SMRP, and then the relative survival rate of the cells in each group was examined by MTT method. Flow cytometry was used to detect the apoptosis of BGC823 cells and laser scanning confocal microscopy (LSCM) was used to demonstrate cell morphology. Statistical analysis was performed and *t* test was used to compare the mean value between the different groups.

RESULTS: After treatment with different concentrations of SMRP, as measured by MTT assay, cell viability decreased in a dose-dependent manner (0.4 g/L: 91.7% ± 10.6%; 0.8 g/L: 66.8% ± 5.1%; 1 g/L: 57.5% ± 9.6%; 1.5 g/L: 32.6% ± 7.3%; 2 g/L: 29.4% ± 9.4%). BGC823 cells cultured with SMRP showed the typical morphologic characteristics of apoptosis. Flow cytometry showed that the apoptotic rates in the early and late stage after SMRP treatment were significantly higher than those in the controls (4.105% ± 2.393% *vs* 2.950% ± 1.575%, $P < 0.05$; 21.465% ± 6.474% *vs* 3.848% ± 2.264%, $P < 0.05$).

CONCLUSION: SMRP can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of human gastric cancer cells.

Key Words: *Salvia miltiorrhiza Bge.f.alba* root preparation; Gastric cancer; Apoptosis; Proliferation; MTT assay; Flow cytometry

Jiao P, Chang Q, Yang MF, Zhang F, Zhao XM, Xia ZL. Effects of *Salvia miltiorrhiza Bge.f.alba* root preparation on the proliferation and apoptosis of gastric cancer cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(8):820-823

摘要
目的: 研究白花丹参根制剂对体外培养的人胃癌细胞BGC823增殖和凋亡的影响.

方法: 用不同浓度白花丹参根制剂处理胃癌细胞BGC823后, 噻唑蓝(MTT)检测细胞的相对存活率, 流式细胞仪Annexin V/PI双染法检测BGC823细胞凋亡, 激光扫描共聚焦显微镜检测细胞形态. 对结果进行统计分析, 均数比较用*t*检验.

结果: 不同浓度白花丹参根制剂作用于BGC823细胞后, 细胞的存活率明显下降且呈剂量依赖性(0.4 g/L: 91.7%±10.6%; 0.8 g/L: 66.8%±5.1%; 1 g/L: 57.5%±9.6%; 1.5 g/L: 32.6%±7.3%; 2 g/L: 29.4%±9.4%). 镜下可见凋亡细胞典型形态, 流式细胞术分析表明经过白花丹参根制剂处理后早期凋亡细胞数和晚期凋亡细胞数与对照组相比

均显著增加(2.950%±1.575% *vs* 4.105%±2.393%, $P<0.05$; 3.848%±2.264% *vs* 21.465%±6.474%, $P<0.05$).

结论: 白花丹参根制剂能有效地抑制胃癌细胞增生和诱导细胞凋亡.

关键词: 白花丹参根制剂; 胃癌; 凋亡

焦鹏, 常起, 杨明峰, 张凤, 赵晓民, 夏作理. 白花丹参根制剂对胃癌细胞增殖和凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(8):820-823
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/820.asp

■研发前沿
现代医学研究表明, 诱导肿瘤细胞凋亡是一条有效的肿瘤治疗途径, 比杀伤肿瘤细胞的治疗有明显的优越性, 故寻求高效低毒的肿瘤细胞凋亡诱导剂已成为目前肿瘤治疗的研究热点.

0 引言

泰山白花丹参属唇型科植物, 是唇型科植物丹参的变型, 为丹参族中一极品, 是山东特有珍奇物种. 多年来, 人们将丹参广泛应用于临床, 是具有活血化瘀活性的常用中药, 临床主要用于治疗冠心病、心绞痛、缺血性中风、栓塞、肝脾肿大、化脓性感染等疾病[1-2]. 目前, 已有些研究认为丹参有抑癌作用[3-6], 但其对胃癌细胞的作用报道不多, 在我国, 胃癌的死亡率高居恶性肿瘤的首位, 发病率在恶性肿瘤中位居第二, 因此进行胃癌治疗的研究有重大的现实价值[7]. 我们研究白花丹参根制剂对胃癌细胞BGC823细胞增殖和凋亡的影响, 为进一步开发白花丹参这一珍奇的植物物种资源的应用价值提供基础资料.

1 材料和方法

1.1 材料 白花丹参(产自泰山); 胃癌细胞BGC823; 1640培养基(Gibco); 新生牛血清(杭州四季清公司); 二甲基亚砜(DMSO), 噻唑蓝(MTT), 碘化丙啶(PI)均购自Sigma公司; Annexin-V-Flous染色试剂(Roche公司). 取100 g自然干燥的白花丹参根, 剪切成碎块, 加1 L双蒸水, 以温水浸泡4 h. 文火第1次煎2 h, 收集煮剂, 再加双蒸水1 L, 第2, 3次各煎1.5 h, 合并煎液, 200目滤网过滤, 5000 r/min离心10 min, 收集上清液. 旋转蒸发仪蒸馏煮剂至100 mL, -20℃至-60℃冰冻煮剂后, 冷冻干燥机干燥约19 h后大约得到50 g样品, 每次用时称取适当样品, 用无血清培养液溶解制成各种不同浓度的白花丹参根制剂, 0.22 μm滤膜过滤后, 4℃冰箱避光储存备用.

1.2 方法 选用人胃癌细胞系BGC823细胞, 于含新生牛血清浓度为100 mL/L的1640培养基中培养, 其中在恒温培养箱中以50 mL/L CO_2, 37℃及饱和湿度条件下培养, 每2 d换液一次, 当细胞80%融合时传代.

1.2.1 细胞存活率的影响 单细胞悬液以每孔5×10^3个细胞100 μL接种于96孔培养板中, 贴壁24 h后分别接入不同浓度的无菌的白花丹参根制剂溶液100 μL, 使最终浓度分别为2, 1.5, 1, 0.8, 0.4 g/L, 各组设8个重复孔, 对照组加100 μL无血清培养液, 在37℃, 50 mL/L CO_2条件下继续培养24 h, 实验终止前加入新配制的5 g/L的MTT溶液20 μL, 混匀, 再继续培养4 h, 弃去上清, 每孔加DMSO 200 μL, 充分振荡30 min, 溶解MTT沉淀物, 490 nm测定每孔的吸光度*A*值[8-13]. 计算胃癌细胞相对存活率: 相对存活率 = 实验孔*A*值/对照孔*A*值×100%[14].

1.2.2 流式细胞仪Annexin V/PI双染法检测细胞凋亡 将5×10^7/L细胞接种于50 mL培养瓶中, 24 h后加入无菌的白花丹参根制剂溶液, 使其终浓度为1 g/L, 对照组加等量的无血清培养液, 继续培养24 h, 漂浮细胞和用胰酶消化下的细胞5×10^5, PBS洗涤2次, 1000 r/min离心5 min后去上清, 将细胞重悬于100 μL Annexin-V-FLUOS和碘化丙锭(PI)染色液中, 室温下避光孵育15 min, 立即进行流式细胞仪检测, 实验重复1次.

1.2.3 激光扫描共聚焦显微镜检测 将密度5×10^7/L的BGC823细胞加入放有盖玻片的6孔培养板, 细胞在盖玻片上贴壁生长, 2 d更换培养液, 同时加入不同浓度的药物: (1)对照组(未做处理); (2)1 g/L白花丹参根制剂; (3)1.5 g/L白花丹参根制剂, 作用24 h后, 弃培养液, PBS冲洗, 每块盖片加100 μL Annexin-V-FLUOS和碘化丙啶(PI)染色液, 室温染色15 min, 封片, 在488 nm波长下用激光扫描共聚焦显微镜扫描细胞形态.

统计学处理 采用SPSS11.5进行统计分析, 均数比较用*t*检验. 所有数据均用mean±SD表示.

2 结果

2.1 白花丹参根制剂对胃癌细胞BGC823细胞存活率的影响 白花丹参根制剂处理BGC823细胞后, 能使细胞存活率明显下降, 并呈明显的剂量依赖效应(表1).

2.2 细胞形态学变化 在倒置相差显微镜下观察, 可见随着白花丹参根制剂浓度和孵育时间的增加, 贴壁细胞逐渐变圆, 折光性和贴壁能力均减弱, 而对照组细胞均无明显改变. 实验组悬浮的

■应用要点
本文研究白花丹参根制剂对胃癌细胞BGC823细胞增殖和凋亡的影响, 不但为进一步开发白花丹参这一珍奇的植物物种资源的应用价值提供基础资料, 而且对临床治疗胃癌具有重要的参考价值.

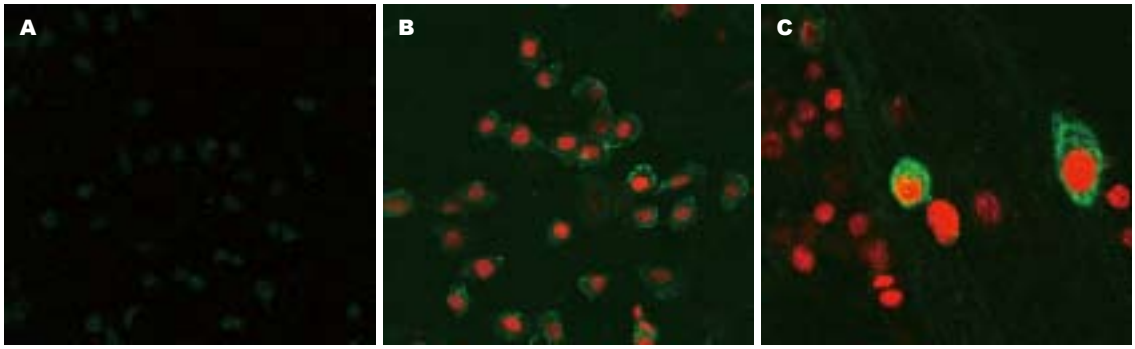


图 1 白花丹参根制剂对胃癌BGC823细胞的作用. A: 正常对照; B: 1 g/L白花丹参根制剂作用组; C: 1.5 g/L白花丹参根制剂作用组.

表 1 白花丹参根制剂对胃癌细胞存活率的影响

白花丹参根制剂(g/L)	吸光度(A)	存活率(%)
0	1.109±0.053	-
0.4	1.017±0.117[a]	91.7±10.6
0.8	0.741±0.057[a]	66.8±5.1
1	0.638±0.107[b]	57.5±9.6
1.5	0.361±0.081[b]	32.6±7.3
2	0.326±0.104[b]	29.4±9.4

[a]$P<0.05$, [b]$P<0.01$ *vs* 0 g/L白花丹参根制剂作用组.

细胞数量多于对照组. 细胞爬片后, AnnexinV/PI荧光染色, 激光扫描共聚焦显微镜扫描显示, 正常对照组细胞发出微弱的绿色荧光, 在各实验组均发现有细胞核浓缩聚集, 并发出较强的绿色和红色荧光(图1).

2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡变化 在中效浓度附近选择1 g/L白花丹参根制剂作用24 h后BGC823细胞早期凋亡细胞数与晚期凋亡细胞数均明显增加, 与对照组相比差异具有显著性(2.950%±1.575% *vs* 4.105%±2.393%, 3.848%±2.264% *vs* 21.465%±6.474%, $P<0.05$)(图2).

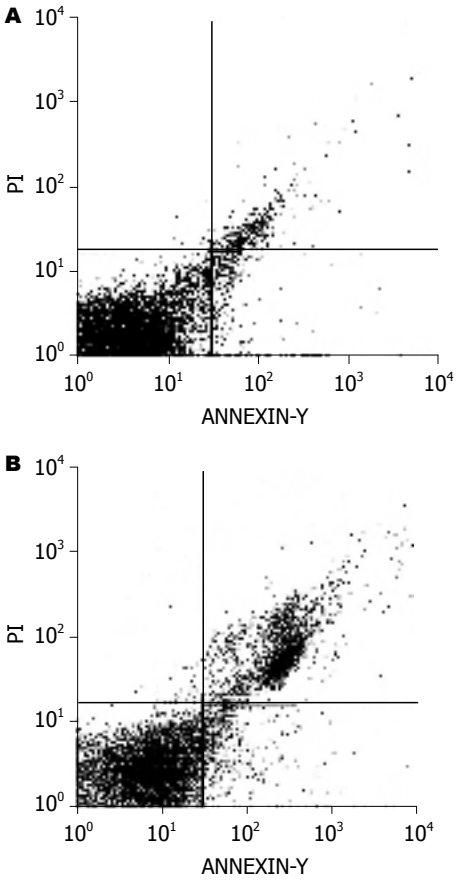


图 2 AnnexinV/PI双染流式细胞法测定对照组与实验组凋亡细胞的比率. A: 正常对照组; B: 1 g/L白花丹参根制剂作用组; $PI^-/AnnexinV^-$: 活细胞; $PI^-/AnnexinV^+$: 早期凋亡细胞; $PI^+/AnnexinV^+$: 晚期凋亡细胞; $PI^+/AnnexinV^-$: 机械死亡细胞.

3 讨论

白花丹参系多年生草本植物, 是丹参族中的极品. 现代医学检测证实其中的丹参酮ⅡA含量远远超过一般的丹参, 水溶性成份明显高于丹参, 约为丹参的2倍. 丹参的主要化学成分为水溶性酚酸类和脂溶性二萜醌类化合物. 丹参的脂溶性有效成分主要为丹参酮, 其中以丹参酮ⅡA含量较高; 水溶性酚酸类成分包括丹参素、原儿茶醛、丹参酚酸A、丹参酚酸B等, 其中丹参素即β-3, 4-二羟基苯乳酸含量较高, 是最主要的水溶性成分[15-16]. 据报道, 丹参的活性成分丹参素、丹参酮ⅡA有一定的抗肿瘤、诱导癌细胞凋亡作用[5,17-21]. 众所周知, 丹参的传统应用方式为水煎液, 因此其有效成分应以水溶性物质为主, 本文中制备的白花丹参根制剂为澄清透明、棕色的水溶液, 主要是丹参素等多种水溶性成分的混合液, 推测丹参酮含量极低.

通过MTT法观察白花丹参根制剂对人胃

癌细胞增殖的影响表明, 白花丹参根制剂体外直接作用于胃癌细胞有明显抑制生长和杀伤作用, 且有浓度依赖性, 我们在中效浓度附近选择了1 g/L进一步用流式细胞仪分析其对胃癌细胞BGC823的作用, 结果表明处理的胃癌细胞BGC823晚期凋亡细胞数、早期凋亡细胞数均明显增加, 激光扫描共聚焦显微镜扫描显示了凋亡细胞典型形态, 这些说明白花丹参根制剂能够诱导胃癌细胞凋亡. 现代医学研究表明, 诱导肿瘤细胞凋亡是一条有效的肿瘤治疗途径, 比杀伤肿瘤细胞的治疗有明显的优越性, 故寻求高效低毒的肿瘤细胞凋亡诱导剂已成为目前肿瘤治疗的研究热点[18]. 我们使用的白花丹参根制剂主要是丹参水溶性成分, 丹参酮含量极低, 推测不是丹参酮引起的, 究竟是哪一种丹参的单体成分发挥主要作用, 是否为水溶性代表成分——丹参素的作用以及白花丹参根制剂具体是通过哪一机制诱导胃癌细胞凋亡, 还有待进一步的探索和研究.

■同行评价
本文研究了中药白花丹参根制剂对体外培养的人胃癌细胞BGC823的增殖和凋亡的影响, 文章研究方法较先进, 研究内容较新颖, 结果准确, 在临床治疗胃癌方面可能具有潜在的应用价值.

4 参考文献

1 曲桂武, 解飞霞, 岳喜典, 刘影, 李桂生. 丹参酚酸B和丹参酮ⅡA在丹参中的分布. 中药研究与信息 2005; 7: 11-13
2 郭宝林, 冯毓秀, 赵杨景. 丹参种质资源研究进展. 中国中药杂志 2002; 27: 492-495
3 谭宇蕙, 杜标炎, 吴映雅, 李杰芬, 刘晓东, 钟富有. 丹参注射液和三七总皂甙对大鼠肝癌细胞及自杀基因旁观者效应的影响. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2540-2544
4 方杰. 丹参素对乳腺癌MCF细胞株的作用. 中国老年学杂志 2003; 23: 168-169
5 陈坚. 丹参酮抗肿瘤的研究进展. 复旦学报(医学版) 2003; 30: 626-628
6 冯玲玲, 周吉源. 丹参的研究现状与应用前景. 中国野生植物资源 2004; 23: 4-7
7 王龙, 朱金水, 陈维雄, 朱励, 达炜, 王秀玲. 奥曲肽联合汉防己甲素对人胃癌细胞增殖的影响. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2318-2322
8 黄光琦, 宋毅, 张洁, 陆燕蓉, 肖林, 杨元, 郭元彪. 丹参酮ⅡA增强HSV-tk/GCV旁观者效应及其与Cx43 mRNA表达的关系. 中华肿瘤杂志 2004; 26: 146-149
9 张凤, 杨桂文, 张金凤, 安利国. 银杏叶类黄酮对人胃癌细胞BGC823体外的增殖抑制作用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2627-2629
10 Wu K, Yuan LH, Xia W. Inhibitory effects of apigenin on the growth of gastric carcinoma SGC-7901 cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4461-4464
11 Huang C, Liu LY, Song TS, Ni L, Yang L, Hu XY, Hu JS, Song LP, Luo Y, Si LS. Apoptosis of pancreatic cancer BXPC-3 cells induced by indole-3-acetic acid in combination with horseradish peroxidase. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4519-4523
12 Wang D, Xiang DB, He YJ, Li ZP, Wu XH, Mou JH, XiaoHL, Zhang QH. Effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4008-4012
13 Zhang R, Gong J, Wang H, Wang L. Bile salts inhibit growth and induce apoptosis of human esophageal cancer cell line. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5109-5116
14 刘江伟, 李开宗, 窦科峰, 宋振顺, 苏明权, 于文彬. COX-2抑制剂联合顺铂对胰腺癌细胞增生和凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1139-1143
15 王娟, 桂常青, 周静, 宋建国. 丹参注射液在小鼠体内的毒效药动学研究. 皖南医学院学报 2003; 22: 248-250
16 朱立彬. 高效液相色谱法测定丹参药材中丹参素的含量. 湖北中医学院学报 2004; 6: 33-34
17 陈良良, 吴良村, 李庆霞, 陈卫星, 沈敏鹤. 丹参注射液对肿瘤浸润淋巴细胞的体外扩增及抗肿瘤作用. 浙江中医学院学报 2002; 26: 49-54
18 徐俊丽, 和水祥, 陈静宏, 符寒, 赵刚, 王艳丽, 任牡丹. 丹参酮ⅡA对肝癌SMMC-7721细胞COX-2表达的影响. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1352-1356
19 李旭芬, 李天琅. 丹参及复方丹参注射液的体外抗肿瘤作用. 浙江中西医结合杂志 1999; 9: 291-292
20 李庆彦, 李春忠, 黄智武, 罗远英, 韦光刚, 梅桂色. 3种丹参制剂对Bel-7402细胞和外周血干细胞生长的影响. 实用癌症杂志 2001; 16: 467-468
21 李林, 陈志伟, 石岩. 丹参素临床应用的研究进展. 齐齐哈尔医学院学报 2004; 25: 181-182

电编 张敏 编辑 张焕兰

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

• 消息 •

世界华人消化杂志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.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月18日; 15(8): 824-830
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

血管生成素-1基因对人胃癌细胞增殖与凋亡的影响

颜 芳, 欧希龙, 关云艳, 产松苗, 陈国胜, 杨 柳, 孙为豪

■背景资料
胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 全世界每年新增胃癌患者约80万, 死亡约63万, 其死亡率较高, 5 a生存率只有约20%, 危害十分严重. 血管生成素及其受体Tie-2是近年新发现的与肿瘤转移, 血管生成、重塑密切相关的分子, 本文研究了血管生成素-1基因对胃癌细胞增殖和凋亡的影响.

颜芳, 欧希龙, 关云艳, 杨柳, 东南大学临床医学院附属中大医院消化科 江苏省南京市 210009
陈国胜, 孙为豪, 南京医科大学第一附属医院老年医学科 江苏省南京市 210029
产松苗, 上海市梅山医院消化内科 江苏省南京市 210039
颜芳, 医学学士, 在读硕士研究生, 主要从事消化系统肿瘤的研究.
通讯作者: 欧希龙, 210009, 江苏省南京市, 东南大学医学院附属中大医院消化科. ouxilong@126.com
电话: 025-83272034
收稿日期: 2006-12-14 接受日期: 2007-01-10

Effect of angiopoietin-1 gene on the proliferation and apoptosis of human gastric cancer cells

Fang Yan, Xi-Long Ou, Yun-Yan Guan, Song-Miao Chan, Guo-Sheng Chen, Liu Yang, Wei-Hao Sun

Fang Yan, Xi-Long Ou, Yun-San Guan, Liu Yang, Department of Gastroenterology, Zhongda Hospital Affiliated to Clinical Medical College of Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China
Guo-Sheng Chen, Wei-Hao Sun, Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Song-Miao Chan, Department of Gastroenterology, Shanghai Meishan Hospital, Nanjing 210039, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Xi-Long Ou, Department of Gastroenterology, Zhongda Hospital Affiliated to Clinical Medical College of Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China. ouxilong@126.com
Received: 2006-12-14 Accepted: 2007-01-10

Abstract

AIM: To explore the effect of angiopoietin-1 (Ang1) gene on the proliferation and apoptosis of human gastric cancer cell line MGC-803.

METHODS: The replication-deficient adenovirus carrying human angiopoietin-1 (Ad-Ang1) and green fluorescent protein (Ad-GFP) were packaged, amplified and purified in human embryonic kidney cells 293 (HEK293). Then gastric cancer cell line MGC-803 was transfected with the resultant adenoviruses. The proliferation and apoptosis of MGC-803 cells were measured by MTT colorimetry and flow cytometry, respectively. The expression of Ang1 and its receptor (Tie-2) were detected by immunohistochemistry.

RESULTS: The recombinant adenovirus vector carrying Ang1 or GFP were amplified and purified successfully with the viral titers of 1.15 $\times 10^{13}$ and 2.0×10^{12} PFU/L, respectively. The transfection rate almost reached 100% when the multiplicity of infection (MOI) was 20. The proliferation of MGC-803 cells in Ad-Ang1-transfected group was markedly higher than that in Ad-GFP-transfected group (24 h: t = 16.32, P < 0.0001; 48 h: t = 10.47, P = 0.0005; 72 h: t = 24.59, P < 0.0001) and control group (24 h: t = 10.54, P = 0.0005; 48 h: t = 13.92, P = 0.0002; 72 h: t = 22.46, P < 0.0001). The apoptotic rate of Ag-Ang1-transfected MGC-803 cells was obviously lower than that of Ag-GFP-transfected ones (t = 7.73, P = 0.0015), but there was no difference between Ag-GFP group and control group. The positive rates of Ang1 and Tie-2 expression were significantly higher in Ad-Ang1-transfected cells (Ang-1: 99.2 ± 0.8; Tie-2: 85.4 ± 1.8) than those in the control (Ang-1: 51.0 ± 2.7; Tie-2: 30.8 ± 1.5) and Ag-GFP-transfected ones (Ang-1: 51.4 ± 1.5; Tie-2: 32.4 ± 2.3), respectively (P < 0.0001).

CONCLUSION: Ang1 gene may obviously promote the proliferation and inhibit the apoptosis of human gastric cancer cell line MGC-803.

Key Words: Adenovirus vector; Angiopoietin-1; Gastric cancer; Proliferation; Apoptosis

Yan F, Ou XL, Guan YY, Chan SM, Chen GS, Yang L, Sun WH. Effect of angiopoietin-1 gene on the proliferation and apoptosis of human gastric cancer cell. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(8):824-830

摘要

目的: 探讨人血管生成素-1(angiopoietin-1, Ang1)对胃癌细胞MGC-803增殖与凋亡的影响, 研究其生物学作用及其在肿瘤发生中的作用机制.

方法: 以人胚肾293细胞对重组质粒Ad-Ang1和Ad-GFP进行包装、扩增和纯化后转导MGC-803细胞, 应用MTT比色法分析Ang1对

该胃癌细胞增殖的影响, 通过流式细胞仪分析血浆Ang1对胃癌细胞凋亡的影响, 并通过免疫组织化学法检测Ang1及其受体Tie-2的表达情况.

结果: 成功包装、扩增及纯化了重组腺病毒Ad-Ang1及对照病毒Ad-GFP, 其感染滴度分别为2.0×10^{12}和1.15×10^{13} PFU/L. 当感染复数(MOI)为20时转导率即接近100%, 而细胞形态无明显改变. MTT结果显示, 24, 48和72 h时Ad-Ang1组吸光度均明显高于Ad-GFP组及对照组(Ad-GFP *vs* Ad-Ang1: 24 h, t = 16.32, P<0.0001; 48 h, t = 10.47, P = 0.0005; 72 h, t = 24.59, P<0.0001. 对照组 *vs* Ad-Ang1: 24 h, t = 10.54, P = 0.0005; 48 h, t = 13.92, P = 0.0002; 72 h, t = 22.46, P<0.0001), Ad-GFP组与对照组相比无差别; 流式细胞仪检测显示, 对照组、Ad-GFP组和Ad-Ang1组的凋亡率(%)分别为: 9.90±0.62, 10.07±1.27和4.17±0.35; 免疫组化显示, 3组细胞均有不同程度Ang-1及其受体Tie-2的表达, 且其阳性表达率在Ang1基因转染组(Ang-1: 99.2±0.8; Tie-2: 85.4±1.8)显著高于对照组(Ang-1: 51.0±2.7; Tie-2: 30.8±1.5)和GFP组(Ang-1: 51.4±1.5; Tie-2: 32.4±2.3)(P<0.0001).

结论: Ang1能显著促进人胃癌细胞MGC-803体外增殖, 抑制血浆饥饿时的凋亡.

关键词: 腺病毒载体; 血管生成素; 胃癌; 增殖; 凋亡

颜芳, 欧希龙, 关云艳, 产松苗, 陈国胜, 杨柳, 孙为豪. 血管生成素-1基因对人胃癌细胞增殖与凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(8):824-830
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/824.asp

0 引言

血管生成素(angiopoietin, Ang)及其受体Tie-2是继VEGF后新发现的与肿瘤转移, 血管生成、重塑密切相关的分子[1]. 血管生成素包括Ang1, Ang2, Ang3和Ang4等[2-3], 目前, Ang-1与在肿瘤生长中的作用结果尚有争议. 为研究Ang1对胃癌细胞有无影响, 我们以腺病毒为载体, 将Ang1基因转染至MGC-803细胞, 并研究其对该胃癌细胞株增殖和凋亡的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 人胃腺癌细胞株MGC-803购自中科院; 人胚肾293细胞购自Microbix Biosystems公司; 复制缺陷型腺病毒重组体Ad-Ang1及对照病毒Ad-GFP由南京医科大学第一附属医院构建[4]并赠送. PacI, LipofectAmine 2000试剂盒分别购自NEB公司和Gibco公司. Ang1一抗, Tie-2一抗购自北京莱博, 工作浓度分别为1∶100和1∶50, 免疫组化SP试剂盒及DAB试剂盒购自北京中山公司, Annexin V-FITC/PI试剂盒购自Bender Medsystems公司.

1.2 方法

1.2.1 病毒颗粒的包装与扩增 取对数生长期的293细胞接种于100 mm直径的培养皿中, 以含100 mL/L胎牛血清, 10^5 U/L青霉素和100 mg/L链霉素的RPMI1640培养基培养. 当细胞生长度达60%-70%时, 换无血清无抗生素的RPMI-1640培养. 将以*Pac*I酶切回收的线性化的Ad–Ang1 1 μg通过Lipofectamine2000转染至293细胞内, 同时以Ad-GFP(编码绿色荧光蛋白的复制缺陷型腺病毒重组体)做平行对照. 观察出现细胞病理反应(cytopathic effect, CPE)后收取细胞上清, 再以细胞上清转染更多的293 细胞. 重组病毒在293细胞中呈几何级数包装扩增, 收集足够多的293细胞备用.

1.2.2 病毒颗粒的纯化 将收集的293细胞以PBS悬浮, 将其于液氮/37℃反复冻融3次, 收集细胞裂解液. 在超速离心管中依次加入CsC l1.4 , CsC l1.2及细胞裂解液, 以100 000 *g*离心2 h, 在1.345密度附近可见腺病毒浓缩带, 穿刺离心管侧壁, 将目的条带吸出, 经12 000-14 000 kDa孔径透析袋透析纯化, 浓缩纯化的病毒颗粒再经0.45 μm孔径滤膜过滤, 分装保存备用.

1.2.3 生物活性滴度测定 按Quantum公司提供的试剂盒说明书步骤, 采用组织培养半数感染剂量法(TCID50)测定Ad-Ang1的生物活性. 以1×10^4个/孔接种293细胞于96孔板, 待细胞密度约90%后, 倍比稀释病毒上清、分别以不同稀释浓度100 μL病毒溶液转染细胞, 以20 mL/L胎牛血清的培养基培养10 d后倒置显微镜下观察, 计算每一排中出现CPE的孔数, 按公式$T = 10^{(S+3.8)}$ PFU/L计算滴度值.

1.2.4 腺病毒体外转导效率的测定(MOI试验) MGC-803细胞以8000个/孔接种于96孔板培养至60%-70%细胞贴壁时,分别以感染复数(病毒颗粒/细胞数)为10, 20, 30, 50, 100 Ad-GFP 100 μL感染细胞, 8 h后换含100 mL/L胎牛血清的RPMI1640培养液继续培养, 48 h后在荧光显微镜下计数, 随机计算3个表达GFP 的细胞数占视野中所有细胞的百分数, 取均值代表转导效率.

■研发前沿
Ang在肿瘤生长中发挥了重要的作用, 在很多实体肿瘤中得到了证实, 如在人胃癌、肝癌、乳腺癌和胶质细胞瘤等均可见到有Ang-1及其受体Tie-2表达增加, 但其具体机制尚不完全清楚. 目前的研究结果显示, Ang-1在肿瘤发展过程的作用尚有争议, 故需进一步深入研究.

■相关报道
有研究表明, Ang-1可促进肿瘤生长, 转染Ang-1基因可降低肿瘤细胞的凋亡指数, 但其具体机制不清; 也有部分研究发现, Ang-1抑制肿瘤生长的可能机制是Ang-1减少血管渗漏, 形成稳定的血管.

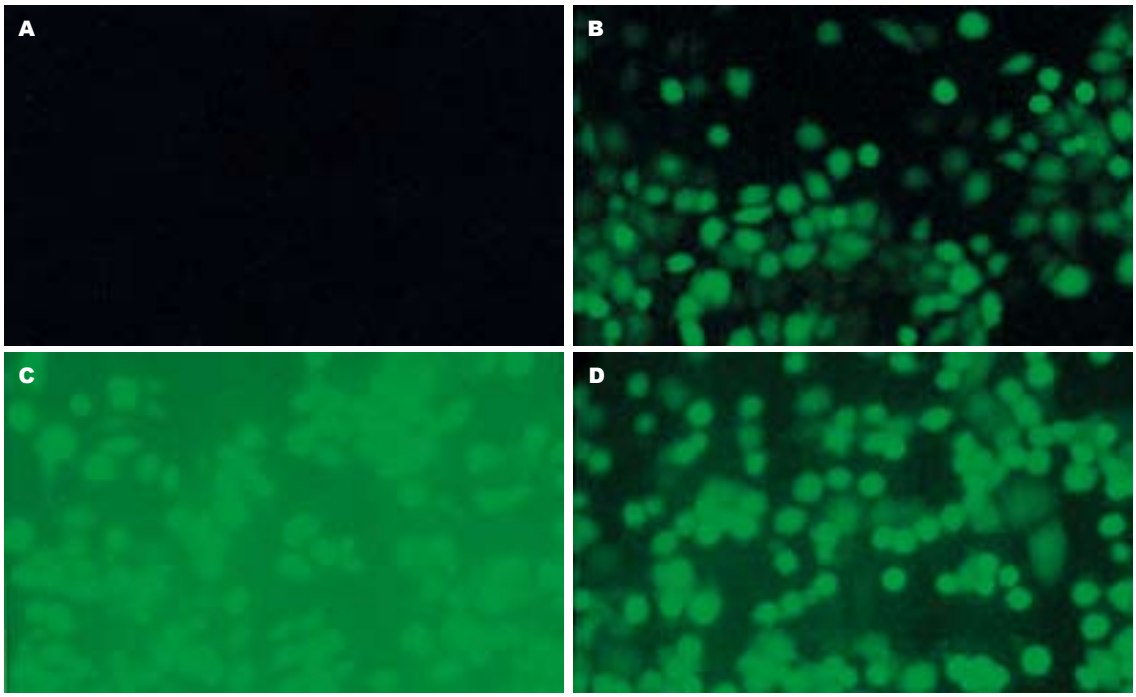


图 1 不同MOI值时MGC-803细胞的GFP表达(SP × 100). A: MOI = 0; B: MOI = 10; C: MOI = 20; D: MOI = 50.

1.2.5 MTT法测定Ang1对MGC-803细胞增殖的影响 实验分对照组(正常细胞组)、Ad-GFP(平行对照组)、Ad-Ang1(Ang1转染组)3组, 每组设3个复孔. 取对数生长期的MGC-803细胞, 以8000个/孔接种细胞于96孔培养板中, 细胞生长度达60%-70%时对Ad-GFP、Ad-Ang1两组予相应的无血清无抗生素培养液稀释的病毒液100 μL感染, 感染8 h后换RPMI1640完全培养液继续培养. 分别于感染后24, 48和72 h定每孔吸光度(*A*值).

1.2.6 流式细胞仪检测转导Ang1基因对MGC-803凋亡的影响 根据Harfouche *et al*[5]的方法进行. 以每孔1.0×10^8/L的MGC-803接种于6孔板, 实验分组同MTT, 每组设3个复孔, 感染8 h后用无血清培养液继续培养48 h后收集对照组、Ad-GFP及Ad-Ang1组MGC-803细胞1.0×10^9/L, 1000 r/min, 4℃离心10 min, 弃上清, 加入1 mL冷的PBS, 轻轻震荡使细胞悬浮. 1000 r/min, 4℃离心10 min, 弃上清. 重复用冷的PBS洗两次. 将细胞重悬于200 μL结合缓冲液. 加入10 μL Annexin V-FITC和5 μL PI, 轻轻混匀, 避光室温反应15 min. 加入300 μL结合缓冲液, 在1 h内上机检测细胞的凋亡率.

1.2.7 应用免疫细胞化学方法检测Tie-2, Ang1在MGC-803细胞中的表达 取对数生长期的MGC-803细胞, 消化后计数并调整培养液用量, 使细胞悬液终浓度为1.0×10^8/L, 接种至底部有小玻片的6孔板中, 每孔2 mL细胞悬液, 置孵育箱中培养. 次日, 细胞在小玻片上贴壁生长约60%融合, 分别于两孔中加入Ad-GFP、两孔中加入Ad-Ang1的无血清无抗生素培养液稀释的病毒液1 mL感染, 感染8 h后换RPMI1640完全培养液继续培养. 两孔中不加病毒作为对照组. 再于48 h后取出小玻片用丙酮固定. PBS缓冲液冲洗, 30 mL/L双氧水灭活内源性过氧化酶, 微波抗原热修复后正常山羊血清封闭, 一抗4℃过夜孵育, 二抗30 min, DAB显色, 复染核、脱水、透明, 中性树胶封片. 用PBS代替一抗作阴性对照, 已知阳性片作阳性对照. 胞质或胞膜见棕黄色颗粒为阳性. 在200倍显微镜下随机取5个视野细胞计数, 细胞阳性表达率 = 阳性细胞数/总细胞数×100%.

统计学处理 实验结果以均数±标准差(mean±SD)表示, 均数间比较采用*t*检验. 所有数据均采用SAS8.2统计软件进行分析, $P<0.05$表示有显著差异.

2 结果

2.1 扩增、纯化后Ad-GFP及Ad-Ang1的滴度 Ad-GFP的滴度为2.0×10^{12} PFU/L, Ad-Ang1滴度为3.2×10^{13} PFU/L.

2.2 MOI试验结果 随着MOI值的加大, 腺病毒重组体在MGC-803细胞内转导率逐渐增加, 当

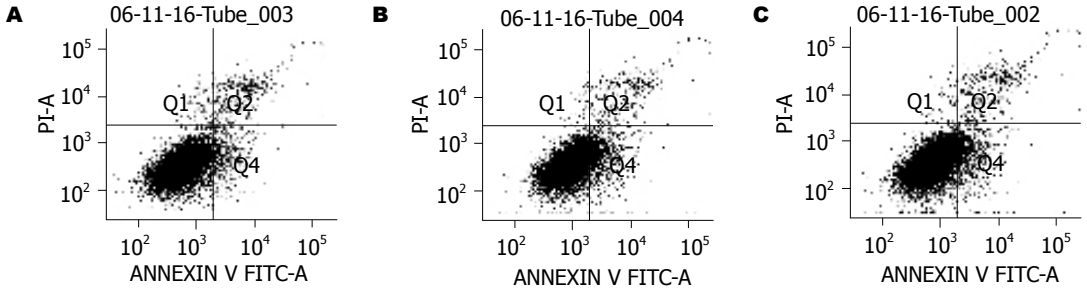


图 2 转导Ang1基因对人胃癌细胞MGC-803凋亡的影响. A: 对照组; B: Ad-GFP; C: Ad-Ang1.

■创新盘点
本文应用基因转染技术将Ang-1导入人胃癌细胞MGC-803, 研究该基因对胃癌细胞增殖和凋亡的影响, 并探讨其可能的作用机制, 具有一定新意.

MOI为10时, 其转导效率约为92%; 当MOI为50时, 其转导率为100%, 但细胞脱落、变圆, 有半数漂浮, 呈现腺病毒过量中毒状态; 当MOI为20时, 其转导效率接近100%而无明显细胞中毒现象(图1). 本试验均采用MOI = 20进行.

2.3 MTT法测定转染Ang1对MGC-803细胞增殖的影响 MTT结果如表1所示, 对照组 *vs* Ad-GFP组: 24 h(t = 1.16, P = 0.3105), 48 h(t = 1.08, P = 0.3908), 72 h(t = 1.09, P = 0.3359); Ad-GFP组*vs* Ad-Ang1组: 24 h(t = 16.32, P<0.0001), 48 h(t = 10.47, P = 0.0005), 72 h(t = 24.59, P<0.0001); 对照组 *vs* Ad-Ang1组: 24 h(t = 10.54, P = 0.0005), 48 h(t = 13.92, P = 0.0002), 72 h(t = 22.46, P<0.0001). 以上数据说明GFP对MGC-803细胞的增殖没有影响, 而转染Ang1基因能够显著促进MGC-803细胞的增殖.

2.4 转染Ang1基因对MGC-803凋亡的影响 流式细胞仪检测结果表明, 对照组、Ad-GFP组和Ad-Ang1组的凋亡率(%)分别为: 9.90±0.62, 10.07±1.27(*vs* 对照组, t = 0.02 , P = 0.8487), 4.17±0.35(*vs* Ad-GFP组, t = 7.73 , P = 0.0015), 说明转染GFP对MGC-803的凋亡无影响, 而转染Ang1基因可显著抑制血浆饥饿条件下的凋亡(图2).

2.5 Ang1及其受体Tie-2在MGC-803细胞中的表达 对照组、Ad-GFP组及Ad-Ang1组3组Tie-2阳性率(%)分别为30.8±1.5; 32.4±2.3; 85.4±1.8, 且在Ad-Ang1组的阳性表达率明显高于对照组和Ad-GFP组(P<0.0001, 图3). Ang1在3组细胞中均有表达, 对照组、Ad-GFP组及Ad-Ang1阳性率(%)分别为51.0±2.7; 51.4±1.5; 99.2±0.8, 在Ang1转染组近100%表达, 明显高于对照和Ad-GFP组(P<0.0 001, 图4).

表 1 MTT法测定转染Ang1对MGC-803细胞增殖的影响 (mean ± SD)

	*A*值		
	24 h	48 h	72 h
对照组	0.758±0.03	1.004±0.01	1.232±0.03
Ad-GFP组	0.781±0.01	1.027±0.03	1.253±0.02
Ad-Ang1组	0.948±0.01	1.393±0.03	1.753±0.03

3 讨论

血管生长因子如VEGF[6]、bFGF[7]等以及新近发现的Ang[8]的促血管生成作用作为肿瘤研究领域中的热点一直以来受到大家的关注. Ang-1作为一个新发现的血管生长因子, 在肿瘤生长过程中发挥了重要的作用, 在很多实体肿瘤中得到了证实. 如在人胃癌[9]、肝癌[10]、肠癌[11-12]、肺鳞癌[13]和胶质细胞瘤[14-15]等均可见有Ang1及其受体Tie-2的表达增加. 但Ang1在肿瘤发展过程中的作用一直存在争议, 有些学者认为, Ang1可促进肿瘤的生长[16-20], 也有部分研究显示抑制肿瘤的发展[21-23]. Stratmann *et al*[16]将内皮细胞与胶质瘤细胞共同培养于基质胶(Matrigel)中, 可检测到Ang-1的表达, 并观察到内皮细胞迁移, 形成相互吻合的血管网, 血管成条索状; 反之, 当去除胶质瘤细胞时, 未能检测到Ang-1的表达, 而内皮细胞堆积成团, 血管延伸异常, 推测肿瘤细胞分泌Ang-1, 使内皮细胞迁移、趋化, 从而促进肿瘤血管生成. Wang *et al*[9]检测53例胃癌组织和23例正常胃黏膜中Ang-1的表达, 结果显示, 有66%胃癌组织中Ang-1明显升高且与胃癌细胞株的分化程度有相关性. 而Stoeltzing *et al*[22]用重组Ang-1转染人结肠癌细胞并种植到裸鼠身上, 发现转染Ang-1的HT29种植瘤比转染空载体组的体积小, 血管密度低, 肿瘤细胞增殖程度低, 血管周细胞包绕程度高, 血管渗透性低. 推测Ang-1可通过抵抗血管渗漏, 抑制血管新生, 维持血管稳定, 有阻止肿瘤转移的潜能. 不管是促进或是抑制作用, 目前的研究多是从促血管生成、稳定血管角度研究的; 而其血管生

■应用要点
本文发现，转染Ang-1基因对人胃癌细胞MGC-803有促进增殖和抑制凋亡作用，这一研究结果可能为胃癌的临床治疗提供理论依据.

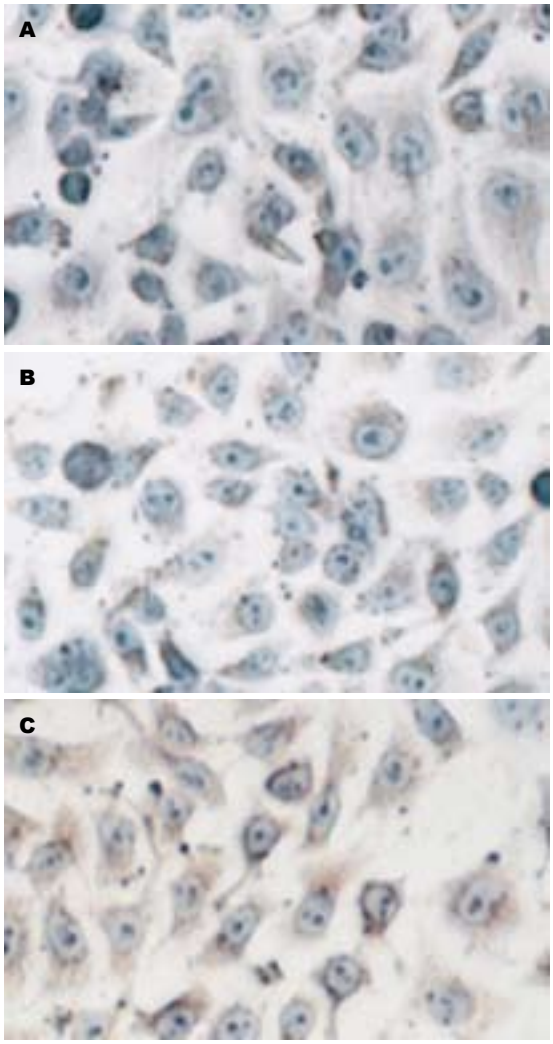


图 3 Tie-2在各组胃癌细胞中的表达(SP × 200). A: 对照组; B: Ad - GFP;C: Ad - Ang1.

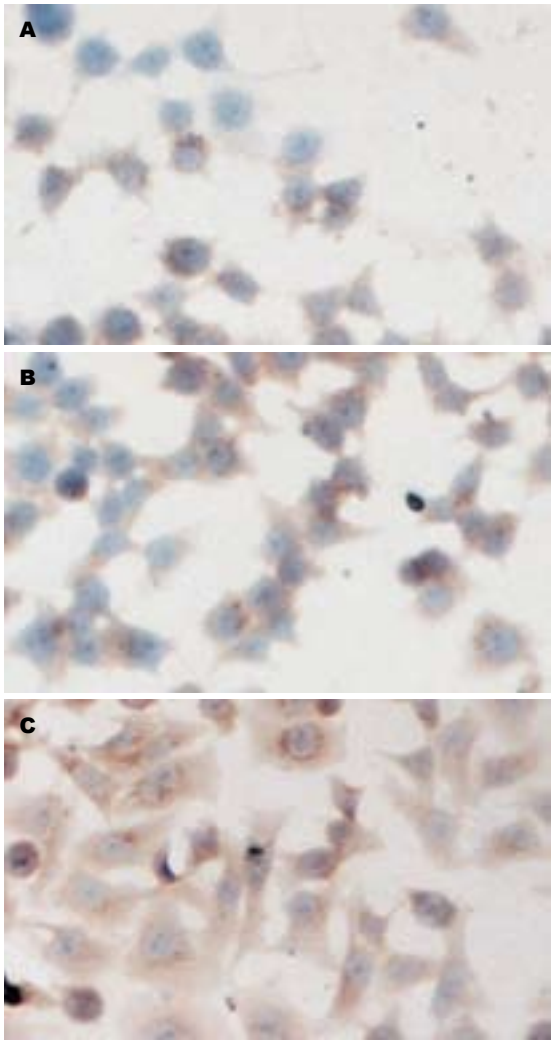


图 4 Ang1在各组胃癌细胞中的表达(SP × 200). A: 对照组; B: Ad - GFP; C: Ad - Ang1.

成以外的功能学研究甚少. 因此，我们利用腺病毒作为载体将外源Ang1基因导入人胃癌细胞株MGC-803，研究血管生长因子Ang1除具有血管生长作用以外，是否对胃癌细胞本身的增殖和凋亡的有无影响及探讨其可能机制.

基因转染载体分为非病毒载体和病毒载体2大类. 非病毒载体包括质粒、脂质体、基因枪和裸DNA等; 病毒载体包括逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒和慢病毒等，他们多是高效载体，其中腺病毒最为常用. 腺病毒载体主要具有以下优点: (1)宿主广泛. 能感染绝大多数处于分裂或不分裂状态的细胞; (2) 安全. 腺病毒是一约36 kb的双股DNA病毒，有40多种血清型. 本试验采用的是腺病毒5型，其控制转录复制单位E1基因和编码毒性产物的E3基因已经被剔除，所以具有不会自身复制和毒性低的特点; (3)转染率高. 腺病毒很容易生长到较高滴度(10^{12} PFU/L以上)，转染后能表达高丰度的目的蛋白; (4)目的基因不整合到宿主染色体DNA中，转染细胞表达目的基因数量随细胞分裂增殖而递减，因而不会带来严重副作用[24-25]. 在实验中我们以绿色荧光蛋白(GFP)做平行对照，因为GFP是目前已知的唯一能在活细胞中产生自发荧光的蛋白，并且其基因序列很短，易于构建质粒，具有敏感的标记检测率，而没有放射性的危害[26]. 本实验用复制缺陷型腺病毒将Ang1基因转导入MGC-803进行体外表达实验，以最适感染复数(MOI = 20)转染MGC-803，培养瓶中发现细胞死亡现象很少. 转染后48 h，免疫组化染色可见绝大部分细胞中存在阳性颗粒，这表明腺病毒载体的瞬时转染效率很高，我们的结果显示可达99%以上. 而MTT和流式细胞仪检测显示，GFP对MGC-803细胞的增殖和凋亡没有影响，也进一步证实，GFP是在基因转染实验中较理想的平

行对照基因.

我们成功制备了高滴度的Ad-GFP和Ad-Ang1, 在感染复数(MOI)为20时即对胃癌细胞MGC-803有近100%转导效率. MTT结果显示, Ad-Ang1组细胞吸光度明显高于对照组及Ad-GFP组, 说明Ang1能够促进体外培养的MGC-803细胞的增殖. 血浆饥饿诱导的凋亡实验常被用来检测某些物质、因素的抗凋亡效应, 并且认为其诱导的凋亡是Caspase依赖性的[27]. 本研究流式细胞仪检测结果证明, Ang1对胃癌细胞具有抗凋亡作用, 可能是通过与其细胞表面Tie-2受体结合后, 导致后者的磷酸化, 从而激活PI-3K, AKT, 抑制细胞Caspase家族的活化所至. 另外, 我们应用免疫细胞化学方法在该种细胞株上也检测到了Ang1及其受体Tie-2的阳性表达, 且Ad-Ang1组阳性细胞表达率显著高于对照组和Ad-GFP组, 说明Ang1水平的增多可上调其受体的表达, 可能系通过自分泌途径促进肿瘤的增殖. 这些研究结果证明, Ang1基因对肿瘤生长和转移的促进作用除了通过血管机制以外, 对肿瘤细胞本身也有直接的促增殖和抑制凋亡作用.

总之, 以腺病毒为载体, 将外源Ang1基因导入人胃癌细胞, 发现该基因对MGC-803有促进增殖和抑制凋亡作用, Ang1这种促血管生成以外的作用将为其功能学研究和在肿瘤的临床应用开辟新方向.

4 参考文献

1 Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996; 87: 1161-1169

2 Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts *in vivo* angiogenesis. *Science* 1997; 277: 55-60

3 Valenzuela DM, Griffiths JA, Rojas J, Aldrich TH, Jones PF, Zhou H, McClain J, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Huang T, Papadopoulos N, Maisonpierre PC, Davis S, Yancopoulos GD. Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 1904-1909

4 周磊, 张馥敏, 杨志健, 陆丽, 丁兆丰, 丁必森, 哈团柱, 李传富, 高翔, 马文珠. 人血管生成素-1和血管内皮生长因子$_{165}$基因克隆及复制缺陷型腺病毒载体构建. 中华心血管病杂志. 2003; 31: 699

5 Harfouche R, Hassessian HM, Guo Y, Faivre V, Srikant CB, Yancopoulos GD, Hussain SN. Mechanisms which mediate the antiapoptotic effects of angiopoietin-1 on endothelial cells. *Microvasc Res* 2002; 64: 135-147

6 Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998; 273: 30336-30343

7 Takahashi JC, Saiki M, Miyatake S, Tani S, Kubo H, Goto K, Aoki T, Takahashi JA, Nagata I, Kikuchi H. Adenovirus-mediated gene transfer of basic fibroblast growth factor induces *in vitro* angiogenesis. *Atherosclerosis* 1997; 132: 199-205

8 Kim I, Kim HG, Moon SO, Chae SW, So JN, Koh KN, Ahn BC, Koh GY. Angiopoietin-1 induces endothelial cell sprouting through the activation of focal adhesion kinase and plasmin secretion. *Circ Res* 2000; 86: 952-959

9 Wang J, Wu K, Zhang D, Tang H, Xie H, Hong L, Pan Y, Lan M, Hu S, Ning X, Fan D. Expressions and clinical significances of angiopoietin-1, -2 and Tie2 in human gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 337: 386-393

10 Sugimachi K, Tanaka S, Taguchi K, Aishima S, Shimada M, Tsuneyoshi M. Angiopoietin switching regulates angiogenesis and progression of human hepatocellular carcinoma. *J Clin Pathol* 2003; 56: 854-860

11 Ahmad SA, Liu W, Jung YD, Fan F, Wilson M, Reinmuth N, Shaheen RM, Bucana CD, Ellis LM. The effects of angiopoietin-1 and -2 on tumor growth and angiogenesis in human colon cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 1255-1259

12 Nakayama T, Hatachi G, Wen CY, Yoshizaki A, Yamazumi K, Niino D, Sekine I. Expression and significance of Tie-1 and Tie-2 receptors, and angiopoietins-1, 2 and 4 in colorectal adenocarcinoma: Immunohistochemical analysis and correlation with clinicopathological factors. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 964-969

13 Takahama M, Tsutsumi M, Tsujiuchi T, Nezu K, Kushibe K, Taniguchi S, Kotake Y, Konishi Y. Enhanced expression of Tie2, its ligand angiopoietin-1, vascular endothelial growth factor, and CD31 in human non-small cell lung carcinomas. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2506-2510

14 Machein MR, Knedla A, Knoth R, Wagner S, Neuschl E, Plate KH. Angiopoietin-1 promotes tumor angiogenesis in a rat glioma model. Am J Pathol 2004; 165: 1557-1570

15 Zadeh G, Reti R, Koushan K, Baoping Q, Shannon P, Guha A. Regulation of the pathological vasculature of malignant astrocytomas by angiopoietin-1. *Neoplasia* 2005; 7: 1081-1090

16 Stratmann A, Risau W, Plate KH. Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis. *Am J Pathol* 1998; 153: 1459-1466

17 Shim WS, Teh M, Bapna A, Kim I, Koh GY, Mack PO, Ge R. Angiopoietin 1 promotes tumor angiogenesis and tumor vessel plasticity of human cervical cancer in mice. *Exp Cell Res* 2002; 279: 299-309

18 Torimura T, Ueno T, Kin M, Harada R, Taniguchi E, Nakamura T, Sakata R, Hashimoto O, Sakamoto M, Kumashiro R, Sata M, Nakashima O, Yano H, Kojiro M. Overexpression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in hepatocellular carcinoma. *J*

■名词解释

血管生成素-1: 是一种分泌性糖蛋白, 主要由血管旁支持细胞包括周细胞(pericyte)、血管平滑肌细胞和肿瘤细胞等合成, 与肿瘤转移, 血管生成、重塑密切相关.

■同行评价
本文研究了Ang1基因对胃癌生长和转移的促进作用, 思路新颖, 以腺病毒为载体, 将外源Ang1基因导入人胃癌细胞, 发现该基因对MGC-803有促进增殖和抑制凋亡作用, 为我们提供了较充足的有价值的信息. 文章的科学性、创新性和可读性能较好的反映我国胃肠道肿瘤基础研究的先进水平.

Hepatol 2004; 40: 799-807
19 Melani C, Stoppacciaro A, Foroni C, Felicetti F, Care A, Colombo MP. Angiopoietin decoy secreted at tumor site impairs tumor growth and metastases by inducing local inflammation and altering neoangiogenesis. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53: 600-608
20 Wang J, Wu KC, Zhang DX, Fan DM. Antisense angiopoietin-1 inhibits tumorigenesis and angiogenesis of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2450-2454
21 Tian S, Hayes AJ, Metheny-Barlow LJ, Li LY. Stabilization of breast cancer xenograft tumour neovasculature by angiopoietin-1. *Br J Cancer* 2002; 86: 645-651
22 Stoeltzing O, Ahmad SA, Liu W, McCarty MF, Wey JS, Parikh AA, Fan F, Reinmuth N, Kawaguchi M, Bucana CD, Ellis LM. Angiopoietin-1 inhibits vascular permeability, angiogenesis, and growth of hepatic colon cancer tumors. *Cancer Res* 2003; 63: 3370-3377
23 Hayes AJ, Huang WQ, Yu J, Maisonpierre PC, Liu A, Kern FG, Lippman ME, McLeskey SW, Li LY. Expression and function of angiopoietin-1 in breast cancer. *Br J Cancer* 2000; 83: 1154-1160
24 Vorburger SA, Hunt KK. Adenoviral gene therapy. *Oncologist* 2002; 7: 46-59
25 Zhang C, Liu ZK. Gene therapy for gastric cancer: a review. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2390-2394
26 Zimmer M. Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem Rev* 2002; 102: 759-781
27 Gu J, Fujibayashi A, Yamada KM, Sekiguchi K. Laminin-10/11 and fibronectin differentially prevent apoptosis induced by serum removal via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt- and MEK1/ERK-dependent pathways. *J Biol Chem* 2002; 277: 19922-19928

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 •

欢迎订阅 2007 年《世界华人消化杂志》

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

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

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月18日; 15(8): 831-837
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

活血化瘀注射液I号预处理与缺血预处理改善肝缺血再灌注损伤

毕旭东, 郭 伟, 赵 晶, 赵连根, 付晓光

毕旭东, 付晓光, 辽宁医学院附属第一医院肝胆外科 辽宁省锦州市 121001
郭伟, 山东省肿瘤医院放射线科 山东省济南市 250117
赵晶, 辽宁医学院组织胚胎学教研室 辽宁省锦州市 121001
赵连根, 天津市中西医结合急腹症研究所 天津市 300100
毕旭东, 2000年天津医科大学博士, 副教授, 主要从事肝胆外科临床和基础研究.
通讯作者: 毕旭东, 121001, 辽宁省锦州市人民街5段2号, 辽宁医学院附属第一医院肝胆外科. bizhaojing@sohu.com
电话: 0416-4197248
收稿日期: 2006-09-28 接受日期: 2007-01-04

Effects of Huoxue Huayu injection I pretreatment and ischemic preconditioning on liver ischemia and reperfusion injury in rats

Xu-Dong Bi, Wei Guo, Jing Zhao, Lian-Gen Zhao, Xiao-Guang Fu

Xu-Dong Bi, Xiao-Guang Fu, Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China
Wei Guo, Department of Radiology, Shandong Tumor Hospital, Ji'nan 250117, Shandong Province, China
Jing Zhao, Department of Histoembryology, Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China
Lian-Gen Zhao, Tianjin Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Institute of Acute Abdomen, Tianjin 300100, China
Correspondence to: Xu-Dong Bi, Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, 2 Renmin Street 5 Section, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China.
bizhaojing@sohu.com
Received: 2006-09-28 Accepted: 2007-01-04

Abstract

AIM: To investigate the effects of Huoxue Huayu injection I (HHI-I) pretreatment and ischemic preconditioning (IP) on hepatic ischemia and reperfusion (I/R) injury in rats and compare their efficacity.

METHODS: Eighty healthy adult male Sprague-Dawley rats were randomly and averagely divided into 4 groups: sham operation (SO) group, I/R group, ischemia preconditioning (IP) group, and HHI-I pretreatment group. After partial hepatic I/R model was made, the rats of each group were sacrificed to determine serum alanine aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH), tissue malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) level 1, 3, 6 and 24 hours after reperfusion, respectively. Tissue tumor necrosis factor alpha (TNF-α) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) mRNA levels were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction after 1 hour of reperfusion. Liver histology was observed after 3 hours of reperfusion.

RESULTS: The activities of ALT, AST, LDH, the level of MDA, and the expression of TNF-α, ICAM-1 mRNA in I/R, IP, and HHI-I group were significantly higher than those in SO group, but they were markedly lower in IP and HHI-I group than those in I/R group. The activities of ALT, AST, LDH in HHI-I group were significantly lower than those in IP group (ALT: 2378.8 ± 303.4 nkat/L *vs* 2840.6 ± 248.4 nkat/L; AST: 2887.2 ± 270.1 nkat/L *vs* 4567.6 ± 275.1 nkat/L; LDH: 10550.4 ± 710.1 nkat/L *vs* 12164.1 ± 735.1 nkat/L; all $P < 0.05$). As compared with that in the IP group, the level of MDA in HHI-I group was decreased at the 3rd and 6th hour (17.35 ± 1.39 nmol/g *vs* 21.66 ± 1.84 nmol/g, $P < 0.05$), and the mRNA expression of TNF-α and ICAM-1 were decreased (TNF-α: 0.54 ± 0.06 *vs* 0.78 ± 0.08; ICAM-1: 0.43 ± 0.03 *vs* 0.69 ± 0.11, both $P < 0.01$). The level of SOD in I/R, IP and HHI-I group was markedly lower than that in SO group ($P < 0.05$), but it was significantly higher in IP and HHI-I group than that in I/R group ($P < 0.05$). The SOD level in the animals received HHI-I was significantly increased in comparison with that in IP group (136.00 ± 12.50 nmol/g *vs* 124.70 ± 9.32 nmol/g, $P < 0.05$). Microscopy showed that liver injury in the HHI-I-treated animals and IP-treated animals were attenuated as compared with that in I/R group.

CONCLUSION: HHI-I and IP pretreatment can alleviate I/R-induced liver injury, and the

■背景资料
肝脏缺血再灌注损伤是肝脏外科手术和肝移植后常见的病理生理过程, 导致肝脏缺血再灌注损伤的原因众多, 确切机制目前仍不十分清楚. 目前, 人们认为肝脏缺血再灌注损伤是许多不同的机制相互作用的结果, 因此其防护也就有各种不同的方法. 对其机制及防治措施的研究具有重要的临床意义, 已成为肝脏移植领域的研究热点.

■创新盘点
HHI-I已制成单体, 并获国家专利保护, 他能明显抑制出血坏死性胰腺炎发病过程中白细胞募集、浸润和黏附, 我们首次将其用于肝脏缺血再灌注损伤的防护.

former is superior to the latter. The protective mechanism of HHI-I may be associated with the improvement of liver microcirculation, elimination of tissue anoxia, transcription inhibition of cytokine and cell adhesion molecule such as TNF-α and ICAM-1, and decrease of neutrophil infiltration.

Key Words: Liver ischemia reperfusion injury; Ischemia preconditioning; Huoxue Huayu injection I; Tumor necrosis factor-α; Rat

Bi XD, Guo W, Zhao J, Zhao LG, Fu XG. Effects of Huoxue Huayu injection I pretreatment and ischemic preconditioning on liver ischemia and reperfusion injury in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(8):831-837

摘要

目的: 研究活血化瘀注射液I号(HHI-I)预处理与缺血预处理(ischemic preconditioning, IP)对大鼠肝脏缺血再灌注(ischemia and reperfusion, I/R)损伤的改善作用, 并比较两者的作用效果.

方法: 健康♂SD大鼠80只, 随机分为假手术对照组(Sham组)、缺血再灌注组 (I/R组)、缺血预处理组(IP组)、HHI-I预处理组(HHI-I组), 每组20只. 建立大鼠部分肝缺血模型, 各组在I/R后1, 3, 6, 24 h分别取材, 测血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)的水平; 取左肝测组织丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)的含量. I/R后1 h RT-PCR检测肝组织中肿瘤坏死因子α (TNF-α)和细胞间黏附分子-1(ICAM-1)mRNA的表达, I/R后3 h行组织学观察.

结果: I/R组、IP组、HHI-I组的ALT, AST, LDH活性、MDA值和TNF-α, ICAM-1 mRNA表达水平均明显高于Sham组. IP组、HHI-I组低于I/R组. HHI-I组所有时间点ALT, AST, LDH明显低于IP组(ALT: 2378.8±303.4 nkat/L *vs* 2840.6±248.4 nkat/L; AST: 2887.2±270.1 nkat/L *vs* 4567.6±275.1 nkat/L; LDH: 10550.4±710.1 nkat/L *vs* 12164.1±735.1 nkat/L; P均<0.05). HHI-I组MDA值明显低于IP组(17.35±1.39 nmol/g *vs* 21.66±1.84 nmol/g, P<0.05). HHI-I组TNF-α, ICAM-1 mRNA表达水平低于IP组(TNF-α: 0.54±0.06 *vs* 0.78±0.08; ICAM-1: 0.43±0.03 *vs* 0.69±0.11, P均<0.01). 各组SOD值均低于Sham组(P<0.05), IP组、HHI-I组均高于I/R组(P<0.05), HHI-I组SOD(1, 3, 6 h)明显高于IP组(136.00±12.50 nmol/g *vs* 124.70±9.32 nmol/g, P<0.05). Sham组光镜下肝小叶结构正常; I/R组肝小叶结构紊乱, 肝细胞水肿变性; IP组肝细胞水肿明显, 部分肝细胞变性; HHI-I组肝小叶结构基本正常, 肝细胞无明显水肿.

结论: HHI-I预处理与IP均可改善I/R对肝脏造成的损伤, 前者的效果优于后者. HHI-I的保护机制可能在于改善肝脏微循环, 减轻组织缺氧状态, 并通过抑制TNF-α和ICAM-1等细胞因子和细胞黏附分子的转录表达, 减少肝组织中中性粒细胞的浸润.

关键词: 肝脏缺血再灌注损伤; 缺血预处理; 肿瘤坏死因子-α; 活血化瘀注射液I号; 大鼠

毕旭东, 郭伟, 赵晶, 赵连根, 付晓光. 活血化瘀注射液I号预处理与缺血预处理改善肝缺血再灌注损伤. 世界华人消化杂志 2007;15(8):831-837
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/831.asp

0 引言

临床外科实践中常把肝血流暂时阻断以保证手术顺利进行, 当恢复血流再灌注时, 肝脏组织细胞发生了一系列代谢、结构和功能的紊乱, 临床上称之为缺血再灌注(I/R)损伤(IRI). 他直接影响到疾病的预后、手术成功率和患者存活率. 因此, 对肝脏缺血再灌注损伤作用机制及防治措施的研究, 具有重要的临床意义. 目前, 肝脏IRI防护常用的方法有两类, 即缺血预处理(ischemia preconditioning, IP)和药物预处理. IP即在长时间的缺血前行几次短暂的IR过程, 调动机体内源性抗损伤机制, 使肝脏耐受更长时间的缺血. 药物预处理是指利用某些活性物质直接或间接的药理作用来达到类似缺血预处理的保护作用[1], 增强组织或细胞对缺血再灌注损伤的耐受性, 从而减轻损伤[2]. 国内研究证实, 一些活血化瘀中药对脏器缺血再灌注损伤具有保护作用[3]. 活血化瘀注射液Ⅰ号(HHI-Ⅰ)的有效成分是杏仁提取物, 具有很强的活血化瘀作用, 他能改善急性坏死性胰腺炎时胰腺和肠系膜的微循环增加局部血流量[4]. 大鼠肾脏缺血再灌注时应用HHI-Ⅰ亦能改善肾脏微循环, 对造模动物具有保护作用[5]. 本实验研究活血化瘀中药HHI-Ⅰ预处理对于肝脏缺血再灌注损伤的防治的效果, 并与IP的作用相比较, 以探求防治肝脏缺血再灌注损伤的最佳方法, 为将来临床肝脏切除和移植过程中IRI的预防打下坚实的理论基础.

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级健康♂ SD大鼠(由辽宁医学院

表 1 RT-PCR引物和产物

基因	基因库序列号	位点	引物序列	产物大小(bp)
β-actin	NM_031144	F	5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3'	228
		R	5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA-3'	
ICAM-1	NM_012967	F	5'-GGGGAAAGATCATACGGGTT-3'	241
		R	5'-TTTAGGCATGGTGGTTGACA-3'	
TNF-α	NM_012675	F	5'-CTCTTCAAGGGACAAGGCTG-3'	185
		R	5'-TGGAAGACTCCTCCCAGGTA-3'	

■应用要点
在经过临床试验后, 将HHI-I申报国家新药, 进行批量生产, 应用于临床肝脏切除和肝脏移植中肝缺血再灌注损伤的防护, 减少术中、术后肝功能障碍的发生, 促进肝切除和肝脏移植患者尽快的康复.

实验动物中心提供)80只, 体质量200-220 g, 随机分成4组, 每组20只. TGLL-18 g型台式高速冷冻离心机, JY92-Ⅱ超声波细胞粉粹机, DY89-Ⅰ型电动玻璃匀浆机, SHZ-88水浴恒温振荡器, UV751GD紫外/可见分光光度仪, 日立7170A型全自动生化分析仪, GeneAmp PCR system 9700, EPS 301 Power Supply电泳仪, 全自动凝胶成像系统, LKB-V超薄切片机, RM-2135组织切片机, OLYMPUS万能显微镜照相机. Taq E, PCR Buffer, $MgCl_2$(Promega), TRIzol、DNA反转录试剂盒(Invitrogen), 丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒购于南京建成生物工程研究所. HHI-Ⅰ: 天津市中西医结合急腹症研究所赵连根研究员提供HHI-Ⅰ提取物粉末, 使用前加入无菌生理盐水配成浓度为30 g/L的注射液. DEPC (Sigma). PCR引物用Primer 3.0(http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/ primer3.cgi)设计, 上海基康公司合成. 本研究所用引物名称、序列及其相关实验见表1.

1.2 方法 SD大鼠术前12 h禁食, 自由饮水. 术前100 g/L水合氯醛3.0 mL/kg ip麻醉. I/R组: 腹正中切口, 按Yoshidome *et al*[6]法, 分离出肝十二指肠韧带, 用无损伤动脉夹将肝中叶和左侧叶的动脉、门静脉和胆管一并阻断, 造成70%肝脏缺血模型, 40 min后移走动脉夹恢复灌流, 缺血前5 min分别自阴茎背静脉缓慢注射生理盐水(10 mL/kg). Sham组: 单纯麻醉和开腹, 分离出肝十二指肠韧带, 仅暴露肝中叶和左侧叶的肝蒂, 不进行阻断, 余同I/R组. IP组: 在实验前先将肝中叶和左侧叶的动脉、门静脉和胆管一并阻断缺血5 min, 然后开放血流5 min, 反复2次, 余同I/R组. HHI-Ⅰ组: 缺血前5 min自阴茎背静脉缓慢注射HHI-Ⅰ(10 mL/kg), 余同I/R组.

1.2.1 肝脏酶学和MDA, SOD实验指标的检测 各组在1, 3, 6, 24 h分别处死5只动物, 下腔静脉采血约4 mL, 注入离心管, 置于37℃温水中20 min, 2 500 r/min离心30 min, 提取血清标本-20℃保存待测; 取左肝固定部位的组织, 置于-80℃冰箱保存. 取血清1 mL全自动生化分析仪测血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)水平. 分别采用硫代巴比妥酸比色法和黄嘌呤氧化酶法测定MDA, SOD.

1.2.2 肝组织肿瘤坏死因子α(TNFα), 细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的RT-PCR检测 (1)总RNA的提取: 1 g组织置入液氮中磨成细粉, 刮入管内, 加10 mL TRIzol. 高速匀浆机打成匀浆. 9900 r/min(12 000 *g*)离心10 min(4℃), 倒出上清. 加2 mL氯仿, 剧烈摇荡15 s, 室温2-3 min. 9900 r/min离心15 min(4℃), 小心吸出上清. 加5 mL异丙醇, 室温10 min. 8600 rpm(9000 *g*)离心10 min(4℃), 保留沉淀物. 加10 mL 75 mL/L乙醇, 7600 r/min(7000 *g*)离心5 min(4℃), 保留沉淀物. 室温5-10 min, 加适量消毒过的DEPC H_2O溶解RNA. 取少量Total RNA进行变性胶电泳. (2)反转录: 经DNase I处理过的组织总RNA 9 μL(4-5 μg)和Oligo dT 1 μL混合, 72℃ 5 min, 冰上10 min; 加入8 μL反转录混合液(10×RT Buffer 2 μL, 25 mmol/L $MgCl_2$ 2 μL, 10 mmol/L dNTPs 1 μL, 0.1 mmol/L DTT 2 μL, RNase inhibitor 1 μL), PCR仪42℃ 5 min, 加入1 μL(50 U)SuperScript Ⅱ反转录酶, 42℃反应50 min; 70℃ 15 min终止反应, 置于冰上; 加入1 μL RNase H, 37℃ 20 min. C: PCR: 取逆转录产物1 μL, 10 mmol/L dNTP 0.5 μL, 25 mmol/L $MgCl_2$ 2 μL, 5 U/μL Taq聚合酶0.1 μL, 10×Reaction Buffer 2.5 μL, 6 pmol引物. 反应条件为94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 62℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30个循环; 72℃ 3 min. β-actin作为内参照标准. D: PCR产物溴乙锭染色, 2 g/L琼脂糖凝胶电泳, 全自动凝胶成像系统分析.

1.2.3 组织学检查 取甲醛固定肝组织, 梯度酒精脱水(700, 800, 900, 950 mL/L Ⅰ, Ⅱ, 1000 mL/L Ⅰ, 1000 mL/L Ⅱ), 二甲苯透明、浸腊包埋后切

■名词解释
1 缺血预处理: 肝组织经短暂的重复缺血能增加对缺血的耐受性, 减轻随后持续长时间缺血造成的损伤.
2 药物预处理: 利用某些活性物质直接或间接的药理作用来达到类似缺血预处理的保护作用, 增强组织或细胞对缺血再灌注损伤的耐受性, 从而减轻损伤.

表 2 血清AST的变化(mean ± SD, nkat/L)

分组	1 h	3 h	6 h	24 h
Sham	1723.7 ± 235.0	1797.0 ± 238.4	1882.0 ± 193.4	1743.7 ± 268.4
IR	5447.8 ± 641.8[b]	12 734.2 ± 876.8[b]	18 537.0 ± 2567.2[b]	6879.7 ± 388.4[b]
IP	4849.3 ± 368.4[bc]	8880.1 ± 691.8[bc]	14 771.3 ± 955.2[bc]	4567.6 ± 275.1[bc]
HHI–I	2858.9 ± 466.8[bce]	6441.3 ± 656.8[bce]	10 010.3 ± 851.8[bce]	2887.2 ± 270.1[bce]

[b]P<0.01 *vs* Sham组; [c]P<0.05 *vs* I/R组; [e]P<0.05 *vs* IP组.

表 3 血清ALT的变化(mean ± SD, nkat/L)

分组	1 h	3 h	6 h	24 h
Sham	1306.9 ± 226.5	1286.3 ± 117.2	1257.9 ± 121.4	1217.9 ± 123.4
IR	3569.0 ± 383.4[b]	10 163.7 ± 713.5[b]	15 116.4 ± 1008.5[b]	4047.1 ± 283.4[b]
IP	3042.3 ± 216.7[bc]	6803.0 ± 548.4[bc]	12 255.1 ± 876.8[bc]	2840.6 ± 248.4[bc]
HHI–I	2578.8 ± 328.4[bce]	5401.1 ± 361.7[bc]	8768.4 ± 698.5[bce]	2378.8 ± 303.4[bce]

[b]P<0.01 *vs* Sham 组; [c]P<0.05 *vs* I/R组; [e]P<0.05 *vs* IP组.

表 4 血清LDH的变化(mean ± SD, nkat/L)

分组	1 h	3 h	6 h	24 h
Sham	7911.6 ± 508.4	8095.0 ± 386.7	7969.9 ± 505.1	7921.6 ± 595.1
IR	19 920.7 ± 1800.4[b]	54 444.2 ± 3535.7[b]	80 632.8 ± 4517.6[b]	14 322.9 ± 781.8[b]
IP	17 503.5 ± 1070.2[bc]	34 340.2 ± 2655.5[bc]	42 375.1 ± 2633.9[bc]	12 164.1 ± 735.1[bc]
HHI–I	15 669.8 ± 1603.7[bce]	23 054.6 ± 2185.4[bce]	30 856.2 ± 2567.2[bce]	10 550.4 ± 710.1[bce]

[b]P<0.01 *vs* Sham组; [c]P<0.05 *vs* I/R组; [e]P<0.05 *vs* IP组.

片(5 μm), HE染色, 显微镜下观察.

统计学处理 利用统计软件SPSS11.0处理分析数据: 对各组同一时间点的同一指标采用多个样本均数的两两比较的方差分析, 文中所有数据均用均数±标准差表示(mean±SD).

2 结果

2.1肝功能变化 I/R组各时点AST, ALT和LDH值明显高于Sham组、IP组和HHI-I组, IP组和HHI-I组各时点AST, ALT和LDH值明显高于Sham组, IP组明显高于HHI-Ⅰ组(表2-4).

2.2 肝组织MDA、SOD含量的变化 I/R组、HHI-Ⅰ组和IP组各时间点SOD值均低于Sham组(P<0.05), HHI-Ⅰ组和IP组各时间点均高于I/R组(P<0.05), HHI-Ⅰ组SOD(1, 3, 6 h)明显高于IP组(P<0.05). 再灌注后MDA值均升高, HHI-Ⅰ组和IP组各时间点均低于I/R组(P<0.05), HHI-Ⅰ组MDA(3, 6 h)明显低于IP组(P<0.05)(表5).

2.3 肝组织TNF-α和ICAM-1的表达 缺血再灌注1 h后大鼠1 g肝组织中提取总RNA, 用RT-PCR的方法进行半定量分析. TNF-α, ICAM-1 mRNA表达量均较Sham组增高, 但IP组、HHI-Ⅰ组均低于I/R组, HHI-Ⅰ组低于IP组(P<0.01, 图1, 表6).

2.4 组织学观察 I/R后3 h, 肝组织切片HE染色光镜观察见图2.

3 讨论

肝脏缺血再灌注损伤的发生机制十分复杂[7-8], 大多数学者认为, 再灌注后细胞因子的过表达、钙超载与氧自由基的大量形成是造成肝脏缺血再灌注损伤的主要原因. 缺血缺氧使细胞能量代谢从有氧化转为无氧代谢为主, 利用糖类减少而脂肪酸供能增多, 无氧糖酵解和脂肪酸代谢的产物也对细胞有损害作用[9]. 目前认为, 肝脏缺血再灌注损伤经历两个阶段[10]: 初期是由活化的枯否细胞释放的大量氧自由基和TNFα、IL-1等细胞因子对肝细胞的直接损害; 后期是中性粒细胞介导的炎性损伤.

缺血再灌注导致氧自由基大量产生, 同时SOD活性降低. 氧自由基对细胞的主要损害是

表 5 不同组肝组织MDA含量的变化(mean ± SD, nmol/g)

分组	MDA				SOD			
	1 h	3 h	6 h	24 h	1 h	3 h	6 h	24 h
Sham	7.32 ± 0.53	7.58 ± 0.62	7.50 ± 0.60	7.47 ± 0.73	182.50 ± 13.10	181.70 ± 10.20	183.70 ± 10.20	185.5 ± 7.89
I/R	13.80 ± 1.19[b]	20.72 ± 1.34[b]	28.70 ± 2.29[b]	16.07 ± 1.738[b]	144.10 ± 8.03[b]	134.50 ± 7.45[b]	110.80 ± 9.82[b]	129.9 ± 4.98[b]
IP	11.75 ± 1.22[bc]	17.48 ± 1.71[bc]	21.66 ± 1.84[bc]	12.77 ± 1.45[bc]	154.60 ± 8.70[b]	140.90 ± 6.35[b]	124.70 ± 9.32[bc]	141.6 ± 7.74[bc]
HHI-I	10.45 ± 1.31[bc]	14.49 ± 1.89[bce]	17.35 ± 1.39[bce]	11.58 ± 2.32[bc]	169.50 ± 5.60[ce]	156.20 ± 9.88[bce]	136.00 ± 12.50[bce]	149.8 ± 8.98[bc]

[b]P<0.01 *vs* Sham组; [c]P<0.05 *vs* I/R组; [e]P<0.05 *vs* IP组.

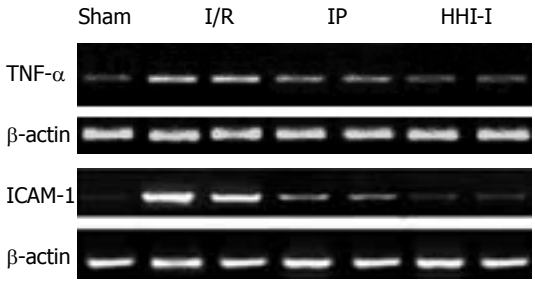


图 1 大鼠假手术组和肝缺血再灌注1 h后肝脏TNF-α和ICAM-1 mRNA的表达.

造成脂质过氧化, MDA 的产生与脂质过氧化相平行. SOD是机体清除氧自由基的重要酶, 测定其活性高低可反应机体清除自由基的能力, 而测定MDA的高低可间接反映出细胞损伤的程度. 机体在缺氧时无氧代谢加强, 乳酸含量激增, 从而引起LDH反应性增高. 血清ALT和AST水平则是反映肝损伤程度的灵敏指标. 本实验结果证实, 肝脏I/R后肝小叶结构消失, 细胞肿胀水样变性. HHI-Ⅰ预处理和IP对肝脏IRI均具有防治作用, HHI-Ⅰ预处理的效果优于IP.

微循环障碍在肝IRI的发病机制中具有重要作用, 并决定最终肝组织的损伤程度[11]. 再灌注早期阶段, 白细胞流速减缓, 其与内皮细胞及kupffer细胞的接触率上升, 导致白细胞淤滞、肝血窦网中的血流障碍[12]. 缺血区肝脏的低氧期延长, 激活Kupffer细胞和中性粒细胞[13], 合成分泌大量黏附分子、细胞因子及氧自由基, 加重肝脏微循环障碍及肝脏损伤[11,14-16]. 在肝脏缺血早期由于HHI-Ⅰ的活血化瘀功能减少了血小板在血窦内聚集, 减轻了内皮细胞肿胀和血管收缩, 降低了白细胞的附壁率及枯否细胞和中性粒细胞激活率, 从而减少了炎性细胞因子和氧自由基的产生. 因此HHI-Ⅰ可能改善了肝脏微循环、改善了缺氧状态, 从而从源头上减轻了缺血再灌注对肝脏的损伤.

缺血时肝细胞受损, 引起细胞内Ca^{2+}超载,

表 6 不同组肝组织TNF-α和ICAM-1的表达

分组	TNF-α/β-actin	ICAM-1/β-actin
Sham	0.32 ± 0.04	0.21 ± 0.04
I/R	1.34 ± 0.10[b]	1.14 ± 0.15[b]
IP	0.78 ± 0.08[bd]	0.69 ± 0.11[bd]
HHI-I	0.54 ± 0.06[bdf]	0.43 ± 0.03[bdf]

[b]P<0.01 *vs* Sham组; [d]P<0.01 *vs* I/R组; [f]P<0.01 *vs* IP组.

在再灌注时Ca^{2+}超载加重. Kupffer细胞因Ca^{2+}超载而活化, 分泌释放大量TNFα[17]. TNFα的过表达引起大量肝细胞的损害[18], 直接导致肝窦内皮细胞肿胀、肝血窦微循环障碍, 并激发Kupffer细胞产生过氧化物, 引起肝细胞的炎性坏死. 肝I/R时内皮细胞被激活导致ICAM-1表达迅速增加[19], 与中性粒细胞表面β2-整合素受体相结合, 参与白细胞在血管内皮上的滚动、黏附、移行及渗出过程[20-22], 造成中性粒细胞的大量浸润. 抗ICAM-1单抗可显著减少缺血后白细胞与内皮细胞的黏附[23], 显著减轻肝组织损伤. 而ICAM-1表达缺陷的小鼠I/R损伤程度显著轻于普通对照组小鼠[24]. 可见ICAM-1通过介导中性粒细胞和内皮细胞的黏附在IRI中起着重要作用. 肝I/R后TNFα释放的激增也诱导ICAM-1等细胞黏附分子的表达明显增加[26], 用TNFα的抗体阻断TNFα后肝内ICAM-1和中性粒细胞的数量均下降[27]. TNFα和细胞黏附分子相互作用, 进一步加重了肝脏的损伤. HHI-Ⅰ能够通过抑制上述细胞因子和细胞黏附分子的转录表达, 减轻肝组织中中性粒细胞的浸润, 从而减轻缺血再灌注对大鼠肝脏的损害, 这有可能是HHI-Ⅰ的作用机制所在.

肝组织经短暂的重复缺血能增加对缺血的耐受性, 减轻随后持续长时间缺血造成的损伤. IP涉及的机制尚不完全清楚, 可能是由于前期I/R刺激调动了机体内源性抗损伤保护机制,

■同行评价

本文通过观察认为, HHI-I对肝脏缺血再灌注损伤具有保护作用, 具体机制可能与其改善微循环的作用有关, 文章方法可靠, 结果可信, 有一定的指导意义.

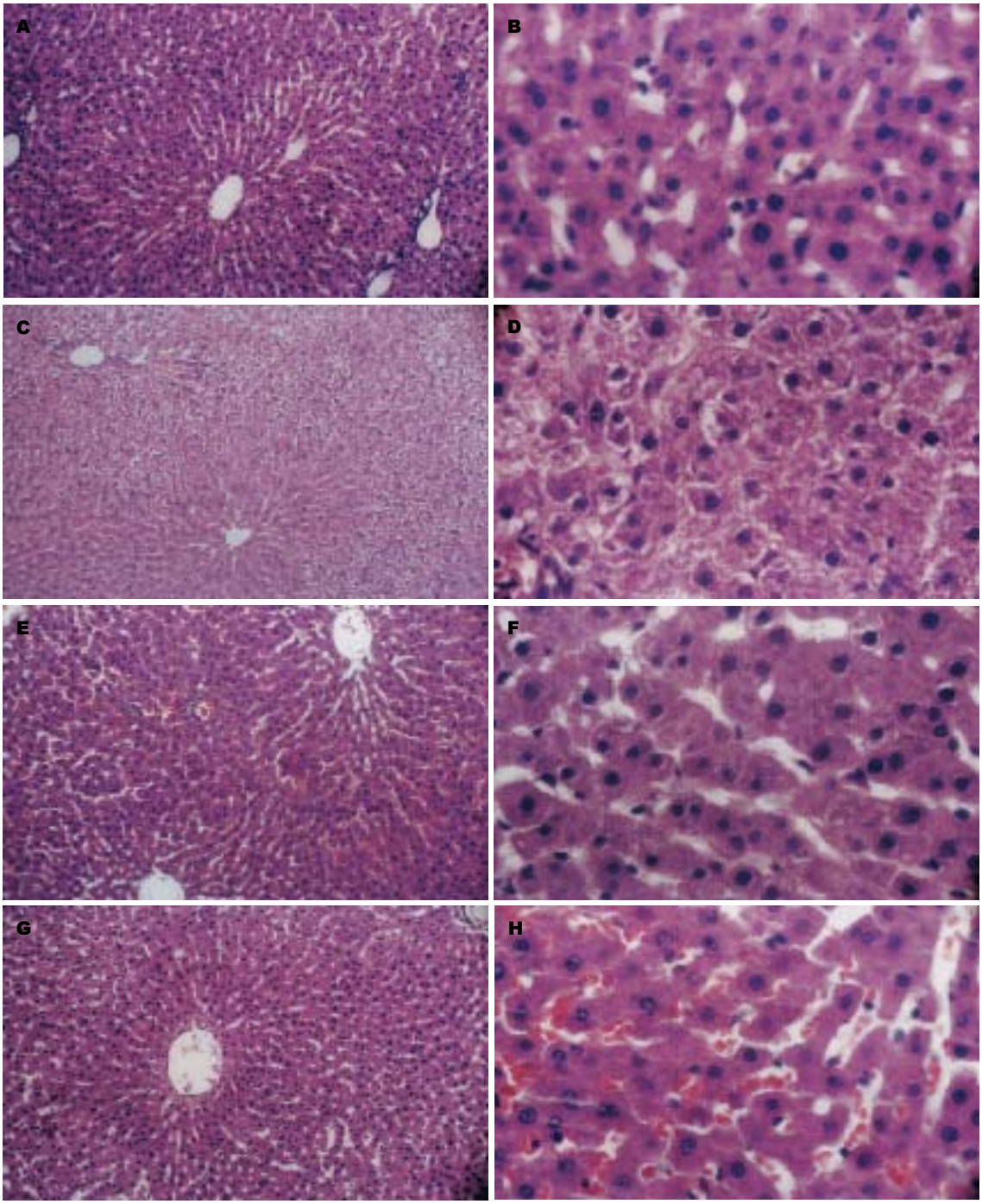


图 2 各组大鼠肝组织观察. A: Sham组(×100); B: Sham组(×400)肝小叶、肝细胞结构正常; C: I/R组(×100); D: I/R组(×400)肝小叶结构紊乱, 肝细胞水肿变性, 肝窦缩小消失; E: IP组(×100); F: IP组(×400)肝小叶结构尚可, 肝细胞水肿明显, 可见部分肝细胞变性; G: HHI-Ⅰ组(×100); H: HHI-Ⅰ组(×400)肝小叶结构正常, 肝细胞无明显水肿, 肝窦内可见红细胞淤积.

使机体对缺血损伤发生主动性适应反应[28]. IP除了即刻出现的保护作用外, 还有IP后12-72 h的延迟保护作用. 本研究证实IP对肝脏缺血再灌注损伤具有保护作用, 抑制ICAM-1和TNFα mRNA的表达, 但临床实施比较困难.

减轻肝脏缺血再灌注损伤, 可从多方面、多角度着手, 其中药物预处理因操作简单、作用环节多、效果可能优于缺血预处理[29]而具有非常广阔的应用前景. 中药安全范围大, 毒副作用小, 这为临床肝缺血再灌注损伤的防治提供了新的思路[30-31]. 对HHI-Ⅰ进行深入研究, 明确其作用机制及具体环节, 将为临床肝脏切除和移植过程中IRI的防治打下坚实的理论基础, 具有广泛的临床应用前景和价值.

4 参考文献

1 郝悦, 周新民. 左旋精氨酸对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2003; 11:

1636-1638
2 Yoshizumi T, Yanaga K, Soejima Y, Maeda T, Uchiyama H, Sugimachi K. Amelioration of liver injury by ischaemic preconditioning. *Br J Surg* 1998; 85: 1636-1640
3 孙备, 姜洪池, 赵金鹏, 朴大勋, 孙金圣, 刘凤芝, 王孝铭. 丹参对大鼠肝脏低温保存损伤的保护作用. 中华实验外科杂志 2000; 17: 233-234
4 张艳军, 赵连根, 吴咸中. 活血化瘀注射液对急性重型胰腺炎大鼠胰腺、小肠白细胞聚集的影响. 天津中医 2001; 18: 37-39
5 毕旭东, 崔乃强, 赵晶, 赵连根. 活血化瘀注射液 I 号对大鼠肾脏低温保存时超微结构及移植肾功能的影响. 中国中西医结合外科杂志 2002; 8: 331-334
6 Yoshidome H, Kato A, Edwards MJ, Lentsch AB. Interleukin-10 suppresses hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: implications of a central role for nuclear factor kappaB. *Hepatology* 1999; 30: 203-208
7 Morioka D, Kubota T, Sekido H, Matsuo K, Saito S, Ichikawa Y, Endo I, Togo S, Shimada H. Prostaglandin E1 improved the function of transplanted fatty liver in a rat reduced-size-liver transplantation model under conditions of permissible cold preservation. *Liver Transpl* 2003; 9: 79-86
8 Shah V, Kamath PS. Nitric oxide in liver transplantation: pathobiology and clinical implications. *Liver Transpl* 2003; 9: 1-11
9 孙备, 候利民, 姜洪池. 肝移植供肝保护的研究进展. 国外医学外科学分册 2000; 27: 135-138
10 Peralta C, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology* 1999; 30: 1481-1489
11 Uhlmann D, Pietsch UC, Ludwig S, Hess J, Armann B, Gaebel G, Escher E, Schaffranietz L, Tannapfel A, Fiedler M, Hauss J, Witzigmann H. Assessment of hepatic ischemia-reperfusion injury by simultaneous measurement of tissue pO_2, pCO_2, and pH. *Microvasc Res* 2004; 67: 38-47
12 Vollmar B, Richter S, Menger MD. Leukocyte stasis in hepatic sinusoids. *Am J Physiol* 1996; 270: G798-803
13 徐明清, 薛兰, 龚建平. 缺血再灌注肝脏Kupffer细胞NF-κB激活及其意义. 世界华人消化杂志 2001; 9: 1250-1253
14 Cutrn JC, Perrelli MG, Cavalieri B, Peralta C, Rosell Catafau J, Poli G. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 1200-1208
15 Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 2001; 181: 160-166
16 Fondevila C, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Hepatic ischemia/reperfusion injury-a fresh look. *Exp Mol Pathol* 2003; 74: 86-93
17 董满库, 崔彦, 陈昌玮, 周立艳, 刘子沛, 李晓鸥, 吉敏. 大鼠肝脏缺血再灌注损伤中TNF-α的变化. 世界华人消化杂志 2001; 9: 354-355
18 郭伟, 毕旭东. 肿瘤坏死因子-α与肝脏缺血再灌注损伤. 国外医学外科学分册 2005; 32: 197-200
19 Zhou T, Sun GZ, Zhang MJ, Chen JL, Zhang DQ, Hu QS, Chen YY, Chen N. Role of adhesion molecules and dendritic cells in rat hepatic/renal ischemia-reperfusion injury and anti-adhesive intervention with anti-P-selectin lectin-EGF domain monoclonal antibody. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1005-1010
20 Hess DC, Howard E, Cheng C, Carroll J, Hill WD, Hsu CY. Hypertonic mannitol loading of NF-kappaB transcription factor decoys in human brain microvascular endothelial cells blocks upregulation of ICAM-1. *Stroke* 2000; 31: 1179-1186
21 El-Wahsh M, Seifalian AM, Fuller BJ, Rolles K, Davidson BR. Induction of adhesion molecule expression in liver ischaemia-reperfusion injury is associated with impaired hepatic parenchymal microcirculation. *Br J Surg* 2004; 91: 1034-1039
22 Werner J, Z'graggen K, Fernandez-del Castillo C, Lewandrowski KB, Compton CC, Warshaw AL. Specific therapy for local and systemic complications of acute pancreatitis with monoclonal antibodies against ICAM-1. *Ann Surg* 1999; 229: 834-40; discussion 841-842
23 Vollmar B, Glasz J, Menger MD, Messmer K. Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence. *Surgery* 1995; 117: 195-200
24 Yadav SS, Howell DN, Gao W, Steeber DA, Harland RC, Clavien PA. L-selectin and ICAM-1 mediate reperfusion injury and neutrophil adhesion in the warm ischemic mouse liver. *Am J Physiol* 1998; 275: G1341-G1352
25 Kobayashi A, Imamura H, Isobe M, Matsuyama Y, Soeda J, Matsunaga K, Kawasaki S. Mac-1 (CD11b/CD18) and intercellular adhesion molecule-1 in ischemia-reperfusion injury of rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G577-G585
26 Bumgardner GL, Li J, Apte S, Heininger M, Frankel WL. Effect of tumor necrosis factor alpha and intercellular adhesion molecule-1 expression on immol/Lunogenicity of murine liver cells in mice. *Hepatology* 1998; 28: 466-474
27 Colletti LM, Cortis A, Lukacs N, Kunkel SL, Green M, Strieter RM. Tumor necrosis factor up-regulates intercellular adhesion molecule 1, which is important in the neutrophil-dependent lung and liver injury associated with hepatic ischemia and reperfusion in the rat. *Shock* 1998; 10: 182-191
28 Yamagami K, Yamamoto Y, Kume M, Kimoto S, Yamamoto H, Ozaki N, Yamamoto M, Shimahara Y, Toyokuni S, Yamaoka Y. Heat shock preconditioning ameliorates liver injury following normothermic ischemia-reperfusion in steatotic rat livers. *J Surg Res* 1998; 79: 47-53
29 宫念樵, 叶启发, 姜汉英, 郭辉, 陈金枝, 朱彤, 杨军. 药物预处理和缺血预处理对供肝保护作用的比较研究. 中华肝胆外科杂志 2000; 6: 282
30 朱新华, 仇毓东, 史敏科, 丁义涛. 苦参碱对大鼠原位肝移植冷缺血再灌注损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2006; 14 : 1675-1680
31 汪爽, 高毅, 詹兴海. 柴胡煎剂治疗肝脏缺血性损伤的形态学观察. 世界华人消化杂志 2000; 8: 159-161

电编 李琪 编辑 张焕兰

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月18日; 15(8): 838-843
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

志贺菌基因转移耐多药相关蛋白初步分析

宋春花, 黄志刚, 郗园林, 张梅喜, 段广才

■背景资料
近年来, 随着抗生素的广泛使用, 甚至滥用, 造成志贺菌频繁发生变异产生耐药株, 不断给细菌性痢疾的防治带来新的挑战. 1996年痢疾志贺菌被WHO认定为给人类带来巨大威胁的耐药性菌株, 因此深入探讨志贺菌的耐多药机制成为目前解决志贺菌耐多药的先决条件. 目前, 在向功能基因组学研究过渡中, 蛋白质组学研究成为一种非常有用的工具, 其是解析基因组所表达的真正体现生命活动规律的蛋白质的结构和功能.

宋春花, 郗园林, 张梅喜, 段广才, 郑州大学公共卫生学院流行病学教研室 河南省郑州市 450001
黄志刚, 河北工程大学医学院 河北省邯郸市 056002
宋春花, 在读博士, 主要从事分子流行病学研究.
通讯作者: 段广才, 450001, 河南省郑州市科技大道100号, 郑州大学公共卫生学院流行病学教研室. gcduan@public.zz.ha.cn
电话: 0371-66969270
收稿日期: 2006-11-07 接受日期: 2007-01-20

Primary analysis on conjugational transfer multidrug resistance-related proteins of *Shigella flexneri* strain

Chun-Hua Song, Zhi-Gang Huang, Yuan-Lin Xi, Mei-Xi Zhang, Guang-Cai Duan

Chun-Hua Song, Yuan-Lin Xi, Mei-Xi Zhang, Guang-Cai Duan, Department of Epidemiology, College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, He'nan Province, China
Zhi-Gang Huang, Medical College of Hebei Engineering University, Handan 056002, Hebei Province, China
Correspondence to: Medical College of Hebei Engineering University, Handan 056002, Hebei Province, China
Received: 2006-11-07 Accepted: 2007-01-20

Abstract

AIM: To search for the new proteins related to multidrug resistance by comparing the proteomics of whole cellular proteins between sensitive strain and conjugational transfer anti-multidrug strain of *Shigella flexneri*.

METHODS: Clinical sensitive *Shigella flexneri* strain was transduced into anti-multidrug strain by conjugational transfer trials. Immobilized pH gradient (IPG) two-dimensional electrophoresis was adopted and the gels were analyzed by Image Master 2D Platinum software. Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) were used to analyzed differential expression proteins.

RESULTS: Conjugational transfer anti-multidrug strain of *Shigella flexneri* was obtained successfully. It was found that there were 946±37 protein spots in the whole cellular protein 2-DE gels of sensitive strain and 1013±157 protein spots in that of conjugational transfer anti-multidrug strain. A total of 43 differential expression protein spots were found and 5 proteins related to multidrug resistance, including two new proteins (CRISPR-associated protein and heat shock protein chaperone Groel-Groes-Adp7), were identified based on peptide mass fingerprinting. ATP binding cassette transporter protein, cysteine synthase, predicted periplasmic or secreted lipoprotein protein were highly expressed in conjugational transfer anti-multidrug strain.

CONCLUSION: Some genes related to multidrug resistance of the donor can be transduced into sensitive strains and expressed highly. Meanwhile, the expression of some important cellular metabolic enzymes is up-regulated, and ATP binding cassette transporter protein plays an significant role in the mechanism of *Shigella flexneri* multidrug resistance.

Key Words: *Shigella flexneri*; Multidrug resistance; Proteomics; Two-dimensional electrophoresis; Mass spectrum analysis; Differential expression

Song CH, Huang ZG, Xi YL, Zhang MX, Duan GC. Primary analysis on conjugational transfer multidrug resistance-related proteins of *Shigella flexneri* strain. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(8):838-843

摘要

目的: 对志贺菌敏感株与基因转移耐多药株全菌蛋白进行蛋白质组学比较, 寻找细菌耐多药相关蛋白.

方法: 采用接合基因转移实验对临床分离鉴定志贺菌敏感株进行基因转移耐多药试验, 并对志贺菌敏感株及基因转移耐多药株全菌蛋白进行双向电泳; 电泳图谱采用Image Master 2D Platinum软件分析, 并对差异表达蛋白进行MOLDI TOF-TOF质谱分析.

结果: 成功获得志贺菌基因转移耐多药株, 在志贺菌敏感株与耐多药株全菌蛋白质图谱中分别检测出946±37个和1013±157个蛋白质

斑点; 经分析共发现43个差异表达的蛋白点, 初步对其中5个表达量增加的差异蛋白进行质谱鉴定, 基因转移耐多药株中发现两个新出现的耐多药相关蛋白分别为CRISPR 相关蛋白及Hsp60的分子伴侣蛋白(Groel-Groes-Adp7); ABC转运蛋白、胱氨酸合成酶、预测的胞浆脂蛋白表达量上调.

结论: 通过对鉴定的5个耐多药相关蛋白分析初步发现供体菌中一些耐多药相关基因通过基因转移方式插入志贺菌敏感株中并大量表达, 同时一些在细胞代谢中起重要作用的酶类表达量上调, ABC转运蛋白在志贺菌基因转移耐多药机制中也起重要作用.

关键词: 志贺菌; 耐多药; 蛋白质组学; 双向电泳; 质谱分析; 差异表达

宋春花, 黄志刚, 郗园林, 张梅喜, 段广才. 志贺菌基因转移耐多药相关蛋白初步分析. 世界华人消化杂志 2007;15(8):838-843
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/838.asp

0 引言

志贺菌引起的细菌性痢疾发病率居我国传染病发病率的前3位, 近年来随着抗生素的广泛使用, 甚至滥用, 造成志贺菌频繁发生变异产生耐药株, 且耐药率高、耐药产生速度快、耐药范围广, 不断给细菌性痢疾的防治带来新的挑战, 1996年痢疾志贺菌被WHO认定为给人类带来巨大威胁的耐药性菌株, 因此深入探讨志贺菌的耐多药机制成为目前解决志贺菌耐多药的先决条件. 本课题拟选用对抗生素敏感的一株志贺菌为受体菌, 以一株耐多药埃希氏大肠杆菌为供体菌, 以接合转移方式构建出耐多药菌株, 通过比较敏感株与基因转移耐多药株蛋白质双向电泳图谱, 研究与志贺菌耐多药相关蛋白, 并对表达差异蛋白进行基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MOLDI TOF-TOF)分析和数据库检索, 旨在探索其耐多药机制.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 (1)标准株: 福氏痢疾杆菌标准株, 菌株号51571-9(中国药品生物制品检定所); (2)敏感株及耐多药埃希氏大肠杆菌: 采用改良K-B纸片法[1], 从临床分离鉴定的志贺菌株中, 筛选1株对头孢噻吩(cephalothin, CF)、诺氟沙星(norfloxacin, NOR)、庆大霉素(gentamycin, GM)、磺胺甲基异恶唑(cotrimoxazole, SMZ)均敏感的福氏志贺菌作为敏感株; 对以上4种抗生素均耐药的致病性大肠杆菌为接合基因转移实验的供体菌, 标准株作对照.

1.1.2 试剂与仪器 头孢噻吩等抗生素均为标准品(中国药品检验中心). 固相pH梯度干胶条(immobiline pH gradient, IPG, pH3-10, L = 24 cm); IPG缓冲液、IPG覆盖液、两性电解质pharmalyte(pH3-10)、3-[(3-胆酰胺丙基)-乙二胺]-1-丙磺酸[3-(3-cholamidopropyl-dimethylammonio)-1-propanesulfonate, CHAPS] (Amersham Pharmacia公司). 丙烯酰胺、尿素(urea)、二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺(IAA)、蛋白酶抑制剂丙甲基磺酰氟(PMSF)、亮抑蛋白酶肽(leupeptin)(美国Sigma公司). 固相pH梯度等电聚焦仪IPGphor IEF System, 垂直板电泳仪、ImageScanner光密度扫描仪、图像分析系统(均为AmershamPharmacia公司).

1.2 方法

1.2.1 志贺菌敏感株与耐多药大肠埃希菌接合转移实验 将志贺菌敏感株作为受体菌, 耐多药大肠埃希菌作为供体菌, 参照文献2的方案进行, 将供、受体菌分别接种于4 mL LB肉汤37℃过夜, 后按10∶1比例混合培养过夜. 吸取0.1 mL涂布于含约4倍最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)的CF, NOR, GM, SMX的S.S.琼脂, 取无色透明菌落在相同琼脂上传代一次, 再于普通琼脂上活化后测其耐药谱.

1.2.2 蛋白质双向电泳 (1)蛋白提取方法: 采用超声兼Urea-CHAPS-DTT-SB_{3-10}裂解提取法[3], 略作改进; (2)可溶性总蛋白定量: 应用BradFord法[4]对提取的可溶性总蛋白进行定量; (3)第一相固相pH梯度等电聚焦: 按文献[5]的方案, 程序分别为30 V 7 h, 60 V 7 h, 150 V 0.5 h, 300 V 1 h, 600 V 1 h, 8000 V 12 h; (4)平衡: 按文献[5]的方案; (5)第二相垂直板SDS-PAGE电泳: 按文献[3]的方案; (6)染色: 银染按Amersham Bioscience的银染方案稍作改进[5]. 考马斯亮蓝染色按Neuhoff *et al*[6]的方法进行; (7)图像扫描分析: 用Amersham Bioscience的扫描仪投射扫描, 分辨率为300 dpi. 数字化图像文件运用Image Master 2D Platinum软件分析. 图像分析过程包括蛋白质斑点的检测、量化、背景扣除、匹配. 蛋白质斑点经自动检测后进行手工校对, 匹配之前先选一块胶作为参考凝胶, 其

■**研发前沿**
细菌产生耐药性不仅可以水平传播, 也可以自身诱导产生, 尤其是细菌的耐多药. 细菌耐多药是多基因、多蛋白参与的一个复杂过程, 而目前的研究多局限于某一机制的个别基因及蛋白, 不但难以解释细菌耐多药的全部现象, 更不能全面揭示细菌耐多药的分子基础及机制. 因此, 细菌的耐药机制亟待解决.

■相关报道
Liao *et al*曾对志贺菌标准株作过全菌蛋白质双向电泳, 共得到488的个蛋白质点. 在研究细菌耐多药机制方面, 陈川*et al*在研究嗜水气单胞菌耐四环素的蛋白质组学时发现, ABC转运蛋白在耐药株中表达量显著增加, CRISPR作为细胞中的可移动序列, 其表达的蛋白质家族能够形成保守的蛋白簇, 在宿主的防御机制、基因复制及调节系统中起重要作用.

他凝胶都与之匹配.

1.2.3 质谱分析 (1)质谱样品制备: 比较双向电泳图谱, 找到差异蛋白, 切下1 mm^3含差异蛋白点的凝胶, 置于1. 5 mL的Eppendorf管中, 按文献[7]方法处理样品; (2)质谱鉴定: 样品按照1∶1的比例, 与含有α-氰基-羟基苯丙烯酸的500 g/L乙腈/1 g/L甲酸的溶液混合. 所有质谱在4700型MALDI TOF-TOF蛋白质分析系统下获得. 选择反射式阳离子捕获方式, 质量精确度为50 mg/L; MS光谱质量范围800-4000 Da.

1.2.4 数据库检索 光谱在全球蛋白服务工作站(global protein server workstation, GPS)进行处理和分析; 搜索在NCBInr蛋白数据库进行; 鉴定GPS可信区间应>95%. 搜索参数设置: 相对分子质量误差范围为±20%, 肽片段相对分子质量误差范围为±0.5 Da, 每个肽允许有1个不完全裂解位点, 物种选择细菌; 蛋白质身份确定: 根据搜索结果并结合蛋白质在凝胶上的等电点和相对分子质量进行最终确定; 要求肽段覆盖率>15%, 匹配肽段至少4个, 等电点和相对分子质量与观察值基本相符.

2 结果

2.1 接合转移耐多药结果 志贺菌出发菌株的MIC分别为头孢噻吩(CF) 32 mg/L、诺氟沙星(NOR)0.5 mg/L、庆大霉素(GM)2 mg/L、磺胺甲基异恶唑(SMZ)512 mg/L, 经与耐多药大肠杆菌接合转移实验后, MIC分别是头孢噻吩256 mg/L、诺氟沙星4.0 mg/L、庆大霉素20 mg/L、磺胺甲基异恶唑5120 mg/L的基因转移耐多药志贺菌. 将基因转移后耐多药的志贺菌作药敏试验, 结果4种药物的抑菌环直径均为0 cm(标准株主要用于在药敏实验时的质控菌, 故其结果未在此列出).

2.2 蛋白质双向电泳图谱比较 (1)敏感株: 相同实验条件及参数设置情况下, 对志贺菌可溶性总蛋白重复3次进行双向电泳分离, 发现3次双向电泳图谱非常相似, 蛋白质上样量为100 μg, pH3-10, 24 cm线性干胶条通过Image Master 2D Platinum分析软件对其进行点检测, 获得946±37个蛋白质斑点(图1A); (2)志贺菌基因转移耐多药株: 对志贺菌基因转移耐多药株可溶性总蛋白重复3次进行双向电泳分离, 获得3块凝胶的平均蛋白质点数为1013±157(图1B). 经过背景消减后, 将其中一块胶作为参考凝胶进行匹配, 匹配点数为998±24, 其匹配率为98.52%.

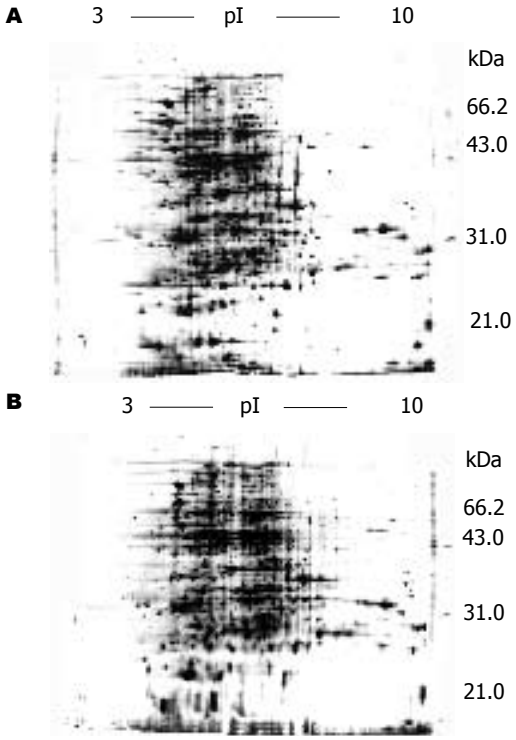


图 1 蛋白质双向电泳图谱. A: 志贺菌敏感株蛋白质; B: 志贺菌基因转移耐多药株蛋白质. 蛋白质上样量100 μg; 第一向pI3−10, 24 cm线性干胶条; 第二向应用125 g/L聚丙烯酰胺凝胶(银染).

2.3 2种菌株蛋白质差异表达谱分析 以基因转移耐多药株双向凝胶图谱为参考凝胶, 与敏感株双向凝胶图谱进行匹配, 匹配蛋白质点数为640±19, 匹配率为65.12%, 共发现43个差异表达的蛋白点, 其中8个蛋白点只存在于基因转移耐多药株中, 6个蛋白点只存在于敏感株中, 还有29个蛋白点在两株菌株中表达量相差5倍以上, 其中22个蛋白点随着志贺菌由敏感株向耐多药株转变而表达量增加, 7个蛋白点表达量下降(图2-3).

2.4 质谱鉴定结果 在考马斯亮蓝染色的凝胶上选取5个在基因转移耐多药株表达量增加的差异点进行肽指纹图谱鉴定, 其中Z202和Z204为新出现蛋白, Z200, Z201及Z98号点表达量增加(表1).

3 讨论

Liao *et al*[8]曾对志贺菌标准株作过全菌蛋白质双向电泳, 共得到488的个蛋白质点, Ying *et al*[9]及Jennison *et al*[10]也分别对其外膜蛋白进行双向电泳, 但临床分离志贺菌全菌蛋白质双向电泳图谱尚无文献报导, 本研究成功构建了志贺

表 1 志贺菌基因转移耐多药株表达量上调蛋白质谱鉴定结果

蛋白序号	SWISS-PROT登陆序列号	最高分	分子量等电点	序列覆盖率(%)	蛋白质(分类)
Z98	NCBInlr gi|75242664	178	59 255 5.96	30	ABC-type dipeptide transport system, periplasmic (Escherichia coli F11)
Z204	NCBInr gi|76795666	80	34 906 5.23	29	CRISPR-associated protein TM1801 [Thermoanaerobacter ethanolicus ATCC 33223]
Z202	NCBInr gi|61679964	211	55 124 4.87	49	Chain N, Groel-Groes-Adp7 (Escherichia coli)
Z200	NCBInr gi|75187168	209	34 484 5.83	71	Cysteine synthase [Escherichia coli E24377A]
Z201	NCBInr gi|75176024,	84	19 388 5.43	42	Predicted periplasmic or secreted lipoprotein [Shigellaboydii BS512]

■**创新盘点**
从全蛋白组出发, 较全面深入揭示志贺菌耐多药的分子基础, 首次构建来自同一临床分离志贺菌敏感株的基因转移耐多药株, 排除了非同源差异. 通过本项研究, 初步获得志贺菌基因转移耐多药机制的部分相关蛋白质, 其中有一些可能为新发现的耐多药相关蛋白.

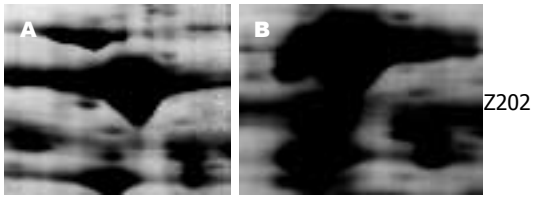


图 2 Z202号蛋白点只存在于基因转移耐多药株. A: 敏感株; B: 基因转移耐多药株.

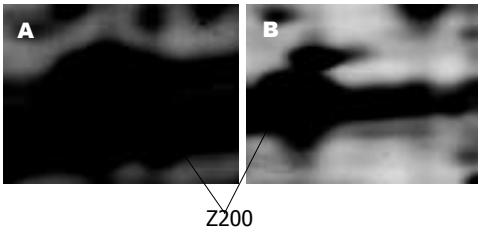


图 3 表达量有差别的蛋白点. Z200号蛋白在基因转移耐多药中表达量增加. A: 基因转移耐多药株; B: 敏感株.

菌的全菌蛋白图谱, 由于我们改进了全菌蛋白提取方法及电泳染色方案, 分别获得946及1013个蛋白质斑点, 远高于Liao *et al*[8]报导的488个蛋白质斑点.

Jansen *et al*[11]于2002年发现一个新的主要在原核细胞中出现的规律的成簇插入的DNA重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR), 片段大小约为21-37 bp, 此可移动重复序列与先前在细菌与古细菌之间发现的横向基因转移成分[12]一样, 存在于半数以上的原核生物基因组中, 在基因组上大多有两个以上CRISPR位点, 这些CRISPR与DNA的新陈代谢及基因的表达有关[11]. CRISPR作为细胞中的可移动序列, 其表达的蛋白质家族能够形成保守的蛋白簇[13], 在宿主的防御机制[14-15]、基因复制及调节系统中[16-17]起重要作用. 本研究通过对敏感株与基因转移耐多药株双向电泳图谱分析发现, CRISPR相关蛋白为在基因转移耐多药株中新出现蛋白, 可见此短片段DNA重复序列是在基因转移耐多药过程中从供体菌转移入受体菌中, 并在受体菌中表达, 可能为一种新的耐多药相关蛋白, 推测其在耐多药机制中起调节作用, 能增强一些耐多药基因的表达, 从而导致细菌出现耐多药.

Z202号蛋白Hsp60的分子伴侣蛋白(Groel-Groes-Adp7): 分子伴侣蛋白为在生物大分子的折叠、组装、转运及降解等过程中起协助作用, 参与协助抗原的呈递和遗传物质的复制、转录及构象的确立; 参与细胞周期调控、抗衰老、凋亡调控等, 但自身并不发生任何变化的一大类广泛存在于生物体内的蛋白质分子[18]. Hartl *et al*[19]研究发现, 分子伴侣与新生肽链结合, 阻止新生肽链折叠成天然构象或聚集, 使其保持能够跨膜转运出去的分子构像, 利于跨膜转运. 我国杨运桂 *et al*[20]研究发现, 在过量表达GroEL的宿主菌中, 周质分泌蛋白总量较对照组提高了约52%, 同时也增加了靶蛋白的溶解性. 在本次研究中, 我们发现, 出发菌株志贺菌敏感株并未分离出此蛋白, 但经与耐多药大肠杆菌接合基因转移后, 此蛋白不但出现, 而且表达量很高, 推测在大剂量药物冲击这个应激条件刺激下, 首先编码GroEL的基因通过接合基因转移整合入志贺菌敏感株基因组中, 或通过质粒传递进入敏感株中, 并且在新宿主菌中大量表达, 防止新生的耐多药相关蛋白质发生聚集或折叠, 保证他们的正确构象, 增强耐多药相关蛋白质活性, 籍此适应新的宿主环境.

■应用要点
通过本项研究, 可以同时获得志贺菌基因转移耐多药机制的相关蛋白质, 对阐明细菌耐多药的分子机制、进行耐药监测及控制、开展药物研制都具有重要价值.

ABC外排系统为细菌多重耐药主动流出机制之一, 肿瘤细胞膜上此蛋白过量表达, 以便药物顺利进入细胞也会很快被泵出, 形成多样抗药性[21-23]. Jessup *et al*[24]发现, ABC转运系统可以把胆固醇从巨噬细胞中排出, 陈川 *et al*[25]在研究嗜水气单胞菌耐四环素的蛋白质组学时发现ABC转运蛋白在耐药株中表达量显著增加, Loiseau *et al*[26]发现, ABC转运系统在利什曼原虫的抗药性中起重要作用. Sipos *et al*[27]也发现, ABC转运子在真菌的多药耐受性中起重要作用. 此前我们关于志贺菌多重耐药机制研究发现另一主动外排系统acrAB-tolC多重耐药泵在临床多重耐药志贺菌中广泛存在[28], 本文结果显示, 98号ABC转运蛋白(ATP binding cassette transporter protein)在志贺菌基因转移耐多药株中表达量上调, 表明虽然ABC转运蛋白也存在于志贺菌敏感株中, 但在志贺菌基因转移耐多药株中表达量明显增加, 将结构不同药物泵出胞外, 导致胞内药物达不到有效浓度而导致细菌耐多药, 可见此蛋白在志贺菌的耐多药机制中也起重要作用.

我们发现, 在接合转移耐多药株中Z200号胱氨酸合成酶(cysteine synthase)表达量显著增加: 胱氨酸合成酶是生物体内合成胱氨酸的主要酶, 有研究表明枯草芽孢杆菌胱氨酸合成酶是与硫同化相关基因表达的一个通用负调控子[29], 但胱氨酸合成酶在志贺菌耐多药中的作用机制尚无报导, 推测此酶在耐多药机制中起着调控子的作用. 质谱分析结果表明201号蛋白为一种预测的胞质脂蛋白, 分子量较小为19388 Da, 在接合转移株表达量显著增加, 说明此胞质脂蛋白在志贺菌接合转移耐多药中起一定作用, 可能与药物的转运及多重耐药信号的传导有关, 但其与耐多药相关功能尚需进一步作N端或C端测序.

本文从全蛋白组角度探讨志贺菌的基因转移耐多药机制, 并且在实验中使用一株出发菌株通过基因转移产生耐多药, 排除菌株不同而导致的差异, 可比性较高. 我们的后续研究将会发现更多与志贺菌基因转移耐多药相关蛋白, 从而为志贺菌耐多药分子机制及新型抗菌药物开发研制提供基础资料.

4 参考文献

1 张朝武, 周宜开. 现代卫生检验. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 762-780
2 刘志远, 许淑珍, 马纪平. 高耐庆大霉素粪肠球菌质粒接合转移试验的方法探讨. 中华医院感染学杂志 2005: 15; 12-14
3 贾继辉, 于修平, 郭辉玉, 张茂修, 陈春燕, 王红艳. 幽门螺杆菌蛋白质组双向电泳图谱的构建及其相关技术体系的建立. 山东大学学报(医学版) 2003; 41: 225-227
4 Marshak DR, Kadonaga JT, Burgess RR, et al.蛋白质纯化与鉴定实验指南. 朱厚础译. 第1版. 北京: 科学出版社, 2000: 158-159
5 Berkelman T, Stenstedt T. 2-D electrophoresis using immobilized pH gradients: principles & Methods. Amersham Pharmacia Biotech Inc Press, 1998: 14-35
6 Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 1988; 9: 255-262
7 Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996; 68: 850-858
8 Liao X, Ying T, Wang H, Wang J, Shi Z, Feng E, Wei K, Wang Y, Zhang X, Huang L, Su G, Huang P. A two-dimensional proteome map of Shigella flexneri. *Electrophoresis* 2003; 24: 2864-2882
9 Ying TY, Wang JJ, Wang HL, Feng EL, Wei KH, Huang LY, Huang PT, Huang CF. Immunoproteomics of membrane proteins of Shigella flexneri 2a 2457T. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6880-6883
10 Jennison AV, Raqib R, Verma NK. Immunoproteome analysis of soluble and membrane proteins of Shigella flexneri 2457T. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6683-6688
11 Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* 2002; 43: 1565-1575
12 Nelson KE, Clayton RA, Gill SR, Gwinn ML, Dodson RJ, Haft DH, Hickey EK, Peterson JD, Nelson WC, Ketchum KA, McDonald L, Utterback TR, Malek JA, Linher KD, Garrett MM, Stewart AM, Cotton MD, Pratt MS, Phillips CA, Richardson D, Heidelberg J, Sutton GG, Fleischmann RD, Eisen JA, White O, Salzberg SL, Smith HO, Venter JC, Fraser CM. Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of Thermotoga maritima. *Nature* 1999; 399: 323-329
13 Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, Nelson KE. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol* 2005; 1: e60
14 Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol* 2005; 60: 174-182
15 Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in Yersinia pestis acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* 2005; 151: 653-663
16 Boysen A, Ellehauge E, Julien B, Sogaard-Andersen L. The DevT protein stimulates synthesis of FruA, a signal transduction protein required for fruiting body morphogenesis in Myxococcus xanthus. *J Bacteriol* 2002; 184: 1540-1546
17 Thony-Meyer L, Kaiser D. devRS, an autoregulated and essential genetic locus for fruiting body

development in Myxococcus xanthus. *J Bacteriol* 1993; 175: 7450-7462
18 Girshovich AS, Bochkareva ES, Todd MJ, Lorimer GH. On the distribution of ligands within the asymmetric chaperonin complex, GroEL14.ADP7. GroES7. *FEBS Lett* 1995; 366: 17-20
19 Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 2002; 295: 1852-1858
20 杨运桂, 童芹, 郑卫东, 钱友存, 杨胜利, 龚毅. 分子伴侣过量表达对蛋白质分泌及可溶性的影响. 中国生物化学与分子生物学报 2000; 16: 382-387
21 Johnstone RW, Ruefli AA, Smyth MJ. Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein? *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 1-6
22 Kim RB. Transporters and xenobiotic disposition. *Toxicology* 2002; 181-182: 291-297
23 Ding S, Gong BD, Yu J, Gu J, Zhang HY, Shang ZB, Fei Q, Wang P, Zhu JD. Methylation profile of the promoter CpG islands of 14 "drug-resistance" genes in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3433-3440
24 Jessup W, Gelissen IC, Gaus K, Kritharides L. Roles of ATP binding cassette transporters A1 and G1, scavenger receptor BI and membrane lipid domains in cholesterol export from macrophages. *Curr Opin Lipidol* 2006; 17: 247-257
25 陈川, 王三英, 彭宣宪. 嗜水气单胞菌耐四环素的蛋白质组学初步研究. 微生物学报 2004; 44: 396-398
26 Loiseau PM, Bories C. Mechanisms of drug action and drug resistance in Leishmania as basis for therapeutic target identification and design of antileishmanial modulators. *Curr Top Med Chem* 2006; 6: 539-550
27 Sipos G, Kuchler K. Fungal ATP-binding cassette (ABC) transporters in drug resistance & detoxification. *Curr Drug Targets* 2006; 7: 471-481
28 杨海燕, 段广才, 郗园林. 主动外排系统acrAB在志贺菌中的分布和表达. 中国公共卫生 2005; 21: 685-688
29 Albanesi D, Mansilla MC, Schujman GE, de Mendoza D. Bacillus subtilis cysteine synthetase is a global regulator of the expression of genes involved in sulfur assimilation. *J Bacteriol* 2005; 187: 7631-7638

■同行评价
本文初步分析了志贺菌基因转移耐多药相关蛋白, 文章撰写较流畅, 目的明确, 具有一定的指导意义.

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)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月18日; 15(8): 844-848
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床研究 CLINICAL RESEARCH

感染后肠易激综合征与溃疡性结肠炎缓解期患者肠黏膜细胞因子表达的相关性

鞠 辉, 刘希双, 王光兰, 尹晓燕, 刘 华, 戴素美

■背景资料
研究表明, IBS与IBD之间可能存在某种联系, 本文研究了PI-IBS与UC缓解期患者结肠黏膜P物质、IL-2与IFN-γ的表达, 从神经-免疫机制分析二者之间的关系.

鞠辉, 刘希双, 王光兰, 尹晓燕, 刘华, 戴素美, 青岛大学医学院附属医院内镜诊治中心 山东省青岛市 266003
鞠辉, 2006年青岛大学医学院消化内科专业硕士, 主要从事消化内窥镜诊治工作.
通讯作者: 刘希双, 266003, 山东省青岛市, 青岛大学医学院附属医院内镜诊治中心. liuxishuang1@sina.com
电话: 0532-82911525
收稿日期: 2006-12-23 接受日期: 2007-01-25

Correlation between post-infective irritable bowel syndrome and cytokine expression in intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis in remission

Hui Ju, Xi-Shuang Liu, Guang-Lan Wang, Xiao-Yan Yin, Hua Liu, Su-Mei Dai

Hui Ju, Xi-Shuang Liu, Guang-Lan Wang, Xiao-Yan Yin, Hua Liu, Su-Mei Dai, Center of Endoscopic Diagnosis and Therapy, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical School, Qingdao 266003, Shandong Province, China
Correspondence to: Xi-Shuang Liu, Center of Endoscopic Diagnosis and Therapy, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical School, Qingdao 266003, Shandong Province, China. liuxishuang1@sina.com
Received: 2006-12-23 Accepted: 2007-01-25

Abstract
AIM: To investigate whether the mucosal cytokines is differently expressed between post-infective irritable bowel syndrome (PI-IBS) and ulcerative colitis (UC) in remission.

METHODS: SABC immunohistochemistry was used to detect the mucosal expression of substance P (SP), interleukin-2 (IL-2), and interferon-γ (IFN-γ) in 26 PI-IBS patients, 45 UC patients, and 30 controls.

RESULTS: The positive rates of mucosal IFN-γ, IL-2 and SP were significantly higher in the descending colon and rectum of PI-IBS patients than those in the controls (IFN-γ: χ^2 = 13.781, 14.012, P < 0.01; IL-2: χ^2 = 13.890, 13.931, P < 0.01; SP intensity: t = 3.623, 3.722, P < 0.01; SP area: t = 3.454, 3.561, P < 0.01), but not markedly different from those in UC patients. The SP intensity and area were also significantly higher in the IFN-γ- and IL-2-positive descending colon and rectum of PI-IBS patients than those in the controls (intensity: t = 2.202, 2.220, P < 0.05; area: t = 2.301, 2.252, P < 0.05), but not notably different from those in UC patients.

CONCLUSION: The cytokine expression has no marked difference between PI-IBS and UC. There may be some correlation between PI-IBS and inflammatory bowel disease (IBD), and IBS is probably a low-grade IBD according to neuro-immune mechanism.

Key Words: Irritable bowel syndrome; Ulcerative colitis; Substance P; Cytokine

Ju H, Liu XS, Wang GL, Yin XY, Liu H, Dai SM. Correlation between post-infective irritable bowel syndrome and cytokine expression in intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis in remission. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(8):844-848

摘要
目的: 探讨感染后肠易激综合征(PI-IBS)与溃疡性结肠炎(UC)缓解期患者结肠黏膜细胞因子表达的相关性.

方法: PI-IBS组26例, UC组45例及对照组30例, 结肠镜下活检降结肠和直肠黏膜标本, 采用免疫组化SABC法检测其肠黏膜P物质(SP)与IL-2, IFN-γ的表达情况.

结果: PI-IBS组降结肠和直肠黏膜IFN-γ和IL-2阳性率表达、SP强度均值和面积高于对照组(IFN-γ: χ^2 = 13.781, 14.012, P<0.01; IL-2: χ^2 = 13.890, 13.931, P<0.01; SP强度: t = 3.623, 3.722, P<0.01; SP面积: t = 3.454, 3.561, P< 0.01), 但与UC组患者无显著差异. 降结肠、直肠黏膜IFN-γ, IL-2阳性表达的PI-IBS患者, SP强度均值(t = 2.202, 2.220, P<0.05)、面积高于对照组(t = 2.301, 2.252, P<0.05), 与UC组患者也无显著差异.

结论: PI-IBS和UC缓解期患者细胞因子表达无显著差异. 从神经-免疫机制上分析认为IBS与炎症性肠病(IBD)之间存在某种相关性, IBS可能是轻微的IBD.

关键词: 肠易激综合征; 溃疡性结肠炎; P物质; 细胞因子

鞠辉, 刘希双, 王光兰, 尹晓燕, 刘华, 戴素美. 感染后肠易激综合征与溃疡性结肠炎缓解期患者肠黏膜细胞因子表达的相关性. 世界华人消化杂志 2007;15(8):844-848
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/844.asp

0 引言

临床研究发现约1/3肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)患者在其患病前曾有急性胃肠道感染史; 部分被肠道病毒、细菌或寄生虫感染的患者, 在病原体已清除及黏膜炎症消退后, 可发生IBS样的症状, 称之为感染后肠易激综合征(post-infective irritable bowel syndrome, PI-IBS)[1-2]. 炎症性肠病(IBD)包括溃疡性结肠炎(UC)和克隆病(CD), 其缓解期与IBS之间存在许多相似的临床表现, 研究表明IBS与IBD之间可能存在某种联系. UC缓解期常表现为肠易激样综合征(Irritable bowel like syndrome, IBLS), 其特点是在UC缓解期内, 具有类似IBS的腹痛、腹泻症状而缺乏胃肠道结构或生化异常, 单独给予5-氨基水杨酸治疗效果欠佳[3]. 在初始诊断为IBS患者随访中发现, 患IBD的危险度显著升高, 相对危险度为16.3, 提示IBS与IBD之间的确存在某种相关性[4]. IBD的发生机制之一是免疫介导对黏膜损伤造成的, 近年来, 神经-免疫机制成为IBS发生机制中研究热点之一. 我们研究了PI-IBS与UC缓解期患者(以下简称UC患者)结肠黏膜P物质(SP)、IL-2与IFN-γ的表达, 从神经-免疫机制分析二者之间的关系.

1 材料和方法

1.1 *材料* 2004-09/2005-07青岛大学医学院附属医院内科门诊PI-IBS患者 26例, 男9例, 女17例, 平均年龄39.9±10.6岁; PI-IBS纳入标准: (1)罗马Ⅱ诊断标准; (2)出现IBS症状前至少1 d有胃肠道急性感染病史, 且治疗未超过5 d而治愈, 没有复发者. 排除标准: (1)有肠道器质性疾病及手术史者; (2)有全身其他系统器质性疾病者; (3)孕妇和哺乳期妇女. UC患者45例, 男25例, 女20例, 平均年龄40.7±13.5岁. UC缓解期纳入标准: 既往经肠镜诊断为UC; 具有类似IBS的腹痛、腹泻症状而缺乏胃肠道结构或生化异常, 肠镜下观察肠黏膜未见明显充血、水肿、渗出等, 单独给予5-氨基水杨酸治疗效果欠佳. 设对照组30例, 男12例, 女18例, 平均年龄38.45±10.90岁. 纳入标准: 为结肠息肉电切除术后复查无异常发现者(术后至少半年)或因大便带少量鲜血行结肠镜检查诊断为痔疮者, 无其他消化道症状与体征, 无免疫疾病、感染病史, 无近期服药史. 兔抗人IL-2抗体、兔抗人IFN-γ抗体及SABC试剂盒均购自武汉博士德生物工程公司, 抗人P物质多克隆抗体(ZA-0235北京中杉金桥生物技术有限公司提供).

1.2 *方法* 分别取降结肠、直肠黏膜各2块, 40 g/L甲醛固定, 石蜡包埋, 所有蜡块均行4 μm连续切片, 每例每部位各取一张切片HE染色, 进行常规病理组织学诊断. 切片常规脱蜡, 梯度乙醇水洗, 双氧水室温孵育10 min, 放入枸橼酸钾缓冲液(pH7)中5 min, 后进行微波修复10 min, PBS缓冲液冲洗15 min, 水洗去PBS, 滴加兔抗人P物质多克隆抗体(兔抗人IL-2抗体、兔抗人IFN-γ抗体), PBS缓冲液冲洗15 min, 滴加通用型IgG抗体(Fab段)-HRP多聚体, 37℃孵育20 min, PBS缓冲液冲洗5 min×3次, 水洗去PBS, 滴加新鲜配置的DAB显色剂. 采用双盲法判断结果, 每张切片选择有代表性的区域, 并避开切片周边区域. 对IFN-γ, IL-2染色的判断, 根据阳性细胞百分数和染色强度进行分级[5], 阳性细胞0%-5%, 计0分; 6%-25%,计1分; 26%-50%,计2分; 51%-75%, 计3分; >75%, 计4分. 同时根据胞质着色程度计分: 未染色0分; 淡黄色1分; 棕黄色2分; 棕褐色3分. 两组计分相加, 0-1分为阴性; 2-3分为弱阳性; 4-5分为阳性; 6-7分为强阳性. 对SP行定量分析用VIDAS图像分析系统, 检测其吸光度*A*值.

统计学处理 采用SPSS10.0统计软件包进行处理, 应用方差分析和*t*检验.

2 结果

PI-IBS患者降结肠、直肠黏膜均经HE染色, 显微镜下观察见黏膜上皮完整, 黏膜下及固有腺之间可见少量淋巴细胞及浆细胞浸润, 个别可见少量中性粒细胞浸润, 与对照组相比, 差异无显著性. UC患者降结肠、直肠黏膜经HE染色, 显微镜下观察无中性粒细胞, 伴有少量慢性炎症细胞, 伴或不伴腺上皮与黏膜肌层间隙增大, 隐窝排列紊乱.

■创新盘点
本文提出, 从神经-免疫机制上分析, IBS与IBD之间存在某种相关性, IBS可能是轻微的IBD.

■应用要点
该研究对今后IBS的治疗可能会产生一定的影响，并且为今后从神经－免疫－内分泌网络机制分析二者的相关关系提供一定的实验基础.

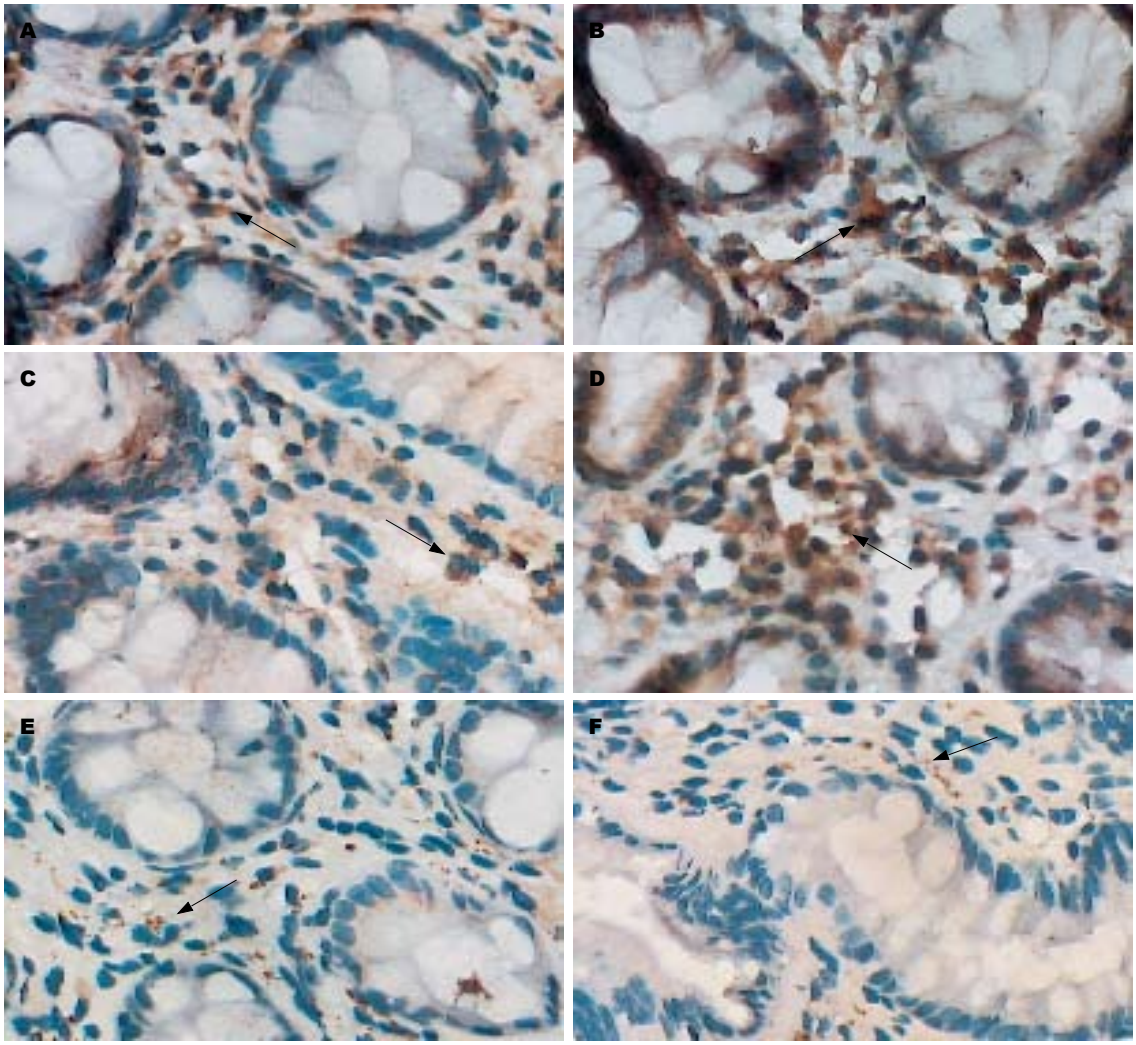


图 1 患者结肠黏膜IL-2，IFN-γ, SP表达(→)×400. A, C, E: PI-IBS; B: D: F: UC; A-B: IL-2; C-D: IFN-γ; E-F: SP.

2.1 肠黏膜IFN-γ, IL-2的表达 IFN-γ, IL-2的表达在降结肠、直肠黏膜固有膜, 呈现棕黄色, 分布于腺体周围(图1A-D). PI-IBS患者降结肠IFN-γ, IL-2阳性表达高于对照组(χ^2 = 13.781, 13.890, P<0.01), 直肠IFN-γ, IL-2阳性表达高于对照组(χ^2 = 14.012, 13.931, P<0.01); UC患者降结肠IFN-γ, IL-2阳性表达高于对照组(χ^2=15.021, 14.992, P<0.01), 直肠IFN-γ, IL-2阳性表达高于对照组(χ^2 = 14.389, 14.152, P<0.01); PI-IBS患者降结肠IFN-γ, IL-2阳性表达与UC患者比较, 差异无统计学意义(χ^2 = 2.220, 2.302, P>0.05); 直肠IFN-γ, IL-2阳性表达与UC患者比较, 差异无统计学意义(χ^2 = 2.290, 2.323, P>0.05)(表1).

2.2 SP的表达 SP分布于腺体周围的固有层中, 呈散在点状或簇状分布(图1E-F). PI-IBS患者降结肠、直肠黏膜SP强度均值高于对照组(t = 3.623, 3.722, P<0.01), 面积高于对照组(t = 3.454, 3.561, P<0.01); UC患者降结肠、直肠黏膜SP强度均值高于对照组 (t = 3.992, 3.892, P<0.01), 面积高于对照组(t = 4.214, 4.120, P<0.01); PI-IBS患者降结肠、直肠的SP强度均值与UC患者比较(t = 1.528, 1.643, P>0.05), 面积与UC患者比较(t = 1.732, 1.875, P>0.05), 差异无统计学意义(表1). 降结肠、直肠黏膜IFN-γ, IL-2阳性表达的PI-IBS患者, SP强度均值高于对照组(t = 2.202, 2.220, P<0.05), 面积高于对照组(t = 2.301, 2.252, P<0.05). 降结肠、直肠黏膜IFN-γ, IL-2阳性表达的UC患者, SP强度均值高于对照组(t = 2.425, 2.528, P<0.05), 面积高于对照组(t = 2.435, 2.503, P<0.05). 降结肠、直肠黏膜IFN-γ, IL-2阳性表达的PI-IBS患者SP强度均值与UC患者比较, 差异无统计学意义(t = 1.584,1.676, P>0.05); 面积与UC患者比较, 差异无统计学意义(t = 1.702, 1.785, P>0.05)(表2).

3 讨论

IBS的病因和发病机制迄今还不完全清楚. 神经-

表 1 各组间肠黏膜IFN-γ, IL-2以及SP强度均值与面积的表达

		PI-IBS组 (n = 26)	UC组(%) (n = 45)	对照组(%) (n = 30)
降结肠	IFN-γ(%)	88.5[b]	91.1[b]	30.0
	IL-2(%)	84.6[b]	88.9[b]	23.3
	SP强度均值	14.8 ± 2.3[b]	15.5 ± 2.9[b]	8.8 ± 2.3
	SP面积	2878.9 ± 450.0[b]	2981.2 ± 482.3[b]	2200.6 ± 432.1
直肠	IFN-γ(%)	80.8[b]	84.4[b]	26.7
	IL-2(%)	69.2[b]	82.2[b]	20.0
	SP强度均值	13.8 ± 2.6[b]	15.0 ± 2.6[b]	8.9 ± 2.0
	SP面积	2850.6 ± 510.5[b]	2945.2 ± 521.3[b]	2120.8 ± 456.4

[b]P<0.01 *vs* 对照组. SP免疫反应阳性纤维的强度与面积为免疫组化分析软件的相对值, 高倍视野(×400)下总的视场面积为260×100.

■名词解释
肠易激样综合征(IBLS): 其特点是在UC缓解期内, 具有类似IBS的腹痛、腹泻症状而缺乏胃肠道结构或生化异常, 单独给予5-氨基水杨酸治疗效果欠佳.

免疫学说是新近提出的观点之一. IBD患者尤其是其缓解期患者与IBS患者, 有很多症状交错, 如腹痛和腹泻等. Bercik *et al*[6]提出IBS可能是轻微的IBD.

SP是一种主要的促炎症性感觉性神经肽, 腹泻型IBS患者血浆中SP水平升高, SP可能以循环激素的方式作用于乙状结肠平滑肌, 使运动增强而致腹泻; SP可以通过与非胆碱能的传递促进肠道的蠕动; 通过特异性受体活化内皮细胞钙离子依赖性NO合酶, 促进NO合成, 增加血管通透性; 刺激黏膜下分泌运动神经以增加黏膜离子的转运[7], 从而发生腹泻. SP表达的增加还可以通过刺激胆碱能神经和依赖NO的抑制性神经系统, 引起肠道压力的升高, 诱发痛觉过敏的发生. 肠道发生感染后, 炎症可致使SP表达增加[8]. 我们的实验表明, PI-IBS与IBLS患者肠黏膜SP表达高于对照组, 且PI-IBS组与UC组之间表达无明显差异. IBS患者尤其是腹泻型IBS肠黏膜SP含量升高, 可能与其结肠高动力, 黏液分泌增多而致腹泻有关[9]. 实验发现UC患者的ENS由胆碱能神经节变为SP神经节[10], 可能导致腹泻. PI-IBS与UC患者的肠黏膜结构变化有相似之处, 都存在SP阳性神经纤维的表达增加[11], 我们的结果与之相似.

IL-2与IFN-γ是主要的Th1细胞因子, 二者可以促进血管通透性增加, 促使组织胺、花生四烯酸代谢产物(PGD2, LTC4, LTD4, TXE4)、血小板活化因子(PAF)表达增多, 使平滑肌收缩增强, 肠道蠕动增加, 导致腹泻[12]. 肠道感染对肠黏膜屏障、传入神经及免疫功能的影响, 最终导致肠道分泌功能、运动功能及内脏感知的改变. 我们发现, PI-IBS患者降结肠、直肠黏膜的IL-2和IFN-γ表达均高于对照组增加, 与李延青 *et al*[5]的研究结果相似. UC组肠黏膜IL-2, IFN-γ表达分别高于PI-IBS组, 不过差异无显著性. PI-IBS和UC患者肠黏膜存在的低度炎症可破坏肠黏膜上皮屏障功能, 增加其通透性, 引起水钠吸收障碍而产生腹泻[13]; 同时也引起抗原的过度暴露以及刷状缘的缺失, 从而激活肠黏膜免疫系统, 引起包括肥大细胞、淋巴细胞、内分泌细胞在内的各种炎症及免疫细胞增加, 释放多种细胞因子[14]. 在IBD中Th1/Th2平衡受细胞因子的调节(IL-12, IFN-γ, IL-4及IL-10是参与调节的重要因子), 细胞因子失调可引起Th1/Th2失衡[15]; IBS患者肠黏膜存在Th1/Th2细胞因子的漂移[5]. 在细胞免疫方面, 二者也存在相似性, IBD肠黏膜病变部位的T细胞出现凋亡抵抗[16]; IBS患者存在T淋巴细胞功能减弱和调节紊乱[17].

表 2 IBS患者结肠黏膜IFN-γ, IL-2阳性表达与SP强度均值的关系(mean ± SD)

部位	细胞因子	PI-IBS组	UC组	对照组
降结肠	IFN-γ阳性	15.1 ± 3.2[a]	16.8 ± 3.6[a]	9.8 ± 2.9
	IL-2阳性	14.9 ± 3.2[a]	15.6 ± 3.4[a]	9.6 ± 3.1
直肠	IFN-γ阳性	14.6 ± 3.0[a]	16.9 ± 3.8[a]	9.2 ± 2.2
	IL-2阳性	15.0 ± 3.3[a]	16.8 ± 3.9[a]	10.8 ± 3.2

[a]P<0.05 *vs* 对照组.

PI-IBS和UC患者降结肠、直肠黏膜IFN-γ和IL-2阳性表达的SP的表达高于对照组, 差异有统计学意义. 我们推测PI-IBS和UC患者肠黏膜IFN-γ, IL-2的表达与SP表达有关, 这可能是黏膜免疫系统和传入神经末梢之间交互作用. 感染可能促使SP表达增加, SP与炎症细胞表面的SP受体结合, (主要是neurokinin-1, NK-1)结合, 促使Th1细胞释放IFN-γ, IL-2和IL-12等因子, 诱发Th1型反应, 破坏肠黏膜上皮屏障功能[18], 出现IBS样症状.

■同行评价
本文通过检测PI-IBS和UC缓解期患者降结肠、直肠黏膜SP、IFN-γ和IL-2的表达, 发现二者肠黏膜的细胞因子表达差异无统计学意义, 从神经-免疫机制上分析认为IBS与IBD之间存在某种相关性, 支持IBS可能是轻微的IBD观点, 研究方法合理, 结论依据充分.

IBS和IBD都存在免疫系统的异常. IBS患者易产生少量的抗炎因子, 与IBD相似[19]. 在肠道感染3 mo后患感染后IBS的患者, 肠道黏膜淋巴细胞轻微的增加[20]. 在IBD缓解期内炎症反应减轻, 炎症细胞、固有层淋巴细胞表达少量增加, 而且改变的结肠运动模式得到改善, 表明结肠的功能障碍依赖于炎症的程度. 研究认为IBLS主要与肠道免疫异常有关, 神经-内分泌-免疫轴体系被激活, 从而导致IBLS的发生[21]. 在IBS中存在异常的免疫细胞活化及炎症介质的异常分泌[22-23]. 通过电镜及免疫组化的方法还发现在神经细胞及免疫活性细胞之间具有更多的膜-膜接触及活性介质异常分泌[24].

通过检测PI-IBS和UC缓解期患者降结肠、直肠黏膜SP、IFN-γ和IL-2的表达, 我们发现二者肠黏膜的细胞因子表达差异无统计学意义, 从神经-免疫机制上分析认为IBS与IBD之间存在某种相关性, 支持IBS可能是轻微的IBD, 对今后IBS的治疗可能会产生一定的影响. 不过进行IBS与IBD的前瞻性研究, 会更有利于分析二者之间的相关关系.

4 参考文献

1 肖海刚, 郭津. 细菌性痢疾与肠易激综合征相关性分析. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1012-1014
2 Neal KR, Barker L, Spiller RC. Prognosis in post-infective irritable bowel syndrome: a six year follow up study. *Gut* 2002; 51: 410-413
3 Isgar B, Harman M, Kaye MD, Whorwell PJ. Symptoms of irritable bowel syndrome in ulcerative colitis in remission. *Gut* 1983; 24: 190-192
4 Garcia Rodriguez LA, Ruigomez A, Wallander MA, Johansson S, Olbe L. Detection of colorectal tumor and inflammatory bowel disease during follow-up of patients with initial diagnosis of irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 306-311
5 李延青, 张海燕, 左秀丽, 袁海鹏, 卢雪峰, 李君曼. 肠易激综合征患者肠黏膜Th1/Th2漂移的研究. 中华消化杂志 2004; 24: 728-731
6 Bercik P, Verdu EF, Collins SM. Is irritable bowel syndrome a low-grade inflammatory bowel disease? *Gastroenterol Clin North Am* 2005; 34: 235-245
7 董文珠, 李兆申, 邹多武, 许国铭, 邹晓平, 朱爱勇, 尹宁, 龚燕芳. 肠易激综合征患者肠黏膜肥大细胞与P物质的相关性. 中华内科杂志 2003; 4: 611-614
8 Koon HW, Zhao D, Zhan Y, Simeonidis S, Moyer MP, Pothoulakis C. Substance P-stimulated interleukin-8 expression in human colonic epithelial cells involves protein kinase Cdelta activation. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 314: 1393-1400
9 Porcher C, Baldo M, Henry M, Orsoni P, Jule Y, Ward SM. Deficiency of interstitial cells of Cajal in the small intestine of patients with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 118-125
10 Tornblom H, Lindberg G, Nyberg B, Veress B. Full-thickness biopsy of the jejunum reveals inflammation and enteric neuropathy in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2002; 123: 1972-1979
11 Tough IR, Lewis CA, Fozard J, Cox HM. Dual and selective antagonism of neurokinin NK(1) and NK(2) receptor-mediated responses in human colon mucosa. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2003; 367: 104-108
12 Qian BF, El-Salhy M, Melgar S, Hammarstrom ML, Danielsson A. Neuroendocrine changes in colon of mice with a disrupted IL-2 gene. *Clin Exp Immunol* 2000; 120: 424-433
13 Collins SM, Piche T, Rampal P. The putative role of inflammation in the irritable bowel syndrome. *Gut* 2001; 49: 743-745
14 Spiller RC, Jenkins D, Thornley JP, Hebden JM, Wright T, Skinner M, Neal KR. Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute Campylobacter enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut* 2000; 47: 804-811
15 Kanai T, Kawamura T, Dohi T, Makita S, Nemoto Y, Totsuka T, Watanabe M. TH1/TH2-mediated colitis induced by adoptive transfer of CD4+CD45RBhigh T lymphocytes into nude mice. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 89-99
16 Neurath MF, Finotto S, Fuss I, Boirivant M, Galle PR, Strober W. Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease: to die or not to die, that is the mucosal question. *Trends Immunol* 2001; 22: 21-26
17 贾勇, 王巧民, 戴海明. 肠易激综合征T淋巴细胞亚群变化及其意义. 临床消化病杂志 2002; 14: 60-61
18 王巍峰, 杨云生, 孙刚, 彭丽华. 肠易激综合征大鼠P物质能神经通路的改变. 世界华人消化杂志 2005; 13: 214-218
19 Gonsalkorale WM, Perrey C, Pravica V, Whorwell PJ, Hutchinson IV. Interleukin 10 genotypes in irritable bowel syndrome: evidence for an inflammatory component? *Gut* 2003; 52: 91-93
20 Dunlop SP, Jenkins D, Neal KR, Spiller RC. Relative importance of enterochromaffin cell hyperplasia, anxiety, and depression in postinfectious IBS. *Gastroenterology* 2003; 125: 1651-1659
21 Pace F, Molteni P, Bollani S, Sarzi-Puttini P, Stockbrugger R, Bianchi Porro G, Drossman DA. Inflammatory bowel disease versus irritable bowel syndrome: a hospital-based, case-control study of disease impact on quality of life. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 1031-1038
22 Neunlist M, Aubert P, Toquet C, Oreshkova T, Barouk J, Lehur PA, Schemann M, Galmiche JP. Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. *Gut* 2003; 52: 84-90
23 Magro F, Vieira-Coelho MA, Fraga S, Serrao MP, Veloso FT, Ribeiro T, Soares-da-Silva P. Impaired synthesis or cellular storage of norepinephrine, dopamine, and 5-hydroxytryptamine in human inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 216-224
24 Stoyanova II, Gulubova MV. Mast cells and inflammatory mediators in chronic ulcerative colitis. *Acta Histochem* 2002; 104: 185-192

电编 李琪 编辑 张焕兰

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月18日; 15(8): 849-854
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

肝素酶: 一种新的广谱的肿瘤转移相关抗原在中晚期肿瘤免疫治疗中的作用研究进展

杨仕明, 汤旭东, 陈 婷, 熊 震, 陈 陵, 蔡永国, 房殿春

杨仕明, 汤旭东, 陈婷, 熊震, 陈陵, 蔡永国, 房殿春, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化病研究所 重庆市 400038
国家自然科学基金资助项目, No.30200123, No.30570841
通讯作者: 杨仕明, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化病研究所. shimingyang@yahoo.com
电话: 023-68765184
收稿日期: 2006-12-21 接受日期: 2007-01-10

Heparanase: a new universal metastasis-associated antigen in the immunotherapy for the advanced cancers

Shi-Ming Yang, Xu-Dong Tang, Ting Chen, Zhen Xiong, Ling Chen, Yong-Guo Cai, Dian-Chun Fang

Shi-Ming Yang, Xu-Dong Tang, Ting Chen, Zhen Xiong, Ling Chen, Yong-Guo Cai, Dian-Chun Fang, Institute of Gastroenterology of Chinese PLA, Southwest Hospital of the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30200123 and No.30570841
Correspondence to: Yang Shi-Ming, Institute of Gastroenterology of Chinese PLA, Southwest Hospital of the Third Military Medical University, Chongqing 400038. shimingyang@yahoo.com
Received: 2006-12-21 Accepted: 2007-01-10

Abstract

Heparanase (Hpa) was an endo-β-D-glucuronidase that can cleave heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) and has been implicated in tumor angiogenesis and metastasis. It has been reported that Hpa was expressed in almost all the advanced tumors, especially in metastatic tumors, and in contrast, down-regulation of Hpa could inhibit the metastasis of tumors. These results indicated that Hpa could serve as a new universal tumor-metastasis-associated antigen in the immunotherapy for the advanced tumors. Development of Hpa vaccine may establish a new method for the treatment of the advanced tumors. In this review, structure and functions of Hpa and its possibility as a new universal antigen in the immunotherapy of the advanced tumors were discussed.

Key Words: Heparanase; Tumor; Immunotherapy

Yang SM, Tang XD, Chen T, Xiong Z, Chen L, Cai YG, Fang DC. Heparanase: a new universal metastasis-associated antigen in the immunotherapy for the advanced cancers. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(8):849-854

摘要

肝素酶(Hpa)是裂解硫酸乙酰肝素蛋白多糖的唯一酶类, 能破坏细胞外基质及基底膜, 参与肿瘤血管生成, 与肿瘤的侵袭转移密切相关. 目前的研究表明, Hpa在大多数中晚期肿瘤中都有表达, 尤其在转移性肿瘤中强表达, 而Hpa表达的下调可以抑制肿瘤细胞的转移, 提示Hpa可以作为一种广谱的肿瘤转移相关抗原用于中晚期肿瘤的免疫治疗. Hpa疫苗的开发可望为中晚期肿瘤的治疗开辟新的途径. 本文详细综述了Hpa的结构与功能、对肿瘤转移的促进作用及其机制、以及其作为肿瘤转移相关抗原用于中晚期肿瘤免疫治疗的可能性.

关键词: 肝素酶; 肿瘤; 免疫治疗

杨仕明, 汤旭东, 陈婷, 熊震, 陈陵, 蔡永国, 房殿春. 肝素酶: 一种新的广谱的肿瘤转移相关抗原在中晚期肿瘤免疫治疗中的作用研究进展. 世界华人消化杂志 2007;15(8):849-854
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/849.asp

■背景资料
肝素酶是近年来发表的与肿瘤转移相关的新基因, 在中晚期肿瘤中高表达, 因此已有许多研究表明, 肝素酶可以作为肿瘤疗的新靶位. 由于肝素酶在大部分中晚期肿瘤中表达. 而在正常组织细胞中仅有少量表达. 因此, 肝素酶有可能作为一种肿瘤相关抗原用于肿瘤的治疗.

0 引言

树突状细胞(dendritic cells, DC)是目前发现的体内功能最强的, 也是唯一能激活初始T淋巴细胞(native T cell)的抗原提呈细胞(APC). DC起源于骨髓$CD34^+$细胞, 他能高水平的表达与抗原递呈有关的MHC-Ⅰ类和MHC-Ⅱ类分子, DC细胞摄取肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA)后, 呈递给T细胞, 激活相应的$CD4^+$T细胞和$CD8^+$T细胞. DC还可以靠表达的黏附分子与T细胞膜表面的相应配体CD28和CTLA-4的相互作用而活化Th细胞, 使Th细胞产生大量的细胞因

■相关报道
国内已有研究表明, 将肝素酶全长基因负载树突状细胞, 可以诱导产生肝素酶特异性CTL, 对肝素酶阳性且MHC相匹配的肿瘤细胞具有杀伤作用, 而对肝素酶阳性但MHC不相匹配的肿瘤细胞不具有杀伤效应; 更为可喜的是, 这种肝素酶特异性CTL对肝素酶阳性的淋巴细胞亦不具有杀伤效应, 提示肝素酶作为肿瘤相关抗原应用于临床的安全性. 近期, 国外亦有一篇文献采用生物信息学技术, 预测到了肝素酶的特异性抗原表位, 这种表位对肝素酶阳性且MHC相匹配的乳腺癌细胞具有明显的杀伤效应, 而对肝素酶阴性或MHC不相匹配的乳腺癌细胞不具有杀伤效应.

子, 进一步调节活化的Th细胞, 以增强机体的细胞免疫和体液免疫功能, 发挥主动免疫的抗肿瘤作用[1]. 将TAA与DC相结合, 通过DC对肿瘤抗原的高效提呈作用激发机体的特异性抗肿瘤免疫反应是肿瘤免疫治疗的一个热门课题. 目前多采用TAA致敏的DC免疫机体, 以产生抗原特异性的抗肿瘤反应. 肿瘤患者虽然DC功能处于失常状态[2], 但亦有研究表明肿瘤患者的T细胞能被其自身负载TAA的DC所激活, 患者自身的DC被肿瘤相关抗原负载后, 亦可激发机体产生TAA特异性的细胞毒T淋巴细胞(CTL)反应, 对自身肿瘤细胞具有强烈的细胞毒作用, 而对自身的正常细胞不具溶解作用[3-4].

肿瘤细胞要发生转移, 就必须同时破坏构成细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的两种主要成分: 结构蛋白和蛋白多糖. 在过去的10多年中, 研究兴趣大多集中在以结构蛋白为底物的基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)上, 但后来发现MMPs至少有17种[5], 所有MMPs合起来几乎能够降解所有的细胞外基质的结构蛋白成分, 对其中一个酶的抑制会有代偿的途径进行弥补, 这样以结构蛋白为底物的蛋白酶的抑制剂就很难在抗肿瘤转移中发挥很好的作用. 而近年来发现的肝素酶(heparanase, Hpa)是唯一能裂解ECM内蛋白多糖主要成分硫酸乙酰肝素蛋白多糖(heparan sulfate proteoglycans, HSPG)的内源性糖苷内切酶, 研究表明抑制Hpa后可明显抑制肿瘤细胞的扩散与转移[6-8], 故Hpa作为抗肿瘤治疗新靶点具有很好的应用前景. 那么Hpa能否作为一种TAA用于中晚期肿瘤的免疫治疗呢? 本文就Hpa在中晚期肿瘤免疫治疗的可能性作一综述.

1 Hpa的结构与功能

人类Hpa基因位于染色体4q21.3, 基因全长50 kb, 内含14个外显子和13个内含子, 转录两种mRNA, 一种为5 kb大小的Hpa-1a型, 另一种为1.7 kb大小的Hpa-1b型. 在免疫系统, 如脾及外周血白细胞内, Hpa基因主要转录前者, 而在胎盘、血小板及W138/VA13细胞系, 则主要转录后者[6]. 两种亚型均含有相同的开放读码框架, 编码含有543个氨基酸的Hpa蛋白前体, 其相对分子质量为M_r 61192. 在正常情况下, Hpa分布于胸腺、脾脏、淋巴结、骨髓、血小板、中性粒细胞、活化的T淋巴细胞、B淋巴细胞等免疫组织及胎盘中, 此外, 胎肝中也见分布. 以外周白细胞表达水平最高, 其次为胎盘. 除胎盘外的非免疫组织中未见或极少表达[8,10-13]. 其生理功能有: (1)帮助胚泡附着于子宫内膜, 促进胎盘的发育和功能形成过程; (2)在损伤或炎症时, Hpa可通过降解基底膜HSPG从而帮助免疫细胞渗出到无血管区, 并且释放和调节促细胞增生因子和促血管生成因子, 加快创面愈合, 帮助组织修复[14].

2 Hpa对肿瘤扩散及转移中的促进作用及其机制

已有大量研究证明了Hpa对肿瘤扩散及转移的促进作用. 研究者先后对多种肿瘤(胃癌[15-16], 肝癌[17], 胰腺癌[18-20], 结肠癌[21], 乳腺癌[8,10,22], 卵巢癌[23], 血液系肿瘤[24], 前列腺癌[25], 膀胱癌[26-27], 淋巴瘤及黑色素瘤[28-29], 口腔鳞状细胞癌[30], 嗜铬细胞瘤[31])采用RT-PCR技术检验肿瘤细胞内Hpa mRNA表达水平, 或用免疫组化荧光染色技术检验Hpa蛋白含量, 均发现肿瘤恶性程度越高, 转移潜能越大, 生长速度越快的肿瘤细胞, 其Hpa mRNA的表达水平越高, 而良性肿瘤则低水平表达, 瘤旁正常组织则不表达; 将鼠Hpa cDNA转染至无转移潜能的小鼠淋巴瘤细胞系Eb和低转移潜能的黑色素瘤细胞系, 其转染细胞能够高水平表达Hpa的稳定克隆后, 这些肿瘤细胞获得了高转移潜能, 接种到裸鼠肝脏后的转移性及致死能力均明显升高[28-29]. 这表明低转移潜能肿瘤细胞可通过导入Hpa cDNA获得高转移潜能. 此外, 具有高转移潜能的肿瘤或细胞系应用Hpa抑制剂后, 肿瘤细胞转移的数量和部位均明显减少[32-34], 可进一步证明Hpa具有促进肿瘤细胞转移的作用. 这些研究结果表明, Hpa促进肿瘤的扩散与转移的作用是确凿无疑的. 其机制有如下几点: (1)促进血管生成. 在肿瘤的生长转移中, 血管的生成提供了非常便利的物质基础和通道. Vlodavsky *et al*[35]发现, 在体外将EBT淋巴瘤细胞转染Hpa基因后, 其血管生成能力增加了3-4倍, 并且认为Hpa通过直接、间接两种方式发挥促血管生成作用. Hpa可直接作用于内皮细胞以生芽方式促进血管生成; bFGF平时以无活性形式与乙酰肝素结合贮存于ECM中, 当HSPG被Hpa裂解时, 可将结合的具有高度活性的HS-bFGF复合物从微环境中释放出来, 间接诱发血管生成反应. 而bFGF是目前认为极有活性的血管生成因子(angiogenesis factor)之一[8,10,36], 同时也是强有力的有丝分裂促进因子.

此外, 另一种被固化在HSPG上的血管生成因子, 即血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在Hpa裂解HSPG的过程中也得到释放并被激活, 与bFBF共同诱导肿瘤血管生成[37]; (2)通过两种途径破坏ECM, BM. 降解HSPG, 与其他基质降解酶(如MMPs、丝氨酸蛋白酶)协同破坏、降解ECM和BM屏障[28,36]; 促进释放内皮下尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase type-plasminogen activator, u-PA)及组织型纤溶酶原激活物(tissue type-plasminogen activator, t-PA), 激活纤溶酶原, 活化MMPs, 裂解ECM、BM中结构蛋白. t-PA和u-PA还可通过活化表皮生长因子(epidermic growth factor, EGF), 激活细胞外基质中的蛋白质酶联反应, 使膜的屏障功能减退[38]; (3)介导细胞黏附. 表达于细胞表面的Hpa可直接介导细胞对ECM及BM的黏附, 引起细胞在基质中的扩散以及促进BM的重塑而帮助肿瘤细胞侵入血管[39]; (4)增加癌细胞迁移能力. Hpa裂解HSPG后产生的HS(heparan sulfate)片段可激活HS的受体CD44v3(CD44 variant exon 3), 发出细胞内迁移信号, 促使细胞变形, 运动, 从而促进肿瘤细胞的扩散与转移[40]. (5)抑制活化T淋巴细胞. 此外, 该酶降解HSPG后的产物可以抑制活化的T淋巴细胞的生物学功能, 从而引起免疫抑制[9,37], 使肿瘤的转移更容易.

总之, Hpa通过降解BM和ECM中的HSPG, 破坏限制肿瘤转移的屏障, 释放活性物质, 产生链式反应, 加快血管生成, 加强肿瘤细胞的运动能力, 促进肿瘤生长和转移, 这已成为肿瘤进展的重要机制之一.

3 Hpa作为一种广谱的肿瘤相关抗原用于肿瘤免疫治疗的可能性

有效的肿瘤免疫治疗要求肿瘤相关抗原必须是肿瘤特异性的, 在正常组织和细胞中不表达或少有表达, 只有这样, 这种抗原诱导产生的免疫效应只对肿瘤细胞有效, 而对正常细胞几乎没有作用, 从而避免自身免疫性疾病的产生. 理想的肿瘤应符合: (1)在绝大多数肿瘤组织中表达从而可以广泛应用; (2)只表达于肿瘤细胞以避免自身免疫反应; (3)不表达于正常成熟组织以避免免疫耐受; (4)在肿瘤的发生、发展过程中具有不可替代的作用, 以避免抗原缺失; (5)能诱导足够强度的免疫反应并导致肿瘤消退; (6)同时包含有MHCⅠ和MHCⅡ类分子, 从而可诱导$CD4^+$和$CD8^+$T细胞反应[41].

Hpa是目前发现的唯一的一种能够降解ECM及BM中HSPG的酶类[6-8], 在正常组织中除淋巴细胞、骨髓等少有表达外, 在正常成熟的非免疫组织中(如心、肺、肝脏、骨骼肌及胰腺等)均不表达, 但在几乎所有的转移性恶性肿瘤细胞中普遍存在[15-31]. 由于Hpa的活化, 肿瘤细胞不仅可以突破ECM及BM屏障, 而且还可以释放多种因子, 促进肿瘤新生血管的生成及肿瘤细胞的局部定殖, Hpa的活化是肿瘤细胞发生转移的一个重要因素[28,36-37]. 某些肿瘤细胞为逃避免疫监视而下调肿瘤相关抗原的表达, 但如果为逃避免疫监视而下调Hpa的表达, 其本身就足以抑制肿瘤细胞的增殖及转移. 因此, Hpa可以作为一种广谱的肿瘤转移相关抗原用于中晚期肿瘤的免疫治疗.

基于以上认识, 我们在国家自然科学基金的资助下(No. 30200123), 将Hpa全长基因序列克隆到pDC315腺病毒载体中, 在HEK-293细胞中进行同源重组, 将Hpa的腺病毒修饰体外培养的DC细胞, 结果发现这种Hpa修饰的DC可以诱导产生Hpa特异性的CTL细胞, 对肝素酶阳性且HLA-A2匹配的KATO-Ⅲ胃癌细胞、SW-480结肠癌细胞等具有明显的免疫杀伤效应, 而对肝素酶阳性但HLA-A2不匹配的SGC-7901胃癌细胞不具有免疫杀伤效应, 进一步研究发现, 这种Hpa特异性的CTL对自体淋巴细胞不具有杀伤效应, 我们的研究还发现, Hpa修饰的DC刺激的效应细胞与KATO-Ⅲ共孵育后, 其IFN-γ的表达明显高于空病毒修饰组以及IL-2刺激组, 而经Hpa修饰的DC刺激的特异性效应细胞与SGC-7901或自体淋巴细胞孵育后所检测的IFN-γ在各组间无明显差别, 以上研究表明Hpa修饰的DC疫苗可以诱发特异性CTL, 对HLA相匹配且肝素酶阳性的肿瘤细胞具有良好的免疫杀伤活性, 而对自体淋巴细胞不具有免疫杀伤作用, 是一种安全有效的肿瘤免疫基因治疗的靶位[42-44].

目前的免疫学研究表明, $CD8^+$T细胞所识别的靶抗原需先经抗原递呈后, 以“抗原肽-MHCⅠ类分子”复合物的形式呈现于抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC)或靶细胞表面, 才能被$CD8^+$T细胞所识别. 相应的与主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)Ⅰ类分子结合的抗原肽即为CTL表位(cytotoxic T lymphocyte epitopes)[45]. 随着对免疫应答分子机制的深

■**应用要点**
研究和开发肝素酶疫苗, 对肿瘤、尤其是中晚期肿瘤的治疗可能具有很好的治疗价值.

■同行评价
肝素酶是近年研究的焦点之一, 有关他的文章国内外均比较多, 本文的新颖之处在于免疫治疗, 有参考价值.

入研究, 人们已认识到机体的免疫细胞并不是一一对应于各种各样的病原体或天然抗原的整体分子, 而是针对各种各样抗原分子的抗原表位(epitope), 蛋白质抗原是通过其表位来体现其免疫特异性. 因此, 在表位水平上对抗原性的认识已促成这样一种趋势: 基于抗原分子的免疫干预手段已不再停留在病原体或天然抗原的整体水平, 而开始向CTL表位水平过渡. CTL表位作为抗肿瘤的新一代多肽疫苗, 尤其是负载CTL表位的树突状细胞疫苗, 被认为是最有希望的新一代肿瘤免疫治疗策略, 已在临床实验中显示出较好的疗效[45-46].

已有研究已表明, Hpa全长基因负载的DC可以诱导产生Hpa特异性的免疫反应, 这个结果一方面提示Hpa可以作为一种肿瘤转移相关的抗原用于肿瘤的免疫治疗, 另一方面提示在Hpa的氨基酸序列中应该存在CTL抗原表位, 这种抗原表位经DC细胞递呈后, 可以激活CTL细胞, 从而发挥抗肿瘤效应. 最近德国学者从Hpa氨基酸序列中设计了3条受HLA-A2限制的Hpa抗原表位, 即Hpa8-16(ALPPPLMMLL)、Hpa16-24(LLLGPLGPL)、Hpa183-191(DLIFGLNAL). HLA-A2是最常见的HLA基因型, 约50%白种人、亚洲人和西班牙人以及33%的非洲人和美洲人具有这种表型. 实验表明这3条抗原表位负载的DC细胞均可以产生Hpa特异性的CTL, 对Hpa阳性且HLA-A2阳性的乳腺癌细胞(BT-20、BT-549及BT-124)具有明显的杀伤效应, 而对HLA2阳性但Hpa阴性的MCF-7乳腺癌细胞不具有杀伤效应, 只有将Hpa基因转染到MCF-7细胞使之变成Hpa阳性的细胞后才出现特异性的杀伤效应, 而且HLA-A2 mAb封闭靶细胞的HLA-A2表位后, 这种特异性杀伤效应明显下降, 提示上述3种Hpa特异性抗原表位诱导的CTL对乳腺癌细胞的杀伤效应具有Hpa特异性, 且受MHC-Ⅰ类分子限制, 可以作为乳腺癌及其他转移性肿瘤的多肽疫苗[47].

在国家自然基金的资助下(No. 30570841), 我们采用生物信息学技术, 在人和小鼠的肝素酶氨基酸序列中各预测5条多肽, 初步结果显示, 人的3条多肽(受HLA-A2限制)以及小鼠的2条多肽(受H-2Kb限制)诱导的CTL对Hpa阳性且MHC相匹配的肿瘤细胞具有明显的杀伤效应, 而对Hpa阴性或MHC不匹配的肿瘤细胞不具有杀伤效应(结果待发表). 需要说明的是, 我们所预测的3条人类Hpa抗原表位与Sommerfeldt *et al*[47]所报道的序列完全不同, 提示在人类的Hpa氨基酸序列中可能还存在更多的抗原表位有待于开发和利用.

总之, 相对于多肽表位而言, 全长基因负载的DC细胞可以诱导产生更为强烈的肿瘤杀伤效应. 这是因为全长基因中存在多个已知或未知的受不同MHC限制抗原表位, 他们负载DC后可以多抗原表位的形式递呈到DC表面, 从而可以产生多个克隆的CTL细胞, 其杀伤效果应该明显高于单个抗原表位诱发的CTL反应[48-51]. 但全长基因克隆到腺病毒或慢病毒载体中, 由于载体的安全性目前仍未很好的解决, 因而限制其在临床的应用; 多肽疫苗本身亦存在缺陷, 首先, 这种疫苗在体内半衰期短, 容易被降解; 其次这类疫苗穿透力不强, 不易进入APC细胞, 难以形成“抗原肽-MHCⅠ类分子”复合物, 最终表现为弱免疫原性, 因而不能有效的激发特异性免疫反应. 如何使免疫原有效的进入APC细胞的MHC-Ⅰ类系统, 是肿瘤免疫治疗研究中急需解决的一个难题. 近年来有文献报道, 将肿瘤抗原或CTL表位与一些可穿透细胞膜的短肽序列(cell-penetrating peptides, CPP)融合后, 其免疫原性明显增强[52-54]. 能否借助穿膜肽的作用增强多肽疫苗的免疫原性及穿膜能力, 值得进一步的研究.

4 参考文献

1 Decker WK, Xing D, Shpall EJ. Dendritic cell immunotherapy for the treatment of neoplastic disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 113-125

2 Mailliard RB, Dallal RM, Son YI, Lotze MT. Dendritic cells promote T-cell survival or death depending upon their maturation state and presentation of antigen. *Immunol Invest* 2000; 29: 177-185

3 Collins MK, Cerundolo V. Gene therapy meets vaccine development. *Trends Biotechnol* 2004; 22: 623-626

4 Santin AD, Bellone S, Ravaggi A, Pecorelli S, Cannon MJ, Parham GP. Induction of ovarian tumor-specific $CD8^+$ cytotoxic T lymphocytes by acid-eluted peptide-pulsed autologous dendritic cells. *Obstet Gynecol* 2000; 96: 422-430

5 Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 1999; 13: 781-792

6 Eccles SA. Heparanase: breaking down barriers in tumors. *Nat Med* 1999; 5: 735-736

7 Finkel E. Potential target found for antimetastasis drugs. *Science* 1999; 285: 33-34

8 Vlodavsky I, Friedmann Y, Elkin M, Aingorn H, Atzmon R, Ishai-Michaeli R, Bitan M, Pappo O, Peretz T, Michal I, Spector L, Pecker I. Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function

in tumor progression and metastasis. *Nat Med* 1999; 5: 793-802
9 Dong J, Kukula AK, Toyoshima M, Nakajima M. Genomic organization and chromosome localization of the newly identified human heparanase gene. *Gene* 2000; 253: 171-178
10 Hulett MD, Freeman C, Hamdorf BJ, Baker RT, Harris MJ, Parish CR. Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis. *Nat Med* 1999; 5: 803-809
11 Dempsey LA, Brunn GJ, Platt JL. Heparanase, a potential regulator of cell-matrix interactions. *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 349-351
12 Parish CR, Freeman C, Hulett MD. Heparanase: a key enzyme involved in cell invasion. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1471: M99-108
13 McKenzie E, Tyson K, Stamps A, Smith P, Turner P, Barry R, Hircock M, Patel S, Barry E, Stubberfield C, Terrett J, Page M. Cloning and expression profiling of Hpa2, a novel mammalian heparanase family member. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276: 1170-1177
14 Bame KJ. Heparanases: endoglycosidases that degrade heparan sulfate proteoglycans. *Glycobiology* 2001; 11: 91R-98R
15 蔡永国, 房殿春, 杨仕明, 罗元辉, 杨孟华, 王东旭. 肝素酶mRNA在胃癌组织中的表达及其与c-met表达的关系. 中华医学杂志 2004; 84: 974-978
16 Wang Z, Xu H, Jiang L, Zhou X, Lu C, Zhang X. Positive association of heparanase expression with tumor invasion and lymphatic metastasis in gastric carcinoma. *Mod Pathol* 2005; 18: 205-211
17 El-Assal ON, Yamanoi A, Ono T, Kohno H, Nagasue N. The clinicopathological significance of heparanase and basic fibroblast growth factor expressions in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1299-1305
18 杨彦, 崔明, 陈陵, 段体德. 反义肝素酶基因对胰腺癌细胞体外增殖和侵袭的抑制作用. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2493-2498
19 Rohloff J, Zinke J, Schoppmeyer K, Tannapfel A, Witzigmann H, Mossner J, Wittekind C, Caca K. Heparanase expression is a prognostic indicator for postoperative survival in pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2002; 86: 1270-1275
20 Kim AW, Xu X, Hollinger EF, Gattuso P, Godellas CV, Prinz RA. Human heparanase-1 gene expression in pancreatic adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg* 2002; 6: 167-172
21 Friedmann Y, Vlodavsky I, Aingorn H, Aviv A, Peretz T, Pecker I, Pappo O. Expression of heparanase in normal, dysplastic, and neoplastic human colonic mucosa and stroma. Evidence for its role in colonic tumorigenesis. *Am J Pathol* 2000; 157: 1167-1175
22 Cohen I, Pappo O, Elkin M, San T, Bar-Shavit R, Hazan R, Peretz T, Vlodavsky I, Abramovitch R. Heparanase promotes growth, angiogenesis and survival of primary breast tumors. *Int J Cancer* 2006; 118: 1609-1617
23 Ginath S, Menczer J, Friedmann Y, Aingorn H, Aviv A, Tajima K, Dantes A, Glezerman M, Vlodavsky I, Amsterdam A. Expression of heparanase, Mdm2, and erbB2 in ovarian cancer. *Int J Oncol* 2001; 18: 1133-1144
24 Bitan M, Polliack A, Zecchina G, Nagler A, Friedmann Y, Nadav L, Deutsch V, Pecker I, Eldor A, Vlodavsky I, Katz BZ. Heparanase expression in human leukemias is restricted to acute myeloid leukemias. *Exp Hematol* 2002; 30: 34-41
25 Ogishima T, Shiina H, Breault JE, Tabatabai L, Bassett WW, Enokida H, Li LC, Kawakami T, Urakami S, Ribeiro-Filho LA, Terashima M, Fujime M, Igawa M, Dahiya R. Increased heparanase expression is caused by promoter hypomethylation and up-regulation of transcriptional factor early growth response-1 in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1028-1036
26 Shafat I, Zcharia E, Nisman B, Nadir Y, Nakhoul F, Vlodavsky I, Ilan N. An ELISA method for the detection and quantification of human heparanase. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 341: 958-963
27 Gohji K, Hirano H, Okamoto M, Kitazawa S, Toyoshima M, Dong J, Katsuoka Y, Nakajima M. Expression of three extracellular matrix degradative enzymes in bladder cancer. *Int J Cancer* 2001; 95: 295-301
28 Pikas DS, Li JP, Vlodavsky I, Lindahl U. Substrate specificity of heparanases from human hepatoma and platelets. *J Biol Chem* 1998; 273: 18770-18777
29 Vlodavsky I, Fuks Z, Bar-Ner M, Ariav Y, Schirrmacher V. Lymphoma cell-mediated degradation of sulfated proteoglycans in the subendothelial extracellular matrix: relationship to tumor cell metastasis. *Cancer Res* 1983; 43: 2704-2711
30 Kurokawa H, Katsube K, Podyma KA, Ikuta M, Iseki H, Nakajima M, Akashi T, Omura K, Takagi M, Yanagishita M. Heparanase and tumor invasion patterns in human oral squamous cell carcinoma xenografts. *Cancer Sci* 2003; 94: 277-285
31 Quiros RM, Kim AW, Maxhimer J, Gattuso P, Xu X, Prinz RA. Differential heparanase-1 expression in malignant and benign pheochromocytomas. *J Surg Res* 2002; 108: 44-50
32 Ilan N, Elkin M, Vlodavsky I. Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 2018-2039
33 Parish CR, Freeman C, Brown KJ, Francis DJ, Cowden WB. Identification of sulfated oligosaccharide-based inhibitors of tumor growth and metastasis using novel *in vitro* assays for angiogenesis and heparanase activity. *Cancer Res* 1999; 59: 3433-3441
34 Bentolila A, Vlodavsky I, Ishai-Michaeli R, Kovalchuk O, Haloun C, Domb AJ. Poly(N-acryl amino acids): a new class of biologically active polyanions. *J Med Chem* 2000; 43: 2591-2600
35 Vlodavsky I, Elkin M, Pappo O, Aingorn H, Atzmon R, Ishai-Michaeli R, Aviv A, Pecker I, Friedmann Y. Mammalian heparanase as mediator of tumor metastasis and angiogenesis. *Isr Med Assoc J* 2000; 2: 37-45
36 Marchetti D, Li J, Shen R. Astrocytes contribute to the brain-metastatic specificity of melanoma cells by producing heparanase. *Cancer Res* 2000; 60: 4767-4770
37 Gohji K, Katsuoka Y, Okamoto M, Kamidono S, Kitazawa S, Toyoshima M, Dong J, Nakajima M. Human heparanase: roles in invasion and metastasis of cancer. *Hinyokika Kiyo* 2000; 46: 757-762
38 Pillarisetti S, Paka L, Sasaki A, Vanni-Reyes T, Yin B, Parthasarathy N, Wagner WD, Goldberg

IJ. Endothelial cell heparanase modulation of lipoprotein lipase activity. Evidence that heparan sulfate oligosaccharide is an extracellular chaperone. *J Biol Chem* 1997; 272: 15753-15759

39 Goldshmidt O, Zcharia E, Cohen M, Aingorn H, Cohen I, Nadav L, Katz BZ, Geiger B, Vlodavsky I. Heparanase mediates cell adhesion independent of its enzymatic activity. *FASEB J* 2003; 17: 1015-1025

40 Kuniyasu H, Chihara Y, Kubozoe T, Takahashi T. Co-expression of CD44v3 and heparanase is correlated with metastasis of human colon cancer. *Int J Mol Med* 2002; 10: 333-337

41 Schultze JL, Maecker B, von Bergwelt-Baildon MS, Anderson KS, Vonderheide RH. Tumour immunotherapy: new tools, new treatment modalities and new T-cell antigens. *Vox Sang* 2001; 80: 81-89

42 蔡永国, 房殿春, 杨仕明, 罗元辉, 杨孟华, 王东旭. 人肝素酶基因正反义腺病毒表达载体的构建及鉴定. 世界华人消化杂志 2004; 12: 336-338

43 陈陵, 蔡永国, 郑兴春, 杨仕明, 房殿春, 罗元辉, 王东旭. 负载肝素酶复制缺陷型腺病毒的包装及鉴定. 解放军医学杂志 2006; 31: 38-41

44 蔡永国, 房殿春, 陈陵, 王东旭, 罗元辉, 汤旭东, 陈婷, 杨仕明. 肝素酶基因修饰的树突状细胞疫苗对胃癌细胞的免疫效应研究. 中华医学杂志 2006; 86: 3122-3127

45 Ueda Y, Itoh T, Nukaya I, Kawashima I, Okugawa K, Yano Y, Yamamoto Y, Naitoh K, Shimizu K, Imura K, Fuji N, Fujiwara H, Ochiai T, Itoi H, Sonoyama T, Hagiwara A, Takesako K, Yamagishi H. Dendritic cell-based immunotherapy of cancer with carcinoembryonic antigen-derived, HLA-A24-restricted CTL epitope: Clinical outcomes of 18 patients with metastatic gastrointestinal or lung adenocarcinomas. *Int J Oncol* 2004; 24: 909-917

46 Gross DA, Graff-Dubois S, Opolon P, Cornet S, Alves P, Bennaceur-Griscelli A, Faure O, Guillaume P, Firat H, Chouaib S, Lemonnier FA, Davoust J, Miconnet I, Vonderheide RH, Kosmatopoulos K. High vaccination efficiency of low-affinity epitopes in antitumor immunotherapy. *J Clin Invest* 2004; 113: 425-433

47 Sommerfeldt N, Beckhove P, Ge Y, Schutz F, Choi C, Bucur M, Domschke C, Sohn C, Schneeweis A, Rom J, Pollmann D, Leucht D, Vlodavsky I, Schirrmacher V. Heparanase: a new metastasis-associated antigen recognized in breast cancer patients by spontaneously induced memory T lymphocytes. *Cancer Res* 2006; 66: 7716-7723

48 Nakamura M, Iwahashi M, Nakamori M, Ueda K, Ojima T, Naka T, Ishida K, Yamaue H. Dendritic cells transduced with tumor-associated antigen gene elicit potent therapeutic antitumor immunity: comparison with immunodominant peptide-pulsed DCs. *Oncology* 2005; 68: 163-170

49 Oh ST, Kim CH, Park MY, Won EH, Sohn HJ, Cho HI, Kang WK, Hong YK, Kim TG. Dendritic cells transduced with recombinant adenoviruses induce more efficient anti-tumor immunity than dendritic cells pulsed with peptide. *Vaccine* 2006; 24: 2860-2868

50 Chen L, Liang GP, Tang XD, Chen T, Cai YG, Fang DC, Yu ST, Luo YH, Yang SM. In vitro anti-tumor immune response induced by dendritic cells transfected with hTERT recombinant adenovirus. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351: 927-934

51 陈陵, 杨仕明, 房殿春, 王东旭. 肝素酶: 抗肿瘤转移的新靶点. 世界华人消化杂志 2004; 12: 439-442

52 Lundberg P, Langel U. A brief introduction to cell-penetrating peptides. *J Mol Recognit* 2003; 16: 227-233

53 Richard JP, Melikov K, Vives E, Ramos C, Verbeure B, Gait MJ, Chernomordik LV, Lebleu B. Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem* 2003; 278: 585-590

54 Becker-Hapak M, McAllister SS, Dowdy SF. TAT-mediated protein transduction into mammalian cells. *Methods* 2001; 24: 247-256

电编 李琪 编辑 张焕兰

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月18日; 15(8): 855-859
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

基因盒–整合子系统与志贺菌耐药

郑晓燕, 温 艳, 阴赪宏, 王 婧

郑晓燕, 温艳, 阴赪宏, 王婧, 首都医科大学附属北京友谊医院, 北京热带医学研究所 北京市 100050
中华医院管理学会/默沙东–医院管理科研基金资助项目, No.2004KY01
通讯作者: 阴赪宏, 100050, 北京市宣武区永安路95号, 首都医科大学附属北京友谊医院, 北京热带医学研究所.
modscn@yahoo.com
收稿日期: 2006–11–09 接受日期: 2006–12–18

Integrons and gene cassettes in antibiotic-resistant *Shigella*

Xiao-Yan Zheng, Yan Wen, Cheng-Hong Yin, Jing Wang

Xiao-Yan Zheng, Yan Wen, Cheng-Hong Yin, Jing Wang, Beijing Friendship Hospital Affiliated to Capital University of Medical Sciences; Beijing Institute for Tropical Medicine, Beijing 100050, China
Supported by China Hospital Administration Association/Mo Sha Dong-Hospital Administration Scientific Research Foundation, No.2004KY01
Correspondence to: Cheng-Hong Yin, Beijing Friendship Hospital Affiliated to Capital University of Medical Sciences; Beijing Institute for Tropical Medicine, 95 Yong'an Road, Xuanwu District, Beijing 100050, China.
modscn@yahoo.com
Received: 2006-11-09 Accepted: 2006-12-18

Abstract
With the widespread use of antibiotics, the question of drug resistance, especially multi-drug resistance, in *Shigella* is increasingly serious. As a new drug-resistant mechanism, integron system, which has the ability of capturing and expressing foreign genes, is attracting more and more attention. According to the difference of integrase, integrons can be divided into six types, of which type 1, 2 and 3 integrons are studied most and have been proved to be correlated with the drug resistance of bacteria. Recent studies indicated that type 2 integron is most commonly found in *Shigella*. In this article, we reviewed the conception and structure of integrons and gene cassettes as well as their correlations with the drug resistance of *Shigella*.

Key Words: Gene cassettes; Integrons; *Shigella*; Drug resistance

Zheng XY, Wen Y, Yin CH, Wang J. Integrons and gene cassettes in antibiotic-resistant *Shigella*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(8):855-859

摘要
随着抗生素的广泛应用, 志贺菌的耐药特别是多重耐药问题日趋严重. 具有捕获及表达外来基因能力的整合子(integron)系统作为新的细菌耐药机制, 正越来越受关注. 根据整合酶int Ⅰ的不同, 整合子可分为6 类. 其中1, 2, 3类整合子研究较多, 并已被证明与细菌的耐药性有关. 最近研究表明, 2类整合子是志贺菌中最常见的整合子. 本文就基因盒-整合子系统的概念、结构及与志贺菌耐药相关性等进行综述.

关键词: 基因盒; 整合子; 志贺菌; 耐药

郑晓燕, 温艳, 阴赪宏, 王婧. 基因盒–整合子系统与志贺菌耐药. 世界华人消化杂志 2007;15(8):855–859
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/855.asp

■背景资料
志贺菌是一类具有高度传染性和危害严重的革兰氏阴性肠道致病菌, 随着抗生素的广泛应用, 志贺菌的耐药特别是多重耐药问题日趋严重, 因此具有捕获及表达外来基因能力的整合子(integron)系统作为新的细菌耐药机制, 正越来越受关注.

0 引言
志贺菌属细菌通称痢疾杆菌, 是一类具有高度传染性和危害严重的革兰氏阴性肠道致病菌. 由志贺菌感染引起的细菌性痢疾是发达国家和发展中国家急性腹泻重要的病因之一[1]. 志贺菌对抗生素耐药的发生率逐渐增加是控制细菌性痢疾的一个主要威胁. 滥用药物和基因水平传播导致了志贺菌对常用抗生素产生了耐药性[2]. 最近的研究表明, 志贺菌耐药与基因盒-整合子系统有着密切的关系[3-6].

1 基因盒–整合子系统
人们对细菌耐药性产生的机制曾主要集中在基因突变的研究中, 认为基因突变的积累是产生细菌耐药的主要原因, 但后来发现没有接触过抗生素的病原菌对抗生素也具有抗性, 耐药性也能转移[7]. 研究表明, 多种机制包括可移动的遗传因素如质粒和转座子参与了细菌抗生素耐药性的传播[8], 最近研究证实整合子和基因

■ 应用要点
检测基因盒-整合子系统能快速准确获得志贺菌多重耐药的信息, 为阐明细菌耐药机制、减少细菌耐药发生提供了新的思路.

盒也成为耐药基因传播的因素[9]. 整合子在质粒、转座子或细菌染色体中被发现, 使细菌质粒具有在整合酶介导下整合抗生素耐药基因的能力. 整合子能编码一种促使基因盒位点特异性整合的DNA重组酶[10].

1.1 整合子及其结构和种类 整合子是细菌基因组中的可移动遗传物质, 携带位点特异性重组系统组分, 可将许多耐药基因盒整合在一起, 从而形成多重耐药[11]. 整合子是细菌, 尤其是革兰阴性菌多重耐药迅速发展的主要原因[12]. 整合子由DNA整合酶基因(int)和2个重组位点attⅠ和attC(59 bp片段重组位点)组成. Int位于整合子的5'-保守末端, 属于酪氨酸整合酶家族, 整合酶负责催化基因盒在attⅠ和attC上的整合及切除; 5'-保守末端区还有负责基因转录的启动子P1(Pant)和P2, 但P2仅见于少数整合子[13-14]. 3'-保守末端结构则因整合子类型不同而异[15]. 1个整合子可捕获1个或多个基因盒, 被捕获的基因盒5'-端与attI结合, 3'-端的59 bp片段与attC发生位点特异性重组[16].

根据整合酶intⅠ的不同, 整合子可分为6类. 其中1, 2, 3类整合子研究较多, 并已被证明与细菌的耐药性有关[17]. (1)1类整合子: 从临床菌株中发现的整合子大多属于1类整合子. 其整合酶intⅠ1大约有337个氨基酸[18]; (2)2类整合子: 其整合酶intⅠ2约有325个氨基酸, 与intⅠ1有46%的同源性, 他的编码整合酶基因中还有一个终止密码子. 目前仅见几种基因, 如核苷转移酶基因aadA 1a、甲氧苄啶耐药基因及链丝霉素耐药基因sat整合于该类整合子上[19]; (3)3类整合子: 他是由Arakawa *et al*[20]1995年在耐亚胺培南的黏质沙雷菌的耐药质粒上发现的. intⅠ3有320个氨基酸, 与int1有61%同源性, 常携带编码β-内酰胺酶blaIMP的基因盒; (4)4类整合子: 他是一类特殊的整合子, 由Mazel *et al*[21]1998年从霍乱弧菌基因组中检测出来的, 整合酶intⅠ4有320个氨基酸, 与intⅠ1有45.5%的同源性. 最早发现的4 类整合子中有179个基因盒, 故被称为超级整合子. 目前, 还未发现他直接与多重耐药有关, 但可能是多重耐药整合子的祖先. 最近在多种革兰阴性菌中发现了超级整合子[22-23]; (5)其他: 5类整合子见于最小弧菌, 有94%氨基酸同attⅠ4. 6类整合子见于麦氏弧菌, 有76%氨基酸同attⅠ4编码的氨基酸[24].

1.2 基因盒及其结构和种类 耐药基因盒是一种可移动的遗传因子, 常以环形结构独立存在, 当被整合子捕获并整合后才可进行转录[25]. 不同基因盒具有不同的大小与功能, 但他们具有共同的结构均拥有两个功能元件: 一个基因和一个位于其下游的attC位点. attC位点是一个不完全的反向重复序列, 他有被整合酶识别的特异性重组位点. 最初发现的attC位点有一个59碱基的片段, 曾被称为59 bp片段或attC[26]. 他的长度从57 bp到141 bp不等, 这种多样性与细菌耐药基因的替代有关[3]. 基因盒总是以相同的方向插入整合子, 且从其5'保守片段中的启动子开始转录. 多个基因盒可同时插入到整合子中[27].

基因盒的种类已达60多种, 常见的有: (1)aad基因: 编码氨基糖苷类的耐药性, 目前至少已发现15种, 传递不同的耐药性. aad基因又分为A、B两类. 目前, aadA 有7 种, 分别传递不同的耐药性, 如aadA1传递对四环素的耐药性; aadA2传递对链霉素和大环类酯霉素的耐药性. aadB基因传递对庆大霉素、卡那霉素和妥布霉素的耐药性[28]; (2)dfr基因: dfr编码二氢叶酸还原酶, 传递对甲氧苄啶类抗生素的耐药性. dfr基因分为A、B两类, 其中又分若干种, 分别编码不同的酶[29]; (3)编码β-内酰胺酶和超广谱β-内酰胺酶的基因, 发现其种类繁多, 如bla(PSE21), bla(CMY22), bla(VEB21), bla(GES22)等, 形成对青霉素类和头胞菌素类的耐药. Bla-IMP形成对亚胺培南的耐药; (4)其他基因盒: 如cat基因编码氯霉素乙酰基转移酶, aac基因编码氨基糖甙类乙酰基转移酶, oxa基因编码苯唑西林酶, aar基因编码对利福平的耐药, ere基因编码对红霉素的耐药等[30].

2 志贺菌耐药的现状

最初, 磺胺类药物和四环素类药物对菌痢的治疗均有效, 由于对这些药物产生耐药的菌株迅速增加, 不得不使用氨苄西林和甲氧苄啶-磺胺甲基异恶唑进行治疗. 但目前发现志贺菌对这些抗生素的耐药率也逐渐增加[31].

Ashkenazi *et al*[32]对以色列1998-2000分离的志贺菌与1991-1992分离的进行对比发现, 四环素的耐药率显著增加(从23%增加到87%, $P<0.00\ 001$), 甲氧苄啶-磺胺甲基异恶唑的耐药率高达94%, 氨苄西林的耐药率高达85%, 对喹诺酮类耐药率达0.5%-2%. Wilson *et al*[33]研究发现, 在尼泊尔西部分离的83株志贺菌中, 67株(80.7%)产生耐药性, 62株(74.7%)对两种或多种抗生素耐药. 土耳其Ozmert *et al*[34]报道, 志贺菌

多重耐药的发生率为24%, 最常见的多重耐药为甲氧苄啶-磺胺甲基异恶唑和氨苄西林. 据Taneja *et al*[35]报道, 在印度志贺氏志贺菌的多重耐药率为70%. Fulla *et al*[36]报道, 1997-2001智利小于5岁儿童急性腹泻患者分离出的178株志贺菌中, 多重耐药率达51%. 在世界上许多地方, 所有的志贺菌株均对全部低价的抗生素产生了耐药性, 喹诺酮类-如诺氟沙星或环丙沙星成为少数有效的药物之一[37].

3 整合子与志贺菌多重耐药相关性的研究

目前, 国内外对整合子的研究极为活跃, 已在多种耐药细菌中发现了整合子. 许多研究都表明整合子与志贺菌多重耐药密切相关.

3.1.1 类整合子与志贺菌多重耐药 研究发现, 1类整合子阳性的菌株大多对甲氧苄啶、复方磺胺甲基异恶唑、氨苄西林多重耐药. 这些抗生素在发展中国家广泛使用, 而对他们的耐药性近年来也日益严重[38]. McIver *et al*[39]报道, 2000年悉尼分离的40株宋内志贺菌2株含有1类整合子, 携带dfrA12和aadA2基因盒, 分别编码耐甲氧苄啶和链霉素/大观霉素基因. Oh *et al*[1]发现, 1998-2000在韩国西南部流行的宋内志贺菌的耐药性增强. 分离的67株宋内志贺菌35株含有1类整合子(1650 bp), 并携有dfrA12, aadA2等基因. DeLappe *et al*[40]发现, 1988-2001在西爱尔兰分离的67株宋内志贺菌中1株除了含有2类整合子(dhfr1, sat和aad)外, 还含有1类整合子(1.95 kbp), 基因盒中包括2个开放读码框架(sat和aad). Navia *et al*[38]报道, 1995-2000在西班牙旅游者腹泻患者中分离出83株志贺菌. 其中, 43株宋内氏志贺菌, 37株福氏致贺菌, 2株志贺氏志贺菌, 1株鲍氏志贺菌. 11株(13.25%)含有1类整合子, 共检测出9种不同的1类整合子, 片段长度为650-1800 bp, 最少含有1个基因盒(片段长度650-1000 bp), 最多含有3个基因盒(片段长度1300-1800 bp). 通过对整合子测序发现, 共携带10种基因盒分别编码对甲氧苄啶的耐药性(dfrA1, dfrA5, dfrA7, dfrA12, dfrA15), 氨基糖苷的耐药性(aadA1a, aadA2), β-内酰胺类的耐药性(oxa2)以及功能未知的开放读码框架(orfD, orfF). 研究发现, 在宋内氏和福氏志贺菌中1类整合子的阳性率都很低, 与McIver *et al*[39]对宋内氏志贺菌的研究相一致. Peirano *et al*[37]研究了1999-2003在巴西分离的62株志贺菌(47株福氏志贺菌, 15株宋内氏志贺菌)中1类和2类整合子及耐药基因情况. 只有2株含有1类整合子(1株福氏志贺菌, 1株宋内氏志贺菌), 对1类整合子阳性的宋内氏志贺菌进行测序分析发现其携带一种aadA1基因, 编码大观霉素/链霉素的耐药性. 对1类整合子阳性的福氏志贺菌进行测序分析证实, 携带2个基因盒, dfr17和aadA5, 分别编码甲氧苄啶和大观霉素/链霉素的耐药性. 1类整合子是耐药志贺菌中经常检测到的整合子, 但Gassama-Sow *et al*[10]报道了自非洲塞内加尔首都达喀尔分离的43株宋内志贺菌中, 没有检测到1类整合子.

3.2 2类整合子与志贺菌多重耐药 2类整合子在志贺菌中的检出率比1类整合子更高, 在抗生素耐药性的传播中起着更为重要的作用. Oh *et al*[1]发现, 1998-2000在韩国西南部流行的宋内志贺菌的耐药性增强. 分离的67株宋内志贺菌全部含有2类整合子. Gassama-Sow *et al*[10]报道了自非洲塞内加尔首都达喀尔分离的43株宋内志贺菌中, 40株(93%)含有2类整合子. 40株含有2类整合子的宋内志贺菌中, 23株(57.5%)含有长2.7 kbp的2类整合子, 具有dfrA1-sat-aadA1-orfX基因盒; 15株(37.5%)含有截断的长2.2 kbp的2类整合子, 具有dfrA1, sat, aadA1基因盒; 2株含有长0.4 kbp的2类整合子. dfrA1, sat, aadA1基因盒会导致对甲氧苄啶、链丝菌素、大观霉素、链霉素耐药, orfX基因盒的功能未知. 几乎所有含有2类整合子的菌株都对甲氧苄啶、磺胺甲基异恶唑、链霉素耐药. 由此可见, 2类整合子在抗生素耐药性的传播中起着重要的作用. 但研究并未证明整合子的位置在质粒还是染色体上. McIver *et al*[39]发现, 2000年悉尼分离的40株宋内志贺菌都含有2类整合子, 携带dfrA1, sat1, aadA1基因盒, 分别编码耐甲氧苄啶、链丝菌素和链霉素/大观霉素基因. Mammina *et al*[41]发现, 2001-2003在意大利分离的64株宋内志贺菌, 经过生物型分类, 13例属于生物型a, 51例属于生物型g. 通过脉冲场凝胶电泳(PFGE)分类, 13例属于PFGE A型, 51例属于PFGE B型. 在所有的生物型g和PFGE B型宋内志贺菌中都检测到了长度为2.2 kb的2类整合子(79.7%). 并且2.2 kb的扩增产物经限制性核酸内切酶AvaI, HincII和HinfI酶切后都得到了相似长度的片断. 所有2类整合子阳性的分离株都对甲氧苄啶和链霉素耐药, 这与其基因盒携带的耐药基因相一致. DeLappe *et al*[40]报道, 1988-2001西爱尔兰分离的67株宋内志贺菌中检测出了2种不同结构的2类整合子. 13株含有长2.22 kbp的2类整合子, 通过DNA测

■ **名词解释**

1 整合子: 细菌基因组中的可移动遗传物质, 携带位点特异性重组系统组分, 可将许多耐药基因盒整合在一起, 从而形成多重耐药.

2 基因盒: 一种可移动的遗传因子, 常以环形结构独立存在, 当被整合子捕获并整合后才可进行转录.

■同行评价
本文进一步报道了基因盒-整合子系统与志贺菌耐药的相关性, 特别是基因盒-整合子系统介导的细菌多重耐药性, 有一定指导意义和学术价值.

序发现, 其中含有3个开放读码框架, 包括dhfr1, sat和aad基因, 这种基因序列与转座子Tn7类似. 1株含有长1.37 kbp的2类整合子, 基因盒中只编码dhfr1和sat两种基因. 所有PFGE B型的菌株都含有2类整合子, 并且都对甲氧苄啶和链霉素耐药. 通过分析两种整合子的基因盒没有发现与氨苄西林耐药相关的基因. 在质粒结合实验中, 并没有观察到甲氧苄啶和链霉素耐药性的共转移, 表明2类整合子可能不在结合质粒上. 整合子的位置在质粒还是染色体上有待于进一步研究. 链霉素耐药极可能与整合子有关, 因为在1类和2类整合子中普遍存在aadA基因盒. Mammina *et al*[42]研究了1971-2000在意大利南部分离的31株生物型g的宋内氏志贺菌. 其中, 1971-1980分离的15株宋内氏志贺菌都不对链霉素和甲氧苄啶耐药, 并且2类整合子全部阴性. 1981-1990分离的8株宋内氏志贺菌中, 1株2类整合子阳性. 1991-2000分离的8株宋内氏志贺菌中, 7株2类整合子阳性, 并且经限制性内切酶酶切后得到相似长度的片段. Peirano *et al*[37]研究了1999-2003在巴西分离的62株志贺菌(47株福氏志贺菌, 15株宋内氏志贺菌)中1类和2类整合子及耐药基因情况. 而56株(90.3%)含有2类整合子(43株福氏志贺菌, 13株宋内氏志贺菌). 2类整合子阳性的菌株含有长2214 bp的相似片段, 携带一种与转座子Tn7结构类似的基因盒序列(dfrA1, sat, aadA1), 分别编码甲氧苄啶、链丝菌素和大观霉素/链霉素的耐药性. 目前, 尚未有临床研究在志贺菌中检测到3类整合子[1-10, 40].

总之, 基因盒-整合子系统在志贺菌耐药基因的获得与传播中有重要作用. 1类和2类整合子是志贺菌中常见的整合子, 其中, 2类整合子比1类更多见. 2类整合子普遍携带dfrA1, sat, aadA1基因盒, 分别编码甲氧苄啶、链丝菌素和大观霉素/链霉素的耐药性. 目前, 介导细菌耐药的基因盒达几十种, 且新的基因盒正不断被发现, 基因盒在整合酶作用下在不同的整合子之间转移, 引起所携带的耐药基因的播散. 检测基因盒-整合子系统能快速准确获得志贺菌多重耐药的信息, 为阐明细菌耐药机制、减少细菌耐药发生提供了新的思路.

4 参考文献

1 Oh JY, Yu HS, Kim SK, Seol SY, Cho DT, Lee JC. Changes in patterns of antimicrobial susceptibility and integron carriage among Shigella sonnei isolates from southwestern Korea during epidemic periods. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 421-423

2 Toro CS, Farfan M, Contreras I, Flores O, Navarro N, Mora GC, Prado V. Genetic analysis of antibiotic-resistance determinants in multidrug-resistant Shigella strains isolated from Chilean children. *Epidemiol Infect* 2005; 133: 81-86

3 Pan JC, Ye R, Meng DM, Zhang W, Wang HQ, Liu KZ. Molecular characteristics of class 1 and class 2 integrons and their relationships to antibiotic resistance in clinical isolates of Shigella sonnei and Shigella flexneri. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 288-296

4 Navia MM, Ruiz J, Vila J. Intercontinental spread of a trimethoprim-resistant strain of Shigella flexneri. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21: 401-403

5 Munoz J, Bello H, Dominguez M, Mella S, Zemelman R, Gonzalez G. Integrons and antimicrobial resistance gene cassettes in Shigella flexneri strains. *Rev Med Chil* 2003; 131: 727-733

6 Iversen J, Sandvang D, Srijan A, Cam PD, Dalsgaard A. Characterization of antimicrobial resistance, plasmids, and gene cassettes in Shigella spp. from patients in vietnam. *Microb Drug Resist* 2003; 9 Suppl 1: S17-S24

7 Ploy MC, Lambert T, Couty JP, Denis F. Integrons: an antibiotic resistance gene capture and expression system. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38: 483-487

8 Barlow RS, Pemberton JM, Desmarchelier PM, Gobius KS. Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 838-842

9 Gonzalez G, Mella S, Zemelman R, Bello H, Dominguez M. Integrons and resistance gene cassettes: structure and role against antimicrobials. *Rev Med Chil* 2004; 132: 619-626

10 Gassama-Sow A, Diallo MH, Boye CS, Garin B, Sire JM, Sow AI, Aidara-Kane A. Class 2 integron-associated antibiotic resistance in Shigella sonnei isolates in Dakar, Senegal. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27: 267-270

11 Harbottle H, Thakur S, Zhao S, White DG. Genetics of antimicrobial resistance. *Anim Biotechnol* 2006; 17: 111-124

12 Rowe-Magnus DA, Guerout AM, Mazel D. Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes. *Mol Microbiol* 2002; 43: 1657-1669

13 Koseoglu O. Integrons *Mikrobiyol Bul* 2004; 38: 305-312

14 Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4: 608-620

15 Walsh TR. Combinatorial genetic evolution of multiresistance. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9: 476-482

16 Bouvier M, Demarre G, Mazel D. Integron cassette insertion: a recombination process involving a folded single strand substrate. *EMBO J* 2005; 24: 4356-4367

17 Hacker J, Hochhut B, Middendorf B, Schneider G, Buchrieser C, Gottschalk G, Dobrindt U. Pathogenomics of mobile genetic elements of toxigenic bacteria. *Int J Med Microbiol* 2004; 293: 453-461

18 Sabate M, Prats G. Structure and function of

integrons. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 20: 341-345
19 She Q, Shen B, Chen L. Archaeal integrases and mechanisms of gene capture. *Biochem Soc Trans* 2004; 32: 222-226
20 Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S, Kato N, Ohta M. A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1612-1615
21 Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J. A distinctive class of integron in the Vibrio cholerae genome. *Science* 1998; 280: 605-608
22 Fluit AC, Schmitz FJ. Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 272-288
23 Hall RM, Stokes HW. Integrons or super integrons? *Microbiology* 2004; 150: 3-4
24 Summers AO. Genetic linkage and horizontal gene transfer, the roots of the antibiotic multi-resistance problem. *Anim Biotechnol* 2006; 17: 125-135
25 Il'ina TS. Bacterial superintegrons, a source of new genes with adaptive functions. *Genetika* 2006; 42: 1536-1546
26 Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R, Collatz E, Courvalin P. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 79-114
27 Roe MT, Vega E, Pillai SD. Antimicrobial resistance markers of class 1 and class 2 integron-bearing Escherichia coli from irrigation water and sediments. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 822-826
28 Gallardo F, Ruiz J, Soto SM, Jimenez de Anta MT, Vila J. Different antibiotic resistance mechanisms associated with integrons in clinical isolates of Salmonella typhimurium. *Rev Esp Quimioter* 2003; 16: 398-402
29 Yu HS, Lee JC, Kang HY, Jeong YS, Lee EY, Choi CH, Tae SH, Lee YC, Seol SY, Cho DT. Prevalence of dfr genes associated with integrons and dissemination of dfrA17 among urinary isolates of Escherichia coli in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 445-450
30 Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in Klebsiella pneumoniae. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 15-22
31 Ahmed AM, Furuta K, Shimomura K, Kasama Y, Shimamoto T. Genetic characterization of multidrug resistance in Shigella spp. from Japan. *J Med Microbiol* 2006; 55: 1685-1691
32 Ashkenazi S, Levy I, Kazaronovski V, Samra Z. Growing antimicrobial resistance of Shigella isolates. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 427-429
33 Wilson G, Easow JM, Mukhopadhyay C, Shivananda PG. Isolation & antimicrobial susceptibility of Shigella from patients with acute gastroenteritis in Western Nepal. *Indian J Med Res* 2006; 123: 145-150
34 Ozmert EN, Gokturk B, Yurdakok K, Yalcin SS, Gur D. Shigella antibiotic resistance in central Turkey: comparison of the years 1987-1994 and 1995-2002. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 40: 359-362
35 Taneja N, Lyngdoh V, Vermani A, Mohan B, Rao P, Singh M, Dogra A, Singh MP, Sharma M. Re-emergence of multi-drug resistant Shigella dysenteriae with added resistance to ciprofloxacin in north India & their plasmid profiles. *Indian J Med Res* 2005; 122: 348-354
36 Fulla N, Prado V, Duran C, Lagos R, Levine MM. Surveillance for antimicrobial resistance profiles among Shigella species isolated from a semirural community in the northern administrative area of santiago, chile. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 72: 851-854
37 Peirano G, Agerso Y, Aarestrup FM, dos Prazeres Rodrigues D. Occurrence of integrons and resistance genes among sulphonamide-resistant Shigella spp. from Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 301-305
38 Navia MM, Ruiz J, Vila J. Molecular characterization of the integrons in Shigella strains isolated from patients with traveler's diarrhea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 48: 175-179
39 McIver CJ, White PA, Jones LA, Karagiannis T, Harkness J, Marriott D, Rawlinson WD. Epidemic strains of Shigella sonnei biotype g carrying integrons. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1538-1540
40 DeLappe N, O'Halloran F, Fanning S, Corbett-Feeney G, Cheasty T, Cormican M. Antimicrobial resistance and genetic diversity of Shigella sonnei isolates from western Ireland, an area of low incidence of infection. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1919-1924
41 Mammina C, Pontello M, Dal Vecchio A, Nastasi A. Identification of Shigella sonnei biotype g isolates carrying class 2 integrons in Italy (2001 to 2003). *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2467-2470
42 Mammina C, Aleo A, Romani C, Nastasi A. Shigella sonnei biotype G carrying class 2 integrons in southern Italy: a retrospective typing study by pulsed field gel electrophoresis. *BMC Infect Dis* 2006; 6: 117

电编 李琪 编辑 王晓瑜

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月18日; 15(8): 860-868
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤的临床研究进展

王 宁, 傅 强, 王雅杰

■背景资料
胃MALT淋巴瘤属于低度恶性的特殊淋巴瘤, 其具有独特的生物学特性, 临床预后较好. 由于多数患者起病隐匿, 病程缓慢, 病理上常常和良性病变难以鉴别, 因此临床上容易误诊. 胃MALT淋巴瘤发病和*H pylori*感染密切相关, 因此抗*H pylori*治疗在其治疗上举足轻重. 但是对于*H pylori*阴性的患者治疗往往在策略上缺乏统一的指导原则.

王宁, 傅强, 王雅杰, 第二军医大学长海医院肿瘤科 上海市 200433
通讯作者: 王宁, 200433, 上海市杨浦区长海路174号, 第二军医大学长海医院肿瘤科. winnewan@126.com
电话: 021-25072062
收稿日期: 2006-12-16 接受日期: 2007-01-10

Advances on the treatment of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma

Ning Wang, Qiang Fu, Ya-Jie Wang

Ning Wang, Qiang Fu, Ya-Jie Wang, Department of Oncology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, Shanghai, China
Correspondence to: Department of Oncology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University, 174 Changhai Road, Yangpu District, Shanghai 200433, Shanghai, China. winnewan@126.com
Received: 2006-12-16 Accepted: 2007-01-10

Abstract
Gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphomas are rare in the gut, and its occurrence rate was 1% to 5% of the malignant tumors. In histological type, most of them are non-Hodgin's lymphomas, while Hodgin's lymphomas are seldom seen. There have been a lot of controversies on the optimal treatments of gastric MALT lymphomas for a long time. Surgery was traditionally considered as the most important approach to cure the disease. However, anti-*H pylori* therapy has been regarded as an alternative method since *H pylori* infection was found to be relevant with the pathogenesis of gastric MALT lymphomas. In this article, we reviewed the current status and recent advances on the treatment of this disease.

Key Words: Stomach; Mucosa-associated lymphoid tissue; *Helicobacter pylori*; Chemeotherapy; Radiotherapy

Wang N, Fu Q, Wang YJ. Advances on the treatment of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(8):860-868

摘要
胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤, 即胃MALT (mucosa-associated lymphoid tissue, MALT)淋巴瘤是一种较为少见的胃恶性肿瘤, 发病率约占恶性肿瘤的1%-5%. 组织学类型主要是非霍奇金淋巴瘤(NHL), 霍奇金淋巴瘤(HD)很少见. 长期以来对其治疗问题一直存在很多争议. 传统观点认为手术是治愈的最主要手段, 但随着对幽门螺旋杆菌(*H pylori*)感染与该病发病机制的认识的提高, 这一观念受到了不断冲击. 本文对胃MALT淋巴瘤的治疗现状和进展作一综述.

关键词: 胃; 黏膜相关淋巴组织淋巴瘤; 幽门螺旋杆菌; 化疗; 放疗

王宁, 傅强, 王雅杰. 胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤的临床研究进展. 世界华人消化杂志 2007;15(8):860-868
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/860.asp

0 引言
胃黏膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤由Isaacson *et al*[1]于1983年首次提出, 是最常见的也是研究最多的淋巴结外MALT淋巴瘤, 占胃淋巴瘤的1/3, 非霍奇金淋巴瘤的8%, 胃肿瘤的3%[2-5]. 胃MALT淋巴瘤具有特殊的病因学、组织病理学以及临床生物学行为特点. 我们主要介绍胃MALT淋巴瘤病因与发病机制及临床治疗的新进展.

1 胃MALT淋巴瘤的组织病理学以及生物学特征
1960年代英国病理医生Isaacson *et al*[1]在研究时发现, 胃肠道淋巴瘤不同于结内淋巴瘤, 并于1983年提出了MALT淋巴瘤的概念, 本病的特点是病变发生于结外黏膜组织免疫系统, 多属低度恶性非霍奇金淋巴瘤. 病变发展呈局限性, 易累及的组织主要是黏膜和/或分泌导管有关的内胚叶[6]. 新的WHO淋巴瘤将胃淋巴瘤分为两大类, 低度恶性命名为MALT结外边缘区B细胞淋巴瘤; 而高度恶性, 属于弥漫性大B细胞淋巴瘤(伴或不伴边缘区MALT淋巴瘤), 胃弥漫性大细胞淋巴瘤病理诊断中应注明伴有或不伴有胃MALT淋巴瘤的病变成分[7]. 然而这种分

类方法在实践中也存在一定问题, 因而De Jong *et al*[8]建议根据肿瘤病灶中包含大细胞数目, 将胃淋巴瘤分为和预后相关的4级: (1)纯粹的低度恶性MALT淋巴瘤, 成簇肿瘤中大细胞数目小于5个; (2)低度恶性MALT淋巴瘤伴有个别大细胞簇或者成簇肿瘤细胞中大细胞个数为5-20个, 可伴有弥漫性大B细胞成分, 但是小于肿瘤总数的10%; (3)高度恶性MALT淋巴瘤, 成簇肿瘤细胞中大细胞个数大于20个, 或者弥漫性大B细胞成分大于肿瘤总数的10%. 但是散在的淋巴上皮样病变仍然存在; (4)高度恶性的淋巴瘤, 无低分化成份, 完全是大细胞成份. 目前是否将这类划为MALT淋巴瘤尚未达成一致, 但是可以明确的是至少部分由MALT淋巴瘤转化而来. 一般认为, 诊断胃MALT淋巴瘤应有中心样细胞, 淋巴上皮病变, 浆细胞分化3种特征[9]. 滤泡中心样细胞一般小到中等大小, 常具有中等量胞质, 细胞核型不规则. 胃MALT淋巴瘤的中心滤泡样细胞不同于结内淋巴瘤的主要依据之一就是前者有浆细胞分化的特征. 此外, 胃MALT淋巴瘤病灶由多少不等的反应性淋巴滤泡和滤泡周围弥漫浸润的淋巴细胞构成, 肿瘤细胞浸润或破坏胃腺体、胃小凹, 形成特征性淋巴上皮病变, 淋巴滤泡间常有异常淋巴细胞浸润, 据此可以与反应性淋巴增生相鉴别[8]. MALT淋巴瘤细胞具有亲上皮性, 此类淋巴瘤细胞进入血循环后又可以回到黏膜上皮部位局部, 这种特征称为“返家现象”, 是由于此淋巴细胞亚群表达一种返家受体, 易与毛细血管内特异性的配体结合, 在局部长期生长[10]. 胃MALT淋巴瘤早期多位于黏膜固有层内, 约30%肿瘤细胞呈多灶状分布, 其中可见正常滤泡残存. 有时远离主要病灶的黏膜有小病灶存在[8], 这种特点可以解释单纯手术切除后出现肿瘤复发的原因. 胃MALT淋巴瘤40%以上发生在胃窦部. 在内镜下通常表现为扁平状隆起, 可以出现一个或多个溃疡, 生长比较缓慢. 低度恶性MALT淋巴瘤多数和*H pylori*感染相关, 而高度恶性MALT淋巴瘤发生基本上和*H pylori*无关.

2 胃MALT淋巴瘤的诊断和分子遗传学

目前认为, 胃MALT淋巴瘤的来源相当于正常淋巴组织的边缘带B淋巴细胞. 瘤细胞表面和胞质表达免疫球蛋白(多为IgM). 免疫球蛋白呈泛B抗原阳性: CD19, CD20, CD35, CD79a阳性, 而CD5、CD10、BCL-2和周期素D1为阴性[8]. 通过细胞遗传学检查, 发现有胃MALT淋巴瘤的48%的比例出现t(11;18)(q21;q21)[2,11], 染色体移位形成API2基因及mlt基因的融合基因. t(11;18)(q21;q21)不出现在胃弥漫性大B细胞淋巴瘤及*H pylori*感染相关胃炎. 这一染色体易位是胃MALT淋巴瘤重要的核型异常[12]. 少数出现t(1;14)(p22;q32)等[2,13], 自1p22断裂点得到一个新基因bcl-10, 其功能可能与抑制凋亡和肿瘤发病有关. 大量$CD4^+$T细胞有时和低度恶性MALT淋巴瘤有关, 验证了T辅助细胞在肿瘤发生过程中的必要作用, 但是$CD4^+$T细胞目前无依据支持高度恶性MALT淋巴瘤[8].

超声胃镜是诊断消化道淋巴瘤最佳方式之一, 由于消化道淋巴瘤起源于黏膜淋巴组织, 因而胃镜检查可正常或仅有糜烂表现, 活组织检查可出现假阴性[8], 此时若作超声胃镜检查, 可发现胃黏膜五层结构消失, 代之以不规则由肿瘤细胞浸润所致的低回声区, 诊断敏感性为90%以上, 分期诊断正确率为88%对周围淋巴转移诊断正确性为85%. 超声胃镜不仅可相当准确地判断原发性胃淋巴瘤的浸润深度, 同时可了解胃周淋巴结的转移情况, 且胃淋巴瘤特殊的超声透壁回声形态有助同其他胃肿瘤相鉴别[15].

超声胃镜于腔内帮助确定病程和病期及范围. 抗*H pylori*治疗后病变可减轻乃至消失, 胃黏膜五层结构可恢复正常, 超声胃镜是随访治疗结果最佳办法[16-18].

3 胃MALT淋巴瘤的病因与发病机制

正常胃黏膜内没有淋巴组织, 但是胃却是胃肠道淋巴瘤最常见的发病部位. 近10余年来对*H pylori*的研究不断深入, 因此*H pylori*感染可以引发胃MALT淋巴瘤的观点也得到共识[19]. 在胃MALT淋巴瘤中, *H pylori*的检出率与胃良性病*H pylori*感染率有显著差异[20]. *H pylori*相关的胃MALT淋巴瘤接受抗生素根治性治疗后, 70%-80%淋巴瘤病变消失, 间接证明了*H pylori*在发病中的重要病因作用. 尽管如此, 胃MALT淋巴瘤确切发病机制尚不清楚, 推测*H pylori*作为抗原引起局部免疫反应, 激发产生胃黏膜相关淋巴组织[21]. *H pylori*特异性的激活Th淋巴细胞并使之释放细胞因子, 而后者促使B细胞进一步活化或增生. 病理的B淋巴细胞克隆产生、发展、取代正常

■研发前沿

长期以来, 对胃MALT淋巴瘤的最优治疗缺乏统一的认识, 抗*H pylori*治疗的地位不断提升, 而手术和放疗的地位有所下降. 2003年WHO将胃MALT淋巴瘤的概念明确化为低度恶性淋巴瘤, 然而他的治疗策略并不是完全等同于惰性淋巴瘤, 临床实践中应该考虑到患者是否合并*H pylori*感染.

■相关报道
近年来对于胃MALT淋巴瘤的分子遗传学的研究不断深入，一些分子和基因水平上的改变往往和治疗以及预后有关. 目前比较明确的是t(11;18)(q21;q21)的易位和三倍体. 而检测基因重排也有利于鉴别诊断, 明确治疗效果, 排除疾病复发.

淋巴细胞群, 引发胃MALT淋巴瘤[22]. 但是大多数*H pylori*感染相关的胃炎患者并未发生胃MALT淋巴瘤, 因此其他的环境因素、微生物和宿主的遗传学因素等可能共同参与了胃MALT淋巴瘤的发病. Isaacson *et al*[23]推测*H pylori*到胃淋巴瘤分为3个步骤: (1)*H pylori*感染引起慢性胃炎导致淋巴细胞增生形成MALT; (2)部分病例*H pylori*感染产物激活黏膜内T细胞进而诱导3号染色体变异, 致使MALT的B细胞产生克隆性增生; (3)在已形成肿瘤基因变化的基础上, 细胞增殖基因表达产物增加, 出现染色体易位t(1;14), 致使对T细胞依赖性的解除, 促使低度恶性MALT淋巴瘤向高度恶性转化.

4 胃MALT淋巴瘤的临床特点及鉴别

本病任何年龄均可发病, 老年人多见, 女多于男, 发病年龄高峰为60-70岁. 合并以下4种条件容易患胃MALT淋巴瘤: *H pylori*相关的慢性胃炎; 自身免疫性疾病; 免疫缺陷性疾病, 如AIDS; 长期应用免疫抑制剂. 临床症状常表现上腹部不适、上腹痛、食欲下降、体重下降和上消化道出血等症状. 这些临床表现类似于胃癌. 胃MALT淋巴瘤属低侵袭性, 病情进展缓慢, 或者数年保持局限性病变, 可长期表现为局部病变(I_E或II_E). 绝大多数患者初次诊断时处于I_E期, 20%合并近端淋巴结侵犯(II_E期), 5%-10%有骨髓侵犯, 属于惰性淋巴瘤[22]. 胃淋巴瘤与慢性胃炎的淋巴组织反应性增生基本组织学形态相似, 二者都可以发现大量反应性淋巴滤泡和滤泡周围弥漫性小淋巴细胞浸润, 以及固有层近黏膜表面部位有大量浆细胞浸润. 由于组织形态上非常相似, 有时依靠形态学检查很难对二者进行区别[25]. 此时, 细胞单克隆性增生对肿瘤的诊断具有决定意义[26]. 轻链限制已经作为一个鉴别炎性病变的标准之一, 即κ：λ比例大于10：1强烈提示病变非炎性而为B细胞淋巴瘤[8]. 因为PCR具有更高的灵敏度, 有些临床上与病理上诊断为慢性胃炎者, 用PCR方法扩增其IgH基因, 出现单克隆基因重排[27]. 这种现象出现, 是否提示形态学和免疫组化未能检测的病例实际已经发生了恶性病变? 目前有些学者认为这种病变为淋巴瘤发病和进展的一个过渡阶段[28-29]. Wundisch *et al*[30]认为B细胞单克隆性增生和病灶不能完全清除或者复发有关. 但是Steiff *et al*[31]和Bertoni *et al*[32]却认为, B细胞单克隆性增生难以预示病灶复发的风险. 目前推测IgH基因单克隆重排代表转录和翻译前癌前分子生物学水平的病变, 因此恶性的微小病变在蛋白质和细胞水平可能检测不到.

5 治疗

5.1 抗*H pylori*治疗 由于*H pylori*感染与胃MALT淋巴瘤发病之间存在的内在联系, 引起人们对抗*H pylori*治疗胃淋巴瘤的极大关注. 大量资料显示, 抗*H pylori*治疗可以导致50%-80%胃MALT淋巴瘤可以获得组织学完全缓解[3,33]. Fischbach *et al*[34]对*H pylori*阳性的I_E期胃MALT淋巴瘤患者采取抗生素根治*H pylori*, 若病变局限于黏膜和/或黏膜下, 抗*H pylori*治疗效果明显, 而病变超过黏膜下层者抗*H pylori*治疗缓解率低. 2006年NCCN指南将抗*H pylori*治疗已经划为低度恶性胃MALT淋巴瘤的一线治疗方案. NCCN指南[35]明确指出, *H pylori*阳性的I_E患者应采用含有质子泵抑制剂[35]的三联治疗. 抗*H pylori*治疗通常显效缓慢, 通常经过3 mo胃镜检查才能观察到瘤灶的变化. 应用抗生素治疗后, 患者可能有4种转归: (1)*H pylori*由阳性转为阴性, 肿瘤体积相应缩小. 这部分患者应在治疗后接受长期随访; (2)*H pylori*阴性患者应用抗生素治疗后, 如果肿瘤明显进展或伴有明显的临床症状, 应接受放疗. 而无症状的患者既可选择随访, 3 mo后再次复查胃镜, 也可以采用放疗; (3)*H pylori*持续阳性, 但是肿瘤体积缩小或者基本稳定. 这些患者可采用二线的抗生素治疗; (4)*H pylori*阳性未能转阴, 并且肿瘤进展, 应给与放疗. 总而言之, *H pylori*阳性患者应用抗生素根治治疗转阴后, 肿瘤持久存在或再次复发后, 应选择局部放疗[37-40]. 若放疗失败, 可以给与单药或者联合化疗[40]. 需要指出的是, 应用NCCN指南时要根据国内医疗环境灵活掌握.

推荐的一线三联药物包括: 质子泵抑制剂[36]、克拉霉素和阿莫西林或者甲硝唑[33]. 经过抗生素治疗后, *H pylori*达到根治的时间从几周到18 mo不等. 胃镜组织学活检结果并不能预示胃MALT淋巴瘤是否对抗生素治疗耐药, 因此, 有必要重复多次取活检标本以明确应用抗生素后的疗效. 根治*H pylori*后肿瘤的缓解是比较稳定的, 目前对应用抗生素

治疗的长期有效性没有明确的结论, 但是越来越多的报道提出单纯抗生素治疗后缓解的病灶仍然会复发, 已有学者[41]通过分子生物学技术发现完全缓解的患者胃黏膜中仍然存在单克隆B细胞. 由于胃MALT淋巴瘤的病程进展缓慢, 所以目前所有文献报道的随访时间均较短, 对该治疗方法的评价还需要时间的验证. 胃MALT淋巴瘤与结内淋巴瘤对抗*H pylori*治疗的反应明显不同. 抗*H pylori*治疗胃MALT淋巴瘤的缓解率从50%到更常见的70%[31-32,41-43], 甚至个别可以达到100%[43]. 结内低度恶性淋巴瘤常病变广泛, 骨髓易受累, 虽然初次治疗有效, 但不易治愈, 多数患者在7-10 a内死亡, 并易出现向高度恶性的转化. 而胃的低度恶性MALT淋巴瘤局限于胃部, 多数可长期存活. Wundisch *et al*[30]对I_E期胃MALT淋巴瘤进行抗生素根治*H pylori*治疗, 在120名患者中116人(97%)经过一线的抗生素治疗*H pylori*得到根除, 而其余4人经过二线抗生素治疗后*H pylori*也得到了根治. 80%的患者(96/120)经过抗*H pylori*治疗后获得临床完全缓解(CR), 出现CR在应用抗生素治疗后1-28 mo不等, 而61%(59/96)的患者通常能够在前3 mo就获得CR. 临床CR的患者5 a无复发率平均为71%(68%-81%), 中位无复发时间为83(61-114) mo. De Mascarel *et al*[44]对60名胃MALT淋巴瘤进行随访发现, 病灶组织学完全缓解的中位时间为13 mo, 但是也有缓解期较长的报道, 如Savio *et al*[45]对56位患者的研究结果明显延长(24 mo).

对于抗生素治疗后仍然有残留病灶的患者, Wundisch *et al*[30]采用了“watch and wait”的态度. Advani *et al*[46]也支持这种观点, 采取消极态度以及积极治疗之间对于患者的生存率没有明显的影响. 但是这种观点不太适合我国的国情.

5.2 *放射治疗* 对于*H pylori*根治无效或者不适用抗*H pylori*治疗的患者, 此时应考虑放疗[39-40]. 放疗在胃MALT淋巴瘤的治疗中具有十分重要的作用[47]. 但是最佳的照射剂量以及治疗计划的具体细节尚未得到完全统一. 目前, 比较一致的观点是有效的照射野应包括全胃以及胃周淋巴结; 如果食管下端或者十二指肠也受到侵犯, 那么放射野应该相应的扩大. 治疗剂量通常为30 Gy左右[48]. 回顾美国Sloan-Kettering癌症纪念医院自1998年来报道单纯应用局部放疗对51名*H pylori*阴性的胃MALT淋巴瘤患者, 中位放疗剂量为30 Gy, 5 a无病生存率、总生存率和疾病特异生存率分别为89%, 83%和100%[49-50]. 2003年Tsang *et al*[51]也报道了类似的结果. Park *et al*[52]对6例*H pylori*阴性或抗*H pylori*治疗无效的Ⅰ期和Ⅱ期的胃MALT淋巴瘤患者进行了单一的放射治疗. 治疗使用的中位照射剂量是30.6 Gy, 照射胃及胃周淋巴结共4 wk时间, 结果显示所有患者治疗均有效, 随访6 a无瘤生存率达到100%. 且患者对治疗耐受性均较好, 未发现明显的急性不良反应, 说明单一低剂量的放射治疗是较为安全可行的. 一般认为, 放疗存在的主要问题是可以造成胃出血穿孔和继发恶性肿瘤, 各项研究统计显示出血穿孔的发生率不等, 波动在1%-4%[25]. 由于放射治疗而继发恶性肿瘤的可能性是存在的, 但也非常少见, 并且可以通过减少放射剂量而加以避免.

对胃MALT淋巴瘤而言, 放疗科医师需要着重考虑的问题之一就是靶病灶与肾脏之间的解剖关系, 即如何既能最大程度保护肾脏又能增加照射剂量. 由美国Sloan-Kettering癌症中心的Della Biancia *et al*[53]将胃MALT淋巴瘤分成3组, 接受普通前后对穿野放疗、三维适形放疗和调强适形放疗3种不同的治疗. 研究结果表明, 3种技术对靶区的治疗效果基本相似. 但是如果计划靶容积和正常肾脏在立体解剖关系上有很多重叠, 这样单纯传统的前后对穿野放疗难以满足这部分患者, 采用四野三维适形放疗是更好的选择, 而应用调强适形放疗可以进一步避免放疗对左肾以及肝脏的影响. 总之, 对绝大多数胃MALT淋巴瘤患者而言, 三维适形放疗是一种简单并且安全的治疗方法. 照射野除外全胃还要留有一定正常的边缘, 以避免由于呼吸运动而对肾、肝脏和心脏等重要脏器的损伤. 应用三维适形放疗以及调强适形放疗可能使胃MALT淋巴瘤侵及十二指肠或食管下端等邻近组织的局部放疗得以安全有效的评估.

5.3 *化疗* 早期胃MALT淋巴瘤病灶比较局限, 多属于低度恶性, 所以单纯化疗的报道不多. 通常把他作为术后的一种辅助治疗或者联合其他治疗方法共同应用[4,26,54-55]. 有学者对使用单一化疗药物口服治疗胃淋巴瘤进行了研究. 对于应用抗生素复发的患者, 单药化疗(例如, 环磷酰胺, 苯丁酸氮芥, 克拉屈滨等)或放疗仍然可以获得80%-90%的5 a生存率. 而多药联合化疗, 如CHOP, 可以治疗上述治疗仍然无效的患者[56-57]. Levy *et al*[58]对*H pylori*阴性或抗*H pylori*治疗无

■创新盘点

2006年NCCN指南将抗*H pylori*治疗已经划为低度恶性胃MALT淋巴瘤的一线治疗方案. 然而, 5%-10%的胃MALT淋巴瘤患者无*H pylori*感染的依据. 对于这部分患者可以考虑采用抗生素经验治疗, 失败后可以根据患者的病情参考选择放疗或者手术干预.

■同行评价
本文综述了胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤的临床研究进展情况，文笔较好，有一定科学性，尤其是阐述了*H pylori*阴性的MALT的研究进展，有参考价值.

效的低度恶性胃MALT淋巴瘤进行了单一口服烷化剂的治疗，58%的患者得到了完全缓解. 化疗较为严重的不良反应也是胃出血与穿孔，Bartlett *et al*[59]在28例化疗患者中发现胃出血的发生率为6.6%，穿孔率为3.3%.

绝大多数胃MALT淋巴瘤都表达CD20，近来报道美罗华治疗后整体有效率可高到64%，完全缓解率为29%[60]. Martinelli *et al*[61]认为，美罗华的活性和肿瘤负荷有关，早期患者的疗效优于晚期的患者，所有Ⅳ期患者的病灶没有完全缓解，此外胃MALT淋巴瘤比滤泡淋巴瘤疗效好.

5.4 外科治疗 关于胃淋巴瘤的治疗，目前而言，多数学者认为行手术切除是必要的. 长期以来，外科治疗一直作为治愈胃原发性淋巴瘤的主要手段. 一般认为其优势有以下几点：可直接切除肿瘤，更易于分级分期、指导下一步的治疗和判断预后；预防放化疗引起的并发症；通过肿瘤的切除提高存活率[62-63]. 但随着诊断技术的不断改进，术前诊断正确率可达90%，从而显著降低了为确诊而进行手术的必要性[64]. 而抗*H pylori*疗法在目前又被认为是*H pylori*阳性的胃原发性淋巴瘤的首选疗法. 此外，胃切除后26%的患者会出现早期和晚期并发症，使中位住院时间延长10 d[38,59]. 进一步研究发现，胃MALT淋巴瘤病变呈弥漫性以及多灶性，常常需要全胃切除或者手术后放疗，这样术后的并发症可以增高到50%[38,59]. 这些使得大家不得不对外科手术在治疗胃MALT淋巴瘤中的地位进行重新的探讨[62,64]. 从目前的文献报道可以看出，在一些情况下例如对部分并无*H pylori*感染或者抗*H pylori*治疗无效的病例，手术仍然是一种非常有效的方法[54,59,62-66]. Takahashi *et al*[53]对85例Ⅰ期和Ⅱ期的胃MALT淋巴瘤患者进行了手术治疗，部分患者接受辅助化疗，结果显示，Ⅰ期和Ⅱ期的5 a存活率分别为97.5%和59.3%. 他们认为，根治性切除联合扩大的淋巴结清扫可以提高Ⅰ期患者术后的生存率. Bartlett *et al*[59]对34例早期的胃MALT淋巴瘤病例进行了研究，其中15例单独接受了外科治疗，随访结果10 a无瘤存活率达到了100%，该研究表明对于早期的胃原发性淋巴瘤病例，手术仍是最为有效的治疗手段之一. 而且对于病灶较小(<10 cm)、无淋巴结转移的低度恶性胃淋巴瘤无需进行手术后的辅助性治疗. Waisberg *et al*[63]也得到了类似的结论，认为早期的胃MALT淋巴瘤接受手术治疗后可以提高5 a生存期，但是对于Ⅱ期的病灶作用尚不明确，需要更多的临床试验以及前瞻性研究进一步证实.

6 *H pylori*阴性的胃MALT淋巴瘤

5%-10%的胃MALT淋巴瘤患者无*H pylori*感染的依据. 因为这部分患者少见，因此相关的临床资料也不多. Ye *et al*[67]对17名*H pylori*阴性的患者进行一项多中心分析，结果显示无*H pylori*感染患者发生t(11;18)(q21;q21)的比例更多. 在另外一项关于胃MALT淋巴瘤研究报告中提出，在115名患者中，21位(18%)存在t(11;18)(q21;q21)，并形成融合转录产物API2-MALT1，这些人群对抗生素治疗是抵抗的[26,68]，以男性居多(82%)，内镜下病灶呈鹅卵石样外观，侵犯胃壁深层. 组织学诊断提示21名患者均为低度恶性胃MALT淋巴瘤，并且不含有大细胞的成分. 而且，t(11;18)(q21;q21)的瘤组织具有*H pylori*感染率低，临床分期晚[69]，BCL10阳性的特点[70]. 然而对于无*H pylori*感染依据的$Ⅰ_E$和$Ⅱ_E$期患者，综合考虑到疾病的低度恶性、进展十分缓慢，并且*H pylori*感染有时难以发现，因此可以给与进行抗生素经验治疗，3 mo后复查胃镜，评估病灶. 如果同样发现t(11;18)患者建议进行放疗. 目前对于缺乏*H pylori*感染依据或者抗生素失败的患者尚无统一的治疗指南. 对于这些患者，放疗是一种明智的选择[16,39]. 在一项前瞻性的研究中，Schechter *et al*[38]应用平均30 Gy的剂量使所有患者都达到了完全缓解，平均随访27 mo，没有出现复发和转移. 对于包括全胃、胃周淋巴结、腹腔淋巴结给与30-35 Gy的照射剂量；双肾的照射剂量控制在20 Gy以下，接受照射的肝脏体积大于50%时，剂量要低于25 Gy. 尽管放疗后会出现短暂的恶心和厌食，但是在30-35 Gy的治疗剂量下发生溃疡以及穿孔等并发症却是少见的. 不仅如此，放疗后患者很少出现复发. 2005年，Raderer *et al*[71]对6名*H pylori*阴性的患者进行前瞻性分析，结果显示，早期胃MALT淋巴瘤患者即使*H pylori*为阴性，应用抗生素仍然可以取得一定疗效. 应用抗生素治疗*H pylori*阴性患者后，疾病无进展时间得到了延长，这是目前比较一致的看法.

7 预后

对于*H pylori*相关的胃MALT淋巴瘤患者而言, 近年来公布了一些对抗生素治疗效果几个有预后价值的因素. Hong *et al*[42]提出局限于胃黏膜或黏膜下的淋巴瘤对抗生素治疗敏感. 此后, Raderer *et al*[72]和Wohrer *et al*[73]分别提出患者伴有自身免疫疾病以及产生单克隆免疫球蛋白者对抗生素治疗不乐观.

目前研究最多的是t(11;18)(q21;q21)在胃MALT淋巴瘤中的预后价值[69]. 根据最近的研究结果, t(11;18)(q21;q21)和抗生素治疗淋巴瘤耐药有关[56-57,74-75]. Liu *et al*[75]对111名患者进行的大规模临床研究结果证明抗生素耐药的63名患者中, 42名发生了t(11;18)(q21;q21); 而治疗有效的48名患者中仅有2名患者存在t(11;18)(q21;q21). 此外, Taji *et al*[76]进行了一系列关于第三染色体三体化的研究, 他们的研究结果提示, 第三染色体三体化的出现预示抗生素根治*H pylori*效果不佳. 另外也有人报道核因子NF-κB或BCL10是感染*H pylori*的胃MALT淋巴瘤的独立预后因子[77-80].

8 参考文献

1 Isaacson P, Wright DH. Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma. *Cancer* 1983; 52: 1410-1416

2 Farinha P, Gascoyne RD. Molecular pathogenesis of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6370-6378

3 Isaacson PG. Update on MALT lymphomas. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005; 18: 57-68

4 Al-Akwaa AM, Siddiqui N, Al-Mofleh IA. Primary gastric lymphoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 5-11

5 Farinha P, Gascoyne RD. *Helicobacter pylori* and MALT lymphoma. *Gastroenterology* 2005; 128: 1579-1605

6 Fujioka T, Yoshiiwa A, Okimoto T, Kodama M, Murakami K. Guidelines for the management of *Helicobacter pylori* infection in Japan: current status and future prospects. *J Gastroenterol* 2007; 42 Suppl 17: 3-6

7 Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *Histopathology* 2 000; 36: 69-86

8 De Jong D, Boot H, van Heerde P, Hart GA, Taal BG. Histological grading in gastric lymphoma: pretreatment criteria and clinical relevance. *Gastroenterology* 1997; 112: 1466-1474

9 Kuper CF. Histopathology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicol Pathol* 2006; 34: 609-615

10 Wundisch T, Kim TD, Thiede C, Morgner A, Alpen B, Stolte M, Neubauer A. Etiology and therapy of *Helicobacter pylori*-associated gastric lymphomas. *Ann Hematol* 2003; 82: 535-545

11 Zhang W, Garces J, Dong HY. Detection of the t(11;18) API2/MALT1 translocation associated with gastric MALT lymphoma in routine formalin-fixed, paraffin-embedded small endoscopic biopsy specimens by robust real-time RT-PCR. *Am J Clin Pathol* 2006; 126: 931-940

12 Iwano M, Watanabe N, Matsushima Y, Seno H, Oki K, Sakurai T, Inagaki H, Okazaki K, Chiba T. Rapid development of diffuse large B-Cell lymphoma after successful eradication of *Helicobacter pylori* for gastric MALT lymphoma. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2878-2883

13 Streubel B, Simonitsch-Klupp I, Mullauer L, Lamprecht A, Huber D, Siebert R, Stolte M, Trautinger F, Lukas J, Puspok A, Formanek M, Assanasen T, Muller-Hermelink HK, Cerroni L, Raderer M, Chott A. Variable frequencies of MALT lymphoma-associated genetic aberrations in MALT lymphomas of different sites. *Leukemia* 2004; 18: 1722-1726

14 Zhang C, Yamada N, Wu YL, Wen M, Matsuhisa T, Matsukura N. *Helicobacter pylori* infection, glandular atrophy and intestinal metaplasia in superficial gastritis, gastric erosion, erosive gastritis, gastric ulcer and early gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 791-796

15 Fischbach W, Goebeler-Kolve ME, Greiner A. Diagnostic accuracy of EUS in the local staging of primary gastric lymphoma: results of a prospective, multicenter study comparing EUS with histopathologic stage. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 696-700

16 El-Zahabi LM, Jamali FR, El-Hajj II, Naja M, Salem Z, Shamseddine A, El-Saghir NS, Zaatari G, Geara F, Soweid AM. The value of EUS in predicting the response of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma to *Helicobacter pylori* eradication. *Gastrointest Endosc* 2007; 65: 89-96

17 Gheorghe C, Bancila I, Stoia R, Gheorghe L, Becheanu G, Dobre C, Brescan R. Regression of gastric malt-lymphoma under specific therapy may be predict by endoscopic ultrasound. *Rom J Gastroenterol* 2004; 13: 129-134

18 Di Raimondo F, Caruso L, Bonanno G, Naso P, Chiarenza A, Fiumara P, Bari A, Palumbo G, Russo A, Giustolisi R. Is endoscopic ultrasound clinically useful for follow-up of gastric lymphoma? *Ann Oncol* 2007; 18: 351-356

19 Ferrucci PF, Zucca E. Primary gastric lymphoma pathogenesis and treatment: what has changed over the past 10 years? *Br J Haematol* 2007; 136: 521-538

20 Nakamura S, Yao T, Aoyagi K, Iida M, Fujishima M, Tsuneyoshi M. *Helicobacter pylori* and primary gastric lymphoma. A histopathologic and immunohistochemical analysis of 237 patients. *Cancer* 1997; 79: 3-11

21 Suarez F, Lortholary O, Hermine O, Lecuit M. Infection-associated lymphomas derived from marginal zone B cells: a model of antigen-driven lymphoproliferation. *Blood* 2006; 107: 3034-3044

22 Szczepanik M. Interplay between *Helicobacter pylori* and the immune system. Clinical implications. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57: 15-27

23 Isaacson PG, Spencer J. Gastric lymphoma and *Helicobacter pylori*. *Important Adv Oncol* 1996; :

111-121
24 Manson SD. Mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. *Semin Oncol Nurs* 2006; 22: 73-79
25 Yi ZH, Ouyang Q, Li GD, Chen DY. Combined histology and molecular biology for diagnosis of early stage gastric MALT lymphoma. *Chin J Dig Dis* 2006; 7: 12-18
26 Hummel M, Oeschger S, Barth TF, Loddenkemper C, Cogliatti SB, Marx A, Wacker HH, Feller AC, Bernd HW, Hansmann ML, Stein H, Moller P. Wotherspoon criteria combined with B cell clonality analysis by advanced polymerase chain reaction technology discriminates covert gastric marginal zone lymphoma from chronic gastritis. *Gut* 2006; 55: 782-787
27 El-Zimaity HM, Wotherspoon A, de Jong D. Interobserver variation in the histopathological assessment of malt/malt lymphoma: towards a consensus. *Blood Cells Mol Dis* 2005; 34: 6-16
28 Mueller A, O'rourke J, Chu P, Chu A, Dixon MF, Bouley DM, Lee A, Falkow S. The role of antigenic drive and tumor-infiltrating accessory cells in the pathogenesis of helicobacter-induced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Am J Pathol* 2005; 167: 797-812
29 El-Zimaity HM. Gastric atrophy, diagnosing and staging. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5757-5762
30 Wundisch T, Thiede C, Morgner A, Dempfle A, Gunther A, Liu H, Ye H, Du MQ, Kim TD, Bayerdorffer E, Stolte M, Neubauer A. Long-term follow-up of gastric MALT lymphoma after *Helicobacter pylori* eradication. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8018-8024
31 Steiff JN, Neubauer A, Stolte M, Wundisch T. Clonality analyses in gastric MALT (mucosa-associated lymphoid tissue). *Pathol Res Pract* 2006; 202: 503-507
32 Bertoni F, Conconi A, Capella C, Motta T, Giardini R, Ponzoni M, Pedrinis E, Novero D, Rinaldi P, Cazzaniga G, Biondi A, Wotherspoon A, Hancock BW, Smith P, Souhami R, Cotter FE, Cavalli F, Zucca E. Molecular follow-up in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas: early analysis of the LY03 cooperative trial. *Blood* 2002; 99: 2541-2544
33 Malfertheiner P, Megraud F, O'morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, Hunt R, Rokkas T, Vakil N, Kuipers EJ. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection-The Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007
34 Fischbach W, Goebeler-Kolve ME, Dragosics B, Greiner A, Stolte M. Long term outcome of patients with gastric marginal zone B cell lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue (MALT) following exclusive *Helicobacter pylori* eradication therapy: experience from a large prospective series. *Gut* 2004; 53: 34-37
35 Zelenetz AD, Hoppe RT. NCCN: Non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Control* 2001; 8: 102-113
36 Wohrer S, Bartsch R, Hejna M, Drach J, Raderer M. Routine application of the proton-pump inhibitor pantoprazole in patients with gastric lymphoma undergoing chemotherapy. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 1222-1225
37 Jezersek Novakovic B, Vovk M, Juznic Setina T. A single-center study of treatment outcomes and survival in patients with primary gastric lymphomas between 1990 and 2003. *Ann Hematol* 2006; 85: 849-856
38 Schechter NR, Yahalom J. Low-grade MALT lymphoma of the stomach: a review of treatment options. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 46: 1093-1103
39 Sugimoto M, Kajimura M, Shirai N, Furuta T, Kanaoka S, Ikuma M, Sato Y, Hishida A. Outcome of radiotherapy for gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma refractory to *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Intern Med* 2006; 45: 405-409
40 Nakamura S, Matsumoto T, Suekane H, Nakamura S, Matsumoto H, Esaki M, Yao T, Iida M. Long-term clinical outcome of *Helicobacter pylori* eradication for gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma with a reference to second-line treatment. *Cancer* 2005; 104: 532-540
41 Montalban C, Santon A, Redondo C, Garcia-Cosio M, Boixeda D, Vazquez-Sequeiros E, Norman F, de Argila CM, Alvarez I, Abraira V, Bellas C. Long-term persistence of molecular disease after histological remission in low-grade gastric MALT lymphoma treated with *H. pylori* eradication. Lack of association with translocation t(11;18): a 10-year updated follow-up of a prospective study. *Ann Oncol* 2005; 16: 1539-1544
42 Hong SS, Jung HY, Choi KD, Song HJ, Lee GH, Oh TH, Jo JY, Kim KJ, Byeon JS, Myung SJ, Yang SK, Hong WS, Kim JH, Min YI. A prospective analysis of low-grade gastric malt lymphoma after *Helicobacter pylori* eradication. *Helicobacter* 2006; 11: 569-573
43 Dzieniszewski J, Jarosz M. Guidelines in the medical treatment of *Helicobacter pylori* infection. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57: 143-154
44 De Mascarel A, Ruskone-Fourmestraux A, Lavergne-Slove A, Megraud F, Dubus P, Merlio JP. Clinical, histological and molecular follow-up of 60 patients with gastric marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Virchows Arch* 2005; 446: 219-224
45 Savio A, Zamboni G, Capelli P, Negrini R, Santandrea G, Scarpa A, Fuini A, Pasini F, Ambrosetti A, Paterlini A, Buffoli F, Angelini GP, Cesari P, Rolfi F, Graffeo M, Pascarella A, Valli M, Mombello A, Ederle A, Franzin G. Relapse of low-grade gastric MALT lymphoma after *Helicobacter pylori* eradication: true relapse or persistence? Long-term post-treatment follow-up of a multicenter trial in the north-east of Italy and evaluation of the diagnostic protocol's adequacy. *Recent Results Cancer Res* 2000; 156: 116-124
46 Advani R, Rosenberg SA, Horning SJ. Stage I and II follicular non-Hodgkin's lymphoma: long-term follow-up of no initial therapy. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1454-1459
47 Akamatsu T, Mochizuki T, Okiyama Y, Matsumoto A, Miyabayashi H, Ota H. Comparison of localized gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma with and without *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2006; 11: 86-95
48 Park W, Chang SK, Yang WI, Ko YH, Huh SJ, Ahn YC, Suh CO. Rationale for radiotherapy as a treatment modality in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Int J Radiat Oncol Biol*

Phys 2004; 58: 1480-1486
49 Schechter NR, Portlock CS, Yahalom J. Treatment of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma of the stomach with radiation alone. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1916-1921
50 Schechter NR, Yahalom J. Low-grade MALT lymphoma of the stomach: a review of treatment options. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 46: 1093-1103
51 Tsang RW, Gospodarowicz MK. Radiation therapy for localized low-grade non-Hodgkin's lymphomas. *Hematol Oncol* 2005; 23: 10-17
52 Park HC, Park W, Hahn JS, Kim CB, Lee YC, Noh JK, Suh CO. Low grade MALT lymphoma of the stomach: treatment outcome with radiotherapy alone. *Yonsei Med J* 2002; 43: 601-606
53 Della Biancia C, Hunt M, Furhang E, Wu E, Yahalom J. Radiation treatment planning techniques for lymphoma of the stomach. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 62: 745-751
54 Takahashi I, Maehara Y, Koga T, Sumiyoshi Y, Oshiro T, Baba H, Kohnoe S, Okamura T, Uike N, Matsusaka T, Kume K, Sugimachi K. Role of surgery in the patients with stage I and II primary gastric lymphoma. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 877-882
55 Aviles A, Neri N, Nambo MJ, Huerta-Guzman J, Cleto S. Surgery and chemotherapy versus chemotherapy as treatment of high-grade MALT gastric lymphoma. *Med Oncol* 2006; 23: 295-300
56 Montalban C, Norman F. Treatment of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: *Helicobacter pylori* eradication and beyond. *Expert Rev Anticancer Ther* 2006; 6: 361-371
57 Levy M, Copie-Bergman C, Gameiro C, Chaumette MT, Delfau-Larue MH, Haioun C, Charachon A, Hemery F, Gaulard P, Leroy K, Delchier JC. Prognostic value of translocation t(11;18) in tumoral response of low-grade gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type to oral chemotherapy. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5061-5066
58 Levy M, Copie-Bergman C, Traulle C, Lavergne-Slove A, Brousse N, Flejou JF, de Mascarel A, Hemery F, Gaulard P, Delchier JC. Conservative treatment of primary gastric low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue: predictive factors of response and outcome. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 292-297
59 Bartlett DL, Karpeh MS Jr, Filippa DA, Brennan MF. Long-term follow-up after curative surgery for early gastric lymphoma. *Ann Surg* 1996; 223: 53-62
60 Conconi A, Martinelli G, Thieblemont C, Ferreri AJ, Devizzi L, Peccatori F, Ponzoni M, Pedrinis E, Dell'Oro S, Pruneri G, Filipazzi V, Dietrich PY, Gianni AM, Coiffier B, Cavalli F, Zucca E. Clinical activity of rituximab in extranodal marginal zone B-cell lymphoma of MALT type. *Blood* 2003; 102: 2741-2745
61 Martinelli G, Laszlo D, Ferreri AJ, Pruneri G, Ponzoni M, Conconi A, Crosta C, Pedrinis E, Bertoni F, Calabrese L, Zucca E. Clinical activity of rituximab in gastric marginal zone non-Hodgkin's lymphoma resistant to or not eligible for anti-*Helicobacter pylori* therapy. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1979-1983
62 Vaillant JC, Ruskone-Fourmestraux A, Aegerter P, Gayet B, Rambaud JC, Valleur P, Parc R. Management and long-term results of surgery for localized gastric lymphomas. *Am J Surg* 2000; 179: 216-222
63 Waisberg J, Andre EA, Franco MI, Abucham-Neto JZ, Wickbold D, Goffi FS. Curative resection plus adjuvant chemotherapy for early stage primary gastric non-Hodgkin's lymphoma: a retrospective study with emphasis on prognostic factors and treatment outcome. *Arq Gastroenterol* 2006; 43: 30-36
64 Yoon SS, Coit DG, Portlock CS, Karpeh MS. The diminishing role of surgery in the treatment of gastric lymphoma. *Ann Surg* 2004; 240: 28-37
65 Gobbi PG, Ghirardelli ML, Cavalli C, Baldini L, Broglia C, Clo V, Berte R, Ilariucci F, Carotenuto M, Piccinini L, Stelitano C, Attardo-Parrinello G, Ascari E. The role of surgery in the treatment of gastrointestinal lymphomas other than low-grade MALT lymphomas. *Haematologica* 2000; 85: 372-380
66 Chang MC, Huang MJ, Su YW, Chang YF, Lin J, Hsieh RK. Clinical outcome of primary gastric lymphoma treated with chemotherapy alone or surgery followed by chemotherapy. *J Formos Med Assoc* 2006; 105: 194-202
67 Ye H, Liu H, Raderer M, Chott A, Ruskone-Fourmestraux A, Wotherspoon A, Dyer MJ, Chuang SS, Dogan A, Isaacson PG, Du MQ. High incidence of t(11;18)(q21;q21) in *Helicobacter pylori*-negative gastric MALT lymphoma. *Blood* 2003; 101: 2547-2550
68 Inagaki H, Nakamura T, Li C, Sugiyama T, Asaka M, Kodaira J, Iwano M, Chiba T, Okazaki K, Kato A, Ueda R, Eimoto T, Okamoto S, Sasaki N, Uemura N, Akamatsu T, Miyabayashi H, Kawamura Y, Goto H, Niwa Y, Yokoi T, Seto M, Nakamura S. Gastric MALT lymphomas are divided into three groups based on responsiveness to *Helicobacter Pylori* eradication and detection of API2-MALT1 fusion. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 1560-1567
69 Zhou Y, Ye H, Martin-Subero JI, Hamoudi R, Lu YJ, Wang R, Siebert R, Shipley J, Isaacson PG, Dogan A, Du MQ. Distinct comparative genomic hybridisation profiles in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas with and without t(11;18)(q21;q21). *Br J Haematol* 2006; 133: 35-42
70 Iwano M, Watanabe N, Matsushima Y, Seno H, Oki K, Sakurai T, Inagaki H, Okazaki K, Chiba T. Rapid development of diffuse large B-Cell lymphoma after successful eradication of *Helicobacter pylori* for gastric MALT lymphoma. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2878-2883
71 Raderer M, Streubel B, Wohrer S, Hafner M, Chott A. Successful antibiotic treatment of *Helicobacter pylori* negative gastric mucosa associated lymphoid tissue lymphomas. Gut 2006; 55: 616-8
72 Raderer M, Osterreicher C, Machold K, Formanek M, Fiebiger W, Penz M, Dragosics B, Chott A. Impaired response of gastric MALT-lymphoma to *Helicobacter pylori* eradication in patients with autoimmune disease. *Ann Oncol* 2001; 12: 937-939
73 Wohrer S, Streubel B, Bartsch R, Chott A, Raderer M. Monoclonal immunoglobulin production is a frequent event in patients with mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 7179-7181
74 Liu H, Ye H, Ruskone-Fourmestraux A, De Jong D, Pileri S, Thiede C, Lavergne A, Boot H, Caletti G, Wundisch T, Molina T, Taal BG, Elena S, Thomas

T, Zinzani PL, Neubauer A, Stolte M, Hamoudi RA, Dogan A, Isaacson PG, Du MQ. T(11;18) is a marker for all stage gastric MALT lymphomas that will not respond to *H pylori* eradication. *Gastroenterology* 2002; 122: 1286-1294

75 Liu H, Ruskon-Fourmestraux A, Lavergne-Slove A, Ye H, Molina T, Bouhnik Y, Hamoudi RA, Diss TC, Dogan A, Megraud F, Rambaud JC, Du MQ, Isaacson PG. Resistance of t(11;18) positive gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma to *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Lancet* 2001; 357: 39-40

76 Taji S, Nomura K, Matsumoto Y, Sakabe H, Yoshida N, Mitsufuji S, Nishida K, Horiike S, Nakamura S, Morita M, Taniwaki M. Trisomy 3 may predict a poor response of gastric MALT lymphoma to Helicobacter pylori eradication therapy. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 89-93

77 Yeh KH, Kuo SH, Chen LT, Mao TL, Doong SL, Wu MS, Hsu HC, Tzeng YS, Chen CL, Lin JT, Cheng AL. Nuclear expression of BCL10 or nuclear factor kappa B helps predict *Helicobacter pylori*-independent status of low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas with or without t(11;18)(q21;q21). *Blood* 2005; 106: 1037-1041

78 Franco R, Camacho FI, Caleo A, Staibano S, Bifano D, De Renzo A, Tranfa F, De Chiara A, Botti G, Merola R, Diez A, Bonavolonta G, De Rosa G, Piris MA. Nuclear bcl10 expression characterizes a group of ocular adnexa MALT lymphomas with shorter failure-free survival. *Mod Pathol* 2006; 19: 1055-1067

79 Ye H, Gong L, Liu H, Ruskone-Fourmestraux A, de Jong D, Pileri S, Thiede C, Lavergne A, Boot H, Caletti G, Wundisch T, Molina T, Taal BG, Elena S, Neubauer A, Maclennan KA, Siebert R, Remstein ED, Dogan A, Du MQ. Strong BCL10 nuclear expression identifies gastric MALT lymphomas that do not respond to *H pylori* eradication. *Gut* 2006; 55: 137-138

80 Zeid MA, Elbedewy AF, Awad I. Primary gastric lymphoma: a clinicopathologic study. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 649-653

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2007-03-18)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月18日; 15(8): 869-872
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

TGF-β1与慢性乙型肝炎的关系

游 晶, 袁丽芳, 陈红英, 唐宝璋, 王 辉

游晶, 袁丽芳, 陈红英, 唐宝璋, 王辉, 昆明医学院第一附属医院感染病科 云南省昆明市 650032
通讯作者: 游晶, 650032, 云南省昆明市西昌路295号, 昆明医学院第一附属医院感染病科. jingyoukm@126.com
电话: 0871-5324888
收稿日期: 2006-11-13 接受日期: 2006-12-18

Relationship between transforming growth factor β1 and chronic hepatitis B

Jing You, Li-Fang Yuan, Hong-Ying Chen, Bao-Zhang Tang, Hui Wang

Jing You, Li-Fang Yuan, Hong-Ying Chen, Bao-Zhang Tang, Hui Wang, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China
Correspondence to: Dr. Jing You, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, 295 Xichang Road, Kunming 650032, Yunnan Province, China. jingyoukm@126.com
Received: 2006-11-13 Accepted: 2006-12-18

Abstract

Transforming growth factor-β (TGF-β) is a family of related proteins that regulate many cellular processes including growth, differentiation, extracellular matrix formation and breaking down and immunosuppression. TGF-β1 is considered to play a pivotal role in hepatic stellate cell activation and a confirmed role in liver fibrosis, and its antiproliferative, proapoptotic, and immunosuppressive activities can play important roles in the pathogenesis of viral hepatitis. There is a marked correlation between the concentration and gene polymorphisms of TGF-β1 and chronic hepatitis B.

Key Words: Transforming growth factor β1; Hepatitis B; Hepatitis B virus

You J, Yuan LF, Chen HY, Tang BZ, Wang H. Relationship between transforming growth factor β1 and chronic hepatitis B. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(8):869-872

摘要

转化生长因子β(transforming growth factor β, TGF-β)是一簇功能相似的活性多肽, 具有多种生物活性, 能调节多种细胞分化、增殖、迁移、及细胞外基质合成与降解, 其中最受关注且与肝脏疾病关系最密切的是TGF-β1, TGF-β1在体内的水平高低及其基因多肽性都与各种乙型肝炎存在着密切的相关性. 本文就TGF-β1与各种慢性乙型肝炎的关系作一综述.

关键词: 转化生长因子β1; 乙型肝炎; 乙型肝炎病毒

游晶, 袁丽芳, 陈红英, 唐宝璋, 王辉. TGF-β1与慢性乙型肝炎的关系. 世界华人消化杂志 2007;15(8):869-872
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/869.asp

0 引言

转化生长因子-β(transforming growth factor β, TGF-β)是Tucker *et al*[1]在1984年发现的一种与多种上皮性肿瘤生长有关的多肽性细胞生长调控因子. 目前发现至少有5种异构体, 分别命名为TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4, TGF-β5. 各种异构体在许多生物反应中表现出相似的作用, 其中TGF-β1最为重要. TGF-β的生物学功能是多方面的, 其对上皮组织、结缔组织的正常细胞或恶性细胞均具有极广泛的多种调节作用. 在不同条件下, 既可刺激细胞的增殖、分化与生长, 又可抑制细胞的增殖、分化与生长. 新近研究表明, TGF-β1与肝细胞损伤、肝纤维化及肝癌等存在密切关系, 因此, TGF-β1与慢性乙型肝炎的关系随之成为目前研究热点, 本文就TGF-β1与各种慢性乙型肝炎的关系作一综述.

1 TGF-β的结构和生物学特性

TGF-β的活性结构为25 kDa的二聚体, 由两条相同的多肽链(112个氨基酸)经二硫键相连. 这种由二硫键结构而成的双聚体结构是维持TGF-β三维空间结构及生物学活性的分子基础. 还原剂可破坏TGF-β的二聚体结构, 并使之丧失生物学活性, 根据基因克隆和序列分析, 证明细胞最初合成的TGF-β是由390个氨基酸

■背景资料
TGF-β是一种多功能的调节因子, 通过自分泌及旁分泌的机制对许多生物过程进行调控, 包括: 细胞生长、迁移、分化, 胚胎的发生, 肿瘤的发生, 伤口愈合, 骨的形成, 免疫调节等. 但是, TGF-β在各种致病过程中, 可诱导不同的甚至相反的生物学效应, 这依赖于细胞类型及细胞外基质. 因此, TGF-β的作用因各种生物学环境及细胞分化的阶段不同而不同, 其各种异构体在许多生物反应中表现出相似的作用, 其中TGF-β1最为重要.

■研发前沿
TGF-β具有至少5种异构体, 分别命名为TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4, TGF-β5. 各种异构体在许多生物反应中表现出相似的作用, 其中TGF-β1最为重要. 新近研究表明, TGF-β1与肝细胞损伤、肝纤维化及肝癌等存在密切关系, 因此, TGF-β1与慢性乙型肝炎的关系随之成为目前研究热点.

■相关报道
肝纤维化或肝硬化是由于胶原或其他细胞外基质的合成降解失衡导致在肝内过量沉积, TGF-β1与肝纤维化的关系主要涉及其促进细胞外基质的产生并抑制其降解、抑制肝细胞的再生, 其基因多态性与肝纤维化也存在一定的关系. TGF-β1是控制肝脏细胞生长和增殖的重要细胞因子, 但发现在肝细胞癌患者肝组织中, TGF-β1的表达不是减弱而是增强.

■应用要点
TGF-β1与肝细胞损伤、肝硬化的发生、肝癌的发生都有密切的相关性, 因此临床上监测血清和肝组织中的TGF-β1水平对肝损伤、纤维化、及肝癌的动态及预后观察具有非常重要的意义.

组成的无活性前体蛋白, 这种前体蛋白N端经酶解可获得2个成熟肽单体, 各含有112个氨基酸, 已知非活化型TGF-β在体外被酸、碱、尿素、SDS、蛋白酶等处理后可转化为25 kDa的活化型TGF-β. 只有活性的TGF-β才能发挥生物学功能. 活化后的TGF-β包括一组密切相关的高二聚体, 目前已鉴定出5种异构体, 其中3种(TGF-β1, β2, β3)已从人体细胞中分离出来. 哺乳动物中, 成熟的、有生物活性的TGF-β也都由二聚体组成, 两条相同的112个氨基酸的多肽为亚单位, 通过二硫键相连, 形成25 kDa的TGF-β分子. TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3同源性很好, 且不同哺乳动物来源的成熟TGF-β具有高度保守性.

TGF-β通过自分泌及旁分泌的机制对许多生物过程进行调控, 包括: 细胞生长、迁移、分化[2], 胚胎的发生[3-4], 肿瘤的发生[5], 伤口愈合[6-7], 骨的形成[8], 免疫调节[9]等. TGF-β在各种致病过程中, 可诱导不同的甚至相反的生物学效应, 这依赖于细胞类型及细胞外基质. 因此, TGF-β的作用因各种生物学环境及细胞分化的阶段不同而不同. 各种异构体在许多生物反应中表现出相似的作用, 其中TGF-β1最为重要. TGF-β1对间叶组织来源的细胞有促进其生长的作用如纤维原细胞、造骨细胞, 对上皮组织、神经外胚层来源的细胞则有抑制其生长的作用, 如破骨细胞、T淋巴细胞、B淋巴细胞、肝细胞等[10-11]. TGF-β1是极强的免疫调节剂, 可以抑制免疫球蛋白的分泌, 抑制大多数T、B细胞系在体外的增殖和分化. 拮抗IL-Ⅰβ, TNF-α, IFN-γ等细胞因子的效应, 抑制IL-Ⅰβ和IL-Ⅱ受体的表达, 阻止巨噬细胞产生过氧化物及NO, 抑制中性粒细胞和T细胞黏附于内皮细胞, 从而限制了炎症细胞补充到损伤部位. Ito *et al*[12]报道, 肝脏巨大血管瘤患者因上皮细胞对TGF-β1 mRNA过度表达使血浆TGF-β1明显升高, 同时伴有免疫功能下降, 随着血管瘤的切除, 血浆TGF-β1水平明显下降, 且免疫功能恢复正常.

2 TGF-β1与肝细胞损伤的关系

正常细胞极少或不存在TGF-β1, 而在慢性乙型肝炎, 病毒对肝细胞的直接作用或其介导的免疫病理损伤, 导致肝细胞变性坏死, Kupffer细胞大量浸润[12], Kupffer细胞激活后合成分泌大量的TGF-β1, 另外受损的肝细胞、内皮细胞使血小板凝聚释放更多的TGF-β1[13]. 孙樱 *et al*[14]对103例慢性乙型肝炎、肝硬化患者血清中TGF-β1研究发现, 血清TGF-β1水平与TBiL呈正相关, 与PTA、BALB呈负相关, 表明血清TGF-β1与CHB的病变程度和肝损的严重程度一致. Flisiak *et al*[15]对21例慢性活动型肝炎及40例肝硬化患者进行研究, TGF-β1在患者中的平均水平(36.9±2.8 μg/L)是正常对照组(18.3±1.6 μg/L)的两倍, 且随肝损程度的加重, 其水平逐渐增高. 邬光惠 *et al*[16]对48例急性和慢性乙型肝炎患者检测血清TGF-β1(分别为23.6±7.7 μg/L和19.7±8.9 μg/L), 均明显高于正常对照组(8.0±3.4 μg/L). 刘芳 *et al*[13]检测76例CHB、LC患者TGF-β1, ALT, SB结果显示, CHB中TGF-β1水平明显高于对照组, ALT>2667.2 nkat/L组、SB>85.5 μmol/L组血清TGF-β1水平明显高于肝功能正常组, 与上述研究者得出相同的结论: TGF-β1含量可反映肝损害程度, 血清TGF-β1的测定对慢性乙型肝炎病情及预后判断有重要意义.

3 TGF-β1与肝纤维化的关系

肝纤维化或肝硬化是由于胶原或其他细胞外基质的合成降解失衡导致在肝内过量沉积[17], TGF-β1与肝纤维化的关系主要涉及其促进细胞外基质的产生并抑制其降解、抑制肝细胞的再生, 其基因多态性与肝纤维化也存在一定的关系.

3.1 促进细胞外基质的产生并抑制其降解 在肝纤维化中, 储脂细胞是细胞外基质产生的主要细胞, TGF-β1是储脂细胞和纤维化母细胞的生长因子, 在TGF-β1作用下, 储脂细胞被激活或转化为纤维母细胞, TGF-β1能刺激这些细胞向损伤部位迁移、增值和产生胶原, 并自分泌TGF-β1, 导致细胞外基质循环不断的产生, 形成肝纤维化的基础条件[18]. TGF-β1本身又促进毛细血管生成作用, 使肝窦出现毛细血管化和胶原化, 形成肝纤维化程度不断加重最早期的组织病理学改变[19]. 细胞外基质的代谢是通过多种水解酶实现, 其中主要包括金属蛋白酶、胶原酶、明胶酶等. TGF-β1通过调节这些酶的产生和活性来干扰细胞外基质的代谢, TGF-β1能在转录水平上促进α2巨球蛋白表达, 而金属蛋白酶与后者结合后功能受到抑制[20]. TGF-β1的生物学活性还包括促进黏合素分子、纤维连接素及其受体的表达, 增加了细胞与基质的黏附性[21]. Si *et al*[19]将TGF-β1皮下注射于小鼠, 72 h

后注射部位有明显纤维原细胞增生及炎性细胞浸润, 对照组并未发生此改变. 黄芬 *et al*[22]研究表明, 慢性乙型肝炎患者血清TGF-β1与纤维黏连蛋白水平呈正相关, 血清TGF-β1与ALT成正相关, 血清纤维黏连蛋白水平与肝脏炎症活动度及纤维化程度密切相关.

3.2 诱导肝细胞凋亡、抑制肝细胞再生 TGF-β1主要生物活性之一是抑制肝细胞再生, 抑制肝细胞DNA合成而诱导肝细胞凋亡. Si *et al*[19]将TGF-β1皮下注射于小鼠, 72 h后观察肝细胞, 结果显示TGF-β1作用过的肝细胞显示明显的凋亡形态学改变, 包括核固缩, 碎片状、环状、月牙状细胞核, 泡沫状胞质, 细胞质与细胞核的浓染, 其凋亡率明显高于对照组. Sugiyama *et al*[23]研究表明, TGF-β1可能通过调节cyclinA及p21来抑制肝细胞生长, 组织肝细胞从G1到S期转化, 组织DNA合成. Akpolat *et al*[24]对30名CHB及30名健康者进行研究, 表明血清TGF-β1水平在CHB中比对照组高出很多, 与纤维化有明显的相关性, 李兵顺 *et al*[25]随机选取92例慢性病毒性肝炎患者, 检测TGF-β1血清水平, 其中31例行肝组织活检, 左胶原纤维染色, 分析两者关系, 结果显示: 按肝组织、纤维化程度(S)分组, 除S2与S1比较外, TGF-β1随纤维化分期的加重而表达增加, 肝组织TGF-β1水平与肝组织胶原含量正相关, 与肝纤维化程度密切相关. 其他研究者得到相同结论[14,26].

3.3 TGF-β1基因多态性与肝硬化的关系 TGF-β1基因调控区存在多个单核苷酸多态性, 其中包括-509位点和codon10位点, 这两个位点的基因多态性与肝硬化的发生密切相关. 杨再兴 *et al*[27]测定了92名健康对照者和134例肝硬化患者TGF-β1基因-509位点和codon10位点, 结果显示: 把肝硬化患者按Child-puch分级分为A, B, C 3组, -509CC基因型在肝硬化C组中的分布频率明显高于TT基因型; codonTT基因型及等位基因T在肝硬化中的分布频率明显高于对照组, 因此得出结论-509位点多态性与肝硬化进展成正相关, 而codon10位点多态性与肝硬化的发生明显相关.

4 TGF-β1与肝细胞癌的关系

TGF-β1是控制肝脏细胞生长和增殖的重要细胞因子, 但发现在肝细胞癌(HCC)患者肝组织中, TGF-β1的表达不是减弱而是增强. 许佳平 *et al*[28]测定了119例急、慢性肝炎、肝硬化、肝癌患者TGF-β1的含量, 结果显示肝癌患者TGF-β1水平明显高于其他各组, 5例肝癌患者经治疗后1 mo内TGF-β1水平较治疗前有明显降低.

TGF-β1可控制C-myc基因表达及Rb磷酸化诱导细胞凋亡, 当TGF-β1介导的Smad7上调, 引起抗凋亡因子NF-KB活化, 信号通路的组成成分发生变化, 导致细胞对TGF-β1耐受, C-myc过表达, Rb的抑制作用降解, 从而使细胞无限制增殖, 导致肿瘤的发生[29-30]. 此外HBxAg可以激活核因子(NF-KB), 控制蛋白激酶抑制TGF-β1所诱导的细胞凋亡, 使致癌基因Ras或Raf诱导的肝细胞发生转化, 最终导致细胞癌变[31-32]. 邹黎 *et al*[33]检测30例HCC癌灶组及其自身对照非癌组TGF-β1的表达, 结果显示, TGF-β1在肝癌癌灶及非癌组表达存在显著差别, 其阳性率分别为83.8%和43.3%; HCC癌灶组中TGF-β1阳性表达与肿瘤分化程度显著相关, 高分化肿瘤组织中TGF-β1的表达较弱, 低分化肿瘤组织中TGF-β1的表达增强, TGF-β1的表达随肿瘤细胞分化程度降低而呈逐渐增强的趋势, 提示TGF-β1有可能做为HCC早期诊断, 预测HCC的预后指标. Kim *et al*[34]发现, -509T>C基因多态性与韩国人群慢性乙型肝炎后的肝细胞癌的发生密切相关, 他们发现在慢性乙型肝炎患者中C-509T位点TT或CT基因型发生肝细胞癌的危险性显著低于CC基因型.

总之, TGF-β1与肝细胞损伤、肝硬化的发生、肝癌的发生都有密切的相关性, 因此临床上监测血清和肝组织中的TGF-β1水平对肝损伤、纤维化、及肝癌的动态及预后观察具有非常重要的意义.

■名词解释

转化生长因子-β: Tuker *et al*在1984年发现的一种与多种上皮性肿瘤生长有关的多肽性细胞生长调控因子. 目前发现至少有5种异构体, 分别命名为TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4, TGF-β5. 各种异构体在许多生物反应中表现出相似的作用, 其中TGF-β1最为重要.

5 参考文献

1 Tucker RF, Shipley GD, Moses HL, Holley RW. Growth inhibitor from BSC-1 cells closely related to platelet type beta transforming growth factor. *Science* 1984; 226: 705-707

2 Massague J, Attisano L, Wrana JL. The TGF-beta family and its composite receptors. *Trends Cell Biol* 1994; 4: 172-178

3 Faure S, Lee MA, Keller T, ten Dijke P, Whitman M. Endogenous patterns of TGFbeta superfamily signaling during early Xenopus development. *Development* 2000; 127: 2917-2931

4 Dunker N, Krieglstein K. Targeted mutations of transforming growth factor-beta genes reveal important roles in mouse development and adult

■同行评价
本文详细的总结了TGF-β1与慢性乙型肝炎各个时期的密切关系. 文章条理性强, 文字尚简洁, 论点明确, 有一定的先进性, 结论可靠, 参考文献适中.

homeostasis. *Eur J Biochem* 2000; 267: 6982-6988
5 黄耀煊, 张桂霞, 吕民生, 范公忍, 陈乃玲, 邬光惠. 转化生长因子-β1在肝细胞性肝癌中表达增强. 世界华人消化杂志 1999; 7: 150-152
6 Crowe MJ, Doetschman T, Greenhalgh DG. Delayed wound healing in immunodeficient TGF-beta 1 knockout mice. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 3-11
7 Iwasawa M. Accelerated maturation in prefabricated flaps by transforming growth factor-beta: an experimental study in the rabbit. *Ann Plast Surg* 1993; 31: 72-75
8 Tatakis DN, Wikesjo UM, Razi SS, Sigurdsson TJ, Lee MB, Nguyen T, Ongpipattanakul B, Hardwick R. Periodontal repair in dogs: effect of transforming growth factor-beta 1 on alveolar bone and cementum regeneration. *J Clin Periodontol* 2000; 27: 698-704
9 Sasaki H, Pollard RB, Schmitt D, Suzuki F. Transforming growth factor-beta in the regulation of the immune response. *Clin Immunol Immunopathol* 1992; 65: 1-9
10 Border WA, Ruoslahti E. Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. J Clin Invest 1992; 90: 1-7
11 Krummel TM, Michna BA, Thomas BL, Sporn MB, Nelson JM, Salzberg AM, Cohen IK, Diegelmann RF. Transforming growth factor beta (TGF-beta) induces fibrosis in a fetal wound model. *J Pediatr Surg* 1988; 23: 647-652
12 Ito N, Kawata S, Tsushima H, Tamura S, Kiso S, Takami S, Igura T, Monnden M, Matsuzawa Y. Increased circulating transforming growth factor beta1 in a patient with giant hepatic hemangioma: possible contribution to an impaired immune function. *Hepatology* 1997; 25: 93-96
13 刘芳, 刘金星, 曹治宸, 李兵顺, 裴琇, 王麟士, 张进贵. 转化生长因子β1在慢性乙型肝炎患者肝细胞损伤和肝纤维化形成中的意义. 中华传染病杂志 1999; 17: 241-244
14 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
15 Flisiak R, Prokopowicz D. Transforming growth factor-beta1 as a surrogate marker of hepatic dysfunction in chronic liver diseases. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38: 1129-1131
16 邬光惠, 黄耀煊, 范公忍, 张桂霞. 乙型肝炎患者血中转化生长因子β1. 世界华人消化杂志 1998; 6: 505-506
17 Friedman SL. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993; 328: 1828-1835
18 Pierce GF, Tarpley JE, Yanagihara D, Mustoe TA, Fox GM, Thomason A. Platelet-derived growth factor (BB homodimer), transforming growth factor-beta 1, and basic fibroblast growth factor in dermal wound healing. Neovessel and matrix formation and cessation of repair. *Am J Pathol* 1992; 140: 1375-1388
19 Si XH, Yang LJ. Extraction and purification of TGFbeta and its effect on the induction of apoptosis of hepatocytes. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 527-531
20 Rieder H, Armbrust T, Meyer zum Buschenfelde KH, Ramadori G. Contribution of sinusoidal endothelial liver cells to liver fibrosis: expression of transforming growth factor-beta 1 receptors and modulation of plasmin-generating enzymes by transforming growth factor-beta 1. *Hepatology* 1993; 18: 937-944
21 Schonherr E, Hausser HJ. Extracellular matrix and cytokines: a functional unit. *Dev Immunol* 2000; 7: 89-101
22 黄芬, 李智伟, 董亚珞. 慢性乙型肝炎血清TGFβ1 FN与肝纤维化的关系. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2246-2247
23 Sugiyama A, Nagaki M, Shidoji Y, Moriwaki H, Muto Y. Regulation of cell cycle-related genes in rat hepatocytes by transforming growth factor beta1. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 238: 539-543
24 Akpolat N, Yahsi S, Godekmerdan A, Demirbag K, Yalniz M. Relationship between serum cytokine levels and histopathological changes of liver in patients with hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3260-3263
25 李兵顺, 阎文昭, 刘金星, 甄真, 孔丽, 刘芳. 肝组织与血清转化生长因子β1表达水平与病毒性肝炎患者肝纤维化的关系. 中华肝脏病杂志 2004; 12: 271-273
26 李惠珍, 周晓萍, 李爱月, 陈林芬, 韩梅英, 李向霞. 慢性乙型肝炎患者肝组织、血清中TGF-β1、TNF-α含量与肝纤维化程度的关系探讨. 中华肝脏病杂志 2001; 7: 88-89
27 杨再兴, 王皓, 万谟彬, 王晓今, 徐玲玲, 赵文静, 高春芳. TGF-β1基因多态性对乙肝肝纤维化的影响. 第二军医大学学报 2004; 25: 1288-1291
28 许佳平, 白宪光. 肝炎、肝硬化、肝癌患者外周血TGF-β1的检测. 中华试验和临床病毒学杂志 2002; 16: 235
29 Flanders KC, Burmester JK. Medical applications of transforming growth factor-beta. *Clin Med Res* 2003; 1: 13-20
30 Arsura M, Panta GR, Bilyeu JD, Cavin LG, Sovak MA, Oliver AA, Factor V, Heuchel R, Mercurio F, Thorgeirsson SS, Sonenshein GE. Transient activation of NF-kappaB through a TAK1/IKK kinase pathway by TGF-beta1 inhibits AP-1/SMAD signaling and apoptosis: implications in liver tumor formation. *Oncogene* 2003; 22: 412-425
31 Miyazaki M, Sakaguchi M, Akiyama I, Sakaguchi Y, Nagamori S, Huh NH. Involvement of interferon regulatory factor 1 and S100C/A11 in growth inhibition by transforming growth factor beta 1 in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res* 2004; 64: 4155-4161
32 Pan J, Duan LX, Sun BS, Feitelson MA. Hepatitis B virus X protein protects against anti-Fas-mediated apoptosis in human liver cells by inducing NF-kappa B. *J Gen Virol* 2001; 82: 171-182
33 邹黎, 姚登福, 邰伯军, 章建国, 吴信华, 邱历伟, 吴玮, 苏小琴. 肝癌组织TGF-β1异常表达与HBV复制的病理学关系分析. 胃肠病学和肝病学杂志 2005; 14: 552-555
34 Kim YJ, Lee HS, Im JP, Min BH, Kim HD, Jeong JB, Yoon JH, Kim CY, Kim MS, Kim JY, Jung JH, Kim LH, Park BL, Shin HD. Association of transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms with a hepatocellular carcinoma risk in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Exp Mol Med* 2003; 35: 196-202

电编 李琪 编辑 张焕兰

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月18日; 15(8): 873-878
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

肝星状细胞激活与信号转导

申月明, 朱 萱

申月明, 朱萱, 南昌大学第一附属医院消化科 江西省南昌市 330006
通讯作者: 朱萱, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第一附属医院消化科. jyyfyzx@163.com
收稿日期: 2006-11-09 接受日期: 2006-12-18

Signal transduction and activation of hepatic stellate cells

Yue-Ming Shen, Xuan Zhu

Yue-Ming Shen, Xuan Zhu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Correspondence to: Dr. Xuan Zhu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. jyyfyzx@163.com
Received: 2006-11-09 Accepted: 2006-12-18

Abstract
Liver fibrosis, which leads to cirrhosis, occurs as a result of various injurious processes and it is the common pathologic basis of all the chronic hepatic diseases. At present, a good many researches demonstrate that the activation of hepatic stellate cells play a critical role in fibrogenesis. Prolonged liver injury results in hepatocyte damages and secretion of many fibrogenic cytokines such as transforming growth factor-beta 1, angiotensin, and leptin, which triggers the activation of hepatic stellate cells through different intracellular signal transduction pathways. In this article, we reviewed the research advancement in the signal transduction pathway of nuclear receptor and membrane receptor during the activation of hepatic stellate cells.

Key Words: Hepatic stellate cell; Signal transduction; Activation; Liver fibrosis

Shen YM, Zhu X. Signal transduction and activation of hepatic stellate cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(8):873-878

摘要
肝纤维化是多种慢性肝病向肝硬化发展的必经阶段, 是所有慢性肝病的共同病理基础. 目前认为肝星状细胞的激活是肝纤维化形成的关键, 各种致病因素作用下引起肝损伤, 释放多种细胞因子, 如转化生长因子β、血管紧张素、瘦素, 通过各种信号转导使肝星状细胞激活. 本文就肝星状细胞激活过程中一些重要的膜受体、核受体信号转导途径及其研究进展作一综述.

关键词: 肝星状细胞; 信号转导; 激活; 肝纤维化

申月明, 朱萱. 肝星状细胞激活与信号转导. 世界华人消化杂志 2007;15(8):873-878
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/873.asp

■背景资料
肝纤维化是慢性肝病重要的病理特征, 也是肝硬化发生的前奏和必经中间环节, 其中肝星状细胞的激活又是肝纤维化形成的关键, 近年来对肝星状细胞激活的各种信号转导途径进行了深入的研究, 干扰其主要的信号转导途径为肝纤维化治疗带来了新的曙光.

0 引言
肝纤维化是各种慢性肝病向肝硬化发展的必经阶段, 是所有慢性肝病的共同病理基础[1-2]. 目前认为, 在各种致病因素作用下, 肝细胞、Kupffer细胞、内皮细胞、肝星状细胞(HSC)等可产生多种细胞因子、氧化应激活性产物等[3-4], 这些细胞因子通过各种信号转导途径介导HSC的激活是肝纤维化形成的关键[5-7]. 近年来, 国内外学者对HSC激活的信号转导途径进行了深入的研究, 干扰HSC激活过程中信号途径已成为治疗肝纤维化的热点[8-10]. 我们就HSC激活过程中一些重要的膜受体信号途径、核受体信号转导途径及其研究进展作一综述.

1 肝星状细胞激活与膜受体信号转导途径
在肝纤维化形成过程中, 转化生长因子β(TGFβ)、血小板衍生生长因子(PDGF)、瘦素(leptin)、血管紧张素(AngⅡ)等是致HSC活化主要的细胞因子, 他们必须与相应膜受体结合后方可将信号传递至细胞内相应的效应分子, 调节细胞的功能.

1.1 TGFβ受体介导的信号转导途径 TGFβ是促进HSC激活和细胞外基质的合成的主要细胞因子之一[11], 其中TGFβ1的活性最强, TGFβ受体属于单次跨膜受体, 人类细胞普遍存在TGF的

■研发前沿
近年就阻断肝星状细胞中的信号转导途径成了研究的热点，如TGFβⅡ型可溶性受体，PPAR-γ配体等用于肝纤维化的防治，但其安全性有待深入研究.

3种类型受体，其中TGFβ1与Ⅱ型受体亲和力最高，TGFβ1先与跨膜蛋白Ⅱ型膜受体结合成膜外复合物，再与Ⅰ型膜受体结合形成Ⅱ型受体-TGFβ1-Ⅰ型受体复合物，活化的受体催化一类重要的信号分子smad发生丝氨酸磷酸化，smad分子形成同源或异源寡聚体后进入细胞核，调节相应基因的转录[12]，其中smad2, smad3属于受体调节型smads(R-smads)[13-14]，而smad6, smad7属于抑制型smads(I-smads)[15]，Schnabl *et al*[16]在对smad3基因敲除小鼠的研究中发现，与野生型小鼠比较，基因敲除组小鼠肝中α1(Ⅰ)，α2(Ⅱ)mRNA表达分别下降58%，36%，但并不影响α-SMA和desim的表达，进一步发现，smad3缺陷的HSC无TGF-β诱导的smads复合物生成及向细胞核内转位产生转录效应，没有smads复合物生成，TGF-β1无法诱导HSC活化及合成细胞外基质. Dooley *et al*[17]构建了smad7基因重组腺病毒载体(AdSmad7)，并分别从尾静脉和门静脉导入胆管结扎(BLD)致肝纤维化动物模型体内，与AdLacZ组比较，导入AdSmad7的BLD大鼠肝组织中的Ⅰ型胶原，羟脯氨酸均下降，体外研究发现，转染了AdSmad7的HSC继续保持静息状态，提示smad7的表达上调阻滞原代肝星状细胞的转型，但并不影响α-SMA的表达. smad7干扰TGF信号转导机制可能是通过抑制smad2/smad3磷酸化、活性smad复合物的核转位及(CAGA)(9)-MLP-Luc的激活. 近年发现，TGFβ也可以通过p38MAPK、胞外信号调节激酶(ERK)、氨基端激酶(JNK)信号途径调节HSC的生物学行为[18]，Tsukada *et al*[19]发现，TGF-β1分别通过Smad和p38MAPK独立的调控α1(Ⅰ)基因的表达，但是二者的作用是可以叠加，深入研究表明，TGFβ是通过p38MAPK信号途径，而并非通过Smad途径增加α1(Ⅰ)mRNA的稳定性，同时阻断这二条信号途径几乎完全抑制α1(Ⅰ)胶原基因的表达. Yoshida *et al*[20]研究急性肝损伤过程中TGFβ1、PDGF通过激活JNK途径调节smad2/3连接区的磷酸化，同时JNK途径可能介导HSC由disse间隙向组织损伤处的迁徙，JNK途径特异性抑制剂SP600125可以阻滞HSC的迁徙. 目前许多研究表明，干扰TGF信号途径是治疗肝纤维化的有效方法[21-24]，如 Nakamuta *et al*[25]把可表达TGFβⅡ型可溶性受体的质粒转染到实验性肝纤维化大鼠的骨骼肌细胞，1 wk后在血清中可检测到该受体的稳定表达，转染组肝纤维化程度减轻，肝组织中羟脯氨酸，Ⅰ型胶原，α-SMA表达下降，同时还可以调节Th1/Th2细胞因子平衡，表现为肝组织中IL12下降，而IL10表达升高. TGFβ是至肝纤维化的一重要因子，深入研究其介导的信号途径及生物学作用对肝纤维化防治具有十分重要的意义.

1.2 PDGF受体介导的信号转导途径 PDGF是sis原癌基因表达产物，是已知促HSC增殖作用最强的细胞因子，PDGF在肝脏中主要由血小板，kupffer细胞，窦内皮细胞产生，PDGF受体属蛋白酪氨酸激酶受体家族，有α、β两种亚型，PDGF结合到HSC胞膜上的受体后，再通过PI3-K途径、STAT途径、Ras/TPK途径、钙通道途径、Na^+/H^+途径、PLC-γ1途径从而促进HSC的增殖、激活[26-27]. 近年来在对PDGF受体介导的信号转导途径研究中有许多新的发现，Breitkopf *et al*[28]研究了在静息的HSC向肌成纤维细胞过程中PDGF-A、-B、-C、-D各亚型的表达情况，PDGF-A mRNA仅出现微量的波动，PDGF-B在HSC激活的第3天表达已经明显下降，而C型，D型是新发现的PDGF亚型，在此过程中表达分别升高5倍和8倍，且持续较长时间，表明在HSC激活的早期主要通过PDGF-B介导信号转导，后期则通过C型，D型介导的. Adachi *et al*[29]和Kreuzer *et al*[30]研究发现，NAD(P)H氧合酶在PDGF促HSC增殖过程中起重要作用，PDGF-BB通过激活NAD(P)H氧合酶而产生活性氧(ROS)，ROS使p38 MAPK磷酸化而诱导HSC的增殖，使用自由基清除剂MnTBAP(一种可通透细胞的SOD类似物)和NADPH氧化酶抑制剂二碘基苯均可抑制PDGF-BB诱导的细胞增殖效应，并发现HSC可表达4种不同亚型的NAD(P)H氧合酶. Gabele *et al*[31]和Tsutsumi *et al*[32]证实了PDGF可通过S6激酶信号传导途径调节HSC的增殖和胶原基因的表达，p70S6K特异性抑制剂rapamycin可以抑制PDGF诱导的HSC增殖和I型胶原的表达，但并不影响α-SMA的表达. Borkham-Kamphorst *et al*[33-34]构建了PDGF-β可溶性受体表达载体(sPDGFRb)，经尾静脉导入胆管结扎至肝纤维化动物模型后，肝纤维化程度减轻，Ⅰ型胶原，α-SMA的表达下降. Di *et al*[35] 和Benedetti *et al*[36]研究发现，cariporide可以阻断PDGF促HSC增殖效应，该药的作用机制是选择性的抑制Na^+/H^+交换器，而不影响ERK1/2, Akt, PKC的激活，同时，把该药分别运用于二甲基亚硝酸及胆管结扎致肝纤维化的两种大鼠模型后，能显著抑制HSC的活化，增殖，及胶原的分泌，改善肝纤维化程度.

1.3 瘦素(leptin)受体介导的信号转导途径 瘦素是ob基因编码的一种分泌蛋白质, 瘦素受体(LepR)由1165个氨基酸构成的一单次跨膜蛋白. 瘦素与受体结合后, 可影响机体许多生理系统和代谢途径, 具有广泛的生物学效应[37]. 最新的一些临床与基础研究显示, 瘦素与肝纤维化具有密切关系, 如促进Ⅰ型胶原[38], TGFβ, TIMP1等基因的表达, 作为新的肝纤维化的形成因子, 对其生物学作用和信号转导的研究已受到广泛的关注[39-42]. Ahima *et al*[43]研究表明, JAK STAT途径是瘦素的主要信号转导途径, 瘦素与受体结合后引起JAK1, JAK2及受体胞质区磷酸化, 进一步使下游胞质蛋白STAT磷酸化, STAT磷酸化后转入核内, 调控相应基因的表达. Saxena *et al*[44]发现, 使用JAK2激酶抑制剂AG490和受体磷酸化激酶抑制因子SOCS-3可以阻断瘦素的促HSC增殖效应, 同时发现瘦素增加ERK和Akt的磷酸化, 而对应激激活蛋白激酶和C-JUN氨基末端激酶磷酸化无明显影响, 使用PI3激酶抑制剂LY294002和ERK抑制剂PD98059也可以阻断瘦素的促HSC增殖效应, 提示瘦素使通过MAPK信号转导途径促进HSC的激活及胶原蛋白的表达. Cao *et al*[45]报道, 瘦素通过激活JNK1, JNK2而使H_2O_2表达增加, 再激活H_2O_2依赖的p38和ERK1/2途径而使HSC表达α1(Ⅰ)胶原增加. 使用ERK1/2抑制剂PD098059和P38抑制剂SB203580可以使HSC表达α1(Ⅰ)胶原下降. 越来越多的研究表明瘦素是一种多功能细胞因子, 目前瘦素促肝纤维化发生机制仍不明确, 阻断瘦素介导的信号转导途径有可能为肝纤维化的防治开辟一条新道路[46].

1.4 血管紧张素(AngⅡ)受体介导的信号转导途径 AngⅡ是肾素血管紧张素系统的主要生物活性肽, 目前许多研究表明, AngⅡ能促进HSC的激活, 增殖, 促使细胞外基质大量积聚, 在肝纤维化形成中起重要作用[47-48], AngⅡ是通过与细胞膜上特异性受体(ATR)结合而发挥作用的, AngⅡ受体主要有AT1R, AT2R二种亚型, HSC主要表达AT1R, ATR属G蛋白偶联受体, AngⅡ与受体结合后导致G蛋白活化, 活化的G蛋白可以激活下游效应分子, 如磷脂酶C(PLC), 磷脂酶A_2(PLA_2)等, 通过产生第二信使, 如cAMP、cGMP、DAG, IP3等调节相应基因的表达, 近年, 对AT1R介导的信号途径有了一些新的认识, Bataller *et al*[49]和Griendling *et al*[50]研究表明, AngⅡ与AT1R结合后, 激活NAD(P)H氧合酶诱导产生ROS, ROS再激活ERK-2, p38 MAPK, JNK等通路而调节HSC的增殖、迁移. Li *et al*[51]也发现, AngⅡ通过ERK1/2途径使AP-1活性增加, 促进α1(Ⅰ)型前胶原基因的表达. 因此, 血管紧张素转换酶抑制剂和血管紧张素1型受体拮抗剂有望成为防治肝纤维化的合适药物[52-54].

■**创新盘点**
本文就TGFβ、PDGF、瘦素、PPAR等受体的结构, 功能, 及目前干扰其信号途径的主要措施作了较全面的阐述.

2 肝星状细胞激活与核受体信号转导途径

核受体是配体依赖性转录因子超家族, 与机体生长发育、细胞分化, 以及体内许多生理、代谢过程中的基因表达调控密切相关, 近年研究发现, PPAR, RXR, FXR等核受体介导的信号转导途径与肝星状细胞激活有密切关系.

2.1 过氧化物酶体增殖物激活受体(PPARs)介导的信号转导途径 过氧化物酶体增殖物激活受体, 属Ⅱ型核受体超家族, 包括PPAR-α, PPAR-β和PPAR-γ 3种类型, PPARs也是一种配体激活的转录因子, 与基因调控区的PPAR反应元件(PPRE)结合后调节相应基因的转录, 在脂代谢、糖代谢、细胞增殖分化等方面发挥重要作用, 近年发现, PPARs还可以影响HSC的激活及胶原的合成[55-56], Miyahara *et al*[57]发现, 胆管结扎致肝纤维化动物模型中, HSC中PPAR-γ mRNA表达下降近70%, 细胞核蛋白与PPRE结合力下降, 与NF-κb, AP-1结合却增加, 使用PPAR-γ特异性配体15dPGJ; (2)作用于HSC后可以抑制细胞增殖和α1(Ⅰ)前胶原的合成, PPAR-γ拮抗剂GW9662可以消除这种抑制作用. Hazra *et al*[58]构建了PPAR-γ重组腺病毒载体(AdPPAR-γ), 并将其转染到激活了的HSC后, 可以使消失的脂滴恢复, 其表型也从激活向静止转变, 同时也可抑制JunD与AP-1的结合、AP-1的活性. 同样Yavrom *et al*[59]使用AdPPAR-γ转染入HSC后, PPAR-γ表达上调导致α1(Ⅰ) mRNA下降约50%, 机制可能是抑制COL1A1启动子的活性, 且作用位点主要在启动子-133 bp区域, 免疫共沉淀分析, PPAR-γ通过抑制p300而阻滞NF-I蛋白和DNA结合. 这些研究表明, PPAR-γ是保持HSC静息状态所必需的, PPAR-γ配体有可能成为抗肝纤维化治疗一新的亮点[60-61].

2.2 视黄酸(RAR)和视黄醇(RXR)类核受体介导的信号转导途径 RAR和RXR属于类固醇和甲状腺激素受体超家族成员, 他们作为配体激活的转录因子, 结合到靶基因的特定应答序列(DNA)上, 如: 视黄酸应答元件(RARE), 再调节基因的转录表达. 受体由3

■同行评价
本文对肝星状细胞激活过程中的重要的膜受体信号途径、核受体信号转导途径及研究进展作了详细的阐述, 研究内容较全面, 并能突出进展, 具有一定的学术水平及指导价值.

种不同的基因: α, β和γ编码, 形成了RARα, RARβ, RARγ和RXRα, RXRβ, RXRγ等多种类型的受体. 考虑到HSC活化时伴有维生素A丢失, 预示恢复HSC内的维A酸水平是否可以抑制HSC的激活呢[62]? 研究发现, RAR, RXR特异性配体或把RARβ, RXRα表达质粒转染入PDGF刺激的大鼠肝星状细胞可抑制该细胞的增殖, 下调α-SMA的表达[63]. Hellemans *et al*[64]和Okuno *et al*[65]报道, 在HSC激活过程中RARα, β, γ, RXRα表达逐渐下降, 特别是RARα, β在新分离HSC的前3天下降显著, 同时发现RXRα转录子缺乏6, 7外显子, RXR激动剂AGN194204和RAR激动剂全反式维甲酸, 13-顺式维甲酸, 9-顺式维甲酸可以明显的抑制HSC的增殖, 而RAR激动剂TTNPB却无此效应, RXR激动剂AGN194204还具有抑制α1(Ⅰ)前胶原和纤维连接蛋白的合成. Wang *et al*[66]报道维甲酸作用于CCl_4所致的肝纤维化大鼠12 wk后, 治疗组肝组织中α2(Ⅰ)胶原和羟脯氨酸表达下降2-3倍, 作用机制可能与其抑制胶原纤维的表达、抗氧化等有关. Milliano *et al*[67]发现, 视黄醇、维甲酸可以抑制静息HSC的活化、增殖, 但并不能恢复细胞内的维生素A及RARα, β, γ, RXRα的水平, 也不能逆转已激活的HSC, 提示HSC激活后对细胞外视黄醇、维甲酸失去反应. 因此, RAR, RXR特异性配体抗肝纤维化作用还有待更深入研究.

2.3 法呢醇X受体(FXR)介导的信号转导途径 FXR激素核受体超家族成员, 具有典型的核受体结构, 在肝肠系统、肾、肾上腺均有FXR表达, 目前发现FXR具有α1, α2, β1, β2, 4种亚型, 在胆汁酸和脂质代谢中发挥重要作用, 6-ECDCA是FXR高亲和力特异性配体. Fiorucci *et al*[68-69]研究表明, FXR介导的信号途径与HSC活化及胶原的合成有密切关系, 使用6-ECDCA可以减轻猪血清和胆管结扎致肝纤维化动物模型肝纤维化程度, 下调肝星状细胞TGFβ, α-SMA,TIMP1的表达, 可能机制是6-ECDCA作用于FXR后诱导转录抑制因子SHP表达, SHP抑制AP-1结合DNA的活性. 另一研究发现, 6-ECDCA作用于FXR后, PPAR-γ表达升高达40倍, 提示FXR通过其与PPAR-γ之间的交叉串连而调节HSC的激活[70].

总之, 肝星状细胞激活过程中, 各种信号转导途径极为复杂, 一种细胞因子可以激活多条信号转导途径, 一条信号转导通路又可被多种细胞因子激活, 不同途径之间存在着多种交互联系, 形成错综复杂的信号调节网络. 近年关于HSC激活过程中的信号转导这方面的研究进展是日新月异, 干扰其主要的信号转导途径为肝纤维化治疗带来了新的曙光, 但是目前研究大多限于体外和动物实验, 且设计的信号转导干扰药物大多缺乏细胞特异性, 理想的抗肝纤维化药物应仅作用于肝脏, 特异性抑制细胞外基质合成或促进其降解, 而这正是我们今后研究的重点.

3 参考文献

1 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218
2 Tsukada S, Parsons CJ, Rippe RA. Mechanisms of liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2006; 364: 33-60
3 Iredale JP. Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 427-436
4 Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 373-384
5 Pinzani M, Marra F, Carloni V. Signal transduction in hepatic stellate cells. *Liver* 1998; 18: 2-13
6 Tsukamoto H. Cytokine regulation of hepatic stellate cells in liver fibrosis. *Alcohol Clin Exp Res* 1999; 23: 911-916
7 Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 397-416
8 Wu J, Zern MA. Hepatic stellate cells: a target for the treatment of liver fibrosis. *J Gastroenterol* 2000; 35: 665-672
9 Beljaars L, Meijer DK, Poelstra K. Targeting hepatic stellate cells for cell-specific treatment of liver fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: e214-e222
10 Prosser CC, Yen RD, Wu J. Molecular therapy for hepatic injury and fibrosis: where are we? *World J Gastroenterol* 2006; 12: 509-515
11 Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d793-d807
12 Kitamura Y, Ninomiya H. Smad expression of hepatic stellate cells in liver cirrhosis *in vivo* and hepatic stellate cell line *in vitro*. *Pathol Int* 2003; 53: 18-26
13 Liu C, Gaca MD, Swenson ES, Vellucci VF, Reiss M, Wells RG. Smads 2 and 3 are differentially activated by transforming growth factor-beta (TGF-beta) in quiescent and activated hepatic stellate cells. Constitutive nuclear localization of Smads in activated cells is TGF-beta-independent. *J Biol Chem* 2003; 278: 11721-11728
14 Inagaki Y, Mamura M, Kanamaru Y, Greenwel P, Nemoto T, Takehara K, Ten Dijke P, Nakao A. Constitutive phosphorylation and nuclear localization of Smad3 are correlated with increased collagen gene transcription in activated hepatic stellate cells. *J Cell Physiol* 2001; 187: 117-123
15 Stopa M, Benes V, Ansorge W, Gressner AM, Dooley S. Genomic locus and promoter region of rat Smad7, an important antagonist of TGFbeta signaling. *Mamm Genome* 2000; 11: 169-176
16 Schnabl B, Kweon YO, Frederick JP, Wang XF, Rippe

RA, Brenner DA. The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation. *Hepatology* 2001; 34: 89-100
17 Dooley S, Hamzavi J, Breitkopf K, Wiercinska E, Said HM, Lorenzen J, Ten Dijke P, Gressner AM. Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* 2003; 125: 178-191
18 Tahashi Y, Matsuzaki K, Date M, Yoshida K, Furukawa F, Sugano Y, Matsushita M, Himeno Y, Inagaki Y, Inoue K. Differential regulation of TGF-beta signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury. *Hepatology* 2002; 35: 49-61
19 Tsukada S, Westwick JK, Ikejima K, Sato N, Rippe RA. SMAD and p38 MAPK signaling pathways independently regulate alpha1(I) collagen gene expression in unstimulated and transforming growth factor-beta-stimulated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 10055-10064
20 Yoshida K, Matsuzaki K, Mori S, Tahashi Y, Yamagata H, Furukawa F, Seki T, Nishizawa M, Fujisawa J, Okazaki K. Transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor signal via c-Jun N-terminal kinase-dependent Smad2/3 phosphorylation in rat hepatic stellate cells after acute liver injury. *Am J Pathol* 2005; 166: 1029-1039
21 Breitkopf K, Haas S, Wiercinska E, Singer MV, Dooley S. Anti-TGF-beta strategies for the treatment of chronic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29: 121S-131S
22 Liu X, Hu H, Yin JQ. Therapeutic strategies against TGF-beta signaling pathway in hepatic fibrosis. *Liver Int* 2006; 26: 8-22
23 Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 76-99
24 Jiang W, Yang CQ, Liu WB, Wang YQ, He BM, Wang JY. Blockage of transforming growth factor beta receptors prevents progression of pig serum-induced rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1634-1638
25 Nakamuta M, Morizono S, Tsuruta S, Kohjima M, Kotoh K, Enjoji M. Remote delivery and expression of soluble type II TGF-beta receptor in muscle prevents hepatic fibrosis in rats. *Int J Mol Med* 2005; 16: 59-64
26 Isbrucker RA, Peterson TC. Platelet-derived growth factor and pentoxifylline modulation of collagen synthesis in myofibroblasts. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998; 149: 120-126
27 Britton RS, Bacon BR. Intracellular signaling pathways in stellate cell activation. *Alcohol Clin Exp Res* 1999; 23: 922-925
28 Breitkopf K, Roeyen C, Sawitza I, Wickert L, Floege J, Gressner AM. Expression patterns of PDGF-A, -B, -C and -D and the PDGF-receptors alpha and beta in activated rat hepatic stellate cells (HSC). *Cytokine* 2005; 31: 349-357
29 Adachi T, Togashi H, Suzuki A, Kasai S, Ito J, Sugahara K, Kawata S. NAD(P)H oxidase plays a crucial role in PDGF-induced proliferation of hepatic stellate cells. *Hepatology* 2005; 41: 1272-1281
30 Kreuzer J, Viedt C, Brandes RP, Seeger F, Rosenkranz AS, Sauer H, Babich A, Nurnberg B, Kather H, Krieger-Brauer HI. Platelet-derived growth factor activates production of reactive oxygen species by NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells through Gi1,2. *FASEB J* 2003; 17: 38-40
31 Gabele E, Reif S, Tsukada S, Bataller R, Yata Y, Morris T, Schrum LW, Brenner DA, Rippe RA. The role of p70S6K in hepatic stellate cell collagen gene expression and cell proliferation. *J Biol Chem* 2005; 280: 13374-13382
32 Tsutsumi N, Yonemitsu Y, Shikada Y, Onimaru M, Tanii M, Okano S, Kaneko K, Hasegawa M, Hashizume M, Maehara Y, Sueishi K. Essential role of PDGFRalpha-p70S6K signaling in mesenchymal cells during therapeutic and tumor angiogenesis *in vivo*: role of PDGFRalpha during angiogenesis. *Circ Res* 2004; 94: 1186-1194
33 Borkham-Kamphorst E, Herrmann J, Stoll D, Treptau J, Gressner AM, Weiskirchen R. Dominant-negative soluble PDGF-beta receptor inhibits hepatic stellate cell activation and attenuates liver fibrosis. *Lab Invest* 2004; 84: 766-777
34 Borkham-Kamphorst E, Stoll D, Gressner AM, Weiskirchen R. Inhibitory effect of soluble PDGF-beta receptor in culture-activated hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 317: 451-462
35 Di Sario A, Bendia E, Taffetani S, Marzioni M, Candelaresi C, Pigini P, Schindler U, Kleemann HW, Trozzi L, Macarri G, Benedetti A. Selective Na+/H+ exchange inhibition by cariporide reduces liver fibrosis in the rat. *Hepatology* 2003; 37: 256-266
36 Benedetti A, Di Sario A, Casini A, Ridolfi F, Bendia E, Pigini P, Tonnini C, D'Ambrosio L, Feliciangeli G, Macarri G, Svegliati-Baroni G. Inhibition of the NA(+)/H(+) exchanger reduces rat hepatic stellate cell activity and liver fibrosis: an *in vitro* and *in vivo* study. *Gastroenterology* 2001; 120: 545-556
37 Landsberg L. A teleological view of obesity, diabetes and hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33: 863-867
38 Saxena NK, Ikeda K, Rockey DC, Friedman SL, Anania FA. Leptin in hepatic fibrosis: evidence for increased collagen production in stellate cells and lean littermates of ob/ob mice. *Hepatology* 2002; 35: 762-771
39 Tsochatzis E, Papatheodoridis GV, Archimandritis AJ. The evolving role of leptin and adiponectin in chronic liver diseases. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2629-2640
40 Marra F, Aleffi S, Bertolani C, Petrai I, Vizzutti F. Adipokines and liver fibrosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2005; 9: 279-284
41 Dai K, Qi JY, Tian DY. Leptin administration exacerbates thioacetamide-induced liver fibrosis in mice. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4822-4826
42 Saxena NK, Saliba G, Floyd JJ, Anania FA. Leptin induces increased alpha2(I) collagen gene expression in cultured rat hepatic stellate cells. *J Cell Biochem* 2003; 89: 311-320
43 Ahima RS, Osei SY. Leptin signaling. *Physiol Behav* 2004; 81: 223-241
44 Saxena NK, Titus MA, Ding X, Floyd J, Srinivasan S, Sitaraman SV, Anania FA. Leptin as a novel profibrogenic cytokine in hepatic stellate cells: mitogenesis and inhibition of apoptosis mediated by extracellular regulated kinase (Erk) and Akt phosphorylation. *FASEB J* 2004; 18: 1612-1614
45 Cao Q, Mak KM, Lieber CS. Leptin enhances alpha1(I) collagen gene expression in LX-2 human hepatic stellate cells through JAK-mediated H_2O_2-dependent MAPK pathways. *J Cell Biochem* 2006; 97: 188-197
46 Xue X, Lin J, Song Y, Sun X, Zhou H. RNA

interference targeting leptin gene effect on hepatic stellate cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2005; 25: 655-657

47 Bataller R, Sancho-Bru P, Gines P, Brenner DA. Liver fibrogenesis: a new role for the renin-angiotensin system. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7: 1346-1355

48 Friedman SL. The answer: angiotensin II. The question: what do inflammation, oxidant stress and fibrogenesis have in common? *J Hepatol* 2004; 40: 1050-1052

49 Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Paik YH, Lindquist J, Qian T, Schoonhoven R, Hagedorn CH, Lemasters JJ, Brenner DA. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 2003; 112: 1383-1394

50 Griendling KK, Ushio-Fukai M. Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Regul Pept* 2000; 91: 21-27

51 Li X, Meng Y, Cai SX, Yang XS, Zhang YJ, Wu PS. Angiotensin II and aldosterone stimulate alpha1-(I) procollagen mRNA expression in hepatic stellate cells via activation of ERK1/2 and AP-1. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2005; 85: 1831-1835

52 Ueki M, Koda M, Yamamoto S, Matsunaga Y, Murawaki Y. Preventive and therapeutic effects of angiotensin II type 1 receptor blocker on hepatic fibrosis induced by bile duct ligation in rats. *J Gastroenterol* 2006; 41: 996-1004

53 Yokohama S, Tokusashi Y, Nakamura K, Tamaki Y, Okamoto S, Okada M, Aso K, Hasegawa T, Aoshima M, Miyokawa N, Haneda M, Yoneda M. Inhibitory effect of angiotensin II receptor antagonist on hepatic stellate cell activation in non-alcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 322-326

54 Wagatsuma Y, Naritaka Y, Shimakawa T, Kanako H, Keiichiro I, Shunichi S, Konno S, Katsube T, Ogawa K. Clinical usefulness of the angiotensin II receptor antagonist losartan in patients with portal hypertensive gastropathy. *Hepatogastroenterology* 2006; 53: 171-174

55 Yang L, Chan CC, Kwon OS, Liu S, McGhee J, Stimpson SA, Chen LZ, Harrington WW, Symonds WT, Rockey DC. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G902-G911

56 Hellemans K, Michalik L, Dittie A, Knorr A, Rombouts K, De Jong J, Heirman C, Quartier E, Schuit F, Wahli W, Geerts A. Peroxisome proliferator-activated receptor-beta signaling contributes to enhanced proliferation of hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2003; 124: 184-201

57 Miyahara T, Schrum L, Rippe R, Xiong S, Yee HF Jr, Motomura K, Anania FA, Willson TM, Tsukamoto H. Peroxisome proliferator-activated receptors and hepatic stellate cell activation. *J Biol Chem* 2000; 275: 35715-35722

58 Hazra S, Xiong S, Wang J, Rippe RA, Krishna V, Chatterjee K, Tsukamoto H. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces a phenotypic switch from activated to quiescent hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 11392-11401

59 Yavrom S, Chen L, Xiong S, Wang J, Rippe RA, Tsukamoto H. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma suppresses proximal alpha1(I) collagen promoter via inhibition of p300-facilitated NF-I binding to DNA in hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 40650-40659

60 Toyama T, Nakamura H, Harano Y, Yamauchi N, Morita A, Kirishima T, Minami M, Itoh Y, Okanoue T. PPARalpha ligands activate antioxidant enzymes and suppress hepatic fibrosis in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324: 697-704

61 Zhao C, Chen W, Yang L, Chen L, Stimpson SA, Diehl AM. PPARgamma agonists prevent TGFbeta1/Smad3-signaling in human hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 350: 385-391

62 Ohata M, Lin M, Satre M, Tsukamoto H. Diminished retinoic acid signaling in hepatic stellate cells in cholestatic liver fibrosis. *Am J Physiol* 1997; 272: G589-G596

63 Chen C, Zhang J, Li J, Huang J, Yang C, Huang G, Shi J. Hydrodynamic-based *in vivo* transfection of retinoic X receptor-alpha gene can enhance vitamin A-induced attenuation of liver fibrosis in mice. *Liver Int* 2004; 24: 679-686

64 Hellemans K, Verbuyst P, Quartier E, Schuit F, Rombouts K, Chandraratna RA, Schuppan D, Geerts A. Differential modulation of rat hepatic stellate phenotype by natural and synthetic retinoids. *Hepatology* 2004; 39: 97-108

65 Okuno M, Sato T, Kitamoto T, Imai S, Kawada N, Suzuki Y, Yoshimura H, Moriwaki H, Onuki K, Masushige S, Muto Y, Friedman SL, Kato S, Kojima S. Increased 9,13-di-cis-retinoic acid in rat hepatic fibrosis: implication for a potential link between retinoid loss and TGF-beta mediated fibrogenesis *in vivo*. *J Hepatol* 1999; 30: 1073-1080

66 Wang L, Potter JJ, Rennie-Tankersley L, Novitskiy G, Sipes J, Mezey E. Effects of retinoic acid on the development of liver fibrosis produced by carbon tetrachloride in mice. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1772: 66-71

67 Milliano MT, Luxon BA. Rat hepatic stellate cells become retinoid unresponsive during activation. *Hepatol Res* 2005; 33: 225-233

68 Fiorucci S, Antonelli E, Rizzo G, Renga B, Mencarelli A, Riccardi L, Orlandi S, Pellicciari R, Morelli A. The nuclear receptor SHP mediates inhibition of hepatic stellate cells by FXR and protects against liver fibrosis. *Gastroenterology* 2004; 127: 1497-1512

69 Fiorucci S, Rizzo G, Antonelli E, Renga B, Mencarelli A, Riccardi L, Orlandi S, Pruzanski M, Morelli A, Pellicciari R. A farnesoid x receptor-small heterodimer partner regulatory cascade modulates tissue metalloproteinase inhibitor-1 and matrix metalloprotease expression in hepatic stellate cells and promotes resolution of liver fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 314: 584-595

70 Fiorucci S, Rizzo G, Antonelli E, Renga B, Mencarelli A, Riccardi L, Morelli A, Pruzanski M, Pellicciari R. Cross-talk between farnesoid-X-receptor (FXR) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to the antifibrotic activity of FXR ligands in rodent models of liver cirrhosis. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315: 58-68

电编 李琪 编辑 王晓瑜

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月18日; 15(8): 879-884
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

肠道致病菌群体感应研究进展

田 辉

田辉, 沈阳二四二医院感染科 辽宁省沈阳市 110034
通讯作者: 田辉, 110034, 辽宁省沈阳市, 沈阳二四二医院感染科. tianhui711204@163.com
电话: 024-86597019
收稿日期: 2007-01-04 接受日期: 2007-01-20

Quorum sensing in intestinal pathogens

Hui Tian

Hui Tian, Department of Infectious Diseases, Shenyang 242 Hospital, Shenyang 110034, Liaoning Province, China
Correspondence to: Hui Tian, Department of Infectious Diseases, Shenyang 242 Hospital, Shenyang 110034, Liaoning Province, China. tianhui711204@163.com
Received: 2007-01-04 Accepted: 2007-01-20

Abstract

Quorum sensing (QS) is an important mechanism of cell-to-cell communication that involves density-dependent recognition of signaling molecules, resulting in modulation of gene expression. This phenomenon allows bacteria to act as a collective unit, i.e., a multicellular entity performing specific functions. Three major QS systems were used by bacteria. Various QS systems have been described in numerous enteric pathogens, and in many cases, the role of QS in the pathogenesis of the diseases caused by these organisms is not so clear-cut. Inhibition of QS signaling might represent a new target for antimicrobial therapy. The course and condition of disease in enteric pathogens may vary among different individuals due to variable levels of signaling molecules in the intestines of different individuals, which, in some degree, may lead to various levels of QS activity and transcription of QS-regulated genes in their intestines.

Key Words: Pathogens; Quorum sensing; Intestine

Tian H. Quorum sensing in intestinal pathogens. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(8):879-884

摘要

群体感应(quorum sensing, QS)是细菌细胞之间交流的重要机制, 可调控基因表达. QS使细菌以多细胞实体行使单个细胞无法完成的功能, 调控细菌的多种活动. 根据细菌合成的信号分子和感应机制不同, QS系统主要分为三种. 肠道致病菌多拥有几种QS系统, 但一些QS系统的确切作用尚不十分明了. 替代抗菌素杀死致病菌, 抑制QS信号及毒力基因表达代表了抗微生物治疗的新靶位. 某种程度上, 肠道致病菌感染后, 个体病程、病情的差异就是由于个体肠道信号传递分子水平的差异, 导致了QS活性及其调控的基因转录不同所致.

关键词: 致病菌; 群体感应; 肠

田辉. 肠道致病菌群体感应研究进展. 世界华人消化杂志 2007;15(8):879-884
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/879.asp

■背景资料
目前研究表明, 肠道致病菌使用LuxR/I、LuxS/AI-2和AI-3/肾上腺素/去甲肾上腺素等几种群体感应(QS)系统来操纵泳动力、生物被膜形成及毒力基因表达等, 以在宿主体内引发感染并使之持续. 深入研究肠道致病菌QS分子的生物化学机制, 将提高对肠道致病菌发病机制的认知, 产生应对感染的新策略.

0 引言

群体感应(quorum sensing, QS)是涉及信号分子密度依赖性识别的一种细胞之间相互交流的重要机制, 可调控基因表达, 是细菌细胞外信号传递过程, 被认为是细菌的“语言”[1]. 1999年Sperandio *et al*[2]率先报道了肠道致病菌QS作用之后, 相关研究迅猛进展. 目前认为, 通过QS细菌在毒力决定簇表达前高浓度积聚, 协调一致的攻击, 适时释放毒力因子, 抵抗宿主免疫防御, 以便体内存活[3]. 一些肠道致病菌QS范例业已产生了些疾病进程新理念. 不过由于多数研究局限于体外, 肠道致病菌QS在发病机制中的确切作用尚待进一步阐明.

1 QS特性

为了适应复杂多变的环境, 细菌可以通过细胞内或细胞间的信息交流来协调群体行为, 以集体单位即多细胞实体行使单个细胞无法完成的功能[4]. QS是细菌细胞之间信号传递机制, 是细菌对信号传递分子即激素样有机化合物-自诱导剂(autoinducer, AI)的应答过程, 呈剂量依赖模式. AI可由同一菌种或不同菌丛的细菌分泌产生. 当AI浓度达到临界阈值时, 细菌检测

■研发前沿
通过QS致病菌在感染进展前释放毒力因子, 压制宿主防御, 这基本解释了非肠道致病菌QS作用. 由于胃肠道有众多的微生物菌群及相当量宿主产生的信号分子, 对肠道致病菌而言QS也许还有其他作用尚待研究.

到这些信号, 通过变更基因表达产生相应反应. QS现象最早在一种海洋发光细菌费希尔弧菌中发现并描述. 目前认为QS能调控细菌的多种活动: 如生物发光, 成群浮游, 质粒转移, 胞外蛋白酶产生, 抗生素合成, 生物被膜形成, DNA摄取能力, 致病菌毒力基因表达, 还可影响细菌细胞表面电动力学特性[5-7]. 通过QS细菌协调信号, 操纵生化反应, 防止不适合特定环境的种群过度增殖, 避免环境内营养素耗竭, 废物产生过度而有害于整个群体. 也就是说QS功效上决定了种群适应性[8].

2 QS系统

根据细菌合成的信号分子和感应机制不同, QS系统主要分为3种[1]. 第一种QS系统是革兰阴性菌使用的LuxR/I系统, 其AI是酰基高丝氨酸内酯(AHL_S), 合成底物是S-腺苷甲硫氨酸(SAM). LuxI型蛋白是AHL合成酶, LuxR型蛋白是AHL受体. 迄今已发现70余种LuxR/I系统. 一些菌种能产生几种AHL, 也有几对LuxR/I系统, 如假单胞菌属. 已有报道表明AHL_S能调控人体部分细胞的基因表达. 第二种QS系统是革兰阳性菌使用, 其AI是寡肽, 不能自由穿越细胞膜, 需ABC转运蛋白(ATP-Binding cassette exporter protein)或其他膜通道蛋白的协助才能跨越胞膜[9]. 被菌体上的双组分磷酸激酶系统识别后, 经由外膜感应器激酶蛋白磷酸化, 激活应答调节器结合DNA特定靶位调控转录. 此类AI特异性强于AHL_S, 非同族AI及受体不互相识别, 同一细菌不同亚群产生的AI不仅不激活而且还抑制另外亚群基因表达. 第三种QS系统主要用于不同菌种间交流, 多种革兰阴性菌及革兰阳性菌都使用, 对肠道致病菌尤为重要[10]. 包括LuxS/AI-2和AI-3/肾上腺素/去甲肾上腺素信号传递系统. LuxS是种代谢酶, 将核糖体-高半胱氨酸转化成高半胱氨酸及4, 5-二氢体-2, 3-戊烷二酮, 后者易溶于水环化成几种呋喃糖, 其中一种即为AI-2的前体. AI-2是呋喃硼酸二酯, 弧菌属AI-2受体是外周胞质蛋白LuxP, 其他菌属是Lsr[11]. 与AI-2不同AI-3是种芳香族化合物, 不含糖支架, 不影响SAM代谢, 其合成不依赖LuxS基因[12]. 肾上腺素、去甲肾上腺素是宿主信号传递系统, 前者经肾上腺髓质释放入血, 随血流抵达肠道; 后者可由肠神经系统分泌[13]. QS大肠杆菌调节器C(QseC)感应器激酶既是细菌的肾上腺素能受体, 又是肠道微生物菌从产生的AI-3受体, 可应答界间信号传递激活毒力基因表达[14].

3 肠道致病菌QS作用

3.1 致病性大肠杆菌 肠出血性大肠杆菌(EHEC)可致血性腹泻和溶血性尿毒综合征, 肠致病性大肠杆菌(EPEC)是发展中国家婴儿腹泻的重要病因. 两者特征性的肠组织病理学改变是: 微绒毛破坏和细胞支架重排成柱脚样结构即附着擦抹(attaching and effacing, AE)性损害. AE表型基因由染色体内致病岛编码, 称为肠细胞擦抹基因座(LEE). LEE区含5种主要的操纵子, 编码Ⅲ型分泌系统(TTSS), 使效应器蛋白移位入肠上皮细胞导致显著的细胞支架改变引发AE损伤[15].

LuxS/AI-3 QS系统操纵了EHEC TTSS、鞭毛表达、泳动力的调控, 及其毒力基因表达[16]. Sperandio *et al*[17]研究显示, LuxS突变株flhDC(编码鞭毛的主调节器)及mot操纵子(编码泳动力基因)转录下降. 由于EHEC感染量极低(10-100 CFU), 推断当EHEC进入结肠, 那里众多的共生菌属多拥有LuxS/AI-3 QS系统, 提醒了EHEC定居; 加之又有细菌与宿主的多重信号, 更进一步精确调控EHEC基因表达, 一部分基因(如编码鞭毛的)先表达, 另一部分基因(如编码TTSS的)稍晚些表达[18]. EHEC也有lsr操纵子, 可识别和摄取AI-2, 但AI-2信号传递作用还未明确. EPEC QS调控类似于EHEC, 但其有质粒编码的调节器, 能增加LEE基因表达; 也可产生束状纤毛, 调节EPEC与上皮细胞黏附形成致密微菌落, 允许局部信号分子高密度聚集[19-20]. 这些代偿机制帮助EPEC定居在共生菌少的小肠.

EHEC, EPEC QS调控中存在类似的级联反应, 至少有6种调控因子参与, 编码基因为Qse. 当细胞外膜同一受体识别AI-3和肾上腺素/或去甲肾上腺素后, 信号分子被输入浆膜外周空间, 先后与二种主要的双组分系统感应器激酶QseBC及QseEF相互作用. QseC感应这些信号激活鞭毛调节器, 使QseB应答调节器磷酸化, 与flhDc启动子结合激活鞭毛调节器表达, QseB也可与自身启动子结合正调控自身转录[21-22]. 随后QseE转录信号激活LEE基因表达, QseF是QseE的应答调节器, 但在何种水平QseF调控LEE基因转录尚不明了.

QseA和QseD均是LysR家族成员, 两者进一步调控了LEE基因表达. QseA对鞭毛调节器无作用, 能结合并直接激活LEE1操纵子内编码的ler转录, 也能激活LEE内griRA操纵子转录, griA激活ler转录, griR阻遏ler转录; 然后ler经级联反应模式激活其他LEE基因转录[23-24]. QseD能调控LEE和鞭毛基因表达. 这种AI-3依赖的QS信号传递级联反应也可见于肠杆菌科中绝大多数细菌, 如沙门菌、耶尔森菌、志贺氏菌等, 最为显著的特征就是所有菌株编码转录因子基因总精确的位于相同的同源染色体上, 并且不同菌种间展现出高度的一致, 可见在肠杆菌科这种信号传递级联反应功能上是保守的[18].

肠集聚性黏附大肠杆菌(EAEC)是儿童、成人腹泻的常见病因. 其QS系统有Qse/LuxS , Lsr/LuxS, SdiA(LuxR同系物), 但这些QS系统的确切作用尚不十分清楚. Ruiz-Perez *et al*[25]采用连续流动厌氧粪便培养系统发现, QS调控EAEC毒力基因的一种球形转录调节器aggR. 肠球菌和梭状芽胞杆菌产生一种或更多的底物上调aggR表达, 而乳杆菌、韦荣球菌则下调此基因表达. 但调控aggR表达的特异性QS系统并未识别.

3.2 沙门菌 沙门菌中存在如EHEC一样的AI-3和肾上腺素信号传递级联反应[26]. 无LuxI基因, 不能产生AHL_S, 但有SdiA[27]. 他可起到“探测器”作用检测其他菌种产生的AHL_S, 能调控极少数沙门菌基因, 其中一种rck涉及了拮抗人类补体. 不过, 动物感染模型中, SdiA基因突变对毒力无任何影响[28]. 沙门菌能产生AI-2, 通过lsr操纵子调控ABC输出系统表达, 此系统涉及AI-2分子摄取和细胞内摄作用[29].

3.3 霍乱弧菌 与多数细菌相反, 在高细胞浓度时霍乱弧菌QS系统表达受阻[30-32]. 霍乱弧菌主要的毒力因子是霍乱肠毒素(CT)及毒素协同调节菌毛(TCP). 霍乱弧菌有3种平行的QS系统, LuxO是关键应答调节器[33-34]. 系统1是HSL AI系统, 其AI合成酶称为CqsA, 感应器是CqsS. 系统2是LuxS/AI-2系统, 感应器是LuxO, LuxP. 遗传学证据表明存在系统3, 但其组成元素目前未明确. 这3种系统均涉及了一种LuxR同系物, 称为HapR[35]. HapR是毒力基因、生物被膜形成的阻遏蛋白及Hap蛋白酶激活剂. 新近Lenz *et al*[36]研究显示, 霍乱弧菌VarS/VarA双组分感应系统操控了依赖QS的基因表达.

在低细胞浓度时, AI浓度低, 空位感应器将磷酸钠逐步传递至LuxO蛋白. LuxO磷酸化后激活小RNA转录, 与Hfq形成复合物, 造成HapR mRNA不稳定转录抑制HapR表达. 低水平HapR只允许CT, TCP和生物被膜形成基因表达. 在高细胞浓度时, 磷酸钠流出逆转, 致LuxO失活, 导致HapR表达, 间接抑制CT, TCP表达, 直接抑制生物被膜形成, 但激活血凝素蛋白酶转录. Hammer *et al*[34]提出, 感染早期CT、TCP、生物被膜低浓度表达有助于肠道定居; 感染晚期, 霍乱弧菌浓度高, 终止生物被膜形成, 增加Hap蛋白酶产量, 有助于细菌离开宿主, 适应环境贮池.

3.4 粪肠球菌 肠球菌是人类肠道正常栖息菌, 是医源性感染的重要原因, 可致手术部位感染、血行感染和尿路感染[37]. 主要的毒力因子是溶细胞素, 他不仅对某些宿主靶细胞是致死毒素, 也是一种能杀死同一环境内其他细菌的细菌素, 而且还担任肠球菌基因表达的AI. 溶细胞素由2个亚单位$CylL_L$和$CylL_S$组成, 细胞外活性形式是$CylL_L$"和$CylL_S$'. 溶细胞素由细胞外$CylL_S$'亚单位达到阈值浓度后, 担当AI激活Cyl转录自身调控表达[38]. 有研究发现, 溶细胞素在厌氧条件下表达增加[39]. 由于厌氧条件是胃肠道的主要环境信号, 所以区分肠球菌基因是厌氧菌直接调控还是间接调控尚需复杂而艰苦的努力. Coburn *et al*[40]研究显示, $CylL_L$"优先与靶细胞膜结合, 允许游离$CylL_S$'积聚超过诱导阈值, 激活Cyl表达, 产生高水平溶细胞素. 有学者提出既是AI又是细菌素的溶细胞素是造成肠道菌丛改变, 允许难辨梭状芽胞杆菌移生的原因, 此假说有待证实[41]. 粪肠球菌另一个QS系统称做Fsr, 诸多方面类似于金葡菌Agr系统. 此系统能激活明胶酶和丝氨酸蛋白酶这二种毒力因子相关蛋白酶[42]. 粪肠球菌也有LuxS同系物, 但该系统对其毒力的作用尚未研究[43].

3.5 耶尔森菌 小肠结肠炎耶尔森菌和假结核耶尔森菌可致人类腹泻. 耶尔森菌具有高度保守的AHL依赖性QS系统, 能操控细胞集聚, 通过鞭毛调控的级联反应操控泳动力[44]. 小肠结肠炎耶尔森菌有一对LuxR/I同系物, 称为YenR/I, 可产生5种AI, YenI直接合成3-oxo-C6-HSL, C6-HSL, 3-oxo-C10-HSL, 3-oxo-C12-HSL, 3-oxo-C4-HSL, YenI突变株泳动

■相关报道
目前, 对肠道致病菌QS研究还处于起步阶段, 国外学者正逐步阐明肠道致病菌都有哪些QS系统及其作用, 国内鲜见此方面报道.

■应用要点
文章简要概括了细菌QS系统, 重点讨论了肠道致病菌QS作用, 不同肠道菌之间QS的异同等, 以明确肠道致病菌毒力机制新观点, 发展肠道共生菌丛新理念.

力消失, 与AHL摄取无关, 对YenR、flhDC、fliA(鞭毛σ因子)表达无作用, 但下调*fle*B(鞭毛蛋白结构基因)表达[45]. 假结核耶尔森菌有2对LuxR/I同系物, 操控泳动力和细胞凝集, 即YpsI/R及YtbI/R. 可产生3种AI, C6-HSL, 3-oxo-C6-HSL, C8-HSL. YpsI合成3-oxo-C6-HSL, YtbI合成C8-HSL, 而YpsI和YtbI均可合成C6-HSL. 温度在决定激活哪一种AI合成酶及与哪一种AI结合方面尤为重要. YpsR突变可致主要的鞭毛蛋白亚单位过表达和泳动力增加. YpsI/R和YtbI/R有QS级联反应, YpsR可协助调控YtbI/R. 耶尔森菌也有Qse/LuxS, Lsr/LuxS QS系统, 但确切的作用尚不明了.

3.6 产气夹膜杆菌 产气夹膜杆菌可致气性坏疽和食源性疾病. 早有报道此菌能产生胞外信号传递分子即A物质激活θ毒素表达, 不过这似乎与AI-2不同是另外的未定性AI. 此菌LuxS/AI-2 QS系统增加细胞外α、κ、θ毒素表达, 与转录及转录后机制相关[46].

3.7 福氏志贺氏菌 痢疾的主要病因, 致感染剂量低, 有TTSS, 这两点特性与EHEC相似. LuxS/AI-2系统调控TTSS内负责侵入宿主细胞位点ipa, mxi和spa表达[47]. LuxS位点突变能造成VirB(表达这些侵入位点必须的一种转录因子)表达下降, 但是未影响侵入操纵子表达, 而且LuxS突变株在组织培养中是有全部毒力的. 与EHEC, EPEC不同, 志贺氏菌能有效侵入宿主细胞, 因此可能在肠腔仅短时间内暴露于来自正常菌丛的高水平AI.

3.8 空肠弯曲菌 最常见的食源性疾病病因. LuxS/AI-2系统调控空肠弯曲菌泳动力[48]. 在半固体培养基中, LuxS突变株泳动力下降, 主要鞭毛蛋白基因flaA转录减少. 同时凝集反应能力下降, 则表明QS可能涉及了空肠弯曲菌表面结构形成[49].

3.9 弧菌科致病菌 创伤弧菌感染是最常见的食海鲜致死原因, 尤其伴发肝病者感染后常死于脓毒血症. 此菌有两种QS系统, LuxS/AI-2和SmcR(一种LuxR同系物), 均能调控蛋白酶及溶血素表达, 可能存在相互作用或等级反应. Kim *et al*[50]发现, 鼠模型中LuxS突变株50%致死量、细胞毒力都显著下降; LuxS突变株蛋白酶活力下降, 溶血素活性增加. SmcR突变株也能降低蛋白酶活力, 增加溶血素活性, 但是SmcR突变株致病力与野生株相仿, 表明SmcR对致病力非必需[51].

副溶血弧菌致死性较创伤弧菌差, 但在进食海产品致胃肠炎中发病率更高. 副溶血弧菌基因组序列有TTSS, 受QS调控[52]. 副溶血弧菌拥有所有的Lux调节器包括LuxM/R和LuxS. 副溶血弧菌LuxR突变同系物称为OpaR, 对TTSS有显著影响. 与霍乱弧菌相仿, QS负向调节TTSS. 在低细胞浓度时, 副溶血弧菌分泌效应器蛋白, 当高细胞浓度时, 终止分泌, 可能也是准备从肠道移位至水生环境的作用.

亲水气单胞菌致感染性腹泻病例逐渐增多, 在宿主防御免疫减退时可引发严重感染. 新近, Sha *et al*[53]研究发现, 此菌拥有受QS调控的TTSS. 亲水气单胞菌主要毒力因子是Ⅱ型分泌细胞毒性肠毒素, 具有溶血性、细胞毒性和肠毒性, 可致鼠感染模型死亡. 单胞菌外膜蛋白B(AopB)与TTSS移位器形成相关. 删除AopB编码基因产生的同源基因突变株细胞毒性和AHL产生力降低, 应用原位基因后可补体激活这些效应.

4 基于QS的治疗

替代抗菌素杀死致病菌, 抑制QS信号及毒力基因表达代表了抗微生物治疗的新靶位[54]. 这些方法给解决抗菌素耐药带来了新希望, 并且在一些绿脓单胞菌、金葡菌感染动物模型中已获得了些进展[55-56]. 然而胃肠道有众多微生物菌群, 其基因数量远超过人类基因数量[57]. 99.9%以上共生菌是专性厌氧菌, 对人类益处颇多, 可供给营养, 防御感染, 促进免疫系统和肠黏膜成熟. 此外肠道还有包括微生物和宿主产生的大量信号分子, 使在肠道致病菌中应用抗QS治疗变得十分复杂. 前车之鉴就是广谱抗菌素使用与难辨梭状芽胞杆菌感染发生相关. 一旦干扰了肠道正常菌丛将可能导致负面效应. 另外, 一些信号分子具有下调免疫应答的特性, 可用于开发新的免疫调控化合物, 治疗自身免疫性疾病[58].

QS的基本特性就是细菌的密度越大, 则信号传递分子的密度就越大, 细胞间交流的机会就越多. 某种程度上, 肠道致病菌感染后, 个体病程、病情的差异就是由于个体肠道信号传递分子水平的差异, 导致了QS活性及其调控的基因转录不同所致. 随着对肠道致病菌QS研究不断深入, 必将出现肠道致病菌毒力机制新观点, 发展肠道共生菌丛新理念, 产生与致病菌战斗的新策略.

5 参考文献

1 Reading NC, Sperandio V. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 254: 1-11

2 Sperandio V, Mellies JL, Nguyen W, Shin S, Kaper JB. Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 15196-15201

3 Yao Y, Vuong C, Kocianova S, Villaruz AE, Lai Y, Sturdevant DE, Otto M. Characterization of the Staphylococcus epidermidis accessory-gene regulator response: quorum-sensing regulation of resistance to human innate host defense. *J Infect Dis* 2006; 193: 841-848

4 Camilli A, Bassler BL. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* 2006; 311: 1113-1116

5 Keller L, Surette MG. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4: 249-258

6 Taga ME, Bassler BL. Chemical communication among bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100 Suppl 2: 14549-14554

7 Eboigbodin KE, Newton JR, Routh AF, Biggs CA. Bacterial quorum sensing and cell surface electrokinetic properties. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006; 73: 669-675

8 Xavier KB, Bassler BL. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr Opin Microbiol* 2003; 6: 191-197

9 徐凯进, 李兰娟, 邢卉春, 吴仲文, 俞云松, 盛吉芳, 陈亚岗. 细菌的群体感应系统. 中华传染病杂志 2006, 24: 356-358

10 Bassler BL. Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* 2002; 109: 421-424

11 Taga ME, Semmelhack JL, Bassler BL. The LuxS-dependent autoinducer AI-2 controls the expression of an ABC transporter that functions in AI-2 uptake in Salmonella typhimurium. *Mol Microbiol* 2001; 42: 777-793

12 Walters M, Sircili MP, Sperandio V. AI-3 synthesis is not dependent on luxS in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2006; 188: 5668-5681

13 Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 2000; 81: 87-96

14 Clarke MB, Hughes DT, Zhu C, Boedeker EC, Sperandio V. The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 10420-10425

15 Sperandio V, Torres AG, Giron JA, Kaper JB. Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* 2001; 183: 5187-5197

16 Walters M, Sperandio V. Autoinducer 3 and epinephrine signaling in the kinetics of locus of enterocyte effacement gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2006; 74: 5445-5455

17 Sperandio V, Torres AG, Jarvis B, Nataro JP, Kaper JB. Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8951-8956

18 Kaper JB, Sperandio V. Bacterial cell-to-cell signaling in the gastrointestinal tract. *Infect Immun* 2005; 73: 3197-3209

19 Falcao JP, Sharp F, Sperandio V. Cell-to-cell signaling in intestinal pathogens. *Curr Issues Intest Microbiol* 2004; 5: 9-17

20 Moreira CG, Palmer K, Whiteley M, Sircili MP, Trabulsi LR, Castro AF, Sperandio V. Bundle-forming pili and EspA are involved in biofilm formation by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2006; 188: 3952-3961

21 Sperandio V, Torres AG, Kaper JB. Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. *Mol Microbiol* 2002; 43: 809-821

22 Clarke MB, Sperandio V. Transcriptional autoregulation by quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC) in enterohaemorrhagic E. coli (EHEC). *Mol Microbiol* 2005; 58: 441-455

23 Sperandio V, Li CC, Kaper JB. Quorum-sensing *Escherichia coli* regulator A: a regulator of the LysR family involved in the regulation of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island in enterohemorrhagic *E. coli*. *Infect Immun* 2002; 70: 3085-3093

24 Deng W, Puente JL, Gruenheid S, Li Y, Vallance BA, Vazquez A, Barba J, Ibarra JA, O'Donnell P, Metalnikov P, Ashman K, Lee S, Goode D, Pawson T, Finlay BB. Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 3597-3602

25 Ruiz-Perez F, Sheikh J, Davis S, Boedeker EC, Nataro JP. Use of a continuous-flow anaerobic culture to characterize enteric virulence gene expression. *Infect Immun* 2004; 72: 3793-3802

26 Walters M, Sperandio V. Quorum sensing in *Escherichia coli* and Salmonella. *Int J Med Microbiol* 2006; 296: 125-131

27 Michael B, Smith JN, Swift S, Heffron F, Ahmer BM. SdiA of Salmonella enterica is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities. *J Bacteriol* 2001; 183: 5733-5742

28 Ahmer BM. Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and Salmonella enterica. *Mol Microbiol* 2004; 52: 933-945

29 Taga ME, Miller ST, Bassler BL. Lsr-mediated transport and processing of AI-2 in Salmonella typhimurium. *Mol Microbiol* 2003; 50: 1411-1427

30 Zhu J, Miller MB, Vance RE, Dziejman M, Bassler BL, Mekalanos JJ. Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in Vibrio cholerae. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 3129-3134

31 Kovacikova G, Skorupski K. Regulation of virulence gene expression in Vibrio cholerae by quorum sensing: HapR functions at the aphA promoter. *Mol Microbiol* 2002; 46: 1135-1147

32 Zhu J, Mekalanos JJ. Quorum sensing-dependent biofilms enhance colonization in Vibrio cholerae. *Dev Cell* 2003; 5: 647-656

33 Miller MB, Skorupski K, Lenz DH, Taylor RK, Bassler BL. Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in Vibrio cholerae. *Cell* 2002; 110: 303-314

34 Hammer BK, Bassler BL. Quorum sensing controls biofilm formation in Vibrio cholerae. *Mol Microbiol* 2003; 50: 101-104

35 Lenz DH, Mok KC, Lilley BN, Kulkarni RV, Wingreen NS, Bassler BL. The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in Vibrio harveyi and Vibrio

■名词解释

群体感应(quorum sensing, QS): 涉及信号分子密度依赖性识别的一种细胞之间相互交流的重要机制, 是细菌对信号传递分子即激素样有机化合物-自诱导剂(autoinducer, AI)的应答过程, 呈剂量依赖模式.

■同行评价
本文综述了肠道致病菌群体感应的研究进展，文章总体书写流畅，逻辑性较强，对临床有一定指导价值.

cholerae. *Cell* 2004; 118: 69-82
36 Lenz DH, Miller MB, Zhu J, Kulkarni RV, Bassler BL. CsrA and three redundant small RNAs regulate quorum sensing in Vibrio cholerae. *Mol Microbiol* 2005; 58: 1186-1202
37 Coburn PS, Gilmore MS. The Enterococcus faecalis cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cell Microbiol* 2003; 5: 661-669
38 Haas W, Shepard BD, Gilmore MS. Two-component regulator of Enterococcus faecalis cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. *Nature* 2002; 415: 84-87
39 Day AM, Cove JH, Phillips-Jones MK. Cytolysin gene expression in Enterococcus faecalis is regulated in response to aerobiosis conditions. *Mol Genet Genomics* 2003; 269: 31-39
40 Coburn PS, Pillar CM, Jett BD, Haas W, Gilmore MS. Enterococcus faecalis senses target cells and in response expresses cytolysin. *Science* 2004; 306: 2270-2272
41 Ozaki E, Kato H, Kita H, Karasawa T, Maegawa T, Koino Y, Matsumoto K, Takada T, Nomoto K, Tanaka R, Nakamura S. Clostridium difficile colonization in healthy adults: transient colonization and correlation with enterococcal colonization. *J Med Microbiol* 2004; 53: 167-172
42 Nakayama J, Chen S, Oyama N, Nishiguchi K, Azab EA, Tanaka E, Kariyama R, Sonomoto K. Revised model for Enterococcus faecalis fsr quorum-sensing system: the small open reading frame fsrD encodes the gelatinase biosynthesis-activating pheromone propeptide corresponding to staphylococcal agrd. *J Bacteriol* 2006; 188: 8321-8326
43 Schauder S, Shokat K, Surette MG, Bassler BL. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol Microbiol* 2001; 41: 463-476
44 Atkinson S, Sockett RE, Camara M, Williams P. Quorum sensing and the lifestyle of Yersinia. *Curr Issues Mol Biol* 2006; 8: 1-10
45 Atkinson S, Chang CY, Sockett RE, Camara M, Williams P. Quorum sensing in Yersinia enterocolitica controls swimming and swarming motility. *J Bacteriol* 2006; 188: 1451-1461
46 Ohtani K, Hayashi H, Shimizu T. The luxS gene is involved in cell-cell signalling for toxin production in Clostridium perfringens. *Mol Microbiol* 2002; 44: 171-179
47 Day WA Jr, Maurelli AT. Shigella flexneri LuxS quorum-sensing system modulates virB expression but is not essential for virulence. *Infect Immun* 2001; 69: 15-23
48 Jeon B, Itoh K, Misawa N, Ryu S. Effects of quorum sensing on flaA transcription and autoagglutination in Campylobacter jejuni. *Microbiol Immunol* 2003; 47: 833-839
49 Elvers KT, Park SF. Quorum sensing in Campylobacter jejuni: detection of a luxS encoded signalling molecule. *Microbiology* 2002; 148: 1475-1481
50 Kim SY, Lee SE, Kim YR, Kim CM, Ryu PY, Choy HE, Chung SS, Rhee JH. Regulation of Vibrio vulnificus virulence by the LuxS quorum-sensing system. *Mol Microbiol* 2003; 48: 1647-1664
51 Shao CP, Hor LI. Regulation of metalloprotease gene expression in Vibrio vulnificus by a Vibrio harveyi LuxR homologue. *J Bacteriol* 2001; 183: 1369-1375
52 Henke JM, Bassler BL. Quorum sensing regulates type III secretion in Vibrio harveyi and Vibrio parahaemolyticus. *J Bacteriol* 2004; 186: 3794-3805
53 Sha J, Pillai L, Fadl AA, Galindo CL, Erova TE, Chopra AK. The type III secretion system and cytotoxic enterotoxin alter the virulence of Aeromonas hydrophila. *Infect Immun* 2005; 73: 6446-6457
54 Kaufmann GF, Sartorio R, Lee SH, Mee JM, Altobell LJ 3rd, Kujawa DP, Jeffries E, Clapham B, Meijler MM, Janda KD. Antibody interference with N-acyl homoserine lactone-mediated bacterial quorum sensing. *J Am Chem Soc* 2006; 128: 2802-2803
55 Hentzer M, Givskov M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* 2003; 112: 1300-1307
56 Smith RS, Iglewski BH. Pseudomonas aeruginosa quorum sensing as a potential antimicrobial target. *J Clin Invest* 2003; 112: 1460-1465
57 Xu J, Bjursell MK, Himrod J, Deng S, Carmichael LK, Chiang HC, Hooper LV, Gordon JI. A genomic view of the human-Bacteroides thetaiotaomicron symbiosis. *Science* 2003; 299: 2074-2076
58 Pritchard DI, Todd I, Brown A, Bycroft BW, Chhabra SR, Williams P, Wood P. Alleviation of insulitis and moderation of diabetes in NOD mice following treatment with a synthetic Pseudomonas aeruginosa signal molecule, N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Acta Diabetol* 2005; 42: 119-122

电编 李琪 编辑 王晓瑜

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月18日; 15(8): 885-889
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

小檗碱对胰岛素抵抗大鼠肝脏葡萄糖激酶及其调节蛋白的影响

欧阳礼枝, 陆付耳, 刘文军, 高志强, 徐丽君

欧阳礼枝, 陆付耳, 刘文军, 高志强, 徐丽君, 华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合研究所 湖北省武汉市 430030
国家自然科学基金资助项目, No. 30472254
通讯作者: 陆付耳, 430030, 湖北省武汉市, 湖北省武汉市同济医院中西医结合研究所. felu@tjh.tjmu.edu.cn
电话: 027-83662577 传真: 027-83662220
收稿日期: 2006-12-07 接受日期: 2006-12-28

Effect of berberine on hepatic glucokinase and its regulatory protein in insulin-resistant rats

Li-Zhi Ouyang, Fu-Er Lu, Wen-Jun Liu, Zhi-Qiang Gao, Li-Jun Xu

Li-Zhi Ouyang, Fu-Er Lu, Wen-Jun Liu, Zhi-Qiang Gao, Li-Jun Xu, Institute of Integrated Chinese and Western Medicine, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30472254
Correspondence to: Fu-Er Lu, Institute of Integrated Chinese and Western Medicine, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. felu@tjh.tjmu.edu.cn
Received: 2006-12-07 Accepted: 2006-12-28

Abstract

AIM: To investigate the effects of berberine on hepatic glucokinase (GK) activity, protein expression and GK's regulatory protein (GKRP) in insulin-resistant rats.

METHODS: Male Wistar rats were fed with high-fat diet for 8 weeks to induce the model of insulin resistance. Then the insulin-resistant rats were randomly divided into 3 groups: model, berberine, and metformin groups which were treated with the corresponding preparations. Meanwhile, a normal control group was designed. The differences in insulin sensitivity, hepatic glycogen, hepatic GK activity, and protein expression (using Western blot) of hepatic GK and GKRP were compared among the groups.

RESULTS: As compared with those in model group, the insulin sensitivity (-4.93 ± 0.30 *vs* -5.35 ± 0.40, $P < 0.05$), hepatic glycogen level (136.58 ± 52.57 μg/g *vs* 65.88 ± 27.80 μg/g, $P < 0.05$), GK activity (226.55 ± 10.62 μkat/g *vs* 92.69 ± 6.43 μkat/g, $P < 0.05$), and hepatic GK protein expression (1.71 ±0.49 *vs* 1.24±0.22, $P < 0.05$) were significantly elevated in berberine group, while the expression of GKRP protein weaker (1.19 ± 0.20 *vs* 1.94 ± 0.56, $P < 0.01$). Meanwhile, the hepatic glycogen level in berberine group was markedly higher than that in metformin group (136.584 ± 52.574 μg/g *vs* 89.427 ± 31.971 μg/g, $P < 0.05$), but the other indexes were not significantly different between them (all $P > 0.05$).

CONCLUSION: Berberine may decrease insulin resistance by increasing of the hepatic GK activity.

Key Words: Insulin resistance; Berberine; Glucokinase; Glucokinase regulatory protein

Ou-Yang LZ, Lu FE, Liu WJ, Gao ZQ, Xu LJ. Effect of berberine on hepatic glucokinase and its regulatory protein in insulin-resistant rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(8):885-889

摘要

目的: 研究小檗碱对胰岛素抵抗大鼠肝脏葡萄糖激酶(GK)活性及肝脏GK与葡萄糖激酶调节蛋白(GKRP)表达的影响.

方法: 选用♂Wistar大鼠, 以高脂高热量饲料喂养8 wk, 复制胰岛素抵抗大鼠模型, 成模后随机分成模型组、小檗碱组、二甲双胍组, 各药干预4 wk后, 比较各组大鼠胰岛素敏感性、肝糖原、肝脏GK活性、肝脏GK与GKRP蛋白(Western blot法)表达的差异.

结果: 比模型组比较, 小檗碱组胰岛素敏感性提高(-4.93±0.30 *vs* -5.35±0.40, $P<0.05$), 肝糖原含量明显升高(136.58±52.57 μg/g *vs* 65.88±27.80 μg/g, $P<0.05$), 肝脏GK活性升高

■**背景资料**
胰岛素抵抗是糖尿病及心血管等多种疾病共同的危险因素, 是滋生多种代谢相关疾病的"共同土壤". 注重改善胰岛素抵抗, 在多种疾病治疗中均能受益.

■研发前沿
葡萄糖激酶及葡萄糖激酶调节蛋白与糖尿病及胰岛素抵抗的关系近年来多有国外学者在进行研究. 葡萄糖激酶激活剂在一定程度上改善了胰岛素抵抗, 但其分子机制尚待深入研究.

(226.55±10.62 μkat/g *vs* 92.69±6.43 μkat/g, $P<0.05$), 肝脏GK蛋白表达增强(1.71±0.49 *vs* 1.24±0.22, $P<0.05$), 而GKRP表达减弱(1.19±0.20 *vs* 1.94±0.56, $P<0.01$); 与二甲双胍组比较, 小檗碱组肝糖原含量高(136.584±52.574 μg/g *vs* 89.427±31.971 μg/g, $P<0.05$), 余指标无显著性差异 ($P>0.05$).

结论: 小檗碱改善胰岛素抵抗的作用机制可能与提高肝脏GK活性有关.

关键词: 胰岛素抵抗; 小檗碱; 葡萄糖激酶; 葡萄糖激酶调节蛋白

欧阳礼枝, 陆付耳, 刘文军, 高志强, 徐丽君. 小檗碱对胰岛素抵抗大鼠肝脏葡萄糖激酶及其调节蛋白的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(8):885-889
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/885.asp

0 引言

小檗碱又名黄连素, 长期以来在临床上用来治疗消化性溃疡及腹泻[1-4], 近年来, 国内外均有文献报道小檗碱可增加胰岛素抵抗大鼠模型胰岛素敏感性, 并有明显降血糖作用[5-7], 其具体作用机制尚未完全研究清楚. 我们用小檗碱干预胰岛素抵抗大鼠, 观察其对肝脏葡萄糖激酶(glucokinase, GK)活性、GK及葡萄糖激酶调节蛋白(glucokinase regulatory protein, GKRP)蛋白表达的影响, 探讨小檗碱改善胰岛素抵抗的分子机制.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂清洁级Wistar大鼠60只, 约2月龄, 体质量170-200 g, 购自湖北省实验动物研究中心. 盐酸小檗碱片由黑龙江百泰药业有限公司生产, 用含5 g/L羧甲基纤维素的PBS溶液(pH7.4)配成浓度为28.125 g/L的混悬液. 盐酸二甲双胍片由上海施贵宝药业生产, 同法配成浓度为36.7 g/L的混悬液. 血糖试剂盒为北京北化康泰试剂有限公司产品. 胰岛素放免盒为北京原子能生物研究所产品. GK山羊抗大鼠多克隆IgG, GKRP兔抗大鼠IgG及β-actin抗体为Santa Cruz公司产品, 辣根酶标记的二抗为北京中杉公司产品.

1.2 方法

1.2.1 胰岛素抵抗大鼠模型的复制及药物干预 大鼠喂养于动物饲养室(室温22℃, 明暗交替周期为12 h, 通风良好), 除做糖耐量试验(GTT)及处死前12 h禁食外, 自由进食、饮水. 动物适应性喂养2 wk后, 随机取50只喂养高脂饲料, 为造模组; 其余10只大鼠不做任何处理, 进食普通饲料, 为正常对照组(NOR组). 高脂饲料依文献资料[8-9]稍作修改后自行配制, 其中热量构成比为脂肪: 蛋白质: 碳水化合物 = 59∶21∶20. 喂养8 wk后, 检测各大鼠空腹血糖(FBG)和空腹胰岛素(FIns), 采用李光伟 *et al*[10]提出的方法计算各大鼠胰岛素敏感性指数(ISI, ISI = FIns与FBG乘积倒数的自然对数), 其中ISI较NOR组降低者(小于NOR组ISI均值减1.96倍标准差)视为胰岛素抵抗大鼠模型造模成功[11], 共38只, 然后随机分成模型组(MOD组)13只, 按7 mL/(kg·d)体质量灌服5 g/L羧甲基纤维素PBS溶液; 小檗碱组(BER组)13只, 按187.5 mg/(kg·d)灌服上述小檗碱混悬液; 二甲双胍组(MET组)12只, 按184 mg/(kg.d)灌服上述二甲双胍组混悬液. 大鼠干预4 wk后, 按45 mg/kg体质量剂量腹腔注射30 g/L戊巴比妥钠进行麻醉, 腹主动脉取血, 分离血清, 用于检测各项生化指标, 另取肝脏迅速冻存于液氮中, 24 h后置于-80℃冰箱保存以待测其他指标.

1.2.2 血糖、胰岛素检测 血糖用葡萄糖氧化酶法测定, 胰岛素用放免法测定, 具体操作步骤严格按试剂盒说明书进行.

1.2.3 胰岛素敏感性 末次大鼠给药后禁食12 h, 取空腹尾静脉血, 按剂量2.2 g/kg体质量予400 g/L葡萄糖水灌胃, 剪尾法取灌糖后0.5, 1, 2, 3 h尾静脉血, 检测各时间段血糖值及胰岛素水平. 参照文献[12]方法计算出各组糖耐量曲线下面积 (SBG)及胰岛素释放曲线下面积(SIns). 胰岛素敏感性用ISI, SBG, SIns评估.

1.2.4 肝糖原含量及肝脏GK活性检测 肝糖原含量检测采用蒽酮法[13]稍做修改, 以梯度浓度的葡萄糖标准液分别加入蒽酮试剂制作7个标准管, 测得A值, 绘制标准曲线, 依曲线回归方程折算出各样本的糖原含量. GK活性检测参照Davidson法[14]稍做修改补充, 另用考马斯亮兰法测量肝脏匀浆上清液的蛋白浓度, 以(△A/min高糖管-△A/min低糖管)/蛋白浓度间接反映肝脏GK活性, , GK活性(μkat/g)= (△A/min高糖管-△A/min低糖管)×10^6/6220×16.67×V总/V反/蛋白浓度, V总表示总反应体积, V反表示参与反应的匀浆上清液体积, 6220表示NADPH的吸光系数.

1.2.5 肝脏GK与GKRP表达水平的检测 采用Western blot方法. 取肝脏100 mg, 三去污裂解液

表 1 干预4 wk后, 各组ISI, SBG, SIns, 肝糖原及肝脏GK活性比较 (mean ± SD)

分组	*n*	ISI	SBG [mmol/(L · h)]	SIns [mU/(L · h)]	肝糖原(μg/g)	GK活性(μkat/g)
NOR	10	−4.42 ± 0.39	13.50 ± 1.05	41.91 ± 12.86	53.70 ± 22.31	324.73 ± 12.76
MOD	12	−5.35 ± 0.40[b]	15.05 ± 1.65[a]	66.06 ± 15.09[b]	65.88 ± 27.80	92.69 ± 6.43[a]
BER	12	−4.93 ± 0.30[c]	13.15 ± 1.61[c]	59.73 ± 16.04	136.58 ± 52.57[ac]	226.55 ± 10.62[c]
MET	11	−4.99 ± 0.49[c]	13.55 ± 2.13	65.84 ± 24.09	89.43 ± 31.97[ae]	215.71 ± 11.56[c]

[a]$P<0.05$, [b]$P<0.01$ *vs* NOR组; [c]$P<0.05$ *vs* MOD组; [e]$P<0.05$ *vs* BER组.

表 2 各组GK/β-actin及GKRP/β-actin光密度值比较

分组	GK/β-actin	GKRP/β-actin
NOR	1.76 ± 0.42	1.16 ± 0.24
MOD	1.24 ± 0.22[a]	1.94 ± 0.56[a]
BER	1.71 ± 0.49[c]	1.19 ± 0.20[c]
MET	1.73 ± 0.52[c]	1.49 ± 0.34

[a]$P<0.05$ *vs* NOR组; [c]$P<0.05$ *vs* MOD组.

匀浆后, 取上清, 考马斯亮兰法测其蛋白浓度. 取各样本总蛋白100 μg, 以100 g/L分离胶, 50 g/L积层胶, SDS-PAGE胶分离蛋白, 湿电转移法将蛋白质转到PVDF膜上. GK蛋白以含50 g/L脱脂奶粉和10 g/L BSA的TBST溶液(含1 mL/L Tween 20)室温轻摇封闭3 h后, 以1∶2000稀释度加入抗GK抗体, 4℃孵育10 h, GKRP蛋白以含50 g/L BSA的TBST溶液于4℃封闭8 h, 以1∶2000稀释度加入抗GKRP抗体, 4℃孵育10 h, 均洗膜后加入HRP标记的二抗, 室温轻摇2 h, 洗涤后用增强化学发光法(ECL)显像曝光, 洗片后用激光扫描仪测各条带光密度.

统计学处理 数据均以mean±SD表示, 两组间均数比较采用组间*t*检验, 多组间均数比较用方差分析, 肝糖原用直线回归.

2 结果

2.1 干预4 wk后各组胰岛素敏感性比较 MOD组ISI明显较NOR组低, BER组ISI较MOD组提高, MOD组SBG较NOR增加, BER组SBG较MOD组减小, MOD组SIns明显较NOR组大, BER组及MET组SIns较MOD组有所减小, 但无统计学差异(表1).

2.2 干预4 wk后各组肝糖原及肝脏GK活性比较 BER组肝糖原水平较MOD组提高($P<0.05$), 且较MET组高($P<0.05$); MOD组GK活性较NOR组下降($P<0.05$), BER组肝脏GK活性较MOD组增强($P<0.05$), 与MET组比较, 无显著性差异($P>0.05$) (表1).

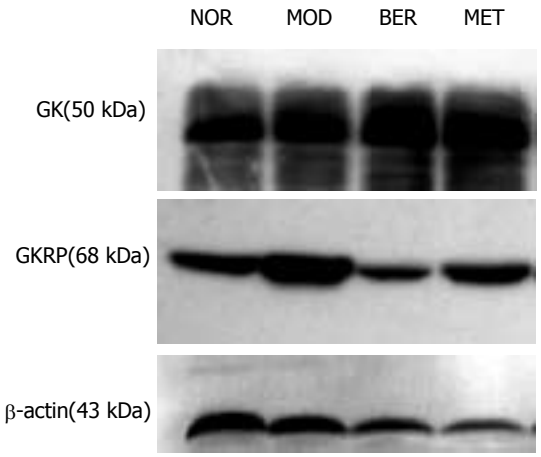


图 1 各组GK与GKRP蛋白表达.

2.3 干预4 wk后各组肝脏GK与GKRP蛋白表达比较 GK蛋白表达MOD组较NOR组减弱, BER组及MET组较MOD组表达增强, 且两干预组之间没有显著性差异. GKRP蛋白表达: MOD组较NOR组明显增强, BER组较MOD组明显减弱, 且其效果较MET组更为显著(图1, 表2).

3 讨论

胰岛素抵抗是指机体组织或靶细胞对胰岛素的作用缺乏正常反应, 即其敏感性和(或)反应性降低的一种病理生理状态. IR可导致一系列代谢紊乱, 如导致葡萄糖摄取和利用的能力下降、脂质紊乱、纤溶系统功能紊乱等, 因此IR在高血压、冠心病及脂肪肝等多种危险因素中居关键地位[15-17]. 本实验予高脂饲料喂养大鼠8 wk后, 大鼠的胰岛素敏感性下降并呈糖耐量减低状态, 这与临床上膳食结构不科学的肥胖患者呈现胰岛素抵抗有一定的模型相似性[18].

小檗碱是从黄连根茎中提取出的一种苯并

■**创新盘点**
临床上习惯用小檗碱治疗腹泻, 但其多方面的药理作用已受越来越多学者重视. 本课题首次从提高葡萄糖激酶活性角度探索了其改善胰岛素敏感性及治疗糖尿病的作用机制, 开创了老药新用的临床用药新思维.

■同行评价
本研究观察了小檗碱对胰岛素抵抗的改善作用及其作用机制. 文章科学性较强, 实验设计合理, 检测指标较先进, 对小檗碱防治胰岛素抵抗领域研究较深入.

异喹林类季铵型碱, 最早作为抗菌药用于临床. 本课题组前期研究表明, 小檗碱能降血糖, 调血脂, 促进胰岛素分泌[19], 高从容 *et al*[20]亦认为小檗碱能提高胰岛素抵抗大鼠的胰岛素敏感性.

GK是一种已糖激酶, 催化葡萄糖转变为6-磷酸葡萄糖. 肝细胞中, GK控制肝细胞对葡萄糖的摄取与利用, 其活性受GKRP的调节, 有"葡萄糖感受器"之称[21]. GK活性增强, 促进肝脏葡萄糖磷酸化, 使肝糖原合成能力增加[22]. Coope *et al*[23]认为: 肝脏GK活性降低可能参与胰岛素抵抗机制. 本实验中胰岛素抵抗大鼠经小檗碱干预4 wk后糖原合成增加, 肝脏GK活性增强, 推测小檗碱通过增强GK活性而促进肝糖原合成, 这支持了我们提出的的小檗碱为GK激活剂的假说. 小檗碱组的糖原含量甚至高于正常组, 其可能机制在于进食高糖高脂饲料的大鼠有高糖的刺激, 糖原合成的底物增多. 为研究小檗碱降糖、改善胰岛素抵抗作用途径, 我们用胰岛素抵抗模型即在血糖水平稳定的情况下研究胰岛素释放, 小檗碱组胰岛素敏感指数提高, 糖耐量下曲线面积减小, 而胰岛素释放曲线下面积并不明显减小, 结合前期研究可提示小檗碱具有改善胰岛素抵抗与促进胰岛素分泌的双重作用. 肝糖原检测显示小檗碱组与二甲双胍组肝糖原的合成增加, 这提示小檗碱是通过促进葡萄糖代谢途径降低血糖. 本研究从增强GK活性角度, 揭示了小檗碱提高胰岛素敏感性的可能机制.

Veiga-da-Cunha *et al*[24]认为, GKRP能调节GK的活性, 且与GK在正常血糖时结合于核内, 抑制GK的活性. Slosberg *et al*[25]研究揭示GKRP的过度表达可能参与2型糖尿病的发病机制. 本研究中Western印迹结果显示小檗碱组GKRP蛋白表达较模型明显减弱, 从而减少对GK活性的抑制, 揭示了小檗碱提高GK活性, 改善胰岛素抵抗的可能机制. 本研究为小檗碱在临床上用于预防胰岛素抵抗向2型糖尿病发展提供了理论依据, 开拓了其临床用药前景. 但小檗碱通过何种机制抑制GKRP的蛋白表达, 尚有待进一步研究.

4 参考文献

1 刘敬军, 郑长青, 潘丽丽, 闻英, 胡刚正. 中西医结合治疗溃疡性结肠炎. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2806-2808
2 杨禄红, 陆付耳, 董慧, 徐丽君, 王开富. 大黄素和黄连素对2型糖尿病大鼠胃肠动力的影响. 世界华人消化杂志 2005; 13: 608-611
3 黄晓东, 罗和生, 余保平, 汤剑青. 小檗碱治疗分泌性腹泻的实验研究. 世界华人消化杂志 1998; 6: 801-803
4 Pan LR, Tang Q, Fu Q, Hu BR, Xiang JZ, Qian JQ. Roles of nitric oxide in protective effect of berberine in ethanol-induced gastric ulcer mice. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26: 1334-1338
5 Lee YS, Kim WS, Kim KH, Yoon MJ, Cho HJ, Shen Y, Ye JM, Lee CH, Oh WK, Kim CT, Hohnen-Behrens C, Gosby A, Kraegen EW, James DE, Kim JB. Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states. *Diabetes* 2006; 55: 2256-2264
6 周丽斌, 杨颖, 尚文斌, 李凤英, 唐金凤, 王晓, 刘尚全, 袁国跃, 陈名道. 小檗碱改善高脂饮食大鼠的胰岛素抵抗. 放射免疫学杂志 2005; 18: 198-200
7 Tang LQ, Wei W, Chen LM, Liu S. Effects of berberine on diabetes induced by alloxan and a high-fat/high-cholesterol diet in rats. *J Ethnopharmacol* 2006; 108: 109-115
8 Storlien LH, James DE, Burleigh KM, Chisholm DJ, Kraegen EW. Fat feeding causes widespread *in vivo* insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats. *Am J Physiol* 1986; 251: E576-E583
9 Petrik J, Srinivasan M, Aalinkeel R, Coukell S, Arany E, Patel MS, Hill DJ. A long-term high-carbohydrate diet causes an altered ontogeny of pancreatic islets of Langerhans in the neonatal rat. *Pediatr Res* 2001; 49: 84-92
10 李光伟, 潘孝仁, Stephen L, Peter HB. 检测人群胰岛素敏感性的一项新指数. 中华内科杂志 1993; 32: 656-660
11 陈世伟, 张立宪, 张红敏, 冯晓凡, 彭晓莉. 大豆异黄酮对胰岛素抵抗大鼠胰岛素敏感性及瘦素基因表达的影响. 北京大学学报 (医学版) 2006; 38: 197-200
12 刘欣秋, 雷鸣, 赵安飞, 张桂芳. 实验性NIDDM模型胰岛素抵抗的评估. 中国误诊学杂志 2001; 1: 492-494
13 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学. 第三版. 北京: 人民卫生出版社 2002: 1493-1495
14 Davidson AL, Arion WJ. Factors underlying significant underestimations of glucokinase activity in crude liver extracts: physiological implications of higher cellular activity. *Arch Biochem Biophys* 1987; 253: 156-167
15 Mendez-Sanchez N, Chavez-Tapia NC, Motola-Kuba D, Sanchez-Lara K, Ponciano-Rodriguez G, Baptista H, Ramos MH, Uribe M. Metabolic syndrome as a risk factor for gallstone disease. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1653-1657
16 窦爱霞, 陆伦根. 胰岛素抵抗和非酒精性脂肪性肝病研究进展. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1197-1202
17 于晓静, 王晓梅, 冯海娟. 2型糖尿病合并脂肪肝危险因素临床分析. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2977-2979
18 Mendez-Sanchez N, Bermejo-Martinez LB, Vinals Y, Chavez-Tapia NC, Graff IV, Ponciano-Rodriguez G, Ramos MH, Uribe M. Serum leptin levels and insulin resistance are associated with gallstone disease in overweight subjects. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6182-6187
19 Leng SH, Lu FE, Xu LJ. Therapeutic effects of berberine in impaired glucose tolerance rats and its influence on insulin secretion. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25: 496-502
20 高从容, 张家庆, 黄庆玲. 黄连素增加胰岛素抵抗大鼠模型敏感性的实验研究. 中国中西医结合杂志 1999; 17: 162-164
21 de la Iglesia N, Mukhtar M, Seoane J, Guinovart JJ, Agius L. The role of the regulatory protein of glucokinase in the glucose sensory mechanism

of the hepatocyte. *J Biol Chem* 2000; 275: 10597-10603
22 郑宏庭, 邓华聪, 兰丽珍, 方芳. "胰岛代理细胞"的构建: 在HepG2细胞中获得胰岛素分泌. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2103-2106
23 Coope GJ, Atkinson AM, Allott C, McKerrecher D, Johnstone C, Pike KG, Holme PC, Vertigan H, Gill D, Coghlan MP, Leighton B. Predictive blood glucose lowering efficacy by Glucokinase activators in high fat fed female Zucker rats. *Br J Pharmacol* 2006; 149: 328-335
24 Veiga-da-Cunha M, Van Schaftingen E. Identification of fructose 6-phosphate- and fructose 1-phosphate-binding residues in the regulatory protein of glucokinase. *J Biol Chem* 2002; 277: 8466-8473
25 Slosberg ED, Desai UJ, Fanelli B, St Denny I, Connelly S, Kaleko M, Boettcher BR, Caplan SL. Treatment of type 2 diabetes by adenoviral-mediated overexpression of the glucokinase regulatory protein. *Diabetes* 2001; 50: 1813-1820

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 •

全国肝病防治学术研讨会征文通知

本刊讯 为贯彻党的十六大和十六届六中全会精神, 紧跟广东改革开放“排头兵”, 实现珠三角经济发展规划, 由广东省肝脏病学会主办的全国肝病防治学术研讨会定于2007-06-30/07-02在广州召开. 凡参加会议者均授予国家继续教育Ⅰ类学分证(9分). 现将会议的征文内容及有关事项通知如下.

1 征文内容

(1)黄疸诊断与治疗; (2)各型肝炎诊断、治疗的临床与基础研究; (3)核苷酸类似物药物及干扰素临床应用与评价; (4)肝纤维化和肝硬化早期诊断与治疗; (5)肝硬化并发症诊断与治疗; (6)肝癌发病机理与早期诊断及其阻断研究; (7)肝癌外科与非手术治疗临床报告; (8)自身免疫性肝病诊断与治疗; (9)药物性肝损害诊断与治疗; (10)中医药防治肝病临床经验总结与实验研究; (11)肝病免疫学或生物调节治疗临床观察与实验研究; (12)人工肝与肝移植治疗现状; (13)脂肪肝流行病学调查、诊断与治疗; (14)肝病辅助检查与临床诊断; (15)肝病新药与新疗法介绍等.

2 征文要求

征文以论著、讲座、综述或个案报道等形式均可, 来稿要求提供全文及中文摘要各1份, 并附软盘或发邮件至gbsgzbxh@163.com或blan9988@hotmail.com, 第一作者请注明性别、年龄、职称、学历、工作单位、邮编及联系电话.凡已公开发表的论文,不予受理. 报名及截稿日期: 2007-05-20. 收稿地址: 广州市广州大道北1838号南方医科大学南方医院消化楼一楼(南廊), 广东省肝脏病学会办公室, 会长李福山、秘书长白岚教授受. 邮编: 510515, 联系电话: 020-61641658, 89830226, 61641233(H).

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月18日; 15(8): 890-892
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

结扎速血管闭合系统闭合实验狗血管的可靠性

王永来, 陈 双, 苏 华, 刘彩刚

■背景资料
结扎速是新近研制的血管闭合系统, 他应用实时反馈技术和智能主机技术, 输出高频电能(低电压 180V, 高电流 4A), 结合血管钳口压力, 使人体组织内胶原蛋白和纤维蛋白溶解变性, 血管壁熔合形成一透明带, 产生永久性管腔闭合. 临床上可安全用于闭合7 mm以内的血管, 韧带和组织束.

■研发前沿
在传统的血管闭合技术领域中, 普通缝线可以通过结扎来闭合直径达10 mm的血管; 而大多数常用的血管夹只能闭合直径在4 mm以下的血管; 基于能量的闭合技术, 如普通双极电刀或超声刀, 则更是只能闭合3 mm以下的血管. 使用传统的结扎方法, 当遇到较大的血管只能通过分离血管, 反复的、步骤繁多的缝线来结扎、闭合. 所以, "通过相对较快的速度来提供更稳定可靠的血管闭合效果"成为血管闭合技术领域中研究的目标.

王永来, 陈双, 苏华, 刘彩刚, 中国医科大学附属盛京医院妇产科 辽宁省沈阳市 110004
通讯作者: 王永来, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院妇产科. yonglai_wang@sina.com
电话: 024-25943605
收稿日期: 2006-12-12 接受日期: 2007-01-10

Reliability of hemostasis with ligasure vessel sealing system in experimental dogs

Yong-Lai Wang, Shuang Chen, Hua Su, Cai-Gang Liu

Yong-Lai Wang, Shuang Chen, Hua Su, Cai-Gang Liu, Department of Obstetrics and Gynecology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Correspondence to: Yong-Lai Wang, Department of Obstetrics and Gynecology, Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. yonglai_wang@sina.com
Received: 2006-12-12 Accepted: 2007-01-10

Abstract
AIM: To study the reliability and tissue damage of ligasure vessel sealing system during vascular occlusion.

METHODS: Ligasure vessel sealing system was used to seal and cut off the dog blood vessel of different locations and diameters. The diameter of the vessel was measured by a caliper before and after sealing and cutting off, respectively. The bursting pressures were recorded after sealed, and the vascular pathology was performed after the operation.

RESULTS: A total of 12 vessels were sealed successfully by ligasure vessel sealing system, and the success rate was 100%. The mean diameters of the sealed artery and vein were 3.26 mm (1.75-5.22 mm) and 5.42 mm (2.40-9.08 mm), while the bursting pressures were 472 mmHg (380-560 mmHg) and 378 mmHg (250-490 mmHg), respectively. The pathological changes of the sealed vessels caused by ligasure vessel sealing system mainly presented as acute thermal and pressure-induced injury.

CONCLUSION: Ligasure vessel sealing system can effectively seal the vessels, especially the ones 3 mm or larger in diameter.

Key Words: Blood vessel; Hemostasis; Ligasure vessel sealing system

Wang YL, Chen S, Su H, Liu CG. Reliability of hemostasis with ligasure vessel sealing system in experimental dogs. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(8):890-892

摘要
目的: 研究结扎速(ligasure)血管闭合系统闭合实验狗血管的可靠性及组织损伤程度.

方法: 应用结扎速血管闭合系统切断和闭合实验狗体内不同部位与直径的血管, 切断和闭合血管前用游标尺测量血管直径, 闭合后测定血管破裂时的压力, 术后血管行组织病理学检查.

结果: 结扎速血管闭合系统闭合12条动、静脉, 闭合成功率均为100%, 平均动静脉直径分别是3.26 mm(1.75-5.22 mm)和5.42 mm(2.40-9.08 mm). 成功闭合血管的平均动、静脉破裂压分别是472 mmHg(380-560 mmHg), 378 mmHg(250-490 mmHg). 术后损伤的主要病理改变为组织的急性热和压力损伤.

结论: 结扎速血管闭合系统闭合直径3 mm或更粗的血管有较高的可靠性.

关键词: 血管; 止血; 结扎速血管闭合系统

王永来, 陈双, 苏华, 刘彩刚. 结扎速血管闭合系统闭合实验狗血管的可靠性. 世界华人消化杂志 2007;15(8):890-892
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/890.asp

0 引言
随着腹腔镜技术的飞速发展, 传统的切开及止血方法已经满足不了腹腔镜手术的要求. 目前有关

各种止血设备闭合血管的可靠性及组织损伤程度的实验研究少见报道. 结扎速血管闭合系统(ligasure vessel sealing system)是一种新型止血设备, 其独特之处是以组织反应发生器作为电流和电压的能量来源. 我们通过研究结扎速血管闭合系统闭合血管的可靠性及组织损伤程度, 为进行腹腔镜手术的临床医生提供科学依据.

1 材料和方法

1.1 材料 普通♀狗1只, 体质量25 kg. 结扎速血管闭合系统: 美国威利公司生产, 直径5 mm.

1.2 方法 将狗实施全身麻醉, 监测生命指标. 首先分离一侧后肢股动脉和静脉5.0 cm, 用游标卡尺分别测量血管的直径(图1), 近端插入静脉输液器针头, 另一端与三腔管连接, 三腔管的两端分别与输液器及另一三腔管相连, 此三腔管两端与压力计和充气囊相连. 血管近端用止血钳夹紧, 远端用结扎速血管闭合系统闭合并切断(功率为3档), 闭合和切断血管时间5 s. 充气囊打气, 注入生理盐水, 直到血管破裂, 测量血管破裂时的压力(图2). 实验完毕后, 血管两断端分别用7号丝线结扎. 同法分离双侧前肢肱动静脉, 主动脉, 腔静脉, 双侧肾动静脉, 双侧髂总动静脉及髂内、外动静脉. 血管破裂压实验完成后, 距闭合端1.0 cm剪断血管, 用40 g/L甲醛缓冲液固定, 石蜡包埋, 纵行切片, 苏木精和伊红染色, 显微镜观察闭合边缘损伤延伸距离、闭合处血管壁对合情况以及损伤的组织病理学改变.

统计学处理 数据处理用数据处理用SPSS13.0统计学软件包.

2 结果

2.1 结扎速血管闭合系统闭合血管的可靠性 应用结扎速血管闭合系统闭合17条动、静脉, 成功率均为100%; 平均动静脉直径分别是3.26(1.75-5.22)mm和5.42(2.40-9.08) mm; 成功闭合血管的平均动静脉破裂压情况(表1).

2.2 结扎速血管闭合系统闭合血管组织损伤的程度 闭合血管病理显示对组织的急性热和压力损伤. 闭合血管的组织损伤从闭合边缘起平均延伸距离(表2). 组织损伤扩散至血管壁外膜层和肌层(图3). 病理显示, 闭合血管的损伤主要为组织的急性热和压力损伤. 电热损伤的组织病理学改变: 光学显微镜下观察, 超声刀闭合血管表现为对组织的急性热和压力损伤. 组织急性热损伤表现为组织细胞蛋白变性和凝固性坏死.

表 1 闭合血管后血管破裂压(mean ± SD, mmHg)

分组	血管数	血管破裂压
动脉	10	486.00 ± 50.38
静脉	7	432.85 ± 49.23
直径≤3mm	8	507.50 ± 25.50
直径 > 3mm	9	425.56 ± 44.75

表 2 血管组织损伤延伸距离(mean ± SD, mm)

分组	血管数	组织损伤延伸距离
动脉	10	2.74 ± 0.47
静脉	7	2.85 ± 0.40

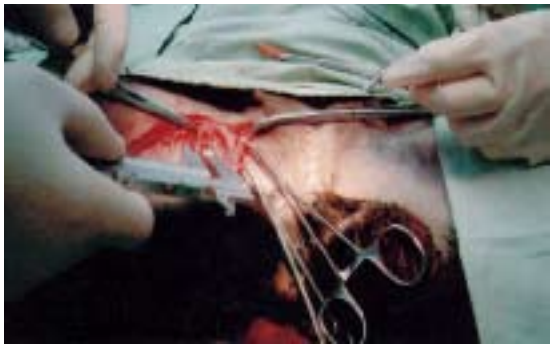


图 1 游标卡尺测量股动脉直径.

图 2 测量股动脉血管破裂压.

组织结构破坏, 细胞界限不清, 细胞核固缩、溶解或消失(图3-4).

3 讨论

腹腔镜外科的出现, 产生了新的技术挑战[1]. 传统的止血方法如单、双极电凝、钛夹夹闭、腔镜下缝合等已经很难适应腔镜外科快速发展的需要[2-3]. 单极电凝虽简单、实用, 但工作时电流通过身体, 组织损伤大, 特别是易引起临近重要组织的损伤, 不宜于精细的手术. 双极电凝虽在

■创新盘点
结扎速在临床应用中的优点已逐渐被广大临床医生所认同, 但现尚无有关其闭合血管后血管变化与血管内压力的客观的实验报道. 该实验通过动物实验观察结扎速闭合血管后血管各项参数的一些变化, 为临床医生的工作提供客观的依据.

■应用要点
结扎速通过独特的电外科输出技术, 使得血管壁的胶原蛋白和纤维蛋白溶解变性融合在了一起, 使血管达到了真正的阻断和闭合, 所形成的闭合带可以抵御3倍以上的正常人体收缩压, 临床可用于胃肠网膜切除、子宫附件切除、肛肠科痔切除及肾膀胱前列腺切除等手术.

■同行评价
本文通过动物实验在可结扎血管直径范围、结扎后血管破裂耐受的压力和病理变化3个方面证实了结扎速闭合血管的可靠性, 选题有临床实用性, 实验设计合理、方法得当、结果可信.

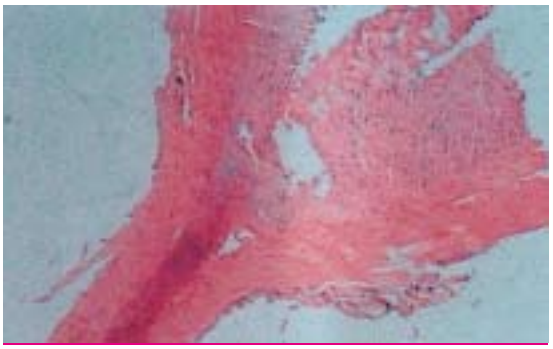


图 3 闭合的肱动脉. 损伤血管外膜及肌层2.25 mm.

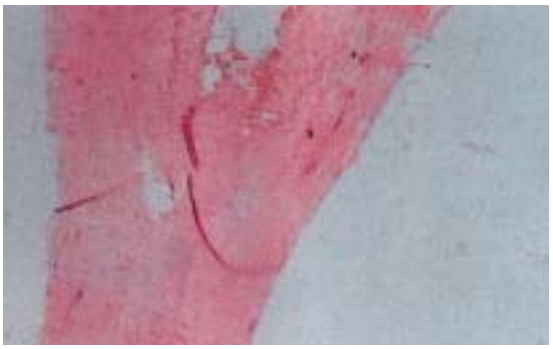


图 4 闭合的髂外静脉. 损伤血管外膜及肌层2.85 mm.

安全性及确切性上有所提高, 但对于直径3 mm以上的血管止血效果不佳, 并且电凝过程中产生烟雾, 影响手术视野. 钛夹夹闭的可靠性与缝扎效果相同, 而且对周围组织无损伤, 但价格昂贵, 对于不能游离出来的血管不能使用. 腹腔镜下缝合止血效果可靠, 适用于比较大的血管或用其他方法无法止血时. 但操作难度较大, 不容易像常规手术那样运用自如, 所以不认为是腹腔镜下应急的好方法, 另外容易造成误损伤, 特别是出血原因不明且部位不清时.

结扎速血管闭合系统使用电热能, 其独特之处是以组织反应发生器作为电流和电压的能量来源[4-6]. 组织反应发生器感觉两钳之间的将要熔合的组织密度, 将信息传回发生器, 发生器控制系统自动调整将要释放的能量的多少, 然后释放适当的能量闭合组织, 使血管和其周围组织的胶原蛋白和弹性蛋白变性, 结合血管钳口的压力, 使变性的蛋白重组, 熔合形成一透明带[4-6]. 本实验结扎速血管闭合系统成功闭合了所有血管, 包括直径为9.10 mm的静脉血管, 闭合血管破裂压最低250 mmHg. 健康人安静状态的大动脉血压为100-120 mmHg, 3 mm的动脉血压为95 mmHg[7], 静脉血压远低于动脉血压, 所以结扎速血管闭合系统闭合直径3 mm或更粗的血管仍然有较高的可靠性. 结扎速血管闭合系统闭合血管组织损伤延伸2.00-3.50 mm, 闭合血管病理显示, 损伤为对组织的急性热和压力损伤, 比Landman *et al*[8]报道的超声刀的组织损伤距离大. 但由于发生器控制系统自动调整将要释放的能量的多少, 其损伤程度较单极和双极电凝小, 术后黏连少. 本次研究的局限性在于实验是急性的, 临床上没有腹腔镜手术血管闭合后晚期破裂的报告, 不能说明血管闭合后闭合处动脉和静脉血管的慢性反应. 本实验为以后进一步研究闭合血管的慢性反应打下基础.

目前, 国内血管闭合系统在腹腔镜手术中的应用有临床研究报道[9-10], 对于血管闭合系统闭合血管的可靠性及组织损伤程度的动物实验研究, 本研究为国内首次报道. 本研究为进行腹腔镜手术的临床医生提供科学依据, 使他们在临床工作中根据遇到的具体情况, 选择更加安全有效的止血方法, 使外科手术真正达到微创.

4 参考文献

1 方驰华, 张伟, 马俊勋. 经蓝碟手辅助腹腔镜治疗腹部外科疑难疾病. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1623-1625

2 王孟春, 李立, 常桂艳, 孙思予, 孙素云. 金属夹联合内镜注射治疗胃肠道出血. 世界华人消化杂志 2003; 11: 673-675

3 陶铸, 刘新华, 严崇恩, 姜虹, 王廷芳. 急诊内镜下消化道急性出血治疗37例. 世界华人消化杂志 2002; 10: 1093b

4 Dubuc-Lissoir J. Use of a new energy-based vessel ligation device during laparoscopic gynecologic oncologic surgery. *Surg Endosc* 2003; 17: 466-468

5 Gelmini R, Romano F, Quaranta N, Caprotti R, Tazzioli G, Colombo G, Saviano M, Uggeri F. Sutureless and stapleless laparoscopic splenectomy using radiofrequency: LigaSure device. *Surg Endosc* 2006; 20: 991-994

6 Hefni MA, Bhaumik J, El-Toukhy T, Kho P, Wong I, Abdel-Razik T, Davies AE. Safety and efficacy of using the LigaSure vessel sealing system for securing the pedicles in vaginal hysterectomy: randomised controlled trial. *BJOG* 2005; 112: 329-333

7 姚泰, 曹济民, 樊小力, 朱大年. 生理学. 第1版. 人民卫生出版社, 2005: 175-184

8 Landman J, Kerbl K, Rehman J, Andreoni C, Humphrey PA, Collyer W, Olweny E, Sundaram C, Clayman RV. Evaluation of a vessel sealing system, bipolar electrosurgery, harmonic scalpel, titanium clips, endoscopic gastrointestinal anastomosis vascular staples and sutures for arterial and venous ligation in a porcine model. *J Urol* 2003; 169: 697-700

9 张萍, 凌奋, 汤蕴琦. 比较结扎速血管闭合系统与双极电凝在腹腔镜子宫切除术中的应用. 现代诊断与治疗 2003; 14: 342-343

10 焦鲁霞. 结扎速血管闭合系统在经阴道子宫切除术中的应用. 解放军医学杂志 2004; 29: 364-365

电编 李琪 编辑 王晓瑜

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月18日; 15(8): 893-896
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

恶性浆膜腔积液脱落细胞中P21 ras蛋白表达状况及其意义

宋荣峰, 张焜和, 靳文剑, 陈 江, 祝金泉, 吕农华

宋荣峰, 靳文剑, 江西省肿瘤医院内科 江西省南昌市 330029
张焜和, 陈江, 祝金泉, 吕农华, 南昌大学第一附属医院消化病研究所 江西省南昌市 330006
江西省科技厅科技攻关项目, No. F980508
通讯作者: 张焜和, 330006, 江西省南昌市永外正街, 南昌大学第一附属医院消化研究所. yfyzkh@sina.com
电话: 0791-8692507
收稿日期: 2006-11-15 接受日期: 2006-12-18

Expression of P21 ras protein in malignant serous cavity effusions and its significance

Rong-Feng Song, Kun-He Zhang, Wen-Jian Jin, Jiang Chen, Jin-Quan Zhu, Nong-Hua Lv

Rong-Feng Song, Wen-Jian Jin, Department of Internal Medicine, Jiangxi Tumor Hospital, Nanchang 330029, Jiangxi Province, China
Kun-He Zhang, Jiang Chen, Jin-Quan Zhu, Nong-Hua Lv, Institute of Digestive Diseases, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Supported by the Key Science and Technology Development Program of Jiangxi Province No. F980508
Correspondence to: Kun-He Zhang, Institute of Digestive Diseases, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Yongwai Street, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. yfyzkh@sina.com
Received: 2006-11-15 Accepted: 2006-12-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of P21 ras protein in the exfoliative cells from malignant serous cavity effusions and its diagnostic value.

METHODS: Exfoliative cells in fresh specimens of serous cavity effusions were collected after centrifugation, and cell smears were prepared for cytological diagnosis, by which the specimens were divided into benign or malignant groups. The remained exfoliative cells were processed with a "standardized" procedure: removing red cells, fixing in paraformaldehyde, adjusting the cell concentration, and finally, cell smears were prepared and P21 ras immunocytochemistry were performed (SP method).

RESULTS: A total of 108 effusion specimens were collected, including 53 malignant and 55 benign one. In the immunocytochemical staining of P21 ras, 39 of 53 malignant effusions were positive (73.6%), and most of them were strongly positive. The positive results were observed in 12 of 55 (21.8%) benign effusions, most of which were weakly positive. The positive rates (χ^2 = 29.02, P < 0.001) and expression intensity (Uc = 6.786, P < 0.001) of P21 ras were significantly different between malignant and benign effusions. The sensitivity, specificity and diagnostic accordance rate of P21 ras immunocytochemistry in the diagnosis of malignant effusions were 73.6%, 78.2% and 75.9%, respectively.

CONCLUSION: P21 ras immunocytochemical staining of exfoliative cells is positive in most malignant effusions, but negative in most benign ones, implicating that it is valuable for the diagnosis of malignant effusions.

Key Words: P21 ras protein; Serous cavity effusion; Immunocytochemistry

Song RF, Zhang KH, Jin WJ, Chen J, Zhu JQ, Lv NH. Expression of P21 ras oncoprotein in malignant serous cavity effusions and its significance. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(8):893-896

摘要

目的: 检测浆膜腔积液脱落细胞P21 ras蛋白表达状况, 探讨其对恶性浆膜腔积液的诊断价值.

方法: 将新鲜浆膜腔积液离心后收集脱落细胞, 取部分细胞涂片进行常规细胞学诊断, 据此将积液分为良性与恶性两组. 对余下脱落细胞作"标准化"处理, 包括去除红细胞、多聚甲醛固定、调整细胞浓度、制备细胞涂片, 然后进行P21 ras蛋白免疫化学染色(SP法).

结果: 共108例浆膜腔积液, 恶性53例, 良性55例. 39例恶性积液P21 ras蛋白免疫化学染色阳性(73.6%), 且多为强阳性或阳性; 12例良性积液P21 ras蛋白染色阳性(21.8%), 且多为弱阳性或阳性, 两组间阳性率(χ^2 = 29.02, P<0.001)及阳性强度(Uc = 6.786, P<0.001)的差异均有

■**背景资料**
随着恶性肿瘤发病率的升高, 恶性胸/腹水不断增多. 细胞学检查是目前诊断恶性胸/腹水的主要手段, 但其敏感性低、经验性强, 难以满足临床需要, 人们一直在寻找有效的诊断新技术.

■研发前沿
免疫化学染色可辅助常规细胞病理学诊断. 对胸/腹水脱落细胞进行免疫细胞化学染色, 检测肿瘤相关蛋白的表达, 对恶性脱落细胞的诊断及其与良性脱落细胞的鉴别有较大的价值, 成为近年来恶性胸/腹水诊断研究的热点.

显著性统计学意义. P21 ras蛋白免疫化学染色诊断恶性积液的敏感度为73.6%, 特异度为78.2%, 诊断符合率达75.9%.

结论: 浆膜腔积液中脱落细胞P21 ras蛋白免疫化学染色在肿瘤细胞多为阳性, 良性细胞多为阴性, 对恶性体腔积液的诊断有较大的价值.

关键词: P21 ras蛋白; 浆膜腔积液; 免疫细胞化学染色

宋荣峰, 张焜和, 靳文剑, 陈江, 祝金泉, 吕农华. 恶性浆膜腔积液脱落细胞P21 ras蛋白表达状况及其意义. 世界华人消化杂志 2007;15(8):893–896
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/893.asp

0 引言

浆膜腔积液是常见的临床病症, 按病因可分为良性与恶性两大类. 随着恶性肿瘤发病率的升高, 恶性浆膜腔积液不断增多, 在老年性积液中高达70%左右. 细胞学检查一直是恶性浆膜腔积液的主要诊断手段, 但其敏感性低、经验性强, 难以满足临床需要[1]. 因此, 恶性积液诊断及其与良性积液的鉴别常困扰临床医务人员. 近年来, 通过体腔积液脱落细胞免疫化学染色辅助细胞学诊断倍受关注[2], 人们试图通过检测肿瘤相关蛋白的表达, 为恶性细胞的诊断提供帮助. 恶性积液中转移癌细胞可来源于全身各种肿瘤, 必须针对“通用”的肿瘤相关抗原进行免疫化学染色, 才有可能取得良好的诊断效果. ras基因是迄今为止研究最多的原癌基因之一, 其突变普遍存在于各种恶性肿瘤, 并与肿瘤的发生、进展和转移密切相关[3], 他所编码的P21 ras蛋白在多种肿瘤中有较高的阳性表达率[4], 因而是恶性肿瘤的一个广谱标志物. 因此, 对P21 ras蛋白进行免疫化学染色可能在恶性积液的诊断及其与良性积液的鉴别中具有较大的价值. 迄今为止, 我们未检索到P21 ras蛋白在恶性浆膜腔积液的诊断应用研究报道, 其具体价值如何尚不清楚. 为此, 我们采用ras蛋白的mAb对浆膜腔积液脱落细胞进行免疫细胞化学染色, 探讨其对恶性浆膜腔积液的诊断价值.

1 材料和方法

1.1 材料 108例浆膜腔积液标本来自108例不同患者, 其中胸水71例, 腹水32例, 心包积液4例, 盆腔灌洗液1例. 所有病例均为2001-10/2002-10在南昌大学第一附属医院的住院患者. 根据细胞学诊断结果将标本分为良性与恶性积液两组.

1.2 方法 取新鲜标本50-100 mL, 常规离心收集细胞沉淀. 如为血性积液, 用氯化铵溶液破坏红细胞. 取部分细胞沉淀涂片, 由本院细胞室高年资医师作出细胞学诊断. 余下的细胞沉淀进行“标准化”处理[5], 包括10 g/L多聚甲醛-PBS固定、用1 g/L BSA-PBS洗涤、调整细胞浓度为2×10^6/mL, 然后涂片, 干燥后置-85℃冰箱保存备用.

1.2.1 免疫细胞化学染色 采用SP酶标法(试剂盒购于北京中山生物技术有限公司), 一抗为鼠抗人P21 ras单克隆抗体(Santa Cruz公司产品), 二抗为通用型生物素标记的羊抗鼠IgG, 酶系统为辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素, DAB显色. PBS代替一抗作为阴性对照. 操作按试剂盒说明书进行.

1.2.2 结果判断 (1)阳性细胞的判断: P21 ras蛋白免疫化学染色呈棕黄色颗粒样着色, 以胞膜明显, 也见于胞质. 将染色强度分为Ⅲ级: Ⅰ级无着色, 计为阴性; Ⅱ级为浅黄色, Ⅲ级为棕黄色, 均计为阳性; (2)阳性标本的判断: 高倍视野下, 计数100个细胞, 计算出阳性细胞百分比. 阳性细胞≥80%计为强阳性+++, 20%-79%计为阳性++, 6%-19%计为弱阳性+, 0-5%计为阴性–. +~+++均计为阳性标本, –计为阴性标本.

统计学处理 计数资料采用卡方检验, 等级资料采用秩和检验, $P<0.05$有统计学意义. 并计算P21 ras蛋白免疫化学染色诊断恶性体腔积液的敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值及诊断符合率.

2 结果

2.1 临床资料 108例浆膜腔积液的患者中, 男57例, 女51例, 年龄14-78(平均51.2)岁. 细胞学检查诊断为恶性积液者53例, 良性积液55例. 恶性积液中, 胸腔积液33例, 腹腔积液17例, 心包积液3例. 良性积液中, 胸腔积液38例, 腹腔积液15例, 心包积液1例, 腹腔灌洗液1例.

2.2 P21 ras蛋白免疫化学染色结果 肿瘤细胞以胞膜着色为主, 有时细胞核及核周也着色, 呈棕黄色颗粒沉淀样; 间皮细胞、淋巴细胞不明显(图1A-B). 在53例恶性积液中, 有39例染色呈阳性, 阳性率73.6%, 且其中36例呈阳性或强阳性++~+++, 占92.3%. 55例良性积液中, 12例染色阳性, 阳性率21.8 %, 且多为阳性或弱阳性+~

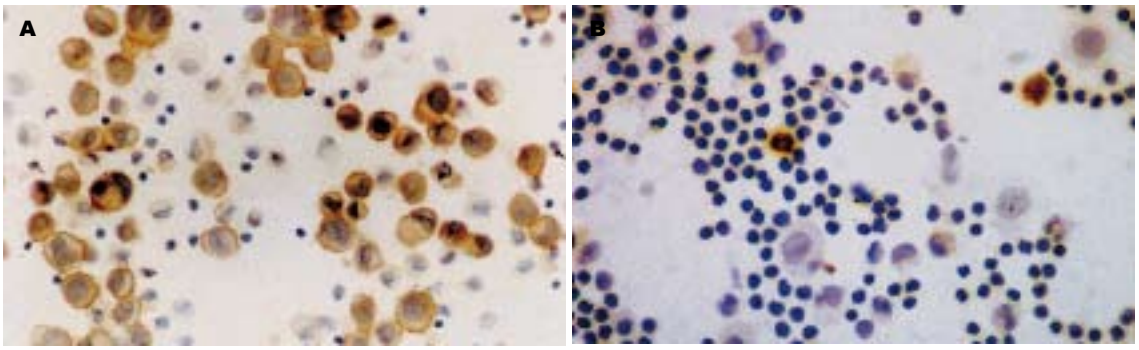


图 1 浆膜腔积液脱落细胞P21 ras蛋白免疫细胞化学染色(×400). A: 恶性; B: 良性.

■同行评价

目前, 利用P21 ras蛋白进行免疫化学染色对恶性肿瘤积液的诊断尚未达成共识意见, 探索其对恶性浆膜腔积液的诊断价值具有较大的临床意义. 该文立意新颖, 材料与方法设计合理, 临床资料与结果可信, 统计学处理正确, 是一篇具有较高水平的论文.

++(表1). 经卡方检验, 良性与恶性积液脱落细胞免疫化学染色阳性率差异有显著性意义(χ^2 = 29.02, P<0.001). 经秩和检验, 良性与恶性标本脱落细胞免疫化学染色的阳性强度差异也有显著性意义(Uc = 6.786, P<0.001).

2.3 P21 ras蛋白表达对恶性积液的诊断价值 浆膜腔积液脱落细胞P21 ras蛋白免疫化学染色对恶性积液具有较好的诊断价值, 敏感度为73.6%, 特异度为78.2%, 阳性预测值为76.5%, 阴性预测值为75.4%, 诊断符合率为75.9%.

表 1 体腔积液脱落细胞抗P21 ras蛋白免疫细胞化学染色结果

积液类型	n	阳性例数(%)	阳性强度			
			−	+	++	+++
恶性	53	39(73.6)	14	3	25	11
良性	55	12(21.8)	43	5	7	0

3 讨论

恶性浆膜腔积液一直是临床诊断难题, 人们不断寻求有效的实验诊断方法[6-9]. 将免疫细胞化学染色应用于浆膜腔积液脱落细胞的各种肿瘤相关抗原表达的检测, 有助于提高恶性积液诊断的准确性[10-11]. Nomoto *et al*[12]比较了常规细胞学检查、免疫细胞化学染色及PCR-RFLP检测K-ras基因突变3种方法对胰腺癌腹膜转移的检出率, 其中脱落细胞免疫细胞化学染色敏感性最高. 目前, 在常规细胞检查的基础上应用免疫细胞化学染色技术已成为良恶性体腔积液鉴别诊断中一项重要的辅助手段[2,13]. ras基因家族突变是人类肿瘤最常见的癌基因事件之一, 并认为是肿瘤发生、发展中的一个共同通路[3], 但ras基因突变在人类肿瘤的阳性检出率较低, 尚不具有临床实用价值, 而其表达产物的阳性检出率高, 对肿瘤有较大的诊断价值[14]. 我们对108例浆膜腔积液脱落细胞进行P21 ras蛋白免疫细胞化学染色, 肿瘤细胞着色大多呈阳性或强阳性, 而良性脱落细胞染色大多为阴性, 如为阳性也多为弱阳性, 细胞着色浅淡, 阳性强度在恶性与良性积液之间的差异有极显著性意义(P<0.001). 恶性标本脱落细胞P21 ras蛋白免疫化学染色的阳性率为73.6%, 明显高于良性积液(P<0.001), 对诊断恶性积液的敏感度、特异度、诊断符合率等5项诊断效率指标均达75%左右. 因此, P21 ras蛋白免疫细胞化学染色对恶性积液的诊断有较大的价值.

浆膜腔积液中的部分肿瘤细胞不表达P21 ras蛋白, 而部分良性脱落细胞有较弱表达, 近年来对P21 ras蛋白在细胞信号转导中的作用机制的深入了解可对此作出解释. P21 ras是细胞内信号转导通路的开关分子, 当其定位于细胞膜时与GTP结合形成P21 ras-GTP复合体即被激活, 使细胞内信号转导系统开放; 因P21 ras具有GTP酶活性, 可将GTP水解为GDP后便失活, 使信号转导系统关闭. P21 ras并不是一直位于细胞膜上, 当他在蛋白激酶C(PKC)的作用下发生磷酸化时, 与细胞膜的结合减弱而移至内质网、高尔基体和粒线体等细胞器内[15]. ras基因突变后所表达的突变型P21 ras蛋白其GTP酶活性减弱以致持续与GTP结合而使信号转导系统一直开放, 细胞无休止地分裂和增殖而发生恶性转化. 因此, 正常细胞与肿瘤细胞相比, 只是P21 ras蛋白在细胞膜内侧的表达量存在差异, 在良性细胞检出P21 ras蛋白也就不奇怪, 同样, 因肿瘤细胞ras基因并非均存在突变, 部分肿瘤细胞不能检查P21 ras也属正常.

4 参考文献

1 Motherby H, Nadjari B, Friegel P, Kohaus J, Ramp U, Bocking A. Diagnostic accuracy of effusion cytology. *Diagn Cytopathol* 1999; 20: 350-357

2 Politi E, Kandaraki C, Apostolopoulou C, Kyritsi T, Koutselini H. Immunocytochemical panel for

distinguishing between carcinoma and reactive mesothelial cells in body cavity fluids. *Diagn Cytopathol* 2005; 32: 151-155
3 Giehl K. Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. *Biol Chem* 2005; 386: 193-205
4 Gulbis B, Galand P. Immunodetection of the p21-ras products in human normal and preneoplastic tissues and solid tumors: a review. *Hum Pathol* 1993; 24: 1271-1285
5 Kuenen-Boumeester V, van Loenen P, de Bruijn EM, Henzen-Logmans SC. Quality control of immunocytochemical staining of effusions using a standardized method of cell processing. *Acta Cytol* 1996; 40: 475-479
6 蔡永国, 房殿春, 杨仕明, 罗元辉, 陈陵, 王东旭. 肝素酶表达鉴别良、恶性腹水无价值. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1111-1114
7 缪应雷, 施丕华, 段丽平. 联合检测CA19-9和CA125鉴别良恶性腹水. 世界华人消化杂志 2006; 14: 823-826
8 黄家淼, 杨剑, 周仁荣, 胡健. 腹水/血清肿瘤标志物对良恶性腹水的鉴别价值. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1533-1536
9 朱樑, 张忠兵, 谢渭芬, 胡和平, 张兴荣, 刘苏, 陈伟忠. 多功能腹膜检查针对良恶性腹水的诊断价值. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1839-1841
10 Comin CE, Novelli L, Boddi V, Paglierani M, Dini S. Calretinin, thrombomodulin, CEA, and CD15: a useful combination of immunohistochemical markers for differentiating pleural epithelial mesothelioma from peripheral pulmonary adenocarcinoma. *Hum Pathol* 2001; 32: 529-536
11 Carella R, Deleonardi G, D'Errico A, Salerno A, Egarter-Vigl E, Seebacher C, Donazzan G, Grigioni WF. Immunohistochemical panels for differentiating epithelial malignant mesothelioma from lung adenocarcinoma: a study with logistic regression analysis. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 43-50
12 Nomoto S, Nakao A, Kasai Y, Inoue S, Harada A, Nonami T, Takagi H. Peritoneal washing cytology combined with immunocytochemical staining and detecting mutant K-ras in pancreatic cancer: comparison of the sensitivity and availability of various methods. *Pancreas* 1997; 14: 126-132
13 Chhieng DC, Yee H, Schaefer D, Cangiarella JF, Jagirdar J, Chiriboga LA, Jagirdar J, Chiriboga LA, Cohen JM. Calretinin staining pattern aids in the differentiation of mesothelioma from adenocarcinoma in serous effusions. *Cancer* 2000; 90: 194-200
14 Ruiz-Godoy R LM, Garcia-Cuellar CM, Herrera Gonzalez NE, Suchil BL, Perez-Cardenas E, Sacnchez-Perez Y, Suarez-Roa ML, Meneses A. Mutational analysis of K-ras and Ras protein expression in larynx squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2006; 25: 73-78
15 Bivona TG, Quatela SE, Bodemann BO, Ahearn IM, Soskis MJ, Mor A, Miura J, Wiener HH, Wright L, Saba SG, Yim D, Fein A, Perez de Castro I, Li C, Thompson CB, Cox AD, Philips MR. PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis. *Mol Cell* 2006; 21: 481-493

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.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月18日; 15(8): 897-900
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

法莫替丁及西咪替丁对Oddi括约肌压力变化的影响

张小薄, 吴硕东, 孔 静, 王 伟

张小薄, 吴硕东, 孔静, 王伟, 中国医科大学盛京医院普外科 辽宁省沈阳市 110004
通讯作者: 吴硕东, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学盛京医院普外科. wusd@cmu2h.com
电话: 024-83955058 传真: 024-83956291
收稿日期: 2006-10-26 接受日期: 2006-12-18

Effects of famotidine and cimetidine on human sphincter of Oddi pressure

Xiao-Bo Zhang, Shuo-Dong Wu, Jing Kong, Wei Wang

Xiao-Bo Zhang, Shuo-Dong Wu, Jing Kong, Wei Wang, Department of General Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Correspondence to: Shuo-Dong Wu, Department of General Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. wusd@cmu2h.com
Received: 2006-10-26 Accepted: 2006-12-18

Abstract

AIM: To assess the effects of famotidine and cimetidine at routine dosages on human sphincter of Oddi (SO) motility by choledochoscope manometry.

METHODS: A total of 20 patients with T tubes after cholecytectomy and choledochotomy were randomly divided into famotidine group and cimetidine group (n = 10). The pressure of duodenum (DP), basal pressure of SO (SOBP), contractive amplitude of SO (SOCA), contractive frequency of SO (SOF), contractive duration of SO (SOD) and the pressure of common bile duct (CBDP) before and after drug administration were recorded and analyzed.

RESULTS: The levels of SOCA and SOBP decreased by 25.6% and 57.3% after 10 minutes of cimetidine treatment, and by 25.4% and 19.3% after 20 minutes of cimetidine treatment, respectively. There was significant difference before and after drug administration (P < 0.05). The levels of SOCA and SOBP also decreased after famotidine treatment, but there was no statistical difference. The other indexes had no obvious changes after drug administration.

CONCLUSION: Cimetidine at routine doses can decrease SOBP and SOCA, showing inhibitory effect on the motility of SO, while famotidine had no obvious effect on SO motility.

Key Words: Sphincter of Oddi; Famotidine; Cimetidine; Manometry; Motility

Zhang XB, Wu SD, Kong J, Wang W. Effects of famotidine and cimetidine on human sphincter of Oddi stress. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(8):897-900

摘要

目的: 观察常规剂量的组胺H2受体阻滞剂法莫替丁、西咪替丁对Oddi括约肌(SO)运动功能的影响.

方法: 取胆道探查术后留有T型管患者20例, 随机分为法莫替丁组和西咪替丁组(n = 10), 测量用药前后的十二指肠压(DP)、SO基础压(SOBP)、收缩幅度(SOCA)、收缩频率(SOF)、收缩间期(SOD)及胆总管压(CBDP).

结果: 静推西咪替丁10 min后, SOCA及SOBP分别下降了25.6%及57.3%, 20 min后SOCA及SOBP分别下降了25.4%及19.3%, 给药前后自身对照统计学上有显著差别(P<0.05); 静脉推注法莫替丁后SOCA及SOBP有降低趋势, 但无统计学意义. 其他指标无明显变化.

结论: 常规剂量的西咪替丁可引起SOBP和SOCA降低, 对SO运动具抑制作用, 常规剂量的法莫替丁对SO压力无明显影响.

关键词: Oddi括约肌; 法莫替丁; 西咪替丁; 测压; 运动性

张小薄, 吴硕东, 孔静, 王伟. 法莫替丁及西咪替丁对Oddi括约肌压力变化的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(8):897-900
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/897.asp

■背景资料
Oddi括约肌在维持胆道动力方面具有极为重要的作用, 他作为胆道系统的一部分, 其上广泛分布着多种神经激素受体, 对于SO运动功能的调节起着重要作用. 哪些药物能够影响Oddi括约肌的运动以及如何准确检测Oddi括约肌的压力尚未完全明确. 近年来, 法莫替丁和西咪替丁对胃肠运动的影响日益受到重视, 其作用机制尚不完全明了, 可能与H2受体作用无关.

■相关报道
吴硕东 *et al*通过经胆道镜测压发现, 吗啡可引起SO基础压、收缩频率、收缩幅度及胆总管压的显著升高, 因此, 在常规胆道疾病患者的治疗过程中, 应该尽量避免应用吗啡镇痛; 而硝酸甘油、阿托品和西沙必利可引起SO基础压、收缩频率显著降低, 有松弛Oddi括约肌的作用.

■创新盘点
以往的实践证明, 经胆道镜测压是一种安全可靠的检测Oddi括约肌压力的方法, 并发现多种药物对Oddi括约肌运动的影响. 该文章亦采用胆道镜测压的方法, 检测法莫替丁和西咪替丁对Oddi括约肌运动的影响.

0 引言

抑酸药组胺H2受体阻滞剂法莫替丁、雷尼替丁、西咪替丁等临床上常用于治疗消化性溃疡、胃泌素瘤、胃食管返流病等胃酸相关性疾病. 近年的研究表明, 他们对胃肠运动亦有重要影响. 胃肠与胆道动力学及Oddi括约肌(SO)收缩具有协调一致性, 关于H2受体阻滞剂对SO运动功能的研究较少. 我们采用经胆道镜测压方法观察常规剂量下法莫替丁、西咪替丁对SO压力变化的影响.

1 材料和方法

1.1 *材料* 原发性胆管结石患者20例, 男6例, 女14例, 平均年龄52.5(27-75)岁, 随机分为2组: 法莫替丁组及西咪替丁组各10人. 全部患者均为胆囊切除、胆总管探查取石及T型管引流术后, 平均手术后8 wk(6-14 mo), 在胆道镜检查或取残石的操作过程中进行了测压观察. 测压前向患者充分说明试验的方法、目的及风险, 取得患者的理解与配合, 并签署知情同意书, 术中所应用的一切药物均免费, 并对可能发生的风险负责. 测压器械为PC polygram HR高分辨、多通道胃肠功能测定仪及相应测压软件、三通道测压导管、低顺应性水灌注系统、氮气泵及PENTEX LX-750 p纤维胆道镜. 三通道测压导管长2 m, 直径1.7 mm, 末端有3个侧孔, 相隔2 mm, 每孔开口于不同方向. 药品: 高舒达(法莫替丁)注射液(日本山之内, 20 mg/支), 西咪替丁注射剂(苏州第六制药厂, 200 mg/支).

1.2 *方法* 受试者检查前2 d不使用任何对胆道及SO有影响的药物如吗啡、阿托品、西沙比利、硝酸甘油等, 测压前禁食水8 h. 设置电脑测压系统参数, 氮气压力为40 kPa, 水流速度为0.5 mL/min, 连接测压导管, 拔除T型管并经T型管窦道导入胆道镜, 观察乳头部是否蠕动良好、有无狭窄、纤维化及结石、有无过度松弛, 所有测压患者乳头均活动良好, 无器质性疾病, 曾行EST的患者排除在外. 全部患者行胆道镜探查取石后, 由胆道镜侧孔插入测压导管, 直视下经乳头达十二指肠, 稳定30 s后测压, 后拽导管至SO部, 直视结合电脑出现时相波可明确导管处于SO内, 测压后将导管拽至胆总管内进行测压. 然后对法莫替丁组10例患者给予静脉推注高舒达40 mg, 10 min和20 min后重复上述过程进行测压并储存压力曲线; 西咪替丁组10例患者第一次测压后, 给予缓慢静脉推注西咪替丁200 mg, 10 min和20 min再行测压并储存压力曲线. 观察参数包括SO基础压(SOBP)、收缩幅度(SOCA)、收缩间期(SOD)、收缩频率(SOF)、十二指肠压(DP)及胆总管压(CDBP), 十二指肠压作为零点.

统计学处理 以DP作为零点, 计算其余各项指标的相对值结果以mean±SD表示, 样本均数间比较使用组内配对t检验, 应用SPSS11.05统计软件进行相关性分析, $P<0.05$被认为有显著意义.

2 结果

在静推高舒达10 min及20 min后, SOBP及SOCA有轻度降低倾向, 但其变化无统计学意义, 其他指标无明显变化, 可见法莫替丁对SO运动功能无明显影响分钟. 在西咪替丁10 min后, SOCA及SOBP分别下降了25.6%及57.3%, 20 min后SOCA及SOBP分别下降了25.4%及19.3%, 利用自身前后对照, 统计学上有显著差别($P<0.05$). 其他指标无明显变化. 可见西咪替丁使SO活动减弱, 对SO运动具有抑制作用(表1).

3 讨论

SO是围绕胆总管末端、主胰管末段及其共同管道所形成的环状括约肌, 长度约为4-6 mm, 在维持胆道动力方面具有极为重要的作用. SO运动学最重要的发展是1970年代中期SO测压计的发明, 人们可以直接评估SO的运动功能. 内镜下SO直接测压是目前公认的SO压力检测的金标准[1]. 行ERCP(endoscopic retrograde cholangiopancreatography)时经内镜测压可选择性插管进入胆总管或主胰管Oddi括约肌功能段, 对胆总管梗阻或急性复发性胰腺炎具有诊断意义[2-3]. 缺点为并发症多, 如经ERCP测压后胰腺炎发病率较高, 并且行ERCP经内镜测压是一门需要技巧的过程, 须选择性胆管或胰管插管, 一般在十二指肠蠕动间期及亚麻醉状态下进行, 这导致了即使是技术熟练的内镜医师其失败率亦高达17%[4]. 我们采用的经T型管窦道胆道镜SO测压法, 是顺行插管检测SO压力, 经实践检验, 其痛苦小, 安全性高, 相对技术难度较低, 易于为临床医生和患者所接受. 我们所检测的20例患者全部插管测压成功, 无1例并发症出现, 而且另有2例患者测压中发现其SO狭窄, 术后行EST术解除狭窄, 避免了SOD(sphincter of Oddi disfunction)的发生, 也降低了结石再发

表 1 法莫替丁和西咪替丁对SO运动功能的影响(n = 10)

	法莫替丁			西咪替丁		
	用药前(对照)	用药10 min后	用药20 min后	用药前(对照)	用药10 min后	用药20 min后
SOBP(mmHg)	9.63 ± 8.48	5.92 ± 4.41	4.97 ± 6.53	9.63 ± 8.16	4.96 ± 4.43[b]	3.10 ± 3.16[b]
SOCA(mmHg)	96.21 ± 53.12	85.31 ± 59.48	78.18 ± 64.01	106.55 ± 73.58	79.24 ± 59.93[a]	52.09 ± 37.11[b]
SOD(s)	6.32 ± 1.15	6.47 ± 1.44	5.71 ± 1.59	6.34 ± 3.19	6.59 ± 1.42	6.07 ± 1.76
SOF(次/min)	9.82 ± 3.18	10.57 ± 3.88	8.35 ± 2.01	8.30 ± 2.84	10.57 ± 2.82	11.44 ± 4.39
CBDP(mmHg)	5.09 ± 7.74	5.63 ± 5.33	2.42 ± 5.28	6.54 ± 4.16	9.03 ± 9.53	5.87 ± 5.07

[a]P<0.05, [b]P<0.01 *vs* 用药前.

■**应用要点**

目前, 常规胆道疾病患者的治疗过程中, 应该尽量避免应用吗啡镇痛, 而硝酸甘油、阿托品和西沙必利可引起SO基础压、收缩频率显著降低, 有松弛Oddi括约肌的作用, 因此对影响SO运动的药物的研究具有重要意义. 随着对这类药物的进一步深入研究, 有可能临床应用抑酸药提供了更加广阔的空间.

的机率. 因EST改变了SO的解剖与功能, 造成测压不准确, 故统计结果时此2例患者未计算在内. SO作为胆道系统的一部分, 其上广泛分布着多种神经激素受体, 对于SO运动功能的调节起着重要作用. 吴硕东 *et al*[5-7]通过经胆道镜测压发现, 吗啡可引起SO基础压、收缩频率、收缩幅度及胆总管压的显著升高, 因此, 在常规胆道疾病患者的治疗过程中, 应该尽量避免应用吗啡镇痛; 而硝酸甘油、阿托品和西沙必利可引起SO基础压、收缩频率显著降低, 有松弛Oddi括约肌的作用. 组胺H2受体阻滞剂法莫替丁、雷尼替丁、西咪替丁等临床上常用于治疗消化性溃疡、胃泌素瘤、胃食管返流病等胃酸相关性疾病. 近年来, 法莫替丁、雷尼替丁和西咪替丁对胃肠运动的影响日益受到重视, 雷尼替丁和西咪替丁都可影响胃肠运动, 延迟胃排空. 其作用机制尚不完全明了, 可能与H2受体作用无关.

关于H2受体阻滞剂对SO作用的研究较少. Toouli *et al*[8]在组胺对负鼠SO运动功能影响的实验中发现, 组胺对SO的抑制作用是通过刺激H1受体介导的抑制神经引起的, 这种抑制神经为非胆碱能神经、非肾上腺能神经; 组胺对SO的抑制作用与H2受体无关. Sand *et al*[9]亦发现, 组胺对SO的抑制作用由H1受体介导, 且成年猪和幼年猪SO对组胺的反应不同. 而在Maples *et al*[10]的研究中发现, H2受体激动剂氨乙吡唑(betazole hydrochloride)能使胆总管压升高, 并与十二指肠肌电活性相关; 应用西咪替丁拮抗后十二指肠肌电活性及胆总管压均降至基线水平.

Bertaccini *et al*[11]在体外动物实验中发现, 法莫替丁比西咪替丁及雷尼替丁具有更高的H2受体选择性; 既使在(10^{-4} mol/L) 浓度下, 对胃肠活动亦没有影响. Ohira *et al*[12]亦发现, 法莫替丁对胃肠的运动功能及胃排空没有影响. 然而Pendleton *et al*[13]报道, 大剂量法莫替丁(27 mg/kg)可加速胃排空. 陈天华 *et al*发现ip法莫替丁(16 mg/kg)可增强胃窦肌电活动, 给药40 min左右, 增效明显, 而十二脂肠的电活动无明显改变. 我们的实验观察到在应用法莫替丁10 min及20 min后, SO基础压(SOBP)、收缩幅度(SOCA)有降低趋势, 但无统计学意义, SOD, SOF及CDBP无明显变化, 说明其对SO没有明显作用.

西咪替丁可减慢猴、大鼠、人的胃排空, 在离体实验中, 西咪替丁舒张大鼠食道下括约肌, 抑制大鼠离体胃、小肠平滑肌的收缩活动, 并且其抑制作用具有浓度依赖性. 西咪替丁对大鼠结肠不同部位的作用不同, 抑制近端结肠纵行肌条的收缩活动, 却兴奋远端结肠. 另外, 大鼠小肠不同部位对西咪替丁的敏感性不同, 十二指肠的反应最强, 回肠的反应最弱, 即表现为沿小肠向末端部位敏感性逐渐减弱. 西咪替丁对胃肠运动的影响可能存在动物种属及作用部位的差异. 其机制存在较多争议, 有人认为, 西咪替丁具有抗乙酰胆碱酯酶作用, 遂其对胃肠运动功能的影响与M受体有关, 而瞿颂义 *et al*[14]通过西咪替丁对大鼠胃肌条运动的研究, 发现西咪替丁的抑制作用为经由内源性前列腺素受体的途径. 本实验观察到常规剂量的西咪替丁可引起SOBP和SOCA降低, 对SOD, SOF, CBDP无明显影响, 说明西咪替丁对SO具有抑制作用. 这一结果与以前的研究相一致, 说明西咪替丁在抑制胃肠运动的同时, 对SO亦有抑制作用, 进一步说明了胃肠运动和胆道运动之间存在协调一致的关系, 并对临床应用抑酸药提供了更加广阔的空间. 瞿颂义 *et al*[14]对胃、小肠肌条的研究发现, 同为H2受体阻滞剂的雷尼替丁和西咪替丁, 对各肌条的作用不同, 雷尼替丁表现为兴奋作用, 而西咪替丁则为抑制作用, 说明他们对胃肠肌条的作用为非H2受体作用. 本实验发现, 法莫替丁和西咪替丁同为H2受体阻滞剂, 抑制胃酸分泌, 且法莫替丁作用强, 但对SO运动功能表现出不同的结果, 说明他们对SO的作用机制可能为非H2受体作用, 与

■同行评价
本文观察了法莫替丁及西咪替丁对Oddi括约肌压力变化的影响, 文章具有一定的科学性和临床实用性.

抑酸机制无关.

4 参考文献

1 Guelrud M, Mendoza S, Rossiter G, Villegas MI. Sphincter of Oddi manometry in healthy volunteers. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 38-46

2 刘晓敏, 唐建光, 苏艺群, 颜丽萍. ERCP检查常见并发症处理及预防措施. 世界华人消化杂志 2002; 10: 1238-1239

3 王东, 李兆申, 张文俊, 潘雪, 孙振兴, 邹晓平. 急性胆源性胰腺炎内镜诊治疗效及安全性. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1550-1553

4 Maples MD, Lea JW 4th, O'Leary JP. Effects of betazole hydrochloride and cimetidine on common bile pressure and duodenal myoelectric activity in the dog. *Am Surg* 1981; 47: 519-521

5 吴硕东, 孔静, 王伟, 张强, 金俊哲. 吗啡及-M胆碱能受体阻断剂对Oddi括约肌压力变化的影响观察. 世界华人消化杂志 2002; 12: 1467-1469

6 吴硕东, 金俊哲, 姜锡然, 张强, 王伟. 经胆道镜测压观察硝酸甘油等对Oddi括约肌的作用. 消化外科 2002; 1: 40-42

7 孔静, 吴硕东, 王伟, 金俊哲. 吗啡、阿托品及丁溴东莨菪碱对Oddi括约肌压力变化的影响观察. 外科理论与实践 2003; 8: 153-155

8 Toouli J, Dodds WJ, Honda R, Hogan WJ. Effect of histamine on motor function of opossum sphincter of Oddi. *Am J Physiol* 1981; 241: G122-G128

9 Sand J, Arvola P, Porsti I, Jantti V, Oja OS, Baer G, Nordback I. Histamine in the control of porcine and human sphincter of Oddi activity. *Neurogastroenterol Motil* 2000; 12: 573-579

10 Maples MD, Lea JW 4th, O'Leary JP. Effects of betazole hydrochloride and cimetidine on common bile pressure and duodenal myoelectric activity in the dog. *Am Surg* 1981; 47: 519-521

11 Bertaccini G, Coruzzi G, Poli E. Histamine H2 receptor antagonists may modify dog intestinal motility independently of their primary action on the H2 receptors. *Pharmacol Res Commun* 1985; 17: 241-254

12 Ohira Y, Hanyu N, Aoki T, Hashimoto Y, Iikura M, Fukuda S. Effects of various histamine H2-receptor antagonists on gastrointestinal motility and gastric emptying. *J Smooth Muscle Res* 1993; 29: 131-142

13 Pendleton RG, Cook PG, Shepherd-Rose A, Mangel AW. Effects of H2-receptor antagonists upon physiological acid secretory states in animals. J *Pharmacol Exp Ther* 1985; 233: 64-69

14 瞿颂义, 郑天珍. 比较雷尼替丁和西咪替丁对大鼠胃肌条运动的影响. 新消化病学杂志 1997; 5: 75-76

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 •

关于2006年度山西省期刊质量评估结果的通报

本刊讯 为推动期刊出版事业的繁荣和发展, 中共山西省委宣传部、山西省新闻出版局、山西省科学技术厅共同组织了2006年度期刊质量评估工作. 此次参评的为2005年度山西省出版的196种期刊, 其中, 社科期刊110种、科技期刊86种. 评估结果如下: 一级（优秀）期刊共88种, 其中社科期刊42种, 科技期刊46种, 包括世界胃肠病学杂志和世界华人消化杂志; 二级期刊共103种, 其中社科期刊64种, 科技期刊39种; 三级期刊共5种, 其中社科期刊4种, 科技期刊1种. (中共山西省委宣传部、山西省新闻出版局、山西省科学技术厅 2007-01-30)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月18日; 15(8): 901-904
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

联合应用埃索美拉唑、铝碳酸镁和莫沙比利治疗难治性胃食管反流病

王战波, 陈玲玲, 游旭东

王战波, 陈玲玲, 游旭东, 河南平顶山煤业集团总医院消化内科, 河南省平顶山市 467000
通讯作者: 王战波, 467000, 河南省平顶山市, 河南平顶山煤业集团总医院消化内科. guogh2000@hotmail.com
电话: 0375-2729334
收稿日期: 2006-12-10 接受日期: 2006-12-27

Efficacy of esomeprazole combined with hydrotalcite and mosapride in treatment of refractory gastroesophageal reflux disease

Zhan-Bo Wang, Ling-Ling Chen, Xu-Dong You

Zhan-Bo Wang, Ling-Ling Chen, Xu-Dong You, Department of Gastroenterology, General Hospital of Pingdingshan Coal Group, Pingdingshan 467000, He'nan Province, China
Correspondence to: Zhan-Bo Wang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Pingdingshan Coal Group, Pingdingshan 467000, Henan Province, China. guogh2000@hotmail.com
Received: 2006-12-10 Accepted: 2006-12-27

Abstract

AIM: To evaluate the effect of esomeprazole combined with hydrotalcite and mosapride on refractory gastroesophageal reflux disease (rGERD).

METHODS: A total of 101 rGERD patients were randomly divided into groups A (n = 36), B B (n = 34) and C (n = 31), treated with esomeprazole plus hydrotalcite plus mosapride, esomeprazole plus mosapride, and hydrotacite plus mosapride, respectively. The clinical outcomes were observed and analyzed after 4 and 8 weeks of treatment. Endoscopy was performed to evaluate the effective rate in the three groups.

RESULTS: After 4 weeks of treatment, the total improvement rate was significantly higher in group A (88.9%) than that in group B (79.4%) and C (61.3%) (χ^2 = 7.3531, P < 0.05). Eight weeks after treatment, the total improvement rates were 97.2%, 88.2% and 71.0% in group A, B and C, ,and the effective rates detected by endoscopy were 94.4%, 85.3% and 67.7%, respectively. The total improvement rate (χ^2 = 9.6039, P < 0.01) and effective rate (χ^2 = 8.6496, P < 0.05) were markedly higher in group A than those in B and C group.

CONCLUSION: Esomeprazole combined with hydrotalcite and mosapride may be highly effective in the treatment of rGERD.

Key Words: Gastroesophageal reflux disease; Esomeprazole; Hydrotalcite; Mosapride

Wang ZB, Chen LL, You XD. Efficacy of esomeprazole combined with hydrotalcite and mosapride in treatment of refractory gastroesophageal reflux disease. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(8):901-904

摘要

目的: 探讨联合应用埃索美拉唑、铝碳酸镁和莫沙比利治疗难治性胃食管反流病(r-GERD)的临床疗效.

方法: 101例rGERD患者随机为A (n = 36), B (n = 34)和C组(n = 31), 分别采用埃索美拉唑+铝碳酸镁+莫沙比利、埃索美拉唑+莫沙比利及铝碳酸镁+莫沙比利治疗. 4及8 wk后评价临床症状, 8 wk后评价内镜下有效率.

结果: 治疗4 wk后, A, B和C组临床症状总改善率分别为88.9%, 79.4%和61.3%, A组与B, C两组相比差异显著(χ^2 = 7.3531, P<0.05). 治疗8 wk后, A, B和C组临床症状总改善率分别为97.2%, 88.2%和71.0%, 内镜下有效率分别为94.4%, 85.3%和67.7%, A组临床症状总改善率和内镜下有效率与B, C组相比存在显著性差异(χ^2 = 9.6079, P<0.01; χ^2 = 8.6496, P<0.05).

结论: 埃索美拉唑联合铝碳酸镁和莫沙比利治疗rGERD有很高的临床疗效.

关键词: 胃食管反流病; 埃索美拉唑; 铝碳酸镁; 莫沙比利

■背景资料
临床上部分GERD经第一代PPI治疗4 wk失败, 这类GERD称为难治性GERD(rGERD), 把这一部分患者作为研究对象, 该文重点阐述rGERD的发生原因及探讨临床上有效的治疗方法.

■**创新盘点**
本文系统阐述了rGERD的发病原因, 阐明了埃索美拉唑、铝碳酸镁和莫沙比利联合能从多角度治疗返流性食管炎, 更有效缓解症状及治愈或减轻胃镜下黏膜炎症.

王战波, 陈玲玲, 游旭东. 联合应用埃索美拉唑、铝碳酸镁和莫沙比利治疗难治性胃食管反流病. 世界华人消化杂志 2007;15(8):901-904
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/901.asp

0 引言

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)是胃和(或)十二指肠内容物反流入食管引起烧心、反酸症状或组织损害. 第一代质子泵抑制剂(PPI)如奥美拉唑、兰索拉唑通常可以取得满意疗效[1]. 然而临床观察发现, 部分GERD经第一代PPI治疗4 wk失败, 这类经第一代PPI治疗失败的GERD称为难治性GERD(rGERD)[2]. 我们采用新型质子泵抑制剂埃索美拉唑(商品名耐信, 阿斯利康公司生产)、铝碳酸镁(商品名达喜, 德国拜尔公司生产)和莫沙比利(商品名加斯清, 日本制药株式会社产生)联合治疗rGERD, 获得了较好疗效, 现报告如下.

1 材料和方法

1.1 *材料* 2002-10/2006-08在门诊和住院患者101例, 男53例, 女48例, 年龄29-75(平均47.2)岁. 均有烧心、反酸、胸骨后灼痛等胃食管反流病的症状, 胃镜证实为反流性食管炎, 并排除消化性溃疡、内镜检查疑为恶性病变、有食管及胃手术史及其他疾病者,可致肠道症状的全身性疾病、妊娠及哺乳期妇女也排除在外. 101例均为常规PPI(奥美拉唑20 mg, 每日1次, 或兰索拉唑30 mg每日1次)治疗4 wk失败(症状无缓解)的患者, 再次治疗前均进行症状评分和内镜检查, 症状评分均>8分, 内镜下均有食管炎表现. 内镜检查按洛杉矶标准分级[3]: A级, 黏膜皱壁表面黏膜破损, 直径<5 mm; B级, 黏膜皱壁表面黏膜破损, 直径>5 mm, 病变不融合; C级, 黏膜破损相互融合, 范围不超过食管周经的75%; D级, 黏膜破损相互融合, 并累及食管周经的75%以上. 101例按洛杉矶标准分级均在B级以上(B、C、D级分别为: 58例、34例、9例).

1.2 *方法* 101名患者按随机数字表法随机为分3组, 联合用药组(A组): 埃索美拉唑(20 mg, 每日2次)、铝碳酸镁(1.0 g, 每日3次)和莫沙比利(5 mg, 每日3次); 埃索美拉唑组B组: 埃索美拉唑(20 mg, 每日2次)、莫沙比利(5 mg, 每日3次); 铝碳酸镁组C组: 铝碳酸镁(1.0 g, 每日3次)和莫沙比利(5 mg, 每日3次). 治疗期间禁烟酒、咖啡及辛辣刺激性食物. 症状评估与疗效判断标准: 症状评估参照文献[4], 治疗前后按烧心、反酸、嗳气与胸骨后疼痛的症状严重程度记分. 0分: 没有症状; 1分: 轻度, 患者需提醒方能回忆起有症状; 2分: 中度, 有症状主诉但不影响日常生活; 3分: 重度, 有症状主诉且影响日常生活. 所选101例病例评分均>8分. 症状疗效评定标准[5]. 显效: 症状记分降低>80%; 有效: 症状记分降低>50%; 无效: 症状记分降低<50%. 症状总有效率 = (显效+有效)/总例数×100%. 治疗8 wk后复查胃镜, 痊愈: 食管炎消失; 好转: 改善大于或等于1个级别; 无效: 改善不明显. 同时记录治疗期间出现的任何与用药有关的症状, 治疗前后验血、尿常规及肝肾功能.

统计学处理 计数资料采用卡方(χ^2)检验.

表 1 3组治疗4, 8 wk时临床症状改善情况比较

分组	*n*	治疗时间(wk)	显效数	有效数	无效数	总有效率(%)
A组	36	4	24	8	4	88.9
		8	31	4	1	97.2
B组	34	4	19	8	7	79.4[a]
		8	24	6	4	88.2[b]
C组	31	4	9	10	12	61.3[a]
		8	12	10	9	71.0[b]

[a]$P<0.05$ *vs* A组, [b]$P<0.01$.

表 2 3组治疗8 wk后胃镜下食管炎愈合情况比较

分组	*n*	治愈数	有效数	无效数	总有效率(%)
A组	36	28	6	2	94.4
B组	34	24	5	5	85.3[a]
C组	31	10	11	10	67.7[a]

[a]$P<0.05$ *vs* A组.

2 结果

2.1 *治疗后症状改善情况比较* 3组治疗4, 8 wk时, A组临床症状改善总有效率明显高于B组和C组, 统计学比较有显著性差异($P<0.05$或$P<0.01$, 表1).

2.2 *治疗后症状食管炎愈合情况比较* 3组治疗8 wk时, A组临床有效率明显高于B组和C组, 统计学比较有显著性差异($P<0.05$, 表2).

2.3 *不良反应* A组出现1例轻度腹泻, B组出现2例轻度腹泻, C组出现1例腹泻与1例腹胀, 但均未影响治疗, 治疗前后查血、尿常规及肝肾功能未见异常.

3 讨论

3.1 rGERD*发病原因* rGERD的发病原因尚不十

分清楚, 考虑与以下情况有关: (1)第一代PPI的CYP依赖性代谢和清除及CYP2C19的基因多态性所导致的不同个体抑酸效果的巨大差异有关[6], 导致部分患者抑酸不够充分, 引起治疗失败; (2)有研究认为, 合并重度食管炎或Barrett's食管是主要原因[2]. 本组资料中食管炎程度均为B、C、D级与之相符; (3)与十二指肠胃食管反流有关. 在胃食管反流病过程中, 除胃酸反流外, 十二指肠内容物的反流(特别是胆汁反流)是有一重要因素, 但临床上往往缺乏足够的重视. 关于反流类型有3种, 单纯酸反流、单纯胆汁反流及混合反流, 一般认为混合反流是最常见的反流类型. 文献[7]表明, 混合反流的食管黏膜损伤显著重于单纯性反流, 在混合反流情况下, 酸反流和胆汁反流存在正性协同作用, 张峻 *et al*[8]报告高达41%的GERD患者存在双重反流, 且合并较重的反流性食管炎; (4)与夜间酸突破现象(NAB)有关. NAB是指在应用PPI的情况下夜间(当晚22点时至次日早上8时)胃内pH值<4.0的时间持续超过60 min[9]. NAB与消化性溃疡、反流性食管炎、Barrett's食管等酸相关性疾病的症状及疗效密切相关[10], 其原因可能为夜间质子泵更新激活, 逃逸PPI作用有关, 也可能与肝药酶基因多态性有关[11]; (5)可能与*H pylori*的影响有关. 资料表明[12-13], *H pylori*阳性GERD的患者GERD易复发和有明显的胃窦及胃体炎症, 而*H pylori*造成的胃窦炎症, 可引起延迟胃排空, 促进食管下端括约肌一过性松弛(TLESR)的发生[12], 引起GRED的发生及治疗困难. 相反的意见, *H pylori*阳性GERD有较高的血清胃泌素(Gas)水平[13], 而Gas可以升高食管下端括约肌的作用, 防止反流发生; *H pylori*通过对胃内酸度的改变对食管产生保护作用[12], 其机制: *H pylori*感染导致胃体炎症时胃酸减少和*H pylori*尿素酶分解尿素产生氨中和胃酸, 升高胃内pH值, 减轻反流的胃内容物对食管的损伤. 另外*H pylori*感染可增强PPI的抑酸作用[14]. 目前, *H pylori*在GERD中的作用非常复杂, 两者关系争论颇多, 不进行进一步讨论.

3.2 3种药物的作用机制 埃索美拉唑是第一个单一奥美拉唑S异构体, 也通过细胞色素P450酶同工酶CYP2C19及CYP3A4代谢, 但更多的通过CYP3A4途径. 其特有的光学异构特点、药代动力学特点以及几乎不受CYP3A4基因多态性影响等决定了其抑酸效应明显优于第一代PPI[15], 由于他的左旋异构体优化了其药代动力学CYP2C19依赖性减少, 提高了CYP3A4代谢途径, 增加了药物到达壁细胞水平的浓度, 并减少了机体个体差异, 使其具有抑酸作用起效快, 能持续提高胃内pH值, 抑酸作用更强、更有效、全天维持较高的抑酸水平, 且疗效无明显的个体差异等优势, 故临床效果更加稳定可靠[16], 能迅速更持久的治愈和缓解症状. 而且采用20 mg每日二次服药, 有助于保持稳定的血药浓度, 降低夜间酸反流峰值. 因此, 能有效解决第一代PPI抑酸效果不足, 易受CYP3A4基因多态性影响及夜间酸突破现象等不足. 铝碳酸镁是氢氧化铝、氢氧化镁、碳酸盐和水的化合物, pH值3-5, 其活性成分为水化碳酸氢氧化镁铝, 有独特的层状网络结构, 不仅能直接中和胃酸, 可逆性结合 80%的胃蛋白酶, 还可在酸性环境结合胆汁酸, 抑制卵磷脂的激活, 嚼服后吸附在黏膜表面能迅速缓解症状[17]. 因此, 嚼服铝碳酸镁, 能有效解决胆汁反流问题, 同时中和胃酸及胃蛋白酶, 不仅降低了食管内的酸度, 而且消除混合反流对食管黏膜的协同损伤作用. 莫沙比利是强效选择性5-HT4受体激动剂, 通过兴奋肌间神经丛的5-HT4受体, 刺激乙酰胆碱释放, 从而增强全胃肠动力, 他不仅能直接提高(食管下端括约肌)LES张力, 而且能促进食管蠕动, 加速胃肠排空, 减轻腹压, 抑制饱胀引起的LES张力下降, 能有效防止胃酸、胃蛋白酶及胆汁反流[18].

3.3 疗效评价 本研究病例诊断是采用有典型的GERD症状如: 烧心、反酸、胸骨后疼痛等及内镜下通用的洛杉矶分级为标准, 毕竟pH检测、压力测定及核素法条件要求较高或患者依从性差, 难于普及. 根据反流性食管炎诊断及治疗指南(2003年): 消化内镜是的主要诊断方法, 目前消化内镜检查基本普及, 方法简便易行. 本组资料显示, 3组治疗4 wk后症状已改善, 随着用药时间的延长, 效果越来越明显, 达8 wk时均有较好疗效. 其中A组联合应用埃索美拉唑、铝碳酸镁和莫沙比利能从多角度治疗反流性食管炎, 更有效缓解症状及治愈或减轻胃镜下黏膜炎症, A组在治疗4, 8 wk症状改善总有效率及8 wk时胃镜下改善总有效率分别为88.9%, 97.2%, 94.4%, 明显高于B组和C组. 说明3种药联合应用治疗难治性胃食管反流病, 有很高的症状、内镜下炎症的改善率和治愈率, 疗效高于埃索美拉唑组或铝碳酸镁组, 在治疗过程中所有患者未发现严重不良反应, 安全性高. 因此, 联合应用埃索美拉唑、铝碳酸镁和莫沙比利是治疗难治性胃食管反流病的良好选择, 并值得早期应用于较重反流性食管炎的治疗.

■名词解释

1 CYP2C19: 是血红蛋白超家族基因编码的细胞色素P450酶系中的一种同功酶,主要存在于肝微粒体中, 基本固定位于10号染色体上(-10a24.1-24.3), 其基因多态性与质子泵抑制剂在酸相关疾病治疗中的有效性和安全性的关系已明确.

2 夜间酸突破现象(NAB): 是指在应用质子泵抑制剂(PPI)的情况下夜间(当晚22点时至次日早上8时)胃内pH值<4.0的时间持续超过60 min.

■同行评价
本文进行了联合应用埃索美拉唑、铝碳酸镁和莫沙比利治疗难治性食管反流病的临床研究, 方法合理, 结果可信, 具有一定的临床指导意义.

4 参考文献

1 Adachi K, Hashimoto T, Hamamoto N, Hirakawa K, Niigaki M, Miyake T, Taniura H, Ono M, Kaji T, Suetsugu H, Yagi J, Komazawa Y, Mihara T, Katsube T, Fujishiro H, Shizuku T, Hattori S, Yamamoto S, Kinoshita Y. Symptom relief in patients with reflux esophagitis: comparative study of omeprazole, lansoprazole, and rabeprazole. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 1392-1398

2 郜元军, 吴清明, 王小虎, 谢国建. 雷贝拉唑治疗难治性胃食管反流病的临床研究. 临床内科杂志 2005; 22: 493-494

3 叶任高, 陆再英. 内科学. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 369-373

4 林金坤, 陈湖, 李初俊, 林丽莉, 任明, 朱雪茵. 兰索拉唑治疗胃食管反流病的临床研究. 新医学 1998; 29: 410-412

5 兰索拉唑临床协作组. 兰索拉唑治疗反流性食管炎多中心临床观察. 中华消化杂志 1999; 19: 243-245

6 Inamori M, Togawa J, Takahashi K, Yoneda M, Fujisawa N, Iwasaki T, Ozawa Y, Kikuchi T, Muramatsu K, Chiguchi G, Matsumoto S, Kawamura H, Abe Y, Kirikoshi H, Kobayashi N, Sakaguchi T, Takamura T, Nakajima A, Ueno N, Sekihara H. Comparison of the effect on intragastric pH of a single dose of omeprazole or rabeprazole: which is suitable for on-demand therapy? *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 1034-1038

7 姜佳丽, 王虹, 王敏丽, 王天佑, 毕春山, 刘宾. 反流性食管炎的临床研究. 中华内科杂志 2002; 41: 822-824

8 张峻, 杨昭徐. 酸反流与胆汁反流在胃食管反流病中的作用. 胃肠病学 2000; 5: 207-210

9 李骢, 姜铀, 姜妙娜, 张善红, 李艳静, 姜春萌, 贾玉杰. 老年十二指肠溃疡患者夜间酸突破现象治疗方案研究. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2514-2517

10 Katsube T, Adachi K, Kawamura A, Amano K, Uchida Y, Watanabe M, Kinoshita Y. *Helicobacter pylori* infection influences nocturnal gastric acid breakthrough. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 1049-1056

11 刘登洋, 周雨峡, 陈百芳. 联合应用雷贝拉唑、铝碳酸镁和莫沙比利治疗反流性食管炎近期疗效分析. 现代消化及介入诊疗 2005; 10: 143-145

12 黎世尧, 杨杰. 胃食管反流病的药物治疗. 临床内科杂志 2005; 22: 68-69

13 吴灵飞, 王炳周, 冯家琳, 郑宗茂, 张金池, 曾哲. 胃食管反流病与幽门螺杆菌相关性胃炎及胃肠激素的关系. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1100-1103

14 周惠萌, 范欣敏. 胃十二指肠疾病与幽门螺杆菌感染的相关性分析. 世界华人消化杂志 2004; 12: 497-498

15 牛春燕, 罗金燕, 王学勤, 朱有玲. CYP2C19基因多态性对埃索美拉唑抑酸效应的影响. 西安交通大学学报(医学版) 2004; 25: 487-489

16 郝云龙, 毛兆明, 范例. 埃索美拉唑联合莫沙比利治疗反流性食管炎疗效观察. 武警医学 2005; 16: 259-261

17 Watters KJ, Murphy GM, Tomkin GH, Ashford JJ. An evaluation of the bile acid binding and antacid properties of hydrotalcite in hiatus hernia and peptic ulceration. *Curr Med Res Opin* 1979; 6: 85-87

18 Yoshida N. Pharmacological effects of the gastroprokinetic agent mosapride citrate. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1999; 113: 299-307

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 •

世界华人消化杂志在线办公系统

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月18日; 15(8): 905-908
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

胸腔胃–气道瘘的临床表现与螺旋CT诊断

韩新巍, 吴 刚, 赵 明, 马 骥, 管 生, 水少锋, 马 南, 王艳丽

韩新巍, 武汉华中科技大学生物医学工程研究所 湖北省武汉市 430074
吴刚, 赵明, 马骥, 管生, 水少锋, 马南, 王艳丽, 郑州大学第一附属医院放射科 河南省郑州市 450052
通讯作者: 韩新巍, 450052, 河南省郑州市建设东路1号, 郑州大学第一附属医院放射科. hanxinwei2006@163.com
电话: 0371–65165352 传真: 0371–66913623
收稿日期: 2006–11–22 接受日期: 2007–01–10

Clinical manifestations and computed tomography diagnosis for thoracostomach-airway fistula

Xin-Wei Han, Gang Wu, Ming Zhao, Ji Ma, Sheng Guan, Shao-Feng Shui, Nan Ma, Yan-Li Wang

Xin-Wei Han, Institute of Biomedical Engineering, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, Hubei Province, China
Gang Wu, Ming Zhao, Ji Ma, Sheng Guan, Shao-Feng Shui, Nan Ma, Yan-Li Wang, Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Correspondence to: Xin-Wei Han, Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. hanxinwei2006@163.com
Received: 2006-11-22 Accepted: 2007-01-10

Abstract

AIM: To analyze the clinical manifestations and spiral computed tomography (CT) signs of thoracostomach-airway fistula (TSAF).

METHODS: The clinical manifestations and spiral CT signs were analyzed in 23 patients with TSAF.

RESULTS: The main clinical manifestations of TSAF were irritative choke after drinking or eating, fever, stubborn pulmonary infection, dyspnea, tachycardia and becoming thin, etc. The site and size of TSAF were shown exactly in 20 patients by spiral CT. According to spiral CT, the pulmonary infection and particular anatomic structures between the fistula and its adjoining air passage in details could be observed, and the inner diameters of the trachea and main bronchi could be measured.

CONCLUSION: TSAF has distinctive clinical manifestations. CT is a non-invasive and non-stimulative examination for TSAF.

Key Words: Stomach; Trachea; Bronchus; Fistula; Clinical manifestation; Computed tomography

Han XW, Wu G, Zhao M, Ma J, Guan S, Shui SF, Ma N, Wang YL. Clinical manifestations and computed tomography diagnosis for thoracostomach-airway fistula. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(8):905-908

摘要

目的: 探讨胸腔胃-气道瘘的临床与螺旋CT表现, 提高人们对本病的认识.

方法: 回顾性分析23例具有完整临床资料的胸腔胃-气道瘘的临床表现和螺旋CT征象.

结果: 胸腔胃-气道瘘主要临床表现为烧灼样刺激性呛咳、发热、顽固性肺部感染、呼吸困难、心动过速、消瘦等; 20例(87%)胸部螺旋CT直接显示胸腔胃-气道瘘的瘘确切位置、瘘口大小以及瘘与气道的毗邻关系, 并且能够观察肺部感染和测量气管、主支气管的内径.

结论: 胸腔胃-气道瘘具有特征性临床表现, 螺旋CT是一种无创伤性、无刺激性检查确诊手段, 并为下一步制定治疗方案提供详细资料.

关键词: 胃; 气管; 支气管; 瘘; 临床表现; 计算机断层成像技术

韩新巍, 吴刚, 赵明, 马骥, 管生, 水少锋, 马南, 王艳丽. 胸腔胃–气道瘘的临床表现与螺旋CT诊断. 世界华人消化杂志 2007;15(8):905–908
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/905.asp

■**背景资料**
各种原因引起胸腔内之胃腔与气道之间相互沟通即形成胸腔胃-气道瘘. 本病严重威胁患者生命, 预后极差, 临床医生对本病缺乏认识, 常漏诊或误诊为食管-气管瘘、误咽和放射性肺炎而贻误治疗. 该文通过对23例胸腔胃-气道瘘临床资料整理、分析、总结, 详细描述了胸腔胃-气道瘘的特征性临床表现和螺旋CT征象, 提高临床医生对该病的认识.

0 引言

食管癌广泛切除、胃上提胸腔内行主动脉弓上或颈部吻合术后, 胸腔胃走行于后纵隔原食管床区与气管、隆突和主支气管相互毗邻并黏连

■应用要点
本文详细描述了胸腔胃-气道瘘的特征性临床表现和CT征象, 能够提高临床医生对该病的认识, 减少误诊或漏诊率. 早期诊断, 及时治疗, 提高患者生活质量, 延长患者生命.

机化为一体, 肿瘤复发、放射损伤、感染、缺血、胃溃疡等原因引起胃壁和气道壁破坏, 胸腔内之胃腔与气道之间相互沟通即形成胸腔胃-气道瘘[1-2]. 目前, 临床医生对本病缺乏认识, 常漏诊或误诊为食管-气管瘘、误咽和放射性肺炎而贻误治疗导致严重后果. 胸腔胃-气道瘘曾认为是食管癌切除后的罕见并发症, 但严重威胁生命, 预后极差[3-4]; 随着手术后立体放射治疗如X刀、γ刀或适形调强的大量应用, 本病日渐增多. 我们对接诊的23例胸腔胃-气道瘘临床资料进行整理分析, 以提高对本病的认识.

1 材料和方法

1.1 材料 2003-12-04/2006-08-10连续收治胸腔胃-气道瘘23例, 男18例, 女5例, 年龄41-75(平均58.5±4.1)岁. 患者全部为食管癌切除术后食管、胃弓上或颈部吻合, 胸腔胃走行于后纵隔原食管床区. 以烧灼样刺激性呛咳、平卧位呛咳加重、坐立位呛咳减轻, 和呼吸困难为主述就诊; 患者呈强迫性坐立位、前倾位或半坐位而不敢平卧. 食管癌切除术至出现呛咳的时间为1-25(平均12.15±7.19)mo. 本组病例均经上消化道造影、纤维胃镜和纤维支气管镜检查证实.

1.2 方法 SCT常规轴位胸部扫描, 层厚10 mm, 螺距为1, 纵隔窗窗宽350-400 HU、窗位40 HU, 肺窗窗宽1000 HU、窗位-700 HU. 必要时瘘口部位3 mm薄层扫描, 调整为大宽窗低窗位的特殊软组织窗(脂肪窗: 窗宽400-500 HU、窗位-100 HU)以便清楚显示软组织层次结构和瘘口与瘘道.

2 结果

2.1 胸腔胃-气道瘘主要临床表现 (1)烧灼样刺激性呛咳: 全部病例均有难以忍受的烈火般烧灼样刺激性呛咳. 进食水后剧烈呛咳, 但单纯禁食水无法制止呛咳; 坐立位呛咳减轻或缓解, 卧位时呛咳更为剧烈并明显加重呈火焰般烧灼样, 患者昼夜强迫坐立体位或半坐位, 不敢平卧. 20例采取禁食水、胃腔插管负压抽吸减压可明显减轻呛咳症状; (2)发热: 20例体温不同程度的增高, 体温在37.5-39.1℃之间; 1例体温基本正常, 但是白细胞13.9×10^9/L, 提示仍有感染; (3)顽固性肺部感染: 咳嗽, 咯痰, 痰液量多, 每天可达上百乃至上千毫升, 淡黄色, 痰液经气道咳出, 具有火焰般烧灼样刺激. 抗菌消炎、禁食禁水、祛痰止咳、营养支持等内科保守治疗对抑制呛咳和肺部炎症均无效; (4)呼吸困难: 7例需持续低流量吸氧, 16例活动后呼吸困难、心慌、胸闷; (5)心动过速: 本组患者心率在102-140次/分, 部分伴有心肌缺血、心律不齐; (6)营养衰竭: 患者精神差、乏力、萎靡不振、消瘦.

2.2 胸部螺旋CT表现 胸部螺旋CT均显示范围不等楔形或不规则形大叶型肺实变, 内见含气支气管征, 其中2例合并双侧胸腔积液, 1例左侧胸腔积液. 15例肺窗显示, 两肺内可见多发小斑片状淡薄高密度影, 边缘模糊, 与周围分界不清, 以两下肺为著; 4例左下肺内可见多发小斑片状高密度影, 边缘模糊, 与周围分界不清; 2例右下肺内可见多发小斑片状高密度影, 边缘模糊, 与周围分界不清; 1例纵隔窗显示, 左下肺高密度的钡剂沉积影; 1例两肺弥漫性钡剂坠积者肺窗显示, 两肺野斑片状高密度影, 其周围密度稍低, 边缘模糊, 纵隔窗显示多发小点状高密度影.

20例(87%)胸部螺旋CT纵隔窗直接显示胸腔胃之胃腔内气体影与气道内之气体影相互沟通, 其间的的正常胃壁和气道壁软组织影消失(图1A-D). 即清晰而直观的显示胃-气道瘘的瘘口与瘘道, 明确瘘的确切位置、瘘口大小以及瘘与气道的毗邻关系. 胃腔与气管下段相交通5例(图1A), 胃腔与气管隆突后壁相交通6例(图1B), 胃腔与左主支气管相交通5例(图1C), 胃腔与右主支气管相交通4例(图1D); 3例(13%)胃-气管瘘患者因瘘口细小扭曲而未能显示. 瘘口直径5-15 mm, 瘘道长2-8 mm.

3 讨论

胃具有自主性分泌功能, 进食与否, 每天均有一定量的胃液产生. 含有大量消化酶的酸性胃液通过瘘口溢入碱性环境的气道和肺内, 产生化学性、腐蚀性、消化性肺炎和继发肺部感染, 因此, 患者出现火焰般烧灼样刺激性呛咳. 平卧位由于胃液更容易由胃腔内溢入气道和肺内而加剧刺激性呛咳症状, 坐位、前倾位或半坐位时胃液沉积于瘘口以下之胃腔内使呛咳减轻, 患者往往呈强迫坐位或半坐位. 我们将胸腔胃-气道瘘出现的剧烈如烈火或火焰般烧灼样刺激性呛咳、平卧位和进食水后加重和腐蚀性肺炎称之为“卧位烧灼样呛咳综合征”, 为胸腔胃-气道瘘特征性临床症状(烧灼样刺激性呛咳、平卧位呛咳或呛咳加重、坐立位呛咳减轻或消失、呼吸困难、下肺呈肺叶或肺段性大叶样实变). 胃腔负压抽吸减压后呛咳减轻或消失, 抗酸

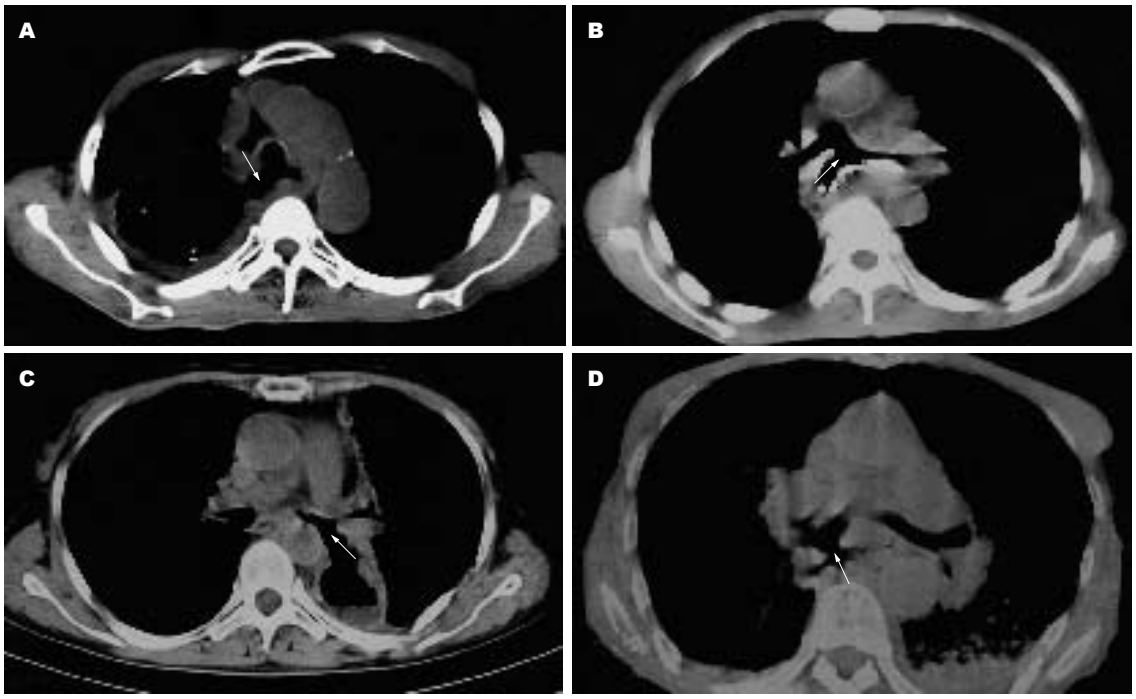


图 1 胸腔胃胸部螺旋CT表现. A: 气管瘘; B: 隆突瘘; C: 左主支气管瘘; D: 右主支气管瘘.

■名词解释

1 胸腔胃-气道瘘: 食管癌广泛切除、胃上提胸腔内行主动脉弓上或颈部吻合术后, 胸腔胃走行于后纵隔原食管床区与气管、隆突和主支气管相互毗邻并黏连机化为一体, 肿瘤复发、放射损伤、感染、缺血、胃溃疡等原因引起胃壁和气道壁破坏, 胸腔内之胃腔与气道之间相互沟通.

2 卧位烧灼样呛咳综合征: 剧烈如烈火或火焰般烧灼样刺激性呛咳、平卧位和进食水后加重、腐蚀性肺炎、呼吸困难、下肺呈肺叶或肺段性大叶样实变, 为胸腔胃-气道瘘特征性临床症状.

治疗也可缓解呛咳症状, 肺部炎症或呼吸困难单纯抗感染治疗无效, 肺大叶样实变内可见含气支气管征.

根据瘘口与气道相通的具体部位可将“卧位烧灼样呛咳综合征”分为4型: (1)胸腔胃-气管瘘: 胸腔胃之胃腔与气管相交通; (2)胸腔胃-隆突瘘: 胸腔胃之胃腔与隆突区气道相交通; (3)胸腔胃-左主支气管瘘: 胸腔胃之胃腔与左主支气管相交通; (4)胸腔胃-右主支气管瘘: 胸腔胃之胃腔与右主支气管相交通. 胸腔胃-气道瘘的分型对于指导治疗具有重要的临床意义[5-7].

螺旋CT检查无创伤、无刺激性、不使用对比剂、不加剧肺部感染, 无重叠结构, 空间分辨率高, 能够准确测量数据, 多窗位观察分析处理图像, 气体与纵隔软组织间的巨大密度差, 形成鲜明对比图像, 并可进行三维重建、立体成像. 螺旋CT不但能够直接显示瘘口和瘘道的大小、位置, 更加清楚的显示肺部感染部位、严重程度, 而且能够显示瘘口与气道相交通的具体位置, 测量气管、支气管的内径和长度, 便于订做气道覆膜内支架以封堵瘘口[8-10]. 另外, 螺旋CT还可以判断有无肺部转移以及其他病变等重要价值. 由于CT的部分容积效应, 严重消瘦患者气管壁与胸腔胃之胃壁菲薄而紧密相贴时, 纵隔窗观察易于误诊为胸腔胃与气道相交通而出现假阳性, 常规肺窗则可遗漏小的瘘口而出现假阴性, 而通过后处理技术调整为大宽窗低窗位的特殊软组织窗(脂肪窗)能够清楚显示软组织和瘘口、瘘道, 准确显示瘘口的大小, 与气道相通的具体位置. 本文20/23(87%)瘘口在螺旋CT胸部平扫中得以明确诊断. 3/23(13%)小瘘口而漏诊, 漏诊原因为瘘口细小, 火瘘口扭曲, 或CT扫描时瘘口水肿, 或瘘道被黏稠分泌物堵塞, 或扫描层面相对过厚. 若采用薄层2-3 mm扫描, 或扫描前使用激素消除水肿, 或多窗宽后处理有可能显示细小瘘口. 肺窗显示, 气道壁与胸腔胃壁的总厚度为7-10 mm, 纵隔窗显示, 气道壁与胸腔胃壁的厚度为2-4 mm, 特殊软组织窗显示3-5 mm. 肺窗显示, 瘘口直径较实际偏小2-4 mm, 纵隔窗显示, 瘘口偏大2-3 mm, 而特殊软组织窗能够准确显示瘘口的大小. 临床怀疑胸腔胃-气道瘘者, 采取多窗位和特殊软组织窗观察能够提高CT诊断的准确性.

总之, 食管癌切除行食管-胃弓上或颈部吻合, 出现烧灼样刺激性呛咳, 尤其与进食无关的平卧位烧灼样呛咳加重, 坐立位或半坐位减轻时, 应高度怀疑“卧位烧灼样呛咳综合征”. 螺旋CT扫描是值得广泛应用的诊断“卧位烧灼样呛咳综合征”即胸腔胃-气道瘘的一项理想技术, 如何改善检查技术、提高微小瘘的正确诊断率尚需进一步研究.

4 参考文献

1 Miwa K, Takamori S, Hayashi A, Shirouzu K.

■同行评价
本文提供了胸腔胃-气道瘘临床与螺旋CT表现的临床经验，新颖度高，其结论有较大的临床指导意义.

Gastrobronchial fistula after esophagectomy. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004; 25: 460

2 韩新巍, 吴刚, 李永东, 高雪梅, 杨瑞民, 李天晓, 马南, 王艳丽. 覆膜内支架置入气道治疗胸腔胃−气道瘘. 郑州大学学报(医学版) 2004; 39: 71-73

3 Barcons M, Betbese A, Perez M, Vallverdu I, Net A, Mancebo J. Gastrobronchial fistula: report of an unusual case. *Intensive Care Med* 1996; 22: 271-272

4 Koichi Nagata, Yoshito Kamio, Tamaki Ichikawa, Mitsutaka Kadokura, Akihiko Kitami, Shungo Endo, Haruhiro Inoue, Shin-Ei Kudo. Congenital tracheoesophageal fistula successfully diagnosed by CT esophagography. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1476-1478

5 Okuyama M, Saito R, Motoyama S, Kitamura M, Ogawa J. Histological confirmation of healing of gastrobronchial fistula using a muscle flap. *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 1298-1299

6 Yang HS, Zhang LB, Wang TW, Zhao YS, Liu L. Clinical application of metallic stents in treatment of esophageal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 451-453

7 Aguilo Espases R, Lozano R, Navarro AC, Regueiro F, Tejero E, Salinas JC. Gastrobronchial fistula and anastomotic esophagogastric stenosis after esophagectomy for esophageal carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 127: 296-297

8 韩新巍, 吴刚, 高雪梅, 李永东, 王艳丽, 马南. 气管−主支气管覆膜分支状内支架的设计及初步应用. 介入放射学杂志 2004; 13: 253-255

9 Li YD, Li MH, Han XW, Wu G, Li WB. Gastrotracheal and Gastrobronchial Fistulas: Management with Covered Expandable Metallic Stents. *J Vasc Interv Radiol* 2006; 17: 1649–1656

10 庞志锋, 庞岩, 汪洋. 椭圆形带膜记忆合金支架动物实验及治疗上段食管气管瘘25例. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1474-1476

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 •

2007年国际会议

Meeting 42nd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver
11–15 April 2007
Barcelona
easl2007@easl.ch
www.easl.ch/liver-meeting/

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

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

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

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

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月18日; 15(8): 909-912
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

二十岁以下慢性HBV感染者HBV DNA与HBeAg的定量关系

吴殿磊, 徐光华, 冯继红, 樊 霞, 苗乃周, 刘晓斌, 陈天艳, 张树林

吴殿磊, 徐光华, 冯继红, 延安大学附属医院感染病科 陕西省延安市 716000
樊霞, 延安大学医学院卫生统计学教研室 陕西省延安市 716000
苗乃周, 延安大学医学院组胚教研室 陕西省延安市 716000
刘晓斌, 延安大学医学院医技系检验教研室 陕西省延安市 716000
陈天艳, 张树林, 西安交通大学医学院第一附属医院感染病科 陕西省西安市 710061
通讯作者: 徐光华, 716000, 陕西省延安市, 延安大学附属医院感染病科. yaxugh@yahoo.com.cn
电话: 0911-2881196
收稿日期: 2006-11-23 接受日期: 2007-01-20

Correlation between hepatitis B virus DNA levels and HBeAg quantity in patients under 20 years old with chronic hepatitis B virus infection

Dian-Lei Wu, Guang-Hua Xu, Ji-Hong Feng, Xia Fan, Nai-Zhou Miao, Xiao-Bin Liu, Tian-Yan Chen, Shu-Lin Zhang

Dian-Lei Wu, Guang-Hua Xu, Ji-Hong Feng, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi Province, China
Xia Fan, Department of Health Statistics, Medical College of Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi Province, China
Nai-Zhou Miao, Department of Histology and Embryology, Medical College of Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi Province, China
Xiao-Bin Liu, Department of Laboratory Medicine and Biotechnology, Medical College of Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi Province, China
Tian-Yan Chen, Shu-Lin Zhang, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an jiaotong University, Xian 710061 shaanxi province China
Correspondence to: Guang-Hua Xu, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi Province, China.
yaxugh@yahoo.com.cn
Received: 2006-11-23 Accepted: 2007-01-20

Abstract

AIM: To investigate the relationshipt between hepatitis B virus (HBV) DNA contents and HBeAg quantity in HBV-infected patients under 20 years old.

METHODS: The serum HBV DNA contents and HBeAg quantity in 339 patients (age 1-20) with chronic HBV infection were examined by real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR) and time-resolved fluoroimmunoassay (TRFIA) respectively, and the level of anine aminotransferase (ALT) was detected by rate method.

RESULTS: The patients with HBV DNA contents more than 10^5 copies/mL, HBeAg quantity more than 0.3 NCU/mL, and normal ALT level accounted for 92.3% of the total cases. Positive correlation (r = 0.769, P < 0.001) and linear regression (b = 0.32, R^2 = 0.59, P < 0.001) existed between HBV DNA contents (on a log scale) and HBeAg quantity in the patients under 20 years old.

CONCLUSION: Serum HBV DNA contents and HBeAg quantity are changed simultaneously in HBV-infected patients under 20 years old, except in quite a few cases, so combined examination of HBV DNA and HBeAg may help to evaluate the state of chronic HBV infection more exactly.

Key Words: Patients under 20 years old; Chronic hepatitis B virus infection; Hepatitis B virus DNA; HBeAg; Correlation

Wu DL, Xu GH, Feng JH, Fan X, Miao NZ, Liu XB, Chen TY, Zhang SL. Correlation between hepatitis B virus DNA levels and HBeAg quantity in patients under 20 years old with chronic hepatitis B virus infection. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(8):909-912

摘要

目的: 探讨20岁以下慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染者血清中HBV DNA、乙型肝炎病毒e抗原(HBeAg)定量之间关系.

方法: 用实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)及时间分辨荧光免疫分析(TRFIA)技术检测339例(1-20岁)慢性HBV感染者血清中HBV DNA、HBeAg含量, 用速率法检测ALT水平.

■背景资料
关于HBV DNA与HBeAg关系研究的学术文章非常多, 得到的结论基本上都是: 慢性乙肝病毒感染者血清中HBV DNA与HBeAg之间存在良好的相关性, 随着对慢性乙肝病毒感染自然史的不断深入了解及对HBeAg阴性慢性乙肝病毒感染研究的深入, HBeAg研究方法已由定性发展到定量, 对于上述结论有必要重新探讨认识.

■**创新盘点**
本文在慢性乙肝病毒感染自然史的背景下，分不同年龄段采用定量分析技术，分别阐明不同年龄阶段检测结果特点的分布构成状况，并对不同年龄段HBV DNA定量与HBeAg定量进行直线相关分析.

结果: HBeAg定量>0.3 NCU/mL、HBV DNA定量>10^5 copies/mL、而ALT水平正常者占总检测病例的92.3%; HBV DNA定量(对数值)与HBeAg定量之间存在正相关关系(r = 0.769, P <0.001)和线性回归关系(b = 0.32, R^2 = 0.59, P <0.001).

结论: 20岁以下慢性HBV感染者血清中HBV DNA水平与HBeAg水平存在同时消长的关系，但是有极少患者例外. HBV DNA定量与HBeAg定量两种检测方法相结合应能够更客观地反映患者HBV感染状况，二者具有互补性.

关键词: 20岁以下患者; 慢性HBV感染; HBV DNA; HBeAg

吴殿磊, 徐光华, 冯继红, 樊霞, 苗乃周, 刘晓斌, 陈天艳, 张树林. 二十岁以下慢性HBV感染者HBV DNA与HBeAg的定量关系. 世界华人消化杂志 2007;15(8):909-912
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/909.asp

0 引言

乙型肝炎是全球性公共卫生问题，我国是乙型肝炎高流行区. 随着分子生物学技术，荧光免疫技术的发展，乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸(HBV DNA)及乙肝血清标志物检测已由过去的定性发展到定量. 特别是近年来发展起来的HBV DNA的实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)及乙肝血清标志物时间分辨荧光免疫分析技术(TRFIA)，以其高度的灵敏性、特异性、精确性以及操作简单，时间短，不易污染，自动化程度高等优点逐步广泛应用于临床. 我们应用FQ-PCR、TRFIA技术，平行检测339例(1-20岁)慢性HBV感染者血清中的HBV DNA含量，乙肝血清标志物定量；并对照患者的肝功能，以探讨20岁以下慢性HBV感染者血清HBV DNA含量与乙肝血清标志物中HBeAg定量的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 本院2005-06/2006-09门诊慢性HBV感染者共339例，男206例，女133例，年龄1-20(平均10.2±6.13)岁. 所有患者无使用抗病毒药物病史，无合并其他肝炎病毒感染. 诊断符合2005-12北京公布的《乙型肝炎防治指南》中的诊断标准. 美国PE公司Gene AmP5700定量基因检测系统和1235 Auto DELFIA全自动时间分辨荧光免疫分析系统；日立7600全自动生化分析仪. 乙型肝炎病毒核酸荧光检测试剂盒，由中山大学达安基因诊断中心提供；时间分辨荧光免疫分析乙肝血清标志物定量检测试剂盒，由苏州新波生物技术有限公司提供；ALT相关试剂，由北京九强生物技术有限公司提供.

1.2 方法 取患者当日空腹血，分为3管，分别作HBV DNA定量，乙肝血清标志物定量，ALT检测. 操作严格按说明书进行. 根据试剂说明和结合本实验室的具体情况规定检测诊断标准，检测诊断标准见表1.

统计学处理 所有数据以mean±SD表示. 用SPSS13.0统计软件进行直线相关和线性回归分析.

2 结果

2.1 检测结果构成情况 339例慢性HBV感染者中，HBV DNA定量(取对数值下同)>5 copies/mL(6.83±0.68 copies/mL)，同时HBeAg定量>0.3 NCU/mL(1.37±0.33 NCU/mL)，而ALT水平于正常范围的病例为313例，占总病例数的92.3%；12例ALT值>80 U/L(142.9±46.4 U/L)；3例患者：ALT水平正常，HBV DNA检测是阴性，而HBeAg定量>0.5 NCU/mL(1.03±0.105 NCU/mL)；2例ALT水平正常，HBeAg定量在正常范围，而HBV DNA检测值>5 copies/mL(6.05±0.113 copies/mL)；HBV DNA定量<3 copies/mL，同时HBeAg，定量<0.03 NCU/mL，且ALT水平于正常范围的有9例(表2).

2.2 相关性分析 患者血清HBV DNA含量与HBeAg定量，二者存在正相关关系(r = 0.769 P<0.001)和线性回归关系(b =0.32, R^2 = 0.59 P<0.001)(图1).

3 讨论

FQ-PCR是一种新的基因检测技术，本技术是在定性PCR基础上增加了一条荧光探针，标记有荧光报告基团(R)和荧光淬灭基团(Q)，当荧光探针保持完整时，R的荧光信号被Q所淬灭，在PCR反应中，Taq酶将探针切断时，R释放出荧光信号，每切断一条探针，相应就有一条核酸链复制，同时释放出一个单位的荧光集团，通过计算机采用光电技术将荧光信号强弱量化，从而反映分析物HBV DNA的含量[1]. FQ-PCR的整个操作过程仅需开盖一次，克服了定性PCR易污染，假阳性率高等不足. 检测的灵敏性、特异性、精确性高，可以客观准确的反映机体HBV的感染及复制状况[2]. 目前已广泛应用于临床实践，并成

表 1 HBeAg, HBV DNA检测诊断标准

升高水平	HBV DNA (copies/mL)	HBeAg (NCU/mL)
阴性	$<10^3$	<0.03
阳性	$>10^3$	>0.03
低水平升高	10^3–10^5	0.12–0.5
中等水平升高	10^5–10^8	0.5–2.0
高水平升高	$>10^8$	2.0–8.0

表 2 总样本检测结果构成表

n	HBV DNA (copies/mL)	HBeAg (NCU/mL)	ALT (U/L)	%
313	>5	>0.3	<80	92.3
3	<3	>0.5	<80	0.88
2	>5	<0.03	<80	0.59
12	>5	>0.3	>80	3.53
9	<3	<0.03	<80	2.65

为病毒学、细菌学、病因病理学等基础研究的重要工具.

TRFIA是用三价稀土离子及其螯合剂作为示踪物, 如铕(Eu^{3+})、铽(Te^{3+})、及钐(Sm^{3+})、镝(De^{3+})等代替传统的荧光物质, 放射性同位素, 酶和化学发光物质, 来标记抗体、抗原、多肽、激素、核酸探针及生物素. 待反应体系发生后, 用时间分辨荧光仪测定最后产物中的荧光强度, 根据荧光强度和相对荧光强度比值, 判断反应体系中分析物的浓度, 达到定量分析的目的[3]. 稀土离子螯合物具有荧光衰变时间长; 激发光与发射光的Stokes位移(激发光与发射光波相差)大及被激发的荧光光谱极窄; 荧光激发波长范围宽; 为原子标记, 体积很小等特点. 使TRFIA集酶标记, 同位素标记技术的优点于一身, 具有灵敏度高[4], 特异性强, 稳定性好, 标记制备简便, 储存时间长, 无放射性污染, 检测重复性好, 操作流程短, 标准曲线范围宽和应用范围广泛等优点[5-6], 其灵敏度大大的超过了放射免疫分析技术, 是目前配基结合分析中最有发展前途的一项超微量检测手段. 已逐步在临床实践中推广.

HBV DNA是乙型肝炎病毒的分子生物学标记, HBV DNA的存在是HBV复制和传染性的直接标志[2,7-8]. HBeAg同样被视为HBV复制与传染的标志而且是重要的免疫耐受因子[7-8], 大部分情况下血清中HBeAg中、高浓度存在表示患者处于高感染低应答期. HBeAg消失而抗HBe产生称为血清转换. 转换过程通常意味着机体由免疫耐受转为免疫激活. HBeAg致机体的免疫耐受作用是HBV适应、生存及繁衍的一种重要保护

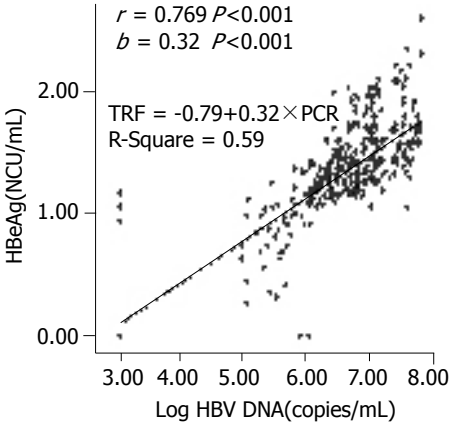


图 1 HBV DNA定量与HBeAg定量的正相关及线性回归关系.

手段. 我们的研究表明: 青少年和小儿慢性HBV感染者血清中HBV DNA含量与HBeAg定量之间存在正相关关系和线性回归关系. 本研究结果与Hussain *et al*[9]研究报导基本一致. 不同的是以往研究未将研究对象按年龄区分[10]; HBeAg研究方法多是定性而非定量; 未用线性回归关系分析进一步阐明二者间量的关系. 我们发现, HBV DNA定量对数值每升高1 copy/mL, HBeAg定量随之平均升高0.32 NCU/mL.

研究发现, 339例总样本中, HBV病毒复制活跃, (HBV DNA定量升高, HBeAg定量升高), 而ALT水平正常的病例为313例占总病例数的92.3%. Lok *et al*[11]认为, 慢性乙肝自然史分为4个不同时期: 免疫耐受期、免疫清除期、非活动期、复发期. 免疫耐受期的特点是: HBV DNA滴度较高, HBeAg(+), 而ALT水平正常, 组织学无明显异常. 我们的研究发现与上述观点是一致的. 青少年和小儿免疫系统发育尚未完善, 加上HBeAg免疫耐受因子的作用, HBV感染时机体处于免疫耐受状态, 而乙肝的发生与免疫清除损害明显相关(Ishikawa *et al*[12]、Chisari *et al*[13]研究认为, 乙型肝炎的发生与患者自身的免疫清除损害明显相关, 与HBV的直接作用无明显相关性. 如: 致敏T细胞清除机体HBV的同时也损伤了肝细胞[14]). 此时肝脏无损害或损害轻微尚达不到肝炎水平, 称为HBV携带状态, 通常具有较强的感染性. 这一时期, 目前尚缺乏有效的治疗药物与治疗方法, 需动态监测, 在ALT升高>正常值上限两倍时(排除 劳累、熬夜、饮酒, 损害肝脏药物及其他因素或疾病所至ALT升高, 也应排除因应用降酶药物后ALT暂时性正常)、即视为其免疫清除发动(激活)的开始. ALT持续或间断升高, 超过6 mo, 在其自身不能自发进行HBeAg

■应用要点

研究发现, 20岁以下慢性HBV感染者血清中HBV DNA与HBeAg定量之间存在正相关关系, 而20岁以上慢性乙型肝炎患者血清中HBV DNA与HBeAg定量之间不一定存在明显正相关关系. 本文发现20岁以上小三阳的慢性乙型肝炎患者中HBV DNA定量明显升高者超过30%, 必将为以后的研究提供新的思路和方法.

■同行评价
本文进行了不同年龄阶段慢性乙肝病毒感染者血清中HBV DNA与HBeAg相关关系的量化研究, 立题合理, 检测方法先进, 具有一定科学性.

到抗HBe的血清转换过程的情况下, 尤其ALT升高至正常值的5-10倍时, 对其(此类患者)进行外源性药物干预或增强其免疫力[15-16], 对其预后是有益的.

本次研究中发现有9例患者(HBV DNA定量<5 copies/mL, 同时HBeAg, 定量<0.03 NCU/mL, 且ALT水平于正常范围)已经过HBeAg血清转换处于非活动期. 有极少数病例HBeAg定量阳性、而HBV DNA阴性或HBV DNA定量阳性、而HBeAg定量阴性. 这可能是病情复发、引物及探针对应的HBV DNA序列变异所致或与HBV前C区基因变异相关[17-19]. 因此, HBV DNA定量与乙肝血清标志物定量检测需互补[20-22], 且结合肝功能生化指标[23], 肝脏影像学, 甚至组织学或原位PCR应该能够更客观综合评价乙型肝炎患者HBV感染状况.

4 参考文献

1 Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 1995; 4: 357-362

2 Zanella I, Rossini A, Domenighini D, Albertini A, Cariani E. Quantitative analysis of hepatitis B virus DNA by real-lime amplification. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21: 22-26

3 Gaillard O, Kapel N, Galli J, Delattre J, Meillet D. Time-resolved fluorometry: principles and applications in clinical biology. *Ann Biol Clin (Paris)* 1994; 52: 751-755

4 Siitari H, Hemmila I, Soini E, Lovgren T, Koistinen V. Detection of hepatitis B surface antigen using time-resolved fluoroimmunoassay. *Nature* 1983; 301: 258-260

5 Wang L, Wu YS, Tang YP, Li M. Detection of SARS-associated coronavirus N protein by time-resolved fluoroimmunoassay. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2005; 25: 429-431, 434

6 Mitrunen K, Pettersson K, Piironen T, Bjork T, Lilja H, Lovgren T. Dual-label one-step immunoassay for simultaneous measurement of free and total prostate-specific antigen concentrations and ratios in serum. *Clin Chem* 1995; 41: 1115-1120

7 Alagiozian-Angelova V, Alagiozian D, Antonov K, Krustev Z. Clinical significance of serum HBeAg and HBV-DNA-specific values of virus replication in chronic hepatitis-B virus infection. *Folia Med (Plovdiv)* 1998; 40: 34-41,23

8 彭文伟, 李兰娟, 乔光彦. 传染病学. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2004; 25: 30-31

9 Hussain AB, Karamat KA, Anwar M, Kazmi SY, Tariq WU. Correlation of HBV DNA PCR and HBeAg in hepatitis B carriers. *J Coll Physicians Surg Pak* 2004; 14: 18-20

10 沈哲式, 金仁顺, 朴东明, 张英哲. 延边地区朝、汉族慢性乙型肝炎患者血清标志物与HBV DNA定量的关系. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1323-1325

11 Lok AS. Chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2002; 346: 1682-1683

12 Ishikawa T, Kakumu S, Yoshioka K, Wakita T, Shinagawa T, Ito Y. T cell lines reactive with hepatitis B core and E antigens in patients with chronic hepatitis B. *J Clin Lab Immunol* 1991; 34: 151-156

13 Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 29-60

14 Wieland S, Thimme R, Purcell RH, Chisari FV. Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 6669-6674

15 Lok AS, McMahon BJ. AASLD Practice Guidelines. Chronic hepatitis B: update of therapeutic guidelines. *Rom J Gastroenterol* 2004; 13: 150-154

16 Fung SK, Lok AS. Treatment of chronic hepatitis B: who to treat, what to use, and for how long? *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 839-848

17 Funk ML, Rosenberg DM, Lok AS. World-wide epidemiology of HBeAg-negative chronic hepatitis B and associated precore and core promoter variants. *J Viral Hepat* 2002; 9: 52-61

18 Vivekanandan P, Abraham P, Sridharan G, Chandy G, Shaji RV, Daniel D, Raghuraman S, Daniel HD, Subramaniam T. High frequency of the 1896 precore mutation in patients and blood donors with hepatitis B virus infection from the Indian subcontinent. *Mol Diagn* 2004; 8: 51-56

19 Peng XM, Huang GM, Li JG, Huang YS, Mei YY, Gao ZL.High level of hepatitis B virus DNA after HBeAg-to-anti-HBe seroconversion is related to coexistence of mutations in its precore and basal core promoter. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3131-3134

20 Yang X, Luo HY, Zhang YH, Qian HY, Zeng XB, Huang L. Relationship between the quantities of virus and the models of serologic markers in patients infected with HBV. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2002; 10: 269-271

21 张言超, 寇海兵, 朱学文. 时间分辨萤光免疫分析定量检测HBV标志物的临床意义. 齐齐哈尔医学院学报 2003; 24: 1213-1214

22 陈雪娟, 李刚, 刘淑芳, 陈文思, 李桂侠. HBV感染者HBV DNA与抗原抗体标志物的关系. 世界华人消化杂志 2003; 11: 870-871

23 Hasan KN, Rumi MA, Hasanat MA, Azam MG, Ahmed S, Salam MA, Islam LN, Hassan MS. Chronic carriers of hepatitis B virus in Bangladesh: a comparative analysis of HBV-DNA, HBeAg/anti-HBe, and liver function tests. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2002; 33: 110-117

电编 李琪 编辑 张焕兰

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月18日; 15(8): 913-914
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

病例报告 CASE REPORT

以下消化道出血为首发症状的急性巨核细胞白血病1例

杜桂芹, 丁秀明, 邵晶莹, 黄立娟, 徐洪伟, 齐桂云

杜桂芹, 邵晶莹, 黄立娟, 徐洪伟, 齐桂云, 哈尔滨医科大学附属第二医院检验科 黑龙江省哈尔滨市 150086
丁秀明, 黑龙江省五大连池市人民医院检验科 黑龙江省五大连池市 161461
通讯作者: 齐桂云, 150086, 哈尔滨市南岗区学府路246号, 哈尔滨医科大学附属第二医院检验科. dongyueyue@tom.com
电话: 0451-86605380
收稿日期: 2006-05-10 接受日期: 2006-09-01

摘要

患者, 女, 34岁, 9 d前无明显诱因出现黏液血便, 发热寒战, 伴腹胀腹痛入院. 纤维结肠镜检查未见异常. 经血常规、骨髓像、免疫组化及流式细胞术检测单个核细胞的免疫表型CD41确诊为急性巨核细胞白血病. 此病例以下消化道出血为首发症状, 易误诊误治, 临床极少见.

关键词: 下消化道出血; 急性巨核细胞白血病

杜桂芹, 丁秀明, 邵晶莹, 黄立娟, 徐洪伟, 齐桂云. 以下消化道出血为首发症状的急性巨核细胞白血病1例. 世界华人消化杂志 2007;15(8):913-914
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/913.asp

0 引言

急性巨核细胞白血病(AMKL)是一种特殊类型的白血病, 以贫血、出血、感染等为主要临床表现. 国外报道此型白血病占急性白血病的12%, 国内报道占急性白血病的1.2%[1], 从整个白血病发病情况看其发病率较低. 而且AMKL多见于慢性粒细胞白血病急性变或继发性白血病. AMKL疗效极差, 是一种进行性预后不良的疾病. 由于AMKL缺乏形态学和组织化学特征, 免疫分型CD41可提高诊断率, 以下消化道出血为首发症状的AMKL临床极少见, 容易误诊误治. 应引起检验工作者和临床医生的高度关注.

1 病例报告

患者, 女, 34岁. 9 d前无明显诱因出现黏液血便, 发热伴下腹部胀痛, 无反酸、嗳气及恶心呕吐, 体温38℃, 经对症治疗症状未见缓解, 纤维结肠镜检查结果显示未见异常, 以下消化道出血收入我院消化科. 查体: 中度贫血外貌, 肝脾未触及, 淋巴结无肿大. 粪便常规检查WBC 0-1/HP, RBC 2-4/HP, 粪便潜血试验阳性. 血常规检查: WBC 8.1×10^9/L, N 0.44, L 0.46, M 10.0, HB 80 g/L, PLT 277×10^9/L, RBC 2.61×10^{12}/L. 骨髓像检查: 骨髓增生明显活跃, 巨核细胞大量出现占30%, 常聚集分布, 以幼巨核和小巨核为主, 可见小巨核及幼巨核产板. 原始细胞大量出现占60.5%, 细胞圆形较大, 核浆比较高, 胞质深蓝色环核分布, 可见空泡, 核染色质细颗粒状均匀分布. 细胞化学染色: 过氧化物酶染色POX阴性, 糖原染色PAS阳性, 骨髓细胞少, 骨髓干抽2次. 流式细胞术检测单个核细胞的免疫表型为CD41, 最终确诊为AMKL. 此病以下消化道出血为首发症状者极少见.

2 讨论

AMKL是急性白血病中一种少见的类型, 发病者多为青壮年及幼儿, 此病病情凶险, 疗效不佳. 以往通过进行骨髓细胞形态学、细胞化学染色检查及电镜检查血小板过氧化物酶即可初步确立诊断. 随着流式细胞技术对巨核细胞超微细胞化学及免疫细胞化学的深入研究, 应用mAb, 特别是单个核细胞的免疫表型检测代替电镜技术诊断AMKL已在临床广泛应用. 目前, 人们多选用CD41作为巨核细胞系的标志, 尽管有许多其他巨核系和血小板mAb可供选择, 但CD41在巨核细胞系发育过程中表达较早, 并且贯穿巨核细胞系发育的整个过程, CD41是血小板糖蛋白的一种, 位于血小板表面的黏附蛋白受体, 可介导广泛的细胞-细胞或细胞-基质黏附反应. 因此CD41表达是诊断AMKL的一种简单、快速的方法[2]. 骨髓干抽是AMKL的一大特点, 该患先后进行3次骨穿, 2次干抽, 与骨髓纤维化有关, 与相关文献报道一致[3]. 如果青壮年患者骨穿出现多次骨髓干抽想象, 应考虑本病的可能性. 做血常规检查时, 白细胞总数和

■背景资料
急性巨核细胞性白血病是急性白血病中一种少见的类型, 发病者多为青壮年及幼儿, 此病病情凶险, 疗效不佳, 缺乏形态学和组织化学特征, 免疫分型CD41可提高诊断率.

■同行评价
急性巨核细胞性白血病较为少见, 以消化道出血为主要表现者尚未见中文文献报道, 故该文对临床处理类似病例有一定的借鉴意义.

分类都正常、血红蛋白轻度降低并伴有下消化道出血症状往往多考虑为消化道疾病, 而忽略了血液病, 导致漏诊、误诊. 临床上以下消化道出血为首发症状的AMKL目前国内未见报道. 这一症状应引起临床医生和检验工作者高度重视.

3 参考文献

1 吕晓毅, 朱娟, 李霞, 卢香兰, 李艳, 何娟, 翟明. 急性巨核细胞白血病20例临床分析. 中国肿瘤临床与康复. 2005; 12: 405-406

2 王东侠, 吕志强, 张文艺, 杨淑芝, 雷蕊, 侯伟, 乔子剑, 杨淑莲. CD41诊断急性巨核细胞白血病假阳性原因探讨. 临床误诊误治 2006; 19: 54-56

3 李保才. 急性巨核细胞白血病一例诊断分析. 检验医学 2006; 21: 438-439

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 •

第三届全国肝移植学术研讨会通知

本刊讯 天津医学会器官移植分会、天津市第一中心医院将于2007-03-24/25在天津天鹅湖度假村举行“第三届全国肝移植学术研讨会”, 会议期间, 将邀请国内包括香港和台湾地区的著名肝移植专家作精彩演讲. 近年, 我国肝移植技术进入快速发展时期, 国内已有大批长期存活的肝移植受者, 如何提高肝移植受者的生存质量是国内的肝移植临床工作人员今后应该研究的重点之一, 本次研讨会将以“肝移植术后患者的长期生存”为主题, 对肝移植术后肝炎复发的防治、肿瘤复发的综合防治、免疫抑制剂的长期应用及其副作用、肝移植术后患者的长期随访等问题进行深入讨论. 适逢举办此次研讨会之际, 与各位专家学者及临床一线的医生共同交流肝移植临床实践的经验.

会议主题: 肝移植术后患者的长期生存; 报到日期: 2007-03-24; 会议日期: 2007-03-25; 会议地点: 天津天鹅湖度假村; 主办单位: 天津市第一中心医院; 联系人: 刘彤; 电话: 022-23626879, 022-85738707; 传真: 022-23626897; 地址: 中国天津南开区复康路24号; 邮编: 300192. 承办单位: 茵斯派克国际会展服务有限公司; 联系人: 高洋; 电话: 010-62358943; 地址: 中国北京市海淀区北太平庄路甲1号9号楼中昊财务写字楼415室; 邮编: 100088.

世界华人消化杂志 2007年3月18日; 15(8): 915-919
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

世界华人消化杂志投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊, 中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊.

1 投稿总则

1.1 性质 世界华人消化杂志®, 国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 大16开, 旬刊, 每期160页, 定价24元, 全年864元, 邮发代号82-262, 由世界胃肠病学杂志社出版. 世界华人消化杂志主要报道消化基础研究、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、消化病理、消化预防医学、消化护理、消化医学、影像消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化诊断指南、消化治疗指南、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊. 世界华人消化杂志被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录. 国内为中国科技论文统计与分析(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录. 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.

1.2 栏目 述评, 食管癌, 胃癌, 肝癌, 病毒性肝炎, 大肠癌, 幽门螺杆菌, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确. 专家述评4 000字以内, 研究原著6 000字以内, 焦点论坛4 000字以内, 文献综述6 000字以内, 研究快报4 000以内字, 临床经验1 800字以内, 病例报告800字以内.

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals). 见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47.

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称. 医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文. 公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD_{50}, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标. 静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服*po*, 灌胃

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(国家科技部, 2003年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2004年版)收录的学术期刊. 世界胃肠病学杂志社, 100023, 北京市2345信箱郎辛庄北路58号院怡寿园1066号, 电话: 010-85381901 Email: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com.

ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, $T_{1/2}$不能写成tl/2或$T\frac{1}{2}$, *V*max不能Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*), *Ilex pubescens* Hook, *et* Arn.*var.glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*n*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; Ibid, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), S(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, ℃), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), T_{max}, C_{max}, *V*d, $T_{1/2}$ *CI*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如 30 kD改为M_r 30 000或30kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即*A*r(A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、−、±及-后列出. 如37.6±1.2℃, 45.6±24岁, 56.4±0.5 d.3.56±0.27 pg/ml应为3.56±0.27 ng/ L, 131.6±0.4 mmol/L, *t* =28.4±0.2℃. BP用kPa(mmHg), RBC数用×10^{12}/L, WBC数用×10^9/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm×6 cm×4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO_2结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B_1、维生素B_2、维生素B_6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B_{12}用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 七年, 7 a; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU=16.67 nkat, 对数log, 紫外*uv*, 百分比%, 升L, 尽量把1×10^{-3} g与5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg•d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10年, 10 a; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/ L酒精; 5% CO_2, 50 mL/L CO_2; 1∶1 000肾上腺素, 1 g/ L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/ L或100 g/ L葡萄糖; 45 ppm=45×10^{-6}; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用*g*; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

2.5 统计学符号 (1)*t*检验用小写*t*; (2)*F*检验用英文大写*F*; (3)卡方检验用希文小写χ^2; (4)样本的相关系数用英文小写*r*; (5)自由度用希文小写*υ*; (6)样本数用英文小写*n*; (7)概率用英文斜体大写*P*. 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 统计学显著性用^aP <0.05, ^bP <0.01(P >0.05不注). 如同一表中另有一套*P*值, 则^cP <0.05, ^dP <0.01; 第三套为^eP <0.05, ^fP <0.01等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1 000-1 500 kg, 3.5±

0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的mean±SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5±420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6±0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4±0.27 cm, 其SD/3=0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48→23.5→24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定:分母≤100, 百分数到个位; 101≤分母≤1 000, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65. 完整的阿位伯数字不移行!

2.7 *标点符号* 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 *题名* 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字左右, 最好不超过26个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 *作者* 论文署名作者不宜过多, 一般不超过8人, 主要应限于参加研究工作并能解答文章有关问题、能对文稿内容负责者, 对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 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.

3.3 *单位* 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 *第一作者简介* 格式如: 张旭晨, 男, 1966-02-26生, 河北省定县人, 汉族. 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 *基金资助项目* 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No.30224801

3.6 *通讯作者* 格式如: 通讯作者: 马连生, 030001, 山西省太原市双塔西街77号, 太原消化病研治中心. wcjd@wjgnet.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 接受日期:

3.7 *英文摘要*

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致.

作者 署名一般不超过8人. 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如:“潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”.

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-

World Journal of Gastroenterology 自2005-01-01起为周刊发行, 每月7、14、21、28日出版. 北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-261. WJG出版的模式为开放存取+印刷版. 免费通过http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp获取, 即: 阅读、下载、复制、打印和检索论文的全文.

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起为旬刊发行, 每月8、18、28日出版. 北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-262.《世界华人消化杂志》出版的模式为开放存取+印刷版. 免费通过http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp获取, 即: 阅读、下载、复制、打印和检索论文的全文.

Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及接受日期 格式如: Received: Accepted:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致. 格式如下:

Abstract

AIM:

METHODS:

RESULTS:

CONCLUSION:

Zhang XC, Gao RF, Li BQ, Ma LS, Mei LX, Wu YZ, Liu FQ, Liao ZL. Effects of Weixibao nizhuanwan on gastric precancerous lesions 300 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006; 14:

3.8 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象. 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写*P*, 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值), 中文摘要格式如下:

摘要

目的:

方法:

结果:

结论:

张旭晨, 高瑞丰, 李炳庆, 马连生, 梅立新, 吴玉珍, 刘凤芹, 廖振林. 胃细胞逆转丸治疗胃癌前期病变300例. 世界华人消化杂志 2006;14:

3.9 正文标题层次为 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 正文内序号连排用(1), (2), (3).

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系.

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可.

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论.

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾.

图表 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …. 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: $^{a}P<0.05$, $^{b}P<0.01$($P>0.05$不注). 如同一表中另有一套*P*值, 则$^{c}P<0.05$, $^{d}P<0.01$; 第3套为$^{e}P<0.05$, $^{f}P<0.01$. *P*值后注明何种检验及其具体数字, 如$P<0.01$, $t = 4.56$ *vs* 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. "空白"表示无此项或未测, "-"代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用*t*/min, *c*/(mol/L), *p*/kPa, *V*/mL, *t*/℃表达. 黑白图请附黑白照片, 并考入磁盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小7.5 cm×4.5 cm, 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴.

致谢 致谢后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

4 参考文献 本刊采用"顺序编码制"的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在"Pang *et al*"的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注码号. 如马连生[1]报告……, 潘伯荣 *et al*[2-5]认为……; PCR方法敏感性高[6-7]. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文

献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年核心期刊为准, 引用被PubMed收录的期刊文献用英文表达, 请附引用文献网上摘要打印件, 包括PMID编号(摘要的左下方). 按顺序编号装订, 并考入磁盘内. 在引用参考文献页码末尾注明PMID编号; 无PMID编号的期刊请删除(重要文献必须保留者, 请附首页复印件). 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号 ; 书籍: 序号, 作者(列出全部),书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页. 参考文献格式如下:

1 Ma LS, Pan BR. Strengthen international academic exchange and promote development of gas-troenterology. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 1 [PMID: 11819215]

2 马连生, 潘伯荣, 马景云. 世界胃肠病学杂志英文版的现状. 世界华人消化杂志 2001; 9: 855-863

3 Lam SK. Academic investigator's perspectives of medical treatment for peptic ulcer. In: Swabb EA, Azabo S, eds. Ulcer disease: investigation and basis for therapy. New York: Marcel Dekker, 1991: 431-450

4 尚克中, 陈九如. 胃肠道造影原理与诊断. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1995: 382-385

4 投稿须知

4.1 投稿信件 来稿包括所有作者签名的作者投稿函. 内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)可建议熟悉该专业的审稿人或因利益冲突而不适宜审阅该稿的审稿人姓名; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部, 所有来稿均需接受同行审阅.

4.2 审稿过程 所有来稿均经2位同行专家的严格评审, 所有审稿人的姓名对作者通常是保密的. 投稿时, 作者可以提出要求回避的同行专家名单, 也可以推荐2位非本单位的审稿人, 尤其是本刊编委会成员. 审稿过程大约需要1 mo.

4.3 录用 来稿经本刊编辑部初审、2位同行专家评审, 将评审后的稿件分为优先发表、可以发表、修改后发表、修改后再审、退稿等项处理. 录用稿件作者需交纳发表费, 发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬).

4.4 修改时间 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删节时, 本刊编辑部将把原稿寄回给作者自行修改. 当原稿退还作者修改时, 作者必须于1 mo内将修改后的稿件及软盘寄回编辑部; 逾期寄回的, 作重新投稿处理.

4.5 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负. 作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码. 如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有. 编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》、《中文生物医学期刊/会议文献数据库》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录.

4.6 投稿清单 (1)投稿函; (2)第1部分为题名及作者, 作者及单位, 第1作者简介, 基金资助项目, 通讯作者Email, 电话, 传真, 收稿日期, 接受日期; (3)第2部分英文摘要; (4)第3部分中文摘要; (5)第4部分为0引言, 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法, 统计学处理, 2 结果, 3 讨论, 致谢, 4 参考文献.

4.7 投稿地址 在线投稿: http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx. 邮局寄送(已在线提交的稿件不必再寄): 请将打印的稿件一式2份(附高质量的图)、存有全文(文字、图表)的磁盘和其他信息(全部文件的清单, 各文件的名称、格式和使用平台等)寄往: 100023, 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社.

世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市2345信箱
郎辛庄北路58号院怡寿园1066号
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com
http://www.wjgnet.com

World Journal of Gastroenterology创刊于1995-10-01, 原刊名《China National of New Gastroenterology》, 1995-06-27国科发信字(95)225号批准国内外公开发行. 1998-02-12经国家科学技术部和国家新闻出版总署批准更名为WJG, 国科发信字(1998)027号. 2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001158号.

• 致谢 •

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿)，我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力，提高了《世界华人消化杂志》的学术质量，在此表示衷心感谢！

蔡开琳 副教授
华中科技大学同济医学院附属协和医院普通外科

曹洁 副教授
第二军医大学微生物学教研室

陈立波 副教授
华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科中心

杜群 副研究员
广州中医药大学脾胃研究所

杜雅菊 副教授
哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科

房静远 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所

高春芳 研究员
第二军医大学附属长征医院全军医学免疫诊断中心

戈之铮 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

巩鹏 副教授
大连医科大学附属第一医院普外二科

何裕隆 教授
中山大学附属第一医院胃肠胰腺外科

洪天配 教授
北京大学第三医院内分泌科

黄恒青 主任医师
福建省第二人民医院消化内科

黄志勇 副教授
华中科技大学同济医学院附属同济医院肝脏外科中心

金瑞 教授
首都医科大学附属北京佑安医院消化科

李奇林 主任医师
南方医科大学珠江医院急诊科

李旭 副教授
广州南方医院急诊科

陆云飞 教授
广西医科大学第一附属医院胃肠外科

吕明德 教授
中山大学附属第一医院肝胆外科

马大烈 教授
上海第二军医大学长海医院病理科

潘秀珍 教授
福建省立医院消化研究室

秦成勇 教授
山东省立医院消化内科

秦华东 教授
黑龙江省哈尔滨医科大学附属第二医院普外四科

秦环龙 教授
上海交通大学附属第六人民医院外科

邱宝安 主任医师
海军总医院肝胆外科

邵成浩 主治医师
第二军医大学长海医院普外科

沈洪 主任医师
南京中医药大学附属医院江苏省中医院消化科

施诚仁 教授
上海交通大学医学院附属新华医院小儿外科

汤展宏 副教授
广西医科大学第一附属医院危重症中心外科ICU

王健生 副教授
西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

王鲁 副教授
复旦大学附属中山医院肝外科, 复旦大学肝癌研究所

王晓艳 副教授
中南大学湘雅三医院消化内科

王学美 研究员
北京大学第一医院中西医结合研究室

王志刚 副主任医师
上海市第六人民医院普外科

徐大华 主任医师
首都医科大学宣武医院普外科

杨林 副研究员
中山大学附属第三医院感染病科

姚登福 教授
南通大学附属医院分子医学中心

郁宝铭 结直肠中心主任
上海市第八人民医院结直肠中心

张吉翔 教授
南昌大学第二附属医院消化内科

张继明 教授
复旦大学附属华山医院肝炎研究室

周丁华 主任医师
解放军二炮总医院普外科