

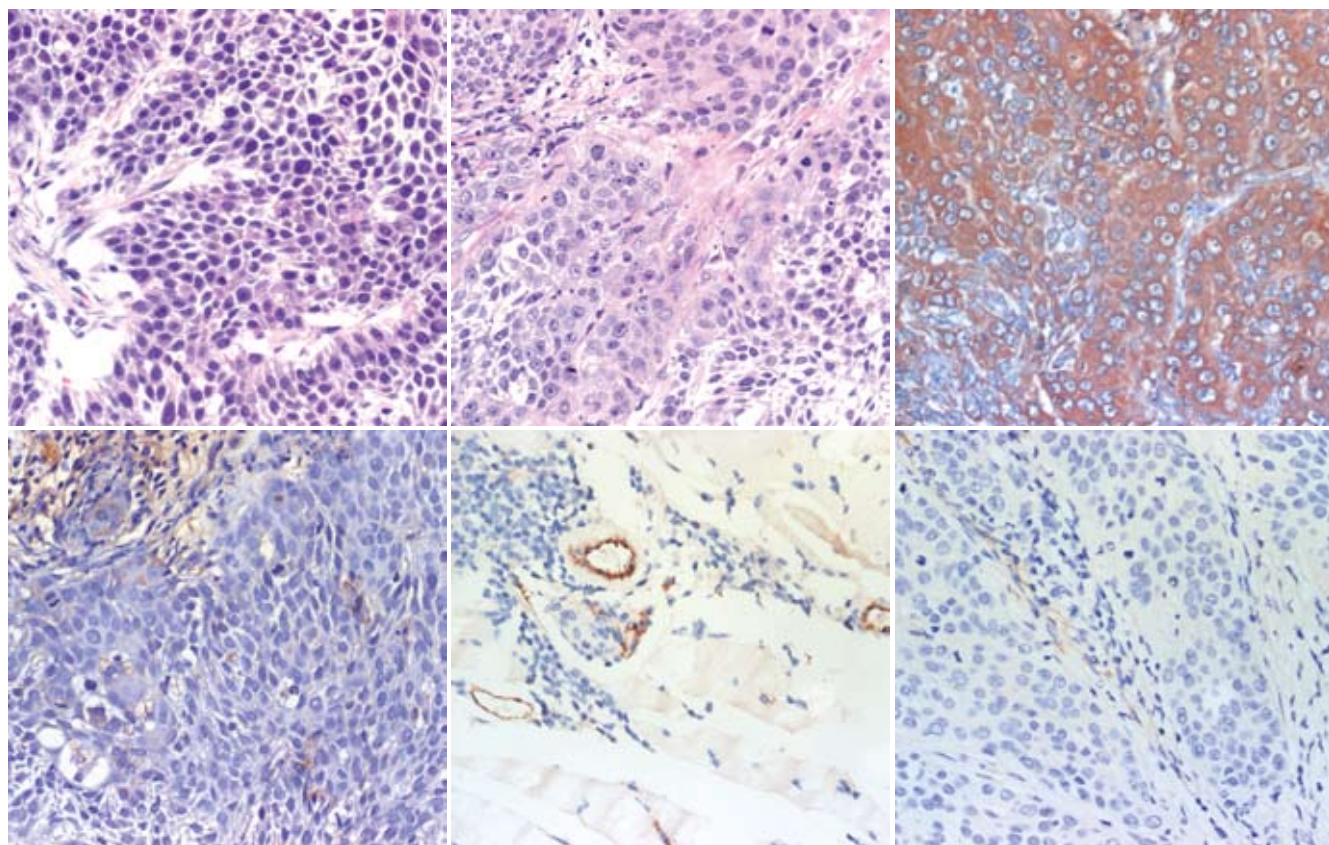
ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2008年10月18日 第16卷 第29期 (Volume 16 Number 29)



29 / 2008

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

《世界华人消化杂志》是一份同行评议性的旬刊，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》和俄罗斯《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

wcj@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

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
程英升主任医师
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
聂青和教授
王小众教授

编委

消化内科学

白爱平副教授
白文元教授
苕新明教授
陈洪副教授
陈军贤主任医师
陈尼维主任医师
陈其奎教授
陈卫昌教授

陈贻胜教授
陈玉林教授
程斌副教授
迟宝荣教授
邓长生教授
丁士刚主任医师
董蕾教授
杜雅菊主任医师
樊晓明主任医师
房静远教授
冯红主任医师
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
高峰副教授
戈之铮教授
关晓辉主任医师
关玉盘教授
郭晓钟教授
郭新宁教授
洪天配教授
侯晓华教授
胡伏莲教授
胡和平主任医师
黄晓东副主任医师
黄颖秋教授
黄裕新教授
霍丽娟主任医师
季国忠副教授
姜春萌教授
姜慧卿教授
金懋林教授
金瑞教授
蓝宇教授
李定国教授
李继强教授
李淑德教授
李晓宇主任医师
李延青教授
李瑜元教授
李玉民教授
李玉明教授
林志辉教授
刘冰熔教授
刘改芳主任医师
刘海林主任医师
刘铁夫教授
刘占举教授
陆伦根教授
吕志武教授
马金城教授
马欣主任医师
毛高平主任医师

倪润洲教授
欧希龙副教授
潘秀珍教授
朴熙绪主任医师
朴云峰教授
秦成勇教授
曲智威副主任医师
任粉玉副教授
任建林教授
邵先玉教授
沈琳主任医师
沈守荣教授
沈薇教授
施瑞华教授
宋于刚教授
孙富强副教授
孙侃教授
孙自勤教授
唐采白副教授
唐笑爱教授
唐丽安教授
田德安主任医师
童强主任医师
宛新建副教授
王邦茂教授
王炳元教授
王承党副教授
王吉耀教授
王莉瑛教授
王晓艳副教授
闻勤生教授
吴萍主任医师
夏时海副教授
徐秀英副教授
许春舫主任医师
许乐主任医师
许亚平副教授
杨冬华教授
杨建民教授
杨希山教授
杨幼林主任医师
杨云生教授
杨昭徐教授
姚树坤教授
叶红军主任医师
于红刚副教授
于晓峰主任医师
袁伟建教授
展玉涛副主任医师
张春清教授
张方信主任医师

张国梁主任医师
张吉翔教授
张集昌主任医师
张军教授
张小晋主任医师
张晓岚教授
张筱茵副教授
张志坚教授
赵晓晏教授
郑鹏远教授
智发朝教授
周国雄主任医师
朱春兰主任医师
朱人敏教授
邹晓平主任医师

消化外科学

别平教授
蔡开琳副教授
蔡三军主任医师
曹杰主任医师
陈光教授
陈海龙教授
陈积圣教授
陈建荣副教授
陈克能主任医师
陈力教授
陈立波副教授
陈凜教授
陈强谱教授
陈亚军主任医师
陈知水教授
陈祖林副教授
程爱国教授
程爱群主任医师
程树群副教授
迟强教授
仇毓东副教授
崔彦教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
丁义涛教授
董明教授
房林副教授
傅红副教授
傅华群教授
傅廷亮教授
傅志仁主任医师
高成新教授
葛海燕教授
龚建平教授

巩鹏教授
谷俊朝主任医师
顾岩教授
郭克建教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
何超教授
何生教授
何裕隆教授
何振平教授
黄志勇副教授
季加孚教授
姜波健教授
蒋龙元副教授
兰平教授
黎乐群教授
李国威教授
李华山副主任医师
李靖副教授
李奇林教授
李胜研究员
李涛副主任医师
李小荣教授
李旭副教授
李志霞教授
李宗芳教授
梁力建教授
林胜璋副教授
刘建教授
刘颖斌副教授
刘志苏教授
刘作金副教授
卢实春教授
陆才德教授
陆云飞教授
吕明德教授
吕云福教授
梅铭惠教授
彭波副教授
彭吉润主任医师
彭心宇教授
彭志海教授
钱建民教授
乔岐禄主任医师
秦春宏副主任医师
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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

裘正军教授
任建安教授
荣大庆教授
邵永孚教授
沈柏用副教授
沈世强教授
沈岩主任医师
师英强教授
施诚仁教授
宋世兵主任医师
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙家邦教授
孙学英教授
孙延平副主任医师
邵升副教授
谭群友副教授
汤恢煊教授
汤展宏副教授
唐文皓副主任医师
田素礼教授
田晓峰教授
万德森教授
汪波副主任医师
汪根树副教授
王春友教授
王凤山副教授
王广义教授
王济明教授
王健生副教授
王烈主任医师
王鲁副教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王效民教授
王要军教授
王振宁教授
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
卫洪波教授
吴德全教授
吴河水教授
吴健雄教授
吴金术教授
吴泰璜教授
吴志勇教授
席启主任医师
谢敏主任医师
谢晓华副教授
邢光明教授
徐大华主任医师
徐智教授

许戈良教授
严律南教授
严以群主任医师
杨广顺教授
杨维良教授
杨尹默教授
伊力亚尔·夏合丁教授
殷正丰教授
于聪慧教授
于恩达教授
于健春教授
于良副教授
于则利教授
郁宝铭教授
郁正亚副教授
曾勇教授
张柏和教授
张群华教授
张水军教授
张肇达教授
张宗明教授
赵增仁副主任医师
郑民华教授
钟德珩教授
周丁华主任医师
周伟平教授
朱立元教授
邹小明教授

消化感染病学

陈国凤主任医师
陈红松研究员
陈建杰教授
陈仕珠主任医师
陈耀凯副教授
党双锁副教授
丁惠国教授
范建高教授
范小玲主任医师
高润平教授
高泽立副教授
龚国忠教授
管世鹤副教授
郝春秋副教授
何生松教授
江家骥教授
李智伟教授
林菊生教授
刘杞教授
刘正稳教授
孟庆华教授
宁琴教授
牛俊奇教授
钱林学主任医师

秦波教授
石统东副教授
孙殿兴主任医师
谭德明教授
唐霓副教授
唐世刚教授
唐晓鹏教授
王凯教授
王怡主任医师
魏来教授
吴建国教授
吴君主任医师
谢青教授
徐小元教授
宣世英教授
闫惠平研究员
杨林研究员
姚鹏副教授
张继明教授
张明辉副主任医师
张绪清副教授
张占卿主任医师
赵桂鸣主任医师
赵桂珍教授
赵连三教授
周伯平教授
周文兴教授
周霞秋教授
朱传武副主任医师
庄林主任医师

消化中医药学

蔡淦教授
陈治水主任医师
杜群研究员
黄恒青主任医师
劳绍贤教授
李军祥教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员
刘平教授
刘绍能主任医师
龙致贤教授
牛建昭教授
沈洪教授
唐旭东主任医师
唐志鹏研究员
王新月教授
徐列明教授
许玲副教授
张声生教授

消化肿瘤学

白玉贤教授
曹秀峰主任医师
曹志成院士
陈公琰主任医师
李瑗教授
刘宝瑞教授
刘彬彬研究员
刘云鹏教授
马力文主任医师
吴晴教授
熊斌教授
张凤春教授

消化影像学

陈克敏教授
程红岩教授
褚建国主任医师
官泳松教授
韩新巍教授
胡红杰主任医师
黄金华副教授
匡安仁教授
李健丁教授
鲁华玉研究员
施海彬教授
魏经国教授
肖恩华教授
徐爱民副教授
徐克教授
扬业发教授
杨建勇教授
赵卫主任医师

消化内镜学

崔毅主任医师
丁佑铭教授
郝俊鸣副主任医师
刘海峰主任医师
潘林娜教授
沈俊教授
孙明军教授
万军教授

消化介入治疗学

卢榜裕教授
茅爱武主任医师
倪才方教授
吴硕东教授
袁友红副教授
郑加生主任医师

消化中西医结合学

崔乃强教授
李方儒教授

刘鲁明教授
唐文富副主任医师
王学美研究员

消化基础研究

曹洁副教授
樊红副教授
高春芳研究员
高峰教授
高英堂研究员
管冬元副教授
黄文林教授
李东辉教授
李杰副教授
李永哲副研究员
李增山副教授

梅林教授
彭曦副研究员
钱睿哲教授
任超世研究员
孙秀发教授
谭学瑞教授
屠红副研究员
汪思应教授
吴晓东教授
夏建川研究员
徐存拴教授
徐德忠教授
徐宁志研究员
徐迎新研究员
许文燮教授
姚登福教授
阴赧宏研究员
喻荣彬副教授
张青云研究员
张学教授
赵平副教授
周士胜教授
周晓东研究员
周晓武副主任医师
左国营副主任药师

消化病理学

杜祥教授
刘勇钢副主任医师
吕宁主任医师
马大烈教授
潘兴华副主任医师
阎晓初副教授
易永芬教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
赵景民教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2008年10月18日 第16卷 第29期 (总第253期)

述 评	3249 胆管癌并阻塞性黄疸的影像学诊断及介入治疗现状与进展 韩新巍, 李臻
基础研究	3255 Fas、FasL及Caspase-3在维甲酸诱导胃癌细胞凋亡中的作用 张红英, 李锦毅, 张建永 3261 益气活血法对大鼠萎缩性胃炎癌前病变差异基因表达谱的影响 李军祥, 张玉禄, 朱陵群, 赵宁宁 3269 HSP90抑制剂17-DMAG对胃癌细胞株SGC-7901增殖及凋亡的影响 高志军, 赵春临, 乔军波, 张谢夫 3274 胡黄连苷 II 对H ₂ O ₂ 损伤L-02细胞的保护作用 顾伟, 范昕建, 吴疆, 牛智强
临床研究	3279 mTOR/P70S6K信号通路在肝细胞肝癌中的表达及临床意义 彭贵主, 吴波, 单人锋, 周福庆 3283 肥胖与大肠腺瘤关系的临床及分子机制 王娜, 黄志刚, 陈锡美, 叶荣菊, 王伟, 张霞, 张建培
文献综述	3289 肝癌相关基因及相互作用的研究进展 王伟丽, 高英堂 3295 碘-125粒子植入治疗肝细胞癌的剂量学 吕进, 曹秀峰 3299 肝纤维化的干细胞治疗进展 丁亚楠, 潘兴华, 马丹, 朱向情, 庞荣清, 杨仁华 3303 瘦素和脂联素在慢性肝病中的研究进展 石瑞芳, 郎振为 3310 氧化应激与肝脏损伤 吴娜, 蔡光明, 何群 3316 肠上皮屏障与炎症性肠病研究进展 何新颖, 唐志鹏, 张亚利
研究快报	3321 黄芪总苷对应激大鼠胃黏膜氧自由基及褪黑素受体的影响 李燕舞, 宋宁, 王汝俊 3324 TNF- α 抑制剂对重症急性胰腺炎细胞凋亡及Caspase-3表达的影响 纪涛, 汤志刚, 黄强, 许戈良, 陈炯, 李建生 3328 模拟失重对大鼠肠黏膜NF- κ B表达的影响 李成林, 张铭, 周金莲, 崔彦, 余佩武
临床经验	3332 内镜检查对原发性胃恶性淋巴瘤诊断意义 谭东毅, 张国梁, 邹江, 布利民 3335 原发性胆汁性肝硬化早期诊断15例 杨永林, 杨建平 3338 自身免疫性肝病临床病理特征分析28例 张会爱, 王邦茂, 章明放, 常毅湘, 弓艳霞

	<p>3343 慢性肝衰竭患者预后的影响因素 高艳颖, 韩涛, 阚志超</p> <p>3347 导丝在降低逆行胰胆管造影并发症中的意义 侯森林, 高永平, 乔娜, 乔占英, 康建省, 张立超</p> <p>3351 溃疡性结肠炎患者血浆MMP-1与TIMP-1测定的意义 王英德, 谭晓燕, 张可</p> <p>3354 庆大霉素联合碳酸氢钠片预防伊立替康所致腹泻52例 梅齐, 曹喆, 陈元</p>
病例报告	<p>3359 罕见侧枝循环形成致不典型布-加综合征1例 卢书明, 段志军, 刘丽娜, 张伟, 王峰, 李枫</p>
致 谢	<p>3362 致谢世界华人消化杂志编委</p>
消 息	<p>3254 世界华人消化杂志栏目设置</p> <p>3260 世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标</p> <p>3268 “科技期刊在国家自主创新体系中的作用”专题讨论会在京召开</p> <p>3273 世界华人消化杂志英文摘要要求</p> <p>3298 世界华人消化杂志网络版的发表前链接</p> <p>3309 世界华人消化杂志被收录情况</p> <p>3315 世界华人消化杂志数字用法标准</p> <p>3320 世界华人消化杂志外文字符标准</p> <p>3334 世界华人消化杂志投稿方式</p> <p>3337 世界华人消化杂志标点符号用法</p> <p>3342 第八届全国消化道恶性病变介入诊疗暨消化介入新技术研讨会征文通知</p> <p>3358 世界华人消化杂志参考文献要求</p>
封面故事	<p>Lu YY, Jing DD, Xu M, Wu K, Wang XP. Anti-tumor activity of erlotinib in the BxPC-3 pancreatic cancer cell line. <i>World J Gastroenterol</i> 2008; 14(35): 5403-5411 http://www.wjgnet.com/1007-9327/14/5403.asp</p>
本期责任人	<p>编务 李慧; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 郭海丽; 责任编辑 史景红; 英文编辑 张海宁; 审核编辑 张海宁; 形式规范 马连生</p>

世界华人消化杂志

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 2008-10-18
原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣
总 编 辑 马连生
常务副总编辑 张海宁
编辑部主任 张海宁
期 刊 名 称 世界华人消化杂志
主 管 单 位 山西省科学技术厅
主 办 单 位 太原消化病研治中心

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
030001, 山西省太原市双塔西街77号
电话: 0351-4078656
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

出版 世界华人消化杂志编辑部
030001, 山西省太原市双塔西街77号
电话: 0351-4078656
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

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 世界华人消化杂志编辑部
030001, 山西省太原市双塔西街77号
电话: 0351-4078656
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 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》和俄罗斯《文摘杂志》收录。

世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(<http://wcjd.wjgnet.com>), 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。

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部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。

2008年版权归世界华人消化杂志所有

中国标准连续出版物号 **ISSN 1009-3079**
CN 14-1260/R

邮发代号 82-262

国外代号 **M 4481**

国内定价 每份24.00元 全年864.00元

广告经营许可证 1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

October 2008 Contents in Brief Volume 16 Number 29

EDITORIAL	3249 Progress in imaging diagnosis and interventional therapy of cholangiocarcinoma associated with obstructive jaundice <i>Han XW, Li Z</i>
BASIC RESEARCH	3255 Effect of Fas, FasL and Caspase-3 on apoptosis of retinoic acid-induced gastric carcinoma cells <i>Zhang HY, Li JY, Zhang JY</i> 3261 Effect of Qi-replenishing and blood-activating treatment on aberrant gene expression profile in the precancerous lesion of CAG in rats <i>Li JX, Zhang YL, Zhu LQ, Zhao NN</i> 3269 Effect of heat shock protein 90 inhibitor 17-DMAG on proliferation and apoptosis of human gastric cancer cell lines SGC-7901 <i>Gao ZJ, Zhao CL, Qiao JB, Zhang XF</i> 3274 Protective effect of Picoside II against H ₂ O ₂ -induced damage in L-02 cells <i>Gu W, Fan XJ, Wu J, Niu ZQ</i>
CLINICAL RESEARCH	3279 Expression and clinical significance of mTOR/P70S6K signaling pathway in hepatocellular carcinoma <i>Peng GZ, Wu B, Shan RF, Zhou FQ</i> 3283 Clinical and molecular mechanism of the relationship between obesity and colorectal adenoma <i>Wang N, Huang ZG, Chen XM, Ye RJ, Wang H, Zhang X, Zhang JP</i>
REVIEW	3289 Advances in genes and gene interaction of hepatocellular carcinoma <i>Wang WL, Gao YT</i> 3295 Dosimetry of ¹²⁵ I radioactive seed implantation in therapy for hepatocellular carcinoma <i>Lv J, Cao XF</i> 3299 Progress in treatment of liver fibrosis by stem cells <i>Ding YN, Pan XH, Ma D, Zhu XQ, Pang RQ, Yang RH</i> 3303 Research progress of leptin and adiponectin in chronic liver diseases <i>Shi RF, Lang ZW</i> 3310 Oxidative stress and hepatic injury <i>Wu N, Cai GM, He Q</i> 3316 Advance in enteric epithelial barrier and inflammatory bowel disease <i>He XY, Tang ZP, Zhang YL</i>
RAPID COMMUNICATION	3321 Influence of astragaloside on gastric mucosal oxygen free radicals and melatonin receptors of rats with stress ulcer <i>Li YW, Song N, Wang RJ</i> 3324 Effects of tumor necrosis factor- α inhibitor on cell apoptosis and expression of Caspase-3 in rats with severe acute pancreatitis <i>Ji T, Tang ZG, Huang Q, Xu GL, Chen J, Li JS</i> 3328 Effects of simulated gravity loss on nuclear factor kappa-B expression in rat intestinal tissues <i>Li CL, Zhang M, Zhou JL, Cui Y, Yu PW</i>

CLINICAL PRACTICE	<p>3332 Diagnostic significance of endoscopy for primary gastric malignant lymphoma <i>Tan DY, Zhang GL, Zhou J, Bu LM</i></p> <p>3335 Diagnosis of early primary biliary cirrhosis: an analysis of 15 cases <i>Yang YL, Yang JP</i></p> <p>3338 Clinicopathological features of autoimmune hepatic diseases: an analysis of 28 cases <i>Zhang HA, Wang BM, Zhang MF, Chang YX, Gong YX</i></p> <p>3343 Risk factors of prognosis for chronic liver failure <i>Gao YY, Han T, Kan ZC</i></p> <p>3347 Role of guide-wire in lowering complications of endoscopic retragrade cholangiopancreatography <i>Hou SL, Gao YP, Qiao N, Qiao ZY, Kang JS, Zhang LC</i></p> <p>3351 Clinical significance of plasma MMP-1 and TIMP-1 measurement in patients with ulcerative colitis <i>Wang YD, Tan XY, Zhang K</i></p> <p>3354 Gentamycin combined with sodium bicarbonate for prevention of irinotecan-induced diarrhea: an analysis of 52 cases <i>Mei Q, Cao Z, Chen Y</i></p>
CASE REPORT	<p>3359 Atypical Budd-Chiari syndrome induced by rare collateral pathways: one-case analysis <i>Lu SM, Duan ZJ, Liu LN, Zhang W, Wang F, Li F</i></p>
ACKNOWLEDGMENT	<p>3362 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
COVER	<p><i>Lu YY, Jing DD, Xu M, Wu K, Wang XP.</i> Anti-tumor activity of erlotinib in the BxPC-3 pancreatic cancer cell line. <i>World J Gastroenterol</i> 2008; 14(35): 5403-5411 http://www.wjgnet.com/1007-9327/14/5403.asp</p>
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	<p>Assistant Editor: <i>Hui Li</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Hai-Li Guo</i> Editor-in-Charge: <i>Jing-Hong Shi</i> English Language Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i> Proof Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i></p>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date October 18, 2008

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION

Department of Science and Technology of Shanxi Province

SPONSOR

Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

EDITING

Editorial Board of *World Chinese Journal of Digestology*, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Telephone: +86-351-4078656
E-mail: wjcd@wjgnet.com

PRINTING

Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Telephone: +86-351-4078656
E-mail: wjcd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

OVERSEAS DISTRIBUTOR

Beijing Bureau for Distribution of Newspapers and Journals (Code No. 82-261)
China International Book Trading Corporation PO Box 399, Beijing, China (Code No. M4481)

HONORARY EDITOR-IN-CHIEF

Bo-Rong Pan

EDITOR-IN-CHIEF

Lian-Sheng Ma

SCIENCE EDITORS

Director: Hai-Ning Zhang

SUBSCRIPTION

RMB 24 Yuan for each issue
RMB 864 Yuan for one year

CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

COPYRIGHT

© 2008 Published by *WCJD*. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

SPECIAL STATEMENT

All articles published in this journal represent the viewpoints of the authors except where indicated otherwise.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Full instructions are available online at www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.asp. If you do not have web access please contact the editorial office.

Copyright © 2008 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

胆管癌并阻塞性黄疸的影像学诊断及介入治疗现状与进展

韩新巍, 李臻

韩新巍, 李臻, 郑州大学第一附属医院放射科 河南省高校临床医学重点开放实验室 河南省郑州市 450052
韩新巍, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事影像学诊断及介入放射学研究。

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

收稿日期: 2008-05-02 修回日期: 2008-09-15

接受日期: 2008-10-07 在线出版日期: 2008-10-18

Progress in imaging diagnosis and interventional therapy of cholangiocarcinoma associated with obstructive jaundice

Xin-Wei Han, Zhen Li

Xin-Wei Han, Zhen Li, Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Dr. Xin-Wei Han, Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. hanxinwei2006@163.com

Received: 2008-05-02 Revised: 2008-09-15

Accepted: 2008-10-07 Published online: 2008-10-18

Abstract

Imaging examination is the major method to diagnose cholangiocarcinoma clinically, and different diagnostic methods have their own characteristics. Reasonable selection may help to improve diagnosis. With the development of imaging technology, progress in diagnosis of cholangiocarcinoma has been made. Interventional therapy has supplied an effective approach for the patients with advanced cholangiocarcinoma. However, many issues still exist in clinic, and the therapeutic methods are waiting for being standardized. Moreover, an scientific mode of interventional therapy should be established.

Key Words: Cholangiocarcinoma; Obstructive jaundice; Imaging diagnosis; Interventional radiology

Han XW, Li Z. Progress in imaging diagnosis and interventional therapy of cholangiocarcinoma associated with obstructive jaundice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi*

2008; 16(29):3249-3254

摘要

影像学检查是临床诊断胆管癌的主要方法, 但不同方法各具特点, 合理选择影像学检查途径有助于提高诊断率。随着影像学技术的发展, 胆管癌的影像学诊断取得了一定进展。介入治疗为中晚期胆管癌患者提供了有效的治疗措施, 但因治疗方法较多, 尚需规范, 亟需深入研究, 建立科学的介入治疗模式。

关键词: 胆管癌; 阻塞性黄疸; 影像诊断; 介入放射学

韩新巍, 李臻. 胆管癌并阻塞性黄疸的影像学诊断及介入治疗现状与进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(29): 3249-3254

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3249.asp>

0 引言

胆管癌(指肝外胆管癌和胆囊癌)是恶性阻塞性黄疸(obstructive jaundice, OJ)的主要病因, 发病率呈上升趋势。多数患者出现临床症状时已属进展期, 伴远隔转移, 预后差。实验室诊断特异性不高, 而外科病理学诊断困难且阳性率低。目前, 影像学检查仍是主要诊断方法^[1], 对肿瘤定位及临床分期评估极为重要, 但临床应用不规范, 影响检诊率。介入放射学已成为公认的治疗中晚期胆管癌的主要手段^[2], 不仅可行姑息性胆道引流术, 而且可进行抗肿瘤治疗及病理学活检^[3]。目前胆管癌性黄疸的介入疗效已得到临床一致的肯定, 但尚缺乏大宗病例的随机、对照研究, 治疗模式欠规范。随着医学影像诊疗技术的进步, 胆管癌并阻塞性黄疸的影像学诊断与介入治疗取得了一些进展, 特作一论述。

1 影像学诊断

1.1 超声诊断 超声因具有无创、简便、经济和可重复的特点, 已被临床证实为可信赖的诊断技术^[4], 其判定阻塞性黄疸的符合率和定位诊断符合率均为100%。彩色多普勒超声可进一步明确肿瘤与血管的关系, 有利于术前对可切除性的评

■背景资料

目前, 影像学检查仍是胆管癌的主要诊断方法, 对肿瘤定位及临床分期评估极为重要, 但临床应用不规范, 影响检诊率。介入放射学已成为公认的治疗中晚期胆管癌的主要手段。

■同行评议者

沈柏用, 副教授, 上海交通大学医学院附属瑞金医院肝胆胰外科中心

■ 研发前沿

目前胆管癌性黄疸的介入疗效已得到临床一致的肯定, 但尚缺乏大宗病例的随机、对照研究, 治疗模式欠规范。

估, 较普通B超更有临床意义. 腔内超声具有细径及高频的特点, 可反复对敏感区扫描, 能显示直径0.5 mm以上的病变, 对确定病因、指导治疗有积极作用. 但因探查范围有限, 对胆管内表浅占位性病变最有价值^[5]. 超声诊断亦有一定的局限性, 如诊断易受操作技术影响、存在漏/误诊情况等. 体形肥胖或胃肠道积气时使胆道显示困难, 常导致中下段胆管癌漏/误诊; 若采用饮水充盈胃肠以扩大声窗或脂餐法、利胆法等方法可进一步提高诊断率^[6].

1.2 PTC和ERCP 经皮肝穿刺胆管造影(PTC)和内镜逆行胰胆管造影(ERCP)作为经典的检查方法, 二者均有较高的空间分辨率, 其对胆管癌的诊断亦有共性, 主要以胆管扩张、狭窄或闭塞、充盈缺损等表现为主. PTC曾是诊断OJ的金标准, 对肝门部肿瘤确诊率达90%以上. 但因其有创性、仅显示胆管内腔而无法观察管壁、管外结构, 现已很少单纯用于诊断目的, 而成为介入治疗的过程之一. PTC术中可行必要的实验室检查, 如胆汁细菌培养和脱落细胞学等; 同时行胆道钳夹病理活检, 为后续治疗提供病理学依据. 此外, 顺行性胆管造影可自然显示壶腹部形态; 若PTC时胰管显影, 可进一步明确诊断是否伴有胰胆管合流异常^[7], 而胰胆管合流异常与胆管癌发病关系密切, 较具临床意义. PTC操作简单, 易于掌握, 并发症少, 技术成功率达100%, 已成为胆管癌介入治疗的主要手段.

ERCP因可通过肠镜直接观察病变并能活检, 是壶腹癌、胰头癌和下段胆总管癌首选的检查方法, 检诊率高于PTC; 对胆管炎性狭窄的诊断亦明显优于CT和超声^[8]. 若ERCP和PTC联合检查、相互补充, 可完整地显示胆系, 有助于明确病变性质、部位, 提高诊断率^[9]. ERCP下亦可可行支架或鼻胆管置入治疗淤胆, 但因检查有侵入性, 可引起急性胰腺炎、胆管炎、出血、穿孔等严重并发症, 限制了其临床应用.

1.3 CT诊断 CT平扫、增强及三维重建技术可显示胆管原发病灶和周围脏器的改变; 反映胆管扩张程度、肝叶体积变化及肿瘤血供等情况, 术前确诊率可达94%^[6], 对临床分期与预后评估有重要意义, 应用广泛. 近年来随着多排CT的应用, 出现了无创性螺旋CT胆道造影(SCTC), 他采用三维技术多角度显示胆道解剖结构, 确诊率高, 优于常规CT、ERCP及US^[10]; 另有认为SCTC空间分辨率不及ERCP或PTC, 尚不能完全

替代之^[11]. 多层螺旋CT曲面重组阴性法胆管成像为无创性胆管成像技术, 对肝外胆管癌的定性诊断率高, 显示肝外胆管癌与扩张胆管的关系更直观, 对合并症的诊断率明显高于MRCP, 在肝外胆管癌的诊断中具有独特的优越性^[12]. CT诊断不足之处在于难以精确显示肝门部结构和肿瘤范围, 早期主要通过间接征象进行诊断, 但与B超联合应用则相得益彰, 成为重要的诊断手段.

1.4 MRI和MRCP 磁共振成像(MRI)和磁共振胰胆管成像(MRCP)为胰胆管病变无创性诊断的重要方法, 对胆管癌的诊断价值已得到肯定^[13]. MRI可进行多序列、多方位扫描, 对胆汁信号敏感, 组织分辨率高, 冠状位成像更能反映肝门部结构, 较其他方法有明显的优势. 胆管癌MRI表现以胆管软藤样扩张的间接征象为主, 常缺乏明确的软组织块影. 直接征象: (1)管壁局限或弥漫增厚, 轴位呈“圆圈征”, 可不规则. 管壁厚度>5 mm, 应疑诊胆管癌. (2)软组织肿块, T1WI为低或等信号, T2WI为稍高信号; 增强扫描时肿块强化信号不均, 延迟强化明显. 有报道MRI显示胆管癌的肝内侵犯范围优于CT, 对评价肿瘤的可切除性及预后意义大, 但在显示肝外胆管壁时不及CT^[14].

MRCP因成像序列的改进及相控阵线圈的应用, 具有比ERCP更有价值的图像. 可清晰显示胆管梗阻端的形态, 如截断状、锥状、鸟嘴状、鼠尾状等, 截断处多不规则, 梗阻以下胆管不扩张. 胆管壁不规则增厚5 mm时即可在MRCP上得以显示^[15]. MRCP定位准确率高, 但空间分辨率稍差, 不能显示细微结构如黏膜的改变, 对狭窄性质的鉴别诊断不及PTC和ERCP. 对于重症黄疸患者如不适宜行CT增强检查时, MRCP可作为一种替代方法^[16].

1.5 血管造影(DSA) 由于有创性、费用高, 诊断性血管造影仅作为辅助性检查, 逐渐被无创性检查所替代, 而更多用于胆管癌的介入治疗. 但血管造影对于了解肿瘤血管侵袭、术前与预后的评价有着独特的优越性^[17]. 胆管癌一般为乏血供肿瘤, 血管造影多无明显肿瘤染色, 肿瘤血管可增粗、迂曲、扩张.

1.6 核素显像 正电子发射断层成像(PET)因其可评价胆管上皮的代谢状况, 反映病变在细胞代谢、受体、酶和基因表达等方面的变化, 已广泛应用于肿瘤功能成像. PET借助^[18F]氟-2-脱氧-D葡萄糖在胆管癌细胞与肝细胞内被磷酸化的程

度不同, 通过该葡萄糖类似物在癌细胞中累积形成的热区及信号背景比率的增强等特征进行诊断, 能确诊直径1 cm大小的胆管癌灶^[18]; 对胆管良恶性狭窄的鉴别诊断价值大^[19]. 但因存在空间分辨率低、对解剖结构显示不清、费用昂贵、检查时间长等缺陷, 临床应用较少; 多与CT联合用于肿瘤的诊治和疗效分析.

2 介入治疗

目前, 介入治疗已成为中晚期胆管癌公认的治疗手段, 疗效肯定, 尤适用于年老体弱、一般情况差和外科术后再发黄疸者^[20]. 胆管癌性黄疸的综合介入治疗方法较多, 规范化的治疗包括既要治标(解除黄疸)又要治本(根治病因), 力争做到标本兼治, 以改善预后^[21].

2.1 胆道外引流术 当胆道梗阻严重无法疏通时, 经PTC可放置外引流管以减轻淤胆, 近期效果满意, 可作为姑息性治疗手段. 但长期外引流可能导致胆管炎和引流管阻塞, 可尝试以抗生素盐水冲管或引流管置换. 但只要引流通畅, 一般不主张冲管, 以免增加外源性感染机会. 长期外引流还可导致电解质和消化液丢失、胃肠功能紊乱, 引起肠内菌群移位和内毒素血症, 已非首选^[22]. 通常仅在难以打通梗阻段时作暂时引流, 以消除胆道充血、渗出和水肿; 再二次打通梗阻一般均能成功^[23-24]. 此外, 由于穿刺、插管等操作刺激, 可引起局部胆管暂时性痉挛, 使本来已经严重狭窄的胆管处于完全闭塞状态, 局部注射利多卡因则有可能缓解痉挛而使导丝通过狭窄区^[24]. 故外引流主要为内引流治疗打下基础或作为术前胆道减压, 待病情缓解后, 再治疗原发病. 江志伟 *et al*^[25]报道经皮肝穿刺胆道引流术(PTCD)联合经皮内镜胃造口(PEG)行外引流胆汁回输及肠内营养支持, 可明显改善患者的生活质量. 动物实验表明经皮肝穿刺胆管-胃引流亦可缓解淤胆, 为治疗OJ提供了新思路, 还限于临床研究阶段^[26].

2.2 胆道内引流术 内引流恢复了胆汁的生理走行, 避免了胆汁流失的弊病; 既可保证患者的营养状态和体液、电解质平衡, 又可使胆汁进入肠道以助消化, 为胆道介入首选. 一般在PTCD后的2-3 d内外引流同时开放, 以加速胆汁排泄与分泌, 此后关闭外引流仅保留内引流.

关于内、外引流管和内支架的临床应用, 观点不一^[2]. 我们主张PTC下力争一次打通梗阻胆管, 置入支架和/或引流管实现内引流. 也有主

张分次置入引流管和内支架. 临床发现在胆道支架置入后, 直接封闭穿刺道而不再使用引流管, 近期疗效满意, 可提高患者生活质量、缩短住院周期、降低医疗费用. 不同方法各具优劣势: 支架置入后封闭穿刺道可能对防治胆系感染有益, 但再狭窄时需再次穿刺建立通道; 支架配合引流管既可加速胆汁排泄, 又保留了胆道与体外的通道, 便于后续治疗性操作如胆道活检、内照射、抗生素冲洗等. 综合文献, 多数主张胆道内支架和引流管一次置入完成. 引流管置入后因其远端在十二指肠, 常发生不同程度的反流性胆管炎, 临床值得重视. 对于高位梗阻患者, 可只将引流管远端置于胆总管而不越过十二指肠乳头, 以减少逆行感染发生率^[27]. 还有报道经引流管灌注化疗药物, 近期疗效与外科姑息治疗效果相仿, 远期疗效优于单纯引流组^[28].

2.2.1 胆道支架成型术 胆道内支架自临床应用, 不断发展与改进, 种类较多, 主要有塑料支架、金属支架两大类, 根据材料和质地又可细分为诸多种, 在胆管介入治疗中各具优势. (1)内引流管置入: 主要用于肿瘤晚期的姑息性治疗, 与金属支架相比更适合于胆道良性狭窄, 特别是术后再狭窄^[29]. 一般体内留置时间为3-6 mo, 可经穿刺道将其推入十二指肠随肠道蠕动排出体外; 亦可借助纤维十二指肠镜将其拔出, 是金属内支架和一般引流管的替代品. 缺点是因内径较细而易发生阻塞及移位, 远期开通率低, 但价格低廉易于普及. 一项非随机临床实验认为^[30], 对于良性狭窄, 内引流管的开通时间较金属内支架为长, 为4 mo左右, 原因可能为内引流管对胆管内皮刺激较小, 较少引起其过度反应性增生. 另有报道^[31]对于胆管上段梗阻时内引流管占优势, 而下段梗阻时更适于金属支架置入. 但多数研究已表明内引流管置入的临床疗效不及金属支架^[19,32], 目前临床已较少应用. (2)内支架置入: 国产胆道金属支架应用广泛, 疗效确切^[33], 日益应用于胆管梗阻性疾病, 达到内引流目的, 技术成功率可达97.5%, 黄疸解除率为98.3%^[34]; 已成为胆管癌介入治疗的主要内容^[35], 但也存在诸多亟需解决的问题, 如多支架置入的适应症、支架再狭窄、并发症防治及治疗规范化等已成为临床研究的热点问题.

当PTC显示肝内多个胆管分支受累时, 临床欲尽可能多地解除梗阻, 常需置入多个支架,

■ 相关报道

韩新巍 *et al* 针对阻塞性黄疸胆道病理活检结果个体化选择理想的抗肿瘤治疗, 疗效确切.

■同行评价

本文针对近年来介入放射学技术在胆管癌方面的一些应用做了详尽的描述, 语言流畅, 实用性强, 具有较好的学术价值。

为此提出了“单通道双支架”、“双通道多支架”等技术方法^[36]和多样化支架组合方式(如T型、Y型等), 旨在通畅引流。但临床实践发现有时胆汁引流并不通畅, 黄疸消退慢, 再狭窄出现较早且发生率高^[37]。分析原因, 一方面与淤胆时间长、肝功能储备能力差、肿瘤进展有关; 另一方面是多支架网眼交错影响胆汁引流; 支架肝内段也可能遮挡对侧的胆管分支引流不畅; 故要慎重对待多支架置入问题。一般而言, 若胆道长期梗阻致肝脏出现“萎缩-肥大复合征”时, 萎缩叶胆管不须处理, 使代偿肝叶胆汁引流通畅即可^[38]。若肝门部多支胆管分支受累(Bismuth IV型), 多考虑引流管置入, 力争保持主肝管通畅引流, 兼顾分支胆管。合并胆道感染时, 应先放置引流管, 待黄疸减轻、炎症控制后再置入支架。过早置入支架可能因胆管黏膜和肿瘤组织水肿造成短期内再狭窄。

低位胆道梗阻支架置入时, 若跨越十二指肠乳头, 可能影响胰管开口, 发生胰腺炎的风险会增高^[39], 应引起注意。除PTCD外, ERCP亦可内支架置入解除胆总管下段梗阻, 有报道ERCP失败时, PTCD与ERCP对接可置入胆道支架^[40], 为另一治疗途径, 具有一定的临床价值。

胆道内支架置入后再狭窄是困扰临床的难题^[41]。公认的主要原因是肿瘤进展而阻塞支架或引流管, 也有其他阻塞因素如血块、菌团等^[42]。对于胆总管病变, 若支架越过壶腹部, Oddi括约肌功能受影响, 肠道内容物长期反流可能导致支架再狭窄。Born *et al*^[43]还认为因长期肠道蠕动, 可能存在支架断裂之虞; 但Chiou *et al*^[44]报道支架是否越过壶腹部并不影响其开通率。针对支架再狭窄的处理措施, 观点不一。谢宗贵 *et al*^[34]报道采用用于血管介入的旋切导管, 切除肿瘤使支架再通; 或支架内再次留置支架即“支架内支架”技术, 疗效满意。另有报道覆膜金属支架可限制肿瘤向腔内生长而延长开通时间^[45], 但存在一些缺点, 如伴随急性胆管炎症状、支架移位等^[41]。但Yoon *et al*报道覆膜支架与裸支架相比, 支架远期开通率无显著差异^[46]。郑建伟 *et al*^[47]实验研究报道通过经强磁场磁化后具有30 mT磁强度的镀膜金属胆道支架丝, 建立局部的内磁场和梯度磁场后静脉注射纳米磁性化疗药物, 进行磁靶向化疗, 可有效抑制肿瘤生长, 显示强大的治疗潜力。总之, 采取积极的抗肿瘤治疗是维持支架长期开通、提高患者生存期的

根本措施。

对于经其他减黄治疗疗效较差者, 经PTC支架置入不失为一种挽救措施。临床中, 部分胆管癌(特别是肝门部胆管癌)或胆石症患者经外科T管或ERCP鼻胆管引流后, 疗效差。主要原因是肿瘤侵犯多个胆管分支, 主肝管受累, 淤胆不能彻底引流; 或因远端狭窄、梗阻而不能拔管, 生活质量差。介入放射学可先经原T管/鼻胆管造影, 再行PTC打通阻塞处胆道置入内支架; 或经原T管途径对狭窄处行球囊扩张。在通畅引流后可拔除T管或鼻胆管, 极大提高了患者生活质量, 近期效果显著。若通过PTC对外科术后胆道再狭窄处行病理活检, 可进一步明确狭窄的性质(肿瘤复发抑或炎性狭窄), 决定后续治疗方法。

2.3 肿瘤介入治疗 当PTCD解决淤胆问题后, 介入行抗肿瘤治疗成为后续治疗的主体部分, 也是保证支架置入疗效的重要措施^[48]。目前, 胆管癌介入治疗主要包括选择性动脉插管灌注化疗栓塞术、胆道腔内外放射治疗、物理或化学消融治疗等措施。

2.3.1 经动脉灌注化疗栓塞术(TACE): 经PTCD黄疸消退后对肿瘤行TACE, 对缩小瘤体, 提高支架远期开通率大有裨益, 此即王建华 *et al*^[49]首先提出的双介入治疗, 现已广泛应用于临床; 尤对于富血供肿瘤, 疗效显著。双介入治疗进一步拓展了胆管癌治疗的内涵, 提高了传统介入治疗的疗效, 延长了患者生存期^[50]。韩新巍 *et al*^[51]针对阻塞性黄疸胆道病理活检结果个体化选择理想的抗肿瘤治疗, 疗效确切。

2.3.2 胆道腔内、外照射治疗: 借助PTCD保留的通道或鞘管送入内照射探头, 将放射源置于肿瘤部位, 辅助应用血卟啉衍化物作为致敏剂, 按照计划对肿瘤行内照射治疗, 可抑制肿瘤生长^[52]。低剂量内照射既可预防内皮细胞过度增生又可阻止炎性肉芽过度形成, 治疗剂量照射尤适用于预防癌灶生长引起的支架再狭窄, 目前临床应用支架辅助¹²⁵I粒子内照射已取得良好疗效。已经证实胆道内支架引流结合放疗可明显提高胆管癌患者的生存期^[53]。非对照性研究^[54]显示置入放射性粒子铈行腔内短距离照射, 并结合化疗、体外放疗, 与单用支架治疗对比, 中位生存期延长3.7 mo, 但随机对照的前瞻性研究尚待进一步开展。

2.3.3 其他介入治疗: 经皮瘤体内无水酒精注射、微波及射频消融(RFA)等治疗胆管癌均有

报道. 自Zgodzinski *et al*^[55]首先报告RFA治疗1例无法切除的孤立性肝内胆管细胞癌以来, RFA已广泛应用于胆管实体癌灶的治疗, 且疗效肯定. 范卫君 *et al*^[56]在PTCD基础上采用RFA、动脉灌注化疗等多种介入方法序贯治疗取得满意疗效.

3 结论

临床与影像学诊断相结合, 对胆管癌性黄疸可作出明确的定性、定位诊断. 基于胆管癌病理学特点行个体化综合介入治疗, 可明显改善晚期患者的生活质量, 在临床治疗中将处于主导地位. 对胆管癌性黄疸, 提倡条件许可时应尽可能在介入减黄后积极治疗原发病. 整个治疗过程中要求多学科团队合作, 治疗目标要强调患者生活质量是首要问题, 其次是生存期.

虽然我国胆管癌介入治疗已积累了丰富的经验, 部分技术甚至达到国际水平, 但各级医院诊治水平参差不齐, 技术操作规范化、并发症预防、临床资料总结、随访等系列研究方面与国外相比尚有差距. 开展临床随机对照研究; 提高和普及MRCP及多层螺旋CT(MSCT)等无创性检查方法在胆管癌性黄疸诊断中的应用; 全面评价胆道内支架远期疗效; 建立胆管癌性黄疸的个体化介入治疗模型等问题是今后我们努力的方向.

4 参考文献

- 1 Malhi H, Gores GJ. Cholangiocarcinoma: modern advances in understanding a deadly old disease. *J Hepatol* 2006; 45: 856-867
- 2 韩新巍. 阻塞性黄疸介入诊断与治疗操作规范讨论. *介入放射学杂志* 2002; 11: 393-396
- 3 韩新巍, 李臻, 管生, 马南, 王艳丽, 张伟, 刘子伦, 张伟. 阻塞性黄疸临床诊断中比较影像学的应用价值分析. *中原医刊* 2006; 30: 31-32
- 4 Albu S, Tantau M, Sparchez Z, Branda H, Suteu T, Badea R, Pascu O. Diagnosis and treatment of extrahepatic cholangiocarcinoma: results in a series of 124 patients. *Rom J Gastroenterol* 2005; 14: 33-36
- 5 金杰, 丁文彬, 袁瑞凡, 钱俊波. 经皮胆管内超声诊断阻塞性黄疸的临床价值. *中国医学影像学杂志* 2007; 15: 449-451
- 6 程红岩, 李斯婕. 非创伤性影像学诊断胆管癌. *实用肿瘤杂志* 2007; 22: 101-103
- 7 李臻, 马骥, 韩新巍. PTC对胰胆管合流异常的诊断. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 966-970
- 8 戴文海, 邓燕贤, 罗敏, 徐军红, 邱维加. B超, ERCP, CT检查对梗阻性黄疸的诊断价值. *实用诊断与治疗杂志* 2005; 19: 95-97
- 9 杨威, 胡虞乾. 肝门部胆管癌的诊断进展. *医学综述* 2006; 12: 1373-1374
- 10 徐爱民, 程红岩, 姜文斌, 陈栋, 贾雨辰, 吴孟超. 多排螺旋CT三维成像技术在胆系的临床应用. *中华肝胆外*

- 科杂志 2002; 8: 203-209
- 11 周康荣. 中华影像医学(肝胆胰脾卷). 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 195-201
- 12 王礼同, 李澄, 顾振, 陈建, 何玲, 袁红梅. MSCT曲面重组阴性法胆管成像与MRCP对肝外胆管癌的诊断比较. *中国医学影像技术* 2007; 23: 1194-1197
- 13 Kim MJ, Mitchell DG, Ito K, Outwater EK. Biliary dilatation: differentiation of benign from malignant causes--value of adding conventional MR imaging to MR cholangiopancreatography. *Radiology* 2000; 214: 173-181
- 14 高雪梅, 黎庶, 郭华, 马述盛, 张景荣, 杨晓鹏. 高位胆道梗阻的CT与MRI, MRCP诊断价值. *实用放射学杂志* 2002; 18: 561-563
- 15 Masselli G, Gualdi G. Hilar cholangiocarcinoma: MRI/MRCP in staging and treatment planning. *Abdom Imaging* 2008; 33: 444-451
- 16 项立, 胡卫东, 王凯, 佟双喜, 赵勇, 姜明武. MRCP ERCP对胆道梗阻疾病的对比研究. *实用医技杂志* 2006; 13: 3160-3162
- 17 温锋, 郭启勇, 卢再鸣, 廖伟, 刘兆玉. HC的血管造影表现分析. *中国医学影像技术* 2003; 19: 71-73
- 18 孟兴凯, 杨成旺. 胆管癌的诊断及治疗进展. *内蒙古医学院学报* 2002; 24: 127-130
- 19 Nishiyama Y, Yamamoto Y, Kimura N, Miki A, Sasakawa Y, Wakabayashi H, Ohkawa M. Comparison of early and delayed FDG PET for evaluation of biliary stricture. *Nucl Med Commun* 2007; 28: 914-919
- 20 van Delden OM, Laméris JS. Percutaneous drainage and stenting for palliation of malignant bile duct obstruction. *Eur Radiol* 2008; 18: 448-456
- 21 韩新巍. 积极开展阻塞性黄疸的介入放射学病理诊断和综合治疗. *介入放射学杂志* 2002; 11: 322-323
- 22 王高仁, 鞠永健, 丁文彬, 金杰, 杨劲松. 经皮肝穿刺胆道内支架引流术治疗恶性阻塞性黄疸21例疗效分析. *中国癌症杂志* 2006; 16: 511-512
- 23 吴安乐, 颜志平, 王建华, 罗剑钧, 程洁敏, 钱晟, 王小林, 刘清欣, 龚高全, 刘清欣, 钱晟, 罗剑钧. 恶性梗阻性黄疸的微创法引流. *临床放射学杂志* 2002; 21: 448-451
- 24 陈晓明, 陆骊工, 李勇, 胡宝山, 罗鹏飞. 完全型恶性阻塞性黄疸胆管再通的方法探讨. *临床放射学杂志* 2006; 25: 1051-1054
- 25 江志伟, 黎介寿, 李宁, 汪志明, 姜军, 李国立. 经皮肝穿刺胆管引流联合经皮内镜下胃造口行外引流胆汁回输及肠内营养支持治疗癌性阻塞性黄疸. *中华胃肠外科杂志* 2004; 7: 188
- 26 吕维富, 胡曙东, 王伟昱, 张学彬, 侯昌龙, 张行明. 经皮肝穿刺胆管-胃引流治疗梗阻性黄疸动物实验. *介入放射学杂志* 2007; 16: 269-272
- 27 王文明, 盛玉国, 王保华, 李乃选, 荆秀荣, 段新武, 许春华. 恶性梗阻性黄疸的介入治疗. *滨州医学院学报* 2007; 30: 89-90
- 28 杨甲梅, 谢峰. 胆管癌介入治疗进展. *临床外科杂志* 2006; 14: 76-77
- 29 曾庆乐, 李彦豪, 陈勇, 何晓峰, 王江云. 经皮肝穿胆道内涵管置入治疗梗阻性黄疸. *中国肿瘤* 2000; 9: 422-424
- 30 Dumonceau JM, Devière J, Delhaye M, Baize M, Cremer M. Plastic and metal stents for postoperative benign bile duct strictures: the best and the worst. *Gastrointest Endosc* 1998; 47: 8-17
- 31 Lammer J, Hausegger KA, Flückiger F, Winkelbauer FW, Wildling R, Klein GE, Thurnher SA, Havelec L. Common bile duct obstruction due to malignancy: treatment with plastic versus metal stents. *Radiology*

- 1996; 201: 167-172
- 32 郭元星, 李彦豪, 陈勇, 俞志坚, 陈平雁, 罗鹏飞, 李勇, 单鸿, 姜在波. 金属支架、内窥镜治疗恶性胆道梗阻的临床疗效比较(多中心研究). 第一军医大学学报 2003; 23: 1237-1241
- 33 罗祖炎, 陈方宏, 袁建华, 俞文强, 刘子江. 国产胆道金属支架的临床应用. 介入放射学杂志 2004; 13: 433-435
- 34 谢宗贵, 张希全, 李凡东, 金鹏, 易玉海, 张绪平. 胆道支架技术5年回顾(213例随访报告). 中华肝胆外科杂志 2002; 8: 595-597
- 35 Güitrón-Cantú A, Adalid-Martínez R, Gutiérrez-Bermúdez JA. [Self-expandable metallic biliary endoprosthesis in malignant obstructive jaundice] *Rev Gastroenterol Mex* 2005; 70: 247-252
- 36 谢宗贵, 李新民, 金鹏, 谢志勇, 易玉海, 张绪平. 单通道双支架植入技术治疗肝门部胆管癌. 介入放射学杂志 2003; 12: 436-438
- 37 翟仁友, 戴定可, 王剑锋, 于平, 魏宝杰. 高位胆管梗阻的介入治疗和近期疗效分析. 介入放射学杂志 2006; 15: 491-493
- 38 Covey AM, Brown KT. Palliative percutaneous drainage in malignant biliary obstruction. Part 1: indications and preprocedure evaluation. *J Support Oncol* 2006; 4: 269-273
- 39 宛新建, 郑萍, 王兴鹏, 万荣, 周如茵, 王娜, 茅柳水. 金属和塑料支架置入治疗胰头癌伴阻塞性黄疸的疗效分析. 胰腺病学 2007; 7: 285-287
- 40 刘迎娣, 王志强, 王向东, 杨云生, 令狐恩强, 李闻, 蔡逢春. 经皮经肝胆管引流术与ERCP对接胆道支架植入术治疗梗阻性黄疸. 解放军医学杂志 2006; 31: 1101-1102
- 41 Tsuyuguchi T, Takada T, Miyazaki M, Miyakawa S, Tsukada K, Nagino M, Kondo S, Furuse J, Saito H, Suyama M, Kimura F, Yoshitomi H, Nozawa S, Yoshida M, Wada K, Amano H, Miura F. Stenting and interventional radiology for obstructive jaundice in patients with unresectable biliary tract carcinomas. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2008; 15: 69-73
- 42 杨立, 时惠平. 胆道梗阻性病变的介入治疗: 金属内支架技术临床研究现状. 中国医学影像技术 1998; 14: 227-229
- 43 Born P, Rösch T, Classen M. Breakage of an endobiliary metal stent. *Endoscopy* 1996; 28: 526
- 44 Chiou YY, Tseng HS, Chiang JH, Hwang JI, Chou YH, Chang CY. Percutaneous placement of metallic stents in the management of malignant biliary obstruction. *J Formos Med Assoc* 2005; 104: 738-743
- 45 Nakamura T, Kitagawa M, Takehira Y, Yamada M, Kawasaki T, Nakamura H. Polyurethane-covered Wallstents to recanalize Wallstents obstructed by tumor ingrowth from malignant common bile duct obstruction. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2000; 23: 161-164
- 46 Yoon WJ, Lee JK, Lee KH, Lee WJ, Ryu JK, Kim YT, Yoon YB. A comparison of covered and uncovered Wallstents for the management of distal malignant biliary obstruction. *Gastrointest Endosc* 2006; 63: 996-1000
- 47 郑建伟, 唐涛, 肖宝来, 陈波, 李宏, 程海斌, 邹声泉. 内磁场在磁靶向治疗胆道恶性肿瘤中作用的实验研究. 北京医学 2006; 28: 726-729
- 48 Qian XJ, Zhai RY, Dai DK, Yu P, Gao L. Treatment of malignant biliary obstruction by combined percutaneous transhepatic biliary drainage with local tumor treatment. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 331-335
- 49 王建华, 王小林, 颜志平. 腹部介入放射学. 上海: 上海医科大学出版社, 1998: 113
- 50 Herber S, Otto G, Schneider J, Manzl N, Kummer I, Kanzler S, Schuchmann A, Thies J, Düber C, Pitton M. Transarterial chemoembolization (TACE) for inoperable intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2007; 30: 1156-1165
- 51 韩新巍, 李永东, 马南, 邢古生, 马波, 吴刚. 胆管癌性阻塞内支架术后再次狭窄的介入治疗. 介入放射学杂志 2002; 11: 354-356
- 52 Ortner MA, Dorta G. Technology insight: Photodynamic therapy for cholangiocarcinoma. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; 3: 459-467
- 53 Válek V, Kysela P, Kala Z, Kiss I, Tomásek J, Petera J. Brachytherapy and percutaneous stenting in the treatment of cholangiocarcinoma: a prospective randomised study. *Eur J Radiol* 2007; 62: 175-179
- 54 Khan SA, Davidson BR, Goldin R, Pereira SP, Rosenberg WM, Taylor-Robinson SD, Thillainayagam AV, Thomas HC, Thursz MR, Wasan H. Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: consensus document. *Gut* 2002; 51 Suppl 6: VII-VI9
- 55 Zgodzinski W, Espat NJ. Radiofrequency ablation for incidentally identified primary intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5239-5240
- 56 范卫君, 吴沛宏, 张亮, 黄金华, 张福君, 顾仰葵, 赵明, 黄祥龙, 郭昌宇. III、IV型肝门区胆管腺癌的介入治疗. 中华放射学杂志 2005; 39: 925-929

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志栏目设置

本刊讯 本刊栏目设置包括述评, 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. 文稿应具有科学性、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. (常务副总编辑: 张海宁 2008-10-18)

Fas、FasL及Caspase-3在维甲酸诱导胃癌细胞凋亡中的作用

张红英, 李锦毅, 张建永

张红英, 李锦毅, 武警总医院 北京市 100039
张建永, 辽宁医学院 辽宁省锦州市 121001
张红英, 主治医师, 主要从事肿瘤治疗及科研管理工作。
国家自然科学基金资助项目, No. 30672771
作者贡献分布: 本课题由张红英与李锦毅设计; 研究过程由张红英与张建永操作完成; 研究所用试剂及工具由张红英与李锦毅提供; 数据分析由张红英, 张建永及李锦毅完成; 本论文写作由张红英与李锦毅完成。
通讯作者: 李锦毅, 100039, 北京市海淀区永定路69号, 武警总医院临床教研室, lijinyi.li@vip.sina.com
电话: 010-88276846
收稿日期: 2008-08-22 修回日期: 2008-09-17
接受日期: 2008-09-22 在线出版日期: 2008-10-18

Effect of Fas, FasL and Caspase-3 on apoptosis of retinoic acid-induced gastric carcinoma cells

Hong-Ying Zhang, Jin-Yi Li, Jian-Yong Zhang

Hong-Ying Zhang, Jin-Yi Li, the General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China
Jian-Yong Zhang, Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30672771
Correspondence to: Dr. Jin-Yi Li, Department of Clinic, the General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China. lijinyi.li@vip.sina.com
Received: 2008-08-22 Revised: 2008-09-17
Accepted: 2008-09-22 Published online: 2008-10-18

Abstract

AIM: To explore the effect on apoptosis of retinoic acid (RA)-induced BGC-803 gastric carcinoma cells and its relationship with the expression of Fas, FasL and Caspase-3.

METHODS: BGC-803 cells were treated with different concentrations of RA (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$) for 72 h. Then methyl-tetrazolium (MTT) assay was performed to determine the growth inhibition of BGC-803 cells; cell apoptosis rate was determined using flow cytometry; the feature of cell apoptosis was observed by Hoechst33342/PI staining; the mRNA expression of Fas, FasL and Caspase-3 were estimated using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: After BGC-803 cells were treated with RA (0.1-20 $\mu\text{mol/L}$) for 72 h, RA inhibited the growth of cells significantly compared with that in the control group (32.61%, 44.42%, 48.14%, 51.15% vs 0.657%; all $P < 0.01$). Cells in G_2/M were significantly increased after the cells were treated with 20 $\mu\text{mol/L}$ RA for 12 h, 24 h and 48 h. G_1 peak specific to apoptosis was observed and also observed were chromatic agglutination and rupture of caryon membrane. Expressions of Fas, FasL and Caspase-3 mRNA were up-regulated significantly by RA for 48 h compared with that in the control group.

CONCLUSION: Fas, FasL and Caspase-3 are involved in gastric carcinoma cell apoptosis induced by RA.

Key Words: Fas; FasL; Caspase-3; Retinoic acid; Gastric carcinoma; Apoptosis

Zhang HY, Li JY, Zhang JY. Effect of Fas, FasL and Caspase-3 on apoptosis of retinoic acid-induced gastric carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(29): 3255-3260

摘要

目的: 探讨维甲酸诱导胃癌细胞BGC-803凋亡的作用及其与Fas、FasL、Caspase-3表达的关系。

方法: 以0.001、0.01、0.1、1、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 的维甲酸作用BGC-803细胞72 h后, MTT法检测维甲酸对BGC-803细胞的生长抑制作用; 流式细胞术分析维甲酸对胃癌BGC-803细胞凋亡的诱导作用; Hoechst33342/PI双荧光染色观察细胞凋亡; RT-PCR法检测Fas、FasL、Caspase-3基因的mRNA表达变化。

结果: 0.1、1、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 的维甲酸作用BGC-803细胞72 h后, 较对照组(未加药)能显著抑制细胞增殖(32.61%、44.42%、48.14%、51.15% vs 0.657%, 均 $P < 0.01$); 20 $\mu\text{mol/L}$ 维甲酸作用BGC-803细胞12、24和48 h后, G_2/M 期

背景资料

维甲酸(retinoic acid, RA)研究较多的是诱导白血病细胞分化, 近年发现其对实体瘤细胞凋亡也有重要作用, 是肿瘤治疗的一个新靶点。

同行评议者

刘连新, 教授, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科

■ 研究前沿

维甲酸对细胞生长、分化和凋亡具有重要作用,有研究表明其可诱导胃癌细胞凋亡,但其诱导凋亡的具体机制及作用方式不甚清楚,如能深入研究维甲酸诱导胃癌细胞凋亡机制,将会为胃癌治疗提供新的途径和方法。

细胞比例显著增加,出现凋亡特征性的亚G₁峰;细胞出现染色质凝集、核膜破裂等凋亡特征;作用48 h后,Fas、FasL、Caspase-3 mRNA表达水平均较对照组显著上调。

结论: Fas、FasL、Caspase-3参与了维甲酸诱导胃癌细胞凋亡的调控过程。

关键词: Fas; FasL; Caspase-3; 维甲酸; 胃癌; 细胞凋亡

张红英, 李锦毅, 张建永. Fas、FasL、Caspase-3在维甲酸诱导胃癌细胞凋亡中的作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(29): 3255-3260

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3255.asp>

0 引言

Fas、FasL、Caspase-3是调控细胞凋亡的重要基因,在肿瘤的发生、发展、转移中扮演着重要角色。Fas与其配体FasL结合后,凋亡信号被传送到细胞内,通过激活下游的Caspase-3诱导细胞凋亡。维甲酸(retinoic acid, RA)研究较多的是诱导白血病细胞分化,近年发现其对实体瘤细胞凋亡也有重要作用^[1-3],国外学者有一些相关报道,但维甲酸诱导胃癌细胞凋亡的分子机制研究很少。本文观察了维甲酸诱导细胞凋亡作用及Fas、FasL、Caspase-3表达对其的影响,从而确定Fas、FasL、Caspase-3参与维甲酸诱导胃癌细胞凋亡的调控过程。

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌细胞株BGC-803由中科院肿瘤研究所提供。RA购自Sigma公司。RA用无水乙醇配成0.01 mol/L的储存液(乙醇终浓度控制在<1 mL/L,避光、-20℃保存)。培养基RPMI 1640、噻唑蓝(MTT)、蛋白酶K、RNase、Hoechst33342、碘化丙啶(PI)和二甲基亚砜(DMSO)均购自Sigma公司。TRIzol购自Promega公司。RT-PCR试剂盒购自大连宝生物公司,引物由上海生物工程技术服务公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 培养细胞在含100 mL/L灭活小牛血清、100 kU/L青霉素、100 mg/L链霉素的RPMI 1640培养液中,于37℃的50 mL/L CO₂饱和湿度下培养,细胞初始浓度为5×10⁸/L,取指数生长期细胞进行实验。

1.2.2 MTT法检测RA作用胃癌细胞后细胞生长抑制: 将BGC-803细胞浓度调整为5×10⁷/L,

接种96孔板,每孔100 μL,培养24 h后,根据参考文献[4]分别加入RA,终浓度分别为0.001、0.01、0.1、1、10、20 μmol/L。设对照组(不加药)和空白组(培养液中无细胞),每组设8个复孔,在药物作用72 h,加入MTT(5 g/L) 20 μL,继续培养4 h,离心,弃上清,加DMSO 200 μL,避光振荡15 min,全自动酶标仪测定570 nm处紫外吸光度值(A)。计算药物对细胞生长抑制率。生长抑制率=[(对照组A-实验组A)/(对照组A-空白组A)]×100%。

1.2.3 流式细胞光度术检测细胞凋亡: 通过预实验,选择MTT实验抑制率最明显药物浓度为流式检测浓度。以20 μmol/L RA处理BGC-803细胞0、12、24、36、48 h后收集细胞,4℃体积分数为750 mL/L乙醇固定,-20℃冰箱保存。检测前,PBS洗3次,RNA酶消化,PI染色,流式细胞仪分析DNA含量,计数10 000个细胞,进行细胞凋亡和细胞周期分析,检测群体细胞中G₀/G₁、S、G₂/M期细胞百分率,亚G₁峰为凋亡细胞峰。以0 h未加RA处理的BGC-803细胞为对照组。

1.2.4 Hoechst33342/PI双荧光染色法检测细胞凋亡的形态学改变: 20 μmol/L RA处理BGC-803细胞0、24、48 h,收集细胞,PBS洗涤,移入Eppendorf管,用200 μL PBS悬浮细胞,加入Hoechst33342/PI染液(1:1) 40 μL,37℃染色8 min,离心弃上清,PBS吹打混匀,涂片,荧光显微镜(日本NikonE800)观察并照相。

1.2.5 RT-PCR检测Fas、FasL、Caspase-3基因的表达: 以未加药的BGC-803细胞为对照组,20 μmol/L RA处理的BGC-803细胞为实验组,分别作用12、24、48 h。TRIzol法提取细胞总RNA,以紫外分光光度计测RNA含量和纯度(RNA在260 nm和280 nm的吸光度比值为1.8-2.0之间),以10 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性(28S和18S RNA条带比值≥2.0)。用1 μg总RNA进行逆转录合成cDNA,反应条件如下:30℃,10 min,42℃,30 min,99℃,5 min,5℃,5 min。将上述逆转录产物按RT-PCR试剂盒进行扩增反应,以GAPDH作为内标,应用Omega2.0设计Fas的上游引物为:5'-GACCCAGAATACCAAGTGCAGATGTA-3',下游引物:5'-CTGTTTCAGGATTTAAGGTTGGAGATT-3',扩增片段为296 bp。FasL的上游引物为:5'-ATCCCTCTGGAATGGGAAGA-3',下游引物:5'-CCATATCTGTCCAGTACTGC-3',扩增片段为240 bp。Caspase-3的上游引物:5'-CATGGCCTGTCAGAAAATAC-3',下游引物:5'-TA

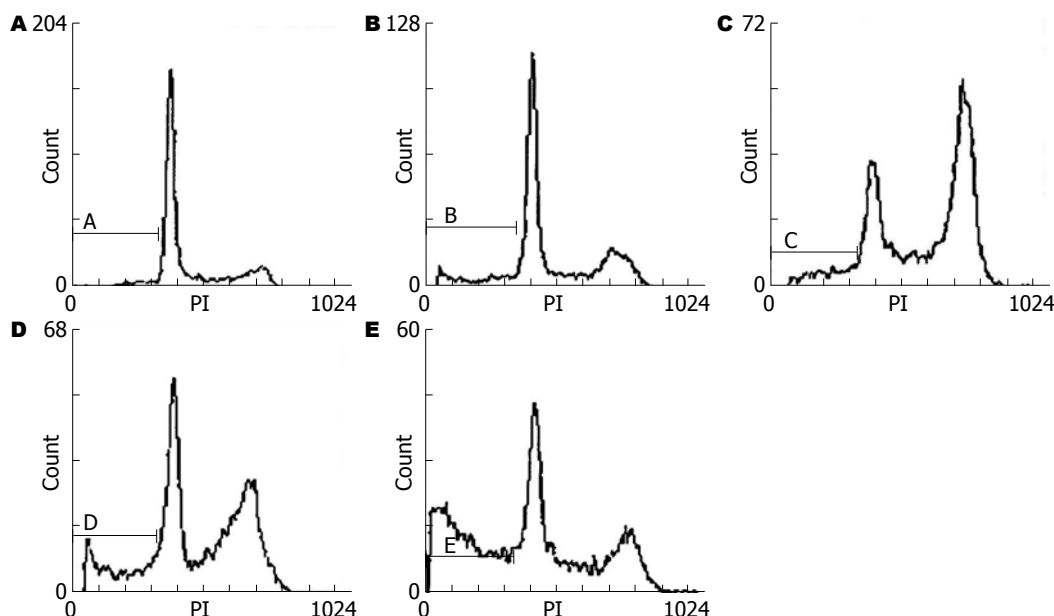


图 1 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡. A: 对照组; B: 20 μmol/L RA作用12 h; C: 20 μmol/L RA作用24 h; D: 20 μmol/L RA作用36 h; E: 20 μmol/L RA作用48 h.

■ 创新盘点
 本文观察了不同剂量下维甲酸对胃癌细胞BGC-803的作用, 观察了20 μmol/L浓度下维甲酸诱导细胞凋亡的形态学变化, 发现在20 μmol/L浓度下随着维甲酸作用时间的延长, 上调了Fas、FasL、Caspase-3的表达水平. 由此我们认为, 维甲酸可在体外呈时间和浓度依赖性抑制人胃癌BGC-803细胞的生长, 其作用机制可能主要是诱导细胞凋亡和影响细胞周期, 同时诱导细胞凋亡的机制可能部分是通过上调Fas、FasL、Caspase-3的表达实现的.

表 1 20 μmol/L RA对胃癌细胞周期的影响 (%)

t(h)	亚G ₁ 期	G ₀ /G ₁ 期	S期	G ₂ /M期
0	3.8	63.7	26.3	10.4
12	6.8	53.7	28.9	22.3
24	10.2	22.5	34.5	47.1
36	19.6	33.8	26.7	40.3
48	38.7	42.5	40.8	20.2

ACCCGAGTAAGAATGTGC-3', 扩增片段为176 bp. 循环条件: 预变性94°C, 2 min, 变性94°C, 30 s, 退火58°C, 1 min, 延伸72°C 1 min. 33个循环后72°C维持5 min. PCR产物行20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 凝胶自动成像2000系统扫描, 取其积分值作为量化指标, 以特异性基因条带与GAPDH基因条带的密度比值表示不同样本间的相对量.

统计学处理 所有数据以SPSS12.0统计软件处理, 两样本均数的比较采用t检验, 多组比较用单因素方差分析.

2 结果

2.1 MTT细胞增殖实验 用0.001、0.01、0.1、1、10、20 μmol/L RA作用BGC-803细胞72 h, 对BGC-803细胞的生长抑制作用呈剂量依赖性, 细胞生长抑制率分别为0.984%、6.83%、32.61%、44.42%、48.14%和51.15%, 其中0.1、1、10、20 μmol/L RA的抑制作用显著强于对照组0.657%($P<0.01$), 20 μmol/L RA的抑制率显著

高于其他各组($P<0.01$).

2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡 20 μmol/L RA处理BGC-803细胞12、24 h, 出现明显诱导G₂/M期阻滞, 对照组G₂/M期细胞所占百分率为10.4%, 实验组12、24、36、48 h后G₂/M期细胞所占百分率分别为22.3%、47.1%、40.3%、20.2%(表1). 结果显示在20 μmol/L RA作用细胞24 h后, 出现的G₂/M期阻滞最为明显; 36、48 h后细胞所占百分率下降, 考虑可能为肿瘤细胞对于RA的耐药性引起. 20 μmol/L RA作用BGC-803细胞12、24、36、48 h的凋亡率, 均高于对照组的凋亡率(7.82%、9.88%、18.69%、40.14% vs 3.05%, $P<0.05$, 图1), 并出现凋亡典型性特征“亚G₁峰”.

2.3 荧光显微镜观察结果 Hoechst33342/PI双荧光染色法可区别正常细胞、凋亡细胞和坏死细胞, Hoechst33342是一种亲脂性物质, 为活细胞染料, 毒性较弱, 是双苯丙咪唑的衍生物, 可与DNA的A-T碱基区特异结合, 跨膜进入活细胞, 将活细胞和凋亡细胞中DNA染成蓝色; 当质膜不完整时, PI可嵌入到双链DNA或RNA中, 细胞被PI染色呈红色, 并可观察到断裂凝集的染色质. 由图2可见, 正常组BGC-803细胞大小一致, 被Hoechst33342染成淡蓝色荧光, 细胞形态规整, 细胞核较大(图2A). 20 μmol/L RA处理细胞24 h后, 可见下列规律性变化: 细胞被染成蓝色荧光, 形态不规则, 核染色质凝集, 核分叶及碎片状, 核膜破裂等凋亡细胞形态(图2B); 48 h后上

应用要点

本研究维甲酸诱导胃癌细胞凋亡的有效浓度和剂量, 探讨其作用机制, 为维甲酸在临床胃癌治疗中提供了一定的理论基础。

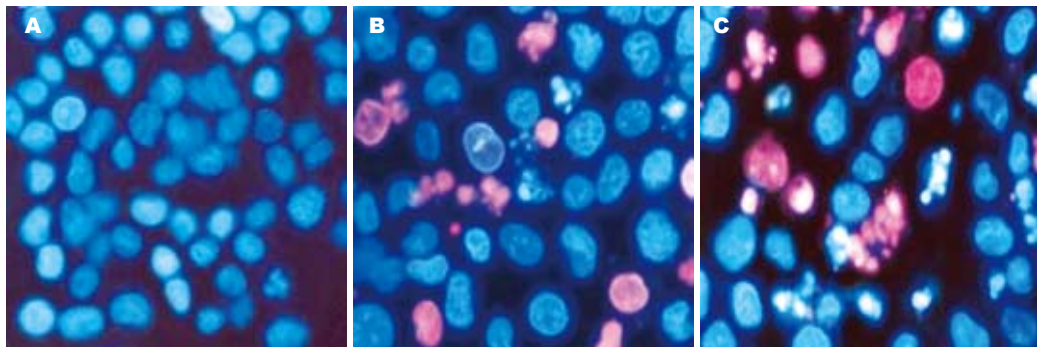


图 2 荧光染色法检测BGC-803凋亡形态学变化($\times 200$). A: 对照组; B: 20 $\mu\text{mol/L}$ RA作用24 h; C: 20 $\mu\text{mol/L}$ RA作用48 h.

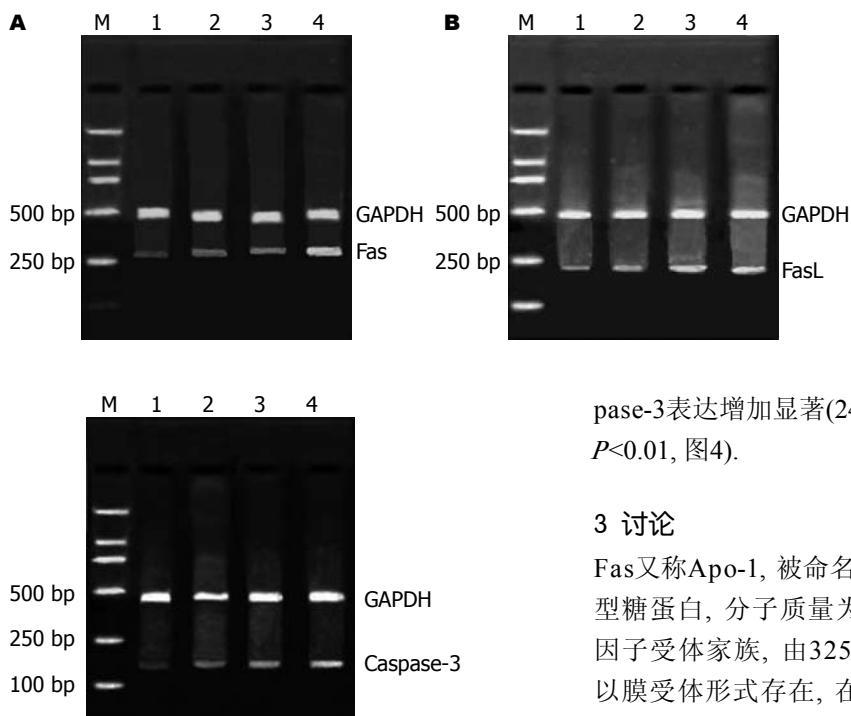


图 3 RA处理后Fas及FasL的表达. A: Fas; B: FasL; M: Marker; 1: 对照组; 2: RA作用12 h; 3: RA作用24 h; 4: RA作用48 h.

图 4 RA处理后Caspase-3的表达. M: Marker; 1: 对照组; 2: RA作用12 h; 3: RA作用24 h; 4: RA作用48 h.

述变化更加明显(图2C).

2.4 Fas、FasL和Caspase-3基因表达在RA诱导BGC-803细胞凋亡中的作用

2.4.1 RA诱导BGC-803细胞凋亡与Fas、FasL基因表达的变化: 20 $\mu\text{mol/L}$ RA作用细胞12 h后, Fas和FasL表达强度无明显改变($P>0.05$); 随着作用时间的延长, 24、48 h后, Fas表达增加($17.69 \pm 1.38, 23.35 \pm 2.13$ vs $8.47 \pm 0.67, P<0.01$); FasL表达显著($16.74 \pm 1.26, 22.35 \pm 1.94$ vs $9.50 \pm 0.75, P<0.01$, 图3).

2.4.2 RA诱导BGC-803细胞凋亡与Caspase-3基因表达的变化: 20 $\mu\text{mol/L}$ RA作用细胞12 h后, Caspase-3表达强度无明显改变($P>0.05$); 随着作用时间的延长, 24 h后Caspase-3表达增加(19.94 ± 1.67 vs $6.42 \pm 0.47, P<0.01$); 48 h后, Cas-

pase-3表达增加显著(24.94 ± 2.17 vs $6.42 \pm 0.47, P<0.01$, 图4).

3 讨论

Fas又称Apo-1, 被命名为CD95, Fas是细胞膜I型糖蛋白, 分子质量为48 kDa, 属于肿瘤坏死因子受体家族, 由325个氨基酸组成. Fas主要以膜受体形式存在, 在细胞凋亡中具有信号传导作用. FasL为Fas配体, Fas与FasL结合使细胞表面Fas分子交联, 凋亡信号被传到细胞内, 诱导表达Fas细胞凋亡. 所以FasL又称死亡因子^[5]. Caspase-3是一类蛋白水解酶, 为Fas及FasL下游的效应分子, 活化的Caspase-3能裂解大量底物, 是凋亡机制的核心成分, 当FasL表达增高时, Caspase-3活性明显提高^[6], Fas与FasL结合后, Fas相关蛋白(FADD)激活Caspase-8, Caspase-3、7等级联反应, 诱导细胞凋亡^[7]. 维甲酸可通过激活相应的受体调控基因的转录活性, 从而产生调节增殖、分化和凋亡等多种生物学效应^[8]. 研究表明, 维甲酸能够诱导卵巢癌^[9]、神经母细胞瘤^[10]等肿瘤细胞分化和凋亡, 从而达到抑制肿瘤细胞生长的作用.

本研究以人胃癌BGC-803细胞为靶标, 观察维甲酸对胃癌细胞生长的作用. MTT实验结果表明, 维甲酸能显著抑制BGC-803细胞生长, 通过0.001、0.01、0.1、1、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 不同浓

度维甲酸作用, 发现其对BGC-803细胞的生长抑制作用呈剂量依赖性, 0.1、1、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 细胞生长抑制率分别为32.61%、44.42%、48.14%和51.15%。0.1-20 $\mu\text{mol/L}$ 的抑制作用显著强于对照组0.657% ($P < 0.01$), 20 $\mu\text{mol/L}$ RA的抑制作用显著强于其他各组 ($P < 0.01$)。

目前, 维甲酸对胃癌作用机制研究, 主要涉及到与细胞分化、增殖、凋亡调节有关的网络系统, 维甲酸主要作用是诱导细胞周期发生阻滞, 进而诱导细胞凋亡。在实验中我们观察到, 在维甲酸作用后, 流式细胞光度术检测显示, 20 $\mu\text{mol/L}$ 维甲酸处理BGC-803细胞12 h、24 h后, 出现明显G₂/M期阻滞, G₂/M期百分率从0 h的10.4%分别升高到12 h的22.3%和24 h的47.1% ($P < 0.01$); 48 h后下降至20.2%, 但仍明显高于对照组10.4%, 说明维甲酸对BGC-803细胞有G₂/M期阻滞作用; 同时, 20 $\mu\text{mol/L}$ 维甲酸作用BGC-803细胞12、24、36、48 h后, 凋亡率分别为7.82%、9.88%、18.69%、40.14%, 均高于对照组(3.05%) ($P < 0.05$), 结果显示, 维甲酸诱导BGC-803凋亡的作用呈时间依赖性。在实验中我们利用Hoechst33342/PI双荧光染色法, 从形态学方面观察了细胞凋亡的变化, 荧光染色观察到, 随着RA作用时间的延长, 细胞呈现形态不规则, 核分叶及碎片状, 染色质凝集、核膜破裂等凋亡细胞形态改变。

Fas、FasL介导的信号传导通路是细胞凋亡的主要途径, 在此通路上任一环节缺失都可导致癌细胞逃逸细胞凋亡, 从而实现细胞无限增殖。有报道指出, 肿瘤发生过程中Fas、FasL表达水平较低^[11-15], Fas、FasL表达水平与肿瘤发生与转移密切相关^[15-18]。我们的实验结果表明, Fas、FasL及Caspase-3在BGC-803细胞中表达水平较低, 这与Falchetti *et al*^[12]结果一致, 意味着胃癌细胞通过细胞凋亡数量减少, 有利于肿瘤细胞增殖。20 $\mu\text{mol/L}$ RA作用24、48 h后, Fas、FasL表达水平较对照组增加 ($P < 0.01$); 同时Caspase-3表达水平亦明显增加 ($P < 0.01$), 随着作用时间的延长, 表达水平增加, 提示Fas途径在诱导BGC-803细胞凋亡中起着重要作用, 而维甲酸可能通过这一途径激活Fas、FasL、Caspase-3之后, 上调其表达水平, 参与诱导细胞凋亡过程。

由此我们认为, 维甲酸可在体外呈时间和浓度依赖性抑制人胃癌BGC-803细胞的生长, 其作用机制可能主要是诱导细胞凋亡和影响细胞周期, 同时诱导细胞凋亡的机制可能部分是

通过上调Fas、FasL、Caspase-3的表达实现的。

4 参考文献

- 1 Kao HW, Chen HC, Wu CW, Lin WC. Tyrosine-kinase expression profiles in human gastric cancer cell lines and their modulations with retinoic acids. *Br J Cancer* 2003; 88: 1058-1064
- 2 Brabender J, Lord RV, Metzger R, Park J, Salonga D, Danenberg KD, Hölscher AH, Danenberg PV, Schneider PM. Role of retinoid X receptor mRNA expression in Barrett's esophagus. *J Gastrointest Surg* 2004; 8: 413-422
- 3 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
- 4 Czczuga-Semeniuk E, Lemancewicz D, Wolczyński S. Can vitamin A modify the activity of docetaxel in MCF-7 breast cancer cells? *Folia Histochem Cytobiol* 2007; 45 Suppl 1: S169-S174
- 5 Shimonishi T, Isse K, Shibata F, Aburatani I, Tsuneyama K, Sabit H, Harada K, Miyazaki K, Nakanuma Y. Up-regulation of fas ligand at early stages and down-regulation of Fas at progressed stages of intrahepatic cholangiocarcinoma reflect evasion from immune surveillance. *Hepatology* 2000; 32: 761-769
- 6 Liang Y, Nylander KD, Yan C, Schor NF. Role of caspase 3-dependent Bcl-2 cleavage in potentiation of apoptosis by Bcl-2. *Mol Pharmacol* 2002; 61: 142-149
- 7 Zheng TS, Schlosser SF, Dao T, Hingorani R, Crispe IN, Boyer JL, Flavell RA. Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 13618-13623
- 8 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
- 9 Um SJ, Lee SY, Kim EJ, Han HS, Koh YM, Hong KJ, Sin HS, Park JS. Antiproliferative mechanism of retinoid derivatives in ovarian cancer cells. *Cancer Lett* 2001; 174: 127-134
- 10 Lovat PE, Dobson M, Malcolm AJ, Pearson AD, Redfern CP. Differential gene regulation by 9-cis and all-trans retinoic acid in neuroblastoma cells. *Med Pediatr Oncol* 2001; 36: 135-138
- 11 Lee TB, Min YD, Lim SC, Kim KJ, Jeon HJ, Choi SM, Choi CH. Fas (Apo-1/CD95) and Fas ligand interaction between gastric cancer cells and immune cells. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 32-38
- 12 Falchetti M, Saieva C, Lupi R, Masala G, Rizzolo P, Zanna I, Ceccarelli K, Sera F, Mariani-Costantini R, Nesi G, Palli D, Ottini L. Gastric cancer with high-level microsatellite instability: target gene mutations, clinicopathologic features, and long-term survival. *Hum Pathol* 2008; 39: 925-932
- 13 毕蔓茹, 杨宝山, 马英骥, 陈立艳, 王岩, 高峰, 王福祥. 复方甘草酸苷对小鼠暴发性肝衰竭Fas/FasL介导的肝细胞凋亡的保护作用. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 26-30
- 14 Thorburn J, Moore F, Rao A, Barclay WW, Thomas LR, Grant KW, Cramer SD, Thorburn A.

■同行评价

本研究方法可靠, 应用准确, 数据可信, 具有一定的科学性和实用性。

- Selective inactivation of a Fas-associated death domain protein (FADD)-dependent apoptosis and autophagy pathway in immortal epithelial cells. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 1189-1199
- 15 Zhu Q, Liu JY, Xu HW, Yang CM, Zhang AZ, Cui Y, Wang HB. Mechanism of counterattack of colorectal cancer cell by Fas/Fas ligand system. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6125-6129
- 16 Abrams SI. Positive and negative consequences of Fas/Fas ligand interactions in the antitumor response. *Front Biosci* 2005; 10: 809-821
- 17 Rupinder SK, Gurpreet AK, Manjeet S. Cell suicide and caspases. *Vascul Pharmacol* 2007; 46: 383-393
- 18 黄文生, 彭慧, 谭进富, 谭敏. 探讨Fas/FasL的表达与大肠癌发展及转移的关系. *中山大学学报(医学科学版)* 2008; 29: 35-37

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标

本刊讯 《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, *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology*)》, 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的496位胃肠病学和肝病专家支持的开放存取的同行评议性的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

除了公开存取之外, 《世界华人消化杂志》的另一大特色是对普通读者的充分照顾, 即每篇论文都会附带有一组供非专业人士阅读的通俗易懂的介绍大纲, 包括背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点、名词解释、同行评价。

《世界华人消化杂志》报道的内容包括食管、胃、肠、肝、胰肿瘤, 食管疾病、胃肠及十二指肠疾病、肝胆疾病、肝脏疾病、胰腺疾病、感染、内镜检查法、流行病学、遗传学、免疫学、微生物学, 以及胃肠道运动对神经的影响、传送、生长因素和受体、营养肥胖、成像及高科技技术。

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医药学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。(常务副总编辑: 张海宁 2008-10-18)

益气活血法对大鼠萎缩性胃炎癌前病变差异基因表达谱的影响

李军祥, 张玉禄, 朱陵群, 赵宁宁

李军祥, 张玉禄, 赵宁宁, 北京中医药大学东方医院消化科
北京市 100078

朱陵群, 北京中医药大学中医内科学教育部重点实验室
李军祥, 教授, 博士生导师, 主要从事中医药防治消化系统疾病
的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30572388

作者贡献分布: 此课题由李军祥设计; 研究过程由李军祥, 张玉
禄及朱陵群操作完成; 数据分析由张玉禄完成; 本论文写作由张
玉禄与赵宁宁完成。

通讯作者: 李军祥, 100078, 北京市, 北京中医药大学东方医院
消化内科. lijx970508@sohu.com

电话: 010-67689766

收稿日期: 2008-05-26 修回日期: 2008-09-03

接受日期: 2008-09-17 在线出版日期: 2008-10-18

Effect of Qi-replenishing and blood-activating treatment on aberrant gene expression profile in the precancerous lesion of CAG in rats

Jun-Xiang Li, Yu-Lu Zhang, Ling-Qun Zhu,
Ning-Ning Zhao

Jun-Xiang Li, Yu-Lu Zhang, Ning-Ning Zhao, Department
of Gastroenterology, Oriental Hospital of Beijing Uni-
versity of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100078,
China

Ling-Qun Zhu, Key Laboratory of the Ministry of Educa-
tion, Chinese Internal Medicine Laboratory, Beijing Uni-
versity of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700,
China

Supported by: National Natural Science Foundation of
China, No. 30572388

Correspondence to: Dr. Jun-Xiang Li, Department of
Gastroenterology, Oriental Hospital of Beijing University of
Traditional Chinese Medicine, Beijing 100078,
China. lijx970508@sohu.com

Received: 2008-05-26 Revised: 2008-09-03

Accepted: 2008-09-17 Published online: 2008-10-18

Abstract

AIM: To investigate aberrant gene expression of
chronic atrophic gastritis (CAG) precancerous
lesions in rats receiving Qi-replenishing and
blood-activating treatment and to analyze its
pharmac-mechanism at genetic level.

METHODS: The model of precancerous lesion
of CAG rats induced by spring insertion and
hot paste was established. One step method

for extraction of total RNA of rat stomach tis-
sues after administration of Qi-replenishing
and blood-activating medicinals and the stom-
ach tissue of the model group was used. After
reverse transcription and fluorescent labeling
by Cy3, Cy5, we got two groups of rat stom-
ach cDNA probes and then hybridized with
the cDNA gene expression profiles microarray
hybridization. The result was scanned by the
laser scanner and processed by software for im-
age analysis, standardization, the ratio of value
analysis, cluster analysis and gene ontology
analysis. Results of gene array were verified by
Real-time PCR.

RESULTS: Screening showed 205 differen-
tially expressed genes, of which, there were
101 up-regulated expression genes and 104
down-regulated expression genes. They
composed the gene expression profiles for
precancerous lesion of precancerous lesions
of CAG in rats treated with Qi-replenishing
and blood-activating medicinals. There were
four genes related to apoptosis including heat
shock 70 kDa protein 1a, growth arrest and
dna-damage-inducible, complement compo-
nent 9 and albumin. The Real-time PCR con-
firmed expression of HSP70 up-regulated in
rats treated with Qi-replenishing and blood-
activating medicinals, which were consistent
with results using microarray technology.

CONCLUSION: These differentially expressed
genes involved different biological processes
and gene regulations. Further analysis of the
differentially expressed genes might help re-
veal the pharmaco-mechanism of Qi-replenish-
ing and blood-activating medicinals at genetic
level.

Key Words: Gene expression; cDNA microarray;
Chronic atrophic gastritis; Precancerous lesion;
Rats; Qi-replenishing and blood-activating treat-
ment; Traditional Chinese medicine

Li JX, Zhang YL, Zhu LQ, Zhao NN. Effect of Qi-

背景资料

在国家“八五”
攻关课题等关于
中医药防治萎缩
性胃炎癌前病变
的研究中, 从临床
和实验研究两方
面证明活血化瘀
法防治萎缩性胃
炎癌前病变取得
了较好的效果, 但
其作用机制尚不
清楚, 本课题的重
点是从基因水平
进一步探讨活血
法防治萎缩性胃
炎癌前期病变的
作用机制。

同行评议者

管冬元, 副教授,
上海中医药大学
基础医学院实验
中医学教研室

■ 研发前沿

近年来活血化痰法防治萎缩性胃炎癌前病变的机制探讨是目前该领域的研究热点之一,已深入到基因水平,但活血化痰法的作用是多方面的,多层次的,从基因信号传导通路方面研究活血化痰法防治萎缩性胃炎癌前病变的作用机制是下一步的研究重点。

replenishing and blood-activating treatment on aberrant gene expression profile in the precancerous lesion of CAG in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(29): 3261-3268

摘要

目的: 分析益气活血法干预慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)癌前病变的差异表达基因,从基因水平探讨益气活血法防治大鼠CAG癌前病变的药理机制

方法: 应用大鼠12K基因表达谱cDNA芯片,检测益气活血法干预后CAG癌前病变大鼠基因的差异表达变化,筛选出差异表达基因,建立益气活血法干预后CAG癌前病变大鼠差异基因表达谱并进行生物信息学分析.并运用Real-time荧光定量PCR鉴定HSP70基因表达.

结果: 共筛选出差异表达基因205个,其中上调基因为101条,下调基因104条,共同构成了益气活血法干预大鼠CAG癌前病变的差异表达基因谱.与凋亡相关的4个基因为heat shock 70 kDa protein 1a, growth arrest and DNA-damage-inducible, complement component 9和albumin. Real-time荧光定量PCR鉴定结果表明益气活血法干预治疗后HSP70基因表达上调,与芯片检测结果一致.

结论: 益气活血法对大鼠CAG癌前病变的基因表达的影响涉及到多种生物学过程信号传递及基因调控的改变,从分子生物学角度说明中医益气活血法对CAG癌前病变的影响是一个复杂的病理生理过程.

关键词: 基因表达; 基因芯片; 萎缩性胃炎; 癌前病变; 大鼠; 益气活血法; 中医

李军祥, 张玉禄, 朱陵群, 赵宁宁. 益气活血法对大鼠萎缩性胃炎癌前病变差异基因表达谱的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16(29): 3261-3268

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3261.asp>

0 引言

慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)是消化系统常见病、疑难病之一,在CAG基础上伴发的肠上皮化生(intestinal metaplasia, IM)和异型增生(dysplasia, Dys)是胃癌前期病变^[1].临床上中医运用益气活血法治疗本病取得了较好的效果.本研究复制大鼠CAG癌前病变模型,研究益气活血法对大鼠萎

缩性胃炎癌前病变基因表达的影响,从基因水平探讨益气活血法防治萎缩性胃炎癌前病变的作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Wistar大鼠,体质量180-220 g,清洁级,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验动物许可证编号: SCXX(京)2002-0003.北京中医药大学东直门医院中药药理学实验室II级动物实验室,许可证号: SYXK 11-00-0029.微量天平(HANGPING JA1003)为上海天平仪器厂产品. Agilent 2100 Bioanalyzer: Agilent: 型号: G2938B; Nano Drop Spectrophotometer: 型号ND-1000; 酶标仪: 型号KC4; MJ PCR仪: 型号PTC-100; UVP杂交炉: 型号HB-1000; Agilent扫描仪: 型号G2655AA; Line-gene荧光定量PCR检测系统为杭州博日科技有限公司产品;台式高速冷冻离心机TGL-16(湘仪); DYY-7C型电泳仪与DYCP-31D型水平式电泳槽为北京六一仪器厂产品;紫外分析仪为北京宾达英创科技有限公司产品;紫外分光光度计UV-2000为尤尼柯(上海)仪器有限公司产品.

1.2 方法

1.2.1 大鼠CAG癌前期病变模型的建立: 大鼠在相同条件下分笼饲养,每笼4只,常规喂养标准颗粒饲料,自由饮用水.按赵凤志 *et al*^[2]的方法,将♂ Wistar大鼠(体质量230-260 g)禁食不禁水16 h后,以10 g/L戊巴比妥ip麻醉(5 mL/kg),称体质量,固定大鼠四肢,在无菌条件下开腹,暴露胃,在胃前壁距幽门环0.2 cm无或少血管处切一小口,将一长约2 cm,直径约0.2-0.3 cm的金属弹簧前1/3插过其幽门环进入十二指肠,用缝线将弹簧两端及中央固定,按手术常规逐层缝合胃及腹壁切口.手术后禁食不禁水24 h,恢复性饲养1 wk后,开始每周每只大鼠ig 60-70℃高盐热淀粉糊2次,每次2 mL,连续24 wk.并于造模结束前随机抽取模型组大鼠8只进行胃黏膜病变病理形态学检查,其中7只出现轻-中度不典型增生,确认造模成功.造模结束后,将模型大鼠随机分为益气活血治疗组[予三七粉0.7 g/(kg·d)加黄芪浸膏3.5 g/(kg·d)]和自然恢复组(予双蒸水灌胃),两组分别每天上午ig 1次,连续12 wk,于给药第12周末处死实验大鼠,进行病理切片.

1.2.2 组织取材: ig 12 wk,采用乙醚麻醉法,剖腹取胃,在胃窦部阳性病变部位取材,益气活血组

取材3例, 正常对照组3例, 自然恢复组1例, 取材后标本迅速液氮冻存备用。

1.2.3 大鼠表达谱芯片: 大鼠12K基因表达谱cDNA芯片, 覆盖11 060种基因, 其中Unigene 10 695条, 已知基因5657条, EST4716条。

1.2.4 探针制备: 按照TRIzol试剂说明, 采用异硫氰酸胍一步法抽提所取胃黏膜组织总RNA, 所提总RNA使用Agilent 2100进行样品RNA检测, 确定其完整性。用Oligotex mRNA Midi Kit(Qiagen公司)纯化mRNA。每1份探针取4 μg mRNA, 逆转录标记cDNA探针并纯化探针。模型组来源的mRNA由Cy3-dUTP标记制成探针, 益气活血组来源的mRNA由Cy5-dUTP标记制成探针。

1.2.5 芯片杂交(cDNA芯片杂交): 取出经定量的Cy3和Cy5标记的探针, 取Cy3探针90 pmol, Cy5探针60 pmol, 浓缩至7 μL , 然后转至0.2 mL PCR管内。将溶解的探针置于PCR仪中94 $^{\circ}\text{C}$ 变性3 min左右, 取出加入Cot-1 DNA 1 μg , A80 1 μg 放回PCR仪中, 70 $^{\circ}\text{C}$ 保温30 min。反应结束后, 加入9 μL 4 \times 杂交缓冲液和18 μL 甲酰胺, 总体积达到36 μL , 充分混匀。取杂交液滴加于芯片上, 盖上盖玻片。将杂交芯片水平放入加有1 \times PBS的杂交盒, 置42 $^{\circ}\text{C}$ 杂交箱中避光杂交16-18 h。

1.2.6 芯片洗涤: 杂交结束后, 用镊子取出片子, 浸入经过50 $^{\circ}\text{C}$ 预热的洗液I中, 上下抽动, 使盖玻片从芯片上自然脱离, 然后在50 $^{\circ}\text{C}$ 洗液I中洗涤10 min。从洗液I中取出片子, 浸入50 $^{\circ}\text{C}$ 预热的洗液II中, 洗涤10 min, 然后再转入新的洗液II中, 重复2次。从洗液II中取出片子, 室温洗液III洗涤5 min, 重复2次。取出芯片于去离子水中室温洗涤2 min。用镊子小心将片子取出, 迅速转入50 mL空离心管中, 1500 r/min离心5 min, 干片。最后将芯片取出放入芯片盒, 避光保存于干燥器中。

1.2.7 荧光扫描、数据处理和统计学分析: 将玻片放入扫描片夹中, Agilent扫描仪扫描芯片, 获得荧光图像, 提取杂交信号, 以管家基因为内参照对Cy3和Cy5的原始提取信号进行均衡和修正。ImaGene3.0软件分析Cy3和Cy5两种荧光信号的强度和比值, 以芯片中密度值 5×10^8 以上的数据点为有效数据, 数据导入分析软件Genespring, 用Background subtraction based on negative controls和per spot and per chip

Intensity dependent normalization(non-linear or LOWESS normalization)方法标准化, 计算得到ratio值(两种荧光Cy5与Cy3的比值); ratio值大于2或小于0.5的数据点为存在显著性差异表达的基因点, 以此为筛选标准, 筛选出差异表达基因。

1.2.8 生物信息学分析: 利用美国NIH开发的DAVID系统对差异表达基因进行基因功能富集分析^[3]。

1.2.9 Real-time荧光定量PCR鉴定HSP70基因表达 引物设计采用Primer premier 5及oligo 6等生物软件, 引物序列如下: NM_031971 Rattus HSP70 192 bp, 上游: 5-gctgatcttgcccttgagac-3; 下游: 5-caagatcaccatcaccaacg-3。RT制备cDNA溶液: Microtube管中配制下列模板RNA/引物混合液, 全量 $<15 \mu\text{L}$, 模板RNA和Oligo(dT)12-18 Primer(50 $\mu\text{mol/L}$)的使用量分别为3, 2.5 μL ; 70 $^{\circ}\text{C}$ 保温5 min后迅速在冰上急冷2 min以上; 离心数秒钟使模板RNA/引物的变性溶液聚集于Microtube管底部; 在上述Microtube管中配制下列反转录反应液: 5 μL 5 \times M-MLV Buffer, 1.25 μL dNTP Mixture(各10 mmol/L), 25 U RNase Inhibitor(40 U/ μL), 200 U, M-MLV(200 U/ μL), up to 25 μL RNase free dH₂O, 42 $^{\circ}\text{C}$ 保温1 h; 70 $^{\circ}\text{C}$ 保温15 min后冰上冷却, 得到cDNA溶液。Real-time PCR: Real-time PCR反应体系: 25 μL 2XSYBR Mix(with 4 mmol/L Mg²⁺), 1 μL PCR Forward Primer(10 $\mu\text{mol/L}$), 1 μL PCR Reverse Primer (10 $\mu\text{mol/L}$), 0.3 μL Taq DNA Polymerase, 20.7 μL ddH₂O, 2 μL cDNA。Real-time PCR反应条件见表1。

2 结果

2.1 各组大鼠体质量 益气活血组大鼠体质量为 $671.25 \pm 36.26 \text{ g}$ ($n = 3$), 正常对照组体质量为 $661.00 \pm 37.29 \text{ g}$ ($n = 3$), 二者相比无显著性差异。自然恢复组大鼠体质量为 603 g ($n = 1$)。

2.2 各组大鼠组织病理 自然恢复组, 重度增生: 上皮细胞或呈立方形、不定形, 细胞核明显增大, 大小、形状不一, 排列紊乱。腺管结构明显紊乱, 形状大小和排列极不规则。益气活血组, 轻度增生: 细胞核稍大, 深染, 呈圆形、卵圆形或柱形, 排列较密集, 位于细胞基底。腺管轻度增生, 管腔稍不规则, 排列稍紊乱和疏密不均。正常组, 细胞核大小均一, 疏密均匀, 腺管管腔

■ 相关报道

近年来国内学者在防治萎缩性胃炎及其癌前病变的研究中发现HSP70基因的表达异常, 证实HSP70基因表达对胃黏膜有保护作用, 并能促进黏膜的损伤修复。

■创新盘点

本文运用基因芯片技术研究活血化瘀法的作用机制,筛选出差异表达基因,从基因功能角度分析,HSP70基因是活血化瘀法防治本病的目的基因之一,为进一步从基因信号传导通路上揭示其作用机制提供了有益的基础。

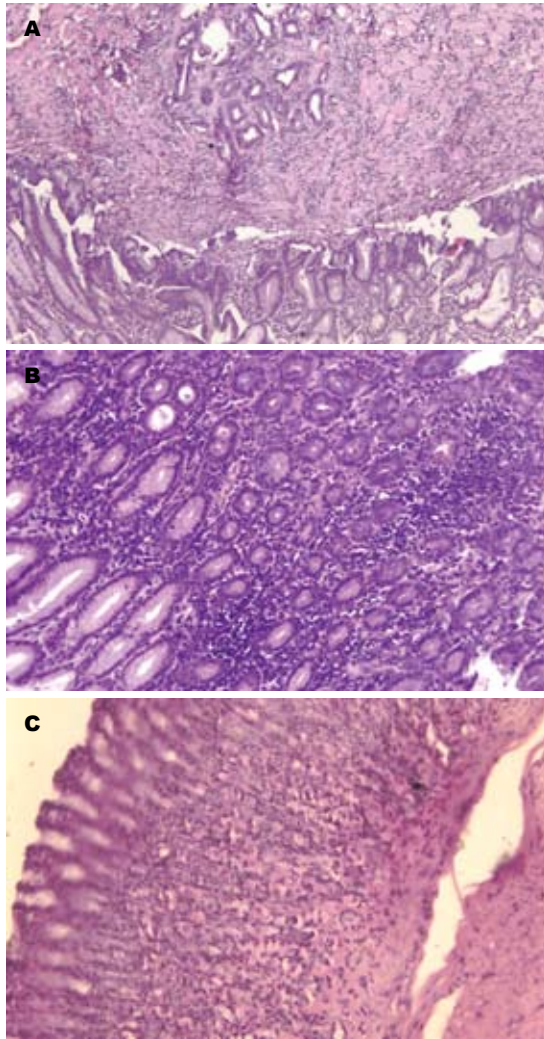


图1 各组大鼠病理图. A: 自然恢复组; B: 益气活血组; C: 正常组.

规则,排列整齐(图1).

2.3 样品RNA质量检测结果 芯样品RNA电泳检测,使用Agilent 2100进行样品质检(样品编号同上).该批样品抽提的RNA量足够;电泳中,条带 $28S > 18S$,质检合格,可以进行芯片实验(表2,图2).

2.4 数据统计学分析

2.4.1 聚类分析: 利用stanford大学Eisen Lab开发的Cluster软件(<http://rana.lbl.gov/>)进行分层聚类,结果表明益气活血组的基因表达谱模式与自然恢复组反差最大,提示益气活血组的药物疗效可能较好,聚类的结果表明热休克蛋白70(heat shock 70 kDa protein, HSP70)及其相邻的几个基因是自然恢复组和益气活血组反差最大的区域(图中蓝圈内所示),提示这几个基因可能是益气活血法作用机制较明确的靶标(图3).

表1 Real-time PCR反应条件

反应步骤	$t(^{\circ}C)$	$t(S)$	循环	荧光信号收集
预孵育	95	120	1	无
	95	20		
扩增	58	25	45	在延伸阶段结束时
	72	30		
溶解曲线	65	0	1	在温度缓慢升高过程中
	95	20		

表2 样品RNA浓度(g/L)

分组	样品编号	总RNA浓度	纯化后RNA浓度
益气活血组	1	1.88	1.78
	2	2.94	1.33
	3	2.65	1.50
空白对照组	10	3.36	1.26
	11	3.36	1.40
	12	3.26	1.63
自然恢复组	13	2.56	1.24

表3 三张芯片差异基因数目

芯片编号	55006	55007	55008
上调基因数	566	346	452
下调基因数	706	640	519

2.4.2 差异基因列表: 按照设定的数据筛选标准: $Ratio \geq 2$ 或 ≤ 0.5 , $P < 0.05$, 益气活血组三张芯片筛选出的差异基因数目见表3. 益气活血组三张芯片同时满足 $Ratio \geq 2$, $P < 0.05$, 或 $Ratio \leq 0.5$, $P < 0.05$, 筛选出差异表达基因205个, 其中上调基因为101条, 下调基因104条, 将上调基因按RATIO1值降序排列前30位及下调基因按RATIO1值升序排列前30位列出见表4.

2.4.3 Gene Ontology(GO)富集分析: 差异表达基因GO分析结果表明, 益气活血法对大鼠CAG癌前病变的基因表达的影响涉及到多种生物学过程信号传递及基因调控的改变, 包括细胞信号和传递类基因、细胞骨架蛋白基因、细胞外基质类基因、细胞周期相关基因、癌基因和抑癌基因、细胞凋亡相关基因以及细胞受体和细胞代谢相关基因等, 从细胞凋亡角度发现4个上调基因可能与益气活血法作用机制密切相关, 其中HSP70基因前期研究结果表明在CAG癌前病变大鼠模型中表达下调, 经活血化瘀法治疗后, HSP70基因表达上调, 因此

表 4 益气活血组筛选出的部分差异表达基因列表

上调基因				下调基因			
GenBank	RATIO1	RATIO2	RATIO3	GenBank	RATIO1	RATIO2	RATIO3
NM_012564	99.01	44.64	42.37	NM_031821	0.25	0.25	0.32
NM_012657	44.25	38.61	41.84	BI296915	0.23	0.32	0.29
NM_145779	34.25	21.14	25.06	XM_149281	0.23	0.23	0.39
NM_012898	25.00	23.92	22.47	NM_133404	0.23	0.27	0.49
NM_134326	24.15	19.57	21.10	BE095796	0.22	0.32	0.27
NM_012582	22.17	15.43	14.16	NM_031320	0.21	0.32	0.24
NM_013112	19.65	8.77	15.90	BC017596	0.21	0.15	0.30
NM_031531	19.61	8.40	11.72	XM_134666	0.21	0.29	0.12
NM_019156	19.46	8.20	10.13	NM_012552	0.21	0.23	0.18
NM_012901	17.83	8.13	7.87	BF396698	0.20	0.28	0.29
NM_053469	17.70	6.85	2.29	AI144892	0.20	0.18	0.21
NM_019184	16.03	9.90	11.55	BF544595	0.20	0.34	0.07
BQ191104	13.28	7.14	10.44	NM_012623	0.19	0.17	0.11
NM_080576	13.18	6.41	6.90	BE118680	0.19	0.14	0.22
XM_342639	12.71	8.06	8.13	M92076	0.18	0.15	0.22
NM_017233	12.38	5.56	6.99	NM_023970	0.17	0.15	0.17
NM_053768	12.02	7.35	13.00	XM_041991	0.17	0.31	0.28
BQ191104	11.86	6.29	10.28	BE099720	0.14	0.33	0.22
NM_017055	11.81	5.18	7.19	NM_012847	0.14	0.19	0.13
NM_031971	10.36	11.43	2.75	NM_013034	0.10	0.18	0.36
NM_031543	10.24	8.47	8.93	NM_152936	0.08	0.06	0.36
NM_020071	10.08	8.26	6.54	NM_016997	0.08	0.07	0.19
NM_017024	9.62	4.26	6.80	NM_016997	0.08	0.06	0.13
NM_175837	8.55	2.93	5.92	NM_012635	0.05	0.06	0.13
NM_030832	8.40	4.29	7.46	NM_012553	0.04	0.06	0.09
NM_053288	8.26	5.18	4.03	NM_139086	0.02	0.02	0.06
NM_053617	8.26	4.88	7.04	NM_173127	0.02	0.02	0.04
NM_030850	8.20	3.89	7.25	NM_054009	0.02	0.02	0.04
XM_129207	8.20	3.33	2.42	NM_031502	0.02	0.02	0.03
NM_057146	7.81	8.70	6.85	NM_013161	0.01	0.02	0.02

■应用要点

HSP70基因表达异常在萎缩性胃炎癌前病变的发病机制中的作用逐渐受到重视,从活血化瘀法影响HSP70基因表达的角度深入研究其作用机制,为临床新药研发积累有益资料。

表 5 GO分析结果与凋亡相关的4个基因

GeneBank ID	gene title
NM_031971	heat shock 70 kd protein 1a
AI599423	growth arrest and dna-damage-inducible
NM_057146	complement component 9
NM_134326	albumin

表 6 正常对照组与凋亡相关的4个基因的RATIO值

GenBank	RATIO1(I0744)	RATIO2(I0745)	RATIO3(I8748)
NM_031971	0.92	1.08	0.98
AI599423	1.00	0.94	0.81
NM_057146	0.64	0.61	-
NM_134326	1.13	0.96	0.89

推测HSP70基因可能是益气活血法治疗大鼠CAG癌前病变较明确的靶基因之一。GO分析结果与凋亡相关的4个基因见表5;与凋亡相关的4个基因在正常对照组的芯片检测中RATIO值见表6。表6数据说明,益气活血组芯片检测结果中表达上调的4个基因在正常对照组芯片检测结果中RATIO值在大部分在0.5-1.5之间,基因表达无明显上调或下调,其中18748号芯片

NM_057146基因无表达,说明与正常对照组比较,益气活血法对4个凋亡相关基因表达有明显影响。

2.4.4 Real-time PCR验证结果:所有样本在相同条件下对内参基因和目的基因进行Real-time PCR验证,得到CT值,应用 $2^{-\Delta CT}$ 公式对目的基因相对表达量进行计算(表7)。结果表明,HSP70基因相对表达量在1号样本(0.76)、2号

■同行评价

本文应用基因芯片探讨了益气活血法中药对CAG癌前病变的基因调控情况,其研究方法新颖,研究目标明确,具有一定的学术价值。

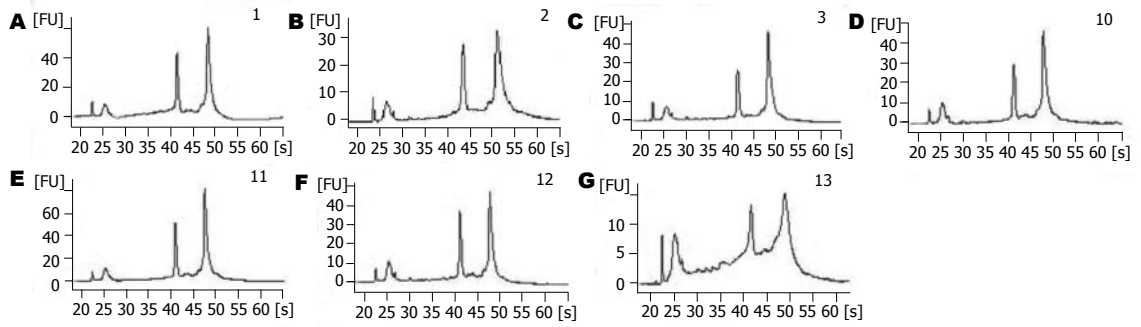


图 2 使用Agilent 2100生物分析仪采用荧光毛细管电泳法对样品RNA检测的结果。横坐标代表时间,纵坐标代表荧光强度,较高的两个波峰分别代表18S和28S;其中:A-C: 益气活血组;D-F: 正常对照组;G: 自然恢复组。

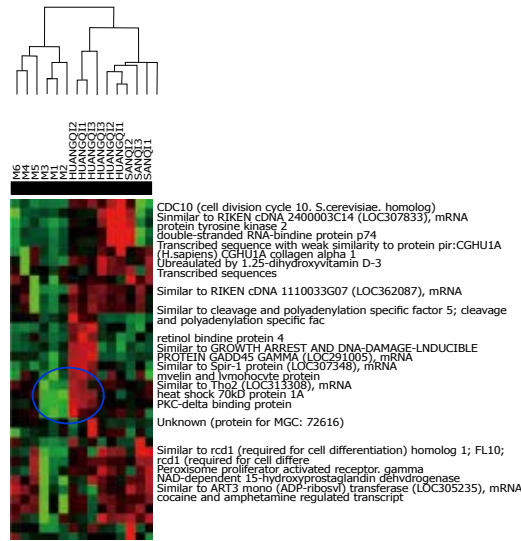


图 3 益气活血组基因表达谱的局部聚类图。

样本(0.81)和3号样本(0.68)比13号样本(0.46)相对表达量都要高,分别为13号样本的1.67倍、1.77倍和1.48倍,说明经过益气活血法干预治疗后HSP70基因表达增加,与芯片检测结果一致。

3 讨论

基因芯片技术具有高质量、高效率、高准确性特点,一次可同步监测数以千计的基因的变化,与传统技术相比,具有无比的优越性^[4]。良好的基因芯片实验设计是充分发挥基因芯片技术优势的前提,基因芯片技术的生物学重复是减少或消除误差的常用手段^[5]。近年来发展起来的Real-time PCR技术具有特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确、速度快、全封闭反应等优点,是分子生物学研究中用于鉴定基因的重要工具。本研究运用基因芯片技术检测益气活血法对大鼠萎缩性胃炎癌前病变基因表达的影响,从基因水平探讨益气活血法防治萎缩性胃炎癌前病变的作用机制,并通过Real-time PCR

表 7 HSP70基因表达Real-time PCR验证

编号	actin	平均值	HSP70	平均值	ΔCT	2 ^{-ΔCT}
1	19.04	19	22.79	22.71	3.71	0.76
1	18.96		22.63			
2	18.83	19.1	23.05	22.73	3.63	0.81
2	19.37		22.40			
3	20.97	21.015	24.93	24.90	3.88	0.68
3	21.06		24.86			
13	24.52	24.41	28.89	28.86	4.45	0.46
13	24.30		28.83			

验证基因芯片的结果。

基因芯片结果显示,益气活血法对CAG癌前病变大鼠胃黏膜基因表达有明显影响,综合分析三张芯片生物学重复结果,共筛选出差异表达基因205个,其中上调基因为101条,下调基因104条,共同构成了益气活血法影响大鼠CAG癌前病变的差异表达基因谱。差异表达基因的功能分析结果表明,益气活血法对大鼠CAG癌前病变的基因表达的影响涉及到多种生物学过程信号传递及基因调控的改变,包括细胞信号和传递类基因、细胞骨架蛋白基因、细胞外基质类基因、细胞周期相关基因、癌基因和抑癌基因、细胞凋亡相关基因以及细胞受体和细胞代谢相关基因等,从基因水平说明中医益气活血法对CAG癌前病变的影响是一个复杂的过程。

本实验造模完成时,基因芯片结果显示,模型大鼠HSP70基因表达较正常大鼠下调;治疗完成时,基因芯片结果显示,益气活血组CAG癌前病变大鼠HSP70基因显著上调。基因聚类分析和富集分析结果提示HSP70基因可能是益气活血法防治大鼠CAG癌前病变的靶基因之一。

HSP70对胃黏膜亦具有保护作用,并能促进黏膜的损伤修复^[6]。正常胃黏膜上皮完整性的维持有赖于细胞增生和凋亡的动态平衡,而凋亡调控基因蛋白的异常会影响这一动态平衡^[7],导致胃黏膜细胞凋亡和增殖的异常^[8]。HSP70是重要的凋亡调控因子。Liu *et al*发现难辨梭状芽孢杆菌毒素A诱导肠黏膜上皮细胞凋亡;上调肠黏膜细胞内源HSP70水平,能保护细胞线粒体功能,抑制凋亡通路的激活^[9]。细胞表面的Fas/Apo-1受体和他们的配体相结合是诱导凋亡的重要原因,HSP-70的表达可能提供一种能够包裹自身和外来抗原的新的免疫物质,从而使细胞避免凋亡^[10-11]。研究发现,细胞内HSP70水平的提高可通过阻断信号通路,抑制应激诱导的蛋白激酶38和JNK(junn-terminalkinase)激活,从而减少细胞凋亡。线粒体可能是细胞选择死亡(炎症扩大)或凋亡(炎症受限)的关键细胞器,HSP70对线粒体的保护作用可能是HSP70的重要的抗凋亡机制^[12]。在金属弹簧、高盐热糊及反流的胆汁和十二指肠液等致病因素的刺激下,大鼠胃黏膜从正常胃黏膜细胞→浅表性胃炎→萎缩性胃炎→肠上皮化生→异型性增生,其凋亡率逐渐升高^[13]。芯片结果表明益气活血法干预治疗后HSP70基因上调,且与Real-time PCR基因鉴定结果一致,HSP70基因表达上调抑制细胞凋亡及其通路的激活可能是其治疗CAG癌前病变的机制之一。

CAG癌前病变大鼠胃黏膜HSP70基因表达较正常大鼠下调,分析其原因,可能有以下几点:(1)与胃黏膜营养供应不良有关:CAG癌前病变胃黏膜血流减少^[14]或局部胃黏膜营养供应失调,蛋白营养不良能削弱HSP70转录调控因子HSF-1活性,抑制HSP70 mRNA合成^[15];(2)与表达HSP70的细胞减少有关:长期的黏膜损害导致胃黏膜细胞死亡,腺体丢失。HSP70表达水平和黏膜损伤程度呈负相关^[16-17]。

CAG癌前病变属中医“胃痞”范畴,其病位在胃,与肝脾关系密切,病性属虚实相兼,病程绵长,病情迁延反复难愈,胃为多气多血之腑,气行则血行,气虚则血瘀,日久则影响气血运行形成气虚血瘀证,临床上中医运用益气活血法治疗CAG癌前病变取得了较好的疗效,能够改善胃黏膜血液循环,促进胃黏膜病变的修复,这种药理作用可能是HSP70基因上调产生的效应之一,HSP70基因上调在益气活血法防

治大鼠CAG癌前病变作用机制中可能是一个重要的环节,但HSP70基因上调对信息传导通路和相关基因的调控等方面的机制有待进一步深入研究。

4 参考文献

- 1 陈灏珠. 实用内科学. 第12版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 1881-1882
- 2 赵凤志, 鲁香凤, 戴欣, 卜益民, 张旭晨, 石雪迎, 方杰, 董建华, 田德禄, 马庆山, 秦腊梅, 王志春, 阎艳芳. 三种方剂水煎液对实验性慢性胃炎大鼠胃粘膜组织病理学变化及胃液pH、胆酸含量的影响. 中国中药杂志 1995; 20: 488-492
- 3 Dennis G Jr, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 2003; 4: P3
- 4 徐俊荣, 崔大祥, 张沥, 张玲霞, 贾长河, 张宁霞, 江梅, 曹广周. 基因芯片法筛选萎缩性胃炎相关的差异表达基因. 世界华人消化杂志 2003; 11: 47-50
- 5 吴斌, 林乔, 王米渠. 试论影响基因芯片实验设计的因素. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1206-1209
- 6 Odashima M, Otaka M, Matsushashi T, Jin M, Horikawa Y, Ohba R, Itoh H, Watanabe S. Mechanical strain stress suppresses expression of HSP70 and wound restoration in gastric mucosal cells. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 3087-3091
- 7 Xia HH, Talley NJ. Apoptosis in gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection: implications in gastric carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 16-26
- 8 Nardone G, Staibano S, Rocco A, Mezza E, D'armiento FP, Insabato L, Coppola A, Salvatore G, Lucariello A, Figura N, De Rosa G, Budillon G. Effect of *Helicobacter pylori* infection and its eradication on cell proliferation, DNA status, and oncogene expression in patients with chronic gastritis. *Gut* 1999; 44: 789-799
- 9 Liu TS, Musch MW, Sugi K, Walsh-Reitz MM, Ropeleski MJ, Hendrickson BA, Pothoulakis C, Lamont JT, Chang EB. Protective role of HSP72 against *Clostridium difficile* toxin A-induced intestinal epithelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284: C1073-C1082
- 10 Beere HM, Green DR. Stress management - heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends Cell Biol* 2001; 11: 6-10
- 11 Didelot C, Schmitt E, Brunet M, Maingret L, Parcellier A, Garrido C. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Handb Exp Pharmacol* 2006; (172): 171-198
- 12 Yenari MA, Liu J, Zheng Z, Vexler ZS, Lee JE, Giffard RG. Antiapoptotic and anti-inflammatory mechanisms of heat-shock protein protection. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1053: 74-83
- 13 李子俊, 林秋雄, 王启仪, 林华欢, 骆新兰, 詹德娟. 胃癌及癌前病变细胞增殖和凋亡与bc12/bax表达关系的研究. 现代消化及介入诊疗杂志 2000; 5: 14-16
- 14 Takaya Y, Tsunoda S, Itoh M, Oshima H. [Studies on analysis of gastric mucosal blood flow by electronic endoscopic image. Especially on atrophic gastritis] *Nippon Ika Daigaku Zasshi* 1994; 61: 295-305
- 15 Kawai T, Teshima S, Kusumoto K, Kawahara T,

- Kondo K, Kishi K, Rokutan K. A non-toxic heat shock protein 70 inducer, geranyl-geranyl-acetone, restores the heat shock response in gastric mucosa of protein-malnourished rats. *J Lab Clin Med* 2000; 136: 138-148
- 16 Guo JS, Cho CH, Wang JY, Koo MW. Expression and immunolocalization of heat shock proteins in the healing of gastric ulcers in rats. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 17-22
- 17 Rokutan K, Miyoshi M, Teshima S, Kawai T, Kawahara T, Kishi K. Phenylarsine oxide inhibits heat shock protein 70 induction in cultured guinea pig gastric mucosal cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279: C1506-C1515

编辑 李军亮 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

“科技期刊在国家自主创新体系中的作用”专题讨论会在京召开

本刊讯 为提升我国科技期刊的整体水平,提高我国科技期刊引领各学科领域自主创新的发展方向,同时也为我国科研人员提供一个很好的国际平台,国家自然科学基金委员会政策局和科学基金杂志社于2008-8-27/28在北京联合组织召开了第31期《双清论坛》,论坛主题为“科技期刊在国家自主创新体系中的作用”。

参会人员有政府管理部门、高等院校、科研院所等机构约40位官员和专家学者,以及来自国内30多家重点学术期刊的编辑。国家自然科学基金委员会王杰副主任全程参加了为期2天的论坛,并在开幕式的发言中指出,我国科学家要将创新成果投向自己的期刊视为己任。政策局韩宇副局长和科学基金杂志社副主任祖广安分别介绍了此次论坛的总体要求和特点与定位。

本次论坛围绕以下6个议题对我国科技期刊在国家自主创新体系中的作用开展了深入讨论:(1)科技发达国家科技期刊的现状与发展趋势;(2)国际上若干影响力大的科技期刊创业发展案例分析与经验分享;(3)我国科技期刊在建设创新性国家中所应扮演的角色;(4)我国科技期刊存在的问题与原因分析;(5)我国科技期刊要从大做到强的具体措施建议;(6)基金委在促进我国科技期刊跨越式发展上所应发挥的作用。

陈佳洱院士、师昌绪院士和朱作言院士分别作了“为中国科学的发展办好科学期刊”、“我国科技期刊要从大做到强”和“基金委全力推进我国科技期刊走向世界”的主题演讲。对于当前科技期刊的发展,他们认为,政府管理部门应引入竞争与淘汰机制,借鉴国有大企业改革创新的经验,办好国家级科技期刊,为国家自主创新体系建设做贡献。在国际化方面,期刊应通过各种渠道与国际大型出版商合作,向国际性期刊学习,逐步实现集团化运作,扩大自己的影响。此外,他们还特别强调了要完善和改革当前的评价体系,目前用表观的、量化的论文数量和引用数据来评价科研和论文,很容易将我国的科研引向歧途。我们应充分重视“开放存取”(Open Access, OA)的出版模式,OA出版是当前我国科技期刊发展的理想模式;科技期刊要注重与新闻媒体的沟通,这是提高国民科技素质的重要渠道。

清华大学生命科学与医学研究院施一公副院长和中国科学院基因组研究所吴仲义所长也分别应邀作了专题报告。他们认为当前有大量优秀华人学者,有着丰富的、潜在的优秀稿源,不少人还都参与着一些国际上具有重要影响的期刊的工作。如果有足够的经费支持和强有力的编辑队伍,我国主办高水平的国际性科技期刊是可行的。中国科学院物理研究所王鼎盛院士、国家地震局地球物理所陈运泰院士、中国科协学会学术部杨文志副部长、中国科学院半导体研究所夏建白院士、中华医学会副会长王海燕教授、北京市肿瘤防治研究所吕有勇教授、中华医学杂志社游苏宁社长和中国科学杂志社肖宏总经理也特邀进行了专题发言。

会议还邀请《细胞研究》、《世界胃肠病学杂志》、《亚洲男科学杂志》及《分子植物》四刊编辑部人员作了典型特邀发言。他们是国内近几年来出现的国际化程度比较领先的期刊,他们的共同特点都是主编全力以赴,全身心地投入到期刊工作中,成为期刊的灵魂。这些刊物都是按照国际通行的办刊模式运作,但是又各有特点。他们的多元化办刊经验很值得国内其他刊物借鉴。

参会者还就基金委完善和改革当前的评价体系进行了讨论,他们提出通过追加研究经费以及设立有关加快科技期刊国际化进程的系列软课题等想法,为国家自然科学基金委员会提出了中肯的建议。今天我们有了改革开放的政策推动,有了与会者所代表的国家政府部门、科学家群体和期刊编辑们的共同努力,就没有克服不了的困难,我国科技期刊走向国际的梦想也一定会早日实现。(祖广安 2008-10-18)

编辑 李军亮

HSP90抑制剂17-DMAG对胃癌细胞株SGC-7901增殖及凋亡的影响

高志军, 赵春临, 乔军波, 张谢夫

高志军, 赵春临, 乔军波, 张谢夫, 郑州大学第一附属医院普外科 河南省郑州市 450052

高志军, 郑州大学第一附属医院普外科硕士研究生, 主要从事胃肠道肿瘤的研究。

作者贡献分布: 该实验课题由高志军, 张谢夫及赵春临设计; 实验过程由高志军与乔军波操作完成; 实验研究用试剂及仪器由张谢夫与赵春临提供; 数据分析由高志军完成; 论文写作由高志军完成, 张谢夫与赵春临提出修改意见。

通讯作者: 张谢夫, 450052, 河南省郑州市建设路1号, 郑州大学第一附属医院普外科. zhangxiefu@medmail.com.cn

收稿日期: 2008-07-11 修回日期: 2008-08-23

接受日期: 2008-08-26 在线出版日期: 2008-10-18

Effect of heat shock protein 90 inhibitor 17-DMAG on proliferation and apoptosis of human gastric cancer cell lines SGC-7901

Zhi-Jun Gao, Chun-Lin Zhao, Jun-Bo Qiao, Xie-Fu Zhang

Zhi-Jun Gao, Chun-Lin Zhao, Jun-Bo Qiao, Xie-Fu Zhang, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China.

Correspondence to: Department of General surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. zhangxiefu@medmail.com.cn

Received: 2008-07-11 Revised: 2008-08-23

Accepted: 2008-08-26 Published online: 2008-10-18

Abstract

AIM: To explore the effect of 17-DMAG, an inhibitor specific for heat shock protein 90, on the growth and apoptosis of gastric cancer cell lines SGC-7901.

METHODS: Human gastric cancer cell lines SGC-7901 were cultivated using routine method, then treated with different concentrations of 17-DMAG. Cell proliferation was detected using MTT assay, and cell cycle and apoptosis were determined using flow cytometry.

RESULTS: 17-DMAG inhibited the proliferation of SGC-7901 cells in time-dependent and dose-dependent manners ($F = 241.313, 246.856$, both $P < 0.001$). After treatment with 17-DMAG,

SGC-7901 cell cycle was arrested at G_2/M phase, and there was significant difference between treatment group and control group ($F = 231.991, P < 0.001$). An increase in early apoptosis occurred at 24 hours' treatment and in late apoptosis at 48 hours' treatment.

CONCLUSION: 17-DMAG inhibits gastric cancer SGC-7901 cell proliferation and thus induces apoptosis and accumulation in G_2/M phase in vitro.

Key Words: Gastric cancer; SGC-7901; Heat shock protein 90; 17-DMAG; MTT assay; Flow cytometry

Gao ZJ, Zhao CL, Qiao JB, Zhang XF. Effect of heat shock protein 90 inhibitor 17-DMAG on proliferation and apoptosis of human gastric cancer cell lines SGC-7901. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(29): 3269-3273

摘要

目的: 探讨热休克蛋白90(HSP90)功能特异性抑制剂17-DMAG对胃癌细胞SGC-7901增殖及凋亡的影响。

方法: 体外培养人胃癌细胞SGC-7901, 以不同浓度的17-DMAG处理后采用MTT法检测SGC-7901细胞的生长抑制情况, 流式细胞仪碘化丙啶(PI)染色分析细胞周期分布, 流式细胞仪及Annexin V-FITC试剂盒监测17-DMAG对胃癌细胞SGC-7901凋亡的影响。

结果: 不同浓度的17-DMAG对人胃癌细胞SGC-7901有明显的生长抑制作用, 各组之间比较($P < 0.01$), 且呈时效量效依赖关系($F = 241.313, 246.856$, 均 $P < 0.001$)。17-DMAG作用24 h后胃癌细胞株SGC-7901呈现 G_2/M 期阻滞, 试验组与对照组比较($F = 231.991, P < 0.001$), 呈浓度依赖关系。17-DMAG处理胃癌细胞SGC-7901 24 h早期凋亡细胞增加, 48 h晚期凋亡细胞增加。

结论: 17-DMAG可明显抑制胃癌细胞SGC-7901的增殖, 使胃癌细胞SGC-7901阻滞

背景资料

胃癌是我国高发肿瘤, 其发病率在消化道肿瘤中居于第1位。其化疗效果一直不尽如人意, 毒副作用严重, 不敏感或很快产生耐受, 寻找更加有效的治疗药物和辅助治疗手段, 乃当务之急。近几年肿瘤的分靶治疗成为研究的热点。

同行评议者

王振宁, 教授, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

■研发前沿

HSP90功能性抑制剂17-AAG和17-DMAG近几年成为肿瘤分子靶向研究的热点,在乳腺癌、卵巢癌和前列腺癌等肿瘤细胞系中得到证实,并进入I期临床实验研究,但在胃癌研究不多,HSP90抑制剂17-DMAG的应用能否为胃癌的靶向治疗提供新的途径是本研究的方向。

■相关报道

HSP90抑制剂抑制肿瘤细胞信号转导通路中的多种蛋白,实现多点攻击,干扰肿瘤细胞周期、诱导细胞凋亡、抑制肿瘤浸润、新生血管形成和肿瘤转移,从多方面达到抑制肿瘤生长,最终治愈肿瘤的目的。HSP90功能性抑制剂17-AAG和17-DMAG在乳腺癌、卵巢癌和前列腺癌等肿瘤细胞系中得到证实,并进入I期临床实验研究,并且在多种肿瘤细胞中,其研究进入体内研究阶段。

于G₂/M期,诱导胃癌细胞SGC-7901凋亡。

关键词: 胃癌; SGC-7901; 热休克蛋白90; 17-DMAG; MTT法; 流式细胞术

高志军, 赵春临, 乔军波, 张谢夫. HSP90抑制剂17-DMAG对胃癌细胞株SGC-7901增殖及凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(29): 3269-3273

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3269.asp>

0 引言

热休克蛋白90(heat shock protein 90, HSP90)是一种分子伴侣,在保护蛋白质的正确空间结构、防止其意外降解和保护蛋白质功能方面有重要意义。HSP90的主要作用是结合已获得3级结构的蛋白质,参与这些蛋白质的激活与成熟过程。肿瘤的发生是由于癌基因与抑癌基因之间失衡,引起细胞的恶性转化,肿瘤细胞内信号转导网络失衡,导致癌蛋白的过度表达。HSP90在多种肿瘤组织中表达增高^[1],与细胞内信号转导通路中的信号蛋白相互作用,维持这些蛋白的正常结构与功能,在肿瘤的发生发展中起重要作用,目前已成为抗肿瘤研究的热门靶点^[2-3]。格尔德霉素(geldanamycin, GA)是最早被发现的HSP90的特异性功能抑制剂,GA和其半合成衍生物17-AAG以及17-DMAG,这些小分子化合物与ATP竞争结合HSP90氮端的结合位点从而改变HSP90的构象,使其不能与客户蛋白(client proteins)及其他小分子蛋白形成复合体,抑制其分子伴侣功能,最终导致客户蛋白降解,继而阻止肿瘤赖以生存的信号网络,导致肿瘤细胞周期停滞,诱导肿瘤细胞凋亡^[4]。本实验通过观察HSP90抑制剂17-DMAG对胃癌细胞株SGC-7901增殖的影响,并通过检测细胞周期及细胞凋亡的改变,从而为胃癌的分子治疗提供新的途径。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞株SGC-7901由郑州大学药学院付蕾教授惠赠, HSP90抑制剂17-DMAG购自美国Sigma-Aldrich公司,用DMSO溶解后配成3.2 mmol/L的储存液,保存于-20℃。四甲基偶氮唑盐(MTT)、碘化丙啶(PI)为Sigma公司产品。Annexin V-FITC试剂盒购自BD公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: SGC-7901细胞培养于含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养液,在37℃、50

mL/L CO₂孵育箱中培养。取对数生长期细胞进行实验,接种细胞密度为2.5×10⁷/L。

1.2.2 MTT法测定细胞增殖: 收集对数生长期细胞,调整密度以2.5×10⁷/L,每孔200 μL接种于96孔培养板,培养48 h,实验组加入3.2 mmol/L 17-DMAG储存液使其终浓度为0.4、0.8、1.6、3.2、6.4 μmol/L,以等量含有相同浓度DMSO的RPMI 1640培养液作为阴性对照,每组设5个复孔。分别培养24、48和72 h后每孔加入5 g/L的MTT溶液20 μL,再培养4 h,弃去上清液,每孔加入150 μL DMSO溶解沉淀,微型振荡仪振荡10 min混匀,用酶标仪测定波长490 nm的吸光度值,细胞生长抑制率 = (1-实验组A值/对照组平均A值)×100%。实验重复3次。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期: 实验组细胞以2.5 μmol/L和5 μmol/L 17-DMAG作用24 h,以相同浓度的DMSO作为阴性对照组。收集细胞,以-20℃预冷的700 mL/L乙醇固定过夜, PBS洗涤2次后加入碘化丙啶(PI)染液,4℃避光染色20 min后,流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.4 流式细胞仪及Annexin V-FITC试剂盒分析细胞凋亡: 细胞传代进入对数生长期,达到80%左右,随机分组,实验组加入3 μmol/L 17-DMAG,对照组加入相同浓度的DMSO分别于24、48 h收集细胞,按照Annexin V-FITC试剂盒说明书操作,检测凋亡细胞。

统计学处理 采用SPSS13.0统计学软件进行统计分析,试验数据以mean±SD表示,分析采用方差分析,组间比较用SLD法, *P*<0.05认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 17-DMAG对胃癌细胞SGC-7901的生长抑制作用 17-DMAG抑制胃癌细胞SGC-7901的生长,分别以0.4、0.8、1.6、3.2、6.4 μmol/L 17-DMAG处理SGC-7901细胞24、48、72 h后,细胞生长均呈不同程度的抑制,并呈浓度依赖与时间依赖性(*F* = 241.313, *P*<0.001; *F* = 246.856, *P*<0.001)。不同浓度和不同时间抑制率之间差异显著(24 h: 8.8±4.3, 20.9±8.6, 35.5±3.3, 50.1±3.9, 53.9±7.4, *P*<0.01; 48 h: 25.9±9.2, 42.2±4.1, 49.9±5.6, 64.3±2.4, 70.4±2.8, *P*<0.01; 72 h: 37.8±4.9, 52.6±6.6, 60.2±7.5, 79.3±3.6, 86.3±2.2, *P*<0.01, 表1, 图1)。

2.2 17-DMAG对胃癌SGC-7901细胞周期的影响 流式细胞仪分析表明, 17-DMAG作用24 h后胃

表 1 不同浓度组17-DMAG对胃癌细胞株SGC-7901的生长抑制作用 (%)

17-DMAG ($\mu\text{mol/L}$)	24 h	48 h	72 h
0.4	8.8 \pm 4.3	25.9 \pm 9.2	37.8 \pm 4.9
0.8	20.9 \pm 8.6	42.2 \pm 4.1	52.6 \pm 6.6
1.6	35.5 \pm 3.3	49.9 \pm 5.6	60.2 \pm 7.5
3.2	50.1 \pm 3.9	64.3 \pm 2.4	79.3 \pm 3.6
6.4	53.9 \pm 7.4	70.4 \pm 2.8	86.3 \pm 2.2

表 2 17-DMAG对胃癌细胞SGC-7901细胞周期的影响

分组	细胞周期分布(%)		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照组	81.1 \pm 1.20	9.7 \pm 0.36	9.2 \pm 0.85
2.5 $\mu\text{mol/L}$	74.8 \pm 1.18	10.7 \pm 0.56	14.5 \pm 0.62 ^b
5.0 $\mu\text{mol/L}$	69.2 \pm 1.68	10.8 \pm 0.51	19.9 \pm 1.95 ^d

^b $P < 0.001$ vs 实验组; LSD法分析, ^d $P < 0.001$ vs 5.0 $\mu\text{mol/L}$.

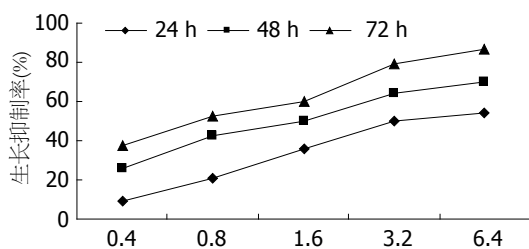


图 1 17-DMAG对胃癌细胞SGC-7901的生长抑制作用。

癌细胞SGC-7901出现G₂/M期阻滞, 随浓度的增大其阻滞作用增强。对照组G₂/M期细胞为9.2% \pm 0.85%, 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 实验组G₂/M期细胞增加到14.5% \pm 0.62%, 5 $\mu\text{mol/L}$ 实验组G₂/M期细胞增加到19.9% \pm 1.95%。实验组与对照组比较, 差异显著($F = 231.991$, $P < 0.001$, 图2, 表2)。

2.3 17-DMAG对胃癌细胞株SGC-7901凋亡的影响 Annexin V-FITC染色, 流式细胞仪分析表明3 $\mu\text{mol/L}$ 17-DMAG作用24 h后, Annexin V⁺/PI细胞由4.57%增加至15.17%。3 $\mu\text{mol/L}$ 17-DMAG处理48 h后Annexin V⁺/PI细胞增加至26.24%; 晚期凋亡Annexin V⁺/PI⁺增加至21.10%。实验组与对照组差别显著(图3)。

3 讨论

基因的不稳定性导致肿瘤的发生, 尽管细胞的恶性转化仅需要某些特定的基因的改变, 肿瘤细胞的遗传可塑性使他们能够对具体的针对细胞信号转导途径中某一环节的分子靶向药物失去反应, 甚至产生耐药。大多数实体瘤患

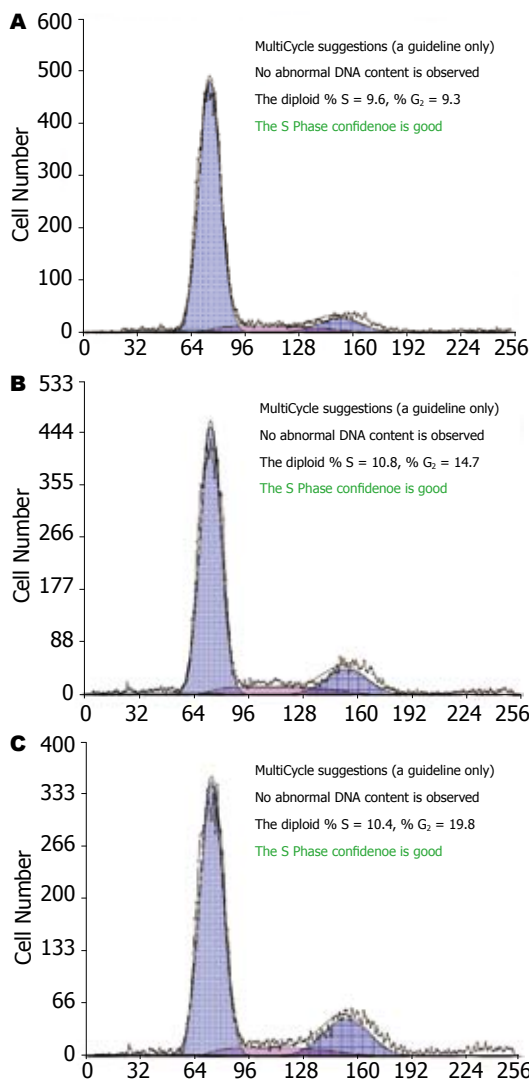


图 2 17-DMAG对胃癌SGC-7901细胞周期的流式细胞仪分析结果。A: 对照组; B: 17-DMAG 2.5 mol/L组; C: 17-DMAG 5 mol/L组。

者, 当其被诊断为肿瘤患者时, 其体内的基因已有多重改变, 足以对抗单一的分子靶向治疗药物。1999年Kaelin首先提出了多点攻击(multi-hit modality)理论。该理论的核心是利用某一靶位实现对信号通路的多点阻断, 从而摧毁肿瘤细胞赖以生存的整个信号通路网络。因此寻找有效的靶位是这一理论应用于肿瘤治疗的关键^[5]。肿瘤细胞经常面临生存环境的剧烈变化, 如缺氧、酸中毒、医源性化疗和放疗等, 在这种环境下仍然有肿瘤细胞生存。剧烈的环境变化导致细胞蛋白的损伤, 考虑到分子伴侣保护受损的细胞蛋白, 而且近年研究发现, 细胞信号转导通路中的许多蛋白是HSP90的客户蛋白。HSP90在肿瘤的发生进展及转移过程中发挥了重要作用。因此通过抑制HSP90这一靶点, 进而抑制肿瘤细胞信号转导通路中的多种蛋白, 实现多点攻击, 干扰肿瘤细胞周期、诱导细胞凋亡、抑

■ 创新盘点

本实验选用HSP90功能性抑制剂17-DMAG, 其与GA和17-AAG比较, 有更小的肝毒性, 且水溶性好。国外报道其抑制肿瘤生长效果更好, 更适合下一步的体内实验, 有望为肿瘤的治疗提供新的途径。

应用要点

17-DMAG通过选择性抑制肿瘤细胞中HSP90的分子伴侣功能,导致其多种客户蛋白功能丧失,抑制肿瘤细胞生长,其在乳腺癌、卵巢癌和前列腺癌等肿瘤细胞系中得到证实,并进入I期临床。通过进一步研究有望在多种肿瘤分子治疗中得到应用。

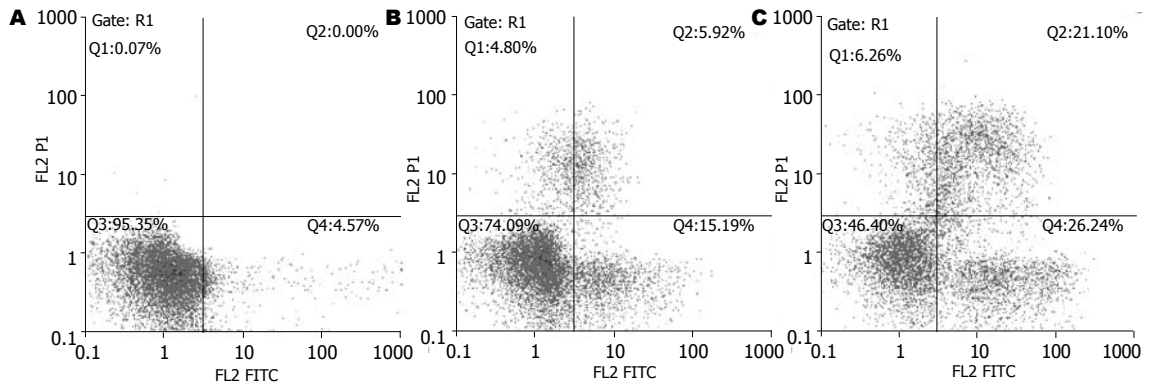


图3 17-DMAG对胃癌细胞株SGC-7901凋亡的流式细胞仪分析结果. A: 对照组; B: 3 $\mu\text{mol/L}$ 17-DMAG作用24 h; C: 3 $\mu\text{mol/L}$ 17-DMAG作用48 h.

制肿瘤浸润、新生血管形成和肿瘤转移,从多方面达到抑制肿瘤生长,最终治愈肿瘤的目的^[6]. HSP90是最丰富的伴侣蛋白之一,与多种细胞增殖相关蛋白结合. HSP90在肿瘤细胞中的表达率是正常细胞的2-10倍^[7],在肿瘤细胞的生长和存活中起重要作用. Paduano *et al*报道肿瘤来源的HSP90与17AAG的亲合力是正常组织亲和力的100倍,因而HSP90抑制剂能特异性地杀伤肿瘤细胞^[8]. 近几年,国外研究证实HSP90抑制剂17-AAG和17-DMAG有效诱导肿瘤细胞死亡已在乳腺癌、卵巢癌和前列腺癌等细胞系中得到证实,并进入I期临床实验^[9].

胃癌是我国高发肿瘤,其发病率在消化道肿瘤中居于第1位. 化疗效果一直不尽如人意,毒副作用严重,不敏感或很快产生耐受,寻找更加有效的治疗药物和辅助治疗手段,乃当务之急. 为了探讨HSP90抑制剂17-DMAG对胃癌细胞的作用,我们采用细胞培养技术,应用MTT法检测17-DMAG对SGC-7901细胞的生长抑制作用,结果表明17-DMAG能明显抑制SGC-7901细胞的生长,且呈显著的浓度-作用时间依赖性. 17-DMAG抑制细胞生长,诱导肿瘤细胞凋亡,是通过抑制HSP90的功能,干扰信号转导蛋白HER₂、Raf、Ras、Akt、STAT等,而且通过干扰肿瘤细胞内端粒酶(telomerase)的稳定,达到对肿瘤细胞的生长抑制作用^[2-3]. 流式细胞仪检测细胞周期发现,17-DMAG阻滞SGC-7901细胞于G₂/M期,且浓度越高其阻滞作用愈强. 我们推测17-DMAG作为HSP90抑制剂可能通过抑制HSP90的分子伴侣功能,干扰多种细胞周期蛋白的功能(如CyclinA、CyclinB和CDK1),使胃癌细胞SGC-7901停滞于G₂/M期. 在预试验中我们发现17-DMAG阻滞SGC-7901细胞于G₂/M期, G₂/M期凋亡的二倍体亚峰与S期或G₀/G₁重合,故本实验中我们应用Phoenixflow流

式细胞仪分析软件分析时没有分析凋亡的二倍体亚峰,我们应用流式细胞仪Annexin V-FITC染色单独监测胃癌细胞SGC-7901的早期凋亡和晚期凋亡,试验结果更为可靠. 本实验中,17-DMAG作用SGC-7901细胞24 h,早期凋亡细胞明显增加,作用48 h不仅晚期凋亡细胞增加,而且早期凋亡细胞亦有增加. 细胞凋亡是一个严密完整的程序化死亡过程,受凋亡抑制蛋白(inhibitors of apoptosis proteins, IAPs)调节. 我们推测17-DMAG通过抑制HSP90功能,使客户蛋白survivin、livin表达下调,诱导肿瘤细胞凋亡,同时其通过抑制STAT信号转导及突变P53诱导胃癌凋亡^[3,10],这也是我们下一步研究的方向. 当增大药物浓度至6 $\mu\text{mol/L}$ 作用48 h发现大部分SGC-7901细胞漂浮死亡,细胞结构消失,以3 $\mu\text{mol/L}$ 17-DMAG作用72 h发现,亦发现大量SGC-7901细胞死亡,提示细胞凋亡是17-DMAG抑制肿瘤生长的一个重要方式,不是唯一途径. 国外文献报道17-DMAG通过有丝分裂灾难(mitotic catastrophe)引起肿瘤细胞死亡. Schwock *et al*^[11]在研究HSP90抑制剂对宫颈癌细胞的凋亡作用时,发现17-DMAG可以引起宫颈癌细胞反常有丝分裂,导致部分肿瘤细胞死亡.

总之,17-DMAG通过阻滞胃癌细胞SGC-7901细胞周期,诱导细胞凋亡,抑制胃癌细胞生长,有望为胃癌的分子靶向治疗提供新的途径.

4 参考文献

- 1 Chatterjee M, Jain S, Stuhmer T, Andrusis M, Ungeth U, Kuban RJ, Lorentz H, Bommert K, Topp M, Kramer D, Muller-Hermelink HK, Einsele H, Greiner A, Bargou RC. STAT3 and MAPK signaling maintain overexpression of heat shock proteins 90alpha and beta in multiple myeloma cells, which critically contribute to tumor-cell survival. *Blood* 2007; 109: 720-728
- 2 Sidera K, Patsavoudi E. Extracellular HSP90:

- conquering the cell surface. *Cell Cycle* 2008; 7: 1564-1568
- 3 Powers MV, Workman P. Targeting of multiple signalling pathways by heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitors. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13 Suppl 1: S125-S135
 - 4 Robles AI, Wright MH, Gandhi B, Feis SS, Hanigan CL, Wiestner A, Varticovski L. Schedule-dependent synergy between the heat shock protein 90 inhibitor 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin and doxorubicin restores apoptosis to p53-mutant lymphoma cell lines. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6547-6556
 - 5 Sharp SY, Prodromou C, Boxall K, Powers MV, Holmes JL, Box G, Matthews TP, Cheung KM, Kalusa A, James K, Hayes A, Hardcastle A, Dymock B, Brough PA, Barril X, Cansfield JE, Wright L, Surgenor A, Foloppe N, Hubbard RE, Aherne W, Pearl L, Jones K, McDonald E, Raynaud F, Eccles S, Drysdale M, Workman P. Inhibition of the heat shock protein 90 molecular chaperone in vitro and in vivo by novel, synthetic, potent resorcinylic pyrazole/isoxazole amide analogues. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 1198-1211
 - 6 Lang SA, Klein D, Moser C, Gaumann A, Glockzin G, Dahlke MH, Dietmaier W, Bolder U, Schlitt HJ, Geissler EK, Stoeltzing O. Inhibition of heat shock protein 90 impairs epidermal growth factor-mediated signaling in gastric cancer cells and reduces tumor growth and vascularization in vivo. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 1123-1132
 - 7 Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L, Boehm MF, Fritz LC, Burrows FJ. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature* 2003; 425: 407-410
 - 8 Paduano F, Villa R, Pennati M, Folini M, Binda M, Daidone MG, Zaffaroni N. Silencing of survivin gene by small interfering RNAs produces supra-additive growth suppression in combination with 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 179-186
 - 9 Tsutsumi S, Neckers L. Extracellular heat shock protein 90: a role for a molecular chaperone in cell motility and cancer metastasis. *Cancer Sci* 2007; 98: 1536-1539
 - 10 李霞, 邓华瑜. HSP90在乳腺癌细胞增殖中的作用与机制研究. *中国病理生理学杂志* 2007; 23: 2023-2025
 - 11 Schwock J, Pham NA, Cao MP, Hedley DW. Efficacy of Hsp90 inhibition for induction of apoptosis and inhibition of growth in cervical carcinoma cells in vitro and in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; 61: 669-681

■同行评价

本实验发现HSP90抑制剂17-DMAG能够抑制胃癌细胞株SGC-7901的增殖, 阻滞胃癌细胞周期, 诱导细胞凋亡, 具有一定的科学意义和创新性。

编辑 李军亮 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志英文摘要要求

本刊讯 本刊英文摘要包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致. 具体格式要求如下: (1)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; (2)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”; (3)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; (4)基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801; (5)通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wjcd@wjgnet.com; (6)收稿及修回日期 格式如: Received: Revised: . (常务副总编辑: 张海宁 2008-10-18)

胡黄连苷 II 对H₂O₂损伤L-02细胞的保护作用

顾伟, 范昕建, 吴疆, 牛智强

■背景资料

肝损伤是指各种有害因子如病毒、药物、毒物、缺氧、自由基、免疫因素等,直接或间接损伤肝脏,造成肝细胞的炎症、坏死或/和凋亡、纤维化等一系列病理改变。本文研究了西藏胡黄连的主要有效成份胡黄连苷 II 对肝细胞损伤的保护作用,并初步探讨了其保护机制。

顾伟, 范昕建, 吴疆, 牛智强, 四川大学华西医院感染性疾病中心生物治疗国家重点实验室感染性疾病研究室 四川省成都市 610041

范昕建, 成都中医药大学 四川省成都市 611137

顾伟, 2008年四川大学硕士, 副教授, 主要从事感染性疾病的研究, 现在大理学院附属医院工作。

四川省重大科技资助项目, No. 07SG004-001

作者贡献分布: 此课题由顾伟与范昕建设计; 研究过程由顾伟与吴疆操作完成; 研究方法指导及分析工具由顾伟与吴疆提供; 数据分析由顾伟, 吴疆及牛智强完成; 本论文写作由顾伟完成。

通讯作者: 范昕建, 611137, 四川省成都市十二桥路37号, 成都中医药大学. fanxj531008@yahoo.com.cn

电话: 028-87732353

收稿日期: 2007-11-07 修回日期: 2008-09-12

接受日期: 2008-09-15 在线出版日期: 2008-10-18

Protective effect of Picroside II against H₂O₂-induced damage in L-02 cells

Wei Gu, Xin-Jian Fan, Jiang Wu, Zhi-Qiang Niu

Wei Gu, Xin-Jian Fan, Jiang Wu, Zhi-Qiang Niu, Center of Infectious Diseases, West China Hospital, Department of Infectious Diseases, National Key Laboratory of Biotechnology, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Xin-Jian Fan, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, Sichuan Province, China

Supported by: the Applied Basic Research Programs of Science and Technology Commission Foundation of Sichuan Province, No. 07SG004-001

Correspondence to: Dr. Xin-Jian Fan, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 37 Shierqiao Road, Chengdu 611137, Sichuan Province, China. fanxj531008@yahoo.com.cn

Received: 2007-11-07 Revised: 2008-09-12

Accepted: 2008-09-15 Published online: 2008-10-18

Abstract

AIM: To study the protective effect of Picroside II on L-02 cell damage induced by oxidative stress.

METHODS: L-02 cells damage induced by hydrogen peroxide (H₂O₂) were chosen to establish the model of hepatocellular oxidative stress. The proliferation of L-02 cells was observed using 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The apoptosis of L-02 cells was detected using Annexin-V/propidium iodide, propidium iodide stain flow cytometry (FCM). The mitochondrial mem-

brane potential ($\Delta\Psi_m$) was analyzed by rhodamine123 stain FCM and the level of reactive oxygen species (ROS) in L-02 cells was determined using dihydrodihydrodamine123 stain FCM.

RESULTS: 0.6 mmol/L H₂O₂ induced L-02 cell apoptosis, increased intracellular accumulation of ROS, decreased mitochondrial membrane potential. After treatment with 0.05, 0.5, 5 mmol/L Picroside II, H₂O₂-induced apoptosis in L-02 significantly reduced (30.8% ± 9.09%, 10.2% ± 9.82%, 8.2% ± 7.10% vs 42.8% ± 8.28%, all *P* < 0.01). At the same time significantly reduced were H₂O₂-induced intracellular accumulation of ROS and mitochondrial membrane potential.

CONCLUSION: Picroside II has protective effect on L-02 cell damage induced by oxidative stress and the effect might be attributed to its removal of ROS and increased $\Delta\Psi_m$ level.

Key Words: Picroside II; Oxidative stress; L-02 cells; Mitochondrial membrane potential; MTT assay; Flow cytometry

Gu W, Fan XJ, Wu J, Niu ZQ. Protective effect of Picroside II against H₂O₂-induced damage in L-02 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(29): 3274-3278

摘要

目的: 探讨胡黄连苷 II (picroside II) 对氧化应激损伤L-02细胞的保护作用。

方法: H₂O₂损伤的L-02细胞作为氧化应激损伤模型, MTT法检测细胞增殖状况, 膜联蛋白(Annexin-V)和碘化丙啶(PI)染色流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测细胞凋亡, 罗丹明123染色FCM检测细胞线粒体膜电位(mitochondrial potential membrane, $\Delta\Psi_m$), 双氢罗丹明123染色FCM检测细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的含量。

结果: 0.6 mmol/L H₂O₂可诱导L-02细胞凋亡, 细胞内ROS浓度增加, 细胞线粒体跨膜电位明显下降。预先经过0.05, 0.5, 5 mmol/L浓度的胡黄连苷 II 处理后, H₂O₂诱导的L-02细胞凋亡明

■同行评议者

朱传武, 副主任医师, 江苏省苏州市第五人民医院传染科

显减少(30.8%±9.09%, 10.2%±9.82%, 8.2%±7.10% vs 42.8%±8.28%, 均 $P<0.01$), 同时明显减弱H₂O₂对细胞内ROS浓度和线粒体跨膜电位的影响。

结论: 胡黄连苷 II 对氧化应激损伤L-02细胞具有保护作用, 其机制可能与降低细胞内ROS含量, 进而抑制 $\Delta\Psi_m$ 的降低有关。

关键词: 胡黄连苷 II; 氧化应激; L-02; 细胞线粒体膜电位; 甲基噻唑蓝法; 流式细胞术

顾伟, 范昕建, 吴疆, 牛智强. 胡黄连苷 II 对H₂O₂损伤L-02细胞的保护作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(29): 3274-3278
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3274.asp>

0 引言

胡黄连为常用中药材之一, 其味苦性寒, 为玄参科植物胡黄连或西藏胡黄连的根茎, 有明显的保肝利胆作用. 胡黄连化学成分主要分为三类: 环烯醚萜类, 葫芦素类和酚甙类, 另外还含有少量的甘露醇, 胡黄连醇, 胡黄连甾醇, 香莰兰乙酮及芳香酸等, 其中胡黄连苷 II (picroside II C₂₃H₂₈O₁₃分子质量512) 为环烯醚萜甙类的主要有效成分, 他有明显的保护肝脏损伤、抗氧化、调节免疫等作用^[1-3]. 但是他的抗肝损伤的药理作用还不是很清楚, 本研究采用细胞培养的方法, 探讨胡黄连苷 II 对双氧水(H₂O₂)导致的肝细胞(L-02细胞株)的损伤的保护作用及其抗氧化损伤的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 流式细胞仪(EPICS ELITE ESP, Beckman Coulter), CO₂培养箱(Sanyo), 倒置生物显微镜(Olympus), 全自动酶标仪(BIO-TEK ELX800), 25 cm²细胞培养瓶、96孔培养板(Corning Incorporated). DMEM培养基(Gibco, Grand Island, NY, USA), 小牛血清(兰州民海生物有限公司), Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购于凯基生物科技发展有限公司, 琼脂糖, 溴化乙锭(EB), 甲基噻唑蓝(MTT), 二甲基亚砜(DMSO)购于Sigma(St. Louis, MO, USA), 胡黄连苷 II (picroside II, 批号111596-200402)标准品、购于中国药品生物制品检定所, 胡黄连苷 II 用无血清培养液(DMEM)溶解. 罗丹明123(Rhodamine123, Rh123, 用DMSO溶解配成1 g/L, 于-20℃冻存备用)、双氢罗丹明123 (Dihydrohodamine123, DHR, 用DMSO溶解配成1 mol/L, 于-20℃冻存备用)购于

Sigma. 人肝细胞细胞株L-02, 来自ATCC, 四川大学教育部移植免疫重点实验室细胞室保种. 细胞接种在含100 mL/L小牛血清的DMEM培养液中, 在37℃, 50 mL/L CO₂培养箱中培养。

1.2 方法

1.2.1 MTT法检测: 将稀释为含 5×10^6 /L个细胞的细胞悬液接种于96孔培养板中, 100 μ L/孔, 待细胞长成对数生长期, 即可用于实验. 选择长成对数生长期的细胞, 换去原培养液, 加入不同药物浓度(0, 0.05, 0.5, 5 mmol/L)的胡黄连苷 II 100 μ L/孔, 37℃, 50 mL/L CO₂条件下培养3 h, 然后加入含H₂O₂ 1.2 mmol/L的培养液100 μ L/孔, 使H₂O₂终浓度为0.6 mmol/L. 继续培养1 h, 造成H₂O₂损伤模型. 每个浓度作3个复孔, 分别培养24、48、72 h后, 每孔加2 g/L MTT 20 μ L, 再培养4 h, 倾去培养液, 加DMSO 100 μ L/孔, 待甲臜完全溶解后, 用酶联免疫仪在波长570 nm处读取吸光度(A_{570}). 取3孔 A 值的均数按公式计算细胞生存率: 细胞存活率 = $(A - A_{空白}) / (A_{模型} - A_{空白}) \times 100\%$. 重复3次。

1.2.2 磷脂酰丝氨酸外翻分析法(Annexin-V法): 每瓶 2×10^6 个细胞的密度接种在25 cm²细胞培养瓶中, 培养24 h后, 加入浓度为0(对照组)、0.05、0.5、5 mmol/L(用药组)胡黄连苷 II 培养液在37℃, 50 mL/L CO₂条件下培养3 h, 加入含H₂O₂的培养液, 使其终浓度为0.6 mmol/L, 培养24 h后, 用2.5 g/L胰蛋白酶消化细胞, 制成单个细胞悬液, 收集 1×10^6 以上细胞, 用PBS离心洗涤, 加入500 μ L Binding Buffer和FITC标记的膜联蛋白V(Annexin-V)5 μ L和5 μ L碘化丙啶(propidium iodide, PI)在4℃反应30 min, 上流式细胞仪检测(激发波长: 488 nm; 发射波长: 610 nm)。

1.2.3 细胞线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)的检测: Rh123是一种可透过细胞膜的阳离子荧光染料, 是一种线粒体跨膜电位的指示剂. 其在正常细胞中能够依赖线粒体跨膜电位进入线粒体基质, 荧光强度减弱或消失. 而在凋亡发生时, 线粒体膜完整性破坏, 线粒体膜通透性转运孔开放, 引起 $\Delta\Psi_m$ 的崩溃, Rh123重新释放出线粒体, 从而发出强黄绿色荧光, 可用流式细胞仪检测, 通过荧光信号的强弱来检测线粒体膜电位的变化. 因此, 可通过检测细胞Rh123的荧光强度反映细胞 $\Delta\Psi_m$. 药物处理24 h后, 用2.5 g/L胰蛋白酶消化贴壁的L-02细胞, 收集 1×10^6 细胞用PBS洗2次. 取储存于-20℃、溶于DMSO的1 g/L Rh123, 用不含小牛血清的DMEM稀释至10 μ g/L, 重悬上

■ 研究前沿

胡黄连苷 II 能有效对受损肝细胞有保护作用, 本文对其保肝作用的机制, 主要是针对其抗氧化应激和细胞抗细胞凋亡方面做了初步研究。

■ 创新盘点

通过体外实验, 探讨了胡黄连苷 II 保护肝细胞的部分药理作用, 为今后做抗病毒实验打下一定的基础。

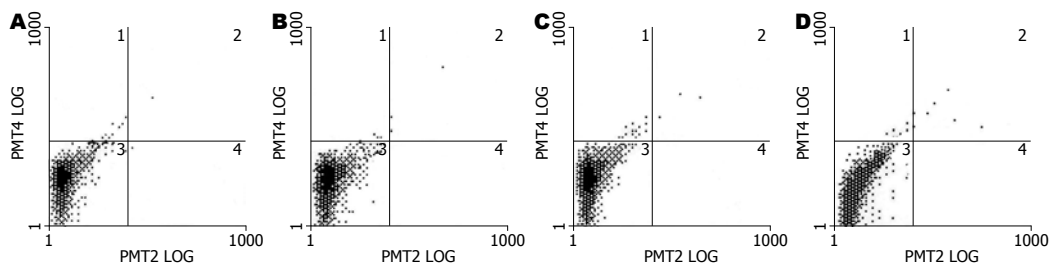


图 1 各浓度组胡黄连苷 II 对L-02细胞凋亡的影响. A: 正常组; B: 0.05 mmol/L胡黄连苷 II; C: 0.5 mmol/L胡黄连苷 II; D: 5 mmol/L胡黄连苷 II.

述细胞, 避光于37℃孵育45 min后进行流式细胞仪测定(激发波长: 488 nm; 发射波长: 525 nm), 测定数据按流式细胞仪所配置的软件进行数据处理. 计数10 000个活细胞, 以阳性细胞的平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)表示 $\Delta\Psi_m$.

1.2.4 细胞内ROS含量的检测^[4]: DHR是一种极易被氧化的亲脂性染料, 可自由进出细胞膜, 进入细胞后可被ROS(主要为超氧化物、过氧化氢和过氧化亚硝基)氧化成一种具有正电荷、能发出荧光的Rh123, 并被泵入线粒体内, 从而维系在细胞内, 经过一定时间的累积, 即可通过流式细胞仪检出相应的荧光. 药物处理16 h后, 倾去陈旧培养基, 用无血清的DMEM洗2次, 加入用无血清的DMEM稀释至终浓度为1 $\mu\text{mol/L}$ 的DRH, 避光于37℃孵育1 h后, 收集细胞, PBS洗1次, 制成 $1 \times 10^8/\text{L}$ 的悬液, 上流式细胞仪检测(激发波长: 488 nm; 发射波长: 525 nm), 测定数据按流式细胞仪所配置的软件进行数据处理. 每个样品测定10 000个活细胞, 直方图分析Rh123的平均荧光强度(MFI), 该值即代表细胞ROS水平.

统计学处理 全部数据经SPSS13.0统计软件进行统计分析, 数据 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 组间比较用independent-samples *t*检验.

2 结果

2.1 胡黄连苷 II 对L-02细胞无凋亡诱导作用 采用Annexin-V染色FCM检测细胞凋亡以了解胡黄连苷 II 能否直接诱导L-02细胞凋亡. 结果发现, 0(正常对照组)、0.05、0.5 和5 mmol/L胡黄连苷 II 作用24 h后, L-02细胞的凋亡率分别为 $1.7\% \pm 8.48\%$ 、 $1.2\% \pm 8.21\%$ 、 $0.8\% \pm 4.22\%$ 和 $2.2\% \pm 8.43\%$, 与对照组 $1.7\% \pm 8.48\%$ 比较差异无显著性, 表明胡黄连苷 II 并不诱导L-02细胞凋亡(图1).

2.2 胡黄连苷 II 对H₂O₂导致L-02细胞损伤的保护作用 采用MTT法, 细胞存活率 = $(A - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{模型}}$

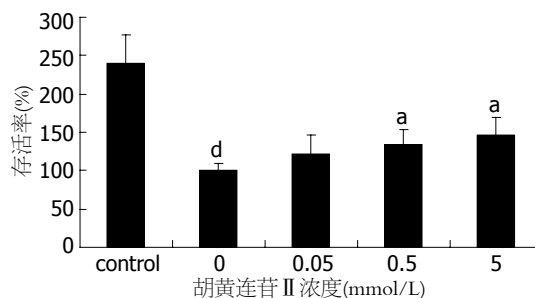


图 2 胡黄连苷 II 对L-02细胞H₂O₂损伤模型的作用(MTT法测定). control: 正常对照组; 0 mmol/L: H₂O₂模型组. **P*<0.05 vs H₂O₂模型组, ^d*P*<0.01 vs 正常对照组.

$-A_{\text{空白}}) \times 100\%$, 测不同浓度胡黄连苷 II 对同一浓度H₂O₂抑制L-02细胞的生长的情况如图2. 结果显示, 胡黄连苷 II 可提高L-02细胞H₂O₂损伤模型的细胞存活率. 0.5、5 mmol/L浓度组胡黄连苷 II 与H₂O₂模型组比较有明显差异(*P*<0.05).

2.3 胡黄连苷 II 对H₂O₂诱导L-02细胞凋亡的作用 采用Annexin-V/PI染色FCM检测细胞凋亡以了解胡黄连苷 II 对H₂O₂诱导L-02细胞凋亡的情况. 如图3所示, 用H₂O₂模型对照(0.6 mmol/L)作用L-02细胞24 h后, 细胞凋亡率为 $42.8\% \pm 8.28\%$; 空白对照组细胞凋亡率为 $1.7\% \pm 4.8\%$, 0.05 mmol/L胡黄连苷 II 保护H₂O₂模型24 h; 细胞凋亡率为 $30.8\% \pm 9.09\%$, 0.5 mmol/L胡黄连苷 II 保护H₂O₂模型24 h; 细胞凋亡率为 $10.2\% \pm 9.82\%$; 5 mmol/L胡黄连苷 II 保护H₂O₂模型24 h; 细胞凋亡率为 $8.2\% \pm 7.10\%$. 各浓度组胡黄连苷 II 和H₂O₂模型组相比较有明显的差异(*P*<0.01).

2.4 胡黄连苷 II 对H₂O₂降低细胞 $\Delta\Psi_m$ 的变化 用胡黄连苷 II 保护用H₂O₂诱导后的L-02细胞, 采用Rh123染色FCM检测细胞 $\Delta\Psi_m$ 的变化, 观察胡黄连苷 II 对于细胞的保护作用. 结果如图4所示: L-02细胞在H₂O₂作用24 h后, 细胞的Rh123平均荧光强度 $16.4\% \pm 3.4\%$ 较正常细胞 $96.2\% \pm 3.2\%$ 的明显下降(*P*<0.01), 可见H₂O₂可使细胞的 $\Delta\Psi_m$ 下降, 在加入不同浓度(0.05、0.5、5 mmol/L)胡黄

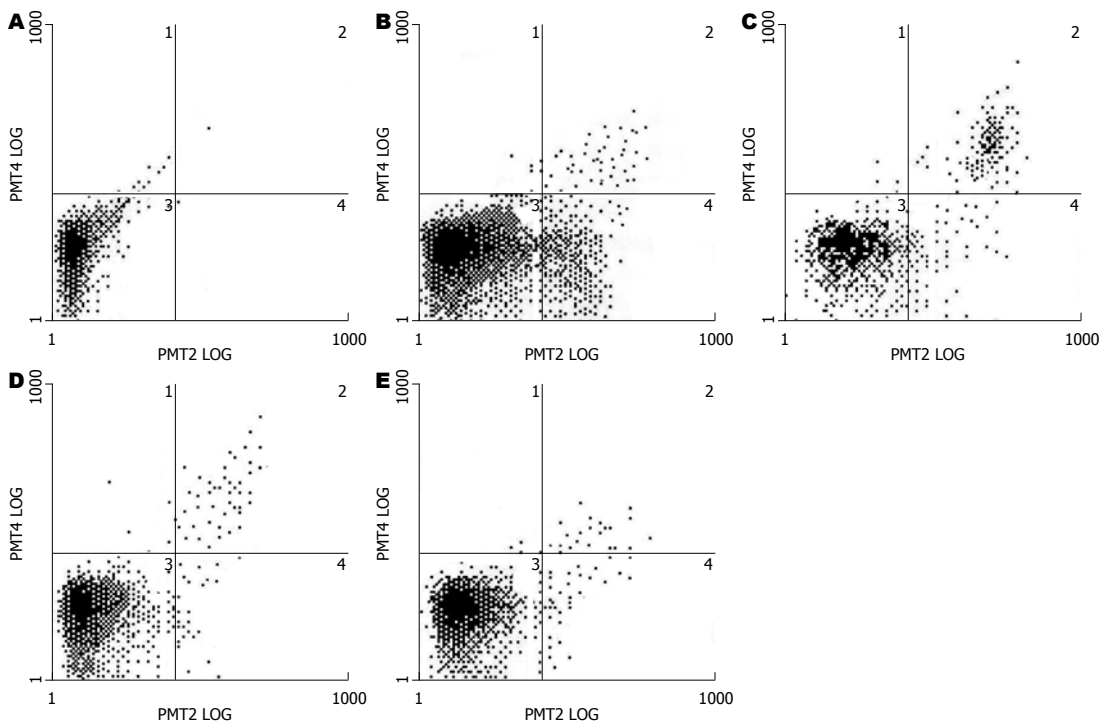


图 3 各浓度胡黄连苷 II 保护H₂O₂诱导L-02细胞凋亡的作用. A: 正常组; B: H₂O₂模型组; C: 0.05 mmol/L胡黄连苷 II; D: 0.5 mmol/L胡黄连苷 II; E: 5 mmol/L胡黄连苷 II.

■应用要点
 保护肝细胞、减轻或阻止肝损伤, 不仅可阻止肝功能的进行性损害, 同时也可以逆转肝纤维化及早期肝硬化. 因此肝脏保护在肝病的治疗中是不可缺少的, 应采用抗炎保肝药物作为综合治疗的措施. 对肝损伤的治疗是评价肝病治疗效果的一个重要的方面, 因此, 研制开发有效治疗肝损伤的药物具有重要的现实意义.

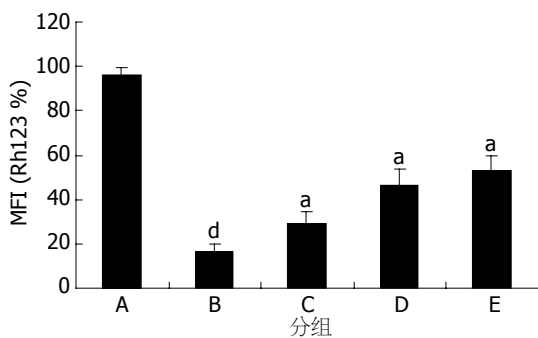


图 4 胡黄连苷 II 对H₂O₂诱导的L-02细胞线粒体膜电位降低的影响. A: 正常组; B: H₂O₂模型组; C: 0.05 mmol/L胡黄连苷 II; D: 0.5 mmol/L胡黄连苷 II; E: 5 mmol/L胡黄连苷 II. ^a*P*<0.05 vs H₂O₂模型组, ^b*P*<0.01 vs 正常对照组.

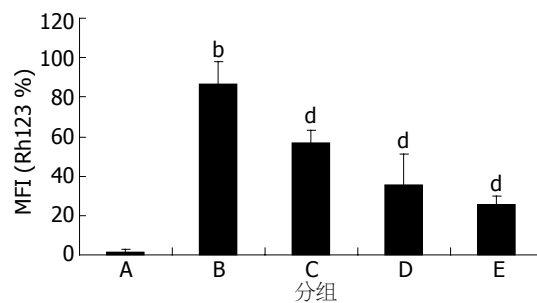


图 5 胡黄连苷 II 对H₂O₂诱导的L-02细胞内活性氧积累的影响. A: 正常组; B: H₂O₂模型组(0.6 mmol/L H₂O₂); C: 0.05 mmol/L胡黄连苷 II; D: 0.5 mmol/L胡黄连苷 II; E: 5 mmol/L胡黄连苷 II. ^b*P*<0.01 vs 正常对照组, ^d*P*<0.01 vs H₂O₂模型组.

连苷 II 后, 他的Rh123平均荧光强度较H₂O₂模型组明显升高(分别为: 28.9%±5.4%, 46.3%±7.18%, 53.0%±6.7%, *P*<0.05), 提示胡黄连 II 对H₂O₂引起的线粒体损伤有明显的保护作用.

2.5 胡黄连苷 II 对H₂O₂诱导细胞后活性氧的变化 用胡黄连苷 II 保护H₂O₂诱导的L-02细胞, 采用DHR染色FCM检测细胞内的ROS的变化, 以观察胡黄连苷 II 对这种变化的影响. 结果如图5所示, 0.6 mmol/L H₂O₂作用16 h后, L-02细胞的Rh123平均荧光强度86.7%±11.4%较对照组1.5%±1.58%明显增强, 表明给以H₂O₂后, 细胞内ROS的含量升高. 合用0.05, 0.5, 5 mmol/L胡黄连苷 II 后, L-02细胞的Rh123平均荧光强度

56.8%±6.48%, 35.8%±15.0%, 25.6%±4.47%较H₂O₂组明显降低, 表明胡黄连苷 II 可清除细胞内ROS. H₂O₂模型组与各药物浓度组和正常组相比有显著性差异(*P*<0.01).

3 讨论

氧化应激是指由内源性的活性氧(ROS)所致的细胞毒性损伤. 细胞内氧化系统与抗氧化系统失衡, 导致ROS在细胞中累积是氧化应激的主要特征之一. 同时细胞内ROS累积、ΔΨ_m下降也是氧化应激诱导细胞凋亡的关键因素^[5]. 线粒体内ROS累积, 可直接或间接损线粒体膜, 造成膜电位下降, 最终引起氧化应激损伤, 他是慢性病毒性肝炎、酒精性肝病(ALD)、自身免疫性肝

■同行评价

本文为药物的实验研究,设计合理,方法得当,采用的统计分析方法合理,为一篇较好的文章。

脏疾病(AILD)和非酒精性脂肪肝(NASH)的共同病理学特征,其至少在一定程度上可能与肝细胞和肝脏其他类型细胞的功能障碍或死亡有关,并导致疾病的发生和发展^[6-7]。

本研究结果显示,胡黄连苷 II 可增加H₂O₂损伤后的L-02细胞生存率,可抑制H₂O₂诱导L-02细胞凋亡,表明胡黄连苷 II 对氧化应激损伤肝细胞具有保护作用,与有关文献报道相似^[8]。在用胡黄连苷 II 作用L-02细胞后,他的凋亡率和正常培养的L-02细胞相比较没有显著性差异,表明胡黄连苷 II 本身对L-02细胞没有细胞毒性。

线粒体是凋亡过程中一个非常重要的调控器,多数凋亡发生过程都伴有线粒体 $\Delta\Psi_m$ 的异常,表明 $\Delta\Psi_m$ 的降低是细胞发生凋亡早期的一个不可逆改变^[9]。而在凋亡发生时,线粒体膜完整性破坏,线粒体膜通透性转运孔开放,引起 $\Delta\Psi_m$ 的崩溃,本研究结果显示,H₂O₂可降低 $\Delta\Psi_m$,而合用胡黄连苷 II 后,细胞的 $\Delta\Psi_m$ 升高,表明胡黄连苷 II 对氧化应激损伤肝细胞的保护作用可能与他抑制细胞 $\Delta\Psi_m$ 降低有关。

真核细胞在有氧呼吸过程中,一小部分氧不能被完全还原,生成了具有较强氧化作用的ROS,包括超氧阴离子(O₂²⁻)、羟自由基(OH)、过氧化氢(H₂O₂)^[10]等。同时细胞内存在一套抗氧化酶类,包括超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶,能够清除代谢过程中不断产生的ROS,使得细胞内ROS处于一个相对稳定的水平。ROS可引起脂类的过氧化,蛋白质的变性,DNA的断裂等等,可参与一系列炎症和变性疾病的形成。近年来还发现ROS还可参与细胞信号转导,启动某些基因的表达,因此细胞内ROS水平对细胞的基本新陈代谢状态有着重要的影响^[11]。本研究结果显示胡黄连苷 II 可明显降低H₂O₂作用16 h后细胞内ROS含量,表明胡黄连苷 II 对氧化应激损伤肝细胞的保护作用可能与对ROS的清除作用有关,线粒体是细胞内的“能量工厂”,是产生ROS的主要部位,ATP、ROS、 $\Delta\Psi_m$ 三者之间的关系影响线粒体的功能,进而影响到细胞的正常结构与功能以及细胞凋亡的产生与发展,ROS的增加可直接或间接

损伤线粒体膜而使 $\Delta\Psi_m$ 降低。因此,认为胡黄连苷 II 对氧化应激损伤肝细胞的保护作用可能是通过清除ROS进而抑制 $\Delta\Psi_m$ 的降低而实现的。

胡黄连苷 II 有明显的抗H₂O₂对L-02细胞损伤作用,其机制可能为:可减少氧自由基,从而发挥抗脂质过氧化损伤作用,增强细胞本身抗氧化系统的功能,从而阻断自由基损伤作用,可能是通过保护细胞膜、线粒体膜的作用而达到。因此,胡黄连苷 II 在治疗肝脏疾病方面值得进一步研究。

4 参考文献

- Gao H, Zhou YW. Anti-lipid peroxidation and protection of liver mitochondria against injuries by picroside II. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3671-3674
- Joy KL, Rajeshkumar NV, Kuttan G, Kuttan R. Effect of Picrorrhiza kurroa extract on transplanted tumours and chemical carcinogenesis in mice. *J Ethnopharmacol* 2000; 71: 261-266
- Rastogi R, Srivastava AK, Srivastava M, Rastogi AK. Hepatocurative effect of picroliv and silymarin against aflatoxin B1 induced hepatotoxicity in rats. *Planta Med* 2000; 66: 709-713
- 史桂英,高飞,石学耕,汤雪明. 流式细胞术检测细胞内活性氧的方法. *上海第二医科大学学报* 2001; 21: 122-124
- Whittemore ER, Loo DT, Cotman CW. Exposure to hydrogen peroxide induces cell death via apoptosis in cultured rat cortical neurons. *Neuroreport* 1994; 5: 1485-1488
- Medina J, Moreno-Otero R. Pathophysiological basis for antioxidant therapy in chronic liver disease. *Drugs* 2005; 65: 2445-2461
- Tribble DL, Aw TY, Jones DP. The pathophysiological significance of lipid peroxidation in oxidative cell injury. *Hepatology* 1987; 7: 377-386
- Gao H, Zhou YW. Inhibitory effect of picroside II on hepatocyte apoptosis. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26: 729-736
- Nieminen AL, Saylor AK, Tesfai SA, Herman B, Lemasters JJ. Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to t-butylhydroperoxide. *Biochem J* 1995; 307 (Pt 1): 99-106
- Kanbagli O, Balkan J, Aykaç-Toker G, Uysal M. Hepatic mitochondrial prooxidant and antioxidant status in ethanol-induced liver injury in rats. *Biol Pharm Bull* 2002; 25: 1482-1484
- Cotgreave IA, Gerdes RG. Recent trends in glutathione biochemistry--glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 242: 1-9

编辑 李军亮 电编 何基才

mTOR/P70S6K信号通路在肝细胞肝癌中的表达及临床意义

彭贵主, 吴波, 单人锋, 周福庆

彭贵主, 单人锋, 周福庆, 南昌大学第一附属医院肝脏外科和移植中心 江西省南昌市 330006
吴波, 南昌大学研究生院医学部 江西省南昌市 330006
作者贡献分布: 实验设计由吴波和周福庆完成; 研究过程由吴波完成; 数据整理, 统计分析及文章写作由吴波完成; 彭贵主与单人锋指导实验。
通讯作者: 彭贵主, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第一附属医院肝脏外科和移植中心. guizhupeng@163.com
电话: 0791-8694129
收稿日期: 2008-07-29 修回日期: 2008-09-12
接受日期: 2008-09-17 在线出版日期: 2008-10-18

Expression and clinical significance of mTOR/P70S6K signaling pathway in hepatocellular carcinoma

Gui-Zhu Peng, Bo Wu, Ren-Feng Shan, Fu-Qing Zhou

Gui-Zhu Peng, Ren-Feng Shan, Fu-Qing Zhou, Liver Surgery and Transplantation Center of the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Bo Wu, Medical Department, Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Correspondence to: Gui-Zhu Peng, Liver Surgery and Transplantation Center of the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. guizhupeng@163.com
Received: 2008-07-29 Revised: 2008-09-12
Accepted: 2008-09-17 Published online: 2008-10-18

Abstract

AIM: To investigate expression of mTOR/P70S6K signaling pathway in human hepatocellular carcinoma (HCC) and to discuss its role in the hepatocellular carcinogenesis.

METHODS: Reverse transcription polymerase chain reactions (RT-PCR) was employed to determine the mRNA expression of mTOR/P70S6K signaling pathway in cancerous and paracancerous tissues of 20 HCC cases and normal healthy liver tissues of 10 cases. The relationship between expression of the genes mRNA in HCC tissues and related clinical parameters was analyzed.

RESULTS: The expression level of mTOR/

P70S6K signaling pathway was markedly higher in the HCC tissues than in the paracancerous tissues or normal healthy liver tissues (mTOR mRNA: 0.594 ± 0.218 vs 0.437 ± 0.156 , 0.594 ± 0.218 vs 0.383 ± 0.081 , both $P < 0.05$; P70S6K mRNA: 0.610 ± 0.147 vs 0.486 ± 0.162 , 0.610 ± 0.147 vs 0.440 ± 0.141 , both $P < 0.05$). There was a positive correlation between mTOR mRNA and P70S6K mRNA expression in HCC tissues ($r = 0.548$, $P = 0.012$). There was also a positive correlation between mTOR mRNA and P70S6K mRNA expressions in paracancerous tissues and the normal liver tissues ($r = 0.607$, 0.737 , $P = 0.005$, 0.015). The expression of mTOR/P70S6K signaling pathway in the HCC tissues was significantly correlated with the pathological grading, the pylic cancer embolus, but not with the diameter, level of the serous alpha - fetoprotein (AFP), and gender.

CONCLUSION: The mTOR/P70S6K signaling pathway is specifically activated in HCC tissues. The mTOR/P70S6K signaling pathway might play an important role in the pathogenesis of HCC.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; mTOR; P70S6K; Reverse transcription polymerase chain reaction

Peng GZ, Wu B, Shan RF, Zhou FQ. Expression and clinical significance of mTOR/P70S6K signaling pathway in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(29): 3279-3282

摘要

目的: 研究mTOR/P70S6K信号通路在肝细胞肝癌(HCC)中的表达, 探讨其在HCC发生发展中的作用及意义。

方法: 用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测20例HCC患者癌组织、癌旁肝组织以及10例正常肝组织中mTOR及P70S6K mRNA表达情况; 并分析mTOR及P70S6K mRNA的表达与相关临床参数的关系。

结果: mTOR及P70S6K mRNA在HCC组织中

■背景资料

肝细胞肝癌是人类常见的恶性肿瘤之一, 现阶段肝细胞肝癌的治疗仍然是一个有待解决的难题, 迫切需要寻求新的治疗方法。随着对肿瘤发生的分子生物学特性的深入了解, 针对肿瘤发展特异性生物环节的分子靶向药物治疗逐渐被人们所重视。

■同行评议者

孙殿兴, 主任医师, 白求恩国际和平医院肝病科

■ 研发前沿

mTOR/P70S6K信号通路在细胞生长中的作用尤为重要,他可以整合营养-氨基酸、能量-ATP、生长因子等所激发的信号通路,参与基因转录、蛋白质翻译、核糖体生物合成和细胞凋亡等多项细胞功能。许多肿瘤都伴有mTOR信号通路调节异常,与肿瘤发生密切相关的多种生理过程如细胞生长增殖,细胞周期调控,细胞迁移等都受到mTOR调控,Cyclin D, c-myc等多种癌基因的表达在翻译水平也受到mTOR调控。

的表达水平显著高于在癌旁肝组织和正常肝组织中的表达水平(mTOR mRNA: 0.594 ± 0.218 vs 0.437 ± 0.156 , 0.594 ± 0.218 vs 0.383 ± 0.081 , 均 $P < 0.05$; P70S6K mRNA: 0.610 ± 0.147 vs 0.486 ± 0.162 , 0.610 ± 0.147 vs 0.440 ± 0.141 , 均 $P < 0.05$)。mTOR mRNA和P70S6K mRNA在HCC组织中的表达呈正相关($r = 0.548$, $P = 0.012$),且两者在癌旁肝组织及正常肝组织中的表达亦正相关性($r = 0.607$, 0.737 , $P = 0.005$, 0.015)。mTOR及P70S6K mRNA在HCC组织中的表达水平与病理分期、门静脉癌栓等明显相关,而与肿瘤直径、血清AFP水平、性别等无明显关系。

结论: mTOR/P70S6K信号通路在HCC中特异性激活。mTOR/P70S6K信号通路可能在肝细胞肝癌的发生、发展中起重要作用。

关键词: 肝细胞肝癌; mTOR; P70S6K; 逆转录聚合酶链反应

彭贵主, 吴波, 单人锋, 周福庆. mTOR/P70S6K信号通路在肝细胞肝癌中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(29): 3279-3282

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3279.asp>

0 引言

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是近年来发现的一种进化上保守的蛋白激酶,也是一种重要的信号转导分子,参与多种病理和生理过程,在细胞的生长、分化、增殖、迁移和存活上扮演了重要的角色。P70S6激酶(P70S6K)是mTOR的直接作用底物,被mTOR磷酸化后激活,从而控制含5'-TOP结构的mRNA的翻译^[1-4]。越来越多的研究证明,mTOR/P70S6K信号通路在细胞的生存、生长与增殖中起中心调控作用,他所介导的信号转导通路的异常与多种恶性肿瘤有关,已成为肿瘤治疗的新靶点^[5-11,14]。本研究通过RT-PCR观察肝细胞肝癌中mTOR/P70S6K信号通路的表达情况及在肝细胞肝癌发生发展中的意义。

1 材料和方法

1.1 材料 标本及一般资料: 2007-04/2008-04我院手术切除的新鲜肝细胞肝癌标本20例,均取相应癌旁组织作对照,和10例正常肝组织分别放入冻存管立即置于液氮中,存储于-80℃冰箱。男性16例,女性4例,年龄29-70岁,平均年龄47.75岁,诊断均经病理学检查证实。所有患者均为第1次

手术,术前未接受放疗、化疗。BIOZOL总RNA提取试剂盒(杭州博日科技有限公司),BIORT逆转录扩增(RT-PCR)试剂盒(杭州博日科技有限公司),mTOR引物(上游引物批号02116,下游引物批号02117)、P70S6K引物(上游引物批号02118、下游引物批号02119)以及 β -actin内参引物(上游引物批号37496、下游引物批号37495)均为上海生工生物工程技术有限公司产品,焦碳酸二乙酯(DEPC, BBI公司,批号DB0154)溴化乙锭(EB, TaKaRa公司)琼脂糖,无水乙醇, DNA Mark(DL2000, TaKaRa公司), GeneAmp 5700型PCR仪(美国应用生物系统公司),凝胶电泳成像系统(Transilluminator公司),紫外分光光度计(Cary-50)(澳大利亚Varian公司)。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR检测: (1)总RNA提取及cDNA合成:按BIOZOL总RNA提取试剂盒说明进行提取组织总RNA,逆转录合成cDNA按BIORT逆转录扩增(RT-PCR)试剂盒说明进行。(2)聚合酶链反应(PCR):引物设计参考文献[12-13],由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列及合成的产物大小见表1,引物及其合成产物的正确性,均在NCBI网站进行了BLAST验证(网址:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)。(3)PCR:按BIORT逆转录扩增(RT-PCR)试剂盒说明进行。反应总体积25 μ L。10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, dNTP Mixture(10 mmol/L)0.5 μ L,每管加入mTOR上下游引物或者P70S6K上下游引物各0.5 μ L,上下游内参各0.5 μ L, Taq mixDNA polymerase 0.5 μ L, RT产物2.5 μ L, ddH₂O 17 μ L。PCR反应条件:94℃ 3 min预变性;94℃ 30 s, 60℃ 30 s和72℃ 90 s,共经过35个循环反应。所得PCR产物在含溴化乙锭的1.5 g/L的琼脂糖凝胶中电泳分离,然后用凝胶成像系统分析结果。

1.2.2 结果判断:用目的基因/看家基因两电泳条带的单位面积内的灰度比值来反映目的基因的相对表达水平。目的基因相对表达水平 = (目的基因灰度值-背景灰度值)/(看家基因灰度值-背景灰度值)。

统计学处理 对半定量RT-PCR结果应用SPSS11.5软件统计,两两比较用 t 检验,两因素的相关分析用直线相关分析(Pearson相关系数), $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 提取RNA的结果 所得RNA琼脂糖凝胶电泳显示5S, 18S, 28S三条清晰条带,再经紫外分光

■ 相关报道

Qi *et al*研究发现在转基因小鼠的胆囊组织中存在mTOR/P70S6K信号通路活化,mTOR信号通路的抑制剂雷帕霉素能明显减少BK5.erbB2小鼠胆囊腺癌的发生率,研究还发现人胆囊腺癌组织中存在mTOR/P70S6K信号通路活化。侯桂琴 *et al*研究发现食管鳞癌细胞系EC9706中存在mTOR/P70S6K信号通路并且处于激活状态,雷帕霉素能明显促进细胞凋亡并抑制该通路激活,从而间接抑制翻译的进行。

表 1 mTOR、P70S6K基因的引物序列

基因	引物序列(5'-3')	扩增片段长度(bp)
mTOR	上游: CTG GGA CTC AAA TGT GTG CAG TTC 下游: GAA CAA TAG GGT GAA TGA TCC GGG	537
P70S6K	上游: TAC TTC GGG TAC TTG GTA A 下游: GAT GAA GGG ATG CTT TAC T	188
β-actin	上游: TCC TCC CTG GAG AAG AGC TA 下游: TCA GGA GGA GCA ATG ATC TTG	302

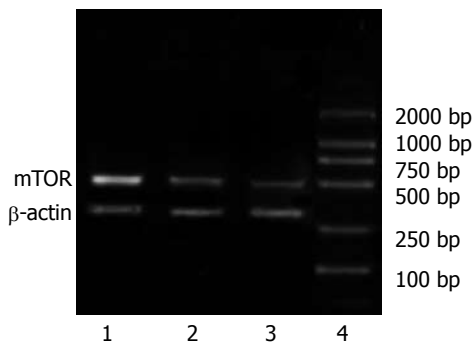


图 1 mTOR mRNA RT-PCR扩增产物表达. 1: HCC组织; 2: 癌旁肝组织; 3: 正常肝组织; 4: Marker.

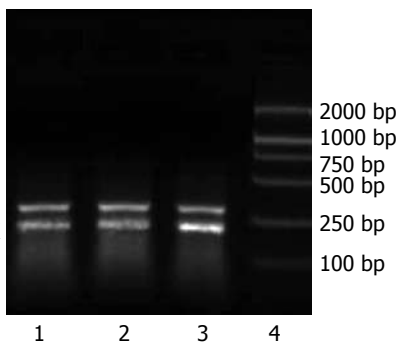


图 2 P70S6K mRNA RT-PCR扩增产物表达. 1: 正常肝组织; 2: 癌旁肝组织; 3: HCC组织; 4: Marker.

光度仪测定 A_{260}/A_{280} 及RNA浓度, 取 A_{260}/A_{280} 值在1.8-2.0者用于RT-PCR反应.

2.2 HCC及相应癌旁组织以及正常肝组织中mTOR, P70S6K mRNA的表达情况 mTOR mRNA在HCC组织中的表达水平(0.594 ± 0.218)明显高于癌旁组织(0.437 ± 0.156)及正常肝组织($0.383 \pm 0.081, P < 0.05$). P70S6K mRNA在HCC组织中的表达水平(0.610 ± 0.147)明显高于癌旁组织(0.486 ± 0.162)及正常肝组织($0.440 \pm 0.141, P < 0.05$, 图1-2).

2.3 HCC、癌旁肝组织及正常肝组织中mTOR、P70S6K表达的相互关系 在mRNA水平mTOR、P70S6K在HCC($r = 0.548, P = 0.012$)癌旁组织($r = 0.607, P = 0.005$), 及正常肝组织($r = 0.737, P = 0.015$)均呈正相关(表2).

2.4 HCC中mTOR、P70S6K mRNA的表达与临床参数的关系 mTOR、P70S6K mRNA在HCC中的表达均与门脉癌栓、病理分级明显相关($P < 0.05$), 与性别、肿瘤直径、AFP无明显相关($P > 0.05$, 表3).

3 讨论

随着对肿瘤发生的分子生物学特性的深入了解, 针对肿瘤发展特异性生物环节的分子靶向药物治疗逐渐被人们所重视. 肝细胞肝癌通常在进展期才被诊断出来, 目前还没有有效的化疗方法.

新近的研究发现, 一部分调控细胞生长的信号途径功能紊乱是导致这一肿瘤表型的主要原因. 因此, 以这些信号途径为治疗靶的化疗方法逐渐被人们重视起来, 包括mTOR/P70S6K信号途径.

mTOR是一种非典型的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶. 分子量大小为289 kDa. mTOR基因位于人一号染色体短臂36.2位点. mTOR的C末端与PI3K的催化结构域高度同源, 因此又属于磷脂酰肌醇激酶相关蛋白家族(phosphatidylinositol kinase-related kinases, PIKKs). P70S6激酶(P70S6K)是mTOR的直接作用底物. mTOR被PI3K/Akt信号传导通路介导的增生信号激活后, 磷酸化激活P70S6激酶, 后者又使40S核糖体蛋白S6磷酸化, S6磷酸化使40S亚单位参与活跃的多核糖体翻译, 从而增加包括编码核糖体蛋白、延长因子、胰岛素生长因子II在内的含有5末端寡聚嘧啶的mRNAs的翻译.

mTOR信号通路在细胞生长中处于核心地位, mTOR信号传导通路活化可以抑制多种刺激诱发的细胞凋亡, 促进细胞周期进展, 从而促进细胞的生存和增殖, 同时参与血管形成, 在肿瘤的形成中扮演重要角色, 并参与肿瘤的侵袭和转移^[1-5].

mTOR不仅对细胞正常生长增殖起着重要作用, 而且与正常细胞向癌细胞转化以及癌细

■创新盘点

关于 mTOR / P70S6K 信号通路在肝组织中的活化情况以及与肝细胞肝癌关系的报道尚少见. 本研究运用RT-PCR检测正常肝组织, 癌旁组织及HCC组织中mTOR / P70S6K信号通路的表达情况, 并分析其与HCC临床病理参数之间关系, 以期了解mTOR/P70S6K信号通路在HCC发生中的作用.

■应用要点

本研究证实 mTOR/P70S6K 信号通路在HCC中特异性激活. mTOR/P70S6K 信号通路可能在肝细胞肝癌的发生、发展中起重要作用. 为HCC的分子靶向药物治疗提供一定的理论基础.

■同行评价

本研究设计合理,方法可行,结果可靠,研究内容重要,提供了一些有意义的信息,为肝细胞肝癌的分子靶向治疗提供一定的理论依据。

表 2 mTOR、P70S6K的相关性

分组	n	mTOR	P70S6K	r	P
HCC组	20	0.594 ± 0.218	0.610 ± 0.147	0.548	0.012
癌旁组	20	0.437 ± 0.156	0.486 ± 0.162	0.607	0.005
正常肝组织	10	0.383 ± 0.081	0.440 ± 0.141	0.737	0.015

表 3 mTOR及P70S6K mRNA与临床参数的关系

临床参数	n	mTOR mRNA	P70S6K mRNA
性别			
女	4	0.651 ± 0.167	0.604 ± 0.108
男	16	0.580 ± 0.231	0.612 ± 0.158
AFP(μg/L)			
>400	12	0.623 ± 0.199	0.629 ± 0.150
<400	8	0.552 ± 0.251	0.583 ± 0.148
门脉癌栓			
有	5	0.784 ± 0.187	0.733 ± 0.088
无	15	0.531 ± 0.193	0.570 ± 0.142
肿瘤直径(cm)			
≤5	7	0.497 ± 0.266	0.617 ± 0.227
>5	13	0.647 ± 0.146	0.607 ± 0.092
病理分级			
iv	7	0.734 ± 0.167	0.745 ± 0.145
i-iii	13	0.519 ± 0.209	0.538 ± 0.086

细胞的生长,增殖密切相关.许多肿瘤中存在有编码mTOR信号通路相关蛋白的基因突变,这些蛋白的表达异常可引起mTOR通路的过度激活.已有研究表明,乳腺癌、白血病、小细胞肺癌、泌尿系肿瘤等均存在该信号通路的失调^[5-11].

在本实验中,mTOR、P70S6K在肝细胞肝癌组织中的表达水平显著高于在癌旁肝组织和正常肝组织中表达水平,说明肝细胞肝癌中存在异常活化的mTOR信号通路,而且mTOR的表达水平越高,mTOR下游的重要靶点P70S6K表达水平亦越高,呈正相关,从而使细胞中蛋白合成越快,即细胞生长越快,这又进一步加速了细胞的恶化.本实验还发现mTOR/P70S6K信号通路在肝细胞肝癌中的表达与门脉癌栓及病理分级明显相关,而与性别、AFP、肿瘤直径无明显相关.本研究结果说明mTOR信号通路的激活在肝细胞肝癌的发生发展中具有重要地位,为肝细胞肝癌的分子靶向治疗提供一定的理论依据.

4 参考文献

1 Zheng Y, Collins SL, Lutz MA, Allen AN, Kole TP,

- Zarek PE, Powell JD. A role for mammalian target of rapamycin in regulating T cell activation versus energy. *J Immunol* 2007; 178: 2163-2170
- 2 Peponi E, Drakos E, Reyes G, Leventaki V, Rassidakis GZ, Medeiros LJ. Activation of mammalian target of rapamycin signaling promotes cell cycle progression and protects cells from apoptosis in mantle cell lymphoma. *Am J Pathol* 2006; 169: 2171-2180
- 3 Pene F, Claessens YE, Muller O, Viguie F, Mayeux P, Dreyfus F, Lacombe C, Bouscary D. Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma. *Oncogene* 2002; 21: 6587-6597
- 4 Wang X, Proud CG. The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology (Bethesda)* 2006; 21: 362-369
- 5 Gao N, Flynn DC, Zhang Z, Zhong XS, Walker V, Liu KJ, Shi X, Jiang BH. G1 cell cycle progression and the expression of G1 cyclins are regulated by PI3K/AKT/mTOR/p70S6K1 signaling in human ovarian cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287: C281-C291
- 6 Costa LJ, Drabkin HA. Renal cell carcinoma: new developments in molecular biology and potential for targeted therapies. *Oncologist* 2007; 12: 1404-1415
- 7 Albert JM, Kim KW, Cao C, Lu B. Targeting the Akt/mammalian target of rapamycin pathway for radiosensitization of breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 1183-1189
- 8 Kopelovich L, Fay JR, Sigman CC, Crowell JA. The mammalian target of rapamycin pathway as a potential target for cancer chemoprevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 1330-1340
- 9 Cho D, Signoretti S, Regan M, Mier JW, Atkins MB. The role of mammalian target of rapamycin inhibitors in the treatment of advanced renal cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 758s-763s
- 10 Gridelli C, Maione P, Rossi A. The potential role of mTOR inhibitors in non-small cell lung cancer. *Oncologist* 2008; 13: 139-147
- 11 Wu Q, Kiguchi K, Kawamoto T, Ajiki T, Traag J, Carbajal S, Ruffino L, Thames H, Wistuba I, Thomas M, Vasquez KM, DiGiovanni J. Therapeutic effect of rapamycin on gallbladder cancer in a transgenic mouse model. *Cancer Res* 2007; 67: 3794-3800
- 12 刘奕, Sujata HIDAYAT, 米泽一仁, 于秉治. mTOR及其底物在HeLa细胞的细胞周期不同相中的表达. *中国生物化学与分子生物学报* 2004; 20: 358-362
- 13 侯桂琴, 鲁照明, 穆欣, 刘洪涛, 刘兰琦, 许培荣, 薛乐勋, 王建华. 雷帕霉素靶蛋白信号通路在食管癌细胞系中激活状态的研究. *中国肿瘤* 2007; 16: 260-262
- 14 Abraham RT, Gibbons JJ. The mammalian target of rapamycin signaling pathway: twists and turns in the road to cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 3109-3114

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

肥胖与大肠腺瘤关系的临床及分子机制

王娜, 黄志刚, 陈锡美, 叶荣菊, 王伟, 张霞, 张建培

王娜, 上海长宁区中心医院消化内科 上海市 200336
黄志刚, 陈锡美, 王伟, 张霞, 张建培, 上海同济大学医学院附属同济医院消化内科 上海市 200065
叶荣菊, 上海静安区老年医院消化内科 上海市 200040
王娜, 2005年上海同济大学医学院消化内科硕士, 现工作在上海长宁区中心医院, 主要从事大肠肿瘤的临床和实验研究。
作者贡献分布: 王娜与黄志刚对此文所作贡献均等; 此课题由黄志刚与陈锡美设计; 研究过程由王娜, 叶荣菊, 王伟, 张霞及张建培操作完成; 数据分析由王娜完成; 本论文写作由王娜与黄志刚完成。
通讯作者: 黄志刚, 200065, 上海市, 上海同济大学医学院附属同济医院消化内科. huangzg@foxmail.com
电话: 021-66111074
收稿日期: 2008-08-03 修回日期: 2008-09-09
接受日期: 2008-09-17 在线出版日期: 2008-10-18

Clinical and molecular mechanism of the relationship between obesity and colorectal adenoma

Na Wang, Zhi-Gang Huang, Xi-Mei Chen, Rong-Ju Ye, Hui Wang, Xia Zhang, Jian-Pei Zhang

Na Wang, Department of Gastroenterology, Central Hospital of Changning District, Shanghai 200336, China
Zhi-Gang Huang, Xi-Mei Chen, Hui Wang, Xia Zhang, Jian-Pei Zhang, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital affiliated to Medical College of Shanghai Tongji University, Shanghai 200065, China
Rong-Ju Ye, Department of Gastroenterology, Jing'an Geriatric Hospital, Shanghai 200040, China
Correspondence to: Dr. Zhi-Gang Huang, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital affiliated to Medical College of Shanghai Tongji University, Shanghai 200065, China. huangzg@foxmail.com
Received: 2008-08-03 Revised: 2008-09-09
Accepted: 2008-09-17 Published online: 2008-10-18

Abstract

AIM: To investigate the relationship between obesity and the colorectal precancerous lesion-adenoma, and to further investigate relationship between obesity and colon cancer and its prevention and treatment.

METHODS: A total of 539 subjects who underwent colonoscopy in Tongji Hospital from December 2006 to December 2007 were selected, and divided into the adenoma group ($n = 250$) and the control group ($n = 289$). Body height, weight, waist and hip circumference were measured, respectively. All data were analyzed using logistic

multi-factors regression. Four adenomatous tissues, pathologically-confirmed as tubular adenoma or tubulovillous adenoma, 2 with BMI > 24, WC > 85 cm, and the others with BMI < 24, WC < 85 cm, were selected from adenoma group, and used to screen the differentially expressed gene by Oligo Signal Transduction Pathway Microarray.

RESULTS: Obesity (by using BMI cut-offs) ($OR_{adj} = 2.48$, 95% CI = 1.19-5.20, $P = 0.016$) and abdominal adiposity (by using WC cut-offs) ($OR_{adj} = 1.75$, 95% CI = 1.15-2.66, $P = 0.009$) were significantly associated with an increased risk of colorectal adenomas, especially in men ($OR_{adj} = 4.10$ and 1.70, 95% CI = 1.26-13.31 and 1.00-2.88, $P = 0.019$ and 0.019, respectively), but there was no association in overweight group. Abdominal adiposity based on WHR showed no significant difference. Genomic hybridization showed 23 differentially expressed genes between the two groups. Among them, there were 6 genes up-regulated in BMI > 24 group, and 17 genes down-regulated in BMI < 24 group. Foxa2 was up-regulated, and IL-8 and Leptin were down-regulated.

CONCLUSION: Obesity or abdominal adiposity is positively associated with colorectal adenomas; the risk is highly increased in men. It is presumed that there are several abnormally expressed factors in the colorectal adenomatous tissues of obesity.

Key Words: Obesity; Colorectal adenoma; Epidemiology; Pathway-focused chip

Wang N, Huang ZG, Chen XM, Ye RJ, Wang H, Zhang X, Zhang JP. Clinical and molecular mechanism of the relationship between obesity and colorectal adenoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(29): 3283-3288

摘要

目的: 初步了解肥胖人群患大肠腺瘤的危险性, 并进一步深入探讨肥胖与大肠肿瘤的关系及其防治。

方法: 选择2006-12/2007-12在我院行结肠镜检查的患者539例, 分为大肠腺瘤组($n = 250$)

背景资料

肥胖人群发生大肠癌的危险性明显增高, 许多脂肪细胞因子在肥胖的大肠癌患者中表达异常, 而肥胖与大肠癌的癌前病变-大肠腺瘤的相关研究值得重视。

同行评议者

王振宁, 教授, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科; 刘宝瑞, 教授, 南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心

■ 研究前沿

肥胖与大肠癌的癌前病变-大肠腺瘤的临床及分子水平相关研究目前国内报道甚少,如深入研究,有望为大肠肿瘤的防治提供一定依据。

和正常对照组($n = 289$), 测量身高、体质量、腰围及臀围, 利用多因素Logistic回归进行相关性分析; 从大肠腺瘤组中选择4例病理为管状腺瘤或绒毛管状腺瘤的大肠息肉组织, 2例BMI $>24 \text{ kg/m}^2$, WC $>85 \text{ cm}$; 2例BMI $<24 \text{ kg/m}^2$, WC $<85 \text{ cm}$, 进行信号通路功能芯片基因筛查。

结果: 肥胖或腹型肥胖(以BMI和WC划分)患大肠腺瘤的调整后OR值分别为2.48(95% CI: 1.19-5.20, $P = 0.016$)和1.75(95% CI: 1.15-2.66, $P = 0.009$), 其中男性调整后的OR值分别为4.10(95% CI: 1.26-13.31, $P = 0.019$)和1.70(95% CI: 1.00-2.88, $P = 0.019$), 以BMI划分的超重组差异无统计学意义; 以WHR划分的腹型肥胖在各种分析中均无统计学意义。基因芯片杂交结果显示, 两组差异表达的基因共23个, 其中BMI $>24 \text{ kg/m}^2$ 组比BMI $<24 \text{ kg/m}^2$ 组表达上调有6个, 下调有17个, 脂肪细胞因子Foxa2表达上调, IL-8和Leptin表达下调。

结论: 肥胖或腹型肥胖与大肠腺瘤的发生存在显著相关性, 肥胖男性的患病风险明显大于女性; 患大肠腺瘤肥胖人群的腺瘤组织中存在一些异常表达的因子。

关键词: 肥胖; 大肠腺瘤; 流行病学; 功能分类基因芯片

王娜, 黄志刚, 陈锡美, 叶荣菊, 王伟, 张霞, 张建培. 肥胖与大肠腺瘤关系的临床及分子机制. 世界华人消化杂志. 2008; 16(29): 3283-3288

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3283.asp>

0 引言

近年来随着经济发展, 饮食结构的变化, 全世界肥胖人群的比例逐年上升, 我国的肥胖患者亦呈迅速增加趋势^[1]. 国内外许多大型流行病学资料显示^[2-5], 肥胖人群发生大肠癌的危险性明显增高, 并有研究发现许多脂肪细胞因子在肥胖的大肠癌患者中表达异常, 但目前对肥胖与大肠癌的癌前病变-大肠腺瘤的相关研究国内报道甚少. 为此, 我们进行了肥胖与大肠腺瘤相关性的病例对照分析研究, 初步了解肥胖人群患大肠腺瘤的危险性, 并通过基因芯片探查大肠腺瘤组织中是否同样存在表达异常的脂肪细胞因子, 为进一步深入研究肥胖与大肠肿瘤关系及其防治提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 以2006-12/2007-12在我院行结肠镜检

查的患者为调查对象, 按照WHO1995年推荐的方法在行结肠镜前测量被调查者的身高、体质量、腰围、臀围, 并记录有无糖尿病、吸烟及大肠癌或腺瘤家族史. 结肠镜下发现大肠息肉且病理为腺瘤并排除高脂血症及大肠癌史的患者250例为腺瘤组, 结肠镜证实大肠无病变的就诊者289例为对照组. 两组人群年龄均在25-88(腺瘤组平均年龄 61.02 ± 12.60 ; 对照组平均年龄 51.44 ± 12.60)岁之间, 男性271人, 女性268人. TrueLabeling-AMPTM线性RNA扩增试剂盒(美国SuperArray公司); 化学发光检测试剂盒(美国SuperArray公司); 信号转导通路发现者Oligo基因芯片(美国SuperArray公司).

1.2 方法

1.2.1 诊断标准: 体质量指数(BMI, kg/m^2)和腰围(WC)采用中国肥胖问题工作组2003年建议的肥胖诊断标准, 即 $24 \text{ kg/m}^2 \leq \text{BMI} < 28 \text{ kg/m}^2$ 为超重, $\text{BMI} \geq 28 \text{ kg/m}^2$ 为肥胖; 男性WC $\geq 85 \text{ cm}$ 或女性WC $\geq 80 \text{ cm}$ 为腹型肥胖(亦称向心性肥胖)^[6]. 腰臀比(WHR)标准采用男性WHR ≥ 0.9 或女性WHR ≥ 0.85 为腹型肥胖. 腺瘤根据肠镜下发现息肉并行病理证实为管状腺瘤、绒毛管状腺瘤或绒毛状腺瘤而确诊。

1.2.2 临床标本: 4例结肠镜下切除的病理为管状腺瘤或绒毛管状腺瘤的大肠息肉组织. 其中2例BMI $>24 \text{ kg/m}^2$, 腰围 $>85 \text{ cm}$ 为1组, 1名男性, 1名女性; 2例BMI $<24 \text{ kg/m}^2$, 腰围 $<85 \text{ cm}$ 为另1组, 1名男性, 1名女性. 肠镜下切除息肉后即刻DEPC水清洗, 置于液氮中保存。

1.2.3 芯片杂交检测: TRIzol抽提总RNA, 分光光度计定量, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性与纯度. 应用TrueLabeling-AMPTM线性RNA扩增试剂盒对该4例样本进行cRNA扩增, 同时行生物素标记. 芯片预杂交2 h, 生物素标记的cRNA样品与GEAhyb杂交液混合旋转杂交过夜, 洗膜2次, 加入CDP-Star化学发光底物, 晾干膜芯片, 通过X胶片和扫描仪获得芯片图像, GEArray表达分析配套软件(GEArray Expression Analysis Suite)进行完整的芯片数据分析, 筛选出比值 ≥ 2.0 或 ≤ 0.5 的基因作为差异表达基因。

统计学处理 所有数据资料均用SPSS13.0软件进行分析, 建立多因素Logistic回归模型进行相关性分析, $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。

2 结果

2.1 腺瘤组与对照组的基线资料 以BMI划分, 250例腺瘤患者中94例超重, 26例肥胖, 289例正

表 1 正常组与腺瘤组的年龄、性别、糖尿病、吸烟、家族史分布情况 (%)

	年龄			性别		糖尿病		吸烟		家族史	
	<40	40-60	≥60	男	女	有	无	有	无	有	无
腺瘤组	13/250 (5.2)	102/250 (40.8)	135/250 (54.0)	163/250 (65.2)	87/250 (34.8)	24/250 (9.6)	226/250 (90.4)	41/250 (16.4)	209/250 (83.6)	11/250 (4.4)	239/250 (95.6)
正常组	55/289 (19.0)	168/289 (58.1)	66/289 (22.8)	108/289 (37.4)	181/289 (62.6)	9/289 (3.1)	280/289 (96.9)	27/289 (9.3)	262/289 (90.7)	4/289 (1.4)	285/289 (98.6)
总计	68/539 (12.6)	270/539 (50.1)	201/539 (37.3)	271/539 (50.3)	268/539 (49.7)	33/539 (6.1)	506/539 (93.9)	68/539 (12.6)	471/539 (87.4)	15/539 (2.8)	524/539 (97.2)

■ 相关报道

Sedjo *et al* 研究发现 $25 \text{ kg/m}^2 \leq \text{BMI} < 30 \text{ kg/m}^2$ 组发生大肠腺瘤的危险度比 $\text{BMI} < 25 \text{ kg/m}^2$ 组要高, 且 $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ 组发生大肠腺瘤的危险度更高, 且女性的相对危险度高于男性, 并认为 WC 是发生大肠腺瘤的独立危险因素。

表 2 BMI、WC、WHR 与大肠腺瘤的相关性分析

		腺瘤发生率 (%)	OR (95% CI) ¹	P 值	OR _{adj} (95% CI) ²	P 值
BMI (kg/m ²)	正常	130/317 (41.0)	1.00		1.00	
	超重	94/181 (51.9)	1.57 (1.05-2.36)	0.029	1.47 (0.97-2.23)	0.067
	肥胖	26/41 (63.4)	2.45 (1.17-5.07)	0.017	2.48 (1.19-5.20)	0.016
WC (cm)	正常	73/201 (36.3)	1.00		1.00	
	腹型肥胖	177/338 (52.4)	1.79 (1.19-2.70)	0.005	1.75 (1.15-2.66)	0.009
WHR	正常	66/160 (40.4)	1.00		1.00	
	腹型肥胖	184/379 (51.6)	1.20 (0.78-1.84)	0.409	1.17 (0.76-1.80)	0.483

¹调整了年龄和性别; ²调整了可能的混杂因素: 年龄、性别、糖尿病、吸烟、家族史。

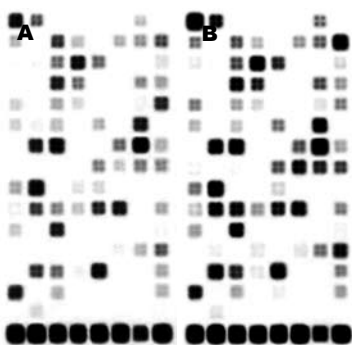


图 1 两组 BMI 不同者基因芯片杂交信号图. A: BMI > 24 组芯片信号灰度; B: BMI < 24 组芯片信号灰度。

常对照中 87 例超重, 15 例肥胖. 以 WC 或 WHR 划分, 腺瘤组腹型肥胖分别为 177 例和 184 例, 正常组的分别为 161 例和 195 例. 两组人群年龄、性别以及糖尿病、吸烟、家族史等影响因素的分布情况见表 1.

2.2 BMI、WC、WHR 与大肠腺瘤的相关性 调整性别、年龄、糖尿病、吸烟、家族史等多种影响因素后, 除超重人群发生大肠腺瘤的危险度未达到统计学差异, 以 BMI 划分的肥胖 ($OR = 2.48$, $95\% \text{ CI} = 1.19-5.20$, $P = 0.016$) 及以 WC 划分的腹型肥胖 ($OR = 1.75$, $95\% \text{ CI} = 1.15-2.66$, $P = 0.009$) 与大肠腺瘤的发生均呈较高的显著相关性. 以 WHR 划分的腹型肥胖人群发生大肠腺瘤的风险无统计学差异 (表 2).

2.3 BMI、WC、WHR 与大肠腺瘤相关性的性别差异 男性在调整年龄、糖尿病、吸烟、家族史等多种影响因素后, 以 BMI 划分的肥胖组 OR 值达 4.10 ($95\% \text{ CI} = 1.26-13.31$, $P = 0.019$), 以 WC 划分的腹型肥胖组 OR 值达 1.70 ($95\% \text{ CI} = 1.00-2.88$, $P = 0.048$), 患大肠腺瘤的危险度显著增高, 超重组仍未达到统计学差异, 而女性患此病的危险性小于 1. 以 WHR 划分的腹型肥胖男女人群发生该病的风险分别均无统计学意义 (表 3).

2.4 基因芯片杂交 芯片杂交结果见图 1, 芯片数据分析显示两组差异表达的基因共 23 个, BMI > 24 组比 BMI < 24 组表达上调的有 6 个, 表达下调的有 17 个, 其中与肥胖相关的因子有 FOXA2、IL-8 和 Leptin, FOXA2 表达上调, IL-8 和 Leptin 表达下调 (表 4).

3 讨论

本次病例对照研究结果显示, BMI 升高的患者发生大肠腺瘤的危险性明显增高, 尤其是 $\text{BMI} \geq 28 \text{ kg/m}^2$ 的肥胖人群, 其患大肠腺瘤的危险度是正常人的 2.48 倍 ($95\% \text{ CI} = 1.19-5.20$), 这与国外大多数研究结果相似^[7-9]. Sedjo *et al*^[10] 将 600 名平均年龄为 64 岁有或无症状的大肠腺瘤患者按 BMI 分成三组, 发现 $25 \text{ kg/m}^2 \leq \text{BMI} < 30 \text{ kg/m}^2$ 组

■创新盘点

在临床资料调查的基础上进一步行分子水平的研究,对肥胖与大肠腺瘤的关系进行更深入的研究.

表 3 不同性别的BMI、WC、WHR与大肠腺瘤的相关性分析

	男				女			
	OR(95%CI) ¹	P值	OR _{adj} (95% CI) ²	P值	OR(95% CI) ¹	P值	OR _{adj} (95% CI) ²	P值
BMI(kg/m ²)								
正常	1.00		1.00		1.00		1.00	
超重	1.49(0.86-2.59)	0.155	1.34(0.76-2.37)	0.314	0.64(0.35-1.18)	0.155	0.67(0.36-1.24)	0.205
肥胖	4.12(1.28-13.28)	0.018	4.10(1.26-13.31)	0.019	0.89(0.30-2.66)	0.842	0.97(0.32-2.89)	0.954
WC(cm)								
正常	1.00		1.00		1.00		1.00	
肥胖	1.69(1.01-2.82)	0.046	1.70(1.00-2.88)	0.048	0.58(0.28-1.16)	0.124	0.58(0.28-1.18)	0.131
WHR								
正常	1.00		1.00		1.00		1.00	
肥胖	1.27(0.75-2.16)	0.369	1.21(0.71-2.09)	0.482	1.09(0.53-2.25)	0.812	1.05(0.51-2.18)	0.893

¹调整了年龄和性别; ²调整了可能的混杂因素: 年龄、性别、糖尿病、吸烟、家族史.

表 4 肥胖组较正常组表达上调基因和下调基因

因子	全称	正常组标准值	肥胖组标准值	肥胖标/正常标
ATF2	Activating transcription factor 2	1.8204E-3	5.3992E-3	2.9658E+0 ¹
BAX	BCL2-associated X protein	7.4304E-5	3.5237E-3	4.7422E+1 ¹
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	2.3220E-3	5.4181E-3	2.3334E+0 ¹
FN1	Fibronectin 1	3.0747E-1	6.9380E-1	2.2565E+0 ¹
FOXA2	Forkhead box A2	1.1944E-2	5.8879E-2	4.9295E+0 ¹
KLK3	Kallikrein-related peptidase 3	3.5870E-2	8.7220E-2	2.4315E+0 ¹
BCL2L1	BCL2-like 1	3.4914E-1	1.4864E-1	4.2573E-1 ²
NAIP	NLR family, apoptosis inhibitory protein	8.7864E-3	4.2057E-3	4.7865E-1 ²
CCND1	Cyclin D1	7.8669E-2	3.2603E-2	4.1444E-1 ²
CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	3.1473E-1	1.2994E-1	4.1286E-1 ²
EN1	Engrailed homeobox 1	1.1108E-2	4.9066E-3	4.4170E-1 ²
IL1α	Interleukin 1, alpha	5.5022E-2	1.7448E-2	3.1711E-1 ²
IL2RA	Interleukin 2 receptor, alpha	4.7090E-2	6.5548E-3	1.3920E-1 ²
IL4	Interleukin 4	1.9040E-2	6.7821E-3	3.5620E-1 ²
IL8	Interleukin 8	7.8034E-1	1.4638E-1	1.8759E-1
LEP	Leptin (obesity homolog, mouse)	2.6489E-2	1.2143E-2	4.5843E-1 ²
MMP10	Matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	1.5760E-1	6.4676E-2	4.1039E-1 ²
MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	7.7896E-1	3.1393E-1	4.0301E-1 ²
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	2.8923E-2	6.3653E-3	2.2008E-1 ²
RBBP8	Retinoblastoma binding protein 8	7.0403E-2	2.0555E-2	2.9196E-1 ²
RBP1	Retinol binding protein 1, cellular	4.4285E-2	1.8433E-2	4.1623E-1 ²
RBP2	Retinol binding protein 2, cellular	8.8997E-2	2.1009E-2	2.3607E-1 ²
WISP1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	7.2911E-2	3.4725E-2	4.7627E-1 ²

¹上调基因, 肥胖标/正常标 ≥ 2; ²下调基因, 肥胖标/正常标 ≤ 0.5.

发生大肠腺瘤的危险度比BMI<25 kg/m²组要高1.46倍, 而BMI ≥ 30 kg/m²组发生大肠腺瘤的危险度达到BMI<25 kg/m²的2.26倍. Jacobs *et al*^[11]对2465例有大肠腺瘤史的患者进行的一项回顾

性研究结果提示BMI ≥ 30的患者再发大肠腺瘤的危险度增高(OR = 1.17, 95% CI = 0.92-1.48). 但亦有相反的观点, Wallace *et al*^[12]进行的一项调查认为BMI与各病理分期及部位的大肠腺瘤

的发生均无明显关联. 韩国一项对860例就诊者行结肠镜筛查的研究亦有相同结论^[13]. 本研究发现肥胖男性的患病风险显著高于女性, 其患大肠腺瘤的危险度是正常人的4.10倍(95% CI = 1.26-13.31), 女性在腺瘤患者中所占比例(34.8%)亦偏少, 也提示男性可能比女性更易患大肠腺瘤. 这与Morimoto *et al*^[14]研究的结果一致, 他们按不同病理分型将被调查者分三组, 每组肥胖男性的OR值在1.6-2.6之间, 女性的OR值在0.8-1.1之间, 男性均高于女性. Jacobs *et al*^[11]的研究亦提示男性的患病风险大(OR = 1.36, 95% CI = 1.01-1.83), 而女性呈负相关(OR = 0.90, 95% CI = 0.60-1.33). 韩国另一项1744例无症状人群结肠镜筛查结果显示高BMI与大肠腺瘤的发生显著相关, 且认为在70岁之前肥胖男性的患病风险大, 而70岁以后性别差异不明显^[15]. 但Sedjo *et al*^[10]认为女性的相对危险度高于男性, 产生这种性别差异的原因目前尚不清楚.

研究显示WC的增大与大肠腺瘤的发生呈正相关(OR = 1.75, 95% CI = 1.15-2.66), 而WHR在各组统计学分析中均无显著统计学差异. 目前对大肠腺瘤与WC和WHR的相关研究非常有限. 韩国一项调查研究($n = 2531$)显示代谢综合征患者患大肠腺瘤的风险增高(OR = 1.51, 95% CI = 1.18-1.93), 认为WC是发生大肠腺瘤的独立危险因素^[16], Sedjo *et al*^[10]的研究亦有类似结论, Jacobs *et al*^[11]研究结果提示随着WC的升高患大肠腺瘤的危险度有升高趋势, 但未达到统计学差异. Lee *et al*^[17]和Morimoto *et al*^[14]的研究显示WHR与大肠腺瘤的发生正相关. 而本研究认为WHR不能很好反映腹型肥胖与大肠腺瘤的相关性, 这可能与种族差异有关, 或可能臀围受个体骨盆横径的影响较大, 故认为腰臀比不能很好代表内脏脂肪堆积的程度.

脂肪组织产生并释放的因子目前已知的有上百种, 这些因子分属于不同类别的分子家族, 均具有多种生物学活性. Kim *et al*^[18]对242例大肠腺瘤患者及631例正常对照组进行研究, 结果证实患大肠腺瘤的肥胖者血清中IL-6、TNF- α 、CRP均升高. 我们的基因芯片杂交结果显示在113个标志基因中有6个基因上调和17个基因下调, 所涉及的信号通路主要是应激通路、P53通路、PI-3K/AKT通路、Jak/Src通路、雌激素通路、雄激素通路、Hedgehog通路、NF- κ B通路、Wnt通路、胰岛素通路以及维甲酸通路等. 这些信号通路具有调节细胞增殖、

抑制凋亡以及细胞分化黏附等功能.

研究表明, 与肥胖相关的因子有Foxa2、IL-8、Leptin等. 本研究中, Foxa2(Forkhead box a2)在肥胖人群的大肠腺瘤组织中mRNA水平表达增高. Foxa2是翼螺旋转录因子家族的一个成员, 在前脂肪细胞中表达, 当出现胰岛素抵抗时, Foxa2可被激活, 并与Akt相互作用, 是PI-3K通路的重要调节因子^[19]. 据此我们推测肥胖人群中存在胰岛素抵抗时, 激活了Foxa2, 从而可能进一步参与PI-3K信号通路的传导, 促进细胞增殖. IL-8亦可由脂肪组织分泌, 已明确其参与了NF- κ B通路激活. 本研究中IL-8在肥胖人群的大肠腺瘤组织中mRNA表达水平是降低的, 其具体机制尚需进一步研究. 肥胖基因的表达产物Leptin可通过多种信号通路途径促有丝分裂和抑制凋亡, 从而促进结肠肿瘤的生长. Chia *et al*^[20]进行的一项病例对照研究发现随着血清Leptin的浓度升高, 男性患大肠腺瘤的危险性升高, 但这种相关性在女性中不明显. 但也有研究显示血清Leptin水平与结肠癌无明显相关性^[21]. 我们的芯片杂交结果中Leptin在肥胖人群的大肠腺瘤组织中mRNA表达水平是降低的. 既往研究主要集中在检测大肠癌或腺瘤患者血清Leptin的浓度以及大肠癌组织中的Leptin表达水平, 经文献检索未找到对大肠腺瘤组织中Leptin表达水平的研究结果. 就我们的实验结果推测Leptin在血清中的作用机制与在腺瘤组织中的机制可能不一样, 是否存在其他因素干扰了Leptin在腺瘤中的表达, 使其在大肠癌的前期病变中作用不明显, 亦或因为我们标本量较少, 存在实验误差. 有学者^[22]研究认为结肠癌组织中高表达的Leptin可能与胃泌素-胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)的分泌存在一定关系, 某些胃癌、结肠癌细胞株的生长可受到CCK和胃泌素的刺激, 而CCK-8的拮抗剂YM002可降低炎症性肠病中小鼠Leptin浓度, 进而缓解炎症程度, 推测结肠癌组织中Leptin表达水平可能会受到胃泌素-CCK分泌浓度的影响, 提示结肠癌组织中Leptin表达水平不一定与肥胖呈正相关.

其他表达异常的因子如Bcl-2、周期蛋白(Cyclin)D1及COX-2等均为NF- κ B信号通路的靶基因产物, NF- κ B信号通路将慢性炎症和肿瘤的形成联系起来, 还需进一步研究确证. 另外, 在慢性炎症和实体瘤生长过程中有调节血管生成作用的趋化因子CXCL9产生于巨噬细胞, 而部分脂肪细胞因子亦产生于脂肪组织的巨噬细胞,

■应用要点

本研究初步探讨肥胖人群患大肠腺瘤的危险性及可能的分子学机制, 为今后进一步深入研究肥胖与大肠肿瘤关系及其防治提供依据.

■同行评价

本研究探讨了肥胖与大肠癌发生的相关风险,并进行了相应的分子机制研究,设计合理,原创性强,学术价值较好。

提示CXCL9亦可能来源于脂肪组织。

通过本次实验,我们发现肥胖或腹型肥胖与大肠腺瘤的发生存在显著的相关性,肥胖男性的患病风险明显大于女性。脂肪细胞因子是否在肥胖与大肠腺瘤的密切关系中起作用目前还不确定,但在肥胖组差异表达的因子与炎症发生及细胞增殖可能密切相关,尚需大样本研究进一步证实。

4 参考文献

- 1 李立明,饶克勤,孔灵芝,姚崇华,向红丁,翟凤英,马冠生,杨晓光. 中国居民2002年营养与健康状况调查. 中华流行病学杂志 2005; 26: 478-484
- 2 Pischon T, Lahmann PH, Boeing H, Friedenreich C, Norat T, Tjønneland A, Halkjaer J, Overvad K, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Guerne G, Bergmann MM, Linseisen J, Becker N, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Sieri S, Palli D, Tumino R, Vineis P, Panico S, Peeters PH, Bueno-de-Mesquita HB, Boshuizen HC, Van Guelpen B, Palmqvist R, Berglund G, Gonzalez CA, Dorransoro M, Barricarte A, Navarro C, Martinez C, Quirós JR, Roddam A, Allen N, Bingham S, Khaw KT, Ferrari P, Kaaks R, Slimani N, Riboli E. Body size and risk of colon and rectal cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 920-931
- 3 Hou L, Ji BT, Blair A, Dai Q, Gao YT, Potter JD, Chow WH. Body mass index and colon cancer risk in Chinese people: menopause as an effect modifier. *Eur J Cancer* 2006; 42: 84-90
- 4 Dignam JJ, Polite BN, Yothers G, Raich P, Colangelo L, O'Connell MJ, Wolmark N. Body mass index and outcomes in patients who receive adjuvant chemotherapy for colon cancer. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 1647-1654
- 5 Moore LL, Bradlee ML, Singer MR, Splansky GL, Proctor MH, Ellison RC, Kregar BE. BMI and waist circumference as predictors of lifetime colon cancer risk in Framingham Study adults. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28: 559-567
- 6 中华人民共和国卫生部疾病控制司. 中国成人超重和肥胖症预防控制指南(试行). 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 3-4
- 7 Tashiro M, Akiyama T, Yoshikawa I, Kume K, Otsuki M. Obesity as a risk factor for colorectal polyps in Japanese patients. *Gut* 2004; 53: 156
- 8 Guilera M, Connelly-Frost A, Keku TO, Martin CF, Galanko J, Sandler RS. Does physical activity modify the association between body mass index and colorectal adenomas? *Nutr Cancer* 2005; 51: 140-145
- 9 Cholongitas E, Pipili C, Dasenaki M, Plexousakis E, Delibaltadakis G. Is diabetes mellitus or obesity

- a more important risk factor for colonic adenoma? *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 692
- 10 Sedjo RL, Byers T, Levin TR, Haffner SM, Saad MF, Tooze JA, D'Agostino RB Jr. Change in body size and the risk of colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 526-531
 - 11 Jacobs ET, Martínez ME, Alberts DS, Jiang R, Lance P, Lowe KA, Thompson PA. Association between body size and colorectal adenoma recurrence. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 982-990
 - 12 Wallace K, Baron JA, Karagas MR, Cole BF, Byers T, Beach MA, Pearson LH, Burke CA, Silverman WB, Sandler RS. The association of physical activity and body mass index with the risk of large bowel polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 2082-2086
 - 13 Ji JH, Park BJ, Park YS, Hwang JH, Chung SH, Kim N, Lee DH, Jung HC, Song IS. [Clinicopathologic study of colorectal polyps and obesity in Korean adult] *Korean J Gastroenterol* 2007; 49: 10-16
 - 14 Morimoto LM, Newcomb PA, Ulrich CM, Bostick RM, Lais CJ, Potter JD. Risk factors for hyperplastic and adenomatous polyps: evidence for malignant potential? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 1012-1018
 - 15 Kim SE, Shim KN, Jung SA, Yoo K, Moon IH. An association between obesity and the prevalence of colonic adenoma according to age and gender. *J Gastroenterol* 2007; 42: 616-623
 - 16 Kim JH, Lim YJ, Kim YH, Sung IK, Shim SG, Oh SO, Park SS, Yang S, Son HJ, Rhee PL, Kim JJ, Rhee JC, Choi YH. Is metabolic syndrome a risk factor for colorectal adenoma? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 1543-1546
 - 17 Lee HL, Son BK, Lee OY, Jeon YC, Han DS, Sohn JH, Yoon BC, Choi HS, Hahm JS, Lee MH, Lee DH, Kee CS. [Abdominal obesity, insulin resistance, and the risk of colonic adenoma.] *Korean J Gastroenterol* 2007; 49: 147-151
 - 18 Kim S, Keku TO, Martin C, Galanko J, Woosley JT, Schroeder JC, Satia JA, Halabi S, Sandler RS. Circulating levels of inflammatory cytokines and risk of colorectal adenomas. *Cancer Res* 2008; 68: 323-328
 - 19 杨金奎. Foxa2与2型糖尿病肝脏胰岛素抵抗的分子病因学. 国际内分泌代谢杂志 2006; 26: 317-319
 - 20 Chia VM, Newcomb PA, Lampe JW, White E, Mandelson MT, McTiernan A, Potter JD. Leptin concentrations, leptin receptor polymorphisms, and colorectal adenoma risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 2697-2703
 - 21 Stattin P, Palmqvist R, Soderberg S, Biessy C, Ardnor B, Hallmans G, Kaaks R, Olsson T. Plasma leptin and colorectal cancer risk: a prospective study in Northern Sweden. *Oncol Rep* 2003; 10: 2015-2021
 - 22 孙军, 沈磊, 罗和生. 结肠癌瘦素和瘦素受体表达及其意义. 中华消化杂志 2006; 28: 561-562

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

肝癌相关基因及相互作用的研究进展

王伟丽, 高英堂

王伟丽, 高英堂, 天津医科大学第三中心临床学院 天津市 300170
高英堂, 天津市人工细胞重点实验室 天津市 300170
天津市科委攻关资助项目, No. 05YFSZSF02500
作者贡献分布: 王伟丽与高英堂对此文所作贡献均等。
通讯作者: 高英堂, 300170, 天津市, 天津医科大学第三中心临床学院, 天津市人工细胞重点实验室. gaoyt816@163.com
电话: 022-84112148
收稿日期: 2008-07-21 修回日期: 2008-08-31
接受日期: 2008-09-08 在线出版日期: 2008-10-18

Advances in genes and gene interaction of hepatocellular carcinoma

Wei-Lin Wang, Ying-Tang Gao

Wei-Lin Wang, Ying-Tang Gao, the Third Central Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300170, China
Ying-Tang Gao, Tianjin Key Laboratory of Artificial Cells, Tianjin 300170, China
Supported by: the Key Project of Tianjin Science Committee, No. 05YFSZSF02500
Correspondence to: Ying-Tang Gao, Clinical College of the Third Central Hospital of Tianjin Medical University, Artificial Cell Key Laboratory in Tianjin, Tianjin 300170, China. gaoyt816@163.com
Received: 2008-07-21 Revised: 2008-08-31
Accepted: 2008-09-08 Published online: 2008-10-18

Abstract

Multigenes and multigene interaction are involved in the development, recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma, while aberrant gene expression is the significant cause of recurrence and metastasis. Researches on gene changes and gene interaction in hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma are important for identifying the development, elucidating the pathogenesis, and guiding the prognosis and therapy of hepatocellular carcinoma.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Gene expression; Interaction

Wang WL, Gao YT. Advances in genes and gene interaction of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(29): 3289-3294

摘要

肝癌的发生、发展、复发与转移是一个多基

因、多途径相互作用的过程, 基因表达的异常是肿瘤发生发展以及肿瘤浸润、转移的重要因素. 研究从正常肝组织到肝炎、肝硬化、肝癌的发展过程中基因的改变及基因间相互作用的关系, 对于明确肝癌的发生发展过程, 阐明肿瘤的发病机制和肿瘤的治疗与预后都有重要的意义.

关键词: 肝癌; 基因表达; 相互作用

王伟丽, 高英堂. 肝癌相关基因及相互作用的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(29): 3289-3294
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3289.asp>

0 引言

原发性肝癌是世界范围内发病率最高的恶性肿瘤之一, 也是我国最常见且恶性程度最高的肿瘤之一. 目前手术切除仍是治疗原发性肝癌的首选方法. 然而根治性切除后患者的5年复发率高、转移率高, 这成为肝癌临床治疗的难题. 因此, 分子水平研究原发性肝癌的发生、发展、复发、转移的机制, 并针对此寻找有效的早期诊断指标及治疗措施成为当今肝癌研究中的重点和难点. 本文就细胞增殖、转移相关的基因及与其他基因间相互作用的关系作一综述.

1 与肝癌细胞增殖相关的基因

1.1 肝癌中PTEN、ppM1A和Smad2之间的关系
PTEN是抑癌基因, 分布在肝细胞的胞核、胞质、胞膜中, 抑癌机制由如下几条途径共同完成^[1]: (1)通过对FAK的去磷酸化抑制细胞转移及浸润^[2]. (2)通过PIP3去磷酸化阻止细胞生长及促进细胞凋亡^[3-4]. (3)通过抑制MAPK细胞传导途径抑制细胞生长分化^[5]; ppM1A分布在胞核、胞质中, 是丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸激酶PP2C家族成员, 其调节细胞应激反应如p38, JNK激酶级联反应^[6], ppM1A使磷酸激酶过表达从而激活抑癌基因TP53/P53^[7], 导致细胞周期G₂/M期停滞; Smad2分布在胞核和胞核周围的胞质中, 是TGF-β信号途径的重要调节因子^[8-13], 抑制细胞生长, 促进凋亡. Wu *et al*^[14]通过Envision免疫组

■背景资料

原发性肝癌是世界范围内发病率最高的恶性肿瘤之一, 也是我国最常见且恶性程度最高的肿瘤之一. 分子水平研究原发性肝癌的发生、发展、复发、转移的机制, 并针对此寻找有效的早期诊断指标及治疗措施成为当今肝癌研究中的重点和难点. 本文对肝癌相关基因的研究新进展、基因间的相互作用等研究成果作一综述.

■同行评议者

孙延平, 副主任医师, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院普外科

■研发前沿

对基因间相互作用关系的明确将对基因作用机制的研究提供帮助。

化技术检测31例肝癌组织、25例癌旁组织、13例非癌组织中PTEN、ppM1A、Smad2的表达情况显示PTEN、ppM1A在癌变过程中从细胞核转移到细胞质中, Smad2从细胞质转移到细胞核中, 且Lin *et al*^[15]证明ppM1A能使TGF- β 激活的Smad2/3去磷酸化, 说明ppM1A从细胞核向细胞质转移将导致Smad2细胞核积聚, 暗示基因分布位置与肝癌发生有关。

microRNA-21(miR-21)调节PTEN的表达。microRNAs(miRNAs)是非编码RNAs, 调节基因的表达。Meng *et al*^[16]研究显示miR-21在肝癌和其细胞系中高表达, 在肝癌细胞系中抑制miR-21的表达, 增加了PTEN的表达, 减少了肿瘤细胞增殖、侵入、转移; 增加miR-21的表达, 增加细胞的增殖、侵入和转移, 而且正常肝细胞转染miR-21前体, 增加了细胞运动能力。miR-21以PTEN为直接靶目标, 调节PTEN表达, 且miR-21调节PTEN下游的MMP2(matrix metalloproteinase 2)和MMP9的表达, 以此促进miR-21的细胞侵入作用, 由此可见miR-21通过调节PTEN及依赖PTEN的信号途径促进肝癌的发生、发展。

1.2 GPC3 GPC3是glypican家族成员之一, 是细胞表面蛋白多糖, 调节细胞生长。目前关于GPC3调节细胞增殖的报道不一致。Capurro *et al*^[17]报道GPC3促进PLCPRF-5, HLF肝癌细胞系的细胞增殖, 而最近报道GPC3在肝癌细胞增殖中呈负向调节, 通过抑制FGF2介导的细胞增长抑制了SNU423细胞的表达, 阻碍GPC3表达增加了肝癌细胞系的增长^[18-19]。Kwack *et al*^[20]报道GPC3下调E-cadherin, 上调MMP-2, 减少了肝癌细胞和I型胶原和纤维连接蛋白的黏附, 增加细胞迁徙和浸润, 这与Peters *et al*^[21]报道的GPC3抑制浸润、转移不一致。GPC3在卵巢癌细胞系、鼠间皮瘤细胞系、乳腺癌细胞系中沉默而肝癌组织甚至肝癌患者的血清中可检测到GPC3表达变化。不同研究中GPC3调节细胞增殖及基因表达的不一致可能是由于使用不同的细胞系及不同类型的肝癌标本。

■相关报道

Kwack *et al*对GPC3近几年的研究成果总结、对比, 发现GPC3下调E-cadherin, 上调MMP-2, 减少了肝癌细胞和I型胶原和纤维连接蛋白的黏附, 增加细胞迁徙和浸润。

1.3 肝癌中Pin1与Nek6的关系 Pin1通过与NIMA(never in mitosis, gene A)相互作用, 减弱有丝分裂启动区活性, 调节有丝分裂, 在肝癌中高表达。Chen *et al*^[22]通过GST pull-down assay、免疫沉淀和免疫荧光检测40例肝癌标本中Pin1和Nek6之间的关系, 研究结果表明Nek6抑制Pin1表达, 减弱有丝分裂, 在细胞周期中起关键

作用。在多种癌中已有实验数据证明Pin1与许多癌蛋白的上调关系密切, 如CyclinD1^[23-29]、 β -catenin^[30-34]的上调促进细胞增殖, 肝癌中基因之间的关系也有待证明。然而现阶段关于Pin1和Nek6与肝癌和其他肿瘤的关系的研究仅限于Nek6 mRNA水平, 无商业化的Nek6抗体试剂盒可利用。

1.4 CCND1 CCND1蛋白与CDK4/6结合, 激活CDK4/6的蛋白激酶, 促使Rb磷酸化而释放与其结合的转录因子E2F, 促进DNA的合成, 加快细胞由G₁期进入S期, 从而导致细胞失控性生长^[35-36]。CCND1在肝细胞癌组织中表达较高, 癌组织分化程度越低, 其阳性表达率越高, 且与肝癌侵袭性明显相关^[37-40]。Park *et al*^[41]研究表明在肝炎后肝癌中, 由HBx介导的NF-2/BCL3(B-cell CLL/lymphoma 3)复合体上调, 该复合体作用于CCND1启动子从而导致CCND1上调。通过小干扰RNA阻止HBx上调BCL3的表达, 最终导致CCND1下调; 通过p53降解HBx, HBx下调, 使HBx介导的BCL3、CCND1上调被损害, 说明HBx介导的BCL3、CCND1上调对肝癌的发生发展起重要作用。

1.5 肝癌中KLF6基因变异 KLF6是具有锌指结构的肿瘤抑制基因, 调节细胞生长的信号转导途径, 参与细胞分化、细胞增殖、坏死和血管发生。KLF6通过上调细胞周期抑制因子p21抑制肿瘤生长, 而癌组织中的KLF6变异体不能上调p21的表达^[42]。Pan *et al*^[43]报道实验中有15%的标本KLF6发生体细胞突变。而Boyault *et al*^[44]报道实验中KLF6未发现KLF6有体细胞突变, 也未发现有种系突变。Song *et al*^[45]研究了85例肝癌标本, 结果显示KLF6的第二外显子无单链构象多态性, 即没有发现突变; 85例标本中有5例在一个或多个位点有等位基因缺失; 85例标本中1例发生甲基化。对于KLF6变异报道的不一致, 可能由于肿瘤标本不同, 标本来源的患者种族不同, 所处的地理位置不同, 危险因素也不同, 以及标本的肿瘤分级不同。

2 与肝癌复发转移相关的基因

2.1 ANGPT ANGPT调节内皮与周围间质、基质间的相互作用, 促进血管的成熟性和稳定性, 与肿瘤浸润、复发、转移有关。Ang-1(angiopoietin-1)和Ang-2(angiopoietin-2)是ANGPT家族成员。Ang-1与Tie-2(Tyrosine-protein kinase receptor)结合促进自身磷酸化, Ang-2与Tie-2

结合抑制自身磷酸化, 大量实验证明Ang-2诱导血管生成反应^[46]. Zhang *et al*^[47]通过RT-PCR法检测38个患者的肝癌组织和癌旁组织中Ang-1、Ang-2、Tie-2、VEGF mRNA表达情况以及和临床的关系, 结果显示Ang-2在肝癌中明显高于癌旁组织, 有统计学意义; Ang-1与Tie-2 mRNA在肝癌组织和癌旁组织中无统计学差异; Ang-2、VEGF、Ang-2/Ang-1与除组织学分级外的临床病理参数相关. Ang-2/Ang-1与MVD(microvessel density)及VEGF正相关. 已有报道证明VEGF、ANGPT/Tie2系统在正常肺组织恶变为非小细胞肺癌的过程中起重要的作用^[48], 有关其在肝癌发生发展中的机制有待进一步研究.

2.2 RhoC RhoC是GTPases的Ras超家族成员之一, 参与细胞骨架重建, Rho蛋白导致肌动蛋白和肌球蛋白聚集在黏着斑复合体, 导致肝癌细胞极性丧失, 增加细胞移动性, 参与肝癌的转移. RhoC在炎性乳腺癌^[49-50], 前列腺癌^[51]中高表达, 在肝癌中RhoC mRNA和蛋白表达水平在转移病灶和肿瘤血栓处高于原发灶, 参与肝癌的血管侵入^[52-54]. 近期研究表明Rho GTPase参与自分泌运动因子(autocrine motility factor, AMF)信号途径^[55], Caceres *et al*^[56]通过RT-PCR检测了25例患者的肝癌组织, 癌旁组织中AMFR, RhoC的表达, 显示所有标本中均表达AMFR(autocrine motility factor receptor)、RhoC, 且肝癌组织中表达高于癌旁组织; 肝外转移灶明显高于肝内转移灶; AMFR表达低的患者复发率低, AMFR表达高的患者复发率高. AMFR与RhoC成正相关暗示RhoC可能参与AMF信号途径. 以上结果表明RhoC、AMFR可以作为肝癌的分子标记, 明确RhoC、AMFR之间的关系将对肝癌的发生机制提供一定的帮助.

2.3 RhoA RhoA调节张力丝和黏着斑形成, 在乳腺癌^[57-58]、肺癌^[59-60]、头颈癌^[61]和卵巢癌^[62]中高表达. Wang *et al*^[63]通过免疫组化技术检测64个肝癌患者癌组织和正常组织中Rho蛋白的表达结果显示在恶性组织中染色强, 在良性组织弱; 通过免疫印迹法和RT-PCR检测显示癌组织中RhoA mRNA和蛋白质水平明显高于相应的癌旁组织, 且在伴有静脉浸润、卫星灶损害、PTNM分期III/IV的肝癌组织中RhoA水平相对较高, 具有统计学差异, 说明RhoA在肝癌进展、转移中具有一定的意义. 大量数据已表明在肿瘤组织中RhoA、RhoC、ROCK(Rho-kinase)蛋白水平

高, 在低分化肿瘤组织和转移的淋巴结中表达更高, 这些数据说明Rho细胞内信号途径可能决定了恶性肿瘤的转移潜能, RhoA/Rho-kinase途径介导的细胞浸润可能与肿瘤进展相关.

3 与肝癌相关的生长因子

3.1 TGF- β TGF- β 调节细胞增殖和分化, 参与胚胎发育调节, 促进细胞外基质形成和抑制免疫等. 在肿瘤发生初期, 他通过诱导生长抑制途径, 起到了抑制因子的作用, 然而在肿瘤发生后, TGF- β 起到了促进肿瘤血管生成, 促进肿瘤细胞浸润、侵入、转移和免疫抑制的作用. 目前已经在前列腺癌^[64-65]、乳腺癌^[66]、胃癌^[67]等肿瘤中, 发现在其信号转导途径中至少有一个成分发生改变. TGF- β 1是TGF- β 的一个亚型, 几乎参与了所有的病理和生理过程, 如阻止细胞周期G₁期, 抑制细胞增殖, 促进细胞坏死, TGF β 1/Smads信号通路与肿瘤的发生发展有着密切的关系^[68-69]. TGF- β 1逃离了由TGF- β 抑制的细胞增殖, 在肝癌组织中高表达, 在癌旁组织表达相对较低; 在HBV-DNA阳性组95%表达TGF- β 1, 在HBV-DNA阴性组64%, TGF- β 1表达与肝癌分化程度, 和HBV复制有关^[70-71], 但与肿瘤大小, 数量无关. 外周血中TGF- β 1诊断肝癌的敏感性和特异性分别是90%、94%, 联合AFP能提高检出率到97%, 因此外周血中TGF- β 1mRNA可以作为HBV诱导的肝癌诊断和预后的生物标记^[72].

3.2 IGF-II IGF-II是与胰岛素相关的促有丝分裂多肽, 调节转录, 是一种胚胎型生长因子, 常常共表达IGF-II和IGF-I受体, 在肝癌中高表达^[73-74], 推测其在多种肿瘤细胞中作为一个自分泌因子^[75]. 肝癌被看作是血管多分布肿瘤, IGF-II可能是低氧诱导的血管源性生长因子, 在低氧环境中诱导VEGF增长, 在人类肝癌细胞中呈时间依赖的方式增加VEGF mRNA和其蛋白水平, 所以IGF-II可能在肝癌的新生血管形成中起重要的作用. IGF-II中P4活化与HBV基因产物间的关系, 证实HBV-X蛋白增加, 导致内皮性IGF-II表达增加且病毒复制, 使胚胎型IGF-II基因活化, 使IGF-II呈高水平状态^[76-77]. HBV-X抗原使Sp1磷酸化增加与DNA的结合力, 可能是调节IGF-II基因转录和表达的重要机制, 从而在细胞癌变过程中促进细胞的分裂. IGF-II mRNA在外周血中的表达与肿瘤分级有关; 肝外转移患者血清中IGF-II mRNA 100%表达, AFP阴性肝癌中有35%表达IGF-II mRNA. 综上所述IGF-II可以作

■创新盘点
从对单个基因的研究上升到基因间相互作用的研究是本文比较新颖的地方.

■应用要点

本文对肝癌基因研究新进展做了综述,为今后基因的研究方向提供参考。

为肝癌肝外转移、预后及复发的分子标记^[72]。

4 结论

尽管基因研究在肝癌中取得了较大进展,但目前尚需对以下问题进行深入研究:(1)一些基因在不同的标本中表达不同,如GPC3在有些细胞系中上调,有些细胞系中下调,所以关于基因表达水平及调节机制还需进一步通过体内实验明确。(2)现阶段多数研究以肝组织为标本,从诊断意义上讲,外周血中基因的检测及其生物学指标的研究,将有可能为临床肿瘤的早期诊断、预后监测及跟踪随访等提供一系列方便、快捷、特异、无创或微创的分子生物学检测手段。(3)进一步通过芯片技术确定基因在不同组织中的表达情况和基因之间的关系,对明确基因之间的相互作用奠定一定的理论基础。(4)每个基因参与的信号途径及在信号途径中的作用机制还了解甚少,许多的研究结果也仅限于实验水平的推测,信号途径的明确是我们今后研究的一大挑战,信号通路中具体的信号传递过程及调控环节的详尽研究,将有助于我们深入理解细胞间的相互作用以及人体中正常的生理过程和某些疾病的发生机制。总之,通过多方面、多领域的研究,阐明肝炎向肝硬化、肝癌发展过程中的机制对肝癌的预防、诊断、治疗、预后评估有重要的意义。

5 参考文献

- Knobbe CB, Trampe-Kieslich A, Reifenberger G. Genetic alteration and expression of the phosphoinositol-3-kinase/Akt pathway genes PIK3CA and PIKE in human glioblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2005; 31: 486-490
- Zhang L, Yu Q, He J, Zha X. Study of the PTEN gene expression and FAK phosphorylation in human hepatocarcinoma tissues and cell lines. *Mol Cell Biochem* 2004; 262: 25-33
- Vazquez F, Devreotes P. Regulation of PTEN function as a PIP3 gatekeeper through membrane interaction. *Cell Cycle* 2006; 5: 1523-1527
- Parsons R. Human cancer, PTEN and the PI-3 kinase pathway. *Semin Cell Dev Biol* 2004; 15: 171-176
- Shen YH, Zhang L, Gan Y, Wang X, Wang J, LeMaire SA, Coselli JS, Wang XL. Up-regulation of PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) mediates p38 MAPK stress signal-induced inhibition of insulin signaling. A cross-talk between stress signaling and insulin signaling in resistin-treated human endothelial cells. *J Biol Chem* 2006; 281: 7727-7736
- Takekawa M, Maeda T, Saito H. Protein phosphatase 2 α inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways. *EMBO J* 1998; 17: 4744-4752
- Ofek P, Ben-Meir D, Kariv-Inbal Z, Oren M, Lavi S.

- Cell cycle regulation and p53 activation by protein phosphatase 2C α . *J Biol Chem* 2003; 278: 14299-14305
- Goto D, Yagi K, Inoue H, Iwamoto I, Kawabata M, Miyazono K, Kato M. A single missense mutant of Smad3 inhibits activation of both Smad2 and Smad3, and has a dominant negative effect on TGF-beta signals. *FEBS Lett* 1998; 430: 201-204
- Feng XH, Lin X, Derynck R. Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta. *EMBO J* 2000; 19: 5178-5193
- Fink SP, Mikkola D, Willson JK, Markowitz S. TGF-beta-induced nuclear localization of Smad2 and Smad3 in Smad4 null cancer cell lines. *Oncogene* 2003; 22: 1317-1323
- Reinholz MM, An MW, Johnsen SA, Subramaniam M, Suman VJ, Ingle JN, Roche PC, Spelsberg TC. Differential gene expression of TGF beta inducible early gene (TIEG), Smad7, Smad2 and Bard1 in normal and malignant breast tissue. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 86: 75-88
- Phanish MK, Wahab NA, Colville-Nash P, Hendry BM, Dockrell ME. The differential role of Smad2 and Smad3 in the regulation of pro-fibrotic TGFbeta1 responses in human proximal-tubule epithelial cells. *Biochem J* 2006; 393: 601-607
- Eppert K, Scherer SW, Ozcelik H, Pirone R, Hoodless P, Kim H, Tsui LC, Bapat B, Gallinger S, Andrulis IL, Thomsen GH, Wrana JL, Attisano L. MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell* 1996; 86: 543-552
- Wu SK, Wang BJ, Yang Y, Feng XH, Zhao XP, Yang DL. Expression of PTEN, PPM1A and P-Smad2 in hepatocellular carcinomas and adjacent liver tissues. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4554-4559
- Lin X, Duan X, Liang YY, Su Y, Wrighton KH, Long J, Hu M, Davis CM, Wang J, Brunicaudi FC, Shi Y, Chen YG, Meng A, Feng XH. PPM1A functions as a Smad phosphatase to terminate TGFbeta signaling. *Cell* 2006; 125: 915-928
- Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007; 133: 647-658
- Capurro M, Wanless IR, Sherman M, Deboer G, Shi W, Miyoshi E, Filmus J. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2003; 125: 89-97
- Grisaru S, Cano-Gauci D, Tee J, Filmus J, Rosenblum ND. Glypican-3 modulates BMP- and FGF-mediated effects during renal branching morphogenesis. *Dev Biol* 2001; 231: 31-46
- Midorikawa Y, Ishikawa S, Iwanari H, Imamura T, Sakamoto H, Miyazono K, Kodama T, Makuuchi M, Aburatani H. Glypican-3, overexpressed in hepatocellular carcinoma, modulates FGF2 and BMP-7 signaling. *Int J Cancer* 2003; 103: 455-465
- Kwack MH, Choi BY, Sung YK. Cellular changes resulting from forced expression of glypican-3 in hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cells* 2006; 21: 224-228
- Peters MG, Farias E, Colombo L, Filmus J, Puricelli L, Bal de Kier Joffe E. Inhibition of invasion and metastasis by glypican-3 in a syngeneic breast

- cancer model. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 80: 221-232
- 22 Chen J, Li L, Zhang Y, Yang H, Wei Y, Zhang L, Liu X, Yu L. Interaction of Pin1 with Nek6 and characterization of their expression correlation in Chinese hepatocellular carcinoma patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 341: 1059-1065
- 23 Nakashima M, Meirmanov S, Naruke Y, Kondo H, Saenko V, Rogounovitch T, Shimizu-Yoshida Y, Takamura N, Namba H, Ito M, Abrosimov A, Lushnikov E, Roumiantsev P, Tsyb A, Yamashita S, Sekine I. Cyclin D1 overexpression in thyroid tumours from a radio-contaminated area and its correlation with Pin1 and aberrant beta-catenin expression. *J Pathol* 2004; 202: 446-455
- 24 Zhou CX, Gao Y. [Expression of Pin1, beta-catenin and cyclin D1 in salivary adenoid cystic carcinoma and its significance] *Zhonghua Kouqiang Yixue Zazhi* 2006; 41: 623-626
- 25 Li HY, Xu Q, Zhu T, Zhou JH, Deng DR, Wang SX, Lu YP, Ma D. [Expression and clinical significance of Pin1 and Cyclin D1 in cervical cancer cell lines and cervical epithelial tissues] *Ai Zheng* 2006; 25: 367-372
- 26 Miyashita H, Mori S, Motegi K, Fukumoto M, Uchida T. Pin1 is overexpressed in oral squamous cell carcinoma and its levels correlate with cyclin D1 overexpression. *Oncol Rep* 2003; 10: 455-461
- 27 Miyashita H, Uchida T, Mori S, Echigo S, Motegi K. Expression status of Pin1 and cyclins in oral squamous cell carcinoma: Pin1 correlates with Cyclin D1 mRNA expression and clinical significance of cyclins. *Oncol Rep* 2003; 10: 1045-1048
- 28 Wulf GM, Ryo A, Wulf GG, Lee SW, Niu T, Petkova V, Lu KP. Pin1 is overexpressed in breast cancer and cooperates with Ras signaling in increasing the transcriptional activity of c-Jun towards cyclin D1. *EMBO J* 2001; 20: 3459-3472
- 29 Fukuchi M, Fukui Y, Kimura H, Sohda M, Miyazaki T, Nakajima M, Masuda N, Tsukada K, Kato H, Kuwano H. Prolyl isomerase Pin1 expression predicts prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma and correlates with cyclinD1 expression. *Int J Oncol* 2006; 29: 329-334
- 30 Zhou CX, Gao Y. Aberrant expression of beta-catenin, Pin1 and cyclin D1 in salivary adenoid cystic carcinoma: relation to tumor proliferation and metastasis. *Oncol Rep* 2006; 16: 505-511
- 31 Wang H, Zhang J, Feng W, Zhang S, Liang H, Wang Y, Zheng Q, Li Z. PIN1 gene overexpression and beta-catenin gene mutation/expression in hepatocellular carcinoma and their significance. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 2007; 27: 54-57
- 32 Chen SY, Wulf G, Zhou XZ, Rubin MA, Lu KP, Balk SP. Activation of beta-catenin signaling in prostate cancer by peptidyl-prolyl isomerase Pin1-mediated abrogation of the androgen receptor-beta-catenin interaction. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 929-939
- 33 Pang R, Yuen J, Yuen MF, Lai CL, Lee TK, Man K, Poon RT, Fan ST, Wong CM, Ng IO, Kwong YL, Tse E. PIN1 overexpression and beta-catenin gene mutations are distinct oncogenic events in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2004; 23: 4182-4186
- 34 Kim CJ, Cho YG, Park YG, Nam SW, Kim SY, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY, Park WS. Pin1 overexpression in colorectal cancer and its correlation with aberrant beta-catenin expression. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5006-5009
- 35 Nadal A, Jares P, Pinyol M, Conde L, Romeu C, Fernandez PL, Campo E, Cardesa A. Association of CDK4 and CCND1 mRNA overexpression in laryngeal squamous cell carcinomas occurs without CDK4 amplification. *Virchows Arch* 2007; 450: 161-167
- 36 Aguirre D, Boya P, Bellet D, Faivre S, Troalen F, Benard J, Saulnier P, Hopkins-Donaldson S, Zangemeister-Wittke U, Kroemer G, Raymond E. Bcl-2 and CCND1/CDK4 expression levels predict the cellular effects of mTOR inhibitors in human ovarian carcinoma. *Apoptosis* 2004; 9: 797-805
- 37 Xu JM, Wen JM, Zhang M, Lu GL, Wu LZ, Wang WS. [A study of gene amplification and expression of cyclin D1 in hepatocellular carcinoma] *Zhonghua Binglixue Zazhi* 2004; 33: 26-30
- 38 Masaki T, Shiratori Y, Rengifo W, Igarashi K, Yamagata M, Kurokohchi K, Uchida N, Miyauchi Y, Yoshiji H, Watanabe S, Omata M, Kuriyama S. Cyclins and cyclin-dependent kinases: comparative study of hepatocellular carcinoma versus cirrhosis. *Hepatology* 2003; 37: 534-543
- 39 Joo M, Lee HK, Kang YK. Expression of beta-catenin in hepatocellular carcinoma in relation to tumor cell proliferation and cyclin D1 expression. *J Korean Med Sci* 2003; 18: 211-217
- 40 Zhang YJ, Chen SY, Chen CJ, Santella RM. Polymorphisms in cyclin D1 gene and hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog* 2002; 33: 125-129
- 41 Park SG, Chung C, Kang H, Kim JY, Jung G. Up-regulation of cyclin D1 by HBx is mediated by NF-kappaB2/BCL3 complex through kappaB site of cyclin D1 promoter. *J Biol Chem* 2006; 281: 31770-31777
- 42 Narla G, Kremer-Tal S, Matsumoto N, Zhao X, Yao S, Kelley K, Tarocchi M, Friedman SL. In vivo regulation of p21 by the Kruppel-like factor 6 tumor-suppressor gene in mouse liver and human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2007; 26: 4428-4434
- 43 Pan XC, Chen Z, Chen F, Chen XH, Jin HY, Xu XY. Inactivation of the tumor suppressor Kruppel-like factor 6 (KLF6) by mutation or decreased expression in hepatocellular carcinomas. *J Zhejiang Univ Sci B* 2006; 7: 830-836
- 44 Boyault S, Herault A, Balabaud C, Zucman-Rossi J. Absence of KLF6 gene mutation in 71 hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 2005; 41: 681-682; author reply 682-683
- 45 Song J, Kim CJ, Cho YG, Kim SY, Nam SW, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY, Park WS. Genetic and epigenetic alterations of the KLF6 gene in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1286-1289
- 46 Moon WS, Park HS, Yu KH, Jang KY, Kang MJ, Park H, Tarnawski AS. Expression of angiotensin 1, 2 and their common receptor Tie2 in human gastric carcinoma: implication for angiogenesis. *J Korean Med Sci* 2006; 21: 272-278
- 47 Zhang ZL, Liu ZS, Sun Q. Expression of angiotensins, Tie2 and vascular endothelial growth factor in angiogenesis and progression of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4241-4245
- 48 Parikh SM, Mammoto T, Schultz A, Yuan HT, Christiani D, Karumanchi SA, Sukhatme VP. Excess circulating angiotensin-2 may contribute to pulmonary vascular leak in sepsis in humans. *PLoS Med* 2006; 3: e46
- 49 van Golen KL, Bao LW, Pan Q, Miller FR, Wu ZF, Merajver SD. Mitogen activated protein kinase

■同行评价

本文对肝癌相关基因及基因间相互作用作了一定分析, 文章通顺, 条理清楚, 但学术价值一般。

- pathway is involved in RhoC GTPase induced motility, invasion and angiogenesis in inflammatory breast cancer. *Clin Exp Metastasis* 2002; 19: 301-311
- 50 van Golen KL, Wu ZF, Qiao XT, Bao LW, Merajver SD. RhoC GTPase, a novel transforming oncogene for human mammary epithelial cells that partially recapitulates the inflammatory breast cancer phenotype. *Cancer Res* 2000; 60: 5832-5838
- 51 Yao H, Dashner EJ, van Golen CM, van Golen KL. RhoC GTPase is required for PC-3 prostate cancer cell invasion but not motility. *Oncogene* 2006; 25: 2285-2296
- 52 Wang W, Yang LY, Yang ZL, Huang GW, Lu WQ. Expression and significance of RhoC gene in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1950-1953
- 53 Wang W, Yang LY, Huang GW, Yang ZL, Lu WQ, Peng JX, Yang JQ. [Overexpression of the RhoC gene correlates with invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma] *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2004; 26: 279-282
- 54 Wang W, Yang LY, Huang GW, Lu WQ, Yang ZL, Yang JQ, Liu HL. Genomic analysis reveals RhoC as a potential marker in hepatocellular carcinoma with poor prognosis. *Br J Cancer* 2004; 90: 2349-2355
- 55 Wang W, Yang LY, Yang ZL, Peng JX, Yang JQ. Elevated expression of autocrine motility factor receptor correlates with overexpression of RhoC and indicates poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 770-775
- 56 Caceres M, Guerrero J, Martinez J. Overexpression of RhoA-GTP induces activation of the Epidermal Growth Factor Receptor, dephosphorylation of focal adhesion kinase and increased motility in breast cancer cells. *Exp Cell Res* 2005; 309: 229-238
- 57 Cardone RA, Bagorda A, Bellizzi A, Busco G, Guerra L, Paradiso A, Casavola V, Zaccolo M, Reshkin SJ. Protein kinase A gating of a pseudopodial-located RhoA/ROCK/p38/NHE1 signal module regulates invasion in breast cancer cell lines. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 3117-3127
- 58 Touge H, Chikumi H, Igishi T, Kurai J, Makino H, Tamura Y, Takata M, Yoneda K, Nakamoto M, Suyama H, Gutkind JS, Shimizu E. Diverse activation states of RhoA in human lung cancer cells: contribution of G protein coupled receptors. *Int J Oncol* 2007; 30: 709-715
- 59 Watts KL, Cottrell E, Hoban PR, Spiteri MA. RhoA signaling modulates cyclin D1 expression in human lung fibroblasts; implications for idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res* 2006; 7: 88
- 60 Pan Q, Bao LW, Teknos TN, Merajver SD. Targeted disruption of protein kinase C epsilon reduces cell invasion and motility through inactivation of RhoA and RhoC GTPases in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2006; 66: 9379-9384
- 61 Han ZQ, Zhang AL, Wu MF, Liu YL, Chen G, Li FJ, Gao QL, Liao GN, Lu YP, Wang SX, Ma D. [Correlation of expression of RhoA (RhoC and their effector ROCK-1 with malignant phenotype of ovarian cancer cells in vitro] *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2004; 26: 385-388
- 62 Wang D, Dou K, Xiang H, Song Z, Zhao Q, Chen Y, Li Y. Involvement of RhoA in progression of human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1916-1920
- 63 Cross NA, Chandrasekharan S, Jokonya N, Fowles A, Hamdy FC, Buttle DJ, Eaton CL. The expression and regulation of ADAMTS-1, -4, -5, -9, and -15, and TIMP-3 by TGFbeta1 in prostate cells: relevance to the accumulation of versican. *Prostate* 2005; 63: 269-275
- 64 Soultz N, Karyotis I, Delakas D, Spandidos DA. Expression analysis of peptide growth factors VEGF, FGF2, TGFB1, EGF and IGF1 in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Int J Oncol* 2006; 29: 305-314
- 65 Lei X, Yang J, Nichols RW, Sun LZ. Abrogation of TGFbeta signaling induces apoptosis through the modulation of MAP kinase pathways in breast cancer cells. *Exp Cell Res* 2007; 313: 1687-1695
- 66 Li X, Zhang YY, Wang Q, Fu SB. Association between endogenous gene expression and growth regulation induced by TGF-beta1 in human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 61-68
- 67 Cheng PL, Chang MH, Chao CH, Lee YH. Hepatitis C viral proteins interact with Smad3 and differentially regulate TGF-beta/Smad3-mediated transcriptional activation. *Oncogene* 2004; 23: 7821-7838
- 68 Bruna A, Darken RS, Rojo F, Ocana A, Penuelas S, Arias A, Paris R, Tortosa A, Mora J, Baselga J, Seoane J. High TGFbeta-Smad activity confers poor prognosis in glioma patients and promotes cell proliferation depending on the methylation of the PDGF-B gene. *Cancer Cell* 2007; 11: 147-160
- 69 Yang ZX, Wang H, Gao CF, Xu LL, Zhao WJ. [Effect of polymorphism of transforming growth factor beta1 gene on HBV-induced liver cirrhosis] *Zhonghua Yixue Zazhi* 2005; 85: 1021-1026
- 70 Migita K, Miyazoe S, Maeda Y, Daikoku M, Abiru S, Ueki T, Yano K, Nagaoka S, Matsumoto T, Nakao K, Hamasaki K, Yatsushashi H, Ishibashi H, Eguchi K. Cytokine gene polymorphisms in Japanese patients with hepatitis B virus infection--association between TGF-beta1 polymorphisms and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2005; 42: 505-510
- 71 Yao DF, Dong ZZ, Yao M. Specific molecular markers in hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6: 241-247
- 72 Wang Z, Ruan YB, Guan Y, Liu SH. Expression of IGF-II in early experimental hepatocellular carcinomas and its significance in early diagnosis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 267-270
- 73 Dong ZZ, Yao DF, Yao DB, Wu XH, Wu W, Qiu LW, Jiang DR, Zhu JH, Meng XY. Expression and alteration of insulin-like growth factor II-messenger RNA in hepatoma tissues and peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4655-4660
- 75 Guo YS, Jin GF, Townsend CM Jr, Zhang T, Sheng HM, Beauchamp RD, Thompson JC. Insulin-like growth factor-II expression in carcinoma in colon cell lines: implications for autocrine actions. *J Am Coll Surg* 1995; 181: 145-154
- 76 Tang SH, Yang DH, Huang W, Zhou HK, Lu XH, Ye G. Hypomethylated P4 promoter induces expression of the insulin-like growth factor-II gene in hepatocellular carcinoma in a Chinese population. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 4171-4177
- 77 Chen GG, Li MY, Ho RL, Chak EC, Lau WY, Lai PB. Identification of hepatitis B virus X gene mutation in Hong Kong patients with hepatocellular carcinoma. *J Clin Virol* 2005; 34: 7-12

碘-125粒子植入治疗肝细胞癌的剂量学

吕进, 曹秀峰

吕进, 曹秀峰, 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心 江苏省南京市 210006
作者贡献分布: 本论文综述由吕进完成; 审校由曹秀峰完成.
通讯作者: 曹秀峰, 210006, 江苏省南京市, 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心. cxf551101@sina.com
收稿日期: 2008-08-22 修回日期: 2008-09-18
接受日期: 2008-09-22 在线出版日期: 2008-10-18

Dosimetry of ¹²⁵I radioactive seed implantation in therapy for hepatocellular carcinoma

Jin Lv, Xiu-Feng Cao

Jin Lv, Xiu-Feng Cao, Oncology Center of Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Xiu-Feng Cao, Oncology Center of Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China. cxf551101@sina.com
Received: 2008-08-22 Revised: 2008-09-18
Accepted: 2008-09-22 Published online: 2008-10-18

Abstract

Radioactive seed implantation, especially ¹²⁵I seeds implantation, which has provided an effective method for treatment of hepatocellular carcinoma (HCC), is attracting more and more attention all over the world, but its dosimetry need standardizing. Therefore, it is necessary to perform the prospective study on the dosimetry of ¹²⁵I radioactive seed implantation and seek for the best dosage and seed activity in order to enhance the therapeutic efficacy of ¹²⁵I seeds implantation in HCC treatment and protect the normal tissues surrounding the tumors.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Radiotherapy; Brachytherapy; Radioactive seeds; ¹²⁵I

Lv J, Cao XF. Dosimetry of ¹²⁵I radioactive seed implantation in therapy for hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(29): 3295-3298

摘要

放射性粒子植入为肝癌的治疗提供了一条新的有效的途径, 尤其是碘-125粒子的应用, 在世界范围内引起了越来越多的学者的兴趣;

然而其剂量学上却没有一个统一的标准. 为提高碘-125粒子治疗肝癌的疗效、保护肿瘤周围正常组织器官, 有必要对碘-125粒子植入治疗肝细胞癌的剂量学进行前瞻性研究, 寻找其最佳处方剂量和粒子的最佳活度.

关键词: 肝细胞癌; 放射疗法; 近距离放射疗法; 放射性粒子; 碘-125

吕进, 曹秀峰. 碘-125粒子植入治疗肝细胞癌的剂量学. *世界华人消化杂志* 2008; 16(29): 3295-3298
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3295.asp>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界上恶性肿瘤的第3大主要死因, 每年有59万余人死于HCC^[1]. 虽然早期HCC通过肝切除、肝移植能取得满意疗效^[2], 但大多数HCC患者确诊时已是中晚期, 只有10%-20%的患者有根治性手术的机会. 由于正常肝脏组织对射线的耐受量限制了放射治疗的剂量, 所以HCC外放射疗法疗效不佳. 化疗对HCC的疗效也较差^[3]. 近20年来, 人们逐步证实HCC在放射生物学上属于放射敏感性肿瘤, 加之新型放疗技术和设备的不断出现, 特别是碘-125粒子植入治疗的应用, 在世界范围内引起了越来越多的学者的兴趣, 然而其剂量学上却没有一个统一的标准. 本篇综述将重点阐述碘-125粒子植入治疗HCC的相关剂量学研究.

1 放射性粒子的植入治疗

放射性粒子植入治疗属于组织间近距离放疗范畴, 由于其拥有局部适形放疗的特点, 从而具有将最大量的放射线强度发射到肿瘤部位, 而周围正常组织接受的剂量迅速衰减的潜在优势, 这样就减少了副反应, 并且在照射过程中, 由于没有体位和呼吸运动的影响, 肿瘤治疗体积的丢失几率大为减少. 如果将放射源固定在体内某位置而又要求给身体的正常组织器官和系统带来最小的影响, 那么就要求靶区能够得到高

■背景资料

肝细胞癌的首选治疗是手术切除, 但只有一小部分肝癌能得以手术切除、肝移植. 外放疗和化疗的疗效甚微. 目前放射性粒子植入为肝癌的治疗提供了一条新的有效的途径.

■同行评议者

肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室

■研发前沿

放射性粒子植入治疗属于组织间近距离放疗范畴,其拥有局部适形放疗的特点和微创、便利、高效、副反应少等优点。

剂量射线,导致肿瘤组织的显著性杀伤,同时对周围组织的损害最小,引起的相关急性放射损伤和远期影响最小。放射性粒子用于组织间植入治疗恶性肿瘤已经有近百年历史,最早应用于上世纪90年代初。早期运用的放射性粒子是高能性核素,如钴-60、镭-226等,发射高能 γ 射线,临床上难以防护,对患者和医护人员都会造成严重损害,使其应用受到了限制,近20年来,新型低能放射性核素像碘-125、钷-103等的研制成功大大拓宽了其治疗范围和适应证。碘-125粒子已经应用于多种恶性肿瘤的植入治疗,如前列腺癌、胰腺癌、肺癌、口腔颌面部恶性肿瘤、头颈部恶性肿瘤等^[4-9]。特别是在前列腺癌的研究领域,他的临床效果已经被证实是相当成功的^[10-14]。国内外关于碘-125粒子植入治疗原发性肝癌的文献报道相对较少,而关于治疗结肠癌肝转移的报道并不少见。

2 碘-125粒子与HCC

2.1 碘-125粒子的相关特性 碘-125粒子是密封型治疗性放射性核素。其单个粒子活度为0.3-1.0 mCi,半衰期60.2 d,能量为27.4-31.4 keV的X射线和35.5 keV的 γ 射线,在组织中的最大辐射半径1.7 cm,既便于保存又易防护,对患者和医护人员的伤害也相对轻微,因而在临床应用于放射性粒子永久性植入放疗中,其渐受欢迎。

2.2 碘-125粒子的相关剂量学 目前,相关剂量学问题可以根据其对大群体或个体患者的影响相对分为“系统性的”和“随机性的”。影响大多数患者的系统性变动很少发生,他包括剂量测定参数、处方剂量的实施、剂量计算公式的变动和剂量计算算法的改进。随机性的变动问题牵涉到每个具体患者的实施^[15]。迄今为止,碘-125粒子植入治疗HCC还没有统一的剂量标准,更没有形成系统性规范。

碘-125是低剂量率放射性核素,一般为0.05-0.10 Gy/h,初始剂量率只有0.0013 Gy/min,而组织间植入近距离放疗属于极低剂量率放疗,加上 γ 射线的能量低且衰变非常快,因此其剂量分布变化很复杂。如果需要测定实际剂量分布,探测器必须满足以下几个条件:足够的精确度和灵敏度以及足够小的体积,但根据当前条件来说这很难达到,所以碘-125粒子源的剂量分布主要依赖计算而不是测量。根据公式: $D_{(T)} = D_{(0)} \times T_{1/2} \times 1.443 \times [1 - e^{-T \times 0.693/T_{1/2}}]$, $D_{(T)}$ 指组织间某点在植入籽源T小时后的吸收剂量,单位为Gy;

$D_{(0)}$ 是指该点在植入籽源时的初始剂量率单位是Gy/h; $T_{1/2}$ 是所用放射源的半衰期,单位h; e 是自然常数)和 $D_{(T)} = S_k \wedge 1/r^2 g_{(r)} \Phi_{an}$, $D_{(T)}$ 和 $g_{(r)}$ 分别指所计算点的剂量和径向剂量函数, S_k 、 \wedge 、 Φ_{an} 代表空气比释动能强度、各向异性常数和剂量率常数, r 代表所计算的点到籽源的距离,单位cm), T小时后某点的吸收剂量与距离籽源1-9 cm范围内的剂量率可以计算出来^[16]。通常碘-125粒子永久性植入的临床总活度通过下列方法计算: (1)平均体积法,是最经典的手工计算方法,也称巴黎公式:籽源总活度(A, mCi) = 肿瘤平均径长(d, cm) \times K, K为常数,一般取5, $d = (长+宽+高)/3$, 上式又可改写为 $n = (a+b+c) \times 5 / 粒子活度 \times 3$, 式中a、b、c分别为肿瘤的长、宽、高,粒子活度为mCi, n为粒子的个数; (2)Power Law平方法, $A = 2.15 \times d^2$, A为总活度(mCi), d为平均径长(cm); (3)治疗计划系统(TPS): TPS是已上市的计算机软件,把患者的肿瘤大小和部位的信息输入该系统,能计算出该肿瘤所需插植的导针数、单个粒子活度和粒子总活度,然后操作者根据治疗计划把粒子植入到肿瘤内,并可通过TPS进行剂量验证,必要时进行补种以保证瘤体90%的体积得到90%以上的处方剂量。值得注意的是上述方法都是根据前列腺癌设计的,而HCC的生物学行为和放射敏感性与前列腺癌并不完全一致。当前已有一些治疗计划系统和器械工具(包括碘-125粒子)开发出来,适用于多种实体肿瘤的永久性植入放疗。

2004-03医用物理学报道了美国医学物理学家协会(AAPM)关于应用碘-125和钷-103粒子组织间近距离放疗剂量学的相关建议^[16]。这份更新的追踪报告主要是为了满足近10年来低能电子发射近距离放疗源永久性植入治疗显著增长的需要和在贯彻组织间近距离放疗中精确剂量学临床理论的需要。此外,在近距离放疗剂量学测定形式和相关参数的准确性以及决定这些参数的方法上有了实质性改良^[17]。这些建议包括了剂量计算形式的一些微小改动和在近距离放疗中广泛应用的8个剂量学测定参数的主要更新。对于碘-125植入使用6711型粒子(在公布的永久性近距离放疗临床实践中应用最广泛的型号)来说,没有显著的变化(少于2%)^[18-19]。

当今的碘-125粒子组织间近距离放射治疗HCC的相关剂量数据绝大多数是从临床实践经验中得来,而缺乏前瞻性研究的验证。和上述的原因一样,碘-125粒子组织间植入治疗HCC的

■相关报道

有报道称,碘-125粒子组织间植入治疗肝细胞癌既能提高靶区的照射剂量又能降低周围正常组织的照射范围,还可以提高肿瘤的局部控制率和患者的生存率。

最佳处方剂量和粒子的最佳活度仍需进一步研究. Ricke *et al*^[20-22]认为在肝癌体内的平均最小剂量应达17-18 Gy; Zhang *et al*^[23]陈述了植入活度为30兆贝克勒尔(MBq, 1 mCi = 37 MBq)的碘-125粒子, 周边匹配剂量(MPD)大约为100-150 Gy(1 mCi = 182 Gy), 每个患者植入粒子数在10-100粒不等. 综合文献, 笔者认为碘-125的单个粒子剂量一般0.6 mCi较安全, 控制体积剂量在20-25 mCi是比较安全的, 其间碘-125粒子植入治疗HCC的关键是设置合理的周边匹配剂量, 设置在80-100 Gy是合理的, 不仅能够显现出其微创、高效、副反应少等优点, 而且能尽可能降低对正常肝细胞的损伤.

2.3 疗效与副反应 根据Zhang *et al*^[23]碘-125粒子植入治疗肝癌的报道, 在45例病变中有17例获得完全缓解(CR), 20例部分缓解(PR), 7例无变化(NC), 1例进展(PD), 有效率达82.2%; 过程中出现的副反应包括1例气胸(肺压缩小于30%)、3例穿刺点出血、5例痰中带血和发热, 植入2 mo后发生粒子移位的2例, 2 wk后白细胞轻度减少2例(白细胞计数 $\geq 3 \times 10^9/L$), 没有发生大量出血、胆瘘、胰瘘等严重并发症. Luo *et al*^[24]报道的碘-125粒子植入治疗肝癌也取得了令人鼓舞的结果. 相应12、24、36 mo生存率分别为91.7%、86.7%、75.0%, 未发生严重副反应. 虽然碘-125粒子植入治疗HCC的实践经验不多, 但其效果与其他的传统放疗方法之间仍可简要地做一些比较, 如三维适形放疗(3DCRT)、立体定向放疗(SBRT). 无论是3DCRT还是SBRT, 肿瘤的固定化(由于呼吸运动导致相关器官的移动^[25])必须被充分考虑, 而对于碘-125粒子植入治疗HCC而言不存在呼吸运动的影响. 在过去15年内, 美国密西根州大学群体已经进行了大批三维适形放射治疗肝癌的实验研究. 1996-04/2003-04, 128名患者接受了适形超分割放疗联合肝动脉灌注5-氟尿嘧啶. 38例(30%)出现3-4级毒性, 5例(4%)出现放射诱导性肝病(RILD), 35例肝细胞癌患者中位生存期为15.2 mo^[26-27]. Méndez Romero *et al*治疗了11例Child分级为A或B中的8例, 对肝细胞癌患者而言, 初始局部控制率为82%, 精确的1年和2年总生存(OS)率分别75%和40%. 在HCC组中, 1例(Child B级)由于肝功能衰竭和感染发展为5级毒性, 提示对Child B级肝硬变患者的治疗必须谨慎^[28]. 无论结果如何, 碘-125粒子植入与3DCRT和SBRT治

疗HCC疗效的相关数据仍需要在随机对照试验(RTC)中才能进一步验证.

3 结论

现代近距离放射疗法通过设定广泛适用的相关剂量学阈值来获得最大化的生存率和最小化的死亡率, 已成为恶性肿瘤的有效治疗手段, 要保证既定的安全性和有效性, 必须恰当的履行近来的相关剂量学一致性报告和质量保证程序.

碘-125粒子组织间植入治疗HCC既能提高靶区的照射剂量又能降低周围正常组织的照射范围, 还可以提高肿瘤的局部控制率和患者的生存率, 为HCC的治疗提供了一条新的思路和有效的治疗途径, 然而其剂量学仍未形成国际一致性意见. 现在的碘-125粒子植入治疗HCC相关数据仍就基于临床经验, 而没有通过前瞻性大样本多中心随机实验研究的验证, 最佳处方剂量和粒子的最佳活度仍需进一步探讨. 如何去研究上述问题, 如何制定出适用于碘-125粒子植入治疗HCC的精确的科学的剂量学标准将是我们将来的工作中的重点. 随着研究的进一步深入, 其前景将更加光明, 治疗方法将更加标准化, 更加系统化, 其适应证也将更将进一步扩大.

4 参考文献

- 1 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- 2 Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003; 362: 1907-1917
- 3 Nowak AK, Chow PK, Findlay M. Systemic therapy for advanced hepatocellular carcinoma: a review. *Eur J Cancer* 2004; 40: 1474-1484
- 4 Zhang FJ, Wu PH, Zhao M, Huang JH, Fan WJ, Gu YK, Liu J, Zhang L, Lu MJ. [CT guided radioactive seed 125I implantation in treatment of pancreatic cancer] *Zhonghua Yixue Zazhi* 2006; 86: 223-227
- 5 Zhang FJ, Li CX, Wu PH, Wu YX, Jiao DC, Liu J, Li YL. [CT guided radioactive 125I seed implantation in treating localized advanced pulmonary carcinoma] *Zhonghua Yixue Zazhi* 2007; 87: 3272-3275
- 6 Zhang JG, Zhang J, Song TL, Cai ZG, Sheng WJ, Yu GY. [Radioactive seed implantation in treatment of oral and maxillofacial malignancy] *Zhonghua Kouqiang Yixue Zazhi* 2006; 41: 464-466
- 7 Zhang J, Zhang JG, Song TL, Zheng L, Huang MW. [CT guided interstitial 125I seed implantation treatment for head and neck malignant tumor] *Huaxi Kouqiang Yixue Zazhi* 2008; 26: 8-9, 14
- 8 Xu KC, Niu LZ, Hu YZ, He WB, He YS, Li YF, Zuo JS. A pilot study on combination of cryosurgery and (125)iodine seed implantation for treatment of locally advanced pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1603-1611
- 9 徐克成, 牛立志. 肝癌的冷冻治疗. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 229-235
- 10 Heysek RV. Modern brachytherapy for treatment of

■应用要点

制定出适用于碘-125粒子植入治疗肝细胞癌的精确的科学的剂量学标准将使治疗方法更加标准化, 更加系统化, 其适应证也将进一步扩大.

■同行评价

碘-125粒子植入治疗肝细胞癌, 临床尚在探索中, 本综述从剂量学角度进行相关论述, 有一定新意。

- prostate cancer. *Cancer Control* 2007; 14: 238-243
- 11 Hughes L, Waterman FM, Dicker AP. Salvage of suboptimal prostate seed implantation: Reimplantation of underdosed region of prostate base. *Brachytherapy* 2005; 4: 163-170
 - 12 Yorozu A, Toya K, Ohashi T, Ohsuga K, Ito R, Kasamatsu T, Saito S, Momma T. [Brachytherapy for prostate cancer] *Gan To Kagaku Ryoho* 2006; 33: 424-427
 - 13 Machtens S, Baumann R, Hagemann J, Warszawski A, Meyer A, Karstens JH, Jonas U. Long-term results of interstitial brachytherapy (LDR-Brachytherapy) in the treatment of patients with prostate cancer. *World J Urol* 2006; 24: 289-295
 - 14 Frank SJ, Pisters LL, Davis J, Lee AK, Bassett R, Kuban DA. An assessment of quality of life following radical prostatectomy, high dose external beam radiation therapy and brachytherapy iodine implantation as monotherapies for localized prostate cancer. *J Urol* 2007; 177: 2151-2156; discussion 2156
 - 15 Butler WM, Merrick GS. Clinical practice and quality assurance challenges in modern brachytherapy sources and dosimetry. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 71: S142-S146
 - 16 Rivard MJ, Coursey BM, DeWerd LA, Hanson WF, Huq MS, Ibbott GS, Mitch MG, Nath R, Williamson JF. Update of AAPM Task Group No. 43 Report: A revised AAPM protocol for brachytherapy dose calculations. *Med Phys* 2004; 31: 633-674
 - 17 Rivard MJ, Nath R. Interstitial brachytherapy dosimetry update. *Radiat Prot Dosimetry* 2006; 120: 64-69
 - 18 Williamson JF, Butler W, Dewerd LA, Huq MS, Ibbott GS, Mitch MG, Nath R, Rivard MJ, Todor D. Recommendations of the American Association of Physicists in Medicine regarding the impact of implementing the 2004 task group 43 report on dose specification for 103Pd and 125I interstitial brachytherapy. *Med Phys* 2005; 32: 1424-1439
 - 19 Rivard MJ, Butler WM, DeWerd LA, Huq MS, Ibbott GS, Meigooni AS, Melhus CS, Mitch MG, Nath R, Williamson JF. Supplement to the 2004 update of the AAPM Task Group No. 43 Report. *Med Phys* 2007; 34: 2187-2205
 - 20 Ricke J, Wust P, Stohlmann A, Beck A, Cho CH, Pech M, Wieners G, Spors B, Werk M, Rosner C, Lopez Hänninen E, Felix R. [CT-Guided brachytherapy. A novel percutaneous technique for interstitial ablation of liver metastases] *Strahlenther Onkol* 2004; 180: 274-280
 - 21 Ricke J, Wust P, Stohlmann A, Beck A, Cho CH, Pech M, Wieners G, Spors B, Werk M, Rosner C, Hänninen EL, Felix R. CT-guided interstitial brachytherapy of liver malignancies alone or in combination with thermal ablation: phase I-II results of a novel technique. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 58: 1496-1505
 - 22 Ricke J, Wust P, Wieners G, Beck A, Cho CH, Seidensticker M, Pech M, Werk M, Rosner C, Hänninen EL, Freund T, Felix R. Liver malignancies: CT-guided interstitial brachytherapy in patients with unfavorable lesions for thermal ablation. *J Vasc Interv Radiol* 2004; 15: 1279-1286
 - 23 Zhang FJ, Li CX, Wu PH, Li K, Huang JH, Fan WJ, Zhang L, Gu YK, Lu MJ, Wu YX, Wang JJ. [Radioactive seed 125I implantation in treating recurrence and metastasis after liver transplantation in hepatoma] *Zhonghua Yixue Zazhi* 2007; 87: 956-959
 - 24 Luo KY, Mao WY, Li B, Shao QH, Yang Y, Zhao Q, Yang R, Yang GK. [Iodine-125 interstitial brachytherapy for malignant tumor] *Zhonghua Waikao Zazhi* 2003; 41: 122-124
 - 25 Eccles C, Brock KK, Bissonnette JP, Hawkins M, Dawson LA. Reproducibility of liver position using active breathing coordinator for liver cancer radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 64: 751-759
 - 26 Ben-Josef E, Normolle D, Ensminger WD, Walker S, Tatro D, Ten Haken RK, Knol J, Dawson LA, Pan C, Lawrence TS. Phase II trial of high-dose conformal radiation therapy with concurrent hepatic artery floxuridine for unresectable intrahepatic malignancies. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8739-8747
 - 27 Dawson LA, McGinn CJ, Normolle D, Ten Haken RK, Walker S, Ensminger W, Lawrence TS. Escalated focal liver radiation and concurrent hepatic artery fluorodeoxyuridine for unresectable intrahepatic malignancies. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2210-2218
 - 28 Méndez Romero A, Wunderink W, Hussain SM, De Pooter JA, Heijmen BJ, Nowak PC, Nuyttens JJ, Brandwijk RP, Verhoef C, Ijzermans JN, Levendag PC. Stereotactic body radiation therapy for primary and metastatic liver tumors: A single institution phase i-ii study. *Acta Oncol* 2006; 45: 831-837

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志网络版的发表前链接

本刊讯 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传. 读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程. (常务副总编辑: 张海宁 2008-10-18)

肝纤维化的干细胞治疗进展

丁亚楠, 潘兴华, 马丹, 朱向情, 庞荣清, 杨仁华

丁亚楠, 潘兴华, 马丹, 朱向情, 庞荣清, 杨仁华, 中国人民解放军昆明总医院干细胞与组织器官工程研究中心 云南省昆明市 650032
丁亚楠, 马丹, 昆明医学院昆明总医院临床学院 云南省昆明市 650031
云南省自然科学基金重点资助项目, No. 2003C013Z
作者贡献分布: 文献检索, 资料分析和论文撰写由丁亚楠完成; 选题和审校由潘兴华完成; 庞荣清, 杨仁华, 马丹及朱向情对此文进行修改。
通讯作者: 潘兴华, 650032, 云南省昆明市, 中国人民解放军成都军区昆明总医院干细胞与组织器官工程研究中心。
xinghuapan@yahoo.com.cn
收稿日期: 2008-01-07 修回日期: 2008-09-18
接受日期: 2008-09-22 在线出版日期: 2008-10-18

Progress in treatment of liver fibrosis by stem cells

Ya-Nan Ding, Xing-Hua Pan, Dan Ma, Xiang-Qing Zhu, Rong-Qing Pang, Ren-Hua Yang

Ya-Nan Ding, Xing-Hua Pan, Dan Ma, Xiang-Qing Zhu, Rong-Qing Pang, Ren-Hua Yang, Research Center of Stem Cells, Tissue and Organ Engineering, Kunming General Hospital of Chengdu Military District of Chinese PLA, Kunming 650032, Yunnan Province, China
Ya-Nan Ding, Dan Ma, Clinical School of Kunming General Hospital, Kunming Medical College, Kunming 650031, Yunnan Province, China
Supported by: the Key Natural Science Foundation of Yunnan Province, No. 2003C013Z
Correspondence to: Xing-Hua Pan, Research Center of Stem Cells, Tissue and Organ Engineering, Kunming General Hospital of Chengdu Military District of Chinese PLA, Kunming 650032, Yunnan Province, China. xinghuapan@yahoo.com.cn
Received: 2008-01-07 Revised: 2008-09-18
Accepted: 2008-09-22 Published online: 2008-10-18

Abstract

Latest studies from home and abroad indicate that stem cells exist in different adult tissues and various stages of individual development. There are stem cells not only derived from liver, but also from other tissues, such as bone marrow and pancreas in liver, which can differentiate into mature hepatocyte-like cells finally. Therefore, stem cell replacement therapy offers a new way for the clinical treatment of hepatic fibrosis in patients with end-stage liver diseases. This paper summarizes the progress in treating liver fibrosis by stem cells in recent years.

Key Words: Stem cell; Differentiation; Liver fibrosis;

Cell therapy

Ding YN, Pan XH, Ma D, Zhu XQ, Pang RQ, Yang RH. Progress in treatment of liver fibrosis by stem cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(29): 3299-3302

摘要

近年来国内外研究表明, 在个体发育的不同阶段及不同成体组织中均存在着干细胞。肝脏内不仅存在肝源性干细胞, 还存在其他组织来源的干细胞(如骨髓干细胞, 胰腺干细胞等), 这些干细胞最终可以分化为成熟的肝样细胞。因此, 干细胞的替代疗法为终末期肝病患者的肝纤维化治疗提供了新的思路。本文就近年来干细胞治疗肝纤维化方面的相关研究进展作一综述。

关键词: 干细胞; 分化; 肝纤维化; 细胞治疗

丁亚楠, 潘兴华, 马丹, 朱向情, 庞荣清, 杨仁华. 肝纤维化的干细胞治疗进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(29): 3299-3302
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3299.asp>

0 引言

肝纤维化是多数终末期肝病发展的共同阶段, 这一阶段若得不到有效治疗, 最终会发展为肝硬化, 甚至导致患者死亡, 因而逆转或延缓肝纤维化过程是肝病治疗的一个重要环节。近年来肝纤维化治疗方面的研究主要集中在如何逆转或延缓肝纤维化过程以及如何解决功能肝细胞迅速减少的问题这两个方面。肝脏移植目前被认为是治疗肝纤维化的最有效方法之一, 但由于肝源供应不足、移植费用昂贵、手术风险高以及移植后并发症严重等限制, 难以推广。生物人工肝治疗肝纤维化虽然在很大程度上能够替代肝脏的部分代谢、解毒等功能, 但是同样存在异体排斥反应、体外培养细胞受限、解毒有限等问题, 并不能从根本上解决肝细胞减少的病理生理过程。而干细胞在一定条件下可以分化为肝样细胞, 从而在一定程度上可以逆转和延缓肝纤维化并补充纤维化过程中损伤的肝细胞, 为临床终末期肝病治疗提供新的思路。干

■背景资料

肝纤维化是多数终末期肝病发展的共同阶段, 这一阶段若得不到有效治疗, 最终会发展为肝硬化, 甚至导致患者死亡。而干细胞在一定条件下可以分化为肝样细胞, 从而在一定程度上可以逆转和延缓肝纤维化并补充纤维化过程中损伤的肝细胞, 为临床终末期肝病治疗提供新的思路。

■同行评议者

倪润洲, 教授, 南通大学附属医院 消化内科

■研发前沿
干细胞临床应用前景可观,但是目前尚处于起步阶段,治疗疾病的原理尚未研究清楚,技术方法还不完善。

细胞(stem cells)是具有无限增值和自我更新能力,并能产生至少一种高度分化子代细胞的细胞群体。主要分为胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)和成体干细胞(adult stem cells, ASCs),而成体干细胞中的骨髓干细胞又可分为造血干细胞(haematopoietic stem cells, HSCs)和间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)。

1 胚胎干细胞

近年来研究表明,胚胎干细胞具有分化成多种组织细胞的潜能,并可在体外诱导分化为人类所需要的各种组织细胞,如心肌细胞、胰腺细胞、造血细胞、肝细胞等^[1]。并能在原始未分化状态无限繁殖。因而,成为细胞替代治疗最合适的细胞资源^[2]。

胚胎干细胞体外诱导分化为肝细胞的研究为数不多,主要集中在研究不同细胞因子干预、细胞共培养和转基因对肝细胞分化的作用和多种肝细胞标志物对肝细胞的鉴定等方面^[3-5]。Ishizaka *et al*^[6]运用贴壁法体外培养大鼠胚胎干细胞时发现,不管有无肝细胞特异性生长因子刺激或是否通过肝细胞核转录因子-3 β 转染,胚胎干细胞在体外均能分化成肝样细胞^[6-7]。蒯小玲 *et al*^[8]采用胚胎干细胞与肝细胞生长因子(HGF)共培养,将小鼠胚胎干细胞成功诱导为肝细胞,检测有肝细胞特异性标志物表达。国外Jung *et al*^[9]应用组织外植体系证实了FGF1和FGF2能替代心脏中胚层的诱导效应。因此,在向肝细胞分化中,FGFs可能是向肝细胞诱导的重要启动因子。Yamamoto *et al*^[10]证实了胚胎干细胞移植能明显改善由CCl₄造成的肝损害。Teratani *et al*^[11]的研究则表明胚胎干细胞移植对小鼠肝硬化有显著疗效。尽管胚胎干细胞研究取得很大成绩,但是由于其存在伦理上争议,使其研究受到限制。近几年科学家试图通过新的手段获得具有全能性的类似胚胎干细胞功能的细胞。即将成体细胞进行逆向分化,使其还原为胚胎干细胞。国外有研究证实了成体干细胞逆向分化的可行性^[12]。这一发现为干细胞逆向分化带来了新的动力。

2 成体干细胞

成体干细胞存在于成人各种组织中,其基本功能是提供稳定的内环境,替代由于损伤和疾病导致的衰老和死亡的细胞,即负责生理性更新正常生理死亡和病理性修复、再生其定居部位的组织。大多研究认为成体干细胞具有多向分化潜能,不仅可以分化为相应胚层来源的组织

细胞,还可以跨胚层分化为其他胚层来源的组织细胞类型,比如骨髓间充质干细胞可以分化为皮肤、血管、神经、肝、胰岛、软骨、肾等十几种类型的成熟细胞,其中包括了外、中、内3个胚层来源的组织细胞。成体干细胞具有来源丰富、可塑性强、具有多向分化潜能和便于体外操作等特点,而且可以实现个体化治疗,无免疫排斥问题,因此是最具临床应用潜能的种子细胞。成体干细胞中的造血干细胞和间充质干细胞是目前研究最多、来源最为方便的成体干细胞。新近的大量研究发现BMSCs可分化为类肝样细胞,这为急慢性肝病的治疗带来了曙光。

2.1 造血干细胞 肝脏与造血之间有着内在的联系。在个体发育过程中,胎肝是主要的造血器官,是造血干细胞生存的场所。在成年个体,肝脏是主要的储血器官之一。因此造血干细胞向肝细胞横向分化看起来是可行的,相关的研究也开展较早。目前的研究表明,造血干细胞可以向肌细胞、肝细胞、神经细胞、肠上皮细胞、表皮细胞等多种细胞分化。造血干细胞这种向在发育上无关的其他系列的细胞类型分化的特性称为“可塑性”(plasticity)^[13]。多年来,人们利用多种表面标记来识别、分离、纯化骨髓和外周血来源的造血干细胞。未分化的造血干细胞和造血祖细胞通常表达c-Kit, CD34和H-2K,不表达或者低表达Lin。通常用于移植的细胞为CD34Thy-1⁺Lin⁻。骨髓中存在着与肝脏相同标志(包括c-Kit, CD34, Thy-1⁺等)的干细胞,并能在体外分化为成熟肝细胞表型^[14]。因此,造血干细胞作为潜在的细胞来源可能会在肝脏再生或重建治疗中发挥作用。例如研究显示在肝脏严重受损时,造血干细胞会对肝实质进行一定程度的修复^[15]。CD34造血干细胞可以在体外诱导分化为肝样细胞,植入体内可以修复肝损伤^[16]。Lagasse *et al*^[17]用正常成年小鼠骨髓细胞移植治疗模型小鼠I型酪氨酸蛋白血症,观察模型小鼠的生长状况及其肝脏生化功能恢复情况,另一组仅用纯化的造血干细胞(C-kit^{high}、Thy^{low}Lin⁻、Sca-1)进行移植,观察其疗效。结果发现骨髓中的造血干细胞在体内转分化为肝细胞,使小鼠产生供体源造血和肝细胞的再生,使受体小鼠肝脏的生化功能得以恢复。还有学者则从功能学上进行了证明:他们将人造造血干细胞或脐血细胞移植入上述老鼠模型,并在老鼠血清中发现了人白蛋白并有人mRNA的表达^[18]。Sakaida *et al*^[19]也证明自体骨髓干细胞移植是治

疗肝病的很好的方法. 但也有研究认为造血干细胞移植对正常及损伤后肝脏的再生均无作用, 因此造血干细胞移植治疗肝病尚需严格评估^[20]. 利用HSC的可塑性将体外分化的肝前体细胞或HSC由门脉注入患者肝内, 有望维持和改善其衰竭的肝功能.

2.2 间充质干细胞 间充质干细胞主要是源于骨髓的具有高度自我更新能力和多向分化潜能的成体干细胞. 近年来研究表明, 这些源于中胚层的骨髓间充质干细胞可以跨越胚层向内胚层及外胚层的组织、细胞分化. 比如分化为肝细胞、胆管上皮细胞、内皮细胞、骨骼肌细胞、心肌细胞、神经元细胞、视网膜细胞等. 研究者称之为“可塑性”或“横向分化”(transdifferentiation). 骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSC)在特定条件下横向分化为肝细胞的研究为其移植治疗肝纤维化提供了理论依据.

研究发现, 骨髓中存在多种可以分化为肝细胞的细胞亚群, 如KTLS细胞(Lin⁻CD45⁺CD38⁺CD34⁺)^[21]等. 这些细胞亚群涉及多个不同的表面标志, 代表了骨髓干细胞不同发育阶段或谱系中的不同分支. 而存在于细胞微环境中的参与黏附过程的信号分子以及参与正常细胞发育、分化、成熟的细胞因子对于其向肝细胞分化起到很大的诱导作用. Petersen *et al*^[22]、Theise *et al*^[23]和Alison *et al*^[24]的研究表明, 骨髓干细胞或造血干细胞能够在鼠肝内转化成为肝卵圆细胞甚至成熟的肝细胞和胆管细胞, 并证明此现象也同样存在于人类体内. 他们用高浓度的肝细胞生长因子(HGF)体外诱导大鼠骨髓细胞, 后用RT-PCR检测发现诱导后的细胞能够表达AFP、白蛋白及CK8/18等肝前体细胞的特征性标记. 磁珠细胞筛选法分离人或大鼠骨髓细胞中的 $\beta 2m^{-}$ Thy-1⁺细胞, 同样能够表达肝细胞的特征性标记^[25]. 这些骨髓来源的肝干细胞(BDHSC)肝内移植后很快可以整合入肝板, 并最终分化为成熟的肝细胞. 而体外培养时加入胆汁化血清可促进这些细胞向肝细胞方向分化. Inderbitzin *et al*^[26]从鼠骨髓中分离出表达 $\beta 2$ -微球蛋白/Thy-1⁺的细胞亚群, 与肝细胞共培养, 结果发现该细胞亚群的氨代谢提高. 提示该亚群骨髓干细胞有向肝干细胞分化的能力. 总之, 以上研究有力证实: 骨髓中确实存在能分化为肝细胞的干细胞, 直接将其移植到肝脏, 在肝脏微环境调节下可分化为肝细胞; 将骨髓干细胞作

为肝细胞移植的细胞来源有重要的临床意义.

2.3 肝干细胞 肝干细胞(hepatic stem cell, HSC)是指肝脏自身组织中那些具有自我更新并能够分化为肝细胞和胆管细胞的干细胞(最近有人证实他也可分化为血管内皮细胞^[27]). 肝干细胞的基本特征可概括为两点: (1)具有多向分化能力, 可向肝细胞、胆管上皮细胞、肝脏血管内皮细胞分化. (2)具有自我更新与自我维持能力, 对肝脏损伤或疾病产生反应并进行修复. 该类细胞不仅在胚胎肝组织中存在, 而且在成年肝组织中也存在. 肝内的肝干细胞称为卵圆细胞(hepatic oval cell, HOC)或小肝细胞^[28]. 肝卵圆形细胞(oval cells)被认为是双潜能的肝干细胞, 研究表明, 他们还可跨胚层分化为其他组织的细胞类型, 姚鹏 *et al*^[29]在基础培养液中添加肝细胞生长因子(HGF)、表皮生长因子(EGF)、胰岛素和地塞米松, 诱导WB2F344肝干细胞系分化为肝细胞. Mitaka *et al*^[30]还发现, 当肝星形细胞长入小肝细胞克隆时, 后者的成熟化被激活, 表现一系列成熟肝细胞的形态. 现在认为小肝细胞是肝细胞的前体细胞, 在胚胎发育晚期, 肝母细胞先分化为小肝细胞, 后者在非实质细胞(如肝星形细胞)分泌的细胞外基质的作用下分化成熟; 在成体肝内, 卵圆细胞先分化为小肝细胞, 然后才能形成成熟肝细胞.

3 结论

大量实验表明, 不同源性干细胞可以定向分化为功能肝样细胞, 这就为临床治疗肝病提供了实验依据. 国内外一些医生应用自体骨髓干细胞移植来治疗一些终末期肝病, 并获得很好的疗效, 因此, 干细胞临床应用前景可观. 但是目前尚处于起步阶段, 治疗疾病的原理尚未研究清楚, 技术方法还不完善, 这就要求我们在干细胞培养、扩增、分化等技术层面的进一步提高, 在干细胞移植要求的细胞数量、活性以及移植途径选择等应用层面的进一步优化, 在干细胞移植后临床观察、指标对比及预后等疗效评估层面进一步完善. 骨髓源性干细胞自体移植用于肝病只是个好的开端, 相信随着研究的不断深入, 其他来源的干细胞同样对许多肝脏疾病有良好的治疗作用. 体外培养的肝干细胞不仅为生物人工肝提供了一种新的细胞来源, 而且其细胞移植可以替代坏死的组织, 并刺激受体组织再生以达自身修复的效果, 同样具有很好的应用前景. 相信干细胞在肝脏疾病治疗领域

■ 相关报道

大量实验表明, 不同源性干细胞可以定向分化为功能肝样细胞, 这就为临床治疗肝病提供了实验依据.

■同行评价

本文对干细胞治疗终末期肝病的研究进展进行了综述,层次清楚,文字简练,能使读者对该领域的研究概况有较清楚的了解。

会发挥越来越大的作用,为终末期肝病患者带来新的希望。

4 参考文献

- Kumar KS, Lefkowitz J, Russo MW, Hesdorffer C, Kinkhabwala M, Kapur S, Emond JC, Brown RS Jr. Successful sequential liver and stem cell transplantation for hepatic failure due to primary AL amyloidosis. *Gastroenterology* 2002; 122: 2026-2031
- Moriya K, Yoshikawa M, Saito K, O uji Y, Nishiofuku M, Hayashi N, Ishizaka S, Fukui H. Embryonic stem cells develop into hepatocytes after intrasplenic transplantation in CCl₄-treated mice. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 866-873
- Jones EA, Tosh D, Wilson DI, Lindsay S, Forrester LM. Hepatic differentiation of murine embryonic stem cells. *Exp Cell Res* 2002; 272: 15-22
- Chinzei R, Tanaka Y, Shimizu-Saito K, Hara Y, Kakinuma S, Watanabe M, Teramoto K, Arii S, Takase K, Sato C, Terada N, Teraoka H. Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes. *Hepatology* 2002; 36: 22-29
- Kuai XL, Cong XQ, Li XL, Xiao SD. Generation of hepatocytes from cultured mouse embryonic stem cells. *Liver Transpl* 2003; 9: 1094-1099
- Ishizaka S, Shiroy A, Kanda S, Yoshikawa M, Tsujinoue H, Kuriyama S, Hasuma T, Nakatani K, Takahashi K. Development of hepatocytes from ES cells after transfection with the HNF-3beta gene. *FASEB J* 2002; 16: 1444-1446
- Kanda S, Shiroy A, O uji Y, Birumachi J, Ueda S, Fukui H, Tatsumi K, Ishizaka S, Takahashi Y, Yoshikawa M. In vitro differentiation of hepatocyte-like cells from embryonic stem cells promoted by gene transfer of hepatocyte nuclear factor 3 beta. *Hepatol Res* 2003; 26: 225-231
- 蒯小玲, 丛笑倩, 李秀兰, 萧树东. 小鼠胚胎干细胞诱导为肝细胞的研究. *胃肠病学* 2003; 8: 6-10
- Jung J, Zheng M, Goldfarb M, Zaret KS. Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* 1999; 284: 1998-2003
- Yamamoto H, Quinn G, Asari A, Yamanokuchi H, Teratani T, Terada M, Ochiya T. Differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes: biological functions and therapeutic application. *Hepatology* 2003; 37: 983-993
- Teratani T, Yamamoto H, Aoyagi K, Sasaki H, Asari A, Quinn G, Sasaki H, Terada M, Ochiya T. Direct hepatic fate specification from mouse embryonic stem cells. *Hepatology* 2005; 41: 836-846
- Chen S, Zhang Q, Wu X, Schultz PG, Ding S. Dedifferentiation of lineage-committed cells by a small molecule. *J Am Chem Soc* 2004; 126: 410-411
- 程昊钰, 何明生. 造血干细胞的可塑性及其临床应用的研究进展. *国外医学·内科学分册* 2005; 32: 200-202
- Fiegel HC, Lioznov MV, Cortes-Dericks L, Lange C, Kluth D, Fehse B, Zander AR. Liver-specific gene expression in cultured human hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 2003; 21: 98-104
- Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, Omori K, Watanabe T, Ohata S, Katada T, Miyamoto K, Shinoda K, Nishina H, Okita K. An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J Biochem* 2003; 134: 551-558
- Jang YY, Collector MI, Baylin SB, Diehl AM, Sharkis SJ. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 532-539
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6: 1229-1234
- Newsome PN, Johannessen I, Boyle S, Dalakas E, McAulay KA, Samuel K, Rae F, Forrester L, Turner ML, Hayes PC, Harrison DJ, Bickmore WA, Plevris JN. Human cord blood-derived cells can differentiate into hepatocytes in the mouse liver with no evidence of cellular fusion. *Gastroenterology* 2003; 124: 1891-1900
- Sakaida I, Terai S, Nishina H, Okita K. Development of cell therapy using autologous bone marrow cells for liver cirrhosis. *Med Mol Morphol* 2005; 38: 197-202
- Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109: 1291-1302
- Danet GH, Luongo JL, Butler G, Lu MM, Tenner AJ, Simon MC, Bonnet DA. ClqRp defines a new human stem cell population with hematopoietic and hepatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 10441-10445
- Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170
- Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000; 31: 235-240
- Alison MR, Poulosom R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wright NA. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; 406: 257
- Avital I, Inderbitzin D, Aoki T, Tyan DB, Cohen AH, Ferrareso C, Rozga J, Arnaout WS, Demetriou AA. Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288: 156-164
- Inderbitzin D, Avital I, Keogh A, Beldi G, Quarta M, Gloor B, Candinas D. Interleukin-3 induces hepatocyte-specific metabolic activity in bone marrow-derived liver stem cells. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 69-74
- Gao Z, McAlister VC, Williams GM. Repopulation of liver endothelium by bone-marrow-derived cells. *Lancet* 2001; 357: 932-933
- Paku S, Schnur J, Nagy P, Thorgeirsson SS. Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver. *Am J Pathol* 2001; 158: 1313-1323
- 姚鹏, 胡大荣, 詹轶群, 许望翔, 李长燕, 杨晓明. 细胞生长因子体外对大鼠肝干细胞的影响. *中华肝脏病杂志* 2003; 11: 33-36
- Mitaka T, Sato F, Mizuguchi T, Yokono T, Mochizuki Y. Reconstruction of hepatic organoid by rat small hepatocytes and hepatic nonparenchymal cells. *Hepatology* 1999; 29: 111-125

瘦素和脂联素在慢性肝病中的研究进展

石瑞芳, 郎振为

石瑞芳, 天津市传染病医院 天津市肝病研究所病理科 天津市 300192

郎振为, 北京市地坛医院病理科 北京市 100011

作者贡献分布: 本文文献检索分析与撰写由石瑞芳完成; 审校由郎振为完成。

通讯作者: 石瑞芳, 300192, 天津市南开区苏堤路75号, 天津市传染病医院 天津市肝病研究所病理科。

shirui Fang1979@yahoo.com.cn

电话: 022-27468193

收稿日期: 2008-08-05 修回日期: 2008-09-10

接受日期: 2008-09-17 在线出版日期: 2008-10-18

Research progress of leptin and adiponectin in chronic liver diseases

Rui-Fang Shi, Zhen-Wei Lang

Rui-Fang Shi, Tianjin Infectious Disease Specialty Hospital; Department of Pathology, Tianjin Institute of Hepatology, Tianjin 300192, China

Zhen-Wei Lang, Department of Pathology, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China

Correspondence to: Rui-Fang Shi, Tianjin Infectious Disease Specialty Hospital; Department of Pathology, Tianjin Institute of Hepatology, 75 Sudi Road, Nankai District, Tianjin 300192, China. shirui Fang1979@yahoo.com.cn

Received: 2008-08-05 Revised: 2008-09-10

Accepted: 2008-09-17 Published online: 2008-10-18

Abstract

Leptin and adiponectin, the main metabolic products of adipose tissues, have been implicated in a wide spectrum of human diseases. There is currently increasing interest in the role of these adipokines in the development of chronic liver diseases, mostly in patients with nonalcoholic fatty liver disease, chronic hepatitis C or cirrhosis. According to experimental data, increased leptin and decreased adiponectin serum levels have been detected initially in patients with nonalcoholic steatohepatitis and more recently in chronic HCV-infected patients compared to healthy controls in most but not all studies, while the data on the associations between these adipokine levels and the development of chronic liver disease are still rather conflicting. Therefore, we summarize the progress of leptin and adiponectin in chronic liver diseases.

Key Words: Leptin; Adiponectin; Nonalcoholic fatty

liver disease; Hepatitis C

Shi RF, Lang ZW. Research progress of leptin and adiponectin in chronic liver diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(29): 3303-3309

摘要

瘦素、脂联素是新发现的重要脂肪因子。近年来瘦素、脂联素在NAFLD、丙肝及肝硬化等慢性肝病中的作用已引起众多学者的关注,多数研究发现在非酒精性脂肪肝和丙肝患者中血清瘦素水平增高而脂联素水平降低,而这些脂肪因子在慢性肝病发生发展中的作用还未完全阐明,各家报道不一。本文就瘦素、脂联素与慢性肝病的研究进展作一综述。

关键词: 瘦素; 脂联素; 非酒精性脂肪性肝病; 丙肝

石瑞芳, 郎振为. 瘦素和脂联素在慢性肝病中的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(29): 3303-3309

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3303.asp>

0 引言

脂肪组织的主要作用是储存与动员脂质, 而这依赖于自分泌细胞因子(即脂肪因子), 这些脂肪因子调节脂肪生成及氧化甚至参与炎症应答。肝脂变是非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)的标志之一, 也是其他慢性肝病中一种常见的组织学表现^[1]。脂肪因子首先在NAFLD中被研究, 他代表了代谢综合症的肝脏表现; 然而最新数据显示在其他肝脏疾病中也涉及到脂肪因子^[2]。本文就瘦素和脂联素这两个重要的脂肪因子在慢性肝病尤其是在NAFLD和慢性丙型肝炎中的研究进展作一综述。

1 瘦素和脂联素

瘦素是1994年通过定位克隆技术克隆的ob基因产物, 在循环中以游离和结合型两种形式存在。瘦素受体分为长型、短型受体两个亚型, 在所有外周组织包括肝脏都能发现瘦素受体^[3]。长亚型受体为最主要的功能受体, 在下丘脑弓状核、腹背内侧核等核团高度表达, 调节瘦素的大多数生

■背景资料

近年来瘦素、脂联素在NAFLD、丙肝及肝硬化等慢性肝病中的作用已引起众多学者的关注, 多数研究发现在NAFLD和丙肝患者中血清瘦素水平增高而脂联素水平降低, 而这些脂肪因子在慢性肝病发生发展中的作用还未完全阐明, 各家报道不一。

■同行评议者

谭德明, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科; 陈胎胜, 教授, 福建省立医院消化内科

■ 研发前沿

在大多数研究中已经发现, NAFLD和丙肝患者中瘦素水平增高、脂联素下降, 然而他们和肝脂变或纤维化严重性的关系还存在着争议, 这两个脂肪因子间的相互作用如何、发挥作用的具体机制以及如何应用于临床等还有待于进一步研究。

物学效应, 而短亚型受体缺乏信号传导功能。瘦素主要由白色脂肪组织产生, 进入血液后, 透过血脑屏障与其长型受体结合双向激活Janus酪氨酸蛋白激酶或信号转导和转录激活蛋白途径, 影响神经肽Y分泌增加, 引起食欲下降及机体耗能增加, 使体质量下降。但是, 他不能作为一种减肥药, 因为大多数存在瘦素抵抗的肥胖患者瘦素水平平均增高。在肝脏, 瘦素通过降低肝细胞类固醇调节元件结合蛋白-1(SREBP-1)的表达达到抗脂质效应^[4]。在严重脂肪营养障碍的患者, 重组体瘦素显著降低肝脂变、甘油三酯、转氨酶活性及非酒精性脂肪肝的损伤^[5]。瘦素也参与纤维化的形成, 并且在先天性和获得性免疫中都起了重要作用^[6]。瘦素还具有调节血管增生、创伤修复及胰岛素敏感性的作用^[7-8]。

脂联素是脂肪细胞分泌的由244个氨基酸组成的蛋白质, 在血浆中以低分子量和高分子量多聚体形式存在。脂联素有AdipoR1和AdipoR2两种受体, 他们的结构高度相关, 有66.7%的同源性, 均为包含7个跨膜区域的蛋白质, 两种受体在多种组织器官都有表达, 但主要分布于肌细胞和肝组织^[9]。脂联素与其受体结合后, 发挥多种重要的生物学作用。脂联素具有抗糖尿病、抗肥胖、抗动脉粥样硬化及抗炎效应, 可以减少体脂肪并且改善肝脏和外周的胰岛素敏感性^[10]。脂联素通过增加肝细胞内游离脂肪酸的 β 氧化和/或降低游离脂肪酸的生成而阻止甘油三酯的蓄积从而调节脂质代谢, 通过抑制NF- κ B的激活和阻碍TNF- α 的释放而调节内皮细胞的炎性反应, 还能抑制巨噬细胞功能和血管平滑肌细胞的增殖和迁移^[11], 诱导白细胞抗炎因子, 调节淋巴细胞的增殖。以上证据表明脂联素是一种多功能的细胞因子, 可以发挥多种生物学作用, 同时脂联素也参与慢性肝病的发生发展。

2 NAFLD

NAFLD包括单纯性脂肪变性、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、肝纤维化及肝硬化。他与肥胖、2型糖尿病和胰岛素抵抗(IR)密切相关^[12]。IR是NAFLD发生、发展的基础, 其严重程度与NAFLD的病情进展相关^[13]。NAFLD的二次打击学说认为, 第1次打击是由于外周胰岛素抵抗, 外周脂肪中激素敏感性脂肪酶活性增强, 脂肪酸由外周脂肪进入肝脏增多, 进而造成肝脏甘油三酯的蓄积; 第2次打击则在细胞因子和氧化应激的作用下胰岛素抵抗进一步加剧, 肝细胞器功能损伤, 从而导致肝细胞炎性坏死和纤维

化。在两次打击中IR起重要作用, 然而IR的分子病理学机制是多因素的。脂联素增强胰岛素活性, 而瘦素则起到抑制作用^[14]。对48例不同分组患者的研究发现^[15], NAFLD组空腹胰岛素水平和IRI显著高于肥胖组和对照组, NAFLD组和肥胖组的瘦素水平显著高于对照组而脂联素水平显著低于对照组; IRI与血清瘦素水平呈正相关; 而与血清脂联素水平呈负相关。NAFLD患者瘦素升高而脂联素降低, 提示瘦素和脂联素通过不同机制参与了IR的发生、发展, 进而影响NAFLD的发病。

丁效蕙 *et al* 研究发现^[16-17] NASH患者肝组织内瘦素水平显著高于对照, 主要表达于肝腺泡3带脂变区域及纤维化明显的汇管区及其周围的枯否细胞、单个核细胞、肝星状细胞(HSC)内; 瘦素受体的定位和分布与瘦素大体一致, 瘦素与NASH纤维化分期、脂变分级相关。NASH常伴有IR和高胰岛素血症, 并与机体对瘦素的敏感性降低有关。Cortez-Pinto *et al*^[18] 观察了合并高血压和糖尿病的NASH患者, 血清瘦素水平显著高于对照组。两组均以女性略高; 血清瘦素和胰岛素相关, 二者均和BMI、体脂肪量呈正相关; 提示NASH和代谢综合征的特征明显相关, IR和瘦素敏感性降低同时存在。另有报道给瘦素缺乏的人或大鼠补充瘦素可以减少摄食量, 通过交感神经兴奋促进能量消耗, 导致肌细胞和白色脂肪细胞中脂肪酸的氧化, 增加胰岛素的敏感性^[19]。提示补充瘦素可以增加瘦素缺乏个体的瘦素水平, 逆转非酒精性脂肪肝, 而具有治疗作用。Petersen *et al*^[20] 对有严重IR的患有肝脂肪变性的脂代谢异常者进行瘦素治疗后, 发现肝脏的胰岛素敏感性增加, 肝脏内甘油三酯量减少约85%, 可逆转IR和肝脏脂肪变性。这也说明瘦素对脂肪肝的治疗主要以增进体内甘油三酯的分解为主。

血清脂联素具有降低血糖、TG、FFA及抗炎、减轻IR等作用, 由于血清脂联素水平下降, 导致肝细胞脂肪贮积及肝细胞炎症, 最终产生NAFLD。Yalniz *et al*^[14] 报道, 不论体质量指数和糖代谢如何, NASH患者血清脂联素水平低于正常对照, 且与组织学分级和分期无关。Jarrar *et al*^[21] 也报道NAFLD时脂联素表达降低, 脂联素与NASH独立相关。NAFLD患者血清脂联素水平降低且伴有明显的IR, 合并2型糖尿病或代谢综合征者IR更为严重, 脂联素水平更低; 合并ALT异常时脂联素水平下降, 而瘦素水平在ALT

增高组与正常对照组间无差异^[22-23]. Kaser *et al*^[24]报道, 肝脂联素蛋白主要在肝血管内皮细胞和肝窦状隙表达, 而AdipoR2在肝细胞表达. 与单纯脂变组相比, NASH患者脂联素和AdipoR2 mRNA表达下降, AdipoR1 mRNA表达没有改变. AdipoR2 mRNA表达与血清AST、ALT及纤维化分期呈负相关. Musso *et al*^[25]也发现脂联素的降低与炎症坏死活动性及纤维化相关, 脂联素的缺乏导致了转氨酶的升高和疾病的进展, 提示肝脂联素和AdipoR2 mRNA表达的降低可能是NAFLD发病的相关因素, 脂联素作为保护性因子在NAFLD的发生、发展中起着重要作用.

3 慢性丙型肝炎

脂变是一种常见的组织学改变, 在30%-70%的丙肝患者中都能检测到. 脂变与基因型、纤维化程度、对治疗的反应性和血清瘦素水平均有关^[26]. 多项研究显示在每一种丙肝基因型宿主和病毒因素在脂变的发展中都起着相对重要的作用. 慢丙肝能诱导基因型相关的IR, 因此促使脂变的形成、纤维化的进展和对干扰素治疗的抵抗^[27]. 已有报道丙肝患者的血清瘦素水平明显高于对照^[17], 瘦素与BMI、高血糖有关, 与纤维化严重度显著相关^[28], 1型丙肝患者瘦素水平与脂变相关而3型患者无关, 瘦素与纤维化有弱的相关性^[26]. 对未经抗病毒治疗的30例慢丙肝患者及30例对照组的研究显示, 血清瘦素水平在慢丙肝患者中显著升高, 且瘦素与体脂肪、BMI、载脂蛋白B密切相关^[29], 提示丙肝病毒感染干扰丙肝患者的脂质代谢, 瘦素在肝脂变形成中起了一定的作用. 对62例慢丙肝患者瘦素、代谢因素、严重肝纤维化(2-4级)及肝脂变($\geq 30\%$)的关系的研究显示瘦素与BMI显著相关而且在女性中表达量较高, 瘦素与严重纤维化无关而与脂变显著相关, 但是不能预测脂变的严重度^[30]. Cua *et al*^[31]报道, 154例未经治疗的非糖尿病的丙肝男性患者(纤维化0-2级)瘦素表达升高, 但与75例年龄、BMI及腰臀比匹配的健康志愿受试者相比无显著性差异. 多元线性回归分析显示胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)与血清瘦素呈正相关, 但瘦素与丙肝组织学改变无关. 对47例韩国丙肝患者的研究显示仅仅女性和体质量指数大于25 kg/m²是与高瘦素水平相关的独立变量, 基线瘦素与瘦素变化在抗病毒治疗前后与治疗反应不相关^[32]. 提示韩国丙肝患者瘦素水平与人体测量参数相关, 与病原学或组织学特征无关, 瘦

素也不能预测抗病毒治疗的效果. 而对40例经INF α -2a和病毒唑治疗24 wk的丙肝患者的变化研究显示^[33], 40例患者中有23例出现持续病毒应答, 17例没有出现, 出现持续病毒应答的患者瘦素水平、HOMA-IR和BMI下降. 他们的持续病毒应答(SVR)与年龄、RNA载量、血清瘦素水平和IR相关, 与性别、ALT或AST无关, 瘦素水平和IR能够独立的预测丙肝患者抗病毒治疗的持续病毒应答. 提示瘦素、IR与丙肝SVR相关, 且他们可作为SVR的独立预测因素. 而Eguchi *et al*^[34]对从1996-2000收集的139例经IFN治疗的慢丙肝患者所作的回顾性研究显示, 33例患者持续应答, 与持续抗病毒效应相关的因素包括RNA病毒载量、基因型、瘦素和纤维化分期. RNA病毒载量是一个重要的危险因素, 但是在HCV-RNA <100 MU/L时, 瘦素成为IFN抵抗的独立的危险因素, 瘦素水平的增高不能预测低病毒载量的丙肝患者抗病毒治疗效应. 而另两项对丙肝的研究^[35-36]未能显示与瘦素任何的联系. 从以上几项研究我们可以看出, 尽管血清瘦素水平在丙肝患者中有所增高, 但关于瘦素与组织学损害相关的数据仍存在争议, 可能是因为研究的人群的不均一所造成的, 还需要更详尽的研究来进一步阐明这一观点.

当前, 越来越多的人开始关注丙肝中脂联素的作用. 对71例未经治疗的慢丙肝患者的研究显示, 血浆脂联素降低与丙肝脂变相关, 脂变与低脂联素、年龄、丙肝基因型3相关, 提示脂联素降低可能促进肝脂变和肝损伤的进程. 增加循环中的脂联素, 如减肥或服用噻唑烷二酮类药物, 可能加速丙肝脂变的发展^[35]. 另两项报道^[37-38]也显示丙肝脂变程度与脂联素呈负相关, 低脂联素水平与脂变分级及HOMA独立相关, 且3型丙肝患者脂联素低于其他基因型. 基线水平的低脂联素被认为是丙肝肝脂变的独立预测因素, 同时脂联素也被认为是治疗结束后无病毒应答的独立预测因素. Hsu *et al*^[39]报道, 1型丙肝患者中HOMA-IR的增高与脂联素水平的降低相关, 组织学分析显示IR与肝脂变严重度相关. 丙肝患者RNA高病毒载量与IR相关. 而Liu *et al*^[40]报道脂联素降低与男性、IR、高丙肝病毒载量和基因型2显著相关, 与其他临床或组织学特征没有相关性, 肝内的AdipoR2基因表达高于AdipoR1, 基线脂联素水平不能预测治疗效果, 治疗后脂变的改变也与脂联素变化无关. 对194例丙肝患者的观察显示, 脂联素与男性、

■ 相关报道

Javor *et al*报道瘦素显著降低肝脂变、转氨酶活性及NAFLD的损伤, 且与纤维化分期、脂变分级相关. Musso *et al*发现脂联素可以减少体脂肪并且改善肝脏和外周的胰岛素敏感性, 低脂联素与炎症坏死活动性及纤维化相关, 脂联素的缺乏导致了转氨酶的升高和疾病的进展.

■创新盘点

本文总结了近年来关于瘦素、脂连素在慢性肝病中的研究进展,并重点探讨了这两个脂肪因子在NAFLD、慢性丙型肝炎发病中的作用,为其临床应用提供了文献参考。

BMI、胰岛素水平呈显著负相关,与纤维化分期无关,低脂联素水平仅在男性与脂变相关,随着炎症的加重脂联素水平升高^[41],提示脂联素在慢性肝病中的作用可能与性别和病原学有关.对48例丙肝(62.5%为1型丙肝)患者的研究显示,脂变与年龄大、炎症坏死活动和高胰岛素水平相关,62.5%的患者出现持续性病毒应答且这种应答与低龄、基因1型及内脏肥胖相关.与基线水平相比,IR下降,脂联素增高,且与治疗效果无关^[42].而在一项没有提供脂变和基因型信息的小型研究中,没有发现血清脂联素与肝组织学的相关性^[43],Kara *et al*^[44]报道丙肝1型患者脂联素水平与正常对照组相似,脂联素与肝脂变严重程度、RNA病毒载量、HAI评分、转氨酶、纤维化之间均无相关性.丙肝患者中82%存在脂变,对50例病例资料的多元分析显示脂变的严重度仅仅与年龄相关.综合以上的研究我们可以看出,丙肝中脂联素在大部分病例中是降低的,但其与临床及组织学的关系还存在着争议,需要进一步深入研究,探讨HCV感染、IR、脂变与脂联素的相互影响.

4 肝纤维化

肝纤维化是由肝毒性因素如酒精、病毒、免疫和先天性代谢性疾病等导致的慢性或复发性肝损伤的结果.无论是静止的还是激活的肝星状细胞(HSC),在肝纤维化过程中都起到了重要的作用.HSC活化是肝纤维化发生发展的中心环节,研究发现^[45]用免疫组织化学法、RT-PCR和Western blot法可以观察到在活化的HSCs中有瘦素及其功能性受体和 α 平滑肌蛋白(HSC激活的标志)的共同表达.Potter *et al*^[46]发现大鼠HSC体外培养增殖2 wk后,即可表达瘦素mRNA及蛋白.Honda *et al*^[47]在体内实验中也证实活化的HSC可以生成瘦素,他们还利用硫代乙酰胺(TAA)创建肝纤维化模型,发现ob/ob小鼠肝结构正常,无纤维化发生,而对对照组肝纤维化明显,瘦素与TAA合用于ob/ob小鼠后,也出现明显肝纤维化,提示瘦素可能通过诱导HSC活化,促进HSC的增殖和抑制其凋亡,进而促进肝纤维化的形成^[48].另一方面,瘦素抵抗或瘦素缺乏大鼠^[49-50]可显著降低纤维化的形成.与瘦素不同,脂联素具有保肝作用,在一个内毒素诱导的KK-Ay肥胖大鼠急性肝损伤模型中,脂联素通过抑制TNF- α 的合成和/或释放抑制肝损伤^[51].由于缺乏脂联素的生理性上调作用,KK-A(y)大鼠出

现严重的脂变、炎症和纤维化^[48].脂联素水平与肝纤维化指标PCm、PCIV、HA和LN呈显著负相关^[52].研究发现仅仅静止的HSCs能合成脂联素mRNA和蛋白^[45].在活化的HSCs中脂联素的过表达可以抑制血小板源性生长因子诱导的HSC的增殖和迁移、加速凋亡,减弱 α 平滑肌蛋白和增殖细胞核抗原的表达.无论活化的还是静止的HSCs都能监测到脂联素受体(AdipoR1 and AdipoR2),但是仅仅活化的HSCs能引起治疗后显著的凋亡.研究报道^[53]脂联素敲除大鼠有广泛的纤维化,而给予重组体脂联素则能降低纤维化.提示脂联素可能逆转HSC的活化,维持HSC的静止状态,在肝纤维化的治疗上具有重要的意义.

5 肝硬化

肝硬化是肝病的晚期阶段,多数存在不同程度的营养不良,而瘦素在维持机体能量代谢平衡方面发挥重要作用.已有报道^[54]肝炎后肝硬化(乙、丙型)血清瘦素显著升高.Campillo *et al*^[55]研究证实酒精性肝硬化血清瘦素水平较正常对照组增高,但不同性别酒精性肝硬化患者瘦素调节存在差异,女性以胰岛素水平影响较大,而男性则与肝脏的炎症状况相关.对35例肝炎后肝硬化患者的研究显示^[56],不论性别如何肝硬化患者瘦素水平显著高于对照,两组中女性瘦素均高于男性.依据Child-Pugh分级,B和C级男性肝硬化患者瘦素显著高于对照组男性,而女性仅C级瘦素高于对照组.提示不论肝炎后肝硬化患者性别、机体组分如何,瘦素水平均增高,且这种增高在Child-Pugh分级C组患者更明显.Ockenga *et al*^[57]报道肝硬化时结合型瘦素受体显著升高,而游离型受体未见升高.游离型受体与代谢因素如能量贮存(体脂量)、胰岛素和IR及肝糖和能量释放显著相关,结合型受体与致炎细胞因子、交感神经活性相关.瘦素受体在肝硬化患者的代谢和致炎过程中具有不同的作用,充分理解这种代谢和炎症修复反应可能为肝脏疾病和其他代谢性疾病提供新的治疗策略.

对73例肝硬化和30例对照的研究显示^[58],肝硬化患者血清脂联素、瘦素水平明显高于对照组,脂联素/瘦素比值 >1 ;血清脂联素、瘦素水平与胰岛素、HOMA-IR呈正相关,与胰岛素敏感指数呈负相关.另有报道在20例肝硬化患者中,血清脂联素显著增高,并且与肝功能下降、肝血流动力学改变相关,与人体组分或代谢因素

无关^[59]. Sohara *et al*^[60]发现肝硬化患者血清脂联素水平的增高程度与Child-Pugh肝功能分级呈正相关, 另一项对111例肝硬化患者和226例对照研究中, 脂联素水平在肝硬化时显著升高且与分期、转氨酶活性及炎症相关, 而与肝合成能力、胰岛素敏感性或临床并发症无关^[61]. 脂联素水平在不同病原学导致的肝硬化病例中显著增高并且随着Child-Pugh分级的增高而增高, 我们推测肝硬化患者血清脂联素的升高是由于脂肪组织的产生和肝脏代谢不平衡所致; 慢性肝病中的高脂联素可能部分地反应了机体的抗炎机制之一^[62]. 由于在胆汁淤积性肝病中脂联素水平显著升高, 脂联素水平的升高与肝组织学上的严重胆管炎和胆汁淤积相关, 因此脂联素可能作为显示肝硬化胆汁淤积的一个新的标志^[61].

6 结论

在当前这个医学时代, 我们对肝损伤病理学和基础新陈代谢变化的研究已经取得了长足的进步, 开始越来越关注瘦素和脂联素这些脂肪因子在慢性肝病中的潜在作用. 在大多数研究中已经发现, NAFLD和丙肝患者中瘦素水平增高、脂联素下降, 这可能导致肝内脂肪的蓄积和炎症纤维化的进展. 然而这些脂肪因子在慢性肝病形成中所起的作用仍未完全阐明, 他们和肝脂变或纤维化严重性的关系还存在着争议. 这两个脂肪因子间的相互作用如何、发挥作用的具体机制以及如何应用于临床等还有待于进一步研究.

7 参考文献

- Powell EE, Jonsson JR, Clouston AD. Steatosis: co-factor in other liver diseases. *Hepatology* 2005; 42: 5-13
- Marra F, Aleffi S, Bertolani C, Petrai I, Vizzutti F. Adipokines and liver fibrosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2005; 9: 279-284
- Considine RV. Human leptin: an adipocyte hormone with weight-regulatory and endocrine functions. *Semin Vasc Med* 2005; 5: 15-24
- Kakuma T, Lee Y, Higa M, Wang Z, Pan W, Shimomura I, Unger RH. Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 8536-8541
- Javor ED, Ghany MG, Cochran EK, Oral EA, DePaoli AM, Premkumar A, Kleiner DE, Gordon P. Leptin reverses nonalcoholic steatohepatitis in patients with severe lipodystrophy. *Hepatology* 2005; 41: 753-760
- Matarese G, Moschos S, Mantzoros CS. Leptin in immunology. *J Immunol* 2005; 174: 3137-3142
- Murad A, Nath AK, Cha ST, Demir E, Flores-

- Riveros J, Sierra-Honigmann MR. Leptin is an autocrine/paracrine regulator of wound healing. *FASEB J* 2003; 17: 1895-1897
- Mantzoros CS. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Intern Med* 1999; 130: 671-680
- Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003; 423: 762-769
- Shklyayev S, Aslanidi G, Tennant M, Prima V, Kohlbrenner E, Kroutov V, Campbell-Thompson M, Crawford J, Shek EW, Scarpace PJ, Zolotukhin S. Sustained peripheral expression of transgene adiponectin offsets the development of diet-induced obesity in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 14217-14222
- Tsatsanis C, Zacharioudaki V, Androulidaki A, Dermitzaki E, Charalampopoulos I, Minas V, Gravanis A, Margioris AN. Adiponectin induces TNF-alpha and IL-6 in macrophages and promotes tolerance to itself and other pro-inflammatory stimuli. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 335: 1254-1263
- Schwimmer JB, Behling C, Newbury R, Deutsch R, Nievergelt C, Schork NJ, Lavine JE. Histopathology of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 42: 641-649
- Marchesini G, Marzocchi R, Agostini F, Bugianesi E. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol* 2005; 16: 421-427
- Yalniz M, Bahcecioglu IH, Ataseven H, Ustundag B, Ilhan F, Poyrazoglu OK, Erensoy A. Serum adipokine and ghrelin levels in nonalcoholic steatohepatitis. *Mediators Inflamm* 2006; 2006: 34295
- 戚丽, 路中. 非酒精性脂肪肝胰岛素抵抗及血清瘦素和脂联素水平的研究. *中国中西医结合消化杂志* 2006; 14: 167-170
- 丁效蕙, 赵景民, 孙艳玲, 周光德, 潘登, 杨建法, 赵雨来, 张玲霞. Leptin及其受体在非酒精性脂肪性肝炎患者肝组织中的表达. *解放军医学杂志* 2007; 32: 957-960
- Tungtrongchitr R, Treeprasertsuk S, Ei NN, Thepouyporn A, Phonrat B, Huntrup A. Serum leptin concentrations in chronic hepatitis. *J Med Assoc Thai* 2006; 89: 490-499
- Cortez-Pinto H, Camilo ME, Baptista A, De Oliveira AG, De Moura MC. Non-alcoholic fatty liver: another feature of the metabolic syndrome? *Clin Nutr* 1999; 18: 353-358
- Jéquier E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 967: 379-388
- Petersen KF, Oral EA, Dufour S, Befroy D, Ariyan C, Yu C, Cline GW, DePaoli AM, Taylor SI, Gordon P, Shulman GI. Leptin reverses insulin resistance and hepatic steatosis in patients with severe lipodystrophy. *J Clin Invest* 2002; 109: 1345-1350
- Jarrar MH, Baranova A, Collantes R, Ranard B, Stepanova M, Bennett C, Fang Y, Elariny H, Goodman Z, Chandhoke V, Younossi ZM. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty

■应用要点

补充瘦素可以增加瘦素缺乏个体的瘦素水平, 逆转非酒精性脂肪肝, 而具有治疗作用; 脂联素可能逆转HSC的活化, 维持HSC的静止状态, 在肝纤维化的治疗上具有重要的意义.

■同行评价

本文较全面的综述了瘦素、脂联素在非酒精性脂肪肝、慢性丙型肝炎和肝硬化患者发病中的作用,基本上反映了目前这一领域的研究现状,条理清楚,具有较好的临床参考价值。

- liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27: 412-421
- 22 王中丽, 夏冰, 陈青松, 程金童, 文斌, 胡正国, 曹萍. 非酒精性脂肪肝合并代谢综合征患者血清脂联素水平及其与胰岛素抵抗程度的相关性分析. *临床内科杂志* 2007; 24: 620-623
- 23 Lee YS, Cho YK, Pae JC, Oh SY, Kang MS, Park JH, Kim HJ, Park DI, Sohn CI, Jeon WK, Kim BI, Lee WY, Oh KW, Yun EJ, Oh ES. [The relationship between serum adiponectin level and serum alanine aminotransferase elevation in Korean male with nonalcoholic fatty liver disease] *Korean J Hepatol* 2006; 12: 221-229
- 24 Kaser S, Moschen A, Cayon A, Kaser A, Crespo J, Pons-Romero F, Ebenbichler CF, Patsch JR, Tilg H. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2005; 54: 117-121
- 25 Musso G, Gambino R, Durazzo M, Biroli G, Carello M, Fagà E, Pacini G, De Michieli F, Rabbione L, Premoli A, Cassader M, Pagano G. Adipokines in NASH: postprandial lipid metabolism as a link between adiponectin and liver disease. *Hepatology* 2005; 42: 1175-1183
- 26 Romero-Gómez M, Castellano-Megias VM, Grande L, Irlés JA, Cruz M, Nogales MC, Alcón JC, Robles A. Serum leptin levels correlate with hepatic steatosis in chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1135-1141
- 27 Sheikh MY, Choi J, Qadri I, Friedman JE, Sanyal AJ. Hepatitis C virus infection: molecular pathways to metabolic syndrome. *Hepatology* 2008; 47: 2127-2133
- 28 Piche T, Vandebos F, Abakar-Mahamat A, Vanbiervliet G, Barjoan EM, Calle G, Giudicelli J, Ferrua B, Laffont C, Benzaken S, Tran A. The severity of liver fibrosis is associated with high leptin levels in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2004; 11: 91-96
- 29 Liu ZW, Zhang N, Han QY, Zeng JT, Chu YL, Qiu JM, Wang YW, Ma LT, Wang XQ. Correlation of serum leptin levels with anthropometric and metabolic parameters and biochemical liver function in Chinese patients with chronic hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3357-3362
- 30 Myers RP, Messous D, Poynard T, Imbert-Bismut F. Association between leptin, metabolic factors and liver histology in patients with chronic hepatitis C. *Can J Gastroenterol* 2007; 21: 289-294
- 31 Cua IH, Hui JM, Bandara P, Kench JG, Farrell GC, McCaughan GW, George J. Insulin resistance and liver injury in hepatitis C is not associated with virus-specific changes in adipocytokines. *Hepatology* 2007; 46: 66-73
- 32 Gwak GY, Kim TH, Yu SJ, Yoon JH, Yong JJ, Park SC, Lee HS. Lack of association between serum leptin levels and hepatic steatosis, fibrosis or response to antiviral therapy in Korean chronic hepatitis C patients. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 844-848
- 33 Zhu B, Zhang P, Wang XH, Sun LH, Jiang ZY. [A virological response study of serum leptin level and insulin resistance on the antiviral effect in patients with chronic hepatitis C] *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2006; 14: 887-889
- 34 Eguchi Y, Mizuta T, Yasutake T, Hisatomi A, Iwakiri R, Ozaki I, Fujimoto K. High serum leptin is an independent risk factor for non-response patients with low viremia to antiviral treatment in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 556-560
- 35 Petit JM, Minello A, Jooste V, Bour JB, Galland F, Duvillard L, Verges B, Olsson NO, Gombert P, Hillon P. Decreased plasma adiponectin concentrations are closely related to steatosis in hepatitis C virus-infected patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 2240-2243
- 36 Wang AY, Hickman IJ, Richards AA, Whitehead JP, Prins JB, Macdonald GA. High molecular weight adiponectin correlates with insulin sensitivity in patients with hepatitis C genotype 3, but not genotype 1 infection. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2717-2723
- 37 Durante-Mangoni E, Zampino R, Marrone A, Tripodi MF, Rinaldi L, Restivo L, Cioffi M, Ruggiero G, Adinolfi LE. Hepatic steatosis and insulin resistance are associated with serum imbalance of adiponectin/tumour necrosis factor-alpha in chronic hepatitis C patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24: 1349-1357
- 38 Zografos TA, Liaskos C, Rigopoulou EI, Togousidis E, Makaritsis K, Germenis A, Dalekos GN. Adiponectin: a new independent predictor of liver steatosis and response to IFN-alpha treatment in chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 605-614
- 39 Hsu CS, Liu CJ, Liu CH, Wang CC, Chen CL, Lai MY, Chen PJ, Kao JH, Chen DS. High hepatitis C viral load is associated with insulin resistance in patients with chronic hepatitis C. *Liver Int* 2008; 28: 271-277
- 40 Liu CJ, Chen PJ, Jeng YM, Huang WL, Yang WS, Lai MY, Kao JH, Chen DS. Serum adiponectin correlates with viral characteristics but not histologic features in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2005; 43: 235-242
- 41 Jonsson JR, Moschen AR, Hickman IJ, Richardson MM, Kaser S, Clouston AD, Powell EE, Tilg H. Adiponectin and its receptors in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2005; 43: 929-936
- 42 Lo Iacono O, Venezia G, Petta S, Mineo C, De Lisi S, Di Marco V, Rodolico V, Amato M, Ferraro D, Giordano C, Almasio PL, Craxi A. The impact of insulin resistance, serum adipocytokines and visceral obesity on steatosis and fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25: 1181-1191
- 43 Sato S, Furuta K, Mishiro T, Miyake T, Kohge N, Akagi S, Adachi K, Kinoshita Y. Serum adiponectin concentration in patients with hepatitis C virus. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 744-745
- 44 Kara B, Gunesacar R, Doran F, Kara IO, Akkiz H. Correlation of serum adiponectin levels and hepatic steatosis in hepatitis C virus genotype 1 infection. *Adv Ther* 2007; 24: 972-982
- 45 Ding X, Saxena NK, Lin S, Xu A, Srinivasan S, Anania FA. The roles of leptin and adiponectin: a novel paradigm in adipocytokine regulation of liver fibrosis and stellate cell biology. *Am J Pathol* 2005; 166: 1655-1669
- 46 Potter JJ, Rennie-Tankesley L, Mezey E. Influence of leptin in the development of hepatic fibrosis produced in mice by *Schistosoma mansoni* infection and by chronic carbon tetrachloride administration. *J Hepatol* 2003; 38: 281-288
- 47 Honda H, Ikejima K, Hirose M, Yoshikawa M, Lang T, Enomoto N, Kitamura T, Takei Y, Sato N. Leptin

- is required for fibrogenic responses induced by thioacetamide in the murine liver. *Hepatology* 2002; 36: 12-21
- 48 Ikejima K, Okumura K, Kon K, Takei Y, Sato N. Role of adipocytokines in hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S87-S92
- 49 Ikejima K, Takei Y, Honda H, Hirose M, Yoshikawa M, Zhang YJ, Lang T, Fukuda T, Yamashina S, Kitamura T, Sato N. Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology* 2002; 122: 1399-1410
- 50 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
- 51 Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H, Yasuda T, Noguchi H, Seike M, Yoshimatsu H. Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice. *Hepatology* 2004; 40: 177-184
- 52 潘峰, 崔建和, 周传文, 任建国, 李东海. 脂联素与非酒精性脂肪性肝病肝纤维化及胰岛素抵抗的关系. *徐州医学院学报* 2007; 27: 713-716
- 53 Chuang JH, Wang PW, Tai MH. An adipocentric view of liver fibrosis and cirrhosis. *Chang Gung Med J* 2004; 27: 855-868
- 54 Manolakopoulos S, Bethanis S, Liapi C, Stripeli F, Sklavos P, Margeli A, Christidou A, Katsanika A, Vogiatzakis E, Tzourmakliotis D, Theocharis S. An assessment of serum leptin levels in patients with chronic viral hepatitis: a prospective study. *BMC Gastroenterol* 2007; 7: 17
- 55 Campillo B, Sherman E, Richardet JP, Bories PN. Serum leptin levels in alcoholic liver cirrhosis: relationship with gender, nutritional status, liver function and energy metabolism. *Eur J Clin Nutr* 2001; 55: 980-988
- 56 Bolukbas FF, Bolukbas C, Horoz M, Gumus M, Erdogan M, Zeyrek F, Yayla A, Ovunc O. Child-Pugh classification dependent alterations in serum leptin levels among cirrhotic patients: a case controlled study. *BMC Gastroenterol* 2004; 4: 23
- 57 Ockenga J, Tietge UJ, Böker KH, Manns MP, Brabant G, Bahr MJ. Distinct roles of free leptin, bound leptin and soluble leptin receptor during the metabolic-inflammatory response in patients with liver cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25: 1301-1309
- 58 田怡, 刘建生, 刘进, 付极, 马铭, 张晓红. 肝硬化患者血清脂联素与瘦素的相关性. *临床消化病杂志* 2007; 19: 360-361
- 59 Tietge UJ, Böker KH, Manns MP, Bahr MJ. Elevated circulating adiponectin levels in liver cirrhosis are associated with reduced liver function and altered hepatic hemodynamics. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287: E82-E89
- 60 Sohara N, Takagi H, Kakizaki S, Sato K, Mori M. Elevated plasma adiponectin concentrations in patients with liver cirrhosis correlate with plasma insulin levels. *Liver Int* 2005; 25: 28-32
- 61 Tacke F, Wüstefeld T, Horn R, Luedde T, Srinivas Rao A, Manns MP, Trautwein C, Brabant G. High adiponectin in chronic liver disease and cholestasis suggests biliary route of adiponectin excretion in vivo. *J Hepatol* 2005; 42: 666-673
- 62 Kaser S, Moschen A, Kaser A, Ludwiczek O, Ebenbichler CF, Vogel W, Jäschke W, Patsch JR, Tilg H. Circulating adiponectin reflects severity of liver disease but not insulin sensitivity in liver cirrhosis. *J Intern Med* 2005; 258: 274-280

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志被收录情况

本刊讯 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.(常务副总编辑: 张海宁 2008-10-18)

氧化应激与肝脏损伤

吴娜, 蔡光明, 何群

■背景资料

人体内95%的自由基属于氧自由基, 他往往是其他自由基产生的起因, 过量的氧自由基容易引起细胞的损伤和死亡, 与多种疾病有密切的关系, 如衰老、肿瘤及冠心病等。

吴娜, 湖南中医药大学 湖南省长沙市 410208
吴娜, 蔡光明, 中国人民解放军302医院中药研究所 北京市 100039
何群, 湖南中医药大学药剂教研室 湖南省长沙市 410208
作者贡献分布: 本文选题, 参考文献检索及撰写由吴娜完成; 论文修改由蔡光明与何群完成。
通讯作者: 蔡光明, 100039, 北京市, 中国人民解放军302医院中药研究所. cgm1004@vip.sina.com
电话: 010-66933323
收稿日期: 2008-08-14 修回日期: 2008-09-21
接受日期: 2008-09-22 在线出版日期: 2008-10-18

Oxidative stress and hepatic injury

Na Wu, Guang-Ming Cai, Qun He

Na Wu, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan Province, China
Na Wu, Guang-Ming Cai, Institute of Chinese Materia Medica, the 302th Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China
Qun He, Pharmaceutical Division, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan Province, China
Correspondence to: Guang-Ming Cai, Institute of Chinese Materia Medica, the 302th Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China. cgm1004@vip.sina.com
Received: 2008-08-14 Revised: 2008-09-21
Accepted: 2008-09-22 Published online: 2008-10-18

Abstract

Oxidative stress, initiated by reactive oxygen species, is the collective pathophysiological mechanism of many hepatopathies. Oxidative stress results in hepatic injury mainly by priming lipid peroxidation to change the function of biological membrane, covalent immobilization of biomacromolecules and destroying the enzyme activity considering cytokine (TNF- α and NF- κ B) interaction. The role of oxidative stress in many hepatopathies such as fatty liver disease, viral hepatitis, hepatic fibrosis is innegligible.

Key Words: Oxidative stress; Reactive oxygen species; Hepatic injury; Lipid peroxidation; Cytokine

Wu N, Cai GM, He Q. Oxidative stress and hepatic injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(29): 3310-3315

摘要

活性氧自由基引发的氧化应激是多种肝病发

病的共同病理生理基础. 氧化应激主要通过启动膜脂质过氧化改变生物膜功能、与生物大分子共价结合及破坏酶的活性等在细胞因子(如TNF- α 、NF- κ B)的共同作用下引起不同程度的肝损伤. 氧化应激在脂肪肝、病毒性肝炎、肝纤维化等肝病中可产生不容忽视的作用。

关键词: 氧化应激; 活性氧; 肝损伤; 脂质过氧化; 细胞因子

吴娜, 蔡光明, 何群. 氧化应激与肝脏损伤. 世界华人消化杂志 2008; 16(29): 3310-3315
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3310.asp>

0 引言

生物体内的能量代谢将氧气作为有氧代谢过程中的电子接受体, 不可避免地产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)自由基. ROS具有双重效应, 与某些生理活性物质的调控和炎症免疫过程密切相关, 但是过量的ROS容易导致氧化应激(oxidative stress, OS)状态^[1]. 线粒体呼吸链复合体利用电子传递生产ATP, 是ROS的主要来源^[2], 肝脏含有丰富的线粒体, 因此也是ROS攻击的主要器官. OS可能是肝病的共同发病机制. 因此, 本文就近年来关于OS在不同肝损伤机制中的作用进行综述.

1 氧化应激与脂肪性肝病

脂肪性肝病指脂肪在肝细胞中的异常沉积, 可分为非酒精性脂肪肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)和酒精性脂肪肝病(alcoholic fatty liver disease, AFLD). 在复杂的脂肪肝发病机制中OS起关键作用, 目前对脂肪肝发病机制广泛接受的理论是1998年Day *et al*^[3]提出的“二次打击”学说. 第一次打击主要是胰岛素抵抗和脂肪代谢的失衡导致的脂肪在肝细胞中的沉积, 尤其是脂肪酸和甘油三酯, 最终引起单纯性肝脂肪变性; 第二次打击为环境应激物(如饮食成分)及代谢应激物(如高血糖)主要通过肝细胞线粒体的损伤产生OS, 在细胞因子等共同作

■同行评议者

王蒙, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院肝外综合治疗一科; 谭学瑞, 教授, 汕头医学院第一附属医院院长室

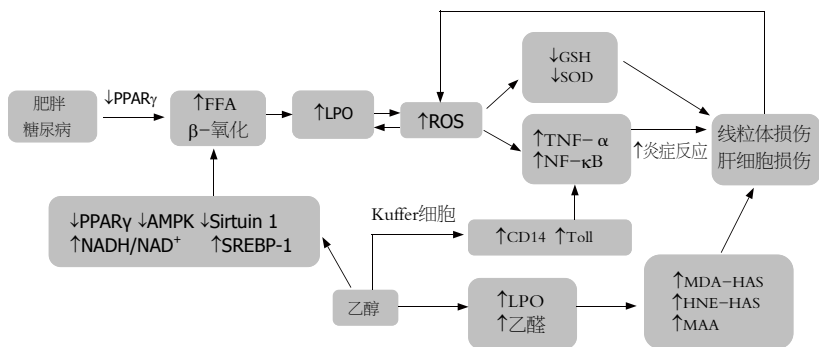


图 1 氧化应激在NAFLD/AFLD中的损伤机制.

■ 研发前沿
肝病的发病机制十分复杂, 氧自由基引起的氧化性损伤是其中一个十分重要的原因. 目前研究的热点是天然抗氧化性药物及其作用机制.

用下, 引起脂肪性肝炎, 进一步形成脂肪性肝纤维化和脂肪性肝硬化.

1.1 氧化应激与NAFLD 随着肥胖及II型糖尿病患病率的增加, NAFLD已成为当今医学领域的一个难题. NAFLD包含两种组织学损伤: 单纯性非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver, NAFL)及非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH). NAFLD的发病机制较复杂, 迄今尚未完全阐明, 过量的ROS使肝内抗氧化系统遭到严重破坏. 谷胱甘肽(glutathione, GSH)是细胞内重要的肽类抗氧化剂, 是诸多ROS清除酶的还原底物, 反应后生成具有潜在高细胞毒素的氧化型谷胱甘肽(oxidative glutathione, GSSG). Nobili *et al*^[4]以GSSG/GSH的比值评估体内OS时发现NASH患者血液中GSSG增长了1.5倍, 导致GSSG/GSH发生显著性变化. 此外, 肝内其他重要的抗氧化物质, 如辅酶Q10, CuZn-SOD及过氧化氢酶(CAT)等的不断衰竭在NAFLD患者中也得到了证实^[5].

NASH患者的肝细胞以异常的线粒体为特征, 线粒体损伤是肝细胞损伤的重要原因之一, 而线粒体中过量游离脂肪酸(FFA)的氧化是导致线粒体损伤的重要原因: 一方面, FFA的β-氧化过程产生的ROS使线粒体膜发生脂质过氧化(lipid peroxidation, LPO), 导致进一步的解偶联作用, 即抑制氧化磷酸化的作用, 同时也增强了线粒体的OS^[6]. ROS的增多促使肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor-α, TNF-α)的生成, 使其通过干预线粒体呼吸链并形成超氧阴离子(O₂⁻)而加剧线粒体损伤, 并增加了线粒体膜的通透性^[7]. 另一方面, ROS能导致mtDNA碱基的氧化, Seki *et al*^[8]研究发现在17例NASH患者中, 有11例患者(64.7%)的肝细胞中表达了8-羟基鸟苷酸(8-OHdG)(mtDNA损伤的一种标志).

ROS还能启动多种细胞因子, 如生长转化因子β(transforming growth factorβ, TGFβ)、

白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)、NF-κB等. NF-κB、TGF-β、IL-8和LPO产物4-OH壬烯酮(4-hydroxynonenal, HNE)在一定程度上还可以导致中性粒细胞的浸润, 使促炎症反应加强, 最终导致肝细胞凋亡.

OS与主要存在于肝实质细胞中的过氧化物酶体增殖物启动受体-α(peroxisome proliferator activated receptor alpha, PPARα)有关^[9], PPARα主要对肝内脂肪酸氧化相关基因表达进行调控, 如脂酰辅酶A氧化酶(acyl-CoA oxidase, AOX)等^[10].

1.2 氧化应激与AFLD 在AFLD的发病机制中OS同样受到格外关注. 细胞色素P450 2E1(CYP2E1)和NADPH氧化酶是乙醇代谢过程中产生ROS的重要酶体系^[11]. 乙醇的代谢产物在CYP2E1及Fe³⁺参与下的氧化作用, 会产生大量的OS产物, 如OH⁻、O₂⁻、H₂O₂等.

ROS的增多将会引起细胞内ATP衰竭, 使线粒体氧化容量受损, 进一步影响乙醛的氧化, 使乙醛在肝脏中不断蓄积, 并可能通过抑制AMP激活的蛋白激酶AMPK和sirtuin 1蛋白活化肝脏的固醇调节组件结合蛋白-1(sterol regulatory element binding protein-1, SREBP-1)增加生脂酶基因的表达, 加速脂肪酸的合成^[12]; 乙醇的代谢受阻, 更易导致肠黏膜通透性增加, 肠源性内毒素可通过增强Kupffer细胞内毒素受体CD14和Toll样受体4的表达, 诱导Kupffer细胞中产生大量的以TNF-α为主的细胞因子, 加剧炎症反应, 进一步引起肝细胞的坏死、凋亡^[13].

在乙醇介导的肝损伤中LPO产物衍生的抗原类引起的免疫反应可能起重要作用. 丙二醛(MDA), HNE可与人血清白蛋白结合(HSA), 分别形成MDA-HSA和HNE-HSA, 引起免疫反应^[14]. 此外, MDA还能与乙醛生成加合物MAA, 同样具有很强的致免疫特性^[15].

另外, PPARα也参与了乙醇介导的肝损伤过程, 是其发病机制的重要原因之一, PPARα基

应用要点

本文综合阐述了氧化应激在多种肝病发病机制中的损伤机制,为临床肝病的治疗中筛选高效的抗氧化活性药物提供了一定的理论依据。

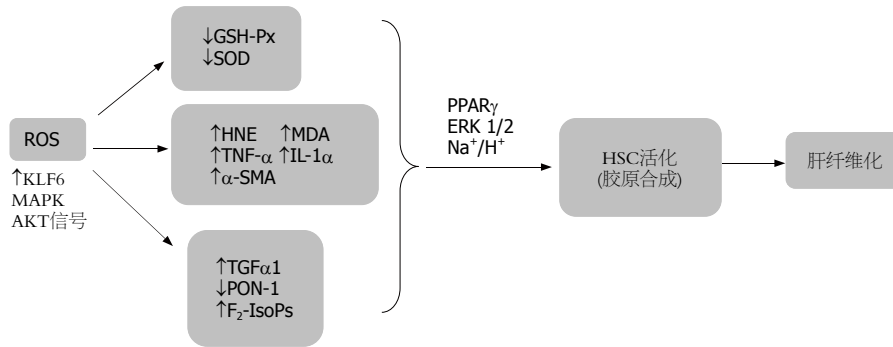


图 2 氧化应激在肝纤维化中的损伤机制。

因的失活将导致肝脏大量的脂质聚集,使脂质代谢机制紊乱^[16]。

2 氧化应激与药物性肝病

随着临床药物和非处方药种类的增多及联合用药的广泛应用,药源性肝损害的发生率逐年增高。根据2007年美国疾控中心的最新调查数据显示每年大约有由药物引起的1600例急性肝功能衰竭的案例^[17]。引起肝损害的常见药物有对乙酰氨基酚(解热镇痛抗炎药)、阿莫西林(青霉素类抗生素)、胺碘酮(抗心律失常药),他莫西芬(抗癌药),司他夫定(抗病毒药)等^[18]。

药物代谢反应与众多酶系有关,不仅包括CYP450,还包括含黄素单氧化酶(flavin-containing monooxygenase, FMO),环氧化物水解酶(epoxide hydrolase, EH),其中CYP450起重要作用,如CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2E1等。Gonzalez^[19]研究发现在不同剂量的乙酰氨基酚(acetaminophen, AP)产生肝毒性条件下,缺失CYP2E1的小鼠存活率明显高于野生型小鼠,缺失CYP2E1及CYP1A2的小鼠在最高剂量的AP(1200 mg/kg)条件下,存活率仍约为90%。

药物代谢可以通过多种途径引起的不同程度的肝损伤。如AP经CYP450(主要为CYP2E1)代谢产生的活性中间体N-乙酰-对苯醌亚胺(NAPQI),与肝细胞大分子结合导致肝毒性及GSH的耗竭^[20],加剧LPO;司他夫定,通过抑制DNA pol-γ(多聚酶中唯一能复制mtDNA的酶类),最终导致乳酸性酸中毒^[21];曲格列酮能明显改变70种线粒体蛋白质,并检测出Lon蛋白酶、CAT等含量增加^[22]。

药物代谢过程中CYP2E1激活产生的ROS可能通过表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGRF)/c-Raf的信号增强细胞外信号调节激酶1/2(extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK 1/2)的磷酸化导致细胞凋亡和坏

死基因的激活或改变^[23]。

3 氧化应激与病毒性肝炎

病毒性肝炎(viral hepatitis, VP)的发病机制至今尚未完全阐明,越来越多的研究表明OS是重要的影响因素。VP患者的肝脏中促氧化/抗氧化系统处于严重失衡状态^[24]。

目前,研究肝炎病毒与OS的关系多集中在HBV(hepatitis B virus)、HCV(hepatitis C virus)。Levent *et al*^[25-26]发现HBV、HCV患者血清中抗氧化酶CuZn-SOD、GSX-Px及GSH、β-胡萝卜素(抑制单线氧活性)明显低于健康者。HBV、HCV蛋白的表达可以通过Ca²⁺信号产生OS^[27-28]。OS能导致GSH-Px(一种极少见的硒依赖酶)的耗竭使硒含量(主要以硒代半胱氨酸的型式存在)减少,使免疫反应受到抑制,并能促进病毒的复制^[29]。HBV、HCV患者血清中MDA、共轭二烯(CD)含量也明显升高,在丙肝患者表现得尤为突出,这不仅与直接引起细胞溶解的病毒有关,还与O₂引发的细胞膜损伤有关^[30]。另外,ROS还能激活NF-κB及转录信号转导子与激活子-3(Signal Transducer and Activator of Transcription-3, STAT-3),ROS在NF-κB介导下可进一步激活环氧化酶-2(Cox-2),Cox-2与STAT-3在细胞增殖、分化、肿瘤形成中起重要作用^[31-32]。

4 氧化应激与肝纤维化

现代医学认为减少胶原纤维的生成和增强其降解,肝纤维化是可以逆转的。肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)的激活转化为肌纤维母细胞,并大量分泌细胞外基质^[33](extracellular matrix, ECM)是肝纤维化发生和发展的核心病理环节,发病机制复杂,OS引发的LPO是HSC活化、增殖、及胶原合成的重要原因。

Wang *et al*^[34]在研究褪黑素对四氯化碳(CCl₄)导致肝纤维化的保护作用时发现6个星

期后, CCl_4 模型组大鼠的羟脯氨酸(胶原代谢的生化指标)、MDA、促炎症因子 $\text{TNF-}\alpha$ 及 $\text{IL-1}\beta$ 显著性升高, 而抗氧化物酶 GSH-Px 及 SOD 的活性显著性降低. 另外, 平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、8-OhdG、转化生长因子 $\beta 1$ ($\text{TGF}\beta 1$)mRNA、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP-2)水平在肝纤维化模型中也明显升高^[35-36].

$\text{TGF}\beta 1$ 是目前研究发现的促纤维增生的最重要的细胞因子之一, ROS能促进HSC通过上调核转录因子 KLF6 (Kruppel-like factor 6, KLF6)分泌 $\text{TGF}\beta 1$ ^[37], 并激活HSC转化为肌纤维母细胞^[38]. $\text{TGF}\beta 1$ 的激活与丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)和Akt信号有关^[35]. $\text{TGF}\beta 1$ 还能释放 F_2 -异前列腺烷(F_2 -isoprostanes, F_2 -IsoPs), F_2 -IsoPs是肝细胞中LOP反应生成的一类前列腺素 F_2 样产物, 被认为是反应LPO水平最可靠的标志^[39], 能介导HSC的分化和促进胶原的过度形成^[40].

对氧磷酶-1(paraoxonase-1, PON-1)对OS的调节和肝纤维化的形成起重要作用, PON-1是一类钙离子依赖性高密度脂蛋白(high-density lipoproteins, HDL)的酯酶, 在脂类代谢中具有重要的抗氧化活性. Ferre *et al*^[41]发现在肝硬化患者的血清和肝脏中PON-1表达显著性增加, 但其活性显著性降低. 原因可能是PON-1在水解脂质过氧化物后活性降低或HDL的结构发生变化导致PON-1活性降低.

另外, 过氧化物酶体增殖物启动受体- γ (peroxisome proliferator activated receptor gamma, PPAR γ)活性^[42]、ERK 1/2信号及 Na^+/H^+ 交换^[43]在激活HSC和胶原的合成中都起作用.

5 氧化应激与肝癌

OS在肝癌细胞增殖、凋亡机制中的作用也是不容忽视的. ROS在特定细胞内氧化还原环境下可通过激活蛋白激酶B(protein kinase B, PKB)途径传递信号, 促使激活蛋白-1(activator protein, AP-1)转录因子组成成员c-fos/c-jun基因的mRNA表达, 最终促进肝癌细胞生长^[44]. 肝癌细胞凋亡与线粒体突变是密不可分的. 李国平 *et al*^[45]研究了OS诱导HepG2肝癌细胞凋亡及其机制时发现HepG2暴露于2 mmol/L的 H_2O_2 可以产生OS, OS作用后4 h, 细胞线粒体膜电位明显下降; 作用8、12 h后细胞凋亡蛋白酶3、9(Caspase-3、Caspase-9)分别升高6.7和3.6倍; 作

用12 h后细胞开始凋亡, 提示OS诱导HepG2肝癌细胞的凋亡与线粒体通路及Caspase启动有关. OS引起的mtDNA突变也是肝癌细胞凋亡的一个重要原因. 张国强 *et al*^[46]用溴化乙锭诱导建立mtDNA缺失肝癌细胞(ρ^0 SK-Hep1)模型, 探讨ROS及线粒体跨膜电位在 ρ^0 SK-Hep1肝癌细胞中的改变时发现mDNA缺失后, 细胞内ROS荧光强度明显增强, 细胞膜电位下降, ROS的增加进一步加重线粒体膜的损伤.

另外, 端粒酶的启动可能是细胞癌变的一个共同通路. 端粒酶的激活是原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的早期事件, Liu *et al*^[47]发现端粒酶的活性与MDA的含量成正相关, OS对端粒还能引起端粒的损伤或缩短加速^[48].

6 结论

作为细胞信号系统中第二信使角色的ROS, 具有独特的生理作用, 但过量的ROS通过多种途径在细胞因子等共同作用下引起不同程度的肝损伤. 了解氧化应激在不同肝病中的损伤机制, 对今后肝病的预防和治疗工作、开发和利用高效低毒的抗氧化活性物质具有重要意义.

7 参考文献

- 张庆柱. 分子药理学. 第1版. 北京: 高等教育出版社, 2007: 190
- 光吉博则, 谷仁辉. 氧化应激的病理生理作用. 日本医学介绍 2007; 28: 150-152
- Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845
- Nobili V, Pastore A, Gaeta LM, Tozzi G, Comparcola D, Sartorelli MR, Marcellini M, Bertini E, Piemonte F. Glutathione metabolism and antioxidant enzymes in patients affected by nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Chim Acta* 2005; 355: 105-111
- Yesilova Z, Yaman H, Oktenli C, Ozcan A, Uygun A, Cakir E, Sanisoglu SY, Erdil A, Ates Y, Aslan M, Musabak U, Erbil MK, Karaeren N, Dagalp K. Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 850-855
- Lancaster JR Jr, Laster SM, Gooding LR. Inhibition of target cell mitochondrial electron transfer by tumor necrosis factor. *FEBS Lett* 1989; 248: 169-174
- Sanchez-Alcazar JA, Schneider E, Martinez MA, Carmona P, Hernandez-Munoz I, Siles E, De La Torre P, Ruiz-Cabello J, Garcia I, Solis-Herruzo JA. Tumor necrosis factor-alpha increases the steady-state reduction of cytochrome b of the mitochondrial respiratory chain in metabolically inhibited L929 cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 13353-13361
- Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty

■同行评价

本文主题明确, 重点突出, 层次分明, 逻辑性强, 是一篇较高学术价值的综述.

- liver diseases. *J Hepatol* 2002; 37: 56-62
- 9 Inoue I, Goto S, Matsunaga T, Nakajima T, Awata T, Hokari S, Komoda T, Katayama S. The ligands/activators for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) and PPARgamma increase Cu²⁺, Zn²⁺-superoxide dismutase and decrease p22phox message expressions in primary endothelial cells. *Metabolism* 2001; 50: 3-11
 - 10 Akter MH, Razzaque MA, Yang L, Fumoto T, Motojima K, Yamaguchi T, Hirose F, Osumi T. Identification of a Gene Sharing a Promoter and Peroxisome Proliferator-Response Elements With Acyl-CoA Oxidase Gene. *PPAR Res* 2006; 2006: 71916
 - 11 周俊英, 赵彩彦, 甄真. 酒精性肝病发病过程中氧化应激指标的变化. *中国组织化学与细胞化学杂志* 2006; 15: 644-648
 - 12 Ajmo JM, Liang X, Rogers CQ, Pennock B, You M. Resveratrol Alleviates Alcoholic Fatty Liver in Mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008 Aug 28. [Epub ahead of print]
 - 13 Nagata K, Suzuki H, Sakaguchi S. Common pathogenic mechanism in development progression of liver injury caused by non-alcoholic or alcoholic steatohepatitis. *J Toxicol Sci* 2007; 32: 453-468
 - 14 Mottaran E, Stewart SF, Rolla R, Vay D, Cipriani V, Moretti M, Vidali M, Sartori M, Rigamonti C, Day CP, Albano E. Lipid peroxidation contributes to immune reactions associated with alcoholic liver disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 38-45
 - 15 Willis MS, Klassen LW, Tuma DJ, Thiele GM. Malondialdehyde-acetaldehyde-haptenated protein induces cell death by induction of necrosis and apoptosis in immune cells. *Int Immunopharmacol* 2002; 2: 519-535
 - 16 Reddy JK, Rao MS. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G852-G888
 - 17 Norris W, Paredes AH, Lewis JH. Drug-induced liver injury in 2007. *Curr Opin Gastroenterol* 2008; 24: 287-297
 - 18 Bjornsson E, Olsson R. Suspected drug-induced liver fatalities reported to the WHO database. *Dig Liver Dis* 2006; 38: 33-38
 - 19 Gonzalez FJ. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutat Res* 2005; 569: 101-110
 - 20 Madsen KG, Olsen J, Skonberg C, Hansen SH, Jurva U. Development and evaluation of an electrochemical method for studying reactive phase-I metabolites: correlation to in vitro drug metabolism. *Chem Res Toxicol* 2007; 20: 821-831
 - 21 Velsor LW, Kovacevic M, Goldstein M, Leitner HM, Lewis W, Day BJ. Mitochondrial oxidative stress in human hepatoma cells exposed to stavudine. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 199: 10-19
 - 22 Lee YH, Chung MC, Lin Q, Boelsterli UA. Troglitazone-induced hepatic mitochondrial proteome expression dynamics in heterozygous Sod2(+/-) mice: two-stage oxidative injury. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 231: 43-51
 - 23 Schattenberg JM, Wang Y, Rigoli RM, Koop DR, Czaja MJ. CYP2E1 overexpression alters hepatocyte death from menadione and fatty acids by activation of ERK1/2 signaling. *Hepatology* 2004; 39: 444-455
 - 24 Irshad M, Chaudhuri PS, Joshi YK. Superoxide dismutase and total anti-oxidant levels in various forms of liver diseases. *Hepatol Res* 2002; 23: 178-184
 - 25 Levent G, Ali A, Ahmet A, Polat EC, Aytac C, Ayse E, Ahmet S. Oxidative stress and antioxidant defense in patients with chronic hepatitis C patients before and after pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin therapy. *J Transl Med* 2006; 4: 25
 - 26 Dikici I, Mehmetoglu I, Dikici N, Bitirgen M, Kurban S. Investigation of oxidative stress and some antioxidants in patients with acute and chronic viral hepatitis B and the effect of interferon-alpha treatment. *Clin Biochem* 2005; 38: 1141-1144
 - 27 Piccoli C, Scrima R, Quarato G, D'Aprile A, Ripoli M, Lecce L, Boffoli D, Moradpour D, Capitano N. Hepatitis C virus protein expression causes calcium-mediated mitochondrial bioenergetic dysfunction and nitro-oxidative stress. *Hepatology* 2007; 46: 58-65
 - 28 McClain SL, Clippinger AJ, Lizzano R, Bouchard MJ. Hepatitis B virus replication is associated with an HBx-dependent mitochondrion-regulated increase in cytosolic calcium levels. *J Virol* 2007; 81: 12061-12065
 - 29 Zhang W, Cox AG, Taylor EW. Hepatitis C virus encodes a selenium-dependent glutathione peroxidase gene. Implications for oxidative stress as a risk factor in progression to hepatocellular carcinoma. *Med Klin (Munich)* 1999; 94 Suppl 3: 2-6
 - 30 Tkachev VD, Nilova TV, Shustova SG, Petrakov AV, Sil'vestrova Slu, Drozdov VN. [Interconnection in activity of lipid peroxidation reactions and functional status of the liver in patients with chronic hepatitis of viral etiology] *Eksp Klin Gastroenterol* 2002; 35-37, 112
 - 31 Waris G, Huh KW, Siddiqui A. Mitochondrially associated hepatitis B virus X protein constitutively activates transcription factors STAT-3 and NF-kappa B via oxidative stress. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 7721-7730
 - 32 Yu J, Hui AY, Chu ES, Cheng AS, Go MY, Chan HL, Leung WK, Cheung KF, Ching AK, Chui YL, Chan KK, Sung JJ. Expression of a cyclo-oxygenase-2 transgene in murine liver causes hepatitis. *Gut* 2007; 56: 991-999
 - 33 Ramadori G, Knittel T, Saile B. Fibrosis and altered matrix synthesis. *Digestion* 1998; 59: 372-375
 - 34 Wang H, Wei W, Wang NP, Gui SY, Wu L, Sun WY, Xu SY. Melatonin ameliorates carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats via inhibition of oxidative stress. *Life Sci* 2005; 77: 1902-1915
 - 35 Miyazaki T, Karube M, Matsuzaki Y, Ikegami T, Doy M, Tanaka N, Bouscarel B. Taurine inhibits oxidative damage and prevents fibrosis in carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis. *J Hepatol* 2005; 43: 117-125
 - 36 Zhen MC, Wang Q, Huang XH, Cao LQ, Chen XL, Sun K, Liu YJ, Li W, Zhang LJ. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits oxidative damage and preventive effects on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis. *J Nutr Biochem* 2007; 18: 795-805
 - 37 Starkel P, Sempoux C, Leclercq I, Herin M, Deby C, Desager JP, Horsmans Y. Oxidative stress, KLF6 and transforming growth factor-beta up-regulation differentiate non-alcoholic steatohepatitis progressing to fibrosis from uncomplicated steatosis in rats. *J Hepatol* 2003; 39: 538-546
 - 38 Isono M, Soda M, Inoue A, Akiyoshi H, Sato K. Reverse transformation of hepatic myofibroblast-

- like cells by TGFbeta1/LAP. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 311: 959-965
- 39 Zhang L, Wei W, Xu J, Min F, Wang L, Wang X, Cao S, Tan DX, Qi W, Reiter RJ. Inhibitory effect of melatonin on diquat-induced lipid peroxidation in vivo as assessed by the measurement of F2-isoprostanes. *J Pineal Res* 2006; 40: 326-331
- 40 Comporti M, Arezzini B, Signorini C, Sgherri C, Monaco B, Gardi C. F2-isoprostanes stimulate collagen synthesis in activated hepatic stellate cells: a link with liver fibrosis? *Lab Invest* 2005; 85: 1381-1391
- 41 Ferre N, Marsillach J, Camps J, Mackness B, Mackness M, Riu F, Coll B, Tous M, Joven J. Paraoxonase-1 is associated with oxidative stress, fibrosis and FAS expression in chronic liver diseases. *J Hepatol* 2006; 45: 51-59
- 42 Ghosh AK, Wei J, Wu M, Varga J. Constitutive Smad signaling and Smad-dependent collagen gene expression in mouse embryonic fibroblasts lacking peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 374: 231-236
- 43 Bendia E, Benedetti A, Baroni GS, Candelaresi C, Macarri G, Trozzi L, Di Sario A. Effect of cyanidin 3-O-beta-glucopyranoside on hepatic stellate cell proliferation and collagen synthesis induced by oxidative stress. *Dig Liver Dis* 2005; 37: 342-348
- 44 刘珊林, 刘冠中, 程建, 施冬云, 陈惠黎, 张亚东. 蛋白激酶对活性氧调节7721人肝癌细胞生长的影响. *生物化学与生物物理学报* 2002; 34: 67-72
- 45 李国平, 吴灵飞, 蒲泽锦. 氧化应激诱导HepG2肝癌细胞凋亡的研究. *中国病理生理杂志* 2008; 24: 105-111
- 46 张国强, 林贤龙, 陈正堂. 线粒体DNA缺失肝癌细胞内活性氧、线粒体膜电位变化实验研究. *第三军医大学学报* 2007; 29: 711-713
- 47 Liu DY, Peng ZH, Qiu GQ, Zhou CZ. Expression of telomerase activity and oxidative stress in human hepatocellular carcinoma with cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1859-1862
- 48 Sekoguchi S, Nakajima T, Moriguchi M, Jo M, Nishikawa T, Katagishi T, Kimura H, Minami M, Itoh Y, Kagawa K, Tani Y, Okanoue T. Role of cell-cycle turnover and oxidative stress in telomere shortening and cellular senescence in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 182-190

编辑 李军亮 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志数字用法标准

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 本刊论文中数字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1000-1500 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! (常务副总编辑: 张海宁 2008-10-18)

肠上皮屏障与炎症性肠病研究进展

何新颖, 唐志鹏, 张亚利

■背景资料

肠上皮屏障是肠黏膜的重要防线之一, 若受损则可引起肠上皮通透性增加, 在IBD发病过程中起重要作用. 目前研究重点侧重于肠上皮细胞和细胞间紧密连接结构和功能的改变

何新颖, 唐志鹏, 张亚利, 上海中医药大学附属龙华医院消化内科 上海中医药大学脾胃病研究所 上海市 200032
上海市教育委员会重点学科资金资助项目, No. J50305-6
作者贡献分布: 本文作者贡献分布均等, 由何新颖与张亚利搜集资料, 由何新颖撰写, 唐志鹏立题及审校.
通讯作者: 唐志鹏, 200032, 上海市, 上海中医药大学附属龙华医院消化内科. zhipengtang@sohu.com
电话: 021-64385700-3925
收稿日期: 2008-07-23 修回日期: 2008-09-15
接受日期: 2008-09-17 在线出版日期: 2008-10-18

Advance in enteric epithelial barrier and inflammatory bowel disease

Xin-Ying He, Zhi-Peng Tang, Ya-Li Zhang

Xin-Ying He, Zhi-Peng Tang, Ya-Li Zhang, Department of Gastroenterology, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine; Institute of Digestive Diseases of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China
Supported by: the Shanghai Leading Academic Discipline Project, No. J50305-6

Correspondence to: Zhi-Peng Tang, Department of Gastroenterology, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China. zhipengtang@sohu.com
Received: 2008-07-23 Revised: 2008-09-15
Accepted: 2008-09-17 Published online: 2008-10-18

Abstract

Enteric epithelial barrier injury is a new field of the study on the cellular and molecular pathogenesis of inflammatory bowel disease (IBD) in recent years. The enteric epithelial barrier is one of the most important line of defense. Once the enteric epithelial barrier, one of the most important defense line in intestinal mucosa, is damaged, the permeability of enteric epithelium will increase, which is significantly involved in the genesis of IBD. At present, most researches mainly concentrate on the changes of intestinal epithelial cells and the structure and function of intercellular tight junction. Maintenance and repair of enteric epithelial barrier may be the ideal strategy for IBD therapy.

Key Words: Enteric epithelial barrier; Inflammatory bowel disease; Apoptosis; Intercellular tight junction

He XY, Tang ZP, Zhang YL. Advance in enteric epithelial barrier and inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(29): 3316-3320

摘要

肠上皮屏障损伤是近年炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)细胞和分子发病机制研究的新领域. 肠上皮屏障是肠黏膜的重要防线之一, 若受损则可引起肠上皮通透性增加, 在IBD发病过程中起重要作用. 目前研究重点侧重于肠上皮细胞和细胞间紧密连接结构和功能的改变, 维持和修复肠上皮屏障可望成为治疗IBD的新策略.

关键词: 肠上皮屏障; 炎症性肠病; 细胞凋亡; 细胞间紧密连接

何新颖, 唐志鹏, 张亚利. 肠上皮屏障与炎症性肠病研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(29): 3316-3320
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3316.asp>

0 引言

近年来, 随着对炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis)和克罗恩病(Crohn's disease)研究的深入, 人们对IBD发病及治疗有了新的认识, 认为不论是肠道的原发性病变, 还是继发性损害, 均会造成肠上皮屏障结构和功能的损伤, 肠上皮屏障与IBD发病密切相关.

1 肠上皮屏障的结构组成

肠上皮屏障主要指肠黏膜上皮层的高度选择性屏障作用, 这种选择性可能与肠上皮通透性有关. 肠上皮的通透性有两个途径, 即跨上皮途径和细胞旁途径(紧密连接). 在跨上皮途径中, 肠黏膜上皮细胞允许营养物质从肠腔吸收进入循环, 同时限制对人体有害的物质(如内毒素和炎症因子)通过^[1-2]. 细胞旁通路是一组复杂的结构, 主要由上皮细胞之间的紧密连接控制. 细胞旁通路对大分子物质(如内毒素和细菌的其他产物)是否通过起到关键性调控作用^[3].

■同行评议者

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

2 肠上皮屏障损伤在IBD发病中的作用

许多研究表明, 跨上皮途径和细胞旁途径结构的改变, 使肠黏膜通透性增加, 即肠上皮屏障损伤参与了IBD的发病过程。

2.1 细胞骨架与IBD 肠上皮屏障结构和功能的完整性依赖健康上皮细胞和具有正常功能的细胞旁通路的存在, 而对于维持上皮细胞和细胞旁通路完整性必备的主要结构之一是细胞骨架(cytoskeleton)。细胞骨架是细胞内一种复杂的丝状蛋白结构, 包括三种蛋白丝: 肌动蛋白, 微管和中间丝。细胞骨架遍布于细胞质内, 并与细胞外表面的黏附连接等相联系^[4]。细胞骨架不仅对于细胞旁通路是必须的, 而且他对于维持包括胃肠道上皮细胞在内的所有真核细胞的正常结构、转运和功能的完整性也是不可或缺的。因此, 细胞骨架是维持肠上皮屏障功能的一个关键结构^[5]。

已经发现多种因素可以影响细胞骨架功能, 破坏肠上皮屏障的结构完整性^[4-5]。例如氧化剂^[6]或乙醇^[7-8]使微管破坏, 可以引起单层细胞屏障的破坏。Soderholm *et al*^[9]研究认为, 克罗恩病患者非炎症远端回肠的细胞间紧密连接在受到腔内抗原刺激后, 使其细胞骨架受损, 因此, 即使不存在活动性炎症或无紧密连接蛋白结构的受损, 其屏障功能也可能失调, 而且这些因素可能是通透性损伤的原发因素。肌动蛋白在肠道屏障完整性和调节肠道紧密连接中也发挥重要作用, 肠上皮屏障功能失调也与氧化剂诱导的肌动蛋白损害有关。Schwarz *et al*^[10]用小鼠和肠上皮单层细胞模型来评价与糖蛋白D竞争疱疹病毒进入T细胞的类淋巴毒素诱导蛋白(lymphotoxin-like inducible protein that competes with glycoprotein D for herpes virus entry on T cells)对肠黏膜屏障、细胞骨架作用及对紧密连接蛋白结构的影响, 结果显示淋巴毒素诱导蛋白通过破坏细胞骨架的肌动蛋白而影响肠上皮屏障作用。提示细胞骨架的改变可以增加发生IBD的几率。

2.2 肠上皮细胞凋亡与IBD 肠上皮细胞为单层柱状上皮细胞, 是抵抗细菌、病毒侵袭及食物抗原侵入的第一道防线, 维持其完整性至关重要。正常情况下, 肠上皮细胞每3-5天更新1次, 细胞凋亡参与该过程。如果肠上皮细胞的生理性增殖或凋亡发生改变, 炎症因子等就可通过跨上皮途径, 破坏肠上皮屏障功能。目前认为肠上皮细胞凋亡失调可能是IBD发生及发展的重

要原因之一。Iwamoto *et al*^[11]认为正常的结肠细胞凋亡主要发生在肠腔上皮细胞, 而活动期溃疡性结肠炎除肠腔上皮细胞外, 病变处及邻近的非病变处隐窝上皮细胞凋亡也增加, 由上皮细胞构成的屏障被破坏, 因而导致结肠黏膜的损伤。Strater *et al*^[12]研究认为, 导致这种大量细胞凋亡的发生是通过激活Fas/FasL信号转导途径介导的。Yukawa *et al*^[13]发现, 活动期溃疡性结肠炎患者血清sFas浓度显著低于缓解期患者及对照组, 活动期溃疡性结肠炎患者结肠黏膜上皮细胞凋亡数是对照组的32倍, 而FasL阳性淋巴细胞是对照组的2.8倍, 血清sFas与肠黏膜上皮细胞凋亡之间有着密切关系。Farrace *et al*认为随着结肠炎症程度加重, 结肠隐窝上皮细胞凋亡率随之增加, 并且FasR/FasL和P53的表达水平也升高^[14]。

许多研究表明, 炎症细胞因子, 如TNF- α 、IL-1 β 等可以增加体内、体外细胞凋亡^[15-16]。生长因子的缺乏、细菌毒素、氧自由基及肠道缺血/再灌注损伤大鼠均可发现肠黏膜上皮细胞凋亡增加, 同时伴有肠黏膜上皮屏障功能障碍, 而且通透性与凋亡指数呈正相关^[17]。Begue *et al*^[18]研究发现, 存在于炎症损伤病位中与凋亡相关的TNF- α 诱导的配体TRAIL, 是一种新的与肠上皮屏障功能稳定性相关的炎症调节因子, 其可促进在炎症回肠和结肠肠上皮细胞快速凋亡。另外, Ikeda *et al*^[19]发现, 大鼠小肠缺血再灌注早期肠上皮脱落细胞多为凋亡细胞, 并且认为上皮细胞与细胞基质连接的破坏可能是导致凋亡的主要原因。因此, 肠道黏膜上皮屏障功能受损可能与肠黏膜上皮的细胞凋亡失调有关, 进而导致IBD的发生。

2.3 细胞旁紧密连接与IBD 新近对IBD的研究更侧重于细胞旁紧密连接结构和功能的探索, 并认为其是导致IBD患者肠道高通透性的主要原因。构成肠上皮细胞间连接的蛋白主要有ZO-1、咬合蛋白(occludin)、钙黏蛋白(cadherin)、闭合蛋白(claudin)和 β -连环蛋白(β -catenin)等^[20-21]。正常情况下肠上皮细胞细胞旁间隙是由连接复合体(junctional complex)封闭的, 肠上皮细胞间连接复合体包括紧密连接(tight junction)、黏附连接(adhesion junction)、缝隙连接(gap junction)等, 其中紧密连接对于维持肠上皮屏障功能有重要作用^[22]。紧密连接存在于各类上皮细胞及血管内皮细胞间的顶端, 形成一个顶端闭锁结构发挥“屏障”和“防

■研发前沿

肠上皮屏障损伤是近年炎症性肠病细胞和分子发病机制研究的新领域, 维持和修复肠上皮屏障可望成为治疗IBD的新策略, 在此基础之上研发治疗IBD的有效药物前景广阔, 值得研究。

■相关报道

Willemsen *et al*认为IFN- γ 丝氨酸蛋白酶抑制剂能够通过改善断裂的claudin-2而扭转IFN- γ 破坏的肠黏膜上皮屏障。丝氨酸蛋白酶抑制剂可减轻IFN- γ 介导的肠黏膜屏障破坏, 可望成为一个重要的靶向治疗剂。

■创新盘点

从细胞和分子水平较全面的论述了肠上皮细胞和细胞间紧密连接在IBD发病中的作用。

御”功能,以控制细胞间的通透性和保持细胞的极性.紧密连接由多种紧密连接蛋白组成,包括跨膜蛋白如咬合蛋白、闭合蛋白、连接黏附分子(junction adhesion molecule)和胞质附着蛋白Zos、AF6、7H6等,在不同的组织结构中,各种紧密连接蛋白表达亦存在差异。

各种炎症因子及内毒素等可通过影响各种紧密连接蛋白的表达,使连接复合体遭到破坏,肠黏膜通透性增加. Gitter *et al*^[23]研究认为TNF- α 可以增加肠上皮细胞细胞旁的通透性,降低肠上皮细胞屏障的跨上皮电阻,并认为这是TNF- α 引起肠黏膜屏障通透性增高的主要原因. Willemsen *et al*^[24]研究IFN- γ 对闭合蛋白claudin-2表达的影响和肠上皮屏障功能之间的关系,发现IFN- γ 通过不同作用机制影响到闭合蛋白claudin-2和咬合蛋白的表达,破坏肠上皮屏障,进而导致IBD等的发生. Gassler *et al*^[25]观察到活动性IBD患者肠组织的连接蛋白(如E-钙黏蛋白和 α -链蛋白)及其mRNA表达增强,但非活动性IBD患者肠组织却无明显改变. IBD患者健康家属也有肠黏膜通透性的改变更支持这一观点, Hollander *et al*^[26]报道, IBD的一级亲属存在肠黏膜通透性的失调。

3 药物改善IBD肠上皮屏障功能

实通过保护肠上皮细胞骨架、修复上皮细胞及细胞间紧密连接而改善肠上皮屏障功能,是治疗IBD的新策略。

3.1 对细胞骨架的保护和治疗作用 抗氧化剂可保护氧化剂诱导的上皮细胞细胞骨架损伤^[27]. Chen *et al*发现葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium)诱导的小鼠结肠炎导致肌动蛋白骨架损伤,腺苷甲硫氨酸等抗氧化剂可修复细胞骨架保护小鼠肠黏膜^[28]. 对苯二酚衍生物(OPC-12759)和噻唑羧基酸衍生物(OPC-6535)处理后的复合物具有抗肌动蛋白氧化作用,通过对抗氧自由基保护肌动蛋白骨架和肠上皮屏障的完整性,成为治疗氧化损伤导致的炎症性肠病的新型药物^[29]。

3.2 对肠上皮细胞的修复作用 越来越多的研究发现,三叶肽(trefoil peptide)可以促进生长因子和细胞因子对上皮的修复作用. 临床研究显示,在克罗恩病溃疡部位附近的三叶肽产物浓度显著升高,三叶肽可在溃疡远、近端肠管附近修复上皮^[30-31]. 血红素加氧酶-1(heme oxygenase -1)是血红素转化为胆绿素、胆红素、铁和CO过程中的限速酶,具有潜在抗氧化损伤功能^[32]. Paul

et al^[33]研究发现,在葡聚糖硫酸钠诱导的鼠急性结肠炎活体实验中预先加入血红素加氧酶-1激动剂钴原卟啉(cobalt protoporphyrin),可显著改善结肠炎症,使结肠上皮细胞凋亡数目显著减少,但在葡聚糖硫酸钠诱导结肠炎起病后加入钴原卟啉,上述效应则不会产生. 这可能与血红素加氧酶-1不能逆转已进入凋亡程序中的细胞凋亡有关。

3.3 对细胞间紧密连接的作用 肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase)介导肌球蛋白轻链磷酸化,是改变细胞间紧密连接的重要途径之一^[34-39]. 更重要的是在IFN- γ 和TNF- α 诱导的肠上皮细胞模型中,通过抑制肌球蛋白轻链激酶可以调整肠道屏障功能紊乱. 因此肌球蛋白轻链激酶抑制剂在修复肠屏障功能、阻止疾病发展过程中提供了一个新的途径. 在许多体内外模型中证实了肌球蛋白轻链激酶抑制剂可能会成为将来治疗IBD的一种新方法^[34,40-41]. Willemsen *et al*^[24]认为IFN- γ 丝氨酸蛋白酶抑制剂AEBSF(4-(2-aminoethyl)- benzenesulphonyl fluoride)能够通过改善断裂的闭合蛋白claudin-2而扭转IFN- γ 破坏的肠黏膜上皮屏障. 丝氨酸蛋白酶抑制剂可减轻IFN- γ 介导的肠黏膜屏障破坏,可望成为一个重要的靶向治疗剂。

另外,中草药和一些中成药对肠上皮细胞及细胞间紧密连接也具有一定的保护作用^[42-43],而且副作用相对较小,值得去开发研究。

4 结论

肠上皮屏障是肠黏膜的重要防线之一,若受损则可引起肠上皮通透性增加,在IBD发病过程中起重要作用. 研究重点侧重于肠上皮细胞和细胞间紧密连接结构和功能的改变,维持和修复肠上皮屏障可望成为治疗IBD的新策略。

5 参考文献

- 1 Madara JL. Warner-Lambert/Parke-Davis Award lecture. Pathobiology of the intestinal epithelial barrier. *Am J Pathol* 1990; 137: 1273-1281
- 2 Barrett KE. New ways of thinking about (and teaching about) intestinal epithelial function. *Adv Physiol Educ* 2008; 32: 25-34
- 3 Turner JR. Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *Am J Pathol* 2006; 169: 1901-1909
- 4 Avila J. Microtubule functions. *Life Sci* 1992; 50: 327-334
- 5 Banan A, Smith GS, Rieckenberg CL, Kokoska ER, Miller TA. Protection against ethanol injury by prostaglandin in a human intestinal cell line: role of microtubules. *Am J Physiol* 1998; 274: G111-G121
- 6 Banan A, Choudhary S, Zhang Y, Fields JZ,

- Keshavarzian A. Oxidant-induced intestinal barrier disruption and its prevention by growth factors in a human colonic cell line: role of the microtubule cytoskeleton. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 727-738
- 7 Banan A, Choudhary S, Zhang Y, Fields JZ, Keshavarzian A. Ethanol-induced barrier dysfunction and its prevention by growth factors in human intestinal monolayers: evidence for oxidative and cytoskeletal mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 291: 1075-1085
- 8 Banan A, Fields JZ, Decker H, Zhang Y, Keshavarzian A. Nitric oxide and its metabolites mediate ethanol-induced microtubule disruption and intestinal barrier dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 294: 997-1008
- 9 Soderholm JD, Olaison G, Peterson KH, Franzén LE, Lindmark T, Wiren M, Tagesson C, Sjö Dahl R. Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut* 2002; 50: 307-313
- 10 Schwarz BT, Wang F, Shen L, Clayburgh DR, Su L, Wang Y, Fu YX, Turner JR. LIGHT signals directly to intestinal epithelia to cause barrier dysfunction via cytoskeletal and endocytic mechanisms. *Gastroenterology* 2007; 132: 2383-2394
- 11 Iwamoto M, Koji T, Makiyama K, Kobayashi N, Nakane PK. Apoptosis of crypt epithelial cells in ulcerative colitis. *J Pathol* 1996; 180: 152-159
- 12 Strater J, Wellisch I, Riedl S, Walczak H, Koretz K, Tandara A, Krammer PH, Möller P. CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis in colon epithelial cells: a possible role in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1997; 113: 160-167
- 13 Yukawa M, Iizuka M, Horie Y, Yoneyama K, Shirasaka T, Ito H, Komatsu M, Fukushima T, Watanabe S. Systemic and local evidence of increased Fas-mediated apoptosis in ulcerative colitis. *Int J Colorectal Dis* 2002; 17: 70-76
- 14 D'Argenio G, Farrace MG, Cosenza V, De Ritis F, Della Valle N, Manguso F, Piacentini M. Expression of apoptosis-related proteins in rat with induced colitis. *Int J Colorectal Dis* 2004; 19: 451-460
- 15 Denning TL, Takaishi H, Crowe SE, Boldogh I, Jevnikar A, Ernst PB. Oxidative stress induces the expression of Fas and Fas ligand and apoptosis in murine intestinal epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 1641-1650
- 16 Jones SA, Butler RN, Sanderson IR, Wilson JW. The effect of specific caspase inhibitors on TNF-alpha and butyrate-induced apoptosis of intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res* 2004; 292: 29-39
- 17 Kojima M, Iwakiri R, Wu B, Fujise T, Watanabe K, Lin T, Amemori S, Sakata H, Shimoda R, Oguzu T, Ootani A, Tsunada S, Fujimoto K. Effects of antioxidative agents on apoptosis induced by ischaemia-reperfusion in rat intestinal mucosa. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18 Suppl 1: 139-145
- 18 Begue B, Wajant H, Bambou JC, Dubuquoy L, Siegmund D, Beaulieu JF, Canioni D, Berrebi D, Brousse N, Desreumaux P, Schmitz J, Lentze MJ, Goulet O, Cerf-Bensussan N, Ruemmele FM. Implication of TNF-related apoptosis-inducing ligand in inflammatory intestinal epithelial lesions. *Gastroenterology* 2006; 130: 1962-1974
- 19 Ikeda H, Suzuki Y, Suzuki M, Koike M, Tamura J, Tong J, Nomura M, Itoh G. Apoptosis is a major mode of cell death caused by ischaemia and ischaemia/reperfusion injury to the rat intestinal epithelium. *Gut* 1998; 42: 530-537
- 20 González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 2003; 81: 1-44
- 21 Dublineau I, Lebrun F, Grison S, Griffiths NM. Functional and structural alterations of epithelial barrier properties of rat ileum following X-irradiation. *Can J Physiol Pharmacol* 2004; 82: 84-93
- 22 秦环龙, 高志光. 肠上皮细胞紧密连接在肠屏障中的作用研究进展. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 443-447
- 23 Gitter AH, Bendfeldt K, Schmitz H, Schulzke JD, Bentzel CJ, Fromm M. Epithelial barrier defects in HT-29/B6 colonic cell monolayers induced by tumor necrosis factor-alpha. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 915: 193-203
- 24 Willemsen LE, Hoetjes JP, van Deventer SJ, van Tol EA. Abrogation of IFN-gamma mediated epithelial barrier disruption by serine protease inhibition. *Clin Exp Immunol* 2005; 142: 275-284
- 25 Gassler N, Rohr C, Schneider A, Kartenbeck J, Bach A, Obermüller N, Otto HF, Autschbach F. Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G216-G228
- 26 Hollander D, Vadheim CM, Brettholz E, Petersen GM, Delahunty T, Rotter JI. Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Ann Intern Med* 1986; 105: 883-885
- 27 Porcelli AM, Ghelli A, Iommarini L, Mariani E, Hoque M, Zanna C, Gasparre G, Rugolo M. The antioxidant function of Bcl-2 preserves cytoskeletal stability of cells with defective respiratory complex I. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 2943-2951
- 28 Oz HS, Chen TS, McClain CJ, de Villiers WJ. Antioxidants as novel therapy in a murine model of colitis. *J Nutr Biochem* 2005; 16: 297-304
- 29 Banan A, Fitzpatrick L, Zhang Y, Keshavarzian A. OPC-compounds prevent oxidant-induced carbonylation and depolymerization of the F-actin cytoskeleton and intestinal barrier hyperpermeability. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 287-298
- 30 Grønbaek H, Vestergaard EM, Hey H, Nielsen JN, Nexø E. Serum trefoil factors in patients with inflammatory bowel disease. *Digestion* 2006; 74: 33-39
- 31 Poulosom R, Chinery R, Sarraf C, Van Noorden S, Stamp GW, Lalani EN, Elia G, Wright NA. Trefoil peptide gene expression in small intestinal Crohn's disease and dietary adaptation. *J Clin Gastroenterol* 1993; 17 Suppl 1: S78-S91
- 32 Oberle S, Schwartz P, Abate A, Schröder H. The antioxidant defense protein ferritin is a novel and specific target for pentaerithrityl tetranitrate in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 261: 28-34
- 33 Paul G, Bataille F, Obermeier F, Bock J, Klebl F, Strauch U, Lochbaum D, Rümmele P, Farkas S, Scholmerich J, Fleck M, Rogler G, Herfarth H. Analysis of intestinal haem-oxygenase-1 (HO-1) in clinical and experimental colitis. *Clin Exp Immunol* 2005; 140: 547-555
- 34 Zolotarevsky Y, Hecht G, Koutsouris A, Gonzalez DE, Quan C, Tom J, Mrsny RJ, Turner JR. A membrane-permeant peptide that inhibits MLC kinase restores barrier function in in vitro models of intestinal disease. *Gastroenterology* 2002; 123:

■应用要点

本文总结了近几年肠上皮屏障损伤导致炎症性肠病细胞和分子水平方面的进展, 从肠上皮细胞和细胞间紧密连接两方面进行论述, 并提出相应的治疗药物。

■同行评价

本文综述了肠上皮屏障及其功能受损与IBD的关系,不少内容涉及到细胞和分子水平,具有一定的理论意义和应用价值.

- 163-172
- 35 Scott KG, Meddings JB, Kirk DR, Lees-Miller SP, Buret AG. Intestinal infection with *Giardia* spp. reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinase-dependent fashion. *Gastroenterology* 2002; 123: 1179-1190
- 36 Ma TY, Hoa NT, Tran DD, Bui V, Pedram A, Mills S, Merryfield M. Cytochalasin B modulation of Caco-2 tight junction barrier: role of myosin light chain kinase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G875-G885
- 37 Turner JR, Rill BK, Carlson SL, Carnes D, Kerner R, Mrsny RJ, Madara JL. Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation. *Am J Physiol* 1997; 273: C1378-C1385
- 38 Berglund JJ, Riegler M, Zolotarevsky Y, Wenzl E, Turner JR. Regulation of human jejunal transmembrane resistance and MLC phosphorylation by Na(+)-glucose cotransport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G1487-G1493
- 39 Ferrier L, Mazelin L, Cenac N, Desreumaux P, Janin A, Emilie D, Colombel JF, Garcia-Villar R, Fioramonti J, Bueno L. Stress-induced disruption of colonic epithelial barrier: role of interferon-gamma and myosin light chain kinase in mice. *Gastroenterology* 2003; 125: 795-804
- 40 Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, Parkos CA, Madara JL, Hopkins AM, Nusrat A. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol* 2003; 171: 6164-6172
- 41 Wainwright MS, Rossi J, Schavocky J, Crawford S, Steinhorn D, Velentza AV, Zasadzki M, Shirinsky V, Jia Y, Haiech J, Van Eldik LJ, Watterson DM. Protein kinase involved in lung injury susceptibility: evidence from enzyme isoform genetic knockout and in vivo inhibitor treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 6233-6238
- 42 Miura N, Fukutake M, Yamamoto M, Ohtake N, Iizuka S, Imamura S, Tsuchiya N, Ishimatsu M, Nakamura Y, Ishige A, Watanabe K, Kase Y, Takeda S. An herbal medicine orengedokuto prevents indomethacin-induced enteropathy. *Biol Pharm Bull* 2007; 30: 495-501
- 43 Li H, Du Q, Wang WJ, Wang RJ, Wang JH, Liu SS. [Effect of kuijieling decoction on gene expression of TLR2, TLR4 in colonic mucosa of UC rats] *Zhong Yao Cai* 2007; 30: 56-59

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、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, T1/2不能写成t1/2或T_{1/2}, Vmax不能写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, °C), 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}, Vd, 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. (常务副总编辑: 张海宁 2008-10-18)

黄芪总苷对应激大鼠胃黏膜氧自由基及褪黑素受体的影响

李燕舞, 宋宁, 王汝俊

李燕舞, 王汝俊, 广州中医药大学脾胃研究所 广东省广州市 510405

宋宁, 河南中医学科学院 河南省郑州市 450008

作者贡献分布: 此课题由李燕舞及王汝俊设计; 研究过程中由李燕舞与宋宁操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由李燕舞提供; 数据分析由李燕舞与宋宁完成; 本论文写作由李燕舞完成。

广州中医药大学创新基金资助项目, No. 200607F31

通讯作者: 李燕舞, 510405, 广东省广州市机场路12号, 广州中医药大学脾胃研究所. lyw_7614@126.com

电话: 020-36585555

收稿日期: 2008-07-30 修回日期: 2008-09-04

接受日期: 2008-09-08 在线出版日期: 2008-10-18

Influence of astragaloside on gastric mucosal oxygen free radicals and melatonin receptors of rats with stress ulcer

Yan-Wu Li, Ning Song, Ru-Jun Wang

Yan-Wu Li, Ru-Jun Wang, the Spleen and Stomach Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Ning Song, Henan University of Traditional Chinese Medicine Zhengzhou 450008, Henan Province, China

Supported by: the Innovation Foundation of Guangzhou University of Chinese Medicine, No. 200607F31

Correspondence to: Yan-Wu Li, the Spleen and Stomach Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, 12 Jichang Road, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China. lyw_7614@126.com

Received: 2008-07-30 Revised: 2008-09-04

Accepted: 2008-09-08 Published online: 2008-10-18

Abstract

AIM: To investigate the effects of astragaloside (AST) on gene expression of melatonin receptor and oxygen free radical in gastric mucosa of rat with stress ulcer.

METHODS: A total of 48 experimental animals were equally divided into 4 groups: the control group, the model group, the AST group and the ranitidine group. The stress ulcer model was established using water immersion and restraint. The SOD activity, the MDA contents were determined using colorimetry, and the expression of melatonin receptors 1 and 2 were detected in gastric mucosa using RT-PCR.

RESULTS: Compared with the control group, the

model group showed increased ulcer index and elevated MDA contents, decreased SOD activity and down-regulated mRNA expression of melatonin receptors in damaged gastric mucosa. After administration of AST, the gastric mucosal ulcer index decreased significantly (6.75 ± 4.10 vs 16.83 ± 4.96 , $P < 0.01$) and MDA contents were relieved obviously (0.45 ± 0.07 vs 0.79 ± 0.36 , $P < 0.05$). The SOD activity (110.62 ± 26.42 vs 71.74 ± 22.20 , $P < 0.05$) and the expression of melatonin receptor1, 2 mRNA were significantly elevated (0.86 ± 0.12 vs 0.54 ± 0.05 , 0.79 ± 0.14 vs 0.50 ± 0.10 , both $P < 0.01$).

CONCLUSION: AST could prevent the gastric mucosal damage of rats with stress ulcer. And the mechanism of the gastric mucosal protection is perhaps concerned with regulating melatonin receptor and lessening the injury of oxygen free radicals.

Key Words: Astragaloside; Oxygen free radical; Melatonin receptor; Stress ulcer

Li YW, Song N, Wang RJ. Influence of astragaloside on gastric mucosal oxygen free radicals and melatonin receptors of rats with stress ulcer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(29): 3321-3323

摘要

目的: 探讨黄芪总苷对应激大鼠胃黏膜褪黑素受体基因表达及氧自由基变化的影响。

方法: SD大鼠48只分为4组, 即正常对照组, 模型组, 黄芪总苷组和雷尼替丁组, 每组12只。采用水浸-束缚应激模型, 观察胃黏膜损伤指数, 比色法检测胃黏膜SOD活性、MDA含量, RT-PCR法测定褪黑素受体1、2亚型mRNA表达变化。

结果: 与正常组比较, 模型组大鼠胃黏膜损伤指数明显增高, MDA含量增高, SOD活性下降, 褪黑素受体1、2基因表达降低, 黄芪总苷预防给药后可明显降低应激大鼠胃黏膜损伤指数 (6.75 ± 4.10 vs 16.83 ± 4.96 , $P < 0.01$) 和MDA含量 (0.45 ± 0.07 vs 0.79 ± 0.36 , $P < 0.05$), 升高SOD活性 (110.62 ± 26.42 vs 71.74 ± 22.20 , $P < 0.05$) 和褪黑素受体1、2基因表达 (0.86 ± 0.12 vs 0.54

■背景资料

国内外文献报道, 应用褪黑素(MT)对应激性胃黏膜损伤有保护作用, 中药黄芪及其有效成分黄芪总苷广泛应用于胃黏膜损伤相关疾病, 其作用机制是否与通过调节内源性MT及其受体相关, 尚未定论。

■同行评议者

许玲, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科

■研究前沿

褪黑素对胃肠道疾病的影响和在胃肠道中的作用被逐步认识,其在急性胃黏膜损害疾病中发挥的保护作用受到重视,中药对机体内源性MT调节的研究有助于新型抗胃黏膜损伤中药制剂的研发。

±0.05, 0.79±0.14 vs 0.50±0.10, 均 $P<0.01$).

结论: 黄芪总苷对水浸-束缚应激大鼠胃黏膜损伤有保护作用,其保护机制可能与调节胃黏膜褪黑素受体,并参与抗氧自由基损伤有关。

关键词: 黄芪总苷; 氧自由基; 褪黑素受体; 应激性溃疡

李燕舞, 宋宁, 王汝俊. 黄芪总苷对应激大鼠胃黏膜氧自由基及褪黑素受体的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(29): 3321-3323

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3321.asp>

0 引言

褪黑素(melatonin, MT)是一种神经内分泌激素,具有广泛的生理效应,并且参与机体许多疾病或损伤的保护反应. MT可直接清除和抑制氧自由基产生,还能增强内源性抗氧化酶的作用. 近年来, MT在胃肠道中的保护作用日益受到重视,大量研究表明: 外源性应用MT对各种实验性胃黏膜损伤有保护作用^[1-4]. 黄芪是益气健脾中药的代表,具有益气健脾、固表生肌的作用,广泛应用于胃肠道疾病,具有胃黏膜保护及抗氧化作用^[5]. 本文观察了黄芪总苷对应激大鼠急性胃黏膜损伤的保护作用,并从胃黏膜氧自由基及褪黑素受体的变化探讨其作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠48只, ♂, SPF级, 180-220 g, 购自广东省医学实验动物中心, 许可证号SCXK(粤)2003-0002. 黄芪总苷购自西安鸿生生物技术有限公司, 批号060614. TaKaRa RNAiso Reagent及合成引物购自宝生物工程有限公司, 逆转录试剂盒(Fermentas)购自晶美生物工程公司; 2×Taq Platinum PCR MasterMix(Tiangen)购自广州合达生物科技有限公司; SOD、MDA检测试剂盒购自南京建成生物有限公司. 6131紫外/可见光分光光度计(ependorf biophotometer); Kodak 1D Image成像系统; PTC-100 Peltier Thermal Cycler(MJ Research).

1.2 方法

1.2.1 动物模型及分组: 实验动物分为4组, 每组12只, 即正常对照组, 模型组, 黄芪总苷组和雷尼替丁组. 各组动物一半用于形态学检查, 其他用于胃黏膜MDA、SOD及MT受体基因检测. 黄芪总苷组预防性灌胃给药(20 mg/kg)3 d, 第3天末次给药后(包括阳性药雷尼替丁12.5 mg/kg), 采用水浸-束缚胃黏膜损伤模型^[6-8]. 大鼠禁食24

h后, 除正常对照组外, 将大鼠装入应激笼内, 垂直浸入19±1℃水浴中, 水面平胸骨剑突. 持续时间6 h, 处死动物, 取胃观察胃黏膜损伤的程度和形态(Guth法计算损伤分数). 冰冷生理盐水冲洗胃并迅速刮取胃黏膜, -80℃保存备用.

1.2.2 化学比色法检测大鼠胃黏膜SOD、MDA: 胃黏膜按重量加入生理盐水进行匀浆, 离心取上清, 按试剂盒步骤检测SOD、MDA含量.

1.2.3 RT-PCR测定胃黏膜MT受体1、2 mRNA表达: 胃黏膜总RNA提取参照RNAiso Reagent提取说明书进行. 提取产物经紫外分光光度计定量后应用RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit进行逆转录. 逆转录产物进行PCR反应, 引物由宝生物工程有限公司合成, MT受体1上游: 5'-GTG CTA CGT GTT CCT GAT ATG G-3', 下游: 5'-GGA TCT GAG GCC ACA ATA AGA C-3', 360 bp; MT受体2上游: 5'-ATC TGT CAC AGT GCG ACC TAC C-3', 下游: 5'-TTC TCT CAG CCT TTG CCT TC-3', 292 bp; GAPDH上游: 5'-CTA CCC ACG GCA AGT TCA AT-3', 下游: 5'-ACT GTG GTC ATG AGC CCT TC-3', 382 bp. MT受体1及MT受体2反应条件: 94℃ 1 min变性, 55℃ 1 min退火, 72℃ 2 min延伸, 40个循环. GAPDH反应条件: 94℃ 30 s变性, 55℃ 45 s退火, 72℃ 1 min延伸, 35个循环. PCR产物进行琼脂糖电泳, 经Kodak 1D Image成像系统分析, 以目的基因(MT受体1、2)与内参(GAPDH)光密度比值表示MT受体mRNA的相对表达量.

统计学处理 结果以mean±SD表示, 采用SPSS11.0软件进行组间比较, *t*检验分析结果.

2 结果

2.1 胃黏膜损伤指数观察 正常大鼠胃黏膜色泽红润, 未见损伤性改变. 模型组大鼠胃黏膜充血明显, 可见有散在点状及条索状出血性损伤, 胃腔内容物呈褐色. 经黄芪总苷预防治疗后, 胃黏膜损伤明显减轻, 胃黏膜损伤指数降低, 与模型组比较, 雷尼替丁组和黄芪总苷组损伤指数有显著统计学差异(3.17±2.32, 6.75±4.10 vs 16.83±4.96, $P<0.01$).

2.2 胃黏膜SOD、MDA含量变化 与正常对照组比较水浸-束缚应激模型大鼠胃黏膜SOD活力明显降低, MDA含量显著增高, 经黄芪总苷预防给药后SOD活力增高, 而MDA含量降低(表1).

2.3 胃黏膜褪黑素受体1、2(MT1、MT2)基因表达 大鼠胃黏膜有MT受体1、2基因表达; 水浸-束缚应激模型大鼠胃黏膜MT受体1、2表达较

■应用要点

黄芪总苷具有广泛的药理效应, 本研究发现其对应激胃黏膜损伤具有保护作用, 可调节胃黏膜氧自由基及褪黑素受体. 本研究对探讨中药的作用靶标及新型抗应激性胃黏膜损伤中药制剂的开发具有一定的意义.

表 1 胃黏膜SOD、MDA含量变化 (n = 6)

分组	SOD(U/mg prot)	MDA(nmol/mg prot)
正常对照组	201.99 ± 65.37	0.44 ± 0.05
模型对照组	71.74 ± 22.20 ^b	0.79 ± 0.36 ^a
黄芪总苷组	110.62 ± 26.42 ^c	0.45 ± 0.07 ^c
雷尼替丁组	128.99 ± 28.51 ^c	0.43 ± 0.08 ^c

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 正常组; ^cP<0.05 vs 模型组.

表 2 胃黏膜MT受体1、2 mRNA相对表达量的变化 (n = 6)

分组	MT1/GAPDH	MT2/GAPDH
正常对照组	0.56 ± 0.10	0.52 ± 0.16
模型对照组	0.54 ± 0.05	0.50 ± 0.10
黄芪总苷组	0.86 ± 0.12 ^a	0.79 ± 0.14 ^a
雷尼替丁组	0.73 ± 0.12 ^a	0.65 ± 0.11 ^b

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 模型组.

正常对照组略有降低, 而经黄芪总苷预防给药后, 应激大鼠胃黏膜MT受体1、2表达均有显著增高(表2).

3 讨论

应激性溃疡是各种应激情况下引起的以胃黏膜充血、水肿、糜烂和出血等为主的急性胃黏膜病变. 已有研究表明, 氧自由基的产生在应激性溃疡的病理过程中起重要作用^[9]. SOD及MDA是目前公认的较好反映体内自由基损伤的指标. 本研究发现, 水浸-束缚应激大鼠胃黏膜可见点状及条索状溃疡出现, 胃黏膜损伤指数明显增高, 同时SOD活性下降, MDA含量上升, 可见胃黏膜氧自由基产生增多和抗氧化酶的减少可能是胃黏膜损伤的重要因素. 而黄芪总苷预防给药后, 应激大鼠胃黏膜损伤明显减轻, SOD活性明显增高, MDA含量下降, 表明黄芪总苷对胃黏膜的保护作用可能与抗氧自由基损伤有关.

褪黑素是一种作用很强的内源性抗氧化剂, 除了能直接清除和抑制氧自由基产生外, 还能增强内源性抗氧化酶的作用^[10-11]. 研究表明, 外源性褪黑素对应激性胃黏膜损伤有保护作用, 其机制可能与增加胃黏膜血流、抗脂质过氧化作用及抑制胃酸分泌有关^[12-15]. 研究证明, 褪黑素受体为膜受体, 特异性与褪黑素结合产生生物效应. 褪黑素受体主要存在于中枢的下丘脑、垂体及外周的胸腺、胃肠道、肾等部位, 因此褪黑素对机体的调节是多层次的综合影响.

本研究通过观察胃黏膜褪黑素受体1、2亚型的变化, 分析黄芪总苷对应激状态下内源性褪黑素的影响及其机制, 结果发现: 应激状态下大鼠胃黏膜褪黑素受体1、2均有所下调, 推测可能是应激引起机体褪黑素代偿性增高, 从而抑制了其受体的表达, 但强烈的损伤因素(应激)超过了保护因素(褪黑素分泌), 导致胃黏膜损伤发生, 预防性给予黄芪总苷后, 褪黑素受体1、2表达均显著上调, 可能是黄芪总苷促进了褪黑素分泌或加强其与受体结合, 继而参与了抗氧自由基损伤的过程.

4 参考文献

- Kato K, Murai I, Asai S, Komuro S, Matsuno Y, Matsukawa Y, Kurosaka H, Iwasaki A, Ishikawa K, Arakawa Y. Central effect of melatonin against stress-induced gastric ulcers in rats. *Neuroreport* 1997; 8: 2305-2309
- Cabeza J, Motilva V, Martín MJ, de la Lastra CA. Mechanisms involved in gastric protection of melatonin against oxidant stress by ischemia-reperfusion in rats. *Life Sci* 2001; 68: 1405-1415
- Bilici D, Süleyman H, Banoğlu ZN, Kiziltunç A, Avci B, Ciftçioglu A, Bilici S. Melatonin prevents ethanol-induced gastric mucosal damage possibly due to its antioxidant effect. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 856-861
- Bandyopadhyay D, Bandyopadhyay A, Das PK, Reiter RJ. Melatonin protects against gastric ulceration and increases the efficacy of ranitidine and omeprazole in reducing gastric damage. *J Pineal Res* 2002; 33: 1-7
- 李维祖, 李卫平, 尹艳艳. 黄芪总苷及黄芪甲苷对糖皮质激素诱导衰老大鼠氧自由基代谢的影响. *中国中药杂志* 2007; 32: 2539-2542
- 沈德凯, 章复清, 韦多, 刘冰怀. 大鼠应激性胃溃疡的形成与中枢神经系统、胃和血浆中单胺类神经递质的关系. *中国危重病急救医学* 1997; 9: 394-399
- 笄红远. 应激性胃溃疡实验研究及中药防治作用研究进展. *中国临床药理学杂志* 2005; 21: 467-469
- 张玉玉, 祝文兴, 孙一耕, 艾洪滨. 大鼠束缚-浸水应激模型体温降低与应激性胃溃疡的关系. *生物医学工程研究* 2007; 26: 282-284
- Kwiecień S, Brzozowski T, Konturek SJ. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. *J Physiol Pharmacol* 2002; 53: 39-50
- 钟历勇. 松果体腺、褪黑素与抗应激作用. *国外医学·生理、病理科学与临床分册* 2003; 23: 522-525
- 吴建胜, 吴金明, 陈民新. 褪黑素与急性胃粘膜病变. *国外医学·消化系疾病分册* 2004; 24: 348-351
- 吴建胜, 吴金明, 黄智铭, 王旦, 黄庆科, 陈向荣, 林向飞, 陈民新, 韩清锡. 应激大鼠胃黏膜氧化应激指标受褪黑素影响的研究. *胃肠病学和肝病杂志* 2005; 14: 629-630
- 李开学, 邓联民, 陈碧玲, 刘新民. 褪黑素对大鼠应激性胃溃疡保护作用研究. *中国误诊学杂志* 2005; 5: 1219-1220
- 吴建胜, 吴金明, 黄庆科, 王旦, 林向飞, 黄智铭, 陈向荣, 陈民新, 韩清锡. 褪黑素对大鼠应激性胃黏膜损害的保护作用. *中华内科杂志* 2005; 44: 50-51
- 黄碧兰, 王秋桂, 余良主, 丁洁琼, 唐琼. 褪黑素对大鼠应激性胃粘膜损伤的保护作用及其机理. *咸宁学院学报(医学版)* 2006; 20: 288-290

■同行评价

本研究设计合理, 数据可信, 结论可靠, 具有一定的可读性.

TNF- α 抑制剂对重症急性胰腺炎细胞凋亡及Caspase-3表达的影响

纪涛, 汤志刚, 黄强, 许戈良, 陈炯, 李建生

■背景资料

重症急性胰腺炎(SAP)是消化外科急腹症死亡率最高的疾病之一, 其中炎症介质的级联释放在该疾病进展中的作用成为当前研究的热点. TNF- α 在机体的炎症反应中处于始动地位, 其抑制剂能诱导凋亡蛋白的表达, 凋亡细胞的增加能在一定程度上抑制炎症反应, 有关炎症介质与细胞凋亡的关系, 目前仍然处于起步阶段, TNF- α 水平对胰腺细胞凋亡影响实验结果也不尽相同.

纪涛, 汤志刚, 黄强, 许戈良, 陈炯, 李建生, 安徽医科大学附属医院普外科 安徽省合肥 230001

安徽省卫生厅基金资助项目, No. 05A004

作者贡献分布: 纪涛与汤志刚对此文所作贡献均等; 此课题由汤志刚, 黄强, 许戈良, 陈炯及李建生设计; 研究过程由纪涛, 汤志刚及黄强操作完成; 研究用新试剂及分析工具由许戈良, 陈炯及李建生提供; 数据分析由纪涛与汤志刚完成; 本论文写作由纪涛与汤志刚完成.

通讯作者: 汤志刚, 230001, 安徽省合肥市, 安徽医科大学附属医院普外科. tzg7031@163.com

电话: 0551-2283280

收稿日期: 2008-07-09 修回日期: 2008-09-09

接受日期: 2008-09-17 在线出版日期: 2008-10-18

Effects of tumor necrosis factor- α inhibitor on cell apoptosis and expression of Caspase-3 in rats with severe acute pancreatitis

Tao Ji, Zhi-Gang Tang, Qiang Huang, Ge-Liang Xu, Jiong Chen, Jian-Sheng Li

Tao Ji, Zhi-Gang Tang, Qiang Huang, Ge-Liang Xu, Jiong Chen, Jian-Sheng Li, Department of General Surgery, the Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001, Anhui Province, China

Supported by: Anhui Provincial Health Office Foundation, No. 05A004

Correspondence to: Zhi-Gang Tang, Department of General Surgery, the Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001, Anhui Province, China. tzg7031@163.com

Received: 2008-07-09 Revised: 2008-09-09

Accepted: 2008-09-17 Published online: 2008-10-18

Abstract

AIM: To investigate the relationship between the pancreatitis cell apoptosis, Caspase-3 expression and disease severity in severe acute pancreatitis (SAP) rats.

METHODS: Forty SD rats were randomly divided into SAP group treated with retrograde injection of sodium taurocholate ($n = 20$), and experimental group (intervention group, SAP animal model was developed, the recombinant human necrosis factor-alpha receptor II: IgG Fc fusion protein was injected, $n = 20$). Serum amylase and TNF- α were detected. And Caspase-3

expression was measured using immunohistochemistry. And the apoptosis of pancreatic cells were detected using TUNEL and the pathological score of pancreatic tissue was estimated.

RESULTS: Serum amylase, TNF- α and pathological scores of pancreatic tissues were lower (6868.80 ± 595.50 U/L vs 5434.20 ± 481.52 U/L, 258.46 ± 38.57 ng/L vs 182.00 ± 19.67 ng/L, 15.54 ± 2.30 vs 11.06 ± 1.09 , all $P < 0.05$), and the positive rate of Caspase-3 and the apoptotic index of pancreatic cells increased significantly in the intervention group than in the SAP group (20.06 ± 2.17 vs 28.52 ± 3.74 , 10.42 ± 1.27 vs 16.23 ± 2.43 , both $P < 0.05$).

CONCLUSION: Pancreatic cell apoptosis is associated with increased expression of the Caspase-3, improved the inflammatory response and lowered pancreatic tissue pathological score in rats with severe acute pancreatitis.

Key Words: Caspase-3; Severe acute pancreatitis; Apoptosis; Tumor necrosis factor- α

Ji T, Tang ZG, Huang Q, Xu GL, Chen J, Li JS. Effects of tumor necrosis factor- α inhibitor on cell apoptosis and expression of Caspase-3 in rats with severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(29): 3324-3327

摘要

目的: 研究重症急性胰腺炎(SAP)大鼠细胞凋亡、Caspase-3表达及其与疾病严重程度的关系。

方法: 40只SD大鼠随机分成对照组(SAP组, 胆管逆行性注射牛磺胆酸钠制备SAP模型, $n = 20$), 实验组(干预组, SAP模型制作成功后, 注射重组人II型肿瘤坏死因子受体-抗体融合蛋白, $n = 20$)。测定两组血清淀粉酶和TNF- α 含量, 采用免疫组化法分析Caspase-3的表达, 运用TUNEL技术检测胰腺细胞的凋亡, 并对胰腺组织进行病理学评分。

结果: 与SAP组比较, 干预组的血清淀粉酶、

■同行评议者

吕云福, 教授, 海南省人民医院外一科

TNF- α 、胰腺组织病理学评分较低(6868.80 \pm 595.50 U/L vs 5434.20 \pm 481.52 U/L, 258.46 \pm 38.57 ng/L vs 182.00 \pm 19.67 ng/L, 15.54 \pm 2.30 vs 11.06 \pm 1.09, 均 P <0.05), Caspase-3阳性率和胰腺细胞的凋亡指数显著升高(20.06 \pm 2.17 vs 28.52 \pm 3.74, 10.42 \pm 1.27 vs 16.23 \pm 2.43, 均 P <0.05)。

结论: SAP时胰腺细胞发生凋亡时伴随Caspase-3的高表达, 而炎症反应和胰腺组织病理学评分得到改善。

关键词: Caspase-3; 重症急性胰腺炎; 凋亡; 肿瘤坏死因子- α

纪涛, 汤志刚, 黄强, 许戈良, 陈炯, 李建生. TNF- α 抑制剂对重症急性胰腺炎细胞凋亡及Caspase-3表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(29): 3324-3327

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3324.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是一种病程凶险、病死率较高的疾病, 易并发多器官功能障碍, 其发病机制目前尚不清楚。有研究证实, 胰腺细胞的凋亡情况与SAP的预后关系密切^[1-8], 而Caspase-3是诱导细胞凋亡的重要蛋白之一。本研究旨在观察肿瘤坏死因子- α (TNF- α)抑制剂对SAP细胞凋亡及Caspase-3表达的影响及其与疾病严重程度的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级健康成年SD大鼠40只, 体质量250 \pm 25 g, 雌雄不拘, 由安徽医科大学实验动物中心提供。牛磺胆酸钠(Sigma公司), Caspase-3试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司), TNF- α ELISA试剂盒(晶美公司), TUNEL试剂盒(凯基生物科技发展有限公司), BeckmanCX9全自动生化分析仪, 重组人II型肿瘤坏死因子受体-抗体融合蛋白(上海中信国健药业有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组及SAP模型制备: 实验大鼠随机分为2组: SAP组($n = 20$), 干预组($n = 20$)。各组大鼠术前禁食24 h, 禁水6 h。20 g/L硫喷妥钠麻醉(50 mg/kg体质量)后, 上腹部正中切口进腹, 找到大鼠十二指肠和胆胰管后, 用无创血管夹夹闭胆胰管肝端, 经十二指肠浆膜层行胆胰管逆行穿刺, 微量注射器行胆胰管内注射50 g/L牛磺胆酸钠(1 mL/kg体质量), 速度0.2 mL/min, 推药后夹闭胆胰管入十二指肠处, 确认大鼠胃、十二指

肠间的胰腺组织出现异常, 颜色变为砖红色或出现出血点后拔出针头, 去除血管夹后关腹。干预组于在模型制作成功后sc重组人II型肿瘤坏死因子受体-抗体融合蛋白(0.25 mg/kg), 12 h后处死动物。

1.2.2 观察指标和方法: (1)血清淀粉酶和TNF- α 测定: 采血针器抽取下腔静脉血3 mL经3000 r/min离心10 min, 制备血清于-30 $^{\circ}$ C保存。经CX9全自动生化分析仪检测血清淀粉酶; 血清TNF- α 测定采用双抗夹心酶联免疫吸附(ELISA)法检测, 严格按照试剂盒说明书操作。(2)TUNEL法检测胰腺细胞凋亡: 石蜡组织切片常规脱蜡水化, 10 g/L蛋白酶K室温消化10 min, 40 g/L甲醛溶液固定5 min, Equilibration Buffer缓冲液室温平衡10 min, 加rTdT酶反应液于37 $^{\circ}$ C湿盒中反应60 min, 2 \times SSC中浸洗终止反应, 3 mL/L的H₂O₂浸洗5 min阻止内源性过氧化物, 1:500稀释的Streptavidin-HRP室温反应30 min, 加入新鲜配置的DAB显色10 min, 去离子水漂洗后苏木精复染, 封片镜检。有棕黄色颗粒者为阳性细胞, 即凋亡的胰腺腺泡细胞。每张切片染色阳性区域随机选取5个不同的高倍视野($\times 40$), 计算200个胰腺细胞中阳性细胞所占的百分比, 即为凋亡指数(apoptosis index, AI)。(3)免疫组化检测Caspase-3蛋白的表达: 采用SP两步法染色, 操作过程按照试剂盒说明书进行, DAB显色, 苏木素复染, 封片, 光镜下观察。含有棕黄色或棕黄色颗粒的细胞为阳性细胞。每张切片随机选取5个不同的高倍视野($\times 40$), 计数100个胰腺细胞, 计算阳性细胞所占的百分比即为Caspase-3的阳性率。(4)病理观察: 胰腺组织固定于40 g/L多聚甲醛溶液中(含0.1% DEPC), 常规脱水, 石蜡包埋、切片做苏木素-伊红染色, 由两位病理医师采用盲法按照Gross^[9]评分标准进行评分。

统计学处理 采用SPSS10.0统计分析软件进行处理, 所得数值以数据以mean \pm SD表示, 组间比较采用方差分析和 t 检验, P <0.05为具有统计学意义。

2 结果

2.1 SAP各项指标的检查结果 与SAP组比较, 干预组的血清淀粉酶、TNF- α 、胰腺组织的病理学评分较低(P <0.05), Caspase-3阳性率和胰腺细胞的凋亡指数显著升高(P <0.05, 表1, 图1)。

2.2 光镜下胰腺组织病理学改变 SAP组胰腺实质大片坏死、脂肪变性, 可见细胞核大量固

■研究前沿

近年的研究热点主要集中在通过平衡促炎症介质和抑炎症介质的平衡对SAP进行干预, 血液滤过炎症介质治疗SAP目前已经在临床上开展, 但是其种种弊端限制了在临床上的应用, 研究者希望能通过药物使用来达到这种效果。

■相关报道

近年来研究发现, TNF- α 抑制剂能诱导细胞程序性死亡, 而凋亡蛋白Caspase-3是胰腺B细胞凋亡途径的关键信号酶, 因此能有效的评价胰腺细胞的凋亡和对炎症反应的抑制情况。

应用要点

TNF- α 抑制剂能够诱导胰腺细胞的凋亡和抑制炎症反应,这为进一步研究其作用机制,研发新的抑制促炎症介质药物及该药物在炎症性疾病的临床应用奠定了实验基础。

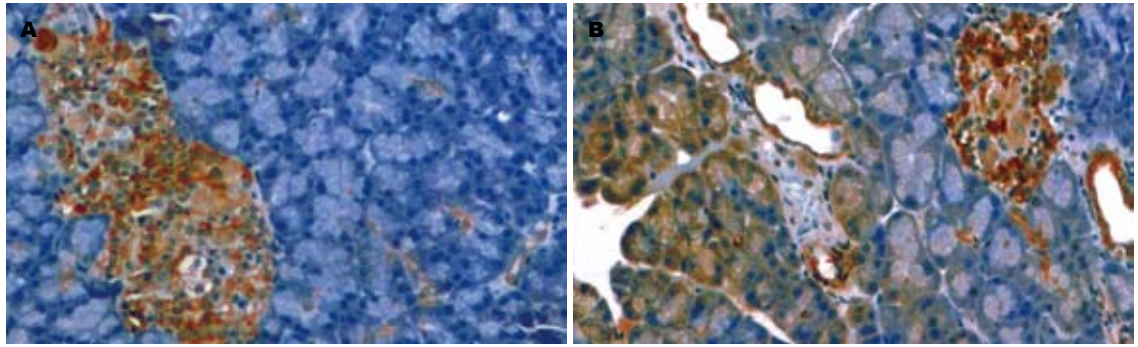


图1 各组胰腺组织Caspase-3的阳性表达(SP染色 $\times 100$)。A: SAP组; B: 干预组。

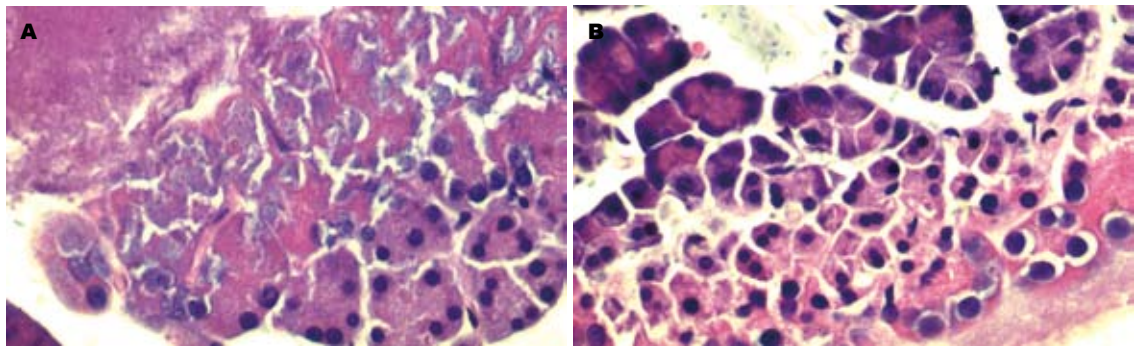


图2 大鼠胰腺组织病理变化(H&E $\times 400$)。A: SAP组; B: 干预组。

表1 各组血清学指标、Caspase-3阳性率、凋亡指数和病理学评分的结果比较 (mean \pm SD)

分组	淀粉酶(U/L)	TNF- α (ng/L)	Caspase-3阳性率(%)	AI(%)	病理学评分
SAP组	6868.80 \pm 595.50 ^a	258.46 \pm 38.57 ^a	20.06 \pm 2.17 ^a	10.42 \pm 1.27 ^a	15.54 \pm 2.30 ^a
干预组	5434.20 \pm 481.52	182.00 \pm 19.67	28.52 \pm 3.74	16.23 \pm 2.43	11.06 \pm 1.09

^a $P < 0.05$ vs 干预组。

缩、溶解,干预组胰腺间质明显水肿,炎症浸润,坏死程度较SAP组范围较小(图2,表1)。

3 讨论

急性胰腺炎除了伴有胰腺本身的损伤外,其另一重要的致命因素来自各种炎症介质的释放导致全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)和多器官功能障碍(multiple organ dysfunction syndrome, MODS),最终导致患者死亡^[10]。自凋亡的概念被提出后,人们对其进行了广泛深入的研究,发现凋亡参与了急性胰腺炎发生发展的全过程,同时发现胰腺细胞的凋亡对病程进展是一种有益的反应^[11-14]。研究发现,轻度急性胰腺炎胰腺腺泡细胞凋亡较多而坏死很少,急性坏死性胰腺炎腺泡细胞出现大量坏死,因而凋亡在急性胰腺炎发病中的意义与作用受到人们的重视,众多实验研究均支持这一观点,即病理条件下受损的

腺泡细胞发生凋亡可以减少因坏死释放的活性胰酶,减轻炎症介质的瀑布样级联释放,这可能是急性胰腺炎时机体的自我保护机制之一^[15]。本研究主要探讨TNF- α 抑制剂对SAP细胞凋亡及Caspase-3表达的影响及其与疾病严重程度的关系。

在SAP中,TNF- α 在机体的炎症反应中处于始动地位,对细胞因子的级联释放具有重要意义,起到“扳机”样作用,是评估SAP预后的主要指标^[16-18]。本研究通过抑制TNF- α ,发现干预组血清淀粉酶和TNF- α 水平均低于SAP组,胰腺间质水肿、炎症浸润、坏死程度均较SAP组小,可见抑制TNF- α 能在一定程度上抑制SAP的炎症反应,同时TNF- α 抑制剂诱导Caspase-3蛋白的表达,而Caspase-3蛋白酶是胰腺B细胞凋亡途径的关键信号酶^[19],抑制Caspase-3能减少细胞凋亡发生,其激活能够诱导凋亡并能够导致其他Caspase级联释放。Nam *et al*^[20]发现青蒿素能够

通过上调Caspase-3蛋白表达诱导细胞凋亡, 上调Caspase-3蛋白表达除了促进肿瘤细胞凋亡外, 对SAP胰腺细胞凋亡也具有促进作用, 且能明显改善炎症反应和组织病理学评分^[21]. 本研究证实抑制TNF- α 能够上调Caspase-3蛋白表达, 诱导细胞凋亡, 降低胰腺炎病理学评分, 改善急性胰腺炎预后.

4 参考文献

- 1 Knobbe CB, Trampe-Kieslich A, Reifemberger G. Genetic alteration and expression of the phosphoinositol-3-kinase/Akt pathway genes PIK3CA and PIKE in human glioblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2005; 31: 486-490
- 2 Gerasimenko JV, Gerasimenko OV, Palejwala A, Tepikin AV, Petersen OH, Watson AJ. Menadione-induced apoptosis: roles of cytosolic Ca(2+) elevations and the mitochondrial permeability transition pore. *J Cell Sci* 2002; 115: 485-497
- 3 Hahm KB, Kim JH, You BM, Kim YS, Cho SW, Yim H, Ahn BO, Kim WB. Induction of apoptosis with an extract of *Artemisia asiatica* attenuates the severity of cerulein-induced pancreatitis in rats. *Pancreas* 1998; 17: 153-157
- 4 Cosen-Binker LI, Binker MG, Cosen R, Negri G, Tiscornia O. Relaxin prevents the development of severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1558-1568
- 5 Lupia E, Goffi A, De Giuli P, Azzolino O, Bosco O, Patrucco E, Vivaldo MC, Ricca M, Wymann MP, Hirsch E, Montrucchio G, Emanuelli G. Ablation of phosphoinositide 3-kinase-gamma reduces the severity of acute pancreatitis. *Am J Pathol* 2004; 165: 2003-2011
- 6 Bhatia M. Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G189-G196
- 7 Bhatia M. Apoptosis of pancreatic acinar cells in acute pancreatitis: is it good or bad? *J Cell Mol Med* 2004; 8: 402-409
- 8 Bhatia M, Wong FL, Cao Y, Lau HY, Huang J, Puneet P, Chevali L. Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatol* 2005; 5: 132-144
- 9 Gross V, Andreesen R, Leser HG, Ceska M, Liehl E, Lausen M, Farthmann EH, Scholmerich J. Interleukin-8 and neutrophil activation in acute pancreatitis. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 200-203
- 10 Cuzzocrea S, Nocentini G, Di Paola R, Agostini M, Mazzon E, Ronchetti S, Crisafulli C, Esposito E, Caputi AP, Riccardi C. Proinflammatory role of glucocorticoid-induced TNF receptor-related gene in acute lung inflammation. *J Immunol* 2006; 177: 631-641
- 11 Yasuda T, Takeyama Y, Ueda T, Shinzeki M, Sawa H, Nakajima T, Kuroda Y. Breakdown of intestinal mucosa via accelerated apoptosis increases intestinal permeability in experimental severe acute pancreatitis. *J Surg Res* 2006; 135: 18-26
- 12 Bhatia M, Wallig MA, Hofbauer B, Lee HS, Frossard JL, Steer ML, Saluja AK. Induction of apoptosis in pancreatic acinar cells reduces the severity of acute pancreatitis. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246: 476-483
- 13 Saluja A, Hofbauer B, Yamaguchi Y, Yamanaka K, Steer M. Induction of apoptosis reduces the severity of caerulein-induced pancreatitis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 220: 875-878
- 14 Kaiser AM, Saluja AK, Lu L, Yamanaka K, Yamaguchi Y, Steer ML. Effects of cycloheximide on pancreatic endonuclease activity, apoptosis, and severity of acute pancreatitis. *Am J Physiol* 1996; 271: C982-C993
- 15 Takeyama Y. Significance of apoptotic cell death in systemic complications with severe acute pancreatitis. *J Gastroenterol* 2005; 40: 1-10
- 16 Gulcubuk A, Altunatmaz K, Sonmez K, Haktanir-Yatkin D, Uzun H, Gurel A, Aydin S. Effects of curcumin on tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 in the late phase of experimental acute pancreatitis. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2006; 53: 49-54
- 17 Andoh A, Hata K, Shimada M, Fujino S, Tasaki K, Bamba S, Araki Y, Fujiyama Y, Bamba T. Inhibitory effects of somatostatin on tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 secretion in human pancreatic periacinar myofibroblasts. *Int J Mol Med* 2002; 10: 89-93
- 18 Kusske AM, Rongione AJ, Reber HA. Cytokines and acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1996; 110: 639-642
- 19 Reddy S, Bradley J, Ginn S, Pathipati P, Ross JM. Immunohistochemical study of Caspase-3-expressing cells within the pancreas of non-obese diabetic mice during cyclophosphamide-accelerated diabetes. *Histochem Cell Biol* 2003; 119: 451-461
- 20 Nam W, Tak J, Ryu JK, Jung M, Yook JI, Kim HJ, Cha IH. Effects of artemisinin and its derivatives on growth inhibition and apoptosis of oral cancer cells. *Head Neck* 2007; 29: 335-340
- 21 Zhao M, Xue DB, Zheng B, Zhang WH, Pan SH, Sun B. Induction of apoptosis by artemisinin relieving the severity of inflammation in caerulein-induced acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5612-5617

■同行评价

本研究对照合理, 统计方法恰当, 具有一定学术价值, 但新颖性一般.

编辑 李军亮 电编 郭海丽

模拟失重对大鼠肠黏膜NF-κB表达的影响

李成林, 张铭, 周金莲, 崔彦, 余佩武

■背景资料

随着几十年来的载人航天实践的发展带来了相关科学研究的深入, 现已经发现失重对人体的各个生理系统都有明显的影响, 相关的研究集中在体液转移、心血管功能障碍、骨质丢失、肌肉萎缩、免疫功能下降、内分泌功能紊乱及空间运动病等多种生理和病理变化。而针对失重对胃肠道影响的研究甚少。

李成林, 余佩武, 中国人民解放军第三军医大学西南医院普通外科 重庆市 400038

李成林, 张铭, 周金莲, 崔彦, 中国人民解放军第306医院 北京市 100101

作者贡献分布: 李成林与余佩武对此文所作贡献均等; 此课题由李成林, 余佩武及崔彦设计; 研究过程由张铭, 周金莲及李成林操作完成; 数据分析由李成林完成; 本论文写作由李成林与余佩武完成。

通讯作者: 余佩武, 400038, 重庆市沙坪坝区高滩岩正街30号, 中国人民解放军第三军医大学西南医院普通外科。

yupeiwu01@vip.sina.com

电话: 023-68754661

收稿日期: 2008-08-25 修回日期: 2008-09-29

接受日期: 2008-10-01 在线出版日期: 2008-10-18

Effects of simulated gravity loss on nuclear factor kappa-B expression in rat intestinal tissues

Cheng-Lin Li, Ming Zhang, Jin-Lian Zhou, Yan Cui, Pei-Wu Yu

Cheng-Lin Li, Pei-Wu Yu, Department of General Surgery, Southwest Hospital of the Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400038, China

Cheng-Lin Li, Ming Zhang, Jin-Lian Zhou, Yan Cui, the 306th Hospital of Chinese PLA, Beijing 100101, China

Correspondence to: Pei-Wu Yu, Department of General Surgery, Southwest Hospital of the Third Military Medical University of Chinese, Chongqing 400038, China. yupeiwu01@vip.sina.com

Received: 2008-08-25 Revised: 2008-09-29

Accepted: 2008-10-01 Published online: 2008-10-18

Abstract

AIM: To investigate the effects of simulated gravity loss on NF-κB expression in rat intestinal tissues, and its significance.

METHODS: Tail-suspension (TS) was used to simulate the physiological effects of gravity loss. Eighty male Wistar rats were randomly assigned to 10 experimental groups suspended for 0.5, 1, 2, 7, 21 d respectively and their corresponding control groups. The dynamic expressions of NF-κB in intestinal tissues were separately measured using the immunohistochemistry.

RESULTS: Compared with control groups, the expression levels of NF-κB in the intestinal tissue of tail-suspension 0.5, 1, 2, 7, 21 d groups were

elevated significantly ($10.11\% \pm 3.29\%$ vs $5.50\% \pm 1.92\%$, $22.00\% \pm 5.31\%$ vs $6.50\% \pm 2.32\%$, $25.50\% \pm 4.11\%$ vs $8.75\% \pm 6.36\%$, $21.50\% \pm 3.02\%$ vs $6.75\% \pm 2.12\%$, $10.87\% \pm 2.64\%$ vs $5.62\% \pm 2.13\%$, all $P < 0.01$). NF-κB expression level began to rise in 0.5 tail-suspension group, and reached the maximum level in 2 d group, then went down gradually.

CONCLUSION: The results suggest that simulated gravity loss acts as a kind of stress to elevate NF-κB expression and indicate a close link between altered intestinal NF-κB expression and tolerance of gravity loss.

Key Words: Nuclear factor Kappa-B; Simulated weightlessness; Rats; Intestine; Immunohistochemistry

Li CL, Zhang M, Zhou JL, Cui Y, Yu PW. Effects of simulated gravity loss on nuclear factor kappa-B expression in rat intestinal tissues. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(29): 3328-3331

摘要

目的: 探讨模拟失重条件下健康大鼠肠道黏膜组织中核因子-κB(NF-κB)的表达变化及其意义。

方法: 成年Wistar大鼠80只, 随机分为10组, 按模拟失重时相分别为0.5、1、2、7、21 d和相应的对照组。采用尾悬吊法建立模拟失重动物模型。免疫组织化学法检测肠道黏膜组织中NF-κB的表达水平。

结果: 0.5、1、2、7、21 d模拟失重组大鼠肠道组织NF-κB表达水平均显著高于相应对照组($10.11\% \pm 3.29\%$ vs $5.50\% \pm 1.92\%$, $22.00\% \pm 5.31\%$ vs $6.50\% \pm 2.32\%$, $25.50\% \pm 4.11\%$ vs $8.75\% \pm 6.36\%$, $21.50\% \pm 3.02\%$ vs $6.75\% \pm 2.12\%$, $10.87\% \pm 2.64\%$ vs $5.62\% \pm 2.13\%$, 均 $P < 0.01$), 模拟失重0.5 d组肠道组织NF-κB表达开始升高, 2 d组达高峰, 随模拟失重时间的延长, NF-κB表达水平依次下降, 21 d组仍然高于相应对照组。

结论: 尾悬吊模拟失重大鼠肠道组织NF-κB表

■同行评议者

田晓峰, 教授, 大连医科大学附属第二医院; 王正康, 教授, 北京中日友好医院普外科

达水平明显上调, 提示肠道组织NF- κ B表达变化与失重应激反应和失重耐受有密切关系。

关键词: 核因子- κ B; 模拟失重; 大鼠; 肠黏膜; 免疫组织化学法

李成林, 张铭, 周金莲, 崔彦, 余佩武. 模拟失重大鼠肠黏膜NF- κ B表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(29): 3328-3331

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3328.asp>

0 引言

几十年来的载人航天实践及相关科学研究, 已经证明了失重对人体的各个生理系统都有明显的影响, 其中包括体液转移、心血管功能障碍、骨质丢失、肌肉萎缩、免疫功能下降、内分泌功能紊乱及空间运动病等多种生理和病理变化。但针对失重对胃肠道影响的研究甚少。有研究发现由失重而引起的体液变化可影响肠道的吸收和动力^[1], 同时, 失重作为一种应激可以引起多种细胞因子的增高。近年来研究发现NF- κ B是具有多向性调节作用的诱导型核转录因子, 广泛调控着自昆虫至人类的一系列基因的表达, 尤其是在与免疫反应、应激反应和炎症反应相关的基因表达上^[2]。本文观察了尾悬吊模拟失重大鼠肠黏膜组织NF- κ B的表达水平, 以期能进一步从分子水平认识模拟失重时肠道功能改变的发生机制。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级成年 δ Wistar大鼠80只, 体质量 300 ± 20 g, 由中国农业大学实验动物研究所提供。NF- κ B兔多克隆抗体购自博士德公司, 工作浓度1:150。PV-6001试剂盒购自中山公司。用PBS代替第一抗体作为空白对照实验。

1.2 方法

1.2.1 分组: δ Wistar大鼠80只按不同时相随机分为10组: 模拟失重0.5 d组、模拟失重1 d组、模拟失重2 d组、模拟失重7 d组、模拟失重21 d组和相应的地面对照组。每组8只。

1.2.2 动物模型与取材: 参照王承珉 *et al*的方法采用尾悬吊法建立模拟失重大鼠模型^[3-4]。大鼠单笼饲养, 实验组大鼠尾部悬于笼顶, 前肢踏于笼底。对照组大鼠置于相同鼠笼中, 自由活动。所有大鼠可自由进食、饮水。动物室温度保持在 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 每天灯光照明12 h与黑暗交替循环, 保持适当湿度及通风条件。在解除模拟失重的不同时相点即时宰杀, ip戊巴比妥钠(45 mg/kg)

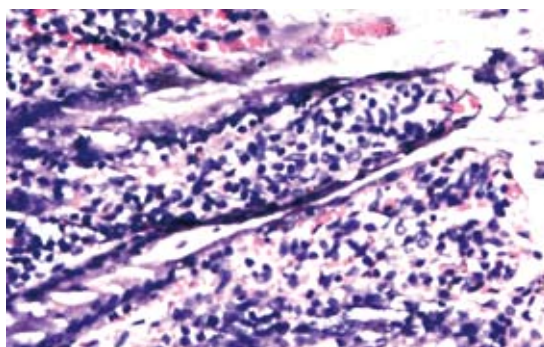


图1 模拟失重大鼠肠黏膜的HE染色。

将动物麻醉, 无菌操作, 经腹正中线剖腹, 打开腹腔取出距离盲肠5 cm的回肠组织, 40 g/L甲醛缓冲液固定。

1.2.3 常规病理检查: 固定的回肠组织常规脱水, 石蜡包埋, 切片(厚3 μm)贴在载玻片上, 常规HE染色行光镜病理。

1.2.4 免疫组织化学法检测NF- κ B表达: 常规切片, 脱蜡至水; 30 mL/L H_2O_2 室温10 min以阻断内源性过氧化物酶; PBS冲洗3 min \times 3次, 枸橼酸钠高压锅热修复2 min后自然冷却, PBS洗3 min \times 3次; 加入一抗NF- κ B于湿盒中4 $^\circ\text{C}$ 过夜; PBS洗3 min \times 3次, 加入辣根酶羊抗兔多聚体, 室温30 min; PBS洗3 min \times 3次; DAB溶液显色; 蒸馏水冲洗、苏木素复染、脱水、封片。阳性反应产物呈棕黄色颗粒状, 位于细胞核和胞质中。计数5个高倍视野($\times 400$)下的阳性细胞数, 分别计算阳性率, 阳性率 = 阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

统计学处理 采用STATA 7.0软件进行统计分析, 以 t 检验比较两组间差异。

2 结果

2.1 实验动物情况 本研究各组动物在实验期间无死亡, 没有意外退出实验情况。在尾悬吊开始至悬吊24 h期间, 大鼠焦躁不安, 转而精神较差, 饮食量减少, 活动减弱, 24-48 h后逐渐适应而恢复稳定状态。

2.2 HE光镜病理检测结果 结果分析显示, 各模拟失重组回肠黏膜组织只有充血及部分轻度水肿, 无明显其他病理变化, 各组间无明显差异(图1)。

2.3 NF- κ B检测结果 NF- κ B阳性产物主要集中在肠巨噬细胞、血管内皮细胞、黏膜上皮细胞等的细胞质与细胞核中(图2)。各对照组大鼠中有零星阳性表达。结果显示, 0.5 d模拟失重组阳性率较对照组开始升高, 1、2、7 d模拟失重组阳

■ 研发前沿

Rivera *et al*的研究发现, 模拟失重情况下, 大鼠门静脉内毒素的水平增高, 说明在失重条件下, 肠道黏膜的通透性发生了改变。同时他们发现血清中的TNF- α 升高, 说明存在着炎症因子的过度表达, 本文测定肠道黏膜的NF- κ B表达, 试图揭示可能的关联。

■ 相关报道

Gandia *et al*发现失重时胃肠道血流增加, 动力减慢。消化道发生运动减少, 分泌活动和黏膜形态功能改变, 失重时肠蠕动减弱, 结肠通过时间延长。白树民 *et al*发现悬吊3 wk后, SD大鼠肠道出现了肿胀细胞, 上皮细胞绒毛排列紊乱、稀疏, 并且发现肠道菌群发生了变化。李天志 *et al*的实验发现, 模拟失重大鼠肺组织NF- κ B和ICAM-1的表达水平明显上调, 考虑与肺组织损伤有关。

■应用要点

NF- κ B的检测为今后的失重时白细胞介素-8, iNOS, 细胞间黏附分子-1等损伤方面的检测提供参考, 通过一系列的研究以期了解炎症因素在模拟失重时的肠道损伤的相关性.

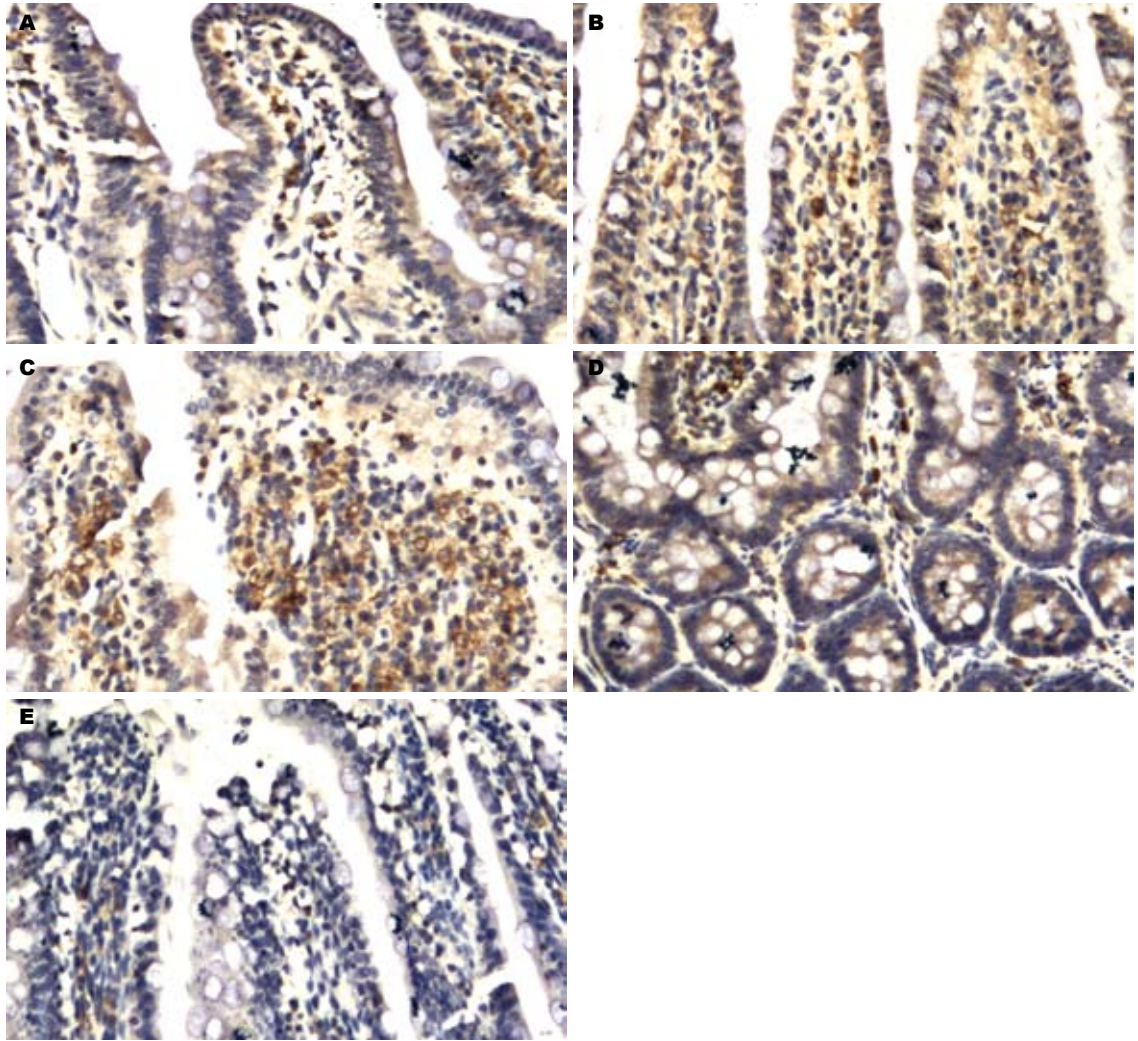


图 2 模拟失重条件下NF- κ B表达. A: 模拟失重0.5 d; B: 模拟失重1 d; C: 模拟失重2 d; D: 模拟失重7 d; E: 模拟失重21 d.

表 1 各组回肠黏膜组织NF- κ B免疫组化结果 (mean \pm SD, %)

分组	0.5 d	1 d	2 d	7 d	21 d
对照组	5.50 \pm 1.92	6.50 \pm 2.32	8.75 \pm 6.36	6.75 \pm 2.12	5.62 \pm 2.13
模拟失重组	10.11 \pm 3.29 ^b	22.00 \pm 5.31 ^b	25.50 \pm 4.11 ^b	21.50 \pm 3.02 ^b	10.87 \pm 2.64 ^b

^b $P < 0.01$ vs 相应对照组.

性率明显高于对照组, 随着模拟失重时间的延长, NF- κ B表达水平呈明显下降趋势. 21 d模拟失重组的阳性表达仍高于对照组(表1).

3 讨论

在失重条件下, 胃肠道血流增加, 动力减慢. 消化道发生运动减少, 分泌活动和黏膜形态功能改变, 肠蠕动减弱, 结肠通过时间延长^[1,6-7]. 白树民 *et al*^[5]发现悬吊3 wk后, SD大鼠肠道出现了肿胀细胞, 上皮细胞绒毛排列紊乱、稀疏. Rivera *et al*^[8]的研究发现, 模拟失重情况下, 大鼠门静脉

血内毒素的水平增高. 说明在失重条件下, 肠道黏膜的通透性发生了改变. 他们还发现, 失重时, 大鼠血液的TNF- α 增高, 提示体内存在着炎症因子的失衡. 在非失重时, 某些病理因素可引起局部细胞因子网络失衡及某些细胞因子、黏附分子的过度表达, 从而引起白细胞介导的组织损伤. 现已发现, 功能性NF- κ B结合序列广泛存在于细胞因子、黏附分子如白细胞介素-8, TNF- α , iNOS, 细胞间黏附分子-1等的启动子和增强子中, NF- κ B活化导致了上述基因的表达. 在肠道的缺血再灌注、炎症疾病及多器官功能障碍的

肠道功能损伤中, NF- κ B通过激活细胞因子级联反应、生成促炎介质及抑制炎症细胞凋亡起重要作用^[9-13]. Banan *et al*^[14]证明NF- κ B的激活在由酒精引起的肠道黏膜屏障完整性损害方面发挥作用. Gadjeva *et al*^[15]发现NF- κ B在急性炎症时的肠道稳定性方面起重要作用. Sharma *et al*^[16]的实验表明模拟失重可引起NF- κ B在睾丸的高表达.

本实验采用免疫组织化学方法检测发现, 尾悬吊0.5、1、2、7、21 d后大鼠回肠黏膜组织中NF- κ B蛋白表达水平较对照组明显增强, 说明模拟失重条件下, 因肠道血液分布改变, 体液转移, 肠道血液的滞留, 这一系列变化可能引起了大鼠肠道血管充血和水肿, 静脉和毛细血管充盈度增加, 伴有炎症细胞浸润, 导致细胞因子过度表达. 故本实验可证实尾悬吊模拟失重可造成大鼠肠道黏膜的急性变化, 且以模拟失重初期(7 d内)为甚, 而随着尾悬吊时间延长到21 d, 肠道组织中NF- κ B的蛋白表达有所减弱, 推测尾悬吊模拟失重大鼠肠道黏膜的改变可能为可逆性的, 或是机体通过自身调节逐渐适应了模拟失重环境. 如果悬吊时间继续延长, 肠道组织中NF- κ B蛋白表达水平能否降至正常或是进一步加剧肠道损伤尚有待深入研究.

本实验的光镜结果显示: 大鼠回肠只表现为血管的充血. 无明显的其他病理变化. 说明失重对肠道的影响较之对心脏、肺及肌肉等的影响小.

本研究表明尾悬吊模拟失重大鼠存在肠道急性变化并同时伴有NF- κ B表达增强, 为进一步深入研究细胞因子在失重条件下引起胃肠道改变的可能机制提供了实验基础.

4 参考文献

- 1 Amidon GL, DeBrincat GA, Najib N. Effects of gravity on gastric emptying, intestinal transit, and drug absorption. *J Clin Pharmacol* 1991; 31: 968-973
- 2 Li C, Browder W, Kao RL. Early activation of transcription factor NF-kappaB during ischemia in perfused rat heart. *Am J Physiol* 1999; 276: H543-H552
- 3 王承珉, 张汝果, 付宏伟. 尾悬吊模拟失重大鼠肺脏

- 4 的影响. *航天医学与医学工程* 1995; 8: 239
- 5 陈杰, 马进, 丁兆平, 张立藩. 一种模拟长期失重影响的大鼠尾部悬吊模型. *空间科学学报* 1993; 13: 159-162
- 6 白树民, 黄纪明, 朱德兵, 李志霞, 洪建武, 周熙成, 梁明, 熊德鑫. 模拟失重大鼠肠道菌群影响的研究. *中国微生态学杂志* 2001; 13: 326-327
- 7 Gandia P, Saivin S, Lavit M, Houin G. Influence of simulated weightlessness on the pharmacokinetics of acetaminophen administered by the oral route: a study in the rat. *Fundam Clin Pharmacol* 2004; 18: 57-64
- 8 Gandia P, Bareille MP, Saivin S, Le-Traon AP, Lavit M, Guell A, Houin G. Influence of simulated weightlessness on the oral pharmacokinetics of acetaminophen as a gastric emptying probe in man: a plasma and a saliva study. *J Clin Pharmacol* 2003; 43: 1235-1243
- 9 Rivera CA, Tchamrtchi MH, Mendoza L, Smith CW. Endotoxemia and hepatic injury in a rodent model of hindlimb unloading. *J Appl Physiol* 2003; 95: 1656-1663
- 10 Nichols TC. NF-kappaB and reperfusion injury. *Drug News Perspect* 2004; 17: 99-104
- 11 Mallick IH, Yang WX, Winslet MC, Seifalian AM. Pyrrolidine dithiocarbamate reduces ischemia-reperfusion injury of the small intestine. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7308-7313
- 12 Zhang XP, Zhang L, Chen LJ, Cheng QH, Wang JM, Cai W, Shen HP, Cai J. Influence of dexamethasone on inflammatory mediators and NF-kappaB expression in multiple organs of rats with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 548-556
- 13 Suzuki T, Yamashita K, Jomen W, Ueki S, Aoyagi T, Fukai M, Furukawa H, Umezawa K, Ozaki M, Todo S. The novel NF-kappaB inhibitor, dehydroxymethyl lepoxyquinomicin, prevents local and remote organ injury following intestinal ischemia/reperfusion in rats. *J Surg Res* 2008; 149: 69-75
- 14 Schmidt C, Höcherl K, Kurt B, Bucher M. Role of nuclear factor-kappaB-dependent induction of cytokines in the regulation of vasopressin V1A-receptors during cecal ligation and puncture-induced circulatory failure. *Crit Care Med* 2008; 36: 2363-2372
- 15 Banan A, Keshavarzian A, Zhang L, Shaikh M, Forsyth CB, Tang Y, Fields JZ. NF-kappaB activation as a key mechanism in ethanol-induced disruption of the F-actin cytoskeleton and monolayer barrier integrity in intestinal epithelium. *Alcohol* 2007; 41: 447-460
- 16 Gadjeva M, Wang Y, Horwitz BH. NF-kappaB p50 and p65 subunits control intestinal homeostasis. *Eur J Immunol* 2007; 37: 2509-2517
- 17 Sharma CS, Sarkar S, Periyakaruppan A, Ravichandran P, Sadanandan B, Ramesh V, Thomas R, Hall JC, Wilson BL, Ramesh GT. Simulated microgravity activates apoptosis and NF-kappaB in mice testis. *Mol Cell Biochem* 2008; 313: 71-78

■同行评价

本研究结果可信, 结论可靠, 学术价值尚可, 建议作进一步深入探讨.

编辑 李军亮 电编 何基才

内镜检查对原发性胃恶性淋巴瘤诊断意义

谭东毅, 张国梁, 邹江, 布利民

■背景资料

原发性胃恶性淋巴瘤, 是除胃癌外胃内发病率最多的胃部恶性肿瘤, 该病发病隐匿, 容易误诊。本病预后较胃癌好, 对放疗化疗敏感, 对于无并发症的患者无需手术治疗, 因此该病早期诊断, 对治疗及预后起着重要作用。

谭东毅, 张国梁, 邹江, 布利民, 天津市第一中心医院消化内科 天津市 300192

作者贡献分布: 此课题由谭东毅与张国梁设计; 临床胃镜检查由谭东毅, 张国梁及邹江操作完成; 数据分析由谭东毅与布利民完成; 本论文写作由谭东毅与邹江完成。

通讯作者: 谭东毅, 300192, 天津市, 天津市第一中心医院消化内科。tdy058@126.com

电话: 022-23626817

收稿日期: 2008-07-08 修回日期: 2008-09-11

接受日期: 2008-09-17 在线出版日期: 2008-10-18

Diagnostic significance of endoscopy for primary gastric malignant lymphoma

Dong-Yi Tan, Guo-Liang Zhang, Jiang Zhou, Li-Min Bu

Dong-Yi Tan, Guo-Liang Zhang, Jiang Zhou, Li-Min Bu, Department of Gastroenterology, First Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300192, China

Correspondence to: Dong-Yi Tan, Department of Gastroenterology, First Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300192, China. tdy058@126.com

Received: 2008-07-08 Revised: 2008-09-11

Accepted: 2008-09-17 Published online: 2008-10-18

Abstract

AIM: To investigate endoscopic features as well as pathological characteristics of primary gastric malignant lymphoma (PGML).

METHODS: A total of 34 histopathologically-confirmed PGML cases were analyzed from January 2004 to March 2008 in our hospital. All the patients underwent electronic gastroscopy, parallel mucosa biopsy examination and immunohistochemistry for detection of CD3, CD20, CD45 and CK. HE staining was performed and positive results were interpreted as *H pylori* infection.

RESULTS: The tumor originated from corpus (44.1%) and antrum (29.4%). Results showed that 61.8% of the patients involved more than 2 lesions. The 61.8% of the tumor patients appeared ulcerative, among which multiple ulcer was 66.7%, infiltrating type was 26.5%, and protrusive erosion was 11.8%. Immunohistochemistry showed B-cell lymphoma in every case, and *H pylori* infection was found in 82.4%.

■同行评议者

唐丽安, 教授, 湖南省长沙市湘雅路中南大学湘雅医院消化内科

CONCLUSION: Wide use of endoscopy and correctness of biopsy make it important in the diagnosis of primary gastric malignant lymphoma.

Key Words: Primary gastric malignant lymphoma; Endoscopy; Diagnosis

Tan DY, Zhang GL, Zhou J, Bu LM. Diagnostic significance of endoscopy for primary gastric malignant lymphoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(29): 3332-3334

摘要

目的: 分析原发性胃恶性淋巴瘤内镜下表现特征及其病理学特点。

方法: 我院2004-01/2008-03住院PGML患者34例, 所有患者经病理组织学证实, 患者均行电子胃镜检查, 并行黏膜活检病理检查, 同时行免疫组织化学染色检测CD3、CD20、CD45和CK等标志物, 并行病理组织HE染色, 阳性即判为有*H pylori*感染。

结果: 内镜检查34例患者, 病变主要在胃体(44.1%)和胃窦(29.4%), 其中累及2个及其以上病变部位占61.8%, 单一部位相对较少; 形态表现多为溃疡型(61.8%), 主要是多发性溃疡(66.7%), 弥散浸润型(26.5%), 隆起糜烂型(11.8%)。病理结果均为B细胞非霍奇金淋巴瘤, 4例(11.8%)为大B细胞性淋巴瘤, 为高度恶性胃淋巴瘤, 30例(88.2%)为低度恶性淋巴瘤; 幽门螺杆菌(*H pylori*)感染率为占82.4%。

结论: 内镜检查的广泛应用及活检的充分和准确, 对于PGML具有重要的确诊意义。

关键词: 原发性胃恶性淋巴瘤; 内镜检查; 诊断

谭东毅, 张国梁, 邹江, 布利民. 内镜检查对原发性胃恶性淋巴瘤诊断意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16(29): 3332-3334
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3332.asp>

0 引言

原发性胃恶性淋巴瘤(primary gastric malignant lymphoma, PGML)是除胃癌外胃内发病率最多

的胃部恶性肿瘤, 绝大多数为胃黏膜相关淋巴组织(mucosa associated lymphoid tissue, MALT)淋巴瘤, 该病发病隐匿, 由于没有特征性临床表现, 容易误诊^[1]. 本病预后较胃癌好, 对放疗化疗敏感, 其中MALT淋巴瘤单纯抗幽门螺旋杆菌治疗也可缓解^[2]. 对于无穿孔、梗阻等并发症的患者无需手术治疗, 因此该病的诊断显得尤为重要^[3]. 本文总结我院34例PGML内镜及病理特点, 旨在探讨其在PGML上的诊断价值, 提高诊断率.

1 材料和方法

1.1 材料 我院2004-01/2008-03住院PGML患者34例, 男21例, 女13例, 年龄44-76(平均56±14.72)岁. 所有患者经病理组织学证实, 并均符合Dawason的诊断标准^[4]: (1)全身浅表淋巴结无肿大; (2)周血白细胞计数及分类正常; (3)X线检查, 无纵隔淋巴结肿大; (4)病变仅限于胃及局部淋巴结; (5)肝脾正常.

1.2 方法 34例患者行电子胃镜检查, 均到达十二指肠降部, 并行黏膜活检病理检查, 黏膜活检均在病变部位多点取标本6块, 病理分型参照WHO的B细胞及T细胞淋巴瘤分类标准^[5], 同时行免疫组织化学染色检测CD3、CD20、CD45和CK等标志物, 并行病理组织HE染色, 阳性即判为有*H pylori*感染.

2 结果

2.1 病变部位 内镜检查胃底病变3例, 占8.8%; 胃体病变15例, 占44.1%; 胃角病变15例, 占17.6%; 胃窦病变10例, 占29.4%; 十二指肠球部病变4例, 占11.8%; 十二指肠降部病变2例, 占5.9%. 其中单一部位受累共13例, 占38.2%; 累及2个及以上病变部位共21例, 占61.8%.

2.2 内镜表现 溃疡型21例, 占61.8%, 其中多发性溃疡14例, 占66.7%, 溃疡之间边界清晰, 互不融合; 弥漫浸润型9例, 占26.5%, 病灶范围广, 累及部位多, 病灶境界多不清, 底部多有不规则糜烂、出血、污秽; 隆起糜烂型4例, 占11.8%, 可发生在胃的任何部位, 多呈孤立隆起病灶, 基底较广约2.0-5.0 cm, 隆起表面、顶端有糜烂或浅小溃疡可出血, 质地较息肉硬, 周边皱襞增粗等改变^[5]. 同一患者不同部位病变情况, 两处病变相对独立, 互不融合(图1).

2.3 病理特点 所有病例经病理学检查确诊均为非霍奇金淋巴瘤. 镜下黏膜组织中可见反应性淋巴滤泡结构, 瘤细胞中等大小, 核不规则, 呈

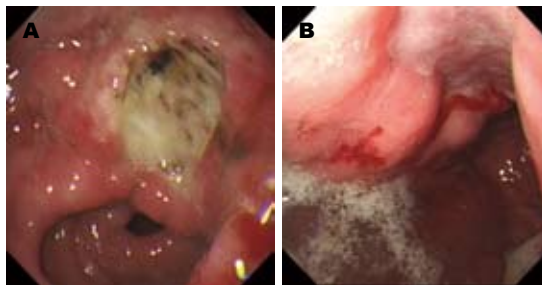


图1 同一患者不同部位病变. A: 胃窦小弯侧溃疡; B: 胃体小弯侧溃疡.

三角形或不规则圆形, 浸润至腺体上皮组织中, 破坏腺上皮或嗜酸性变, 有时可见肿瘤细胞向浆细胞分化倾向, 尚可见反应性淋巴滤泡, 胞质浅染或透明^[6]. 免疫组织化学检查, 瘤细胞标记物CD45及B细胞标记物CD20阳性, 瘤细胞间伴有散在CD3阳性, CK为阴性, 据此诊断为B细胞淋巴瘤. 本组中4例(11.8%)为大B细胞性淋巴瘤, 为高度恶性胃淋巴瘤, 30例(88.2%)为低度恶性淋巴瘤. 病理组织HE染色阳性, 即为有*H pylori*感染者28例, 占82.4%.

3 讨论

恶性淋巴瘤是起源于淋巴结或结外淋巴组织瘤, 临床特点是常见为无痛性进行性淋巴结肿大, 好发于颈部、腋窝、滑车, 其次就是咽淋巴结及胃肠道. PGML没有特征性临床表现, 其主要症状为上腹部不适、腹胀、恶心、呕吐, 部分病例表现为上消化道出血、穿孔或幽门梗阻等, 与胃癌相比, PGML食欲减退, 消瘦少见, 一般情况较好^[7-8]. 部分晚期患者可于上腹部扪及肿块. 有证据表明, *H pylori*为淋巴瘤发生、生长提供了抗原刺激. 正常胃黏膜内缺乏淋巴组织, *H pylori*感染导致黏膜淋巴细胞浸润, 并可出现淋巴滤泡, 这种获得性的淋巴组织是胃壁发生淋巴瘤的病理基础. 绝大多数胃MALT淋巴瘤病例胃黏膜能检出*H pylori*, 本组资料*H pylori*感染率达82.4%, 表明*H pylori*感染与胃MALT淋巴瘤存在密切关联^[9-10].

PGML与胃溃疡、胃癌等难以区别, 故内镜检查是早期诊断该病的重要方法. PGML内镜下特点是病变范围广泛、散在且多发. 本组研究证实, 该病好发于胃体(44.1%)和胃窦(29.4%), 胃角、胃底、十二指肠球部及降部均可受累, 其中多为两个或两个以上病灶, 孤立病灶相对较少. 内镜下主要分为溃疡型、弥漫浸润型、隆起糜烂型, 一般为大的溃疡、巨大的腔内肿

■ 创新点

本文总结了原发性胃恶性淋巴瘤内镜下表现特征及其病理学特点, 针对肿瘤细胞首先在黏膜下生长, 其上往往覆盖正常黏膜组织的特点, 提出了对内镜下疑为恶性形态、多发性的病灶, 活检时注意深取, 并进行多次和多点活检, 甚至是一穴二钳方法, 每次活检组织不少于6块, 以提高检查阳性.

■同行评价

本文属回顾总结性研究,数据可靠准确,实用性强,学术价值较好。

物、广泛的结节,形成鹅卵石样外观或弥漫分布的颗粒样改变^[11]。

本组病理诊断均为B细胞霍奇金淋巴瘤,最基本的组织学改变是边缘区B细胞克隆性增生,淋巴上皮病变,淋巴滤泡克隆化形成假滤泡样结构。大部分为低度恶性淋巴瘤,而4例为大B细胞性淋巴瘤,则为高度恶性胃淋巴瘤。大多数胃高度恶性淋巴瘤是由低度恶性MALT转化而来,转化的标准是出现灶性浸润的大B细胞,不论数量多少,都属于高度恶性淋巴瘤^[12-13],且肿瘤细胞首先在黏膜下生长,其上往往覆盖正常黏膜组织,这一特点提示,对内镜下疑为恶性形态、多发性的病灶,活检时注意深取、多次和多点活检,甚至是一穴二钳方法,每次活检组织不少于6块,以提高检查阳性率^[14]。

PGML的预后明显优于胃其他恶性肿瘤及淋巴结内淋巴瘤。胃MALT淋巴瘤5年生存率可达90%,10年生存率为75%^[15]。因此,早诊断、早治疗是目前提高PGML生存率、延长生存期的关键。内镜检查的广泛应用及活检的充分和准确,对于PGML具有重要的确诊意义。

4 参考文献

- 1 骆红. 原发性胃恶性淋巴瘤的诊治. 中国当代医学 2008; 7: 61
- 2 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
- 3 欧阳钦, 易智慧. 胃肠道淋巴瘤. 中华消化杂志 2006; 26: 209-212
- 4 盛传伦, 赵忠岩, 胡淑晶. 内镜诊断原发性胃恶性淋巴瘤. 吉林医学 2000; 21: 137-138
- 5 陈蕾, 吕翔. 胃原发性恶性淋巴瘤. 诊断病理学杂志 2006; 13: 79
- 6 毕小刚, 杨建民, 王振华, 李向红. 原发性胃恶性淋巴瘤18例临床分析. 中国内镜杂志 2003; 9: 93-94
- 7 Hjermstad MJ, Hollender A, Warloe T, Karlsen KO, Ikonomo I, Kvaloy S, Nome O, Holte H. Quality of life after total or partial gastrectomy for primary gastric lymphoma. *Acta Oncol* 2006; 45: 202-209
- 8 施杰民. 原发性胃恶性淋巴瘤的特点及误诊分析. 中国全科医学 2006; 9: 2060-2061
- 9 贺降福, 刘荣, 胡仕林, 沈俊松, 王银, 陈新皓. 胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤临床与内镜诊断分析. 国际消化病杂志 2007; 27: 306-308
- 10 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
- 11 Hu C, Yi C, Dai X. Clinical study of 31 patients with primary gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 722-726
- 12 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
- 13 胡家柳. 原发性胃恶性淋巴瘤9例临床误诊的探讨. 临床和实验医学杂志 2007; 6: 28-29
- 14 Curcio A, Bertelli R, Gentilini P, Ronconi S, Saragoni L, Vagliasindi A, Mura G, Mazza P, Framarini M, Verdecchia GM. [Multimodal treatment of gastric MALT lymphoma: our experience] *Suppl Tumori* 2005; 4: S77-S78
- 15 Rodriguez-Sanjuan JC, Garcia RA, Trugeda S, de la Torre F, Llorca J, Gomez-Fleitas M. Do current indications for surgery of primary gastric lymphoma exist? *Rev Esp Enferm Dig* 2006; 98: 180-188

编辑 李军亮 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志投稿方式

本刊讯 本刊只接受在线投稿,不接受其他方式的投稿,如E-mail,印刷版。在线投稿网址: <http://wcjd.wjgnet.com/submission@wjgnet.com>, 电话: 010-8538 1892, 传真: 010-8538-1893 寻求帮助。投稿须知下载网址<<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>>审稿过程平均时间需要14 d。来稿均经2-3位同行专家严格评审,2位或以上通过为录用,否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件处理费及发表费,文章发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬)。(常务副总编辑:张海宁 2008-10-18)

原发性胆汁性肝硬化早期诊断15例

杨永林, 杨建平

杨永林, 杨建平, 云南大理学院临床学院内科教研室 云南省大理市 671000
作者贡献分布: 杨永林负责收集组织材料, 书写论文; 杨建平负责协助收集材料。
通讯作者: 杨永林, 671000, 云南省大理市, 云南大理学院临床学院内科教研室, yyl4320@163.com
电话: 0872-2201509
收稿日期: 2008-08-08 修回日期: 2008-09-15
接受日期: 2008-09-17 在线出版日期: 2008-10-18

Diagnosis of early primary biliary cirrhosis: an analysis of 15 cases

Yong-Lin Yang, Jian-Ping Yang

Yong-Lin Yang, Jian-Ping Yang, Department of Internal Medicine, Clinical College of Dali University, Dali 671000, Yunnan Province, China
Correspondence to: Yong-Lin Yang, Department of Internal Medicine, Clinical College of Dali University, Dali 671000, Yunnan Province, China. yyl4320@163.com
Received: 2008-08-08 Revised: 2008-09-15
Accepted: 2008-09-17 Published online: 2008-10-18

Abstract

AIM: To improve the diagnosis of early primary biliary cirrhosis (PBC).

METHODS: We retrospectively analyzed the clinical and laboratory data of 15 early PBC patients admitted to the Clinical College of Dali University from 1994 to June 2007.

RESULTS: Among the 15 patients, 2 cases were with mild skin itch and jaundice, and the other cases had any clinical features. ALP and GGT increase were found in all the cases; moreover, the levels of ALP and GGT enhanced with the prolonging of disease course. The positive status of AMA is specific for the diagnosis of early PBC.

CONCLUSION: Early PBC lacks clinical manifestations, and increases of ALP, GGT, positive status of AMA are the main evidence for its diagnosis.

Key Words: Primary biliary cirrhosis; Early diagnosis; Obstructive enzyme; Autoantibody

Yang YL, Yang JP. Diagnosis of early primary biliary cirrhosis: an analysis of 15 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(29): 3335-3337

摘要

目的: 提高早期原发性胆汁性肝硬化的诊断水平。

方法: 回顾性分析1994/2007-06云南大理学院临床学院附属医院收治确诊的早期原发性胆汁性肝硬化患者15例的临床及实验室资料, 总结其诊断依据和诊断方法。

结果: 15例早期原发胆汁性肝硬化患者中仅有2例有皮肤瘙痒和轻度黄疸, 其余13例无任何临床表现, 所有病例均以ALP、GGT增高为突出表现, 病程越长ALP、GGT增高越明显。AMA阳性对早期原发胆汁性肝硬化的诊断特异性高, 有重要的诊断价值。

结论: 早期原发性胆汁性肝硬化缺乏临床表现, ALP、GGT增高和AMA阳性是早期原发性胆汁性肝硬化的主要表现和诊断依据。

关键词: 原发性胆汁性肝硬化; 早期诊断; 梗阻酶; 自身抗体

杨永林, 杨建平. 原发性胆汁性肝硬化早期诊断15例. *世界华人消化杂志* 2008; 16(29): 3335-3337
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3335.asp>

0 引言

原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)是一种自身免疫性疾病, 早期症状不明显, 主要表现为梗阻酶如碱性磷酸酶(ALP)、 γ -谷氨酰转移酶(GGT)增高和AMA阳性, 且常伴有其他自身免疫性疾病的临床表现和实验室资料的表现, 因此早期PBC容易漏诊^[1]. 本文回顾了1994/2007-06云南大理学院临床学院附属医院所收治确诊的早期原发性胆汁性肝硬化15例的临床及实验室资料, 进行分析和总结, 以提高对原发性胆汁性肝硬化早期诊断的认识。

■背景资料

早期原发性胆汁性肝硬化缺乏临床表现, 主要表现为碱性磷酸酶、谷氨酰转移酶增高和线粒体抗体阳性, 且常伴有其他自身免疫性疾病的临床表现和实验室资料的表现, 因此早期原发性胆汁性肝硬化不易诊断且容易漏诊。

■同行评议者

张晓岚, 教授, 河北医科大学第二医院消化内科

■相关报道

国内外有关研究都提示碱性磷酸酶、谷氨酰转氨酶增高和线粒体抗体阳性早期原发性胆汁性肝硬化诊断的主要依据;线粒体抗体阳性是早期原发性胆汁性肝硬化的特异性指标。

1 材料和方法

1.1 材料 收集从1994/2007-06确诊的早期原发性胆汁性肝硬化15例的临床及实验室资料。早期PBC病例15例,年龄分布为38-39岁3例、40-45岁8例、45-50岁3例、58岁1例;最大为58岁,最小为40岁,平均48岁;性别分布:女13例、男2例。皮肤瘙痒和轻度黄疸各1例,其余13例无任何临床表现;4例因体检发现ALP、GGT增高;3例因子宫肌瘤手术住院发现ALP、GGT增高;2例因胆囊结石手术住院发现ALP、GGT增高;有9例伴自身免疫性疾病:干燥综合征2例、类风湿性关节炎2例、甲亢1例;2型糖尿病2例。另外,有2例合并类风湿性关节炎、甲亢及2型糖尿病的患者是在多次住院后发现ALP、GGT增高而确诊,从发现到确诊病程2 mo-10年。

1.2 方法 收集1994/2007-06本院确诊的早期原发性胆汁性肝硬化15例的临床资料和实验室检查资料,根据美国肝病学会(AASLD)2000年的PBC诊断程序和标准进行诊断。对15例早期原发性胆汁性肝硬化病例的临床及实验室资料进行分析,总结早期原发性胆汁性肝硬化的诊断依据和诊断方法。

根据美国肝病学会(AASLD)2000年的PBC诊断程序^[2]即:(1)对于血清ALP升高无其他解释(B超检查胆道系统正常),应测定AMA;(2)对于血清GGT增高无其他解释,AMA滴度>1:40诊断有把握;(3)对于血清ALP升高无其他解释(B超检查胆道系统正常),应测定AMA,AMA阴性则加做ANA、抗SMA及免疫球蛋白检查,同时进行肝穿刺;(4)如果AMA阳性而ALP正常则每年复查。

2 结果

2.1 15例早期PBC的实验室资料和病理结果如下 ALT(谷丙转氨酶)增高2例(13%),总胆红素(TBiL)增高4例(26%),ALP增高15例(100%),GGT增高15例(100%),AMA(抗线粒抗体)阳性13例(87%),AMA阴性2例(13%),ANA(抗核抗体)阳性8例(52%),SMA(抗平滑肌抗体)阳性5例(33%),免疫球蛋白IgM增高6例(39%),IgG增高4例(26%)。ALP、GGT增高明显,常高于正常值4-5倍,最高者达1842 U/L和1042 U/L;病理活检2例,表现为汇管区纤维组织增生,肝小叶周边肝细胞破坏,细小胆管破坏淤胆、弥漫性肿胀、结构紊乱,假小叶形成。

2.2 15例早期PBC病例诊断标准如下 B超检查胆

道系统正常,ALP、GGT增高,AMA阳性(滴度>1:40)13例;2例B超检查胆道系统正常,ALP、GGT增高而AMA阴性病例行肝活检根据病理而诊断。所有病例肝炎病毒学检查为阴性、排除了药物、酒精中毒、血吸虫病及代谢、遗传因素引起的肝脏疾病情况。

3 讨论

PBC是一种自身免疫性疾病,由免疫异常导致胆管上皮细胞损伤、坏死、最后细小胆管破坏、阻塞,形成胆汁淤积,胆汁在肝细胞和胆管系统内积聚,汇管区纤维瘢痕形成,瘢痕组织从汇管区向另一汇管区或肝小叶内伸展,最终形成肝硬化^[3]。PBC早期的病理改变就引起了细小胆管和微胆管的阻塞和胆汁淤积,因此早期就出现了梗阻酶ALP和GGT增高。ALP和GGT增高是早期PBC的主要表现,也是发现和诊断早期PBC的重要线索。由于本病是一种自身免疫性疾病,因此反映自身免疫性疾病的自身抗体AMA、SMA、ANA出现阳性;其中抗线粒体抗体(AMA)是PBC最具诊断价值和特异性的免疫学指标,其中PBC患者AMA阳性率可达90%-95%,特别是AMA-M2特异性高,是早期诊断PBC最有价值的指标^[3]。另外,免疫球蛋白IgM、IgG也增高。

本组病例资料显示早期PBC患者15例ALP、GGT增高明显(100%)达到正常值的4-5倍,最高达1482 U/L和1042 U/L,且病程越长ALP、GGT增高越明显,可能是随着病情的发展,胆管梗阻加重所致。本组病例13例AMA阳性,阳性率为87%,低于一般文献报道的90%-95%,可能是本组病例较少的缘故^[4-5];对ALP、GGT增高而AMA阴性的2病例,B超排除了胆道阻塞情况,行肝活检病理检查而确诊。本组资料8例(52%)ANA阳性,SMA阳性5例(33%),IgM增高6例(39%),IgG增高4例(26%),9例伴有干燥综合征、关节炎、2型糖尿病、甲状腺功能亢进等疾病是对本病为自身免疫性疾病的临床资料和免疫学检查上的支持。15例中仅有2例出现皮肤瘙痒和轻度黄疸,2例ALT增高,4例TBiL增高,但15例都有ALP、GGT明显增高,说明早期PBC一般缺乏临床表现,ALP、GGT明显增高是其主要的特点,是诊断早期PBC的重要线索^[6-7]。本组资料的病例都是因体检、其他疾病或手术住院发现ALP、GGT明显增高,进一步检查AMA阳性而确诊的。从本组资料看本病的确诊时间最长

■应用要点

通过本文的分析可以认识到:碱性磷酸酶、谷氨酰转氨酶增高是诊断的重要线索和依据。对发现碱性磷酸酶、谷氨酰转氨酶增高的病例应进一步作线粒体抗体的检测。

达10年, 这与PBC早期缺乏临床症状, 临床医生对本病的认识不足有关; 此外PBC可以与自身免疫性肝炎、原发性硬化性胆管炎交叉和重叠, 使本病的早期诊断更加困难^[8]。因此在临床上发现ALP、GGT明显增高, 要考虑有早期PBC的可能, 应做B超, AMA及自身抗体的进一步检查来确诊或排除此病^[9]。总之, ALP、GGT明显增高是早期PBC突出而主要表现, AMA特别是AMA-M2是PBC最具诊断价值和特异性的免疫学指标; 对AMA阴性的病例应做病理检查来确诊。由于本病主要发生于中老年女性, 起病隐匿, 进展缓慢, 早期一般无临床表现或表现轻微, 早期容易漏诊不易诊断; 中晚期临床表现典型, 诊断较容易, 但缺乏有效的治疗方法, 最终出现肝功能衰竭。因此重视此病的早期诊断, 采取恰当治疗的治疗措施; 对延缓病程有重要的意义。熊去氧胆酸是公认的早期治疗有效之药, 可以减轻胆汁淤积程度和延长出现临床症状的进程^[10]。从文献资料来看, 近年随着临床医生对PBC认识的提高和诊断技术的进步, 原发性胆汁性肝硬化早期得到诊断的病例越来越多^[11-12], 减少了漏诊。

4 参考文献

- 1 潘国宗, 曹世植. 现代胃肠病学. 第1版. 北京: 科学出版社, 1994: 1444-1450
- 2 Sakauchi F, Oura A, Ohnishi H, Mori M. Comparison of the clinical features of Japanese patients with primary biliary cirrhosis in 1999 and 2004: utilization of clinical data when patients applied to receive public financial aid. *J Epidemiol* 2007; 17: 210-214
- 3 Neuberger J, Thomson R. PBC and AMA--what is the connection? *Hepatology* 1999; 29: 271-276
- 4 陈学平, 杨晋辉, 尤丽英, 唐映梅, 尧颖, 胥莹, 杨婧. 早期原发性肝硬化的诊断(附20例病例分析). *胃肠病学和肝病学杂志* 2008; 17: 446-448
- 5 刘秋香, 朴云峰. 抗线粒体抗体M2亚型与原发性胆汁性肝硬化. *临床肝胆病杂志* 2008; 24: 142-144
- 6 谭云明, 董叶, 吕娇凤, 刘宁, 李华, 秦和昌, 叶如美. 抗线粒体抗体测定对诊断原发性胆汁性肝硬化的临床意义. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 924-926
- 7 仲人前, 耿红连. 自身免疫性肝病自身抗体检测的临床意义. *中国实用内科杂志* 2006; 26: 1840-1842
- 8 王宇明, 陈蒿. 自身免疫重叠综合征. *中国实用内科杂志* 2006; 23: 1843-1845
- 9 赵景涛, 刘玉兰. 消化内科分册. 第1版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2000: 256-261
- 10 王贵强. 原发性胆汁性肝硬化及其临床诊治. *中国实用内科杂志* 2006; 26: 1859-1861
- 11 姚光弼. 应重视自身免疫性肝病的研究. *中国实用内科杂志* 2006; 26: 1839
- 12 贺江平. 原发性胆汁性肝硬化临床早期诊断的体会(附43例总结). *肝脏* 2002; 7: 176

■同行评价

本文对15例早期原发性胆汁性肝硬化进行了回顾性分析, 对提高原发性胆汁性肝硬化的早期诊断具有实际价值和临床意义。

编辑 李军亮 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志标点符号用法

本刊讯 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。(常务副总编辑: 张海宁 2008-10-18)

自身免疫性肝病临床病理特征分析28例

张会爱, 王邦茂, 章明放, 常毅湘, 弓艳霞

■背景资料

自身免疫性肝病是一组免疫介导的肝脏损伤, 根据临床表现、生化、影像学和组织病理学特点不同, 可简单的分为以肝炎为主型(AIH)和以胆系损害及胆汁淤积为主型(PBC和PSC)及其重叠综合征, 这几种疾病均可表现为严重的肝脏病变, 并可进展为肝硬化。

张会爱, 王邦茂, 常毅湘, 天津医科大学总医院消化科 天津市 300052

章明放, 天津医科大学总医院病理科 天津市 300052

弓艳霞, 天津市南开医院 天津市 300100

作者贡献分布: 张会爱和王邦茂对此文所作贡献均等; 此课题由王邦茂设计; 研究过程由王邦茂, 张会爱, 章明放, 常毅湘及弓艳霞共同操作完成; 研究所用分析工具由张会爱提供; 数据分析由张会爱完成; 本论文写作由王邦茂, 张会爱, 章明放, 常毅湘及弓艳霞完成。

通讯作者: 王邦茂, 300052, 天津市, 天津医科大学总医院消化科. gi.tmuh@sohu.com

电话: 022-60362810/60363615

收稿日期: 2008-07-11 修回日期: 2008-09-06

接受日期: 2008-09-08 在线出版日期: 2008-10-18

Clinicopathological features of autoimmune hepatic diseases: an analysis of 28 cases

Hui-Ai Zhang, Bang-Mao Wang, Ming-Fang Zhang, Yi-Xiang Chang, Yan-Xia Gong

Hui-Ai Zhang, Bang-Mao Wang, Yi-Xiang Chang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

Ming-Fang Zhang, Department of Pathology, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

Yan-Xia Gong, Department of Gastroenterology, Tianjin NanKai Hospital, Tianjin 300100, China

Correspondence to: Bang-Mao Wang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China. gi.tmuh@sohu.com

Received: 2008-07-11 Revised: 2008-09-06

Accepted: 2008-09-08 Published online: 2008-10-18

Abstract

AIM: To investigate and compare the clinical, biological, imaging and histological features of patients with autoimmune hepatitis (AIH), primary biliary cirrhosis (PBC) or AIH-PBC overlap syndrome (AIH-PBC OS).

METHODS: The clinical data and liver biopsy specimens from 13 patients with type I AIH, 6 patients with PBC and 9 patients with AIH-PBC OS in General Hospital of Tianjin Medical University were retrospectively analyzed.

RESULTS: Patients with AIH-PBC OS had markedly higher serum aspartate aminotransferase (AST) and γ globulin (GLO) levels than patients with AIH or PBC (132.67 ± 35.05 vs 81.15 ± 39.26 , 55.17 ± 24.38 ;

44.33 ± 8.92 vs 34.23 ± 9.89 , 33.17 ± 6.79 , all $P < 0.05$); serum alkalinephosphatase (ALP) and gamma-glutamyl-transpeptidase (GGT) levels were significantly higher in patients with AIH-PBC OS than with AIH (218.11 ± 107.79 vs 106.85 ± 91.57 ; 280.33 ± 133.51 vs 82.07 ± 36.67 , both $P < 0.05$), but lower than that in patients with PBC (245.83 ± 88.60 , 315.67 ± 160.01 , both $P < 0.05$). IgM levels in patients with PBC or AIH-PBC OS were significantly higher than in patients with AIH (793.00 ± 528.57 vs 127.33 ± 30.14 ; 538.50 ± 349.43 vs 127.33 ± 30.14 , both $P < 0.05$) while patients with AIH-PBC OS had significantly higher IgG levels than patients with PBC (2036.00 ± 457.03 vs 1121.25 ± 313.8 , $P < 0.05$). Histological analysis showed interface hepatitis in 88.9% and destructive cholangitis in 66.7% of AIH-PBC OS patients. Abdominal ultrasound showed that they were all often associated with hypersplenotrophy and celiac lymphadenectasis.

CONCLUSION: AIH and PBC are representative autoimmune liver diseases in which hepatocytes and intrahepatic bile ducts, respectively, are selectively damaged by autoimmune mechanisms. AIH-PBC OS with clinicopathological features of both AIH and PBC shows closer clinically and histologically features to AIH than to PBC.

Key Words: Hepatitis autoimmune; Primary biliary cirrhosis; Overlap syndrome

Zhang HA, Wang BM, Zhang MF, Chang YX, Gong YX. Clinicopathological features of autoimmune hepatic diseases: an analysis of 28 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(29): 3338-3342

摘要

目的: 探讨并比较自身免疫性肝炎(AIH)、原发性胆汁性肝硬化(PBC)及其重叠综合征(AIH-PBC OS)的临床、生化、影像学以及组织学特征。

方法: 收集在我院自身免疫性肝病住院患者28例, 其中I型AIH 13例、PBC 6例和AIH-PBC OS 9例, 回顾性分析患者临床资料。

结果: AIH-PBC OS患者血清谷草转氨酶(AST)

■同行评议者

唐霓, 副研究员, 教育部感染性疾病分子生物学重点实验室

和 γ -球蛋白(GLO)水平(分别为和)均明显高于AIH和PBC患者(132.67 ± 35.05 vs 81.15 ± 39.26 , 55.17 ± 24.38 ; 44.33 ± 8.92 vs 34.23 ± 9.89 , 33.17 ± 6.79 , 均 $P < 0.05$), 而碱性磷酸酶(ALP)和 γ -谷氨酰转肽酶(GGT)水平明显高于AIH患者(218.11 ± 107.79 vs 106.85 ± 91.57 ; 280.33 ± 133.51 vs 82.07 ± 36.67 , 均 $P < 0.05$), 低于PBC患者(245.83 ± 88.60 , 315.67 ± 160.01 , 均 $P < 0.05$). AIH-PBC OS和PBC患者的IgM水平均明显高于AIH患者(793.00 ± 528.57 vs 127.33 ± 30.14 ; 538.50 ± 349.43 vs 127.33 ± 30.14 , 均 $P < 0.05$), 而AIH-PBC OS患者的IgG水平明显高于PBC患者(2036.00 ± 457.03 vs 1121.25 ± 313.8 , $P < 0.05$). AIH-PBC OS患者界面性肝炎和破坏性胆管炎的发生率分别为88.9%和66.7%. 腹部BUS提示三者常伴有脾大和腹腔淋巴结肿大.

结论: AIH和PBC是典型的分别选择性损伤肝细胞及肝内小胆管的自身免疫性肝病, AIH-PBC OS同时具有AIH和PBC的临床病理学特征, 与PBC相比, AIH-PBC OS更倾向于AIH.

关键词: 自身免疫性肝炎; 原发性胆汁性肝硬化; 重叠综合征

张会爱, 王邦茂, 章明放, 常毅湘, 弓艳霞, 自身免疫性肝病临床病理特征分析28例. 世界华人消化杂志 2008; 16(29): 3338-3342

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3338.asp>

0 引言

自身免疫性肝病包括自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH), 原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC), 原发性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis, PSC)及重叠综合征(overlapsynodrome, OS), PSC发病率低. 本文主要探讨AIH、PBC及AIH-PBC OS的临床、生化指标、病理学特征等, 着重研究其病理学特征.

1 材料和方法

1.1 材料 收集在我院自身免疫性肝病住院患者28例, 其中I型AIH13例, PBC6例和AIH-PBC OS 9例, 参照1999年国际AIH小组(IAIHG)修正的AIH临床评分标准^[1], 以及2000年美国肝病学会(AASLD)关于PBC的临床指导建议^[2], 并依据Chazouillerse *et al*^[3]提出AIH-PBC OS应至少有两项标准分别符合AIH和PBC的诊断标准予以诊断.

1.2 方法 采集患者以下临床资料: (1)临床特征: 患者性别、年龄、临床症状、合并疾病. (2)生化指标: 包括总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、球蛋白(GLO)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总胆红素(TB)、直接胆红素(DB)、碱性磷酸酶(ALP)、 γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT)、凝血酶原时间(PT)、肝炎病毒标志物、胆固醇(CH)、甘油三酯(TC). (3)免疫学指标: 包括抗核抗体(ANA)、抗平滑肌抗体(SMA)、抗肝肾微粒体1型抗体(LKM-1)、抗可溶性肝抗原/肝-胰抗原SLA-LP、抗线粒体抗体(AMA)、抗线粒体抗体-M2(AMA-M2)亚型等, 免疫球蛋白A(IgA)、免疫球蛋白G(IgG)、免疫球蛋白M(IgM)等. (4)影像学检查主要为上腹部B超(BUS). (5)肝穿组织病理学.

统计学处理 计量资料以mean \pm SD描述, 采用SPSS11.5软件进行组间资料的单因素方差分析及SNK法进行两两比较, 并对分类变量资料进行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义.

2 结果

2.1 临床特征 自身免疫性肝病28例, 患者多以乏力、纳差、黄疸、腹胀、消化道出血、皮肤瘙痒、周围性水肿或查体发现肝功能异常等入院, 包括: I型AIH 13例, 其中女12例、男1例, 2例合并甲亢, 2例合并糖尿病, 1例合并原发性甲减、桥本甲状腺炎, 1例合并系统性硬化及干燥综合征; PBC 6例, 均为女性, 3例合并糖尿病, 1例合并类风湿性关节炎, 3例合并高脂血症; AIH-PBC OS患者9例, 其中女8例、男1例, 3例合并糖尿病, 1例合并甲亢, 3例合并高脂血症.

2.2 血液生化及免疫学指标 所有患者肝炎病毒标志物及DNA定量检查结果均提示目前无病毒感染, 血液生化、免疫学指标及统计学分析结果(表1-2). AIH-PBC OS患者AST和GLO水平明显高于AIH或PBC患者, ALP和GGT水平明显高于AIH患者, 而低于PBC患者. PBC患者的TBIL水平明显高于AIH患者. AIH-PBC OS和PBC患者的IgM水平明显高于AIH患者, 而AIH-PBC OS患者的IgG水平明显高于PBC患者, AIH/PBC OS患者的ANA滴度显著高于AIH和PBC患者, 上述结果均有统计学意义(P 均 < 0.05).

2.3 肝穿刺病理结果 典型病理表现为界面性肝炎、淋巴细胞破坏性胆管炎和肝细胞花环样排列等(图1). AIH、PBC及AIH-PBC OS患者汇管区慢性炎细胞浸润发生率分别为92.31%、

■ 研究前沿

目前自身免疫性肝病病因尚不明确, 有报道甲型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人类疱疹病毒6型等感染后可导致自身免疫性肝炎, 65%原发性胆汁性肝硬化患者伴有 β -逆转录病毒感染, 目前治疗主要是免疫抑制治疗及利胆治疗, 找到确切的病因有利于疾病的诊治.

应用要点

本文进一步证实了AIH、PBC以及AIH-PBC OS各自的临床病理学特征,尤其对于其病理学特征(汇管区炎症、界面性肝炎、肝细胞花环样排列、淋巴细胞破坏性胆管炎、胆管增生以及纤维化分级等)及其影像学表现(腹部淋巴结肿大、脾大)作了详细的分析和比较.对于自身免疫性肝病的诊治有较大帮助.

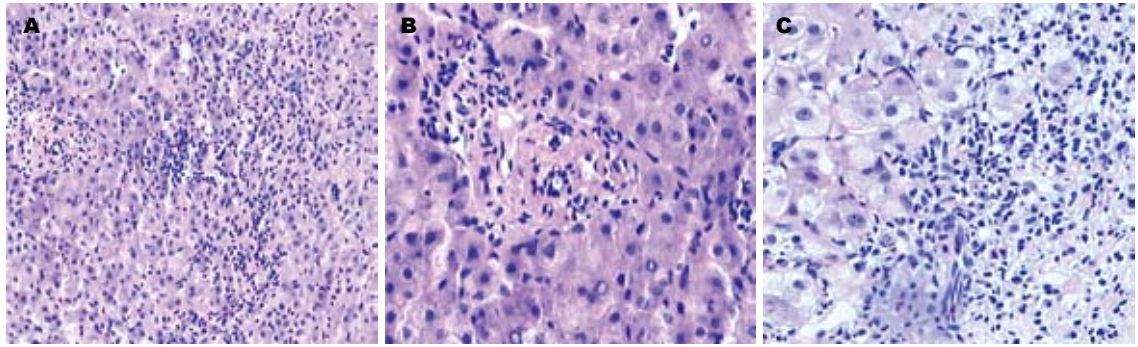


图1 肝组织病理组织图(H&E染色, ×200). A: 界面性肝炎; B: 破坏性胆管炎; C: 肝细胞花环样排列.

表1 三组患者血液生化和免疫学检查结果 (mean ± SD)

项目	AIH (n = 13)	PBC (n = 6)	AIH-PBC OS (n = 9)	P值
TBIL(μmol/L)	13.32 ± 8.73	60.78 ± 27.67 ^a	27.01 ± 13.94	0.036
ALP(U/L)	106.85 ± 91.57	245.83 ± 88.60 ^a	218.11 ± 107.79 ^a	0.009
GGT(U/L)	82.07 ± 36.67	315.67 ± 160.01 ^a	280.33 ± 133.51 ^a	0.025
ALT(U/L)	64.54 ± 48.00	62.05 ± 32.07	111.00 ± 52.14	>0.05
AST(U/L)	81.15 ± 39.26	55.17 ± 24.38 ^c	132.67 ± 35.05 ^a	0.025
GLO(g/L)	34.23 ± 9.89	33.17 ± 6.79 ^c	44.33 ± 8.92 ^a	0.029
PT(s)	14.44 ± 2.03	13.27 ± 2.38	12.60 ± 1.44	>0.05
IgM(g/L)	127.33 ± 30.14	538.50 ± 349.43 ^a	793.00 ± 528.57 ^a	0.026
IgA(g/L)	373.33 ± 216.20	323.50 ± 174.94	302.60 ± 190.95	>0.05
IgG(g/L)	1600.00 ± 562.14	1121.25 ± 313.80 ^c	2036.00 ± 457.03	0.043

^aP<0.05 vs AIH; ^cP<0.05 vs AIH-PBC OS.

表2 三组患者ANA滴度 (%)

ANA滴度	AIH (n = 13)	PBC (n = 6)	AIH/PBC OS (n = 9)
1 : 800	0	0	7/9(77.8)
1 : 400	7/13(53.8)	3/6(50)	2/9(22.2)
1 : 200	3/13(23.1)	2/6(33.3)	0
1 : 100	3/13(23.1)	1/6(16.7)	0

三组比较: $\chi^2 = 20.733$, $P = 0.002 < 0.05$; AIH vs AIH/PBC OS, $P = 0.001 < 0.05$; PBC vs AIH/PBC OS, $P = 0.019 < 0.05$.

83.33%和100%, 界面性肝炎分别为69.2%、16.7%和88.9%, 花环样排列分别为38.5%、0和66.7%, 破坏性胆管炎分别为0、83.3%和66.7%, 小胆管增生分别为0、66.7%和44.4%(表3). AIH和AIH-PBC OS纤维化评分F3及其以上的分别为38.5%和44.5%, Scheuer分级显示PBC患者Grade1和Grade4的发生率分别为50%和66.7%. AIH-PBC OS患者Grade 1和Grade 4的发生率分别为100%和44.4%(表4).

2.4 腹部BUS AIH、PBC和AIH-PBC OS脾大的发生率分别为61.5%、33.3%和22.2%, 胆结石的发生率分别为0、33.3%和22.2%, 三者均有1

表3 三组患者的病理组织学情况 (%)

病理改变	AIH (n = 13)	PBC (n = 6)	AIH/PBC OS (n = 9)
界面性肝炎	9/13(69.2)	1/6(16.7)	8/9(88.9)
花环样排列	5/13(38.5)	0	6/9(66.7)
汇管区炎细胞浸润	12/13(92.31)	5/6(83.33)	9/9(100)
破坏性胆管炎	0	5/6(83.3)	6/9(66.7)
小胆管增生	0	4/6(66.7)	4/9(44.4)

例出现腹腔淋巴结肿大.

3 讨论

AIH和PBC是两种不同的自身免疫性肝病^[4-7], 他们都有自己特征性的临床、免疫以及组织学表现, 这两种特征可能同时或先后发生在同一个患者, 从而产生重叠综合征, 本研究进一步证实了三者的特征.

临床特征、血清生化及免疫学改变: (1)三者均以女性多见, 常合并多种其他自身免疫性疾病, 如系统性硬化、干燥综合征、甲亢、桥本甲状腺炎、类风湿性关节炎等. 三者临床表

表 4 三组患者的纤维化评分 (%)

纤维化评分	AIH (n = 13)	PBC (n = 6)	AIH/PBC OS (n = 9)
Fibrosis			
F0	5/13(38.5)	-	2/9(22.2)
F1	2/13(15.4)	-	2/9(22.2)
F2	1/13(7.6)	-	1/9(11.1)
F3	3/13(23.1)	-	0
F4	2/13(15.4)	-	4/9(44.5)
Scheuer分级			
Grade1	-	3/6(50)	9/9(100)
Grade2	-	2/6(33.3)	2/9(22.2)
Grade3	-	2/6(33.3)	5/9(55.6)
Grade4	-	4/6(66.7)	4/9(44.4)

现无明显差别。(2)血清中出现一种或多种自身抗体, AIH、PBC和AIH-PBC OS均常出现ANA, 但AIH-PBC OS患者ANA滴度均明显高于AIH或PBC患者, 表明AIH-PBC OS患者出现ANA, 且滴度较高, 甚至高于AIH患者, PBC患者虽然也常出现ANA, 但滴度较低。(3)AIH患者血清ALT、AST升高为主, ALP、GGT正常或轻度升高, TBIL也可升高。血清IgG浓度升高^[8-9]。PBC患者主要为ALP和GGT明显升高, 而ALT和AST轻度升高, 血清IgM升高亦为其特点之一^[10]。AIH和PBC血清生化特征分别提示肝细胞炎症和胆汁淤积改变。AIH-PBC OS患者AST和ALP同时升高, AMA、ANA和(或)SMA阳性, 血清IgG和IgM同时升高, 同时, AIH-PBC OS患者具有AIH和PBC的生化以及免疫学特征。其AST和GLO水平明显高于AIH, ANA滴度也高于AIH, 而ALP和GGT水平却低于PBC患者, 表明与PBC相比, AIH-PBC OS更倾向于AIH^[11-15]。

组织学特征: (1)可发生界面性肝炎及肝细胞花环样排列, AIH、AIH-PBC OS较PBC常见。(2)可发生淋巴细胞破坏性胆管炎及胆管增生, AIH-PBC OS、PBC较AIH常见, 其中在PBC中最常见。(3)PBC偶可出现界面性肝炎。(4)AIH无1例出现胆管改变。(5)三者均有明显的汇管区炎细胞浸润, AIH主要为淋巴细胞、浆细胞浸润, AIH-PBC OS、PBC除了淋巴细胞外还常伴有大量嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞浸润。(6)PBC及AIH-PBC OS Scheuer分级显示四级改变可同时出现在同一个患者中, 二者均伴有一定程度的纤维化。但AIH-PBC OS患者Grade 1较PBC更常见, 表明AIH-PBC OS病变部位急性炎症反应

更明显。综上, AIH、AIH-PBC OS、PBC均有显著的汇管区炎症, 其中AIH的重要病理特征是界面性肝炎和肝细胞花环样排列; PBC的重要病理特征是淋巴细胞破坏性胆管炎和胆管增生; AIH-PBC OS则兼有AIH和PBC的病理特征, 其界面性肝炎和肝细胞花环样排列的发生率高于AIH, 淋巴细胞破坏性胆管炎和胆管增生的发生率却低于PBC, 组织学改变也表明, 与PBC相比, AIH-PBC OS更倾向于AIH。

影像学: 腹部BUS显示三者常伴有腹腔淋巴结肿大和脾大, 脾大常发生在肝硬化之前, 淋巴结和脾均属于免疫器官, 可能与免疫反应有关。AIH-PBC OS、PBC发生胆囊结石以及高脂血症较AIH常见, 这与两者胆管损伤造成的胆汁淤积有关。

总之, AIH和PBC是典型的分别选择性的损伤肝细胞及肝内小胆管的自身免疫性肝病, AIH-PBC OS同时具有AIH和PBC的临床病理学特征, 但更倾向AIH, 甚至较AIH更典型。寻找三者特异性抗原进行肝组织免疫组化检查有助于更进一步的明确诊断, 从而更好的治疗。

4 参考文献

- Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, Chapman RW, Cooksley WG, Czaja AJ, Desmet VJ, Donaldson PT, Eddleston AL, Fainboim L, Heathcote J, Homberg JC, Hoofnagle JH, Kakumu S, Krawitt EL, Mackay IR, MacSween RN, Maddrey WC, Manns MP, McFarlane IG, Meyer zum Büschenfelde KH, Zeniya M. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999; 31: 929-938
- Heathcote EJ. Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Diseases practice guidelines. *Hepatology* 2000; 31: 1005-1013
- Chazouillères O, Wendum D, Serfaty L, Montebault S, Rosmorduc O, Poupon R. Primary biliary cirrhosis-autoimmune hepatitis overlap syndrome: clinical features and response to therapy. *Hepatology* 1998; 28: 296-301
- 韩玉坤, 张文瑾, 陈菊梅, 周华, 王林杰. 自身免疫性肝病临床与病理研究. *中华肝脏病杂志* 2001; 9: 82-84
- 陈嵩, 王宇明. 自身免疫重叠综合征. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1875-1878
- 孙艳玲, 赵景民, 孟欣, 李文淑. 自身免疫性肝炎与原发胆汁性肝硬化重叠综合征的临床与病理学研究. *解放军医学杂志* 2006; 31: 662-665
- 邱德凯, 李新民, 马雄. 原发性胆汁性肝硬化-自身免疫性肝炎重叠综合征30例诊断和治疗分析. *胃肠病学* 2004; 9: 340-343
- Sato Y, Harada K, Sudo Y, Watanabe K, Nakahama T, Morimoto H, Nakanuma Y. Autoimmune hepatitis associated with bile duct injury resembling chronic non-suppurative destructive cholangitis.

■名词解释

1 界面性肝炎: 自身免疫性肝病表现为门管周围慢性渐进性单个或小簇肝细胞坏死, 即碎屑样坏死(PN), 由于PN伴有的炎症细胞浸润位于肝小叶实质区与间质区交界处, 因此, 从炎症角度称之为界面性肝炎。

2 肝细胞花环样排列: 表现为数个水样变性的肝细胞被炎症细胞和塌陷网状支架包绕成花环样结构, 其中心可见扩张的毛细胆管, 常见于汇管区周围。

3 淋巴细胞破坏性胆管炎: 表现为汇管区炎症, 淋巴细胞围绕受损的胆管周围, 并浸润至胆管基底膜和胆管上皮细胞内, 胆管上皮细胞呈空泡状变性, 进而引起上皮样组织细胞增生, 形成肉芽肿。

■同行评价

本研究整体设计合理,临床资料详实,分析有一定的深度,对临床具有较好的参考价值.

- 9 *Pathol Int* 2002; 52: 478-482
- 9 Czaja AJ. Current concepts in autoimmune hepatitis. *Ann Hepatol* 2005; 4: 6-24
- 10 Kumagi T, Heathcote EJ. Primary biliary cirrhosis. *Orphanet J Rare Dis* 2008; 3: 1
- 11 Czaja AJ. Autoimmune liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2006; 22: 234-240
- 12 Rust C, Beuers U. Overlap syndromes among autoimmune liver diseases. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3368-3373
- 13 Beuers U, Rust C. Overlap syndromes. *Semin Liver Dis* 2005; 25: 311-320
- 14 Schramm C, Lohse AW. Overlap syndromes of cholestatic liver diseases and auto-immune hepatitis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2005; 28: 105-114
- 15 Premoli A, Morello E, Bo S, Durazzo M. Diagnostic and therapeutic questions in overlap syndromes of autoimmune hepatitis. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2007; 53: 79-82

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

第八届全国消化道恶性病变介入诊疗暨消化介入新技术研讨会征文通知

本刊讯 为满足全国专家、学者和临床一线医师对消化性病变介入/内镜新技术研究、探讨和交流的需求,进一步提升国内消化系疾病尤其是消化道恶性病变介入/内镜诊治的技术水平,上海同仁医院联合福建省肿瘤医院,定于2008-11-07/12在福建省福州市举办第八届全国消化道恶性病变介入诊疗暨消化介入新技术研讨会.会议由福建省抗癌协会、福建省消化内镜学会和福建省放射学会介入学组具体承办.中华消化内镜学杂志、中华放射学杂志、世界华人消化杂志和介入放射学杂志共同参与协办.参会者将授予国家级一类继续医学教育学分10分.

1 会议内容

会议将着重介绍消化道病变内镜治疗、介入放射学治疗、肿瘤内外科治疗的新理论、新技术和新方法,为各相关交叉学科之间的相互交流和研讨搭建一个平台.本次会议拟安排相关学科的著名专家围绕食管、胆管和胃肠道等消化道管腔内支架治疗应用技术和发生的问题,以及消化道病变的消化内镜、介入放射和内外科治疗新进展等热点课题进行精彩演讲及深入研讨.会议中还将安排疑难案例讨论及手术操作演示,内容精彩.

2 联系方式

林海澜, 350014, 福州市福马路凤坂马路顶91号福建省肿瘤医院介入科. hailan@pub2.fz.fj.cn; 手机: 13850171973, 电话: 0591-83660063-8428, 8017, 传真: 0591-83546120

施宏, 350014, 福州市福马路凤坂马路顶91号福建省肿瘤医院内镜科. endoshihong@hotmail.com; 手机: 13959105615, 电话: 0591-83660063-8428, 8017, 传真: 0591-83546120

慢性肝衰竭患者预后的影响因素

高艳颖, 韩涛, 阚志超

高艳颖, 韩涛, 阚志超, 天津市第三中心医院消化内科 天津市 300170

天津市卫生局重点攻关资助项目, No. 07KG9

作者贡献分布: 本课题设计由韩涛完成; 本文的构思, 收集病历, 统计学处理及文章撰写由高艳颖完成; 本文修改由韩涛与阚志超完成。

通讯作者: 韩涛, 300170, 天津市河东区津塘路83号, 天津市第三中心医院消化内科. hantaomd@126.com.cn
电话: 022-84112298

收稿日期: 2008-07-07 修回日期: 2008-09-05

接受日期: 2008-09-08 在线出版日期: 2008-10-18

Risk factors of prognosis for chronic liver failure

Yan-Ying Gao, Tao Han, Zhi-Chao Kan

Yan-Ying Gao, Tao Han, Zhi-Chao Kan, Department of Gastroenterology, the Third Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300170, China

Supported by: the Key Projects of Bureau of Health of Tianjin, No. 07KG9

Correspondence to: Dr. Tao Han, Department of Gastroenterology, the Third Central Hospital of Tianjin, 83 Jintang Road, Hedong District, Tianjin 300170, China. gaoyanying@sina.com.cn

Received: 2008-07-07 Revised: 2008-09-05

Accepted: 2008-09-08 Published online: 2008-10-18

Abstract

AIM: To investigate independent risk factors of prognosis for chronic liver failure and to establish its prognostic model.

METHODS: Retrospective analysis was conducted on clinical aspects of 228 patients with liver failure receiving artificial liver treatment between May 2002 and March 2007 in Tianjin third central hospital. Data were analyzed using SPSS 13.0 statistic software. Quantitative data were analyzed using t test and rank test, and qualitative data were analyzed using Chi-square test, then Logistic regression analysis was used for selecting the independent risk factors affecting the prognosis. Based on independent risk factors from Logistic regression model, prognostic model for our patients with chronic liver failure was established.

RESULTS: Independent risk factors included Child-Pugh score, tyrosine, bilirubin separation

ALT, liver cancer, indirect bilirubin, serum sodium and leukocyte. The mortality of patients with LOG model score higher than 9.5 was 72.18%, while the mortality of patients with LOG model score under 9.5 was 13.68%. There was significant difference between the two ($P < 0.05$). Based on LOG model score, 7-9 score was considered as early stage, 10-12 score as middle stage and 13-14 score as advanced stage. The mortality of three stages were 13.68%, 68.91%, and 100%, respectively, which showed significant differences among them ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Child-Pugh score, tyrosine, bilirubin separation ALT, liver cancer, indirect bilirubin, serum sodium and leukocyte are independent risk factors affecting prognosis. LOG model established in our study has better predictability.

Key Words: Chronic liver failure; Prognostic factors; Logistic regression; LOG model

Gao YY, Han T, Kan ZC. Risk factors of prognosis for chronic liver failure. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(29): 3343-3346

摘要

目的: 探讨影响慢性肝衰竭患者预后的独立危险因素, 并建立预测模型。

方法: 选择天津市第三中心医院2002-05/2007-03行人工肝治疗的慢性肝功能衰竭, 且病例资料完整的患者228例, 对其临床资料进行回顾性分析。使用Logistic回归分析筛选影响预后的独立危险因素, 根据筛选出的独立危险因素建立适合我国慢性肝衰竭患者的预测模型。

结果: 影响慢性肝衰竭患者预后的独立危险因素有Child-Pugh评分、血钠值、酪氨酸、是否有胆酶分离、是否合并肝癌、间接胆红素及白细胞。228例慢性肝衰竭患者中大于9.5分者的病死率72.18%, 小于9.5分者的病死率13.68%, 两组比较有显著性差异($P < 0.05$)。患者早期的病死率为13.68%, 中期的病死率

背景资料

肝功能衰竭是由于肝细胞大量坏死而出现肝功能严重受损为特征的综合征, 是严重危害人类健康的疾病之一, 病死率极高。长期以来肝功能衰竭一直是困扰国内外医学界的难题。

同行评议者

胡和平, 教授, 中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆医院消化科

■研发前沿

由于医疗资源的匮乏,尤其是肝源的紧张,使得肝衰竭的治疗举步为艰.如何及时、早期的识别肝衰竭,正确的评估其预后不仅为选择适当的治疗手段提供了依据,同时也为合理的分配医疗资源提供依据.在我国肝衰竭患者中慢性肝衰竭占据大多数,因此对于影响慢性肝衰竭的预后的研究就显得越发重要.

68.91%,晚期的病死率为100%,三组比较有显著性差异($P<0.05$).

结论:本研究建立的LOG模型对慢性肝衰竭患者的预后有很好的预测性.

关键词:慢性肝衰竭; 预后的预测因子; Logistic回归; LOG模型

高艳颖, 韩涛, 阙志超. 慢性肝衰竭患者预后的影响因素. 世界华人消化杂志 2008; 16(29): 3343-3346

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3343.asp>

0 引言

肝功能衰竭是由于肝细胞大量坏死而出现肝功能严重受损为特征的综合征,主要表现为严重的消化道症状,黄疸迅速加深,出血倾向,并先后出现各种并发症的肝功能衰竭征象,是严重危害人类健康的疾病之一^[1].肝功能衰竭反映了肝脏受损严重而再生不足,以及由于全身炎性细胞因子过度表达所致的多脏器功能衰竭过程,病死率极高^[2].长期以来肝功能衰竭一直是困扰国内外医学界的难题,由于医疗资源的匮乏,尤其是肝源的紧张,使得肝衰竭的治疗举步为艰.如何及时、早期的识别肝衰竭,正确的评估其预后不仅为选择适当的治疗手段提供了依据,同时也为合理的分配医疗资源提供依据.在我国肝衰竭患者中慢性肝衰竭占据大多数,因此对于影响慢性肝衰竭的预后的研究就显得越发重要.

1 材料和方法

1.1 材料 回顾性收集天津市第三中心医院2002-05-01/2007-03-01行人工肝治疗的肝功能衰竭的病历资料完整的患者228例,其诊断符合2006年我国肝衰竭指南^[3].其中男性175例,女性53例,男女比例为3.30:1,年龄为22-76(平均 51.24 ± 9.79)岁.228例患者好转119例,死亡109例,总病死率为47.8%.肝衰竭病因以乙型肝炎为主,其中乙型肝炎178(78.07%),丙型肝炎2(0.88%),酒精性肝硬化19(8.33%),自身免疫性肝硬化9(3.95%),隐源性肝硬化6(2.63%)和重叠病因14(6.14%).本研究14例重叠病因包括乙肝+丙肝4例,乙肝+戊肝4例,酒精肝+戊肝2例,酒精肝+乙肝3例,乙肝+自身免疫性肝病1例.

1.2 方法

1.2.1 观察指标:收集该228例患者的一般情况及住院后至第1次人工肝之前的最差临床及生

化指标.包括:白蛋白、球蛋白、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、直接胆红素、间接胆红素、碱性磷酸酶、 γ -谷氨酰转氨酶、胆碱酯酶、前白蛋白、血糖、血钠、血钾、血氯、钙、磷、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、白细胞、血红蛋白、血小板、凝血酶原活动度(PTA)、凝血酶原时间(PT)、纤维蛋白原(FIB)、凝血酶原时间国际标准化比率(INR)、甲胎蛋白、血型、年龄、性别、是否有家族史、是否有肝性脑病、是否合并肝癌、是否有肝肾综合征、是否有消化道出血、是否有腹水、是否有胆酶分离、肝衰竭病因、氨基酸分析、Child-Pugh分值、MELD分值和MELD-Na分值.

1.2.2 Child-Pugh评分、MELD评分、MELD-Na评分的计算:Child-Pugh评分(5-15分):腹水(无、易消退、难消退,分别为1、2、3分),肝性脑病(无、I-II期、III-IV期,分别为1、2、3分),血清白蛋白(≥ 35 g/L、28-35 g/L、 ≤ 28 g/L,分别为1、2、3分),血清胆红素(< 34 $\mu\text{mol/L}$ 、34-51 $\mu\text{mol/L}$ 、 > 51 $\mu\text{mol/L}$,分别为1、2、3分),凝血酶原时间(≤ 14 s、15-17 s、 ≥ 18 s,分别为1、2、3分).MELD计算公式^[4]:MELD分值 = $3.8 \times \ln[\text{胆红素}(\text{mg/dL})] + 11.2 \times \ln(\text{INR}) + 9.6 \ln[\text{肌酐}(\text{mg/dL})] + 6.4 \times (\text{病因:胆汁性或酒精性为0;其他为1})$.MELD-Na计算公式^[5]:MELD-Na分值 = $\text{MELD} + 1.59 \times (135 - \text{Na})$,其中公式规定血Na浓度大于135 mmol/L者按135 mmol/L计算,小于120 mmol/L者按120 mmol/L计算.

统计学处理 应用SPSS13.0统计软件处理.计量资料的比较采用 t 检验和秩和检验,计数资料的比较用卡方检验.对于单因素分析有意义的变量,将变量引入逐步Logistic回归分析,排除变量之间的干扰因素,确立影响肝衰竭预后的独立危险因素.并根据独立危险因素建立预测模型,利用受试者运行曲线(ROC)及曲线下面积(AUC)评估预测模型预测患者预后的准确性.一般认为AUC在0.8-0.9之间的模型被认为有非常好的预测/判断准确性,大于0.7的模型即有临床应用价值, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义.

2 结果

根据Logistic回归筛选的对预后影响的7个因素($P<0.05$)见表1,表中B值为偏回归系数,S.E.为偏回归系数的标准误,Wald用于检验总体偏回归系数与0有无显著性差异,OR为优势

■创新盘点

本文主要对影响慢性肝衰竭的预后因素作一探讨,并根据独立的危险因素建立预测模型,该文章几乎囊括了目前国内所能检测的所有反应肝功能的指标,筛选的指标有一部分以前尚无人报道.

表 1 228例慢性肝衰竭患者Logistic回归分析

	<i>B</i>	<i>S.E.</i>	<i>Wald</i>	<i>P</i>	<i>OR</i>
合并肝癌	1.638	0.523	9.804	0.002	5.145
胆酶分离	2.289	0.445	26.503	0.000	9.864
Child-Pugh	0.831	0.149	31.041	0.000	2.295
IBIL	0.007	0.003	8.403	0.004	1.007
血钠	-0.076	0.028	7.155	0.007	0.927
白细胞	0.100	0.050	4.054	0.044	1.105
酪氨酸	0.012	0.003	17.470	0.000	1.012

表 2 慢性肝衰竭Logistic回归的预测模型(LOG预测模型)

项目	1分	2分
是否有胆酶分离	否	是
是否合并肝癌	否	是
Child-Pugh评分	<11.5	>11.5
IBIL($\mu\text{mol/L}$)	<163.3	>163.3
血钠(mmol/L)	>134.1	<134.1
酪氨酸	<157.4	>157.4
白细胞($\times 10^9/\text{L}$)	<5.9	>5.9

比^[6]。根据独立危险因素建立评价慢性肝衰竭预后的预测模型见表2。LOG预测模型分数为7-14分, 分数越高预后越差, 其中Child-Pugh评分、IBIL、血钠、酪氨酸、白细胞的界值均为其ROC曲线求得特异性和灵敏性相加的最大值(即cutoff值)。本研究建立的LOG模型的ROC曲线下面积为0.854, 具有很好的预测性, 其最佳临界值(即cutoff值)为9.5(图1)。

在本研究中228例慢性肝衰竭患者中大于9.5分者133例, 死亡96例, 病死率72.18%, 而小于9.5分者95例, 死亡13例, 病死率13.68%, 两组比较有显著性差异($P<0.05$)。把患者根据LOG模型分为三期, 7-9分者为早期, 10-12分者为中期, 13-14分者为晚期, 可与慢性肝衰竭的早、中、晚三期对应, 其中早期95例, 死亡13例, 病死率为13.68%, 中期119例, 死亡82例, 病死率68.91%, 晚期14例, 死亡14例, 病死率为100%, 三组比较有显著性差异($P<0.05$)。

3 讨论

由于影响肝衰竭预后的各因素之间的相互作用, 故单因素分析已不能满足临床分析的需要。本组228例慢性肝衰竭患者经Logistic回归最后得出Child-Pugh评分、是否有胆酶分离、是否合并肝癌、间接胆红素、酪氨酸、白细胞、血钠值是影响慢性肝衰竭预后的独立危险因素。其

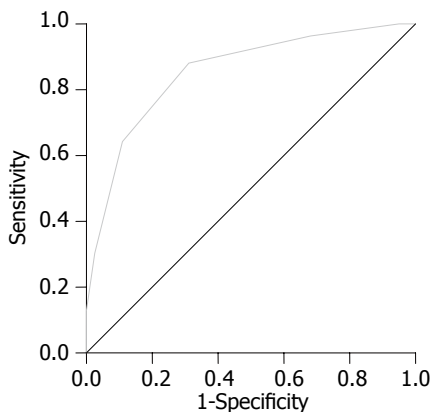


图 1 本研究建立的LOG模型的ROC曲线(AUC值为0.854)。

应用要点

根据本文建立的预测模型对慢性肝衰竭患者进行评分, 从而对其预后尽早作出评估, 为选择治疗方案提供依据。

中合并肝癌的患者预后差这已经是大家的共识。而胆酶分离现象也是肝细胞大面积坏死的表现, 提示预后极差。酪氨酸是芳香族氨基酸的一种, 其升高是肝衰竭患者大面积肝细胞坏死的表现, 国外也有类似的报道^[7]。多数报道都认为在肝衰竭患者中其支链氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸)减少, 芳香族氨基酸(酪氨酸和苯丙氨酸)升高, 本研究也发现此规律, 但经统计学处理真正对预后影响的只有酪氨酸, 酪氨酸越高预后越差。由于Child-Pugh评分是复合指标, 所以其中涵盖的指标包括白蛋白、肝性脑病、腹水、总胆红素、PT也对预后有很大影响。此评分系统也被公认为评价肝功能储备的灵敏指标。本组研究发现间接胆红素升高是预后不良的独立危险因素, 日本学者近年来也提出DBIL与TBIL的比值能够反映肝细胞的转化功能, 认为比值高时肝细胞有一定的转化功能, 预后佳。其原因在于高胆红素血症是肝功能不良的标志, 而总胆红素中如果以直接胆红素为主, 常可能存在胆汁郁积, 间接胆红素为主才是肝细胞坏死的标志。本研究发现白细胞的数值是影响预后的独立危险因素, 白细胞越高预后越差。肝衰竭患者常合并原发性腹膜炎, 内毒素血症和全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response, SIRS), 文献报道慢性肝衰竭SIRS的发生率为30%-50%^[8], 多种感染性因素和非感染性因素均能诱发SIRS, 炎症介质在SIRS的发生发展中起着核心作用^[9-10], 此类患者出现脑水肿^[11]和多脏器功能衰竭^[12]的机会更大, 死亡率更高, 故积极有效的控制感染是决定预后的关键。在本研究中我们发现血钠的作用是十分重要的。慢性肝衰竭发生低钠血症多为稀释性低钠, 而低钠血症常是肝肾综合征早期的表现^[13-14]。Selcuk *et al*进行了123例终末期肝病患者的研究

■同行评价

本文探讨了慢性肝衰竭患者的独立危险因素,并建立了预后预测模型,对临床有一定指导意义。

指出血钠值不仅仅是影响预后,影响生存时间的重要因素,而且是肝移植后早期肝功能恶化的灵敏的标志^[15]。

由于我国肝衰竭的病因和分型与国外差别很大,故国际上通用的一些模型对我国肝衰竭患者的预后评价并不尽如人意。我国的肝衰竭以慢性肝衰竭为主,我们根据慢性肝衰竭患者预后的独立危险因素建立预测模型(LOG模型)。LOG模型中包含是否有胆酶分离、是否合并肝癌、Child-Pugh评分、IBIL、血钠、酪氨酸、白细胞七项指标,分数越高预后越差。当诊断为慢性肝衰竭时,可使用LOG模型进行评分,按评分进行分期,当分期定为早期的患者生存希望很大,经治疗其肝衰竭应该可以逆转,中期的患者死亡率已经很高,必须积极治疗,包括人工肝的治疗,包括积极预防和纠正各种并发症,如果患者肝功能进一步恶化应实行肝移植,以免延误时机,而晚期的患者几乎没有生存的希望,应尽早动员其行肝移植,而对于没有肝移植条件的患者内科保守治疗包括人工肝治疗几乎都是无效的。本研究建立的LOG模型与以往的模型的最大区别为其包括胆酶分离。胆酶分离是在治疗一段时间后观察其转氨酶和胆红素之间变化得出的结论,也是常常用来评估治疗是否有效的指标之一。我们经常会见到一些重症患者虽然开始时各项指标很差但治疗后很快好转,或是一些患者开始情况并不很差,但随着治疗却每况愈下,这就说明对于治疗的反应也是影响预后的因素之一,对于一个患者的病情发展应动态观察,仅以刚刚入院时的化验指标往往不能确切的反应患者的预后。

在我们的研究中也发现有一部分患者他们的诊断还未达到肝衰竭的标准,但是有早期肝衰竭的倾向,对于此类患者在治疗上不能有丝毫懈怠,应完全按肝衰竭处理,事实证明越早治疗患者预后越好。总之对于肝衰竭的治疗主张内科治疗-人工肝-肝移植的模式,但由于目前尚无统一的治疗规范,如何掌握人工肝、肝移植的指征及时机,就要求我们对肝衰竭有正确的认识,对其预后有准确的评估,从而在卫生资源匮乏的今天,才能做到既不浪费血制品和肝源,又能保证肝衰竭患者的生命及健康。

4 参考文献

- 1 李保森,邹正升,张伟,赵军,常彬霞,唐彦,尚丽丹. 215例急性和亚急性重型肝炎临床特征对比性分析. *中华实验和临床病毒学杂志* 2006; 20: 244-246
- 2 胡万峰,周亚珍. 全身炎症反应综合征对慢性重型肝炎预后的影响. *中西医结合肝病杂志* 2007; 17: 51-52
- 3 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组,中华医学会肝病学会分会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊疗指南. *中华肝脏病杂志* 2006; 9: 643-646
- 4 Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, D'Amico G, Dickson ER, Kim WR. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology* 2001; 33: 464-470
- 5 Ruf AE, Kremers WK, Chavez LL, Descalzi VI, Podesta LG, Villamil FG. Addition of serum sodium into the MELD score predicts waiting list mortality better than MELD alone. *Liver Transpl* 2005; 11: 336-343
- 6 陈平雁. SPSS13.0统计软件应用教程. 第1版. 人民卫生出版社, 2006: 196-208
- 7 Clemmesen JO, Larsen FS, Ejlersen E, Schiodt FV, Ott P, Hansen BA. Haemodynamic changes after high-volume plasmapheresis in patients with chronic and acute liver failure. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997; 9: 55-60
- 8 Foreman MG, Mannino DM, Moss M. Cirrhosis as a risk factor for sepsis and death: analysis of the National Hospital Discharge Survey. *Chest* 2003; 124: 1016-1020
- 9 Fehrenbach E, Schneider ME. Trauma-induced systemic inflammatory response versus exercise-induced immunomodulatory effects. *Sports Med* 2006; 36: 373-384
- 10 Inoue K, Takano H, Shimada A, Yanagisawa R, Sakurai M, Yoshino S, Sato H, Yoshikawa T. Urinary trypsin inhibitor protects against systemic inflammation induced by lipopolysaccharide. *Mol Pharmacol* 2005; 67: 673-680
- 11 Shawcross DL, Davies NA, Williams R, Jalan R. Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis. *J Hepatol* 2004; 40: 247-254
- 12 赵志义,郭巧英,王雪梅. 慢性重型肝炎并发多器官功能衰竭48例临床分析. *宁夏医学杂志* 2007; 6: 534-535
- 13 Biggins SW, Kim WR, Terrault NA, Saab S, Balan V, Schiano T, Benson J, Therneau T, Kremers W, Wiesner R, Kamath P, Klintmalm G. Evidence-based incorporation of serum sodium concentration into MELD. *Gastroenterology* 2006; 130: 1652-1660
- 14 Vaquero J, Chung C, Cahill ME, Blei AT. Pathogenesis of hepatic encephalopathy in acute liver failure. *Semin Liver Dis* 2003; 23: 259-269
- 15 Selcuk H, Uruc I, Temel MA, Ocal S, Huddam B, Korkmaz M, Unal H, Kanbay M, Savas N, Gur G, Yilmaz U, Haberal M. Factors prognostic of survival in patients awaiting liver transplantation for end-stage liver disease. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 3217-3223

编辑 李军亮 电编 郭海丽

导丝在降低逆行胰胆管造影并发症中的意义

侯森林, 高永平, 乔娜, 乔占英, 康建省, 张立超

侯森林, 高永平, 乔娜, 乔占英, 康建省, 张立超, 河北医科大学第二医院微创外科 河北省石家庄市 050000

作者贡献分布: 侯森林主持设计, 研究, 总结完成论文撰写; 高永平与乔娜协助参加设计, 研究, 论文撰写; 乔占英与康建省指导, 协调研究过程; 张立超负责整理资料及数据统计学分析.

通讯作者: 侯森林, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学第二医院微创外科. housenlin2006@126.com
电话: 0311-66002386

收稿日期: 2008-07-30 修回日期: 2008-09-10

接受日期: 2008-09-17 在线出版日期: 2008-10-18

Role of guide-wire in lowering complications of endoscopic retragrade cholangiopancreatography

Sen-Lin Hou, Yong-Ping Gao, Na Qiao, Zhan-Ying Qiao, Jian-Sheng Kang, Li-Chao Zhang

Sen-Lin Hou, Yong-Ping Gao, Na Qiao, Zhan-Ying Qiao, Jian-Sheng Kang, Li-Chao Zhang, Department of Minimally Invasive Surgery, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Correspondence to: Sen-Lin Hou, Department of Minimally Invasive Surgery, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. housenlin2006@126.com

Received: 2008-07-30 Revised: 2008-09-10

Accepted: 2008-09-17 Published online: 2008-10-18

Abstract

AIM: To investigate the significance of guide-wire in reducing complications of endoscopic retragrade cholangiopancreatography (ERCP).

METHODS: Eight hundred and fifty one cases undergoing guide-wire procedure were taken as the guide-wire group while 327 cases without guide-wire procedure were taken as conventional treatment group. Incidence rates of complications between the two groups were analyzed.

RESULTS: Incidence of pancreatitis, cholangitis, stone incarceration and total complication rate were significantly lower in the guide-wire group than in the conventional treatment group (2.47% vs 4.90%, 1.41% vs 3.67%, 0% vs 0.61%, 4.70% vs 10.40%, all $P < 0.05$). The bleeding rate and perforation of duodenum were also lower in the

guide-wire group but no statistical significance was observed.

CONCLUSION: Guide-wire flexibly reduces incidence rate of complications and the effect is prominent.

Key Words: Guide-wire; Endoscopic; Endoscopic retragrade cholangiopancreatography; Complication

Hou SL, Gao YP, Qiao N, Qiao ZY, Kang JS, Zhang LC. Role of guide-wire in lowering complications of endoscopic retragrade cholangiopancreatography. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(29): 3347-3350

摘要

目的: 探讨导丝在降低逆行胰胆管造影(ERCP)并发症中的意义.

方法: 收集应用导丝操作ERCP的患者851例, 为导丝组; 未应用导丝ERCP患者327例, 为常规组, 比较两组并发症发生率的差异.

结果: 导丝组胰腺炎、胆管炎、结石嵌顿发生率及并发症总发生率明显低于常规组(2.47% vs 4.90%, 1.41% vs 3.67%, 0% vs 0.61%, 4.70% vs 10.40%, 均 $P < 0.05$), 出血、穿孔发生率亦低于常规组, 但无统计学差异.

结论: 在ERCP操作中灵活应用导丝可降低其并发症的发生, 且效果显著.

关键词: 导丝; 内窥镜; 逆行胰胆管造影; 并发症

侯森林, 高永平, 乔娜, 乔占英, 康建省, 张立超. 导丝在降低逆行胰胆管造影并发症中的意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16(29): 3347-3350

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3347.asp>

0 引言

近年来随着内镜性能及辅助治疗设备的不断改善和术者技术的不断提高, 逆行胰胆管造影(ERCP)已成为诊断治疗胆胰疾病的重要手段, 正逐渐发挥着越来越重要的作用. 但ERCP的并发症限制了ERCP的广泛应用. 导丝作为ERCP

■背景资料

逆行胰胆管造影(ERCP)已成为诊断治疗胆胰疾病的重要手段, 正逐渐发挥着越来越重要的作用. 但ERCP的并发症限制了ERCP的广泛应用.

■同行评议者

郭晓钟, 教授, 沈阳军区总医院消化内科

■研发前沿

导丝作为ERCP操作中常用的器械之一,在ERCP操作中发挥举足轻重的作用.本文论述了灵活应用导丝在降低ERCP并发症中的意义.

■相关报道

导丝在ERCP操作中应用越来越广泛,在临床工作中有较大的意义.国内外学者在大部分的文章中重点介绍了导丝在ERCP中的应用技巧及重要性,他们的技巧也是很实用的.

操作中常用的器械之一,在ERCP操作中发挥举足轻重的作用.本文就灵活应用导丝在降低ERCP并发症中的意义做一分析.

1 材料和方法

1.1 材料 2003年以前临床遇到的病例327例ERCP为常规组;自2003-06/2007-06主动使用导丝的ERCP操作851例为导丝组,其中男469例,女382例,年龄为9-99岁.其中行单纯ERCP者75例;ERCP+经内镜十二指肠括约肌切开术(EST)者47例;ERCP+经内镜鼻胆管引流术(ENBD)者59例;ERCP+EST+网篮取石者451例;ERCP+EST+经内镜胆管支架引流术(ERBD)者141例;ERCP+EST+经内镜下管金属支架引流术(EMBE)者78例.操作者均为同一操作组,两组的性别比、年龄、进行的操作项目经统计学检验无显著差异. TJF-240型电子十二指肠镜由日本OLMPUS公司生产;黄斑马导丝由BOSTON公司生产;白泥鳅导丝由COOK公司生产、黑泥鳅超滑导丝由日本TERUMO公司生产等.

1.2 方法 常规组就是不用导丝或者在特别需要时如置放支架时才用导丝,导丝组是指在造影、十二指肠乳头括约肌切开、取石、置入支架等操作时主动应用导丝,具体方法如下.

1.2.1 导丝的手法:抖动,为了使导丝尖端越过狭窄部,前后方向稍稍抖动,并在抖动过程中推进导丝,这样可以使导丝尖端寻找开口部位深入狭窄部,抖动和推进导丝时幅度和用力皆应恰到好处;捻进,当导丝尖已对位,由于狭窄较严重或狭窄段较长,单纯用力推进导丝难以通过,采用顺逆时针方向轻轻捻进导丝,捻进又分为轻捻和重捻.很多时候是抖动、捻进、出入有机的配合才能完成;合并切开刀、取石球囊、导管等器械,可以利用这些器械增加导丝的强度和改变其方向.

1.2.2 插管造影:选择性插入胆管或选择性插入胰管尤其是乳头有病变或乳头旁有憩室、憩室内乳头、副乳头的插管,可以应用COOK公司生产的白泥鳅导丝或TERUMO导丝,利用导丝前端富有弹性、无组织损伤性及湿润时非常光滑的特点,伸出导管前端1-2 mm采用送进和捻进的手法,通过手腕的抖动即可找到胆管开口;有时导丝反复进入胰管而不进入胆管,可以将导丝放在胰管内,使乳头更好地暴露、固定,改善胆管的走行方向,更容易选择胆管的方向.导丝进入胆管中段注入造影剂,如果结石较小,透视

下将导丝放在结石之上,再沿导丝进入导管再注药以免把结石顶入肝内胆管.

1.2.3 越过狭窄深部插入胆管或胰管:高位胆管梗阻或胰管梗阻患者越过狭窄进入深部插管,或选择性进入左肝管或右肝管困难,此时应用各种手法直接插入,失败者可以联合应用取石球囊、切开刀(尤其是BOSTON公司生产的可旋转方向的切开刀)、导管来改变方向,也可以换成COOK公司生产的白泥鳅超滑导丝或TERUMO导丝.

1.2.4 内镜下乳头括约肌切开术(endoscopic sphincterotomy, EST):应用导丝深插胆管内可以减少切开刀的脱出,避免误切开胰管;同时避免反复插入胆管,减少了操作时间和胰腺炎的发生.也可以将导丝先放在胆管内,切开的同时借助导丝来调整十二指肠乳头的切开方向.

1.2.5 取石:胆总管内小结石尤其是肝内胆管取石或胰管结石时可以先用导丝越过结石,再沿导丝置入球囊或可过导丝的网篮,将结石取出.先有导丝在胆管后应用网篮取石可以减少结石嵌顿的发生,并可以通过导丝顺利放入鼻胆管.

1.2.6 狭窄扩张及置支架:此时导丝应用0.035 in的导丝,越过狭窄后,应用探条进行逐级扩张后,置入支架;对于肝门部的狭窄有时需要多支架的置入,可以用FUSION系统,也可以先置入两根导丝分别到不同的胆管,先置入1根支架,再进入1根导丝后再置入支架总有2根导丝在胆管内就可以完成多支架的置放.

统计学处理 采用 χ^2 检验分析导丝组与常规组之间的成功率及并发症发生率的差异, $P<0.05$ 为差异显著.

2 结果

ERCP成功:根据患者诊断和治疗的要求进行ERCP操作如EST、取石、置支架等,达到了预期的目标视为成功.

ERCP并发症的诊断^[1]:胰腺炎:ERCP术后血淀粉酶升高超过500索氏单位,出现的中上腹部痛持续性24 h以上.腹痛伴恶心、呕吐,左上腹部压痛,伴或不伴有肌紧张.腹部B超及CT检查可见胰腺明显肿大、周围水肿明显、间隙消失、粘连、胰腺实质内可见点泡状液化坏死腔.胆管炎:发热、畏寒、血清转氨酶升高和或术后8 h血培养阳性.前者有急性胆管炎症状伴WBC总数、中性粒细胞升高和巩膜黄染加深,后者除症状及体征加重外,伴有中毒性休克的

表 1 导丝组与常规组发生并发症的比较 (%)

	导丝组	常规组	χ^2	<i>P</i>
成功率	96.12(818/851)	91.44(299/327)	10.56	<0.05
胰腺炎	2.47(21/851)	4.90(16/327)	4.56	<0.05
胆管炎	1.41(12/851)	3.67(11/327)	4.71	<0.05
出血	0.71(6/851)	1.22(4/327)	0.264	>0.05
穿孔	0(0/851)	0.31(1/327)	2.60	>0.05
结石嵌顿	0(0/851)	0.61(2/327)	5.21	<0.05
并发症总发生率	4.70(40/851)	10.40(34/327)	13.02	<0.05

表现. 出血: 术中出血不能镜下成功止血或迟发性出血, 迟发性出血是指EST术后24 h、数天甚至数周后才发现, 这类出血只有呕血、黑便甚至休克才发现, 因此出血量往往较大. 穿孔: 腹痛、腹胀、发热、腹膜刺激征、白细胞计数升高等临床表现外, X线或腹平片有隔下游离气体. 导丝组成功率明显高于常规组($P<0.05$), 导丝组胰腺炎、胆管炎、结石嵌顿发生率及总并发症发生率均低于常规组($P<0.05$). 出血、穿孔发生率也低于常规组, 但没有统计学差异(表1).

3 讨论

B超、CT、磁共振胆胰管成像(magnetic resonance cholangiopancreatography, MRCP)检查具有非侵袭性地检查胰胆管的优点, 使诊断性ERCP逐渐减少. 但治疗性ERCP有着创伤小、恢复快、治疗效果“立竿见影”、成功率高等优势, 受到了欢迎. ERCP是一个微创技术, 也是有创的, 因此并发症的发生是每一个操作者首要考虑的问题. 只有降低了并发症才能将此技术推广得更深入^[2-3]. 导丝是ERCP术的“生命线”, 作为内镜常用的器械发挥了重要的作用, 此研究提示灵活应用导丝提高了成功率、减少了并发症的发生^[4].

胰腺炎的发生是ERCP最常见的并发症, Johnson *et al*^[5]分析了1979例ERCP发生急性胰腺炎并发症的原因, 认为胰管显影1次者胰腺炎发病率为1.3%, 5-7次增至9.7%, 超过10次者高达19.5%. 胰腺炎发生下列因素有关^[2-3]: 多次插管和胰管多次显影、反复的胰管显影导致胰管压力过高过量的造影剂损害了胰管和腺泡上皮细胞; 机械性损伤胰管开口; 预备性切开、EST时胰管开口及周围黏膜误伤或过度灼伤.

本研究提示灵活应用导丝能降低胰腺炎的发生. 导丝前端具有富有弹性、无组织损伤性及湿润时非常光滑的功能. 可以探索胆管或胰

管的腔隙进入胆管或胰管、穿过阻塞或狭窄处, 引导附件通过提高成功率^[6]. 把导管放在乳头开口部位, 可以向11点的方向进入导丝来引导进入胆管. 反复进胰管者, 先将导丝放在胰管内, 使乳头更好地暴露、固定, 改善胆管的走行方向, 然后就很容易选择胆管的方向进行插管. 通过导丝可以更准确地将各种治疗器械导入目标管道内, 减少了插管的次数.

利用导丝进行各种器械的交换, 使操作更准确, 更安全. 可以减少反复寻找目标胆管或胰管而重新插管的次数. 如造影时直接应用聪明刀带导丝可以造影后根据需要确定是否进行切开, 如果需要切开将导丝插入胆管, 切开刀就不易滑出胆管; 如果切开后还需要进行治疗, 可以将导丝再次深插入胆管或胰管内退出切开刀, 更换为相应的器械, 如: 根据病情需要进入扩张探条进行胆管扩张等. 操作过程中切记不能脱出导丝, 导丝在十二指肠腔内尽量保持短直状态尤其避免形成袢, 有时候导丝脱出很难再进入原来的管道. 导丝的不透X光的特性, 可以减少造影剂的应用. 根据导丝游走方向来判断胰胆管方向, 这样可以明显减少因造影剂对胰管过度充盈造成管内高压及造影剂的毒性作用损伤管壁上皮及腺泡, 同时由于黄斑马导丝先端极其柔软并具有亲水性, 对胰管壁损伤很小, 使术后胰腺炎及高淀粉酶血症的发生率得以减少.

胆管炎是ERCP术后又一重要的并发症, 他的发生通常是由于器械污染、胆管内注入过量的造影剂、胆管狭窄或胆管结石碎石未取净引起胆汁引流不畅、引流范围小于全肝的40%等^[2-3], 这样细菌将驻留并繁殖造成感染. 一旦发生, 在积极抗感染的同时, 应采取有效的引流措施.

造影时, 导丝进入胆管中段注入造影剂, 如果结石较小, 透视下将导丝放在结石之上, 再沿导丝进入导管再注药以免把结石顶入肝内胆管, 行乳头切开后, 沿导丝进入取石器械, 以免漏掉

■应用要点

导丝本身的特点, 如前端光滑、柔软无组织损伤性及富有弹性, 前端的后面有较硬的钢丝及导丝的不透X光性等再加上文中所介绍应用的技巧, 在减低并发症的发生率起到了重要的作用. ERCP及其相关技术已在各大医院广泛开展, 成为胰胆疾病治疗的主要手段之一, 使无数的肝胆胰腺疾病患者得到明确的诊断和有效的治疗, 因此有广阔的应用前景.

■同行评价

本文属于回顾性研究, 贴近临床实际, 资料较为详实、完整, 着力解决临床实际问题, 具有极强的临床指导及借鉴意义。

小结石. 深部插管尤其是肝门部肿物需要放置支架时, 也是应用导丝前端光滑、柔软等的优点利用轻捻、重捻、适当推进、抖动等手法进入, 有时需要结合球囊、切开刀、造影管等器械来改变导丝的走行方向进入目标胆管. 与其他器械配合应用时要注意调节导丝与导管的距离、切开刀钢丝的张力大小、球囊的不同插入深度, 使导丝直接进入目标胆管, 也可以多插进一段导丝使其反弹折叠成圈、成勾进入目标胆管^[7], 直头导丝易进入右肝内胆管, 弯头导丝结合其他器械易进入左肝内胆管, 导丝进入目标胆管是操作顺利、达到预期诊治效果的关键, 在肝门部的肿瘤需要双支架或多支架的置入时可以应用双导丝来完成^[8], 可以利用导丝技术进行尽量多位点的引流, 扩大引流范围, 同时导丝的不透X光的特性, 可以减少造影剂的应用, 在最大限度内减少了胆管炎的发生。

EST并发症中以出血最为常见, 出血的原因较多^[2]: 有解剖因素、技术因素、疾病因素等, 包括凝血机制障碍、急性胆管炎症或操作中电流运用不合理、乳头切开太快或切口方向不佳, 以及采用预备切开或用针状刀切开等. 穿孔的发生率与乳头狭窄、乳头旁憩室、切开方向偏离等有关. 预测穿孔的危险性有可疑括约肌功能不全, 年龄大, 括约肌切开、操作时间长有关, 其中以括约肌切开的危险性最大. 导丝前端的后面是钢丝, 可以利用导丝的钢性来改变十二指肠乳头的方向, 避免损伤憩室边缘、控制切开速度和及时调整切开方向. 从而使造影、切开更顺利. 乳头因为憩室、手术、肿瘤等因素偏位; 乳头突出过于柔软易移动; 难以向11点方向切开; 可以先把导丝放在胆管内, 通过胆管内留置的导丝将乳头控制在视野的中央, 乳头的可动性受到抑制, 在进行EST时, 有时乳头位置比较偏或在乳头上有十二指肠黏膜环形皱襞不能完全切开时, 可以将导丝放在胆管内来改变乳头的方向, 从而向理想的方向切开理想的长度, 避免出血和穿孔。

结石及取石网篮嵌顿发生率较低, 主要发生于胆管下端狭窄、结石较大且较硬, 用网篮套住结石后嵌顿在胆管下端, 无法松开及退出网篮, 一旦发生可改用体外碎石, 但也有失败者, 常规组中有1例结石过硬体外碎石器亦不能挤碎结石, 另1例患者不能耐受较硬的应急碎石网套而行紧急手术取出网篮及结石. 目前我们的做法是沿导丝进入球囊, 将球囊充气至欲取出结石的大小后下拉球囊, 如果较顺利拉出乳头外, 则结石可以取, 如果困难, 就把导丝预先放在胆管内, 然后再置入网篮试取石, 可以减少结石嵌顿的发生. 即使取不出结石还可以沿导丝置入鼻胆管行外引流。

ERCP及其相关技术已在各大医院广泛开展, 成为胰胆疾病治疗的主要手段之一, 使无数的肝胆胰腺疾病患者得到明确的诊断和有效的治疗. 我们应不断的探索、总结、完善导丝的操作技巧, 灵活应用导丝、提高操作技术、降低并发症的发生率。

4 参考文献

- 1 苏秉忠, 陈平, 黄应龙, 于金华, 马丽丽. ERCP术后相关并发症分析及处理. 中国消化内镜 2007; 1: 16-18
- 2 李国熊, 张啸. ERCP并发症及防治对策. 中国内镜杂志 2005; 11: 824-827
- 3 陈锦武, 陈其奎. 内镜逆行胰胆管造影术后并发症及其防治. 国际消化病杂志 2005; 25: 397-399
- 4 Maeda S, Hayashi H, Hosokawa O, Dohden K, Hattori M, Morita M, Kidani E, Ibe N, Tatsumi S. Prospective randomized pilot trial of selective biliary cannulation using pancreatic guide-wire placement. *Endoscopy* 2003; 35: 721-724
- 5 Johnson GK, Geenen JE, Johanson JF, Sherman S, Hogan WJ, Cass O. Evaluation of post-ERCP pancreatitis: potential causes noted during controlled study of differing contrast media. *Midwest Pancreaticobiliary Study Group. Gastrointest Endosc* 1997; 46: 217-222
- 6 唐采白, 胡兵, 郭召军. 导丝技术在ERCP操作中应用技巧. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1027-1029
- 7 王书智, 胡冰. 导丝在经内镜逆行胰胆管操作中应用技巧的探讨. 中华消化内镜杂志 2004; 21: 39-40
- 8 Gyökeres T, Duhl J, Varsányi M, Schwab R, Burai M, Pap A. Double guide wire placement for endoscopic pancreaticobiliary procedures. *Endoscopy* 2003; 35: 95-96

编辑 李军亮 电编 何基才

溃疡性结肠炎患者血浆MMP-1与TIMP-1测定的意义

王英德, 谭晓燕, 张可

王英德, 谭晓燕, 大连医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省大连市 116011

张可, 大连大学附属新华医院消化内科 辽宁省大连市 116021

通讯作者: 王英德, 116011 辽宁省大连市西岗区中山路222号, 大连医科大学附属第一医院消化内科. albertwyd@yahoo.com.cn
电话: 0411-83635963-3162

收稿日期: 2008-08-20 修回日期: 2008-09-16

接受日期: 2008-09-22 在线出版日期: 2008-10-18

Clinical significance of plasma MMP-1 and TIMP-1 measurement in patients with ulcerative colitis

Ying-De Wang, Xiao-Yan Tan, Ke Zhang

Ying-De Wang, Xiao-Yan Tan, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China
Zhang Ke, Department of Gastroenterology, the Affiliated Xinhua Hospital of Dalian University, Dalian 116021, Liaoning Province, China

Correspondence to: Ying-De Wang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, 222 Zhongshan Road, Xigang District, Dalian 116011, Liaoning Province, China. albertwyd@yahoo.com.cn
Received: 2008-08-20 Revised: 2008-09-16

Accepted: 2008-09-22 Published online: 2008-10-18

Abstract

AIM: To determine the plasma level of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and its tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in patients with ulcerative colitis (UC) and to investigate their clinical significance.

METHODS: ELISA assay was used to determine the plasma MMP-1 and TIMP-1 level in the peripheral venous blood samples from 30 pathologically confirmed UC patients and 15 normal healthy controls.

RESULTS: Plasma levels of MMP-1 and TIMP-1 were significantly higher in patients with UC than in normal controls (2.4421 ± 0.5394 vs 1.8967 ± 0.3737 , 6.3728 ± 0.4940 vs 5.5917 ± 0.2968 , both $P < 0.05$); Plasma level of TIMP-1 was positively correlated with the severity of the disease ($t = 4.097$, $P < 0.05$), but that of MMP-1 wasn't; Plasma level of MMP-1 in moderate to severe

patients was significantly higher than that in controls, but no significant difference was found between mild patients and control groups.

CONCLUSION: Plasma level of MMP-1 and TIMP-1 are significantly elevated in patients with UC; Plasma MMP-1, particularly plasma TIMP-1 could be considered as simple biological parameters for the severity and clinical diagnosis of UC.

Key Words: Ulcerative colitis; Matrix metalloproteinase-1; Tissue inhibitor of metalloproteinase-1; ELISA assay

Wang YD, Tan XY, Zhang K. Clinical significance of plasma MMP-1 and TIMP-1 measurement in patients with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(29): 3351-3353

摘要

目的: 检测溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 患者血浆基质金属蛋白酶-1 (MMP-1) 及其组织抑制因子-1 (TIMP-1) 水平。

方法: 采集经临床表现、肠镜及病理诊断的 UC 患者 30 例以及正常人 15 例的外周静脉血, ELISA 法测定血浆 MMP-1 和 TIMP-1 水平。

结果: UC 患者血浆 MMP-1、TIMP-1 水平明显高于对照组 (2.4421 ± 0.5394 vs 1.8967 ± 0.3737 , 6.3728 ± 0.4940 vs 5.5917 ± 0.2968 , 均 $P < 0.05$); UC 患者血浆 TIMP-1 水平与病情严重程度呈正相关 ($t = 4.097$, $P < 0.05$), 而血浆 MMP-1 水平与病情严重程度无相关性; 中-重型患者血浆 MMP-1 水平明显升高, 而轻型患者血浆 MMP-1 的水平较对照组无明显的差别。

结论: UC 患者血浆中 MMP-1 与 TIMP-1 呈现高表达; 血浆 MMP-1, 特别是 TIMP-1 可能成为判断 UC 严重程度以及临床诊断简单易行的外周血生物学指标。

关键词: 溃疡性结肠炎; 基质金属蛋白酶-1; 基质金属蛋白酶组织抑制因子-1; ELISA

王英德, 谭晓燕, 张可. 溃疡性结肠炎患者血浆 MMP-1 与

■背景资料

研究表明, 基质金属蛋白酶-1 (MMP-1) 和基质金属蛋白酶-1 组织抑制剂 (TIMP-1) 在溃疡性结肠炎 (UC) 患者结肠组织中表达明显增加, 因而认为二者在 UC 的发病过程中其重要的作用。结肠组织中 MMP-1 和 TIMP-1 的高表达应该在外周血中反映出来。因此, 本研究测定并探讨 UC 患者血浆 MMP-1 和 TIMP-1 水平的变化及其意义。

■同行评议者

高峰, 副教授, 新疆维吾尔自治区人民医院消化科

■研发前沿

有关基质金属蛋白酶(MMPs)及其组织抑制剂(TIMPs),特别是MMP-1和TIMP-1,与UC的发病关系的研究成为近年来国内外研究的热点.

TIMP-1测定的意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(29): 3351-3353
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3351.asp

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种原因不明的直肠和结肠慢性非特异性炎症性疾病,病变主要限于大肠黏膜与黏膜下层,临床主要表现为腹泻、黏液脓血便及腹痛,病情轻重不等,多呈反复发作的慢性病程. 迄今为止,动物实验及临床研究表明,在UC结肠病变黏膜组织中,多种MMPs及TIMPs的表达均增加,并以MMPs的增加更为明显;而在非病变区MMPs及TIMPs的表达相对较低, MMPs/TIMPs的比例失衡已被认为可能是UC发生发展的重要机制之一^[1-4]. 国外学者研究结果显示UC患者外周血MMP-1及TIMP-1水平增高^[5-6]. 目前,国内有关UC患者外周血MMP-1及TIMP-1水平测定的研究尚少. 本文采用ELISA法测定UC患者血浆MMP-1、TIMP-1水平,探讨二者在UC中的意义.

1 材料和方法

1.1 材料 选择根据临床表现、肠镜及病理学检查诊断为UC的患者30例,男14例,女16例,平均年龄49.37±15.56岁,全结肠病变4例,右半结肠病变2例,直乙状结肠病变17例,直肠病变7例. 全部病例符合2000年成都《对溃疡性结肠炎诊断治疗规范的建议》,并根据诊断标准将30例UC患者分为轻型(12例)及中-重型(18例)两组. 选择肠镜及病理学检查均阴性的正常人15例作为对照组,男性6例,女性9例,平均年龄46.52±17.56岁.

1.2 方法 采集被检者外周静脉血,ELISA法测定血浆MMP-1、TIMP-1水平. 试剂盒购自美国R&D公司,操作步骤按照试剂盒说明书进行.

统计学处理 采用单因素方差分析及Spearman相关性分析,均以 $P<0.05$ 具有统计学意义.

2 结果

2.1 UC患者与对照组血浆MMP-1与TIMP-1水平的测定 UC患者血浆MMP-1与TIMP-1水平均明显地高于正常对照组($P<0.05$,表1).

2.2 血浆MMP-1与TIMP-1水平在不同病情患者中的测定 中-重型患者血浆MMP-1水平显著高于正常对照组与轻型($P<0.05$),轻型患者血浆MMP-1水平较对照组无统计学差异($P>0.05$). 轻型与中-重型患者血浆TIMP-1水平显著高于正

表1 UC患者与正常对照组血浆MMP-1与TIMP-1水平

分组	血浆MMP-1	血浆TIMP-1
UC	2.4421 ± 0.5394 ^a	6.3728 ± 0.4940 ^a
对照组	1.8967 ± 0.3737	5.5917 ± 0.2968

^a $P<0.05$ vs 对照组.

表2 不同病情UC患者血浆MMP-1与TIMP-1水平

血浆	MMP-1	TIMP-1
轻型	2.2063 ± 0.3952 ^{ac}	6.1411 ± 0.4839 ^{ac}
中重型	2.6778 ± 0.6835 ^c	6.6044 ± 0.5041 ^c
对照组	1.8967 ± 0.3737	5.5917 ± 0.2968

^a $P<0.05$ vs 中重型; ^c $P<0.05$ vs 对照组.

常对照组($P<0.05$),中-重型患者血浆TIMP-1水平明显高于轻型患者($P<0.05$,表2).

2.3 血浆MMP-1、TIMP-1及与病情严重程度相关性分析 血浆TIMP-1水平与UC患者病情严重程度呈显著正相关($t = 4.097, P = 0.000<0.05$),相关系数为0.658,即病情越重血浆TIMP-1水平越高;而血浆MMP-1水平与UC患者病情严重程度无相关性($P>0.05$).

3 讨论

UC是一种慢性非特异性炎症性肠病,病理下可见有炎症细胞浸润,上皮细胞增生,伴有上皮结缔组织的重构,以及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分的降解. 其中,ECM的降解主要由MMPs来完成,当ECM的降解程度大于合成时,将导致组织的破坏如溃疡的形成. MMPs是一组由结缔组织细胞分泌,参与细胞外基质成分降解的一族锌依赖性内肽酶,主要由成纤维细胞、软骨细胞、内皮细胞、巨噬细胞和粒细胞等合成和分泌. 其中MMP-1又称间质胶原酶,主要降解胶原I、II、III和X,使他们对明胶酶(MMP-2、MMP-9)敏感. TIMPs是阻断ECM降解,抑制MMPs活性的一组分泌型糖蛋白,他们参与组织结构的建立和维持,可以间接影响依赖ECM的细胞信号的传递. 目前在哺乳动物细胞中发现了四种,分别为:TIMP-1、-2、-3和-4. 其中,TIMP-1是一种分子质量为29 kDa的可溶性糖蛋白,主要抑制MMP-1、-3、-9的活性.

有研究表明,MMP-1与UC患者结肠黏膜组织急性损伤、新生血管的形成^[1]、黏膜破坏、

■应用要点

UC患者血浆MMP-1和TIMP-1水平明显升高,表明组织中MMP-1和TIMP-1的高表达可以通过外周血表现出来. 血浆TIMP-1的表达水平与UC病情严重程度呈正相关. 因此,临床上血浆MMP-1、特别是TIMP-1对UC的诊断和病情严重程度的判断都有一定的意义,可能成为帮助判断UC严重程度的简易的外周血生物学指标.

以及溃疡形成初始步骤有关^[2]. McKaig *et al*^[4]研究发现在UC的结肠病变组织中MMP-1的表达明显增加, 其表达水平的高低与UC的炎症病理分期相关. UC患者结肠病变的炎症区域TIMP-1 mRNA的表达较正常区域略微增高, 在溃疡区黏膜表达增高9-12倍. 免疫组化的结果也证实了蛋白水平的表达与mRNA水平的表达一致^[1].

MMPs水平不仅在组织、体液中可增加, 在一些癌症、肝硬化、类风湿性关节炎、急性冠脉综合症的外周血中也可升高^[7]. 已有文献报道^[8], MMPs的活性可以在正常人的血清中稳定检测和定量. 本研究采用ELISA法测定UC患者血浆MMP-1、TIMP-1水平. 结果显示, UC患者血浆MMP-1、TIMP-1水平均明显高于正常对照组, 说明在UC患者中, 结肠组织中MMP-1和TIMP-1表达的增加, 可以反映到外周血中. 因此, 血浆MMP-1与TIMP-1水平可以作为UC诊断的一个简单易行的外周血指标. 另外, 血浆TIMP-1水平与病情严重程度呈正相关, 病情越重, 血浆TIMP-1水平越高, 说明在一定程度上, 血浆TIMP-1水平可以反映出UC患者结肠黏膜组织损伤程度以及疾病的严重程度. 因此, 血浆TIMP-1水平可以作为反映UC患者病情严重程度的血清学指标. Baugh *et al*^[9]的研究结果显示UC患者MMP-1在外周血中的表达较正常人增高, 与本研究结果一致. Wiercinska-Drapalo *et al*^[5]应用ELISA法测定结果表明MMP-1、TIMP-1在溃疡性结肠炎患者血清中的水平较正常对照组显著提高, 并揭示出TIMP-1的水平与内镜下黏膜损伤、疾病活动指数、临床活动指数、C反应蛋白浓度正相关. 理论上讲, MMP-1在UC结肠组织损伤过程中起着重要的作用, UC的结肠组织中MMP-1的表达明显增加, 其表达水平的高低与UC的炎症病理分期有相关性^[4]. 但是, 本研究发现血浆MMP-1的水平仅在中-重度UC患者中增高明显, 而在轻度及对照组的表达之间无统计学差异, 其表达水平与病情严重程度无相关性. 这可能与本研究样本较小有关. 另外, 外周血中MMP-1、TIMP-1的活性受诸多因

素的影响, 因而尚需增加病例进一步研究.

总之, 本研究的结果显示, 与结肠病变组织相似, UC患者血浆MMP-1、TIMP-1亦呈现高表达, 血浆中TIMP-1的表达水平与UC病情严重程度呈正相关. 血浆MMP-1、特别是TIMP-1可能成为帮助判断UC严重程度以及临床诊断简单易行的外周血生物学指标.

4 参考文献

- 1 von Lampe B, Barthel B, Coupland SE, Riecken EO, Rosewicz S. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2000; 47: 63-73
- 2 Wang YD, Yan PY. Expression of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6050-6053
- 3 Medina C, Videla S, Radomski A, Radomski MW, Antolín M, Guarner F, Vilaseca J, Salas A, Malagelada JR. Increased activity and expression of matrix metalloproteinase-9 in a rat model of distal colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284: G116-G122
- 4 McKaig BC, McWilliams D, Watson SA, Mahida YR. Expression and regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinases by intestinal myofibroblasts in inflammatory bowel disease. *Am J Pathol* 2003; 162: 1355-1360
- 5 Wiercinska-Drapalo A, Jaroszewicz J, Flisiak R, Prokopowicz D. Plasma matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as biomarkers of ulcerative colitis activity. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2843-2845
- 6 Holten-Andersen MN, Christensen IJ, Nielsen HJ, Stephens RW, Jensen V, Nielsen OH, Sørensen S, Overgaard J, Lilja H, Harris A, Murphy G, Brünner N. Total levels of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in plasma yield high diagnostic sensitivity and specificity in patients with colon cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 156-164
- 7 Kai H, Ikeda H, Yasukawa H, Kai M, Seki Y, Kuwahara F, Ueno T, Sugi K, Imaizumi T. Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 368-372
- 8 Zucker S, Lysik RM, Zarrabi MH, Moll U. M(r) 92,000 type IV collagenase is increased in plasma of patients with colon cancer and breast cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 140-146
- 9 Baugh MD, Perry MJ, Hollander AP, Davies DR, Cross SS, Lobo AJ, Taylor CJ, Evans GS. Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1999; 117: 814-822

■同行评价

本文设计合理, 结论具有一定科学性, 学术价值较好.

编辑 李军亮 电编 何基才

庆大霉素联合碳酸氢钠片预防伊立替康所致腹泻52例

梅齐, 曹喆, 陈元

■背景资料

伊立替康是半合成喜树碱衍生物, 用于转移性结肠癌的治疗, 并且与其他药物联合治疗肺癌、食管癌、胃癌等, 应用较为广泛。但是迟发性腹泻是伊立替康最常见的剂量限制性毒性之一, 严重者可致患者死亡。国外有学者指出 po 抗生素及碳酸氢盐可减轻伊立替康所致腹泻, 但国内少有这方面的研究及报道。

梅齐, 曹喆, 陈元, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤中心 湖北省武汉市 430030

作者贡献分布: 此课题由陈元及梅齐设计; 研究过程由梅齐与曹喆操作完成; 研究所用分析工具由梅齐提供; 数据分析由梅齐与曹喆完成; 本论文写作由梅齐, 曹喆及陈元完成。

通讯作者: 陈元, 430030, 湖北省武汉市, 武汉华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤中心四楼一病区。

chenyuan008@163.com

电话: 027-83663502

收稿日期: 2008-08-08 修回日期: 2008-09-11

接受日期: 2008-09-17 在线出版日期: 2008-10-18

Gentamycin combined with sodium bicarbonate for prevention of irinotecan-induced diarrhea: an analysis of 52 cases

Qi Mei, Zhe Cao, Yuan Chen

Qi Mei, Zhe Cao, Yuan Chen, Oncology Center of Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Chen Yuan, Oncology Center of Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. chenyan008@163.com

Received: 2008-08-08 Revised: 2008-09-11

Accepted: 2008-09-17 Published online: 2008-10-18

Abstract

AIM: To observe the therapeutic effects of gentamycin combined with sodium bicarbonate for irinotecan-induced diarrhea.

METHODS: A total of 98 patients with stage IV cancers were allotted into prevention group ($n = 52$ patients) and control group ($n = 46$ patients) from July 2006 to May 2008 in our hospital. All patients received the chemotherapy including irinotecan. The prevention group received gentamycin combined with sodium bicarbonate before the use of irinotecan for 4 d, while the control group received routine treatment. Tropisetron was conventionally used to prevent the vomiting in both groups. All adverse effects were evaluated using NCI-CTC standard.

RESULTS: The use of gentamycin combined

with sodium bicarbonate resulted in significantly higher stool pH value ($t = 15.295, P < 0.05$), significantly reduced the incidence of irinotecan-induced diarrhea (13.70% vs 34.83%, $P < 0.001$) and medications (Loperamide: $\chi^2 = 23.844, P < 0.001$; Smecta: $\chi^2 = 25.054, P < 0.001$; Somafostatin: $\chi^2 = 8.561, P = 0.003$; Fluid replacement: $\chi^2 = 8.007, P = 0.005$). At the same time, bone marrow suppression, nausea and vomiting and liver function were also improved in the prevention group ($\chi^2 = 80.335, 60.339, 5.155, P < 0.01$ or 0.05). However, there were no significant differences in appetite, constipation, renal function between the two groups.

CONCLUSION: Gentamycin combined with sodium bicarbonate proves to be useful for preventing the diarrhea induced by irinotecan and is recommended for wide use.

Key Words: Irinotecan; Diarrhea; Gentamycin; Sodium Bicarbonate; Prevention

Mei Q, Cao Z, Chen Y. Gentamycin combined with sodium bicarbonate for prevention of irinotecan-induced diarrhea: an analysis of 52 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(29): 3354-3358

摘要

目的: 观察庆大霉素联合碳酸氢钠片预防伊立替康(irinotecan)所致腹泻的疗效。

方法: 收集2006-07/2008-50我科98例接受含伊立替康方案化疗的晚期癌症患者病例资料, 比较腹泻及其他不良反应的差异, 其中预防组(A组, $n = 52$), 化疗前1 d开始口服碳酸氢钠和庆大霉素(碳酸氢钠片每次2 g, 每天3次; 庆大霉素每次8万U, 每天2次), 连用4 d; 对照组(B组, $n = 46$), 采用常规方法处理腹泻。预防组与对照组在化疗期间均常规用托烷司琼等止吐, 于每周化疗过程中及化疗后监测不良反应发生情况及程度。

结果: A组较B组显著提高了患者的大便pH值($t = 15.295, P < 0.05$), 腹泻发生率有显著降低(13.70% vs 34.83%, $P < 0.001$), 且减少合并用

■同行评议者

陈耀凯, 副教授, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所; 张绪清, 副教授, 中国人民解放军第三军医大学附属西南医院全军感染病研究所

药(洛哌丁胺: $\chi^2 = 23.844, P < 0.001$; 思密达: $\chi^2 = 25.054, P < 0.001$; 生长抑素: $\chi^2 = 8.561, P = 0.003$; 静脉补液: $\chi^2 = 8.007, P = 0.005$); 同时, 骨髓抑制、恶心呕吐、肝功能异常也有所降低($\chi^2 = 80.335, 60.339, 5.155, P < 0.01$ 或 0.05), 而食欲减退、便秘、肾功能异常无明显差异。

结论: 口服庆大霉素联合碳酸氢钠片能有效预防伊立替康所致腹泻, 值得推广。

关键词: 伊立替康; 腹泻; 碳酸氢钠片; 庆大霉素; 预防

梅齐, 曹喆, 陈元. 庆大霉素联合碳酸氢钠片预防伊立替康所致腹泻52例. 世界华人消化杂志 2008; 16(29): 3354-3358
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3354.asp

0 引言

伊立替康(irinotecan, CPT-11, 开普拓)是半合成喜树碱衍生物, 能特异性抑制DNA拓扑异构酶 I, 1998年获得FDA批准, 用于转移性结直肠癌的治疗^[1]。目前, 伊立替康联合5-FU/LV为晚期结直肠癌的一线标准方案, 并且与其他药物联合治疗肺癌、食管癌、胃癌等, 应用较为广泛^[2]。但是迟发性腹泻是伊立替康最常见的剂量限制性毒性之一, 有报道本品每周给药引起3-4度腹泻发生率高达44.4%, 严重者可致患者死亡。国外有学者指出口服抗生素及碳酸氢盐可减轻伊立替康所致腹泻^[3-4], 但国内少有这方面的研究及报道。我科自2006年以来便尝试应用庆大霉素联合碳酸氢钠片预防伊立替康所致腹泻, 目前已取得了较好的临床反响。本文收集我科2006-07/2008-05 98例接受含伊立替康方案化疗的晚期癌症患者病例资料, 比较腹泻等不良反应的差异。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2006-07/2008-05 98例我科住院病例符合以下条件者: (1)组织学或细胞学诊断为肺癌、食管癌或结直肠癌; (2)根据International Union Against Cancer Classification (UICC)分期为IV期, 不能手术者; (3)年龄 ≤ 75 岁; (4)ECOG评分 ≤ 2 ; (5)骨髓造血功能: WBC $> 0.004/L$, PLT $> 0.1/L$, Hb $> 9 \times 10^6 g/L$; 肝功能: 胆红素 $< 15 mg/L$, 转氨酶 $<$ 正常上限值的两倍; 肾功能: 肌酐 $< 15 mg/L$; (6)预期生存时间至少2 mo; (7)化疗方案中含有伊立替康; (8)患者同意签署知情同意书。其中, A组52例患者, 共197个周期化疗; B组46例患者, 共

178个周期化疗。结肠癌49例, 直肠癌33例, 食管癌9例, 肺癌7例, 这些病例按1:1分配到A、B两个组; 男性60例, 女性38例(男女比1.58:1); 年龄在25-70(平均年龄 45.4 ± 9.2)岁。

1.2 方法

1.2.1 治疗方案: 52例患者共计197周期化疗在使用伊立替康治疗前用庆大霉素联合碳酸氢钠片预防腹泻(A组), 46例患者共计178周期化疗不做预处理(B组)。A组于化疗前1天开始po碳酸氢钠和庆大霉素(碳酸氢钠片每次2 g, 3次/d; 庆大霉素每次 $8 \times 10^4 U$, 2次/d), 连用4 d; B组不用碳酸氢钠和庆大霉素。一旦出现首次稀便或大便次数增多, 患者开始饮用大量含电解质的饮料, 并给予高剂量洛哌丁胺(首次服药4 mg, 然后每2 h服药2 mg), 持续到最后1次稀便结束后12 h, 不超过48 h。必要时, 使用思密达、生长抑素等其他药物, 以及静脉补充液体和电解质。所有患者化疗前均常规给予5-HT3受体阻滞剂等预防呕吐, 伊立替康用药前1 h肌肉注射阿托品0.5 mg预防急性胆碱能综合征。下次化疗前当WBC $< 0.003/L$ 和/或腹泻分级超过I度(NCI-CTC V3.0)则推迟伊立替康使用时间。病情稳定或好转的患者至少维持两周期原方案治疗, 病情明显进展者更换化疗方案。如果化疗延迟超过6 wk则退出观察。

1.2.2 测定大便pH值: 收集患者使用伊立替康后第1-5天自然排泄的大便。每个大便标本取5 mL加入25 mL蒸馏水混匀, 在20℃下静置30 min以上。溶液重新悬浮后, 用pH计(上海精密仪器仪表有限公司生产的PHS-3C, 精度为0.01)测定pH值。

1.2.3 不良反应评价标准: 按NCI-CTC, Version 3.0评价所有发生的不良反应。

统计学处理 使用SPSS13.0软件包, 计数资料显著性检验采用卡方检验, 计量资料显著性检验采用t检验, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 腹泻发生率及程度 A组的总腹泻发生率、1-2级腹泻发生率及3-4级腹泻发生率均显著低于对照组(表1)。结果表明口服庆大霉素和碳酸氢钠能减少腹泻发生率, 并且能降低腹泻的严重程度。

2.2 大便pH值 比较两组患者使用伊立替康第1-5天自然排泄的大便样本pH, A组40个大便样本来自15个患者, B组38个大便标本来自14个患者。A组大便pH值范围是8.21-9.64, 平均值为 $8.77 \pm$

■ 相关报道

CPT-11引起的腹泻包括早期腹泻和迟发性腹泻, 早期腹泻多在用药后24 h内出现; 迟发性腹泻, 为剂量限制性毒性, 在用药24 h后出现。国外有报道伊立替康联合5-FU/LV治疗转移性结直肠癌患者, 迟发性腹泻发生率为85%(1-4级), 其中3级为15%, 4级为8%, 严重者可致患者死亡。

■ 创新盘点

本文采用庆大霉素联合碳酸氢钠片预防伊立替康所致腹泻,在病例资料分析中观察到,预防组腹泻发生率显著低于对照组,其他不良反应发生率也有所降低。

表 1 两组腹泻发生率情况

腹泻分级	A组			B组			χ^2	P
	发生腹泻 周期数	总周 期数	腹泻 发生率(%)	发生腹泻 周期数	总周 期数	腹泻 发生率(%)		
1-2级	15	197	7.61	38	178	21.35	14.534	<0.001
3-4级	12	197	6.09	24	178	13.48	5.887	0.015
合计	27	197	13.70	62	178	34.83	23.056	<0.001

表 2 两组合并用药情况

合并用药	A组			B组			χ^2	P
	使用 周期数	总周 期数	用药 比例(%)	使用 周期数	总周 期数	用药 比例(%)		
洛哌丁胺	24	197	12.18	59	178	33.15	23.844	<0.001
思密达	15	197	7.61	48	178	26.97	25.054	<0.001
生长抑素	11	197	5.58	26	178	14.60	8.561	0.003
静脉补液	13	197	6.60	28	178	15.73	8.007	0.005

0.44, B组大便pH值范围是6.32-8.05, 平均值为 7.21 ± 0.46 。成组t检验显示 $t = 15.295$, $P < 0.05$, 说明两组pH值有显著性差异, 结果表明口服庆大霉素和碳酸氢钠片能有效提高肠腔pH值(图1)。

2.3 合并用药情况 在整个观察周期中, A组和B组在洛哌丁胺化疗周期数、思密达周期数、生长抑素周期数及需要静脉补液周期数存在显著性差异($P < 0.05$, 表2)。结果表明, 口服庆大霉素和碳酸氢钠片能减少以上辅助性药物在观察期间的使用次数及总量。

2.4 其他不良反应 治疗期间还监测了患者血液毒性、肝肾功能以及恶心呕吐等不良反应发生情况。研究发现, 其他主要不良反应依次是食欲减退, 骨髓抑制, 恶心呕吐等。结果表明, 口服庆大霉素和碳酸氢钠片能减轻骨髓抑制、恶心呕吐等其他不良反应(表3)。

3 讨论

伊立替康是一种半合成可溶性喜树碱衍生物, 是拓扑异构酶 I 的特异性抑制剂。伊立替康在大多数组织中经羧酸酯酶的作用产生活性代谢产物7-乙基-10羟基-喜树碱(SN-38), 两者与拓补异构酶I-DNA复合物结合, 阻止DNA链重组, 引起DNA双链断裂, 造成细胞死亡, 为细胞周期特异性药物, 主要作用于S期^[5-6]。

CPT-11引起的腹泻包括早期腹泻和迟发性腹泻, 早期腹泻多在用药后24 h内出现, 为乙酰胆碱综合征表现之一, 给予阿托品可缓解; 迟

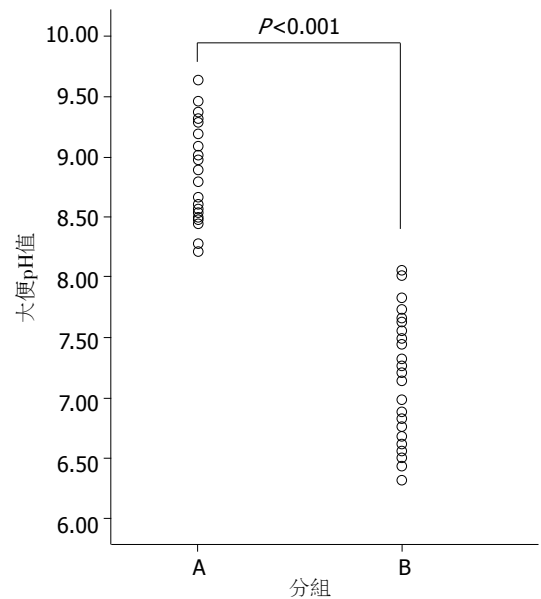


图 1 两组大便pH值比较。

发性腹泻, 为剂量限制性毒性, 在用药24 h后出现^[7]。临床试验证明, 在所有使用伊立替康的患者中, 单药治疗3 wk方案中发生迟发性腹泻的中位时间为滴注伊立替康后第5天^[8]。在联合治疗每周方案中通常出现第1次稀便的中位时间为滴注伊立替康后第11天^[9]。在Saltz *et al*^[10]的研究中, 伊立替康联合5-FU/LV治疗转移性结肠直肠癌患者, 迟发性腹泻发生率为85%(1-4级), 其中3级为15%, 4级为8%。在Douillard *et al*^[11]的研究中, 伊立替康联合5-FU/LV治疗转移性结肠直肠癌患者中迟发性腹泻发生率为72%(1-4级), 其中3级

表 3 其他不良反应评价

不良 反应	A组			B组			χ^2	P
	发生 周期数	总周 期数	发生 率(%)	发生 周期数	总周 期数	发生 率(%)		
骨髓抑制	64	197	32.74	140	178	78.65	80.335	<0.001
食欲减退	120	197	60.91	113	178	63.48	0.262	0.608
恶心呕吐	56	197	28.43	122	178	68.54	60.339	<0.001
肝功能异常	12	197	6.09	23	178	12.92	5.155	0.023
肾功能异常	2	197	1.02	1	178	0.56	0.242	0.623
便秘	30	197	15.23	27	178	15.17	2.6018	0.987

为10%, 4级为4%。

CPT-11活性物质SN-38在肠道内的浓度及其与肠道上皮接触的时间是导致延迟性腹泻的关键^[12]。SN-38引起肠上皮细胞坏死、凋亡, 导致小肠吸收水、电解质障碍及小肠液过度分泌。SN-38还引起肠上皮细胞释放血栓素A2(TXA2), 加上CPT-11治疗后肠道上皮细胞的环氧化酶(COX-2)表达增加, 前列腺素E2(PGE2)水平增高。而TXA2、PGE2能诱导肠上皮细胞氯离子分泌增加, 钠离子吸收下降, 造成腹泻。肠道菌群在CPT-11所致延迟性腹泻的发生过程中起到重要作用^[13]。肠道细菌的 β -葡萄糖醛酸酶可将SN-38-G重新转变成SN-38, 而SN-38对肠道黏膜产生直接损害, 从而造成腹泻。另一方面, 给药后胆汁中CPT-11的浓度很高。CPT-11通过胆汁分泌进入十二指肠, 然后通过肠道排泄, 而小肠中的羧酸酯酶(CE)活性很高, 可直接将排入肠道的CPT-11原型转变成SN-38, 造成腹泻。

国外有研究报道, 口服抗菌素能抑制肠道细菌生长, 减少细菌所产生的 β -葡萄糖醛酸酶, 使肠腔内的SN-38G不能转化为SN-38, 从而减少对肠上皮细胞的损伤^[14-15]。临床已有用抗生素疗法用于本品引起的腹泻。有报道结直肠癌患者口服新霉素以降低肠道 β -葡萄糖醛酸酶活性, 取得较好效果^[16]。给予碳酸氢盐升高肠道pH值, 可降低肠道内SN-38内酯型浓度, 减轻药物引起的细胞损伤和腹泻。如使用碳酸氢钠提高肠腔pH值, 碱性环境下SN-38转变为羧酸盐形式, 其活性较低^[17]。同时, 药代动力学研究显示口服碱性液体不降低SN-38的血药浓度或曲线下面积(AUC)。

国内有关于预防伊立替康所致腹泻的报道较为有限, 经验较少。参考国外资料, 综合考虑: 新霉素毒性大, 主要不良反应为胃肠道反应, 有食欲不振、恶心及大便次数增多等, 并且在国

内多数医院已经没有口服制剂供应; 而庆大霉素胃肠道毒性小, 小剂量口服产生的肾毒性、耳毒性及神经毒性也较小, 并且临床已有用庆大霉素治疗腹泻的经验。所以我科采用庆大霉素联合碳酸氢钠片预防伊立替康所致腹泻。在病例资料分析中我们观察到, 预防组腹泻发生率显著低于对照组($P<0.001$), 而大便pH值明显高于对照组($P<0.05$), 不但减少了化疗期间患者的合并用药次数, 而且其他不良反应发生率也有所降低。

总之, 庆大霉素联合碳酸氢钠预防伊立替康所致腹泻有较好疗效, 与传统方法相比减少了腹泻发生率, 提高了患者对伊立替康化疗的耐受性, 效价合理, 给药方便, 经济适用, 可以考虑作为预防伊立替康化疗所致迟发性腹泻的常规治疗方法, 值得推广。

4 参考文献

- 1 Sabharwal A, Kerr D. Chemotherapy for colorectal cancer in the metastatic and adjuvant setting: past, present and future. *Expert Rev Anticancer Ther* 2007; 7: 477-487
- 2 曹妮达, 赵爱光, 朱莹杰, 杨金坤. 进展期胃癌化疗疗效的中国文献分析. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 436-442
- 3 Tsavaris N, Kosmas C, Skopelitis H, Papadoniou N, Polyzos A, Zografos G, Adoniou E, Gryniatsos J, Felekouras E, Zacharakis M, Sigala F, Bacoyiannis C, Papastratis G, Papalambros E. Sequential administration of 5-fluorouracil (5FU)/leucovorin (LV) followed by irinotecan (CPT-11) at relapse versus CPT-11 followed by 5-FU/LV in advanced colorectal carcinoma. A phase III randomized study. *Chemotherapy* 2007; 53: 282-291
- 4 Takasuna K, Hagiwara T, Watanabe K, Onose S, Yoshida S, Kumazawa E, Nagai E, Kamataki T. Optimal antidiarrhea treatment for antitumor agent irinotecan hydrochloride (CPT-11)-induced delayed diarrhea. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 58: 494-503
- 5 Hahn KK, Wolff JJ, Kolesar JM. Pharmacogenetics and irinotecan therapy. *Am J Health Syst Pharm* 2006; 63: 2211-2217
- 6 Lagadec P, Griessinger E, Nawrot MP, Fenouille N,

■应用要点

庆大霉素联合碳酸氢钠预防伊立替康所致腹泻有较好疗效, 与传统方法相比减少了腹泻发生率, 提高了患者对伊立替康化疗的耐受性, 效价合理, 给药方便, 经济适用, 可以考虑作为预防伊立替康化疗所致迟发性腹泻的常规治疗方法, 值得推广。

■同行评价

本研究设计较为合理, 临床资料较完整, 研究结论对临床有参考价值.

- Colosetti P, Imbert V, Mari M, Hofman P, Czerucka D, Rousseau D, Berard E, Dreano M, Peyron JF. Pharmacological targeting of NF-kappaB potentiates the effect of the topoisomerase inhibitor CPT-11 on colon cancer cells. *Br J Cancer* 2008; 98: 335-344
- 7 Kweekel D, Guchelaar HJ, Gelderblom H. Clinical and pharmacogenetic factors associated with irinotecan toxicity. *Cancer Treat Rev* 2008 Jun 14. [Epub ahead of print]
- 8 Maeda Y, Ohune T, Nakamura M, Yamasaki M, Kiribayashi Y, Murakami T. Prevention of irinotecan-induced diarrhoea by oral carbonaceous adsorbent (Kremezin) in cancer patients. *Oncol Rep* 2004; 12: 581-585
- 9 Yang X, Hu Z, Chan SY, Chan E, Goh BC, Duan W, Zhou S. Novel agents that potentially inhibit irinotecan-induced diarrhea. *Curr Med Chem* 2005; 12: 1343-1358
- 10 Saltz LB. Understanding and managing chemotherapy-induced diarrhea. *J Support Oncol* 2003; 1: 35-46; discussion 38-41, 45-46
- 11 Douillard JY, Sobrero A, Carnaghi C, Comella P, Díaz-Rubio E, Santoro A, Van Cutsem E. Metastatic colorectal cancer: integrating irinotecan into combination and sequential chemotherapy. *Ann Oncol* 2003; 14 Suppl 2: ii7-ii12
- 12 Ikegami T, Ha L, Arimori K, Latham P, Kobayashi K, Ceryak S, Matsuzaki Y, Bouscarel B. Intestinal alkalization as a possible preventive mechanism in irinotecan (CPT-11)-induced diarrhea. *Cancer Res* 2002; 62: 179-187
- 13 de Jong FA, Kehrer DF, Mathijssen RH, Creemers GJ, de Bruijn P, van Schaik RH, Planting AS, van der Gaast A, Eskens FA, Janssen JT, Ruit JB, Verweij J, Sparreboom A, de Jonge MJ. Prophylaxis of irinotecan-induced diarrhea with neomycin and potential role for UGT1A1*28 genotype screening: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Oncologist* 2006; 11: 944-954
- 14 Schmittl A, Jahnke K, Thiel E, Keilholz U. Neomycin as secondary prophylaxis for irinotecan-induced diarrhea. *Ann Oncol* 2004; 15: 1296
- 15 Alimonti A, Satta F, Pavese I, Burattini E, Zoffoli V, Vecchione A. Prevention of irinotecan plus 5-fluorouracil/leucovorin-induced diarrhoea by oral administration of neomycin plus bacitracin in first-line treatment of advanced colorectal cancer. *Ann Oncol* 2003; 14: 805-806
- 16 Kehrer DF, Sparreboom A, Verweij J, de Bruijn P, Nierop CA, van de Schraaf J, Ruijgrok EJ, de Jonge MJ. Modulation of irinotecan-induced diarrhea by cotreatment with neomycin in cancer patients. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1136-1141
- 17 Takeda Y, Kobayashi K, Akiyama Y, Soma T, Handa S, Kudoh S, Kudo K. Prevention of irinotecan (CPT-11)-induced diarrhea by oral alkalization combined with control of defecation in cancer patients. *Int J Cancer* 2001; 92: 269-275

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志参考文献要求

本刊讯 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角码号. 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,用与正文同角的数字并排,如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和 *World Journal of Gastroenterology*(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>). 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. (常务副总编辑: 张海宁 2008-10-18)

罕见侧枝循环形成致不典型布-加综合征1例

卢书明, 段志军, 刘丽娜, 张伟, 王峰, 李枫

卢书明, 段志军, 刘丽娜, 张伟, 大连医科大学附属第一医院
消化内科 辽宁省大连市 116011

王峰, 李枫, 大连医科大学附属第一医院介入治疗科 辽宁省
大连市 116011

作者贡献分布: 段志军和卢书明对此文所作贡献均等; 此课题由
段志军和卢书明设计; 研究过程由段志军, 卢书明, 刘丽娜, 张
伟, 王峰及李枫操作完成; 本论文写作由卢书明与段志军完成。

通讯作者: 段志军, 116011, 辽宁省大连市中山路222号, 大连医
科大学附属第一医院消化内科. cathydoctor@yahoo.com

电话: 0411-83635963-3163 传真: 0411-83632383

收稿日期: 2008-08-04 修回日期: 2008-08-31

接受日期: 2008-09-08 在线出版日期: 2008-10-18

Atypical Budd-Chiari syndrome induced by rare collateral pathways: one-case analysis

Shu-Ming Lu, Zhi-Jun Duan, Li-Na Liu, Wei Zhang,
Feng Wang, Feng Li

Shu-Ming Lu, Zhi-Jun Duan, Li-Na Liu, Wei Zhang, De-
partment of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of
Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning
Province, China

Feng Wang, Feng Li, Department of Interventional Ther-
apy, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical Uni-
versity, Dalian 116011, Liaoning Province, China

Correspondence to: Professor Zhi-Jun Duan, Department
of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Dalian
Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province,
China. cathydoctor@yahoo.com

Received: 2008-08-04 Revised: 2008-08-31

Accepted: 2008-09-08 Published online: 2008-10-18

Abstract

A male patient of fifty-eight years old was diagnosed with cryptogenic cirrhosis in other hospital. However, we concluded it Budd-Chiari Syndrome by multislice spiral computed tomography and inferior vena cavography. He had no clinical manifestations of Budd-Chiari syndrome, such as ascites, varicose veins of lower extremity and pedal edema. Moreover there were rare collateral pathways. The patient's symptom was released and without complication after successful interventional therapy.

Key Words: Budd-Chiari Syndrome; Cryptogenic cirrhosis; Collateral pathway; Multislice spiral computed tomography

Lu SM, Duan ZJ, Liu LN, Zhang W, Wang F, Li F. Atypical Budd-Chiari syndrome induced by rare

collateral pathways: one-case analysis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(29): 3359-3361

摘要

患者, 男, 58岁, 曾于外院诊断隐源性肝硬化, 于我院经多层螺旋CT成像及下腔静脉造影诊断布-加综合征。但患者无腹水、下肢静脉曲张、下肢水肿等布-加综合征的典型表现, 检查发现存在罕见的侧支循环旁路。经介入治疗, 症状缓解, 未出现并发症。

关键词: 布-加综合征; 隐源性肝硬化; 侧支循环; 多层螺旋CT成像

卢书明, 段志军, 刘丽娜, 张伟, 王峰, 李枫. 罕见侧枝循环形成致不典型布-加综合征1例. *世界华人消化杂志* 2008; 16(29): 3359-3361

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3359.asp>

0 引言

布-加综合征(Budd-Chiari syndrome, BCS)是肝静脉(hepatic vein, HV)和/或肝静脉水平的下腔静脉(inferior vena cava, IVC)完全或不完全阻塞所导致的一组临床综合征, 表现为门脉高压及下腔静脉高压症。2008-04我院收治1例无腹水、腰背部及下肢静脉曲张、下肢水肿等典型表现的布-加综合征患者, 检查发现存在一种罕见的侧支循环旁路, 现报道如下。

1 病例报告

男, 58岁。皮肤黄染1 mo入院, 伴乏力、食欲不振, 有齿龈出血。既往糖尿病病史8年, 否认病毒性肝炎、饮酒、毒物接触史, 否认长期服药史。入院前曾于多家医院就诊, 诊断为隐源性肝硬化, 保肝治疗效果不佳。查体: T: 36.2°C, P: 70次/min, R: 18次/min, BP: 140/80 mmHg, 神清, 问答合理, 可见蜘蛛痣, 巩膜黄染, 胸腹壁、腰背部及下肢未见静脉曲张, 肝大, 肋下约5 cm, 质地韧, 脾未触及, 移动性浊音阴性, 双下肢不肿。辅助检查: 血常规WBC $3.51 \times 10^9/L$, Hb 139 g/L, PLT $76 \times 10^9/L$ 。尿常规BIL (-), URO正常。肝炎病毒学HAV-

■背景资料

布-加综合征(BCS)在临床上表现缺乏特异性, 易误诊, 部分患者以肝硬化就诊, 因缺乏肝硬化的常见病因, 常诊断为隐源性肝硬化, 而得不到根本治疗。随着医学影像技术的不断发展和充分利用, 使得BCS检出率大大提高, 同时也扩展了临床诊断思路, 提高了诊疗水平。

■同行评议者

金瑞, 教授, 首都医科大学附属北京佑安医院消化科; 黄颖秋, 教授, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

■相关报道

下腔静脉阻塞型布-加综合征, 可因侧枝循环形成得到一定的代偿, 致使临床表现不典型, 而常常误诊或漏诊. 如有报道经肝静脉参与体循环完全代偿, 无临床症状, 仅体检超声发现异常后经下腔静脉血管造影确诊BCS. 应加强对BCS的认识, 提高BCS的诊疗水平.

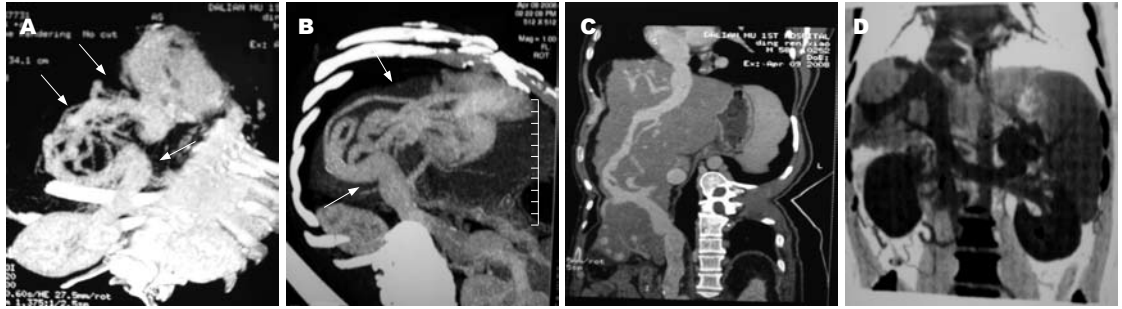


图1 多层螺旋CT成像. A-C: 下腔静脉肝段闭塞, 下腔静脉血反向流入肝脏, 经肝右静脉和肝内侧枝循环与肝左静脉相连, 经肝左静脉直接流入右心房; D: 门静脉血反向流动经扩张的脾静脉、左肾静脉注入下腔静脉.

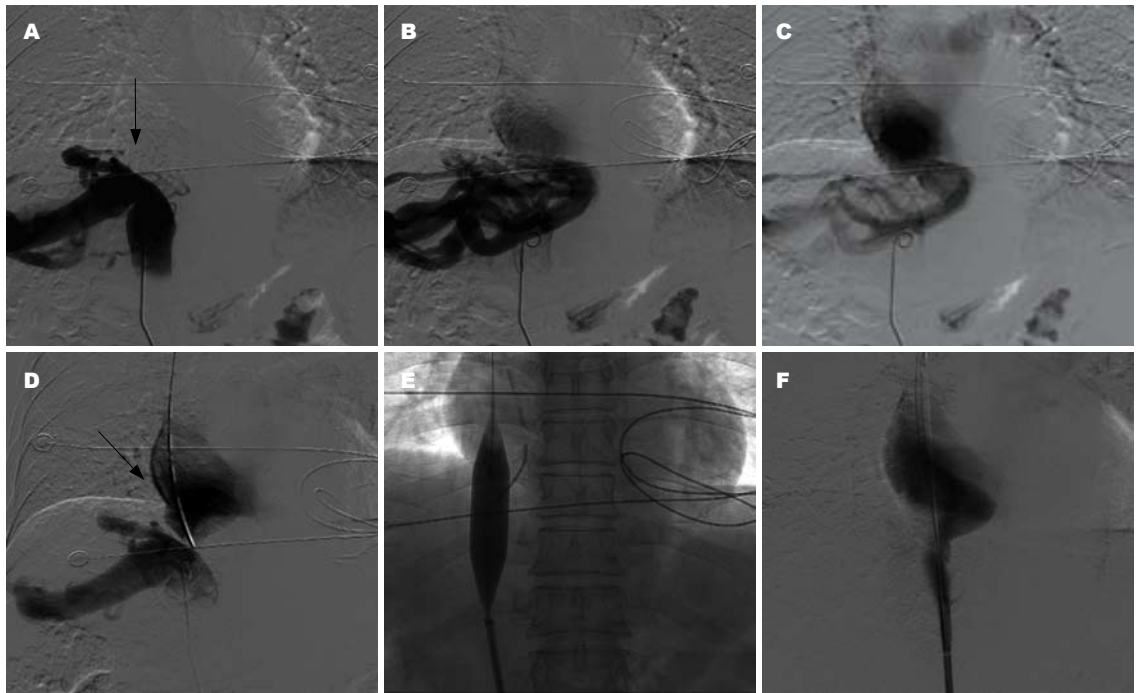


图2 下腔静脉造影及成形术. A, D: 下腔静脉肝段闭塞(箭头示); A: 下腔静脉血经肝右静脉反向流入肝脏; B-C: 肝内丰富侧枝循环, 血流经肝左静脉直接流入右心房; D-E: 导丝破膜后球囊扩张; F: 再造影示下腔静脉通畅.

IgM (-), HBsAg (-), HBsAb (-), HBeAg (-), HBeAb (-), HBcAg (-), HBcAb (-), HCV (-), HEV-IgM (-). 梅毒抗体 (-), HIV (-). 生化肝功ALT 32 IU/L, AST 38 IU/L, TBIL 66 $\mu\text{mol/L}$, DBIL 28.0 $\mu\text{mol/L}$, ALP 130 IU/L, γ -GT 152 IU/L, 白蛋白 35.2 g/L, 球蛋白 39.2 g/L. 血糖 12.36 mmol/L. 肾功能正常. 免疫学指标IgG 1650 g/L, IgA 846 g/L, IgM 130 g/L, 肝病相关抗体(抗核抗体、抗线粒体抗体、抗平滑肌抗体、抗肝肾微粒体抗体、抗可溶性肝抗原/肝胰抗原抗体、抗肝细胞溶质抗体、抗线粒体抗体M2亚型)均阴性. 肿瘤标志物: AFP 4.78 IU/mL, CA125 24.81 U/mL, CA19-9 24.12 U/mL, CEA 6.66 $\mu\text{g/L}$. 腹部CT示: 肝硬化(肝表面欠光滑, 凹凸不平, 左叶增大, 肝叶比例失调, 肝裂增宽), 门脉高压(胃-脾间及腹主动脉旁区见迂曲血管团影). 腹部MRCP示: 肝硬化, 脾大, 门脉高压, 食道胃底部

及腹膜后静脉曲张; 肝静脉及下腔静脉异常(肝右静脉增粗迂曲与下腔静脉相连, 肝左静脉增粗迂曲与右房相连, 下腔静脉与右房未见相连), 肝内、外胆管未见异常扩张或狭窄. 多层螺旋CT下腔静脉成像(图1): 下腔静脉(肝段)闭塞, 大量侧枝循环形成, 下腔静脉(闭塞段远侧)-肝右和肝中静脉-肝左静脉-右心房; 门静脉-脾静脉-左肾静脉-下腔静脉; 下腔静脉-奇静脉和半奇静脉-上腔静脉. 下腔静脉造影(图2): 肝段下腔静脉膜性闭塞, 可见众多扩张侧枝循环. 诊断: 肝硬化失代偿期布-加综合征 糖尿病. 治疗: 采用介入治疗-下腔静脉成形术. 下腔静脉造影见肝段下腔静脉膜性闭塞, 术中用导丝自下而上破膜成功, 并行球囊扩张, 扩张后再造影示下腔静脉通畅, 侧枝静脉消失, 术后予抗凝、预防感染等治疗. 随访4 mo病情稳定, 未出现并发症.

2 讨论

本例患者因乏力、食欲不振、出现黄疸就诊, 行腹部CT检查提示肝硬化, 存在门脉高压, 由于缺少引起肝硬化的常见病因的依据, 曾被考虑为隐源性肝硬化。但患者肝大不易解释, 有无引起肝硬化的少见原因, 如肝静脉、下腔静脉病变即布-加综合征, 因为后者可引起门脉高压、肝大、肝硬化, 重要的是布-加综合征是可能根治的, 积极寻找病因, 对患者的预后是至关重要的。该患无腹水, 无腹壁静脉及下肢静脉曲张、下肢水肿等布-加综合征表现, 通常不被认识到。如果证实为布-加综合征, 缺乏典型表现的原因也值得明确。

布-加综合征是肝静脉(HV)和/或肝静脉水平的下腔静脉(IVC)完全或不完全阻塞所导致的一组临床综合征, 表现为门脉高压和/或下腔静脉高压症, 如瘀血性肝肿大、脾大、腹水、腹壁静脉、食道胃底静脉曲张, 上消化道出血等和/或腰背、下肢静脉曲张、下肢水肿、色素沉着、甚至溃烂^[1]。肝静脉、下腔静脉阻塞后, 会引起一系列血流变化。一般肝内侧枝循环很少, 而受阻的下腔静脉血流经腰升静脉、左肾静脉、椎旁静脉和体壁静脉回流进入右房。本例患者下腔静脉肝段闭塞, 极小部分下腔静脉血流经奇静脉和半奇静脉回流至上腔静脉, 而肝内形成大量侧枝循环。肝静脉有一支(肝右静脉)连通于下腔静脉梗阻下方, 又有一支(肝左静脉)与右心房直接相连, 且在两肝静脉之间形成丰富的、开放良好的交通支, 这样下腔静脉血反向流动经扩张增粗的肝右静脉和肝内交通支与肝左静脉相连, 再经肝左静脉血直接流入右心房, 因此患者发生淤血性肝硬化时年龄较大。肝脏充当下腔静脉与右心房间的中转站, 可缓解门脉的压力及下腔静脉的压力。而且在门静脉与下腔静脉间也存在侧枝循环, 门静脉血反向流动经脾静脉、左肾静脉注入下腔静脉, 这也减轻门脉压力。这就可解释本病例为何无腹水、腰背部及下肢静脉曲张、下肢浮肿等表现。该病例肝静脉均开放, 属于下腔静脉型布-加综合征。下腔静脉型布-加综合征的症状与侧枝循环的情况主要和肝静脉开口与下腔静脉闭塞段相对位置关系有关, 肝静脉开口位于闭塞段近心端时症状轻, 主要表现为下肢水肿, 严重时腰背部及下肢静脉曲张, 若像本例部分血流经肝内通路回心者症状尤轻。开口完全位于闭塞段离心端时症状尤为明显, 肝淤血无法回流右心房, 门脉压增高, 出现腹水、上消化道出血, 下腔静脉回流受阻致腰

升静脉、左肾静脉、椎旁静脉和体壁静脉侧支开放, 出现腰背部、腹部及下肢静脉曲张。具备该患者这种特殊侧枝循环的布-加综合征临床上较少见。曾有学者通过彩色多普勒超声发现具有类似侧枝循环的布-加综合征^[2-3]。彩色多普勒超声能够分析各支血管的病变类型和血流动力学变化, 但不能提供清晰的下腔静脉系统血管图像。应用多层螺旋CT下腔静脉成像清晰地显示了肝静脉、下腔静脉及肝内外侧枝循环情况, 病变血管直观、明了, 图像可以为介入科或血管外科医师提供了较大的帮助, 有利于指导一个最佳治疗方案的选择。多层螺旋CT下腔静脉成像具备安全、可靠、便捷、无创的特点。下腔静脉造影是诊断布-加综合征的金标准, 而其毕竟是一种有创的检查, 具有一定的风险性, 临床用于诊断时常受到限制, 但下腔静脉造影又具备一个优势就是能够在诊断明确时, 同步进行介入治疗-下腔静脉成形术。本例通过多层螺旋CT下腔静脉成像诊断布-加综合征后, 经右颈静脉及右股静脉穿刺插管行下腔静脉造影, 见肝段下腔静脉膜性闭塞, 并见众多扩张侧枝循环, 与多层螺旋CT下腔静脉成像结果相一致。经介入治疗, 患者症状逐渐缓解。

隐源性肝硬化是指病史不详、组织病理辨认困难等原因而未能明确病因的肝硬化。隐源性肝硬化中30%-80%为病毒感染, 其中至少一半可能为丙型肝炎病毒慢性感染所致, 20%的隐源性肝硬化与脂肪肝相关^[4-5]。本例无病毒性肝炎、酒精、药物、代谢、免疫等致肝硬化的常见原因, 故曾拟诊为隐源性肝硬化。

肝硬化原因不明的病例, 病因诊断不要轻易放弃。早期诊断布-加综合征并给予及时治疗, 能明显改善患者预后、提高生活质量。

3 参考文献

- 1 Menon KV, Shah V, Kamath PS. The Budd-Chiari syndrome. *N Engl J Med* 2004; 350: 578-585
- 2 Kamba M, Ochi S, Ochi H, Maruyama S, Sato H, Suto Y. Asymptomatic membranous obstruction of the inferior vena cava forming intrahepatic collateral pathways. *J Gastroenterol* 1995; 30: 783-785
- 3 张国全, 孙红军, 万兆海. 下腔静脉血经肝回流入右心房: 布-加氏综合征的一种特殊类型. *中华超声影像学杂志* 2000; 9: 86-88
- 4 Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology* 2001; 121: 91-100
- 5 尤金R. 希夫, 迈克尔F. 索雷尔, 威利斯C. 马德里. 希夫肝脏病学. 第9版. 黄志强. 北京: 化学工业出版社, 2006: 1115-1144

■应用要点

多层螺旋CT成像显示病变血管图像直观明了, 对BCS有很大诊断价值。原因不明的肝硬化, 不要轻易放弃病因诊断, 警惕BCS, 尤其是不典型的BCS。

■同行评价

本文报道病例少见, 并得到多层螺旋CT成像、下腔静脉造影及成形术的影像学资料证实, 内容可靠, 对临床有一定参考价值。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

陈贻胜 教授

福建省立医院消化内科

程爱群 主任医师

上海华东医院普外科

樊晓明 主任医师

复旦大学附属金山医院消化科

范建高 教授

上海交通大学附属第一人民医院消化内科/脂肪肝诊治中心

冯志杰 主任医师

河北医科大学第二医院消化内科

高春芳 研究员

中国人民解放军第二军医大学附属长征医院全军医学免疫诊断中心/实验诊断科

葛海燕 教授

同济大学附属第十人民医院普通外科

韩新巍 教授

河南省郑州大学第一附属医院放射科

黄晓东 副主任医师

武汉市中心医院消化内科

姜春萌 教授

大连医科大学附属第二医院消化科

江学良 主任医师

济南军区总医院消化科

李华山 副主任医师

中国中医科学院广安门医院肛肠科

李涛 副主任医师

北京大学人民医院肝胆外科

刘海林 主任医师

上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科

刘杞 教授

重庆医科大学病毒性肝炎研究所

刘作金 副教授

重庆医科大学附属第二医院肝胆外科

梅林 教授

北京大学医学部生理学与病理生理学系神经调节和消化内分泌研究室

彭曦 副研究员

重庆市西南医院烧伤研究所

朴云峰 教授

吉林大学第一附属医院消化科

秦环龙 教授

上海交通大学附属第六人民医院外科

任建林 教授

厦门大学附属中山医院消化内科

孙殿兴 主任医师

白求恩国际和平医院肝病科

谭德明 教授

中南大学湘雅医院感染病科

唐文富 副主任医师

四川大学华西医院中西医结合科

王小众 教授

福建医科大学附属协和医院消化内科

王振宁 教授

中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

徐列明 教授

上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝二科

杨维良 教授

哈尔滨医科大学附属第二医院普外三科

张锦生 教授

复旦大学上海医学院病理学系