

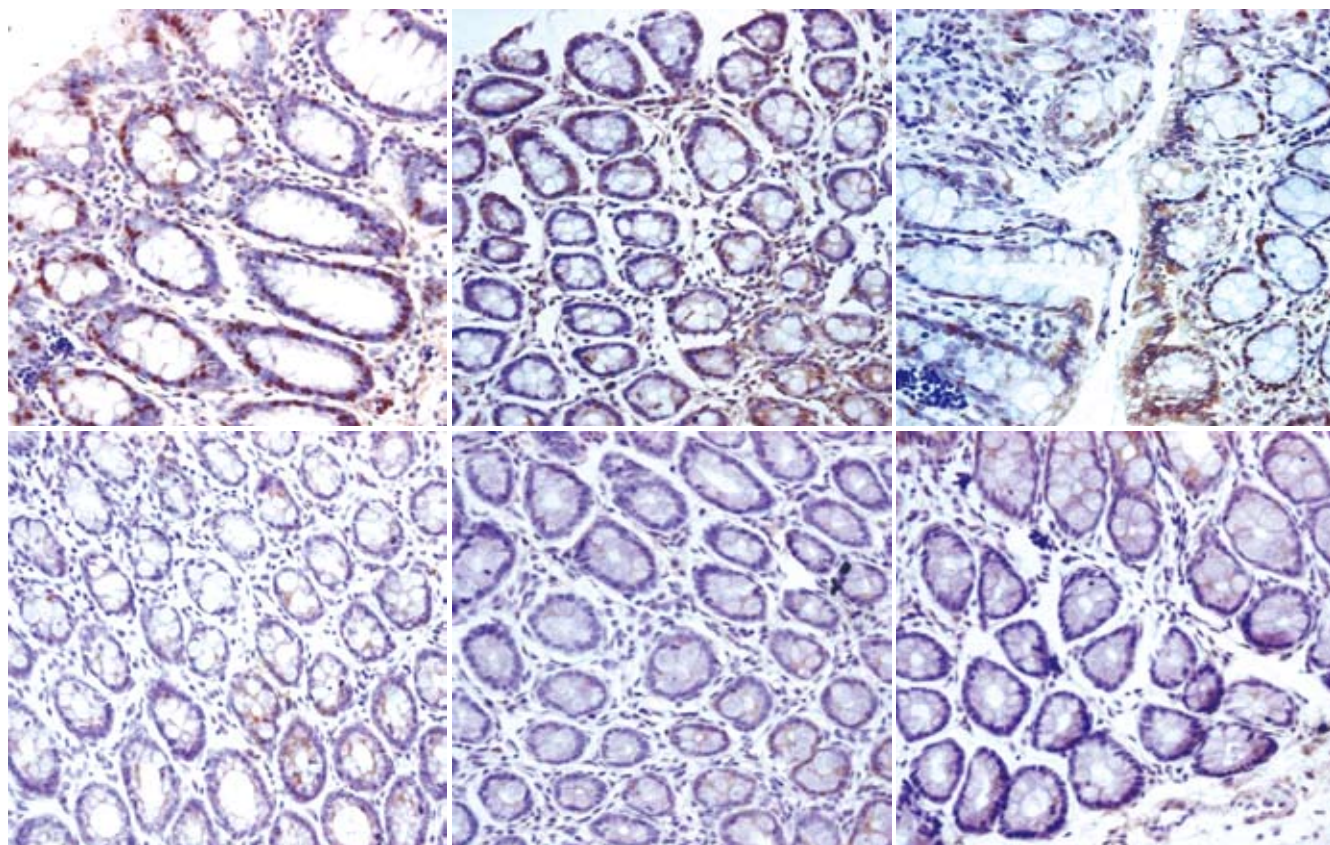
ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2009年1月8日 第17卷 第1期 (Volume 17 Number 1)



1 / 2009

ISSN 1009-3079



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

2009-01-01/2011-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

陈可冀教授
黄象谦教授
黄志强教授
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
杨思风教授
姚希贤教授
岳茂兴教授
张万岱教授
周学文教授

常务编委

程英升教授
范学工教授
高毅主任医师
江学良主任医师
李岩教授
刘连新教授
吕宾教授
罗和生教授
聂青和教授
王小众教授

编委

消化内科学

白爱平副教授
聂新明教授
陈洪副教授

陈其奎教授
陈卫昌教授
陈贻胜教授
程斌副教授
迟宝荣教授
崔立红副教授
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
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
高峰副教授
戈之铮教授
关玉盘教授
郭晓钟教授
何松教授
洪天配教授
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
黄缘教授
季国忠副教授
江米足主任医师
姜春萌教授
姜慧卿教授
金瑞教授
蓝宇教授
李定国教授
李淑德教授
李瑜元教授
李玉民教授
李玉明教授
李祖国副教授
林志辉教授
刘冰熔教授
刘凤斌教授
刘改芳主任医师
刘海林主任医师
刘占举教授
陆伦根教授
马欣主任医师

倪润洲教授
欧希龙副教授
潘秀珍教授
朴云峰教授
秦成勇教授
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
宋军副教授
宋于刚教授
唐世刚教授
王邦茂教授
王炳元教授
王承党副教授
王晓艳副教授
闻勤生教授
夏冰教授
夏时海副教授
徐可树教授
许乐主任医师
杨建民教授
姚树坤教授
叶红军主任医师
张春清教授
张国梁主任医师
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
郑培永副教授
郑鹏远教授
周国雄主任医师
朱春兰主任医师
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
陈进宏副主任医师
陈力教授
陈立波副教授
陈凜教授
陈强谱教授
陈汝福教授
陈亚军主任医师
陈钟教授
程爱国教授
程爱群主任医师
程树群副教授
仇毓东副教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
单云峰副主任医师
丁义涛教授
董明教授
房林副教授
傅红副教授
傅华群教授
傅志仁主任医师
葛海燕教授
龚建平教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师
顾岩教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
何超教授
何裕隆教授
黄志勇副教授
季加孚教授
荚卫东副主任医师
蒋龙元副教授
李国威教授
李华副教授
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

李文岗副教授
李旭副教授
梁力建教授
刘超副教授
刘建教授
刘作金副教授
卢实春教授
陆才德教授
禄韶英副主任医师
吕明德教授
吕云福教授
彭吉润主任医师
彭心宇教授
秦春宏副主任医师
秦华东教授
秦环龙教授
秦建民副主任医师
邱宝安主任医师
邱双健副教授
邱伟华副主任医师
裘正军教授
沈柏用副教授
沈世强教授
施诚仁教授
石毓君副研究员
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙学英教授
孙延平副主任医师
邵升副教授
汤恢焕教授
田晓峰教授
汪波副主任医师
汪根树副教授
王春友教授
王德盛副主任医师
王凤山教授
王广义教授
王健生副教授
王鲁副教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王要军教授
王悦华副主任医师

世界华人消化杂志®

编辑委员会

王振宁教授
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
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
谢敏主任医师
谢晓华副教授
邢光明教授
徐大华主任医师
徐迅迪副主任医师
徐泱副主任医师
许戈良教授
严律南教授
杨柏霖副主任医师
杨家和主任医师
杨秋蒙副主任医师
杨维良教授
伊力亚尔·夏合丁教授
殷正丰教授
于聪慧教授
于则利教授
郁宝铭教授
元云飞教授
张佳林教授
张进祥副教授
张俊副研究员
张群华教授
张水军教授
张宗明教授
周伟平教授
邹小明教授

消化感染病学

陈国凤主任医师
陈红松副研究员
陈建杰教授
陈仕珠主任医师
陈耀凯副教授
陈志辉副主任医师
党双锁教授
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
何生松教授
胡国信副主任医师
林菊生教授
刘杞教授
刘正稳教授
貌盼勇研究员
宁琴教授
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
汤华研究员
唐霓副研究员
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
宣世英教授
杨江华副主任医师
杨林副研究员
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
赵连三教授
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
杜群副研究员
黄恒青主任医师
李军祥教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员

刘孟安教授
刘平教授
刘绍能主任医师
沈洪教授
唐志鹏研究员
王富春教授
王新月教授
谢鸣教授
徐列明教授
许玲副教授
张声生教授

消化肿瘤学

曹秀峰主任医师
曹志成院士
陈公琰主任医师
李璇教授
刘宝瑞教授
刘彬彬副研究员
刘云鹏教授
沈克平主任医师
肖文华主任医师
熊斌教授
张凤春教授

消化影像学

白彬主任医师
陈克敏教授
官泳松教授
韩新巍教授
李健丁教授
龙学颖副主任医师
倪才方教授
魏经国教授
肖恩华教授
徐爱民副教授
徐克教授
杨业发教授
杨建勇教授
赵卫主任医师

消化内镜及介入治疗学

丁佑铭教授
郝俊鸣副主任医师
潘林娜教授
孙明军教授
万军教授

吴硕东教授
袁友红副教授

消化中西医结合学

唐文富副教授
王学美研究员
张春虎副教授

消化基础研究

曹洁副教授
曹鹏副研究员
樊红副教授
高春芳研究员
高国全教授
高英堂研究员
管冬元副教授
胡旭初副教授
黄文林教授
李刚教授
李杰副教授
李永哲副研究员
李增山副教授
刘克辛教授
梅林教授
彭曦副研究员
钱睿哲教授
任超世研究员
任浩副教授
台桂香教授
谭学瑞教授
田颖刚副研究员
汪思应教授
吴军研究员
吴俊华副教授
徐宁志研究员
许文燮教授
姚登福教授
阴赅宏研究员
郁卫东副研究员
喻荣彬副教授
张青云研究员
张学教授
赵平副教授
周南进研究员
周士胜教授
周素芳教授
周晓东研究员

周晓武副主任医师

消化病理学

杜祥教授
李淳副教授
刘丽江教授
刘勇钢副主任医师
马大烈教授
潘兴华副主任医师
王鲁平主任医师
王娅兰教授
魏蕾教授
阎晓初副教授
颜宏利副教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
赵景民教授
朱亮副教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2009年1月8日

第17卷

第1期

(总第261期)

述 评	
	1 胰十二指肠切除术中的过“三关” 汤恢焕
基础 研究	4 内质网应激对2型糖尿病小鼠脂肪肝发生的影响 毛刘锋, 姜小伟, 秦艳, 董晓光, 李继锋, 周晓莹, 潘杰
	11 蓝玉簪颗粒对大鼠肝纤维化的治疗作用 房志鑫, 李旭波, 刘菁菁, 耿铮, 田琼
	17 植物药洪天肝康防治肝硬化的作用机制 洪艳, 杨锐华, 许晴, 贾洪章, 史小林
	24 急性坏死性胰腺炎肠黏膜氧化应激损伤和HIF-1 α 的表达 崔培林, 吕栋, 张峻, 姚士伟, 王燕斌, 杨昭徐
	31 依达拉奉对大鼠重症急性胰腺炎的保护作用 龚平, 张戛, 宋政军
	36 不同分子量壳寡糖对促胰岛细胞增殖、胰岛素分泌及调节餐后血糖的作用 刘冰, 秦贞奎, 林祥梅, 梅琳, 刘万顺, 韩宝芹
43 缺血-再灌注损伤对大鼠肠黏膜及运动功能的影响 王宏	
临床 研究	49 西藏拉萨地区乙型肝炎病毒基因型分布及与肝病的关系 曹占良, 高英堂, 吉宗, 刘持佳, 鲍布和, 赵金梅
	53 应用SELDI-TOF-MS技术初步建立结直肠癌分类树模型 范乃军, 高春芳, 王秀丽, 盛新华, 李冬晖, 郑国宝
文 献 综 述	59 门脉高压性胃病的研究进展 金世柱, 孟祥伟, 韩明子
	63 胃泌素释放肽受体在肿瘤治疗中的研究进展 赵开军, 沈建康
	68 P38丝裂原活化蛋白激酶信号通路与肝星状细胞 马超, 马红
研 究 快 报	74 外源性一氧化碳对小肠缺血再灌注大鼠多形核中性粒细胞聚集及血浆TNF- α 、IL-10的影响 韩宁, 李勇, 陈卫民
	78 溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜CINC-1及其受体CXCR2的表达及意义 张涛, 施斌, 陈建永, 潘锋
临 床 经 验	83 心得安对食管曲张静脉套扎后再出血的影响 程文芳, 施瑞华, 陈晓星, 丁静
	86 同源异形盒基因CDX2的表达与胃黏膜肠上皮化生类型的关系 王旭光, 张忠, 孙丽萍, 袁媛
	90 肝癌患者血液RASSF1A基因甲基化的检测及其临床意义 仇小强, 陈罡, 余红平, 胡浪
	94 胆囊占位病变中P53和K-ras的表达及其临床意义

	王延召, 于则利, 张立军 97 复发性急性胰腺炎临床特征及诊治分析84例 李鹏, 李晓云, 李郁 102 IL-21受体在溃疡性结肠炎中的表达及对促炎症细胞因子分泌的诱导作用 夏兴洲, 刘占举
病例报告	106 原发性胆汁性肝硬化并结节病1例 雷静静, 周力, 陈佳
附录	109 《世界华人消化杂志》投稿须知
致谢	114 致谢世界华人消化杂志编委
消息	16 第二十一次全国中西医结合消化学术会议征文通知 23 世界华人消化杂志外文字符标准 30 世界华人消化杂志英文摘要要求 35 <i>WJG</i> 荣获2007年“中国百种杰出学术期刊”和2008年中国国际化精品科技期刊 42 2007年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序 58 世界华人消化杂志参考文献要求 67 世界华人消化杂志中文摘要要求 73 世界华人消化杂志修回稿须知 82 世界华人消化杂志数字用法标准 96 中国科技期刊引证报告(核心版)发布世界华人消化杂志2007年影响因子0.568 101 世界华人消化杂志标点符号用法 105 中国科技期刊引证报告(核心版)发布 <i>WJG</i> 2007年影响因子0.745 108 世界华人消化杂志名词术语标准
封面故事	张涛, 施斌, 陈建永, 潘锋. 溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜CINC-1及其受体CXCR2的表达及意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(1): 78-82 http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/78.asp
本期责任人	编务 李慧; 送审编辑 李军亮, 史景红; 组版编辑 吴鹏朕; 责任编辑 李军亮; 英文编辑 张海宁; 审核编辑 张海宁; 形式规范 马连生

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 2009-01-08
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: wjcd@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: wjcd@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: wjcd@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://wjcd.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。

2009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

January 2009 Contents in Brief Volume 17 Number 1

EDITORIAL	1 "Three Barriers" in pancreaticoduodenectomy <i>Tang HH</i>
BASIC RESEARCH	4 Roles of endoplasmic reticulum stress in liver steatosis of type 2 diabetic mice <i>Mao LF, Jiang XW, Qin Y, Dong XG, Li JF, Zhou XY, Pan J</i> 11 Therapeutic effects of Lanyuzan granules on hepatic fibrosis in rats <i>Fang ZX, Li XB, Liu JJ, Geng Z, Tian Q</i> 17 Prevention and treatment of hepatic cirrhosis with herbal medicine Hongtian Gankang <i>Hong Y, Yang RH, Xu Q, Jia HZ, Shi XL</i> 24 Oxidative stress damage and HIF-1 α expression in rat intestinal mucosa during acute necrotic pancreatitis <i>Cui PL, Lv D, Zhang J, Yao SW, Wang YB, Yang ZX</i> 31 Protective effects of edaravone on rats with severe acute pancreatitis <i>Gong P, Zhang Y, Song ZJ</i> 36 Antidiabetic effects of varying molecular chitooligosaccharides on pancreatic islet cells in streptozotocin-induced diabetic rats <i>Liu B, Qin ZK, Lin XM, Mei L, Liu WS, Han BQ</i> 43 Effects of ischemia-reperfusion injury on intestinal mucosa and colon motility in rats <i>Wang H</i>
CLINICAL RESEARCH	49 Relationship between distribution of HBV genotypes and liver diseases in Lhasa <i>Cao ZL, Gao YT, Ji Z, Liu CJ, Bao BH, Zhao JM</i> 53 Identification of colorectal cancer patients by serum protein profile using surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry <i>Fan NJ, Gao CF, Wang XL, Sheng XH, Li DH, Zheng GB</i>
REVIEW	59 Advances in portal hypertension gastropathy <i>Jin SZ, Meng XW, Han MZ</i> 63 Advances of gastrin-releasing peptide receptor in treatment of tumors <i>Zhao KJ, Shen JK</i> 68 P38 mitogen-activated protein kinase signal pathway and hepatic stellate cells <i>Ma C, Ma H</i>
RAPID COMMUNICATION	74 Effects of exogenous carbon monoxide on polymorphonuclear neutrophil, TNF- α and IL-10 expression in rats with intestinal ischemia-reperfusion injury <i>Han N, Li Y, Chen WM</i> 78 Expression and significance of cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 and CXC chemokine receptor 2 in a rat model of colitis <i>Zhang T, Shi B, Chen JY, Pan F</i>
CLINICAL PRACTICE	83 Effects of propranolol on rebleeding following endoscopic esophageal variceal ligation: a prospective, controlled trial <i>Cheng WF, Shi RH, Chen XX, Ding J</i> 86 Relationship between the expression of CDX2 and different types of gastric intestinal metaplasia <i>Wang XG, Zhang Z, Sun LP, Yuan Y</i>

	<p>90 Detection of RASSF1A promoter hypermethylation in plasma of patients with primary hepatocellular carcinoma and its clinical significance <i>Qiu XQ, Chen G, Yu HP, Hu L</i></p> <p>94 Expression of P53 and K-ras in benign neoplasms and carcinoma of gallbladder <i>Wang YZ, Yu ZL, Zhang LJ</i></p> <p>97 Rational diagnosis and therapy for recurrent acute pancreatitis: a clinical analysis of 84 cases <i>Li P, Li XY, Li Y</i></p> <p>102 IL-21 receptor is highly expressed and induces proinflammatory cytokine secretion in patients with ulcerative colitis <i>Xia XZ, Liu ZJ</i></p>
CASE REPORT	<p>106 Primary biliary cirrhosis complicated with sarcoidosis: one-case analysis <i>Lei JJ, Zhou L, Chen J</i></p>
APPENDIX	<p>109 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology</p>
ACKNOWLEDGMENT	<p>114 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
COVER	<p><i>Zhang T, Shi B, Chen JY, Pan F.</i> Expression and significance of cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 and CXC chemokine receptor 2 in a rat model of colitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(1): 78-82 http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/78.asp</p>
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	<p>Assistant Editor: <i>Hui Li</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li, Jing-Hong Shi</i> Electronic Page Editor: <i>Peng-Zhen Wu</i> Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</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 January 8, 2009

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: 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: 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

© 2009 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 © 2009 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

胰十二指肠切除术中的过“三关”

汤恢焕

汤恢焕, 中南大学湘雅医院普外科 湖南省长沙市 410008
汤恢焕, 教授, 主要从事胆道疾病的临床基础研究。
通讯作者: 汤恢焕, 410008, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅医院
普外科. tanghuihuan@yahoo.com.cn
电话: 0731-4327021
收稿日期: 2008-11-24 修回日期: 2008-12-24
接受日期: 2008-12-26 在线出版日期: 2009-01-08

“Three Barriers” in pancreaticoduodenectomy

Hui-Huan Tang

Hui-Huan Tang, Department of General Surgery, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Correspondence to: Hui-Huan Tang, Department of General Surgery, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China. tanghuihuan@yahoo.com.cn

Received: 2008-11-24 Revised: 2008-12-24

Accepted: 2008-12-26 Published online: 2009-01-08

Abstract

There are three main steps during the process of pancreaticoduodenectomy, which directly determine the resectability and difficulty of the operation. In combination with references and the clinical experiences, we discuss the exploratory steps and caution points in pancreaticoduodenectomy, and suggest that clinicians may perform thorough explorations around the head of pancreas in order to standardize the procedures of pancreaticoduodenectomy.

Key Words: Pancreaticoduodenectomy; Standard; Procedure; Exploration

Tang HH. “Three Barriers” in pancreaticoduodenectomy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(1): 1-3

摘要

行胰十二指肠切除术时有三个主要探查步骤, 直接决定病变的可切除性及手术难度。本文在参照文献的基础上结合临床经验论述胰十二指肠切除术过程中的探查步骤及主要注意事项, 指出临床医生可以围绕胰头外、下、上区域序贯行彻底探查将有助于规范胰

十二指肠切除术。

关键词: 胰十二指肠切除术; 规范; 操作; 探查

汤恢焕. 胰十二指肠切除术中的过“三关”. *世界华人消化杂志* 2009; 17(1): 1-3

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1.asp>

0 引言

胰十二指肠切除术(pancreaticoduodenectomy, PD)是治疗胰头和壶腹周围各种良、恶性疾病的标准术式。由于该部位解剖关系复杂、切除范围广、手术步骤繁琐、手术风险较大, 是外科手术中极具挑战性的术式之一。Kausch早在1912年首创胰十二指肠切除术, 直至1935年Whipple首次成功分期实施后, 该术式才渐趋规范化。在近百年不断发展中, 针对切除范围和技术细节进行了许多改进。如1955年Ross提出全胰切除术(total pancreatectomy, TP); 1973年Fortner提出区域性胰腺切除术(regional pancreatectomy, RP)及1986年日本学者提出胰十二指肠联合血管切除的扩大根治术。随着外科经验及技术的进步, PD手术死亡率虽有下降, 但手术切除率仍仅30%。切除术后五年生存率仅5%-10%。手术疗效不佳的原因与患者就诊较晚、胰周解剖复杂、主要血管脏器受侵犯根治切除困难及手术创伤大、患者年龄偏大等有关^[1]。

能否行胰十二指肠切除, 术前应根据B超、CT、MRI、腔内超声或血管造影等影像学检查资料进行评估。但有相当多患者术前影像学资料与手术探查发现不一定相符。有报道术前血管造影发现门静脉-肠系膜上静脉(PV-SMV)受累者, 术中及术后病理学检查证实40%并未发现血管侵犯。即使术中发现肿块“侵犯”门静脉亦有约50%为炎性粘连^[2]。同时随着血管外科的发展, 血管吻合技术不断改进, 术中可切除门静脉(portal vein, PV)后吻合, 从而使过去认为不可切除的肿瘤得到了根治切除的机会。

在PD的手术指征明确后, 手术包括探查、

■背景资料

随着外科经验及技术的进步, PD手术死亡率虽有下降, 但手术切除率仍仅30%。切除术后五年生存率仅5%-10%。手术疗效不佳的原因与患者就诊较晚、胰周解剖复杂、主要血管脏器受侵犯根治切除困难及手术创伤大、患者年龄偏大等有关。

■同行评议者

王凤山, 教授, 中国医科大学附属第一医院肝胆外科; 杨维良, 教授, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科

■ 研发前沿

胰十二指肠切除术是治疗胰头和壶腹周围各种良、恶性疾病的标准术式。由于该部位解剖关系复杂、切除范围广、手术步骤繁琐、手术风险较大,是外科手术中极具挑战性的术式之一。

切除和消化系重建三个主要步骤。其中探查是确定能否切除的重要步骤。探查中俗称要过“三关”,即探查病变与下腔静脉、腹主动脉、肠系膜上动、静脉及肝动脉之间的关系。虽然探查的方法及顺序因施术者的习惯而异,但原则没有本质区别。本章结合作者的临床经验就这一关键步骤进行讨论,以期对临床工作者有所帮助。

1 步骤

进腹后首先探查肝脏、腹膜、盆腔、大网膜、横结肠有无转移结节,以及肝十二指肠韧带、胰腺周围、腹腔动脉周围、肠系膜根部及腹主动脉旁淋巴结有无肿大,以便对病变作出临床评估。如无明显的腹腔转移则应按胰十二指肠切除术的探查方法分外、下、上三个方面循序渐进进行探查。其目的是探查癌是否局限于Vater壶腹周围,门静脉、肠系膜上动、静脉、腹主动脉、下腔静脉及肝动脉等重要血管有无受侵犯。

1.1 外侧探查,了解肿瘤有无下腔静脉及腹主动脉的侵犯。切开十二指肠外侧腹膜(Kocher切口),沿腹膜后疏松结缔组织间隙将十二指肠及胰头部向内掀起,用左手食指和中指钝性分离胰头部背侧与下腔静脉和腹主动脉前方的间隙,便可将十二指肠连同胰腺从腹膜后游离。分离范围应达腹主动脉的前方或左侧。同时应切开横结肠系膜的前叶,使十二指肠的第三段充分游离。此时可将胰头十二指肠提至腹部手术野浅部,进行探查和随后的手术操作。手术者以左手食指和中指在胰十二指肠后方、拇指在其前方,触摸胆总管下端、Vater壶腹或胰头处肿物。注意其性质及与下腔静脉和腹主动脉的关系,并探查胰头后方是否有淋巴结转移。如该处受浸润或下腔静脉、腹主动脉壁受浸润,则手指不能伸入该间隙,说明肿瘤已超出可根治切除的范围;若手指容易伸入此间隙,提示癌肿后方尚局限,可进行后续步骤探查。由于CT能清楚显示腹膜后间隙,因此决定剖腹探查者90%以上的病例可顺利通过这一步(图1)。

1.2 探查胰腺下缘 将胃、横结肠韧带(大网膜)牵平后充分切开,显露胰腺头部及颈部,将胃向上钩开后,于小网膜腔探查胰腺的形态及肿块的边界。在胰腺下缘近胰头处切开腹膜层及纤维脂肪组织,结扎引流胰腺血流的小静脉,显露SMV和SMA。钝或锐性分开静脉前面的疏松组织,沿SMV用手指或花生米分离胰腺颈部后方

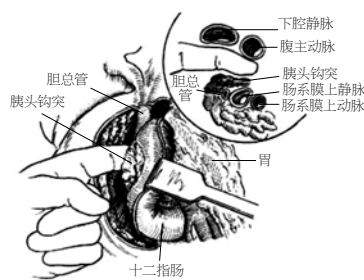


图1 探查胰头外侧。

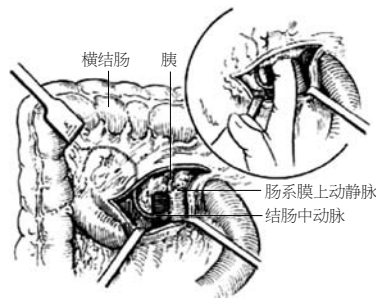


图2 探查胰腺下缘。

的间隙可达胰腺上缘。该处一般无血管分支,容易分离。如遇阻力则应停止,以防撕破门静脉或肠系膜静脉引起不可控制的大出血,此情况也间接提示肿瘤或炎症已侵出胰腺之外。当肠系膜上静脉寻找有困难时,可沿结肠中静脉向上分离,到达与肠系膜上静脉汇接处,便容易显露SMV。第二步主要是了解肿块对肠系膜血管有无侵犯,是关键的一步。显露肠系膜上静脉和门静脉后可行第三步探查。但在第二步显露有困难时,也可先行第三步探查,然后再第二、三步联合进行探查(图2)。

1.3 探查胰腺上缘 最后探查胰腺上缘是因为该处必须切断几支重要血管。如果前两步探查证明肿瘤无法切除,该复杂步骤便可免除。探查方法是切开小网膜及肝动脉鞘,显露肝总动脉,向上游离至腹腔动脉,了解有无淋巴结肿大及局部侵犯,如能达到R0切除,则沿肝总动脉向远端解剖。于根部结扎、切断胃右动脉,继续向右可找到胃十二指肠动脉和肝固有动脉。游离肝固有动脉过带牵引,认清两者关系后结扎、切断胃十二指肠动脉,近断端再贯穿缝扎。显露门静脉,游离后过带牵引。胃十二指肠动脉主干有时较短,遇这种情况可先穿过一根丝线牵引,然后向远端分离,至足够长度后双重结扎再钳夹切断并缝扎近端。对有动脉粥样硬化的老年人,结扎时可造成动脉内膜断裂,术后形成假性动脉瘤并破裂出血。此时最好用血管缝线缝合动脉残端。随后分离并显露胆总管及周围淋巴结并过带牵引。此时试用手指或花生米从胰腺上缘的胰腺后门静脉腹侧之间分离,正常情况下

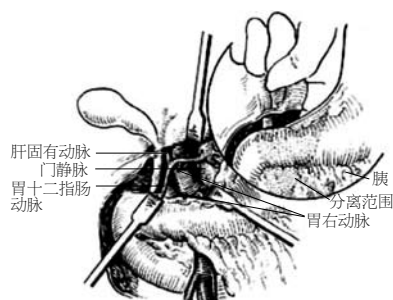


图3 探查胰腺上缘。

胰腺与门静脉之间为疏松组织, 容易分开. 然后再以另一手指自胰腺下缘探查处沿肠系膜上静脉前方向上. 如两指会师提示肿瘤未侵及PV及SMV, 能基本确定肿瘤可以切除(图3).

需要注意的是, 经上述探查之后胰十二指肠切除术中仍应继续处处考虑到退路. 横断胰腺一定要在彻底肯定肿块可切除以后才进行, 因其余步骤都可以中转为姑息性手术.

2 结论

上述三步为传统的探查方法. 随着临床经验不断积累及扩大胰十二指肠切除术的实施, 探查及游离的方式亦可不完全相同.

1973年Fortner首先提出了区域性胰腺切除(RP)的概念, 在仔细研究胰腺癌的淋巴转移方式后, 认为扩大切除范围可以提高切除率、改善疗效. 他认为PV和SMV受累有两种可能性: (1)癌性侵犯; (2)炎性粘连. 而后者所占比例更高. 即使局限性肿瘤浸润, 也可切除并重建受累的SMV或PV以便更广泛的整块切除区域淋巴结、提高切除率. 扩大的PD在日本胰腺外科界受到青睐, 其理论依据为PV受浸润是构成局部病变不能切除的主要原因. 肿瘤与PV粘连不易分开, 即使没有胰外转移, 亦常放弃根治性切除. 这种情况约50%是炎性粘连, 手术中很难鉴别. 切除PV无疑可提高手术切除率. 日本报道扩大根治后胰头癌的手术切除率可由7%-20%提高到50%, 根治性切除率从10%提高到40%-50%^[3].

虽然对该术式的疗效仍有争议, 但提高了手术切除率是事实^[1,4-5]. 该方法强调整块切除肿瘤的同时将门静脉、肠系膜上静脉一并切除后重建. 即不分离肿块和门静脉之间的粘连, 而将SMA游离牵引保护后把肿块和上述静脉一并切除重建. 一般PV或SMV的切除长度为0.8-8 cm超过4 cm需架桥吻合, 多用自体血管也可用人工血管架桥. 如侧壁切除不超过PV周径1/3, 长度不超过1.5 cm可直接修补或局部楔形切除后吻合^[6-7]. PV阻断时间在40 min以内较安全, 如超过60 min应作门体静脉的转流. 阻断PV时应尽量避免同时阻断肝动脉. 大样本回顾性资料分析发现扩大PD不能改善胰头癌的生存率, 反而增加了手术并发症的发生率^[1-2]. 笔者认为如不能达到R0切除应尽量避免实施此类手术.

3 参考文献

- 1 Cameron JL, Riall TS, Coleman J, Belcher KA. One thousand consecutive pancreaticoduodenectomies. *Ann Surg* 2006; 244: 10-15
- 2 Leach SD, Lee JE, Charnsangavej C, Cleary KR, Lowy AM, Fenoglio CJ, Pisters PW, Evans DB. Survival following pancreaticoduodenectomy with resection of the superior mesenteric-portal vein confluence for adenocarcinoma of the pancreatic head. *Br J Surg* 1998; 85: 611-617
- 3 Imaizumi T, Hanyu F, Harada N, Hatori T, Fukuda A. Extended radical Whipple resection for cancer of the pancreatic head: operative procedure and results. *Dig Surg* 1998; 15: 299-307
- 4 Kennedy EP, Yeo CJ. Pancreaticoduodenectomy with extended retroperitoneal lymphadenectomy for periampullary adenocarcinoma. *Surg Oncol Clin N Am* 2007; 16: 157-176
- 5 Siriwardana HP, Siriwardena AK. Systematic review of outcome of synchronous portal-superior mesenteric vein resection during pancreatotomy for cancer. *Br J Surg* 2006; 93: 662-673
- 6 谭毓铨, 陈光. 胰头癌行扩大胰十二指肠切除术的现状与思考. *中国普外基础与临床杂志* 2001; 8: 406-408
- 7 van Geenen RC, ten Kate FJ, de Wit LT, van Gulik TM, Obertop H, Gouma DJ. Segmental resection and wedge excision of the portal or superior mesenteric vein during pancreatoduodenectomy. *Surgery* 2001; 129: 158-163

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

同行评价

本文作者结合自身经验综述了胰十二指肠切除术中的探查步骤, 文笔锐利, 简单, 画龙点睛, 值得外科医生学习.

内质网应激对2型糖尿病小鼠脂肪肝发生的影响

毛刘锋, 姜小伟, 秦艳, 董晓光, 李继锋, 周晓莹, 潘杰

■背景资料

脂肪肝是2型糖尿病(T2DM)的常见肝脏并发症。研究表明内质网应激(ERS)在T2DM和脂肪肝的形成过程中具有重要作用。然而目前对ERS在T2DM脂肪肝发生中的作用机制尚未完全明了。本文就ERS在T2DM小鼠脂肪肝形成中的作用机制进行了探讨, 将为T2DM脂肪肝及其相关疾病治疗策略的制定提供有参考价值的实验数据。

毛刘锋, 秦艳, 董晓光, 潘杰, 山东师范大学生命科学学院 山东省动物抗性生物学重点实验室 山东省济南市 250014
姜小伟, 山东省莱西市农业局农业广播学校 山东省莱西市 266600
李继锋, 山东师范大学校医院内科 山东省济南市 250014
周晓莹, 山东大学医学院医疗系 山东省济南市 250012
毛刘锋, 山东师范大学生命科学学院在读硕士, 主要从事2型糖尿病发生机制的研究。

山东省教育厅科技计划项目, No. J06L11

作者贡献分布: 此课题由毛刘锋与潘杰共同设计; 研究过程由毛刘锋, 姜小伟, 秦艳, 董晓光及潘杰操作完成; 研究相关分析工具由李继锋与周晓莹提供; 数据分析由毛刘锋与姜小伟等完成; 本论文写作主要由毛刘锋与潘杰完成。

通讯作者: 潘杰, 250014, 山东省济南市, 山东师范大学生命科学学院. jiepan@sdu.edu.cn

电话: 0531-86182572

收稿日期: 2008-11-17 修回日期: 2008-12-02

接受日期: 2008-12-08 在线出版日期: 2009-01-08

Roles of endoplasmic reticulum stress in liver steatosis of type 2 diabetic mice

Liu-Feng Mao, Xiao-Wei Jiang, Yan Qin,
Xiao-Guang Dong, Ji-Feng Li, Xiao-Ying Zhou, Jie Pan

Liu-Feng Mao, Yan Qin, Xiao-Guang Dong, Jie Pan,
College of Life Sciences, the Key Laboratory of Animal
Resistance Biology of Shandong, Shandong Normal Uni-
versity, Jinan 250014, Shandong Province, China

Xiao-Wei Jiang, the Broadcasting College of Agriculture
Bureau of Laixi, Laixi 266600, Shandong Province, China

Ji-Feng Li, Department of Internal Medicine, Clinical Hos-
pital, Shandong Normal University, Jinan 250014, Shan-
dong Province, China

Xiao-Ying Zhou, Department of Medicine, Medical Col-
lege, Shandong University, Jinan 250012, Shandong Pro-
vince, China

Supported by: the Technology Project of the Department
of Education of Shandong Province, No. J06L11

Correspondence to: Dr. Jie Pan, College of Life Sciences,
Shandong Normal University, Jinan 250014, Shandong
Province, China. jiepan@sdu.edu.cn

Received: 2008-11-17 Revised: 2008-12-02

Accepted: 2008-12-08 Published online: 2009-01-08

Abstract

AIM: To investigate the roles of endoplasmic reticulum stress (ERS) in development of liver steatosis.

METHODS: The differential expressions of ERS and lipid metabolism related genes in the liver of T2DM and non-T2DM mice were analyzed using real-time quantitative RT-PCR. Serum

total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), free fatty acid (FFA), alanine amino transferase (ALT) and aspartate amino transferase (AST) levels were determined. The liver TG, FFA content and morphology were also analyzed.

RESULTS: Compared with non-T2DM, T2DM mice had manifestations: (1) Insulin Resistance, increased fasting blood glucose (increased 30.76 ± 4.52 vs 12.80 ± 2.13 , 14.73 ± 2.74 vs 4.61 ± 1.12); (2) obviously elevated liver TG and FFA levels ($P < 0.01$); marked lesion of fatty liver was observed. (3) Up-regulated liver glucose regulated protein 78 (GRP78), X-box binding protein 1 (XBP1), C/EBP homologous protein (CHOP), mannosidase alpha-like 1 (EDEM1), glycogen synthase kinase3 β (GSK3 β), apolipoprotein100 (apoB100), sterol regulatory element binding proteins1c (SREBP1c), acetyl CoA carboxylase α (ACC α) and fatty acid synthase (FAS) mRNA levels ($P < 0.05$). (4) Significantly increased serum TG, TC, LDL-C, FFA, ALT and AST ($P < 0.01$). Serum apoB100 was first increased and then decreased ($P < 0.05$).

CONCLUSION: ERS plays a central role in the development of liver steatosis in the T2DM mouse through increased lipogenesis and decreased secretion of apoB100.

Key Words: Endoplasmic reticulum stress; Liver steatosis; Type 2 diabetes; LDLR deficient mice

Mao LF, Jiang XW, Qin Y, Dong XG, Li JF, Zhou XY, Pan J. Roles of endoplasmic reticulum stress in liver steatosis of type 2 diabetic mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(1): 4-10

摘要

目的: 探讨内质网应激(ERS)在2型糖尿病(T2DM)小鼠脂肪肝发生中的作用机制。

方法: 应用实时定量RT-PCR技术检测T2DM与非糖尿病小鼠肝脏ERS和脂代谢相关基因表达差异, 并进行血生化指标及肝脏形态学检测。

结果: 与同龄非T2DM小鼠相比T2DM小

■同行评议者

曹志成, 英国生物医学科学研究所院士, 伊利沙伯医院临床肿瘤科

鼠表现为: (1)胰岛素抵抗、空腹血糖升高(30.76 ± 4.52 vs 12.80 ± 2.13 , 14.73 ± 2.74 vs 4.61 ± 1.12). (2)肝脏TG和FFA水平明显升高($P < 0.01$); 脂肪肝病变明显. (3)肝脏GRP78、XBP1、CHOP、EDEM1、GSK3 β 、apoB100、SREBP1c、ACC α 及FAS的mRNA水平均显著上调($P < 0.05$). (4)血清TG、TC、LDL-C、FFA、ALT及AST显著升高($P < 0.01$). 血清apoB100水平先升高, 后下降($P < 0.05$).

结论: ERS参与调节肝脏脂质及apoB100的合成与代谢过程, 在T2DM小鼠脂肪肝发生过程中起着重要作用.

关键词: 内质网应激; 脂肪肝; 2型糖尿病; LDLR缺失小鼠

毛刘锋, 姜小伟, 秦艳, 董晓光, 李继锋, 周晓莹, 潘杰. 内质网应激对2型糖尿病小鼠脂肪肝发生的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(1): 4-10

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/4.asp>

0 引言

脂肪肝是2型糖尿病(T2DM)的常见肝脏并发症^[1-4], 然而, 其发生发展的分子机制尚未完全明确. 内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)是一种由于外界环境刺激而导致的错误折叠与未折叠蛋白质在内质网腔内聚集以及Ca²⁺平衡紊乱的状态^[5-7]. 研究表明ERS在T2DM以及脂肪肝的形成过程中具有重要作用^[8-10]. ERS可能通过影响脂代谢相关基因, 如固醇调节元件结合蛋白(SREBP1c)等的表达, 增加肝脏脂肪酸的合成和积聚^[11]. 另外, ERS在肝载脂蛋白B100(apoB100)的合成和分泌过程中也具有重要的调节作用, 影响和制约着肝细胞合成和分泌极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL), 引起肝脏脂质积累^[12-13]. 目前对ERS在T2DM脂肪肝发生中的作用机制尚未完全明了. 本实验通过高脂饲料喂养联合链脲佐菌素诱导, 在低密度脂蛋白受体基因突变小鼠的基础上成功建立T2DM模型, 本文针对ERS在T2DM模型小鼠脂肪肝形成中的作用机制进行了探讨.

1 材料和方法

1.1 材料 低密度脂蛋白受体基因突变(LDLR^{-/-})小鼠(美国Jackson实验室提供), 于SPF级动物房饲养, 室温为20-22℃, 相对湿度为65%-75%, 保持12 h循环照明. 本小鼠实验严格按照山东大学动物管理与动物实验的有关管理章程进行, 符

合动物实验的伦理要求. ♂小鼠出生后第22天断乳, 随机分为三组: 组1小鼠饲喂高脂饲料(含20%脂肪、20%蔗糖和1.25%胆固醇); 组2、3为对照组小鼠, 饲喂标准饲料(含4%脂肪和0.075%胆固醇); 实验过程中三组小鼠均令其自由进食水. 组1(43只)参照传统的方法^[14-15]建立T2DM模型, 小鼠断乳后食用高脂饲料3 wk, 禁食6 h, 一次性ip链脲佐菌素(STZ)(100 mg/kg, Sigma)之后, 继续喂养高脂饲料; 于10周龄时禁食6 h, 测量血糖(GLU)水平, 进行葡萄糖耐量试验, 以确定T2DM建模是否成功. 其中88%(38只)为建模成功小鼠, 简称T2DM小鼠. 组2(38只)小鼠食用标准饲料3 wk后, 采用同样方法注射安慰剂(100 mg/kg, pH4.4的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液), 继续喂养标准饲料, 该组小鼠简称NC小鼠. 组3(38只)小鼠于整个实验中, 持续食用标准饲料, 不做任何药物注射, 简称NT小鼠.

1.2 方法

1.2.1 胰岛素抵抗指数(IR)及血生化指标: 分别令10、14和18周龄的三组小鼠禁食6 h后, 采集静脉血($n \geq 10$), 采用血糖仪测GLU水平; COD-PAP和GPO-PAP酶学法测定总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)含量; 免疫比浊法测定血清apoB100; 速率法测定丙氨酸氨基转移酶(ALT)以及天门冬氨酸氨基转移酶(AST)含量; 放免法测定胰岛素(INS)水平; 酶比色法测定游离脂肪酸(FFA)含量. 用稳态模式评估法(HOMA)^[16]中的HOMA-IR公式计算IR指数, 即HOMA-IR = (GLU × INS)/22.5.

1.2.2 葡萄糖耐量试验: 参照Nakatani *et al*^[17]的方法, 三组小鼠分别于10和18周龄时禁食6 h后, ip 200 g/L葡萄糖溶液(2 g/kg体重), 于注射后0、15、30、60及120 min, 测定小鼠GLU水平.

1.2.3 肝脏FFA和TG的测定: 取新鲜肝脏组织, 用9 g/L的生理盐水4℃下制备10%的肝匀浆, 3000 r/min离心15 min后取上清, 分别用酶比色法测定FFA含量, COD-PAP法测定TG含量.

1.2.4 肝组织形态学观察: 取同一部位小鼠肝组织, 40 g/L甲醛溶液中固定48 h后制备冰冻切片, 油红O染色, 苏木精复染, 光镜观察、拍照.

1.2.5 肝组织ERS相关基因mRNA表达的测定: 分别取10和18周龄的组1与组2小鼠肝组织($n \geq 10$), 用TRIzol试剂(BioFlux, Japan)抽提总RNA, DNase I (TaKaRa, Japan)处理后用M-MLV反转录酶(TaKaRa, Japan)进行反转录. 应用DNA Star 6.0软件, 根据GenBank中小鼠的靶基因序

■ 研发前沿

目前关于ERS在脂肪肝发生中的作用机制的研究多集中在ERS对体外培养的肝细胞apoB100和TG分泌的影响方面, 而针对ERS与T2DM脂肪肝形成和发展相关性的研究报道较少, 具体的内在机制尚不清楚. 肝脏脂质的合成和积累在脂肪肝的形成中具有重要的作用, 而关于ERS对肝脏脂代谢的影响报道也不多见.

■ 相关报道

Ozcan *et al* 报道 ERS 在 T2DM 和脂肪肝的形成过程中具有重要作用, 利用 ERS 阻遏试剂对改善 T2DM 小鼠胰岛素抵抗状态及减轻脂肪肝病变具有重要作用; Ota *et al* 报道用低剂量饱和脂肪酸处理的肝细胞出现 ERS 相关基因表达和 apoB100 分泌增加, 但随着饱和脂肪酸剂量的增加和处理时间的延长, 肝细胞出现 ERS 过度反应并伴随 apoB100 和 TG 的分泌减少。

表 1 靶基因引物序列

基因号	基因	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
NM007393	β -肌动蛋白	CCTCTATGCCAACACAGTGC GTACTCCTGCTTGCTGATCC	211
NM022310	葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)	ATCAGGGCAACCGCATCA CGCATCGCCAATCAGACG	71
NM013842	X盒结合蛋白 1(XBP1)	TGGGCATTCTGGACAAGTT GAAAGGGAGGCTGGTAAGG	124
NM007837	C/EBP同源蛋白 (CHOP)	CAGCGACAGAGCCAGAATAAC ACCGTCTCCAAGGTGAAAGG	148
NM138677	内质网甘露糖苷酶 1样蛋白(EDEM1)	CCAGATGGTTGGCTTGATT AGAGCTGGACAGAACTTCG	141
NM019827	糖原合酶激酶3 β (GSK3 β)	CCATCCTTATCCCTCCACAT CACGGTCTCCAGCATTAGTAT	93
NM009693	载脂蛋白B100 (apoB100)	TCGAGCACAGATGACCAGAGT CTTAGAAGCCTTGGGCACAT	201
NM011480	固醇调节元件结合 蛋白1c(SREBP1c)	TGGCTTGGTGATGCTATGTT TAAGGGGTTGGGAGTAGAGG	257
NM133360	乙酰辅酶A羧化酶 α (ACC α)	TGGCGTCCGCTCTGTGATA TGGGTGAGATGTCTGGGTC	140
NM007988	脂肪酸合酶(FAS)	ACCCAAGCGGTCTGGAAAG CGGATGCCTCTGAACCACTC	212

列设计 PCR 引物(表1)。分别检测上述两组小鼠肝脏葡萄糖调节蛋白78(GRP78)、X盒结合蛋白1(XBP1)、C/EBP同源蛋白(CHOP)、甘露糖苷酶1样蛋白(EDEM1)、糖原合酶激酶(GSK3 β)、apoB100、SREBP1c、乙酰辅酶A羧化酶 α (ACC α)以及脂肪酸合酶(FAS)的mRNA表达水平。使用Rotor-Gene 3000 Real-time PCR仪(Corbett Research)及Sybergreen I 试剂最适条件下扩增目的基因及内参。将每个目的基因的拷贝数与其相对应的 β -肌动蛋白基因的拷贝数相除, 计算出目的基因的相对表达量。

统计学处理 采用SPSS13.0软件进行统计分析, 所有数据采用mean \pm SD表示。组间比较采用独立样本的*t*检验, 以*P*<0.05为有统计学上显著差异, *P*<0.01为有极显著差异。

2 结果

2.1 GLU、INS及血生化指标变化特征 三组小鼠于10周龄时检测血清GLU和INS水平, 并计算IR指数(图1), 进行葡萄糖耐量试验(图2)。结果表明, 组1小鼠中88%表现为GLU升高(组1 vs 组2: 14.73 \pm 2.74 vs 4.61 \pm 1.12 mmol/L)、葡萄糖耐量异常以及IR加重(组1 vs 组2: 30.76 \pm 4.52 vs 12.80 \pm 2.13)。因此, 这些小鼠作为T2DM模型用于以下实验。该组小鼠血清TC、TG、LDL-C

和FFA含量于10周龄时较非T2DM(NC和NT)小鼠明显升高, 并持续升高至18周龄(*P*<0.01, 表2), NC与NT组间无差异。T2DM小鼠血清apoB100含量在10周龄时明显高于同龄非T2DM小鼠(*P*<0.01), 18周龄时低于非T2DM小鼠(*P*<0.05)。血清ALT及AST分别从10周龄和14周龄时显著升高(*P*<0.01, 表2)。

2.2 肝脏TG和FFA含量检测 与非糖尿病小鼠组(NC和NT)相比, T2DM组小鼠肝脏TG和FFA, 10周龄时明显升高, 持续升高至18周龄(*P*<0.01, 表3)。

2.3 肝组织学变化 T2DM组小鼠10周龄时肝细胞质内出现大小不等的脂滴, 呈现明显的肝脂肪变性。14和18周龄时病变加重, 并伴有局部炎症细胞浸润。各年龄段的NC小鼠肝细胞内均未观察到明显的脂质沉积(图3, 因NC与NT组间无差异, 故省略NT组检测数据, 下同)。

2.4 肝组织ERS相关基因表达特征 与NC小鼠相比, T2DM组小鼠10周龄时肝脏ERS相关因子GRP78、XBP1和CHOP表达水平明显升高, 并持续到18周龄(*P*<0.05)。SREBP1c、ACC α 、FAS和apoB100的表达水平在10和18周龄时较NC小鼠明显升高(*P*<0.01)。然而, T2DM组小鼠apoB100水平在18周龄时较10周龄有所降低。T2DM组小鼠肝脏GSK3 β 及内质网相关性降解基因EDEM1表达水平在18周龄时, 较NC小鼠显

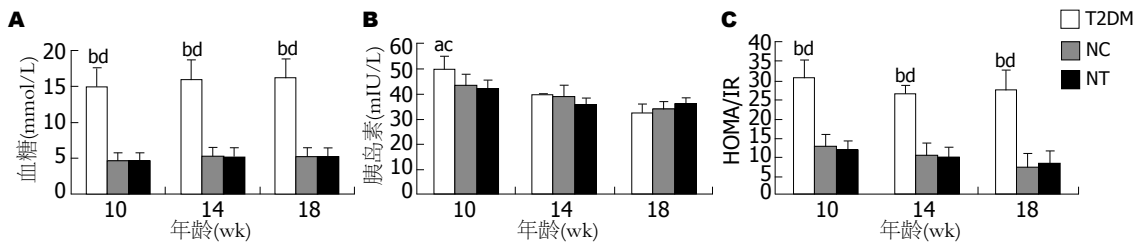


图 1 不同年龄T2DM和非T2DM小鼠血糖, 胰岛素及HOMA-IR变化. A: 血糖; B: 胰岛素; C: HOMA-IR. ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, T2DM和NC小鼠在相同年龄段相比较; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$, T2DM和NT小鼠在相同年龄段相比较.

■ 创新盘点

本实验通过高脂饲料喂养联合链脲佐菌素诱导, 成功建立了低密度脂蛋白受体基因突变T2DM小鼠模型. 应用实时定量RT-PCR技术对肝脏ERS及脂代谢相关基因的表达进行分析, 研究了ERS在调节肝脏脂质及apoB100的合成与代谢过程中的作用, 从而探讨了ERS在T2DM小鼠脂肪肝发生中的作用机制.

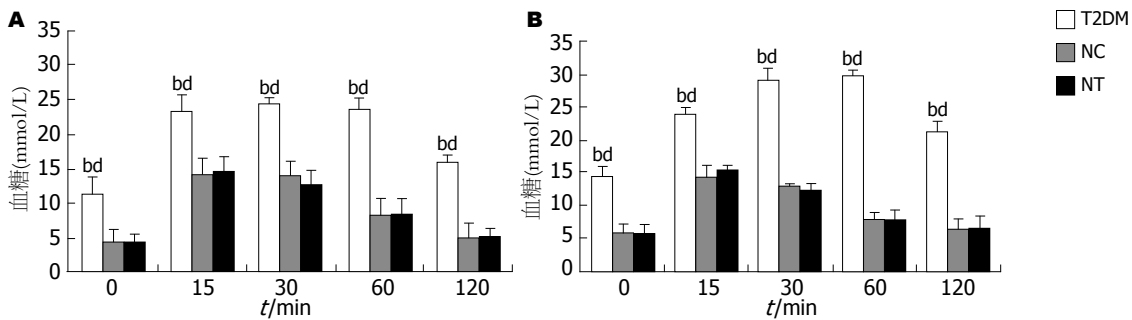


图 2 不同年龄T2DM和非T2DM小鼠葡萄糖耐量试验. A: 10周龄时; B: 18周龄时. ^b $P < 0.01$, T2DM和NC小鼠在相同年龄段相比较; ^d $P < 0.01$, T2DM和NT小鼠在相同年龄段相比较.

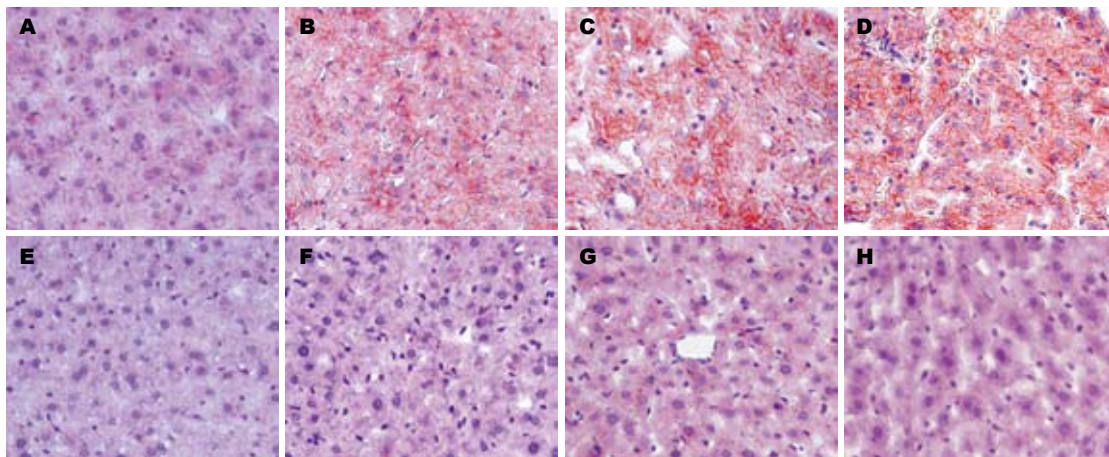


图 3 不同年龄T2DM和NC小鼠肝脏组织形态($\times 200$). A-D: T2DM小鼠6, 10, 14和18周龄时肝脏切片; E-H: NC小鼠6, 10, 14和18周龄时肝脏切片. 油红O染色, 苏木精复染.

著升高($P < 0.05$, 表4).

3 讨论

研究表明, 高脂饮食喂养的LDLR^{-/-}小鼠容易诱发T2DM和IR^[18]. 本实验通过高脂饲料喂养联合STZ诱导, 在LDLR^{-/-}小鼠的基础上成功建立了T2DM模型. 该小鼠模型表现出明显的高GLU和IR, 同时表现出明显的脂肪肝病变. ERS是T2DM在细胞和分子水平的一个重要特征^[8,19-20]. 本实验显示T2DM小鼠肝脏ERS相关因子GRP78、XBP1和CHOP的mRNA水平较非T2DM小鼠升高, 且与脂肪肝的病变趋势一致.

这说明ERS在T2DM脂肪肝的形成过程中具有重要的作用.

在脂肪肝的形成和发展过程中常常伴随着肝脏中脂肪酸合成增加及VLDL分泌的减少^[13,21-22]. SREBP1可引起与胆固醇/三酰甘油合成和摄取相关基因表达的增加, 导致肝细胞内胆固醇和脂肪酸的积聚^[23-25]. 本实验中, T2DM小鼠肝脏SREBP1c较非T2DM小鼠表达增加, 同时脂肪酸合成基因FAS和ACC α 的表达也显著增高, 表明肝脏内脂肪酸合成增加. 研究表明同型半胱氨酸诱导产生的ERS可以激活SREBP1的表达进而影响脂质的代谢^[26]. 同时ERS可通过JNK(c-JUN

■应用要点

本研究应用T2DM小鼠模型,研究了ERS与脂肪肝之间的关系. 研究结果将有助于进一步了解ERS在T2DM脂肪肝形成和发展中的作用机制. 通过调控ERS反应的过程和程度,将会为T2DM脂肪肝及其相关疾病提供新的治疗策略.

表 2 小鼠血清TC, TG, LDL-C, FFA, apoB100, ALT及AST含量 ($n = 10$, mean \pm SD)

项目	分组	年龄(wk)		
		10	14	18
TC(mmol/L)	T2DM	55.23 \pm 4.18 ^{bd}	54.73 \pm 6.08 ^{bd}	59.65 \pm 4.73 ^{bd}
	NC	4.32 \pm 2.35	5.39 \pm 0.97	5.33 \pm 0.49
	NT	4.43 \pm 1.32	5.51 \pm 1.02	5.42 \pm 0.85
TG(mmol/L)	T2DM	10.97 \pm 3.22 ^{bd}	11.74 \pm 0.37 ^{bd}	12.96 \pm 1.43 ^{bd}
	NC	1.94 \pm 0.12	1.65 \pm 0.27	1.61 \pm 0.07
	NT	1.89 \pm 0.26	1.70 \pm 0.56	1.72 \pm 0.13
LDL-C(mmol/L)	T2DM	47.21 \pm 3.90 ^{bd}	49.47 \pm 6.10 ^{bd}	49.81 \pm 2.44 ^{bd}
	NC	3.72 \pm 0.22	3.13 \pm 0.54	3.24 \pm 0.19
	NT	3.56 \pm 1.56	3.56 \pm 0.54	3.35 \pm 0.25
FFA(mmol/L)	T2DM	9.51 \pm 4.04 ^{bd}	9.94 \pm 1.71 ^{bd}	10.92 \pm 1.08 ^{bd}
	NC	1.70 \pm 0.05	1.52 \pm 0.15	1.32 \pm 0.35
	NT	1.57 \pm 0.11	1.57 \pm 0.23	1.42 \pm 0.26
apoB100(g/L)	T2DM	0.44 \pm 0.15 ^{bd}	0.22 \pm 0.05	0.18 \pm 0.03 ^{ac}
	NC	0.20 \pm 0.01	0.20 \pm 0.03	0.25 \pm 0.02
	NT	0.19 \pm 0.01	0.21 \pm 0.02	0.24 \pm 0.03
ALT(IU/L)	T2DM	87.32 \pm 11.08 ^{bd}	102.11 \pm 12.11 ^{bd}	130.21 \pm 4.52 ^{bd}
	NC	42.50 \pm 3.08	46.30 \pm 2.05	51.51 \pm 6.52
	NT	40.25 \pm 3.26	45.85 \pm 1.26	53.56 \pm 5.36
AST(IU/L)	T2DM	120.11 \pm 9.90	145.30 \pm 5.21 ^{bd}	206.50 \pm 24.11 ^{bd}
	NC	117.21 \pm 11.21	102.31 \pm 12.41	138.30 \pm 17.42
	NT	114.26 \pm 8.59	110.56 \pm 10.26	129.59 \pm 12.97

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs NC组(相同年龄段); ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs NT组(相同年龄段).

表 3 小鼠肝脏TG和FFA含量 ($n = 10$, mean \pm SD)

项目	分组	年龄(wk)		
		10	14	18
TG(μ mol/g)	T2DM	48.95 \pm 5.25 ^{bd}	49.56 \pm 3.45 ^{bd}	52.32 \pm 5.36 ^{bd}
	NC	26.32 \pm 4.32	27.52 \pm 4.21	32.37 \pm 2.36
	NT	24.56 \pm 3.26	25.26 \pm 4.28	26.77 \pm 4.56
FFA(μ mol/g)	T2DM	87.19 \pm 9.82 ^{bd}	97.58 \pm 5.26 ^{bd}	102.22 \pm 10.36 ^{bd}
	NC	29.75 \pm 3.09	32.44 \pm 2.13	42.87 \pm 9.83
	NT	28.56 \pm 5.26	35.46 \pm 5.26	41.86 \pm 7.26

^b $P < 0.01$ vs NC组(相同年龄段); ^a $P < 0.01$ vs NT组(相同年龄段).

NH₂ terminal kinase)途径激活GSK3 β 的表达,后者在IR及激活SREBP1c表达的过程中具有重要作用^[11]. 本实验中T2DM小鼠GSK3 β 和SREBP1c的表达上调,表明ERS参与了调控脂代谢相关基因的表达,增加了肝细胞内脂质的积累.

ApoB100在富含TG的脂蛋白如VLDL的合成和分泌中发挥重要作用. 本实验中18周龄T2DM小鼠肝脏apoB100 mRNA的表达水平较10周龄时降低,这可能是因为10周龄时引发的ERS通过上调apoB100的表达来应对肝脏内脂质

的积累,而在18周龄时因为未折叠的apoB100蛋白在内质网内大量积聚,反馈阻遏了apoB100基因的表达. 关于ERS对apoB100和TG合成和分泌的影响有不同的报道^[13,27-29]. 高同型半胱氨酸血症常常伴随着脂肪肝的产生,然而在小鼠模型中高同型半胱氨酸血症所引发ERS却伴随着TG分泌的增多^[27]. 用衣霉素、二硫苏糖醇或葡萄糖胺培养细胞所引发的ERS可以使肝细胞中apoB100分泌减少^[28-29]. Ota *et al*^[13]发现用低剂量饱和脂肪酸处理的肝细胞出现ERS相关基因

表 4 小鼠ERS和脂代谢相关基因mRNA在肝脏中的相对表达量 ($n = 10$, mean \pm SD)

基因	T2DM组		NC组	
	10周龄	18周龄	10周龄	18周龄
GRP78	(5.17 \pm 0.22)E-02 ^b	(5.89 \pm 0.34)E-02 ^b	(1.75 \pm 0.10)E-02	(1.44 \pm 0.13)E-02
XBP1	(4.30 \pm 0.42)E-01 ^a	(5.50 \pm 0.46)E-01 ^a	(3.13 \pm 0.12)E-01	(4.45 \pm 0.13)E-01
CHOP	(9.98 \pm 0.45)E-03 ^b	(3.71 \pm 0.15)E-02 ^b	(3.72 \pm 0.22)E-03	(1.95 \pm 0.13)E-02
EDEM1	(1.10 \pm 0.08)E-01	(2.34 \pm 0.10)E-01 ^a	(1.31 \pm 0.11)E-01	(1.87 \pm 0.10)E-01
GSK3 β	(2.30 \pm 0.24)E-02	(3.53 \pm 0.20)E-02 ^a	(2.07 \pm 0.22)E-02	(3.02 \pm 0.21)E-02
apoB100	(4.68 \pm 0.31)E-02 ^b	(3.13 \pm 0.30)E-02 ^a	(3.33 \pm 0.21)E-02	(2.34 \pm 0.12)E-02
SREBP1c	(6.69 \pm 0.41)E-02 ^b	(5.94 \pm 0.31)E-02 ^b	(3.56 \pm 0.32)E-02	(4.23 \pm 0.33)E-02
ACC α	(1.41 \pm 0.12)E-02 ^b	(1.48 \pm 0.13)E-02 ^b	(8.55 \pm 0.32)E-03	(8.21 \pm 0.41)E-03
FAS	(9.26 \pm 0.72)E-04 ^b	(1.21 \pm 0.13)E-03 ^b	(3.27 \pm 0.55)E-04	(6.39 \pm 0.62)E-04

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs NC组(相同年龄段).

的表达和apoB100分泌增加, 但是随着饱和脂肪酸剂量的增加和处理时间的延长, 肝细胞出现ERS过度反应并伴随apoB100和TG的分泌减少. 本实验显示, 与基因表达水平一致, T2DM小鼠血清apoB100的含量在10周龄时增加, 而在18周龄时显著降低, 表明T2DM小鼠在脂肪肝的形成过程中存在apoB100蛋白合成和分泌的减少, 而ERS在这一过程中具有重要的调节作用.

这种apoB100分泌的减少, 可能是由于非折叠的apoB100蛋白在内质网内大量积聚, 降解增多的结果, 而这是通过ERS所参与的泛素化蛋白质降解途径实现的^[12,29]. Qiu *et al*^[29]发现用葡萄糖胺培养肝细胞所引发的apoB100分泌的减少与GRP78的含量呈正相关, 同时可被蛋白酶体抑制剂所阻止, 说明GRP78在内质网质量控制和蛋白酶体降解途径中影响着apoB100非折叠蛋白的降解. EDEM1是一种重要的内质网相关性降解途径的标志分子^[30-31]. 本实验中, T2DM小鼠在18周龄时肝脏GRP78和EDEM1 mRNA表达水平均显著增加, 这表明肝脏内质网相关性降解增强, 从而加速内质网内累积的apoB100等非折叠蛋白的降解. 这也说明ERS在降低T2DM小鼠肝脏apoB100和VLDL合成和分泌、增加脂质积累方面具有重要作用, 加速了脂肪肝的形成.

在T2DM发生过程中常常伴随着脂代谢异常及肝细胞内脂质的累积, 从而引发ERS. 本实验中T2DM小鼠肝脏ERS相关及脂肪酸合成基因的表达明显上调. 在T2DM初期ERS通过增加apoB100等的合成和分泌来应对肝脏内不断增加的脂质积累, 从而保护肝脏. 但随着T2DM的

发展及肝脏脂质的积累, 将引发ERS过度反应. 同时通过泛素化途径参与的内质网相关性降解^[12], 加速内质网内未折叠apoB100蛋白的降解, 导致apoB100水平降低, 加重肝脏脂质的积累.

总之, ERS通过参与调节肝脏脂质及apoB100等的合成与代谢过程, 在T2DM小鼠脂肪肝形成和发展过程中起着重要作用. 因此, 通过调控ERS反应的过程和程度, 可能为治疗T2DM脂肪肝相关疾病提供新的策略.

致谢: 本实验在山东省动物抗性生物学重点实验室完成. 尹苗副教授和任国诚讲师在实验中给予了指导和帮助, 张暉博士生、曲学彬和王岩硕士生在实验过程中提供了帮助和支持, 在此表示衷心感谢.

4 参考文献

- Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Lehrke M, Hendler RE, Shulman GI. Reversal of nonalcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance, and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2005; 54: 603-608
- Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346: 1221-1231
- 于晓静, 王晓梅, 冯海娟. 2型糖尿病合并脂肪肝危险因素临床分析. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2977-2979
- Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ, Shulman GI. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 2004; 279: 32345-32353
- 吴涛, 季光, 郑培永, 柳涛. 内质网应激与肝细胞凋亡. *世界华人消化杂志* 2006; 15: 2507-2515
- Lai E, Teodoro T, Volchuk A. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda)* 2007; 22: 193-201
- Araki E, Oyadomari S, Mori M. Endoplasmic reticulum stress and diabetes mellitus. *Intern Med* 2003; 42: 7-14
- Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN,

■名词解释

内质网应激(ERS): 是一种由于外界环境刺激而导致的错误折叠与未折叠蛋白质在内质网腔内聚集以及Ca²⁺平衡紊乱的状态. 适度的ERS反应有助于保护细胞, 维持生存. 但ERS反应过强则可引起细胞功能障碍, 乃至细胞凋亡, 促进疾病的发生发展.

■同行评价

本文探讨内质网应激对2型糖尿病小鼠脂肪肝发生的影响,通过调控ERS反应的过程和程度,可能为治疗T2DM脂肪肝相关疾病提供新的策略。

- Ozdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 2004; 306: 457-461
- 9 Ozawa K, Miyazaki M, Matsuhisa M, Takano K, Nakatani Y, Hatazaki M, Tamatani T, Yamagata K, Miyagawa J, Kitao Y, Hori O, Yamasaki Y, Ogawa S. The endoplasmic reticulum chaperone improves insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes* 2005; 54: 657-663
- 10 Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, Görgün CZ, Hotamisligil GS. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 2006; 313: 1137-1140
- 11 Kim AJ, Shi Y, Austin RC, Werstuck GH. Valproate protects cells from ER stress-induced lipid accumulation and apoptosis by inhibiting glycogen synthase kinase-3. *J Cell Sci* 2005; 118: 89-99
- 12 Qiu W, Kohen-Avramoglu R, Mhapsekar S, Tsai J, Austin RC, Adeli K. Glucosamine-induced endoplasmic reticulum stress promotes ApoB100 degradation: evidence for Grp78-mediated targeting to proteasomal degradation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 571-577
- 13 Ota T, Gayet C, Ginsberg HN. Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents. *J Clin Invest* 2008; 118: 316-332
- 14 Sawant SP, Dnyanmote AV, Mitra MS, Chilakapati J, Warbritton A, Latendresse JR, Mehendale HM. Protective effect of type 2 diabetes on acetaminophen-induced hepatotoxicity in male Swiss-Webster mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316: 507-519
- 15 Mu J, Woods J, Zhou YP, Roy RS, Li Z, Zycband E, Feng Y, Zhu L, Li C, Howard AD, Moller DE, Thornberry NA, Zhang BB. Chronic inhibition of dipeptidyl peptidase-4 with a sitagliptin analog preserves pancreatic beta-cell mass and function in a rodent model of type 2 diabetes. *Diabetes* 2006; 55: 1695-1704
- 16 Bonora E, Formentini G, Calcaterra F, Lombardi S, Marini F, Zenari L, Saggiani F, Poli M, Perbellini S, Raffaelli A, Cacciatori V, Santi L, Targher G, Bonadonna R, Muggeo M. HOMA-estimated insulin resistance is an independent predictor of cardiovascular disease in type 2 diabetic subjects: prospective data from the Verona Diabetes Complications Study. *Diabetes Care* 2002; 25: 1135-1141
- 17 Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Yoshiuchi K, Hatazaki M, Matsuoka TA, Ozawa K, Ogawa S, Hori M, Yamasaki Y, Matsuhisa M. Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *J Biol Chem* 2005; 280: 847-851
- 18 Schreyer SA, Vick C, Lystig TC, Mystkowski P, LeBoeuf RC. LDL receptor but not apolipoprotein E deficiency increases diet-induced obesity and diabetes in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282: E207-E214
- 19 Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, Previs SF, Shulman GI, Magnuson MA, Kahn CR. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell* 2000; 6: 87-97
- 20 Kaneto H, Matsuoka TA, Nakatani Y, Kawamori D, Miyatsuka T, Matsuhisa M, Yamasaki Y. Oxidative stress, ER stress, and the JNK pathway in type 2 diabetes. *J Mol Med* 2005; 83: 429-439
- 21 陆金来, 陈金联, 陈明祥, 洪静, 陈维雄, 朱金水, 陈尼维. 肝脏脂肪酸在高脂饮食大鼠非酒精性脂肪性肝病模型中的代谢. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1728-1733
- 22 Wang D, Wei Y, Pagliassotti MJ. Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology* 2006; 147: 943-951
- 23 Yahagi N, Shimano H, Hastay AH, Matsuzaka T, Ide T, Yoshikawa T, Amemiya-Kudo M, Tomita S, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Nagai R, Ishibashi S, Yamada N. Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in Lep(ob)/Lep(ob) mice. *J Biol Chem* 2002; 277: 19353-19357
- 24 Ahmed MH, Byrne CD. Modulation of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) as potential treatments for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Drug Discov Today* 2007; 12: 740-747
- 25 Raghov R, Yellaturu C, Deng X, Park EA, Elam MB. SREBPs: the crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 2008; 19: 65-73
- 26 Kokame K, Kato H, Miyata T. Homocysteine-responsive genes in vascular endothelial cells identified by differential display analysis. GRP78/BiP and novel genes. *J Biol Chem* 1996; 271: 29659-29665
- 27 Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, Hossain GS, Sood SK, Shi YY, Zhou J, Maeda N, Krisans SK, Malinow MR, Austin RC. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J Clin Invest* 2001; 107: 1263-1273
- 28 Qiu W, Kohen-Avramoglu R, Rashid-Kolvear F, Au CS, Chong TM, Lewis GF, Trinh DK, Austin RC, Urade R, Adeli K. Overexpression of the endoplasmic reticulum 60 protein ER-60 downregulates apoB100 secretion by inducing its intracellular degradation via a nonproteasomal pathway: evidence for an ER-60-mediated and pCMB-sensitive intracellular degradative pathway. *Biochemistry* 2004; 43: 4819-4831
- 29 Qiu W, Avramoglu RK, Rutledge AC, Tsai J, Adeli K. Mechanisms of glucosamine-induced suppression of the hepatic assembly and secretion of apolipoprotein B-100-containing lipoproteins. *J Lipid Res* 2006; 47: 1749-1761
- 30 Sundar Rajan S, Srinivasan V, Balasubramanyam M, Tatu U. Endoplasmic reticulum (ER) stress & diabetes. *Indian J Med Res* 2007; 125: 411-424
- 31 Marciniak SJ, Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev* 2006; 86: 1133-1149

编辑 史景红 电编 何基才

蓝玉簪颗粒对大鼠肝纤维化的治疗作用

房志鑫, 李旭波, 刘菁菁, 耿铮, 田琼

房志鑫, 李旭波, 刘菁菁, 耿铮, 田琼, 中国人民解放军第四军医大学药理学教研室 陕西省西安市 710032

房志鑫, 硕士, 主要从事分子药理学研究。

作者贡献分布: 此课题由房志鑫设计; 研究过程由房志鑫, 李旭波, 耿铮及刘婧婧操作完成; 研究用新试剂及分析工具由田琼提供; 数据分析由房志鑫完成; 本论文写作由房志鑫完成。

通讯作者: 田琼, 710032, 陕西省西安市长乐西路17号, 中国人民解放军第四军医大学药理学教研室。tqiong@fmmu.edu.cn 电话: 029-84773701

收稿日期: 2008-10-20 修回日期: 2008-11-18

接受日期: 2008-11-24 在线出版日期: 2009-01-08

Therapeutic effects of Lanyuzan granules on hepatic fibrosis in rats

Zhi-Xin Fang, Xu-Bo Li, Jing-Jing Liu, Zheng Geng, Qiong Tian

Zhi-Xin Fang, Xu-Bo Li, Jing-Jing Liu, Zheng Geng, Qiong Tian, Department of Pharmacology, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Qiong Tian, Department of Pharmacology, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. tqiong@fmmu.edu.cn

Received: 2008-10-20 Revised: 2008-11-18

Accepted: 2008-11-24 Published online: 2009-01-08

Abstract

AIM: To explore the curative effects of Lanyuzan granules on hepatic fibrosis in dimethylnitrosamine (DMN)-induced SD rat model and its mechanism.

METHODS: Forty-five female SD rats were randomly divided into six groups: a control group ($n = 5$), a model group ($n = 8$), three treatment groups with different dosage of Lanyuzan granules ($n = 8$), and a positive control group ($n = 8$). In the following 30 days, an intraperitoneal injection of dimethylnitrosamine (DMN) 10 mg/kg was performed in five groups every three days, except in the control group. On the thirty-first day, the five indexes of hepatic function, serum concentrations of ALT, AST and ALB, the expressions of α -smooth muscle actin (α -SMA) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) were measured. Moreover, pathological changes were observed on liver tissue with HE staining.

RESULTS: In liver fibrosis model group, serum concentrations of ALT and AST were significantly higher and concentration of ALB was significantly lower ($P < 0.05$), while significant increase in α -SMA expression and significant decrease in MMP-2 expression were observed compared with the normal group (182.042 ± 0.658 vs 60.879 ± 0.987 ; 145.612 ± 4.66 vs 74.824 ± 9.004 ; 16.078 ± 0.633 vs 28.971 ± 0.443 ; 161.667 ± 26.766 vs 80.167 ± 10.135 ; 5.994 ± 1.360 vs 8.270 ± 0.289 , all $P < 0.05$). Decreased ALT and AST serum concentrations, significantly increased ALB concentration, lowered α -SMA expression and elevated MMP-2 expression in liver tissue, were observed in Lanyuzan granules treatment group compared with model control group (87.856 ± 8.526 , 106.69 ± 0.987 , 136.11 ± 0.329 vs 182.042 ± 0.658 ; 94.208 ± 2.017 , 107.602 ± 20.014 , 118.847 ± 5.486 vs 145.612 ± 4.66 ; 23.412 ± 0.775 , 19.653 ± 0.775 , 18.635 ± 0.221 vs 16.078 ± 0.633 ; 109.958 ± 3.607 , 117.833 ± 6.600 , 119.833 ± 6.167 vs 161.667 ± 26.766 ; 11.610 ± 0.523 , 10.367 ± 0.714 vs 5.994 ± 1.360 , all $P < 0.05$). No notable difference was observed between low dosage group and model control group. The pathological observation showed hepatic fibrosis was alleviated markedly.

CONCLUSION: Lanyuzan granules may play a part in the alleviation of inflammation and the protection of liver by markedly relieving and inhibiting the formation of hepatic fibrosis induced by dimethylnitrosamine.

Key Words: Lanyuzan; Dimethylnitrosamine; Hepatic fibrosis

Fang ZX, Li XB, Liu JJ, Geng Z, Tian Q. Therapeutic effects of Lanyuzan granules on hepatic fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(1): 11-16

摘要

目的: 探讨蓝玉簪颗粒对实验性二甲基亚硝胺(dimethylnitrosamine, DMN)诱导的SD大鼠肝纤维化模型的治疗作用机制。

方法: SD♀大鼠45只随机分为正常组, 模型组, 蓝玉簪颗粒高、中、低治疗组, γ -干扰素阳

背景资料

肝纤维化是发展到肝硬化的必经阶段, 是所有慢性肝病晚期并发症(门脉高压, 腹水, 肝性脑病等)的共同病理基础, 并与肝癌有关。目前最积极有效的抗肝纤维化的治疗措施是去除病因与治疗相结合, 预防肝纤维化的发生, 抑制肝纤维化进展与促进肝纤维化的降解。

同行评议者

陈国凤, 主任医师, 中国人民解放军第302医院感染七科

■ 研发前沿

到目前为止,国内 外学者在HF防治 药物方面的研究 已经在实验动物 模型上取得了重 要的进展,研究思 路和药物靶点也 比较明确,但是从 临床治疗来评估, HF防治药物研究 并未取得重大的 突破性进展。

性对照组。除正常组外,其余各组大鼠均给予 10 mg/kg的剂量腹腔注射DMN,隔天注射1次,连续30 d。第31天,检测各组大鼠血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、白蛋白(ALB)含量;肝组织匀浆中 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)的含量。应用HE染色观察各组大鼠肝组织病理学变化。

结果:模型组大鼠血清中ALT、AST明显升高,ALB明显降低;肝组织匀浆中 α -SMA明显增加、MMP-2降低,与正常组比较有显著性差异(182.042 ± 0.658 vs 60.879 ± 0.987 ; 145.612 ± 4.66 vs 74.824 ± 9.004 ; 16.078 ± 0.633 vs 28.971 ± 0.443 ; 161.667 ± 26.766 vs 80.167 ± 10.135 ; 5.994 ± 1.360 vs 8.270 ± 0.289 , 均 $P < 0.05$);蓝玉簪颗粒治疗组与模型组比较,血清ALT、AST降低,ALB增加; α -SMA降低,肝组织中MMP-2水平升高(87.856 ± 8.526 , 106.69 ± 0.987 , 136.11 ± 0.329 vs 182.042 ± 0.658 ; 94.208 ± 2.017 , 107.602 ± 20.014 , 118.847 ± 5.486 vs 145.612 ± 4.66 ; 23.412 ± 0.775 , 19.653 ± 0.775 , 18.635 ± 0.221 vs 16.078 ± 0.633 ; 109.958 ± 3.607 , 117.833 ± 6.600 , 119.833 ± 6.167 vs 161.667 ± 26.766 ; 11.610 ± 0.523 , 10.367 ± 0.714 vs 5.994 ± 1.360 , 均 $P < 0.05$),小剂量组与模型组MMP-2水平比较,差异无统计学意义。HE染色观察肝组织纤维化分级和积分明显改善。

结论:蓝玉簪颗粒可减轻肝脏炎症,保护肝脏功能,减轻或抑制DMN诱导的肝纤维化的形成。

关键词:蓝玉簪颗粒;二甲亚硝胺;肝纤维化

房志鑫,李旭波,刘菁菁,耿铮,田琼.蓝玉簪颗粒对大鼠肝纤维化的治疗作用.世界华人消化杂志 2009;17(1):11-16
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/11.asp>

0 引言

肝纤维化是肝脏内纤维结缔组织异常增生,细胞外基质过度沉积的病理过程,是慢性肝损伤向肝硬化甚至原发性肝癌发展的中间环节^[1]。近年来随着对肝纤维化形成、发生机制的不断深入研究,发现肝纤维化是可以逆转的^[2-5]。蓝玉簪颗粒是由蓝玉簪、三七总苷等多种成分组成的抗肝纤维化中药复方。本研究通过建立二甲亚硝胺(dimethylnitrosamine, DMN)诱导的大鼠肝纤维化动物模型,对大鼠血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、白蛋白(ALB)的含量;大鼠肝组织匀浆中 α -平滑肌

肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin, α -SMA)、基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)的含量进行测定,以及观察肝纤维化大鼠的肝组织病理切片的变化,从减轻肝内炎症、抑制肝星状细胞(hepatic star cell, HSC)激活和促进胶原的降解方面探讨蓝玉簪颗粒在慢性肝损伤、肝纤维化中的防治作用及作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 ♀SD大鼠45只,体质量180-200 g,由中国人民解放军第四军医大学实验动物中心提供,二级动物。蓝玉簪颗粒为中国人民解放军第四军医大学研制;蓝玉簪颗粒大、中、小剂量组分别为4、2、1 g/kg。 γ -干扰素由中国人民解放军第四军医大学生物技术中心赠送。二甲亚硝胺为天津市化学试剂研究所产品。ALT、AST、ALB试剂盒为南京建成生物制品公司产品。 α -SMA、MMP-2抗体为美国Adlitteram Diagnostic Laboratories, Inc公司产品。

1.2 方法

1.2.1 实验动物处理:将45只SD大鼠随机分为6组,除正常组5只外,其余各组均为8只。正常组:予ip生理盐水。DMN模型组:DMN 2 mL/(kg·d)ip,隔天注射1次,连续30 d。每天称质量1次,根据体质量调整DMN用量^[6]。蓝玉簪颗粒治疗组(大、中、小剂量组)和阳性对照组(γ -干扰素治疗组):同模型组方法造模。造模之日起,同时给予蓝玉簪颗粒ig,蓝玉簪颗粒治疗组(大、中、小剂量组)分别为生药4、2和1 g/kg,阳性 γ -干扰素15万单位/kg肌肉注射,观察动物的一般情况及死亡情况。30 d后于末次给药24 h断颈处死各组大鼠,腹主动脉取血,离心取血清和肝脏组织备用。

1.2.2 血清学测定:血清肝功能的检测采用752C型紫外分光光度计完成,ALT、AST及ALB测定按照试剂盒说明书操作。

1.2.3 肝脏病理学检查:取右叶肝脏,以100 g/L甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋、切片,HE染色做组织学检查。HE染色后按慢性肝炎分期分级标准判定肝纤维化程度,肝纤维化程度(S)0-4级。现在最常用的肝纤维化分期、分级标准参考,F0期:无纤维化;F1期:汇管区纤维增多,中央区及小叶内局限性纤维化;F2期:汇管区周围纤维化,纤维间隔少量形成,但小叶结构完整;F3期:纤维间隔形成伴有小叶结构紊乱,无肝硬化;F4期:早期肝硬化^[7]。

1.2.4 肝组织 α -SMA、MMP-2用ELISA法测定:

表 1 各组大鼠肝功能结果的比较 (mean ± SD)

分组	n	ALT(U/L)	AST(U/L)	ALB(g/L)
正常组	5	60.879 ± 0.987	74.824 ± 9.004	28.971 ± 0.443
模型组	6	182.042 ± 0.658 ^a	145.612 ± 4.66 ^a	16.078 ± 0.633 ^a
蓝玉簪颗粒治疗组				
大剂量组	8	87.856 ± 8.526 ^{ac}	94.208 ± 2.017 ^{ac}	23.412 ± 0.775 ^{ac}
中剂量组	8	106.69 ± 0.987 ^{ac}	107.602 ± 20.014 ^{ac}	19.653 ± 0.775 ^{ac}
小剂量组	7	136.11 ± 0.329 ^{ac}	118.847 ± 5.486 ^{ac}	18.635 ± 0.221 ^{ac}
阳性对照组	7	90.879 ± 0.987 ^{ac}	97.114 ± 11.357 ^{ac}	20.984 ± 0.313 ^{ac}

^aP<0.05 vs 正常组; ^cP<0.05 vs 模型组.

取肝在冰水中制成100 g/L匀浆, 按照试剂盒说明书操作, 用酶标仪测定结果.

统计学处理 采用SPSS12.0统计软件进行数据分析. 计量资料用mean ± SD表示, 经方差齐性检验后用方差分析, 组间均数比较用t检验. 计数资料用秩和检验.

2 结果

2.1 一般状况 ip DMN第2周动物出现乏力、反应迟钝、嗜睡、皮毛皱而不洁、进食减少、腹泻、尿黄、个别大鼠趾甲易出血, 造模结束时5只大鼠出现腹水. 模型组死亡2只; 蓝玉簪颗粒治疗组有所改善, 大鼠活动好, 毛色有光泽, 小剂量组死亡1只; 阳性对照组死亡1只.

2.2 血清学指标的改变 与正常组比较, 模型组血清ALT和AST均明显增高, ALB明显降低, 差异有显著性(P<0.05); 蓝玉簪颗粒能降低ALT、AST, 增加ALB含量, 与模型组比较差异有显著性(P<0.05, 表1).

2.3 肝脏病理形态改变 肉眼观察, 模型组与蓝玉簪颗粒治疗组(小剂量组)颜色灰白, 质较硬. HE染色后光镜下观察, 正常组大鼠HE染色肝细胞结构清楚多成单核, 无细胞变性、坏死; 肝板条索状以肝小叶中央静脉为中心成放射样排列, 肝板间有少许极为纤细的网状纤维包绕肝窦, 门脉区少有纤维分布. 模型组大鼠HE染色见肝组织结构部分破坏、肝细胞普遍变性、水样变性甚至气球样变性, 还可见程度、范围不等的肝细胞坏死; 肝板排列紊乱, 部分肝小叶失去正常结构; 汇管区大量胶原沉积, 可见相互连接的纤维分隔重新分割肝小叶; 有较明显纤维组织增生, 甚至有部分区域有早期肝硬化表现. 蓝玉簪颗粒治疗组(大、中剂量组)在汇管区有胶原沉积, 胶原染色显示结缔组织增生程度较模型组减轻, 脂肪变性轻微; 蓝玉簪颗粒治疗组(小剂

表 2 各组大鼠肝纤维化程度分级比较

分组	n	肝纤维化分级(n)				
		S0	S1	S2	S3	S4
正常组	5	5	0	0	0	0
模型组 ^a	6	0	0	1	2	3
蓝玉簪颗粒治疗组						
大剂量组 ^d	8	0	4	2	1	1
中剂量组 ^d	8	0	3	3	1	1
小剂量组 ^d	7	0	3	2	1	1
阳性对照组 ^d	7	0	4	2	1	0

^aP<0.05 vs 正常组; ^dP<0.01 vs 模型组.

表 3 各组肝匀浆α-SMA和MMP-2的检测结果 (mean ± SD)

分组	n	α-SMA(ng/mL)	MMP-2(ng/mL)
正常组	5	80.167 ± 10.135	8.270 ± 0.289
模型组	6	161.667 ± 26.766 ^a	5.994 ± 1.360 ^a
蓝玉簪颗粒治疗组			
大剂量组	8	109.958 ± 3.607 ^{ac}	11.610 ± 0.523 ^{ac}
中剂量组	8	117.833 ± 6.600 ^{ac}	10.367 ± 0.714 ^{ac}
小剂量组	7	119.833 ± 6.167 ^{ac}	6.603 ± 0.334 ^a
阳性对照组	7	104.917 ± 9.546 ^{ac}	13.501 ± 0.361 ^{ac}

^aP<0.05 vs 正常组; ^cP<0.05 vs 模型组.

量组)肝组织灶性破坏, 肝细胞变性、肝纤维化较模型组稍微. 阳性对照组肝组织灶性破坏, 肝细胞变性、肝纤维化较模型组稍微(表2).

2.4 肝组织α-SMA与MMP-2表达情况 ELISA分析结果: 正常组α-SMA和MMP-2的阳性表达很少, 甚至是阴性; 与其比较, 模型组的α-SMA阳性表达明显增高(P<0.05), MMP-2表达很少(P<0.05). 与模型组比较, 蓝玉簪颗粒治疗组的α-SMA的表达量减少(P<0.05), MMP-2的表达量增加(P<0.05, 表3).

■创新盘点

本研究中新发现: 蓝玉簪和三七总苷联合应用, 可减轻肝脏炎症, 保护肝脏功能, 减轻或抑制DMN诱导的肝纤维化的形成.

■应用要点

本研究运用二甲基亚硝胺诱导大鼠肝纤维化, 对大鼠肝组织中的 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)的含量进行测定有助于进一步研究肝纤维化的形成和降解机制, 同时也有助于阐明补蓝玉簪颗粒抗肝纤维化的机制.

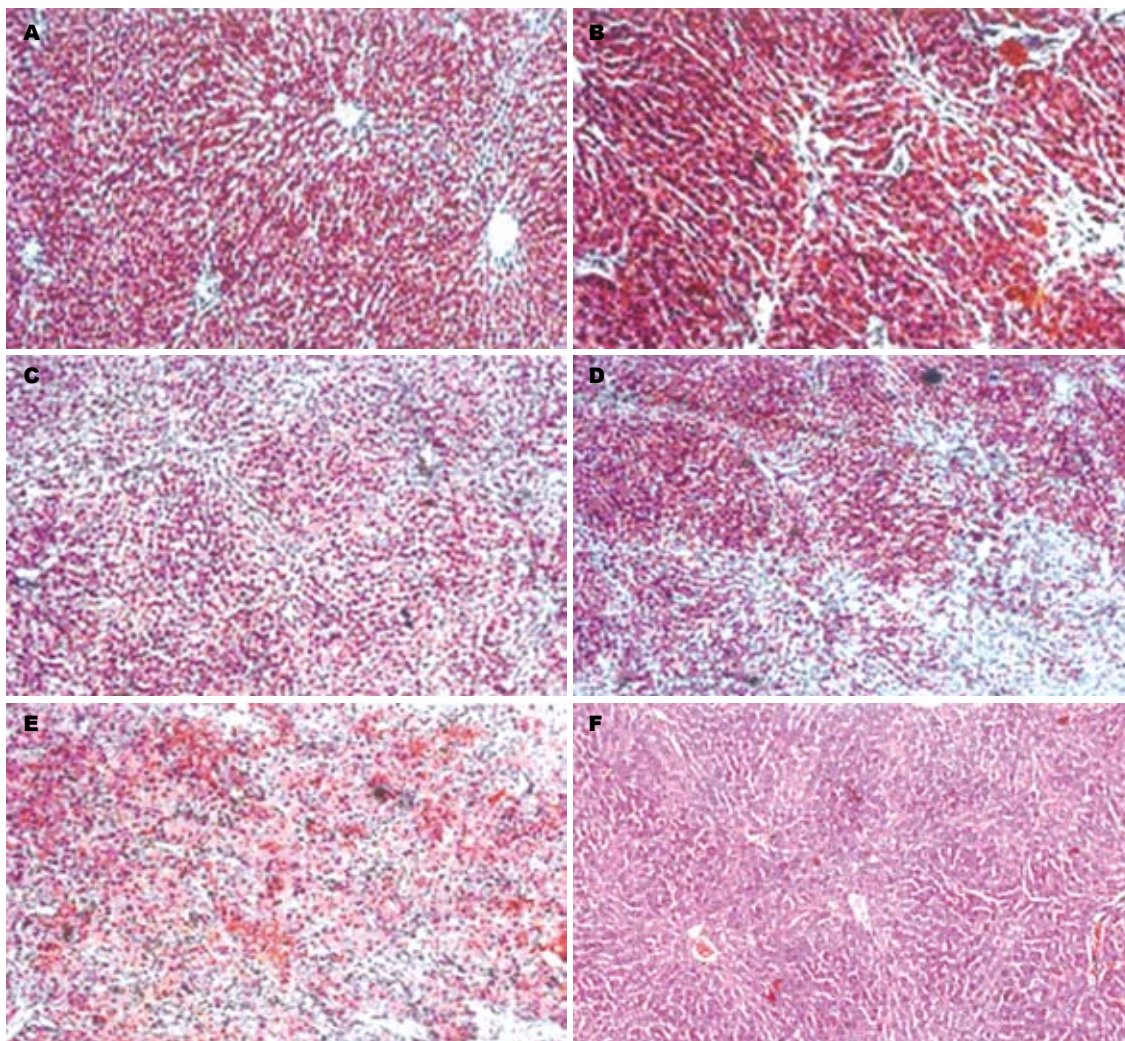


图1 各组动物肝组织切片HE染色结果. A: 正常组; B: 模型组; C: 蓝玉簪颗粒治疗组(大剂量组); D: 蓝玉簪颗粒治疗组(中剂量组); E: 蓝玉簪颗粒治疗组(小剂量组); F: 阳性对照组.

3 讨论

据流行病学调查: 我国是病毒性肝炎高发区, 仅乙型肝炎病毒携带者就达1.3亿, 其中约有3000万以上慢性肝炎患者, 每年还有50-100万的新发病例, 其中肝纤维化发生的年增长率为13.3%, 25%-40%肝纤维化患者可进展为肝硬化, 有的最终形成肝癌^[8]. 肝纤维化形成机制复杂, 影响因素多, 因此研制和开发安全、有效的抗肝纤维化的药物成为迫在眉睫的任务. 目前疗效确切、不良反应少的抗纤维化的西药很少. 近年来的研究表明, 中药在抗肝纤维化的治疗中具有明显的优势, 我们通过前期的实验研究发现, 中药复方蓝玉簪颗粒可减轻肝组织中脂质过氧化反应, 清除氧自由基并抑制其生成, 并削弱炎症反应, 减少炎症细胞的渗出, 在肝纤维化形成的早期起到预防、治疗作用.

DMN具有较强的肝毒性, 通过腹腔内向大鼠体内注射DMN, 很快致肝细胞损伤, 使肝组织

发生明显的出血性坏死并伴有剧烈的炎症反应, 可激发HSC的活化, 产生包括大量胶原成分在内的细胞外基质, 长期反复注射会导致进行性的肝纤维化乃至肝硬化, 伴有慢性肝功能障碍. DMN诱导的大鼠肝纤维化模型, 其病变具有进展性、短期内不易自发恢复的特点, 是观察抗肝纤维化药物治疗效果的最佳模型^[9]. 因此, 我们建立了DMN肝纤维化模型, 以观察蓝玉簪颗粒防治肝纤维化的疗效并初步探讨其发生机制.

现代研究认为, 肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是肝纤维化细胞机制的重要环节. 活化的HSC是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分主要的细胞来源^[10-15]. 正常时HSC处于静止状态, 其代谢和功能不活跃. 但在病理情况下, HSC不仅发生形态改变, 而且表现出明显增殖、分泌细胞因子、合成大量ECM和产生蛋白降解酶等功能变化, 这一系列变化被称为活化^[16-19]. 活化的HSC产生ECM, 细胞发生功能和

表型改变, 转变为表达 α -SMA的肌成纤维细胞(myofibroblast, MFB), 后者合成ECM的能力显著提高. α -SMA是公认的HSC活化标志^[20-23]. 实验研究显示, DMN致肝损伤后, 血清ALT水平明显升高, AST水平有升高的趋势, 明显高于正常, HE染色观察到肝组织胶原大量沉积, 结果显示肝纤维化明显, α -SMA有高表达, 大量分布在中央静脉、汇管区和纤维间隔, 提示DMN有促进HSC激活并迅速转型表达细胞因子和产生ECM的作用. 给予蓝玉簪颗粒治疗后, 肝组织纤维化程度明显减轻, α -SMA表达减弱, 表明蓝玉簪颗粒能够抑制HSC激活和增殖, 减少胶原合成与沉积, 达到抗纤维化的作用.

肝脏内胶原是肝纤维组织的基本成分, 在肝纤维化形成过程中细胞外基质合成大量增加, 而分解代谢相对低下, 是造成其沉积的重要原因^[19,24-26]. 改善分解代谢障碍, 促进胶原降解, 可能是蓝玉簪颗粒抗肝纤维化的作用机制之一. 近年来的研究发现, 细胞外基质的胶原可被多种蛋白酶分解, MMP-2是其中一种已知的蛋白酶. MMP-2又叫IV型胶原酶或明胶酶, 主要在造血肝细胞、Kupffer细胞和窦内皮细胞中合成, 并以无活性的酶原形式分泌, 随后通过其氨基端被机体内有机泵裂解后而激活. 活化的IV型胶原酶当降解明胶^[27-29]. 实验结果显示: 模型组大鼠MMP-2活性明显低于正常对照组, 病理观察结果也证实模型组纤维增生严重. 给药4 wk后, 蓝玉簪颗粒治疗组MMP-2活性上升, 提示蓝玉簪颗粒可能有提高酶活性, 这有利于肝纤维化时过多IV胶原的降解, 从而促进IV型胶原降解的功能.

本研究结果显示: 蓝玉簪颗粒治疗组的大鼠血清中ALT和AST水平较模型组明显降低, ALB水平有所提高, 肝组织匀浆中 α -SMA表达减弱. 模型组大鼠MMP-2活性明显低于正常对照组, 病理观察结果也证实模型组纤维增生严重; 蓝玉簪颗粒治疗组MMP-2活性明显上升. 表明蓝玉簪颗粒具有较好的减轻肝内炎症, 保护肝细胞功能; 抑制HSC激活和增殖, 减少胶原合成与沉积; 提高酶活性, 利于肝纤维化时过多IV胶原的降解, 促进损伤肝细胞修复的作用, 而达到预防及治疗肝纤维化的作用, 但是其抗肝纤维化的机制需要进一步研究.

4 参考文献

1 Manning DS, Afdhal NH. Diagnosis and quantitation of fibrosis. *Gastroenterology* 2008; 134:

- 1670-1681
- 2 Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1655-1669
- 3 Tsukada S, Parsons CJ, Rippe RA. Mechanisms of liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2006; 364: 33-60
- 4 Rovida E, Navari N, Caligiuri A, Dello Sbarba P, Marra F. ERK5 differentially regulates PDGF-induced proliferation and migration of hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2008; 48: 107-115
- 5 Bennett RG, Dalton SR, Mahan KJ, Gentry-Nielsen MJ, Hamel FG, Tuma DJ. Relaxin receptors in hepatic stellate cells and cirrhotic liver. *Biochem Pharmacol* 2007; 73: 1033-1040
- 6 Zhang B, Wang LT. Upregulation of TNF- α mRNA in hepatic fibrosis rats induced by dimethylnitrosamine. *J Med Coll PLA* 2007; 22: 279-282
- 7 毕文杰, 陈克敏, 刘林祥. MR在肝纤维化诊断的应用进展. *泰山医学院学报* 2007; 28: 478-480
- 8 张彬彬, 蔡卫民. 近年来肝纤维化研究若干进展. *国外医学·流行病学染病学分册* 2004; 31: 151-154
- 9 李生财, 李彤. 肝纤维化动物模型的造模原理及应用. *中华中医药学刊* 2006; 24: 2267-2269
- 10 Shyu MH, Kao TC, Yen GC. Hsian-tsao (*Mesona procumbens* Heml.) prevents against rat liver fibrosis induced by CCl₄ via inhibition of hepatic stellate cells activation. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 3707-3713
- 11 Olsen AL, Wells RG. Cellular fibronectin enhances hepatic stellate cell migration. *Matrix Biol (American Society for Matrix Biology Biennial Meeting)* 2008; 27 Suppl 1: 46
- 12 Fang HL, Lin WC. Lipid peroxidation products do not activate hepatic stellate cells. *Toxicology* 2008; 253: 36-45
- 13 Gäbele E, Mühlbauer M, Dorn C, Weiss TS, Froh M, Schnabl B, Wiest R, Schölmerich J, Obermeier F, Hellerbrand C. Role of TLR9 in hepatic stellate cells and experimental liver fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 376: 271-276
- 14 Fang HL, Lai JT, Lin WC. Inhibitory effect of olive oil on fibrosis induced by carbon tetrachloride in rat liver. *Clin Nutr* 2008; 27: 900-907
- 15 Holt AP, Salmon M, Buckley CD, Adams DH. Immune interactions in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 861-882, x
- 16 Roskams T. Relationships among stellate cell activation, progenitor cells, and hepatic regeneration. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 853-860, ix
- 17 Gieling RG, Burt AD, Mann DA. Fibrosis and cirrhosis reversibility - molecular mechanisms. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 915-937, xi
- 18 Taura K, De Minicis S, Seki E, Hatano E, Iwaisako K, Osterreicher CH, Kodama Y, Miura K, Ikai I, Uemoto S, Brenner DA. Hepatic stellate cells secrete angiopoietin 1 that induces angiogenesis in liver fibrosis. *Gastroenterology* 2008; 135: 1729-1738
- 19 Iwaisako K, Hatano E, Taura K, Nakajima A, Tada M, Seo S, Tamaki N, Sato F, Ikai I, Uemoto S, Kinoshita M. Loss of Sept4 exacerbates liver fibrosis through the dysregulation of hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2008; 49: 768-778
- 20 Day E, Waters B, Spiegel K, Alnadaf T, Manley PW, Buchdunger E, Walker C, Jarai G. Inhibition of collagen-induced discoidin domain receptor 1 and 2 activation by imatinib, nilotinib and dasatinib. *Eur J Pharmacol* 2008; 599: 44-53
- 21 Weber S, Gressner OA, Hall R, Grünhage F, Lammert F. Genetic determinants in hepatic fibrosis: from

■同行评价

本文条理清晰, 结果可信, 有一定实际应用价值.

- experimental models to fibrogenic gene signatures in humans. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 747-757, vii
- 22 van der Poorten D, George J. Disease-specific mechanisms of fibrosis: hepatitis C virus and nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 805-824, ix
- 23 Varela-Rey M, Fontán-Gabás L, Blanco P, López-Zabalza MJ, Iraburu MJ. Glutathione depletion is involved in the inhibition of procollagen alpha1(I) mRNA levels caused by TNF-alpha on hepatic stellate cells. *Cytokine* 2007; 37: 212-217
- 24 Wells RG. Cellular sources of extracellular matrix in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 759-768, viii
- 25 Moreno M, Bataller R. Cytokines and renin-angiotensin system signaling in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 825-852, ix
- 26 Debret R, Brassart-Pasco S, Lorin J, Martoriati A, Deshorgue A, Maquart FX, Hornebeck W, Rahman I, Antonicelli F. Ceramide inhibition of MMP-2 expression and human cancer bronchial cell invasiveness involve decreased histone acetylation. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783: 1718-1727
- 27 Hu QW, Liu GT. Effects of bicyclol on dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in mice and its mechanism of action. *Life Sci* 2006; 79: 606-612
- 28 Oakley F, Meso M, Iredale JP, Green K, Marek CJ, Zhou X, May MJ, Millward-Sadler H, Wright MC, Mann DA. Inhibition of inhibitor of kappaB kinases stimulates hepatic stellate cell apoptosis and accelerated recovery from rat liver fibrosis. *Gastroenterology* 2005; 128: 108-120
- 29 徐光福, 张凤朝. DMN诱发大鼠肝硬化模型MMP-2活性的动态变化. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 902-905

编辑 史景红 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

第二十一次全国中西医结合消化学术会议征文通知

本刊讯 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会决定于2009-06下旬在南宁市召开第二十一次全国中西医结合消化系统疾病学术会议,并同时举办全国中西医结合消化疾病(重点为功能性胃肠病、炎症性肠病和消化内镜新技术临床应用演示)新技术新理论继续教育学习班.学习班招收对象:中西医结合、中医或西医的消化专业医师、科研人员、研究生等.参加学习班者授予国家级1类继续教育学分;大会论文报告者另授继续教育学分6分.

1 征稿内容

功能性胃肠病、炎症性肠病中西医结合基础与临床治疗研究;幽门螺杆菌相关疾病的中西医结合基础与治疗研究;脂肪肝、慢性肝炎与肝硬化等常见肝病的中西医结合基础与临床研究;消化系肿瘤中西医结合诊疗;脾胃学说及其临床应用;其他消化系统疾病(包括食管、胃、肝、胆、胰腺等疾病)的基础研究、临床研究与实践等.

2 征稿要求

请注明作者姓名、单位、详细通讯地址、邮编.稿件请附800字论文摘要,尽可能以电子信件的形式将稿件传送,截稿日期:2009-05-30.

3 联系方式

袁海锋,朱永苹,530011,广西壮族自治区南宁市华东路10号,广西中医学院瑞康医院,电话:0771-2188107;13597004049;13077766271,传真:0771-2411156, rkxhnc@sina.com或czs.xiaohua@163.com.(常务副总编辑:张海宁 2009-01-08)

植物药洪天肝康防治肝硬化的作用机制

洪艳, 杨锐华, 许晴, 贾洪章, 史小林

洪艳, 杨锐华, 许晴, 贾洪章, 史小林, 首都医科大学组织学与胚胎学教研室 北京市 100069

洪艳, 贵州省贵阳医学院组织学与胚胎学教研室 贵州省贵阳市 550004

洪艳, 硕士, 副教授, 主要从事神经内分泌方面的研究。

作者贡献分布: 洪艳采集数据, 分析/解释数据, 起草文章, 统计分析; 杨锐华制作动物模型; 许晴直接参与实验, 提供技术支持; 贾洪章提供材料支持; 史小林酝酿和设计实验, 对文章的知识性内容作批评性审阅, 提供研究经费。

通讯作者: 史小林, 100069, 北京市, 首都医科大学组织胚胎学教研室, szhyxzhx@ccmu.edu.cn

电话: 010-83911448

收稿日期: 2007-07-12 修回日期: 2008-12-05

接受日期: 2008-12-15 在线出版日期: 2009-01-08

Prevention and treatment of hepatic cirrhosis with herbal medicine Hongtian Gankang

Yan Hong, Rui-Hua Yang, Qing Xu, Hong-Zhang Jia, Xiao-Lin Shi

Yan Hong, Rui-Hua Yang, Qing Xu, Hong-Zhang Jia, Xiao-Lin Shi, Department of Histology and Embryology, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Yan Hong, Department of Histology and Embryology, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Correspondence to: Xiao-Lin Shi, Department of Histology and Embryology, Capital Medical University, Beijing 100069, China. szhyxzhx@ccmu.edu.cn

Received: 2007-07-12 Revised: 2008-12-05

Accepted: 2008-12-15 Published online: 2009-01-08

Abstract

AIM: To investigate the mechanism underlying preventing and treating hepatic cirrhosis with Hong Tian Gan Kang (HTGK) in mice.

METHODS: Sixty mice were divided randomly into 4 groups: normal control group, model control group, prevention group and treatment group. Except the mice in normal control group, all mice were given injection of CCl₄ into abdominal cavity that had been proved to induce experimental hepatic cirrhosis. In prevention group, mice were also given HTGK simultaneously by intragastric administration for 180 days, whereas mice in treatment group were given HTGK 150 days after modeling. Liver tissue and spleen tissue were made into sections stained with HE to evaluate the extent of liver

cirrhosis and morphologic changes and to detect the expression of TGF-β1, IFN-γ, IgG, CD3 using immunohistochemistry.

RESULTS: Expression level of TGF-β1 in liver and spleen was markedly higher in model group than in control, prevention and treatment groups ($F = 80.155, 120.850$, both $P < 0.05$). The expression of IFN-γ and IgG was most obvious in treatment group, second in prevention group and least in model group ($F = 53.584, 118.240, 85.075, 105.566$, all $P < 0.05$). Compared with model group, expression levels of CD3 in prevention and treatment groups were significantly increased ($F = 42.969, 69.775$, both $P < 0.05$).

CONCLUSION: HTGK can improve the function of immune system so that it can prevent and cure hepatic cirrhosis effectively.

Key Words: Hepatic cirrhosis; Herbal-based medicine; Transforming growth factor-β1; Interferon-gamma

Hong Y, Yang RH, Xu Q, Jia HZ, Shi XL. Prevention and treatment of hepatic cirrhosis with herbal medicine Hongtian Gankang. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(1): 17-23

摘要

目的: 探讨植物药洪天肝康防治肝硬化的作用机制。

方法: 采用200 mL/L CCl₄腹腔注射制备小鼠肝硬化模型(模型组), 于模型制备的同时, 给予洪天肝康灌服(预防组)。造模150 d后添加洪天肝康灌服(治疗组)。取各组的肝、脾组织, 采用HE染色观察肝硬化程度及肝、脾组织的形态学变化; 免疫组织化学方法标记TGF-β1、IFN-γ、IgG和CD3, 并用图像分析仪进行定量分析。

结果: 模型组小鼠的肝脏及脾脏TGF-β1的表达较对照组明显增高, 预防组及治疗组肝脏与脾脏中TGF-β1的表达均较模型组减少($F = 80.155, 120.850$; 均 $P < 0.05$); IFN-γ和IgG在肝脏及脾脏的表达以治疗组最为明显, 预防组

背景资料

转化生长因子β1是组织纤维化的促进因子, 近年的研究表明TGF-β1还是重要的免疫抑制因子。γ干扰素是肝纤维化的主要抑制因子, 同时也是重要的免疫调节因子。但有关上述两种细胞因子对肝硬化时免疫功能的影响报道甚少。

同行评议者

唐文富, 副主任医师, 四川大学华西医院中西医结合科

■ 研究前沿

影响肝纤维化形成的因素很多,至今尚未完全阐明.目前认为免疫因素在肝纤维化的形成及进展过程中起重要作用,但其具体机制尚不明确.

次之,模型组极少出现($F = 53.584, 118.240, 85.075, 105.566$, 均 $P < 0.05$);预防组及治疗组CD3在肝脏及脾脏的表达明显增高,与模型组相比有统计学意义($F = 42.969, 69.775$, 均 $P < 0.05$).

结论:植物药洪天肝康对肝硬化模型小鼠机体进行动态平衡的整体调节后,可增强机体的免疫防御功能,从有效控制肝纤维化产生的角度,有效地防治肝硬化.

关键词:肝硬化;植物药;转化生长因子 $\beta 1$; γ 干扰素

洪艳, 杨锐华, 许晴, 贾洪章, 史小林. 植物药洪天肝康防治肝硬化的作用机制. 世界华人消化杂志 2009; 17(1): 17-23
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/17.asp>

0 引言

转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)是组织纤维化的促进因子,近年的研究表明TGF- $\beta 1$ 还是重要的免疫抑制因子. γ 干扰素(interferon gamma, IFN- γ)是肝纤维化的主要抑制因子,同时也是重要的免疫调节因子.目前认为肝纤维化的形成与机体免疫功能间有密切的相关性.我们将应用免疫组织化学方法,对正常小鼠、肝硬化小鼠及应用植物药洪天肝康(Hong Tian Gan Kang, HTGK)预防与治疗小鼠肝硬化的各实验组进行肝和脾组织中TGF- $\beta 1$ 、IFN- γ 、免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG)、细胞分化抗原3(cell differentiation antigen 3, CD3)的标记,旨在探讨HTGK以增强机体免疫系统功能的角度,达到抗肝硬化的作用机制,实验结果将为植物药的临床应用提供有意义的实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 成年ICR小鼠100只,体质量20-30 g,购于首都医科大学实验动物部,标准饲料,自由饮水.但造模过程中共有22只小鼠死亡,故本实验只选取60只小鼠,随机分成4组,对照组(5只)、模型组(20只)、预防组(20只)及治疗组(15只).200 mL/L CCl₄橄榄油溶液,HTGK是应用现代工艺提取黄芪、半枝莲、白芍等纯植物原料中的皂甙、黄酮等有效活性成分,应用益气解毒,扶正祛邪的中医理论维持机体的动态平衡,最终达到防治肝硬化的目的.兔抗鼠TGF- $\beta 1$ 抗血清、兔抗鼠IFN- γ 和兔抗鼠CD3抗血清由武汉博士德生物工程有限公司提供.兔抗人IgG抗血清及生物

素抗兔IgG及SP复合物由北京中杉金桥生物工程有限公司提供.

1.2 方法

1.2.1 给药及造模:模型组小鼠按0.01 mL/kg ip 200 mL/L CCl₄橄榄油溶液,5 d 1次,预防组在ip 200 mL/L CCl₄橄榄油溶液的同时灌服HTGK每天2次,每次0.02 mg,治疗组于模型组ip橄榄油溶液150 d后开始灌服HTGK,同时继续给予ip CCl₄,剂量同预防组,对照组于同一时间灌服等量蒸馏水.

1.2.2 取材及标本制作:模型组、预防组于造模第60、120、150、180 d,治疗组于治疗30、60、90 d分别处死小鼠(各时间点5只),对照组与模型组相同时间处死,每次1只,取肝、脾组织, Bouin液固定,常规石蜡包埋,制成4 μ m厚的连续间断切片,每张切片至少贴3个标本.标本间隔40 μ m.

1.2.3 指标观察:HE染色观察肝、脾组织的组织病理学的改变.应用免疫组织化学SP法标记TGF- $\beta 1$ 、IFN- γ 、IgG、CD3.切片常规脱蜡至水,柠檬酸钠缓冲液热抗原修复,30 g/L H₂O₂封闭内源性过氧化物酶,50 mL/L BSA溶液封闭,依次滴加兔抗鼠TGF- $\beta 1$ 抗血清、IFN- γ 和CD3抗血清(工作浓度1:100),兔抗人IgG抗血清,生物素抗兔IgG及SP复合物,DAB显色.阴性对照以PBS代替TGF- $\beta 1$ 抗血清.

随机选取第60、120、150、180 d模型组和预防组,30、60、90 d治疗组小鼠肝脾切片,各时间点每只动物1张,对照组每只动物1张,在40 \times 物镜下,每个标本随机选取5个视野,用图像分析系统检测免疫反应阳性细胞的平均吸光度(A).

统计学处理 所得数据用SPSS11.0统计软件进行单因素方差分析及其相关性分析.

2 结果

2.1 各组小鼠光镜下肝脾病理变化

2.1.1 肝组织:对照组结构正常,肝细胞索沿中央静脉呈放射状排列,肝细胞质丰富,核圆形,蓝染.模型组60 d,正常的肝小叶结构消失,肝血窦不规则狭窄,肝细胞排列紊乱,肝细胞变性坏死,核固缩或溶解.炎性细胞浸润明显,纤维组织增生.随模型时间的延长,肝脏病变进一步进展,肝细胞灶性坏死,纤维组织呈条索样增生,纤维间隔内可见慢性炎性细胞浸润.预防组肝细胞空泡变性、坏死,纤维组织增生较模型组减轻,仅汇管区有少量的纤维组织增生.治疗组

表 1 各组小鼠肝脏和脾脏内TGF-β1免疫反应平均吸光度变化 (mean ± SD)

分组	60 d	120 d	150 d	180 d	治疗30 d	治疗60 d	治疗90 d
模型组							
肝	0.24 ± 0.029 ^d	0.23 ± 0.030 ^d	0.24 ± 0.032 ^d	0.25 ± 0.039 ^d	-	-	-
脾	0.25 ± 0.027 ^d	0.31 ± 0.026 ^d	0.32 ± 0.034 ^d	0.33 ± 0.028 ^d	-	-	-
预防组							
肝	0.19 ± 0.020 ^a	0.19 ± 0.020 ^a	0.19 ± 0.030 ^a	0.18 ± 0.030 ^a	-	-	-
脾	0.23 ± 0.023 ^a	0.22 ± 0.027 ^a	0.23 ± 0.026 ^a	0.20 ± 0.020 ^a	-	-	-
治疗组							
肝	-	-	-	-	0.16 ± 0.028	0.15 ± 0.029	0.14 ± 0.021
脾	-	-	-	-	0.21 ± 0.021	0.21 ± 0.022	0.19 ± 0.030
对照组							
肝	0.14 ± 0.017	-	-	-	-	-	-
脾	0.18 ± 0.021	-	-	-	-	-	-

^aP<0.05 vs 对照组; ^dP<0.01 vs 对照组, 预防组和治疗组; $F_{肝} = 80.155, F_{脾} = 120.850$.

表 2 各组小鼠肝脏和脾脏内IFN-γ免疫反应平均吸光度变化 (mean ± SD)

分组	60 d	120 d	150 d	180 d	治疗30 d	治疗60 d	治疗90 d
模型组							
肝	0.20 ± 0.017 ^a	0.21 ± 0.023 ^a	0.20 ± 0.020 ^a	0.21 ± 0.024 ^a	-	-	-
脾	0.22 ± 0.021 ^a	0.23 ± 0.023 ^a	0.17 ± 0.030 ^a	0.18 ± 0.022 ^a	-	-	-
预防组							
肝	0.23 ± 0.002	0.25 ± 0.032	0.24 ± 0.031	0.24 ± 0.024	-	-	-
脾	0.23 ± 0.025	0.29 ± 0.033	0.31 ± 0.035	0.32 ± 0.032	-	-	-
治疗组							
肝	-	-	-	-	0.24 ± 0.019	0.26 ± 0.026	0.26 ± 0.026
脾	-	-	-	-	0.23 ± 0.029	0.31 ± 0.031	0.31 ± 0.032
对照组							
肝	0.17 ± 0.019	-	-	-	-	-	-
脾	0.30 ± 0.028	-	-	-	-	-	-

^aP<0.05 vs 对照组、预防组(除脾预防60 d)和治疗组(除脾治疗30 d); $F_{肝} = 53.584, F_{脾} = 118.240$.

30 d, 门管区周围肝细胞广泛空泡变性或脂肪变性, 核固缩, 中央静脉周围可见形态趋于正常的肝细胞. 治疗组60 d和90 d, 变性坏死的肝细胞明显减少, 取而代之的是大量形态近似正常的肝细胞, 门管区可见较多纤维组织.

2.1.2 脾组织: 对照组红髓、白髓结构正常, 模型组红髓内可见较多含铁血黄素沉着, 纤维组织明显增生. 白髓内淋巴小结结构不典型, 可见较多变性坏死的淋巴细胞, 预防组病变较模型组明显减轻, 红髓内纤维组织增生程度较轻. 治疗组脾脏淋巴组织增多, 可见淋巴小结和生发中心, 红髓内含铁血黄素及纤维组织均明显减少.

2.2 各组小鼠免疫组织化学指标变化 免疫阳性反应物存在于胞质或管腔内, 呈棕黄色或棕褐

色颗粒状, 阴性对照未见免疫反应物表达.

2.2.1 各组小鼠TGF-β1免疫反应平均吸光度: 表1显示不同时间段各组小鼠肝脏和脾脏内TGF-β1免疫反应平均吸光度的变化.

肝脏正常对照组中TGF-β1偶见表达, 模型组TGF-β1阳性细胞数较对照组明显增多, 且主要分布于被膜下、门管区、中央静脉旁等非实质肝细胞内, 少数表达于肝细胞(图1A); 脾脏正常对照组TGF-β1主要表达于淋巴细胞内, 模型组TGF-β1阳性细胞的数量较正常组增多. 肝脏与脾脏预防组及治疗组中TGF-β1阳性细胞的数量均较模型组减少(图1B).

2.2.2 各组小鼠IFN-γ免疫反应平均吸光度 表2显示不同时间段各组小鼠肝脏和脾脏内IFN-γ免疫

■ 相关报道

Gressner *et al*研究表明肝纤维化小鼠肝脾组织内TGF-β1的表达均明显增高, IFN-γ在则在肝脏的表达增高, 汪谦 *et al*研究证实脾脏促进了肝硬化的形成, 其主要方式是影响了多种细胞因子的产生, 尤其是促进TGF-β1的表达.

■应用要点

本文的相关工作为免疫因素对肝硬化形成及HTGK对其作用的相关机制研究提供了实验依据和方向,极具研究价值和前景,并为肝硬化的预防、治疗提供理论依据。

表 3 各组小鼠肝脏和脾脏内IgG免疫反应平均吸光度变化 (mean ± SD)

分组	60 d	120 d	150 d	180 d	治疗30 d	治疗60 d	治疗90 d
模型组							
肝	0.14 ± 0.028 ^a	0.15 ± 0.028 ^a	0.14 ± 0.023 ^a	0.15 ± 0.025 ^a	—	—	—
脾	0.16 ± 0.025 ^a	0.15 ± 0.027 ^a	0.15 ± 0.025 ^a	0.16 ± 0.022 ^a	—	—	—
预防组							
肝	0.15 ± 0.027	0.20 ± 0.022	0.21 ± 0.028	0.22 ± 0.028	—	—	—
脾	0.15 ± 0.021	0.18 ± 0.034	0.21 ± 0.028	0.21 ± 0.028	—	—	—
治疗组							
肝	—	—	—	—	0.23 ± 0.026 ^c	0.26 ± 0.031 ^c	0.26 ± 0.025 ^c
脾	—	—	—	—	0.28 ± 0.024 ^c	0.27 ± 0.028 ^c	0.25 ± 0.029 ^c
对照组							
肝	0.13 ± 0.031	—	—	—	—	—	—
脾	0.16 ± 0.027	—	—	—	—	—	—

^a $P < 0.05$ vs 对照组、预防组(除预防60 d)和治疗组, ^c $P < 0.05$ vs 对照组; $F_{肝} = 85.075$, $F_{脾} = 105.566$.

表 4 各组小鼠肝脏和脾脏内CD3免疫反应平均吸光度变化 (mean ± SD)

分组	60 d	120 d	150 d	180 d	治疗30 d	治疗60 d	治疗90 d
模型组							
肝	0.16 ± 0.017	0.18 ± 0.015 ^a	0.18 ± 0.017 ^a	0.19 ± 0.021 ^a	—	—	—
脾	0.18 ± 0.015	0.16 ± 0.015 ^a	0.16 ± 0.016 ^a	0.15 ± 0.011 ^a	—	—	—
预防组							
肝	0.21 ± 0.014 ^c	0.23 ± 0.016 ^c	0.22 ± 0.034 ^c	0.24 ± 0.033 ^c	—	—	—
脾	0.22 ± 0.017 ^c	0.24 ± 0.017 ^c	0.23 ± 0.018 ^c	0.24 ± 0.031 ^c	—	—	—
治疗组							
肝	—	—	—	—	0.21 ± 0.028 ^c	0.22 ± 0.020 ^c	0.23 ± 0.041 ^c
脾	—	—	—	—	0.26 ± 0.015 ^c	0.25 ± 0.018 ^c	0.26 ± 0.021 ^c
对照组							
肝	0.16 ± 0.020	—	—	—	—	—	—
脾	0.18 ± 0.016	—	—	—	—	—	—

^a $P < 0.05$ vs 对照组、预防组和治疗组, ^c $P < 0.05$ vs 对照组; $F_{肝} = 42.969$, $F_{脾} = 69.775$.

反应平均吸光度的变化。

肝脏对照组IFN- γ 在细胞内有少量表达;模型组IFN- γ 表达较对照组增多,主要分布于肝小叶周边及门管区的间质细胞内,少量分布于肝细胞,治疗组IFN- γ 阳性细胞明显增多,除门管区间质细胞,肝细胞内也有较多表达。预防组各时间点IFN- γ 的表达未见明显增高。脾脏对照组IFN- γ 主要表达于淋巴细胞及NK细胞,数量较多。模型组各时间点IFN- γ 的表达均明显降低(图1C),预防组60 d及治疗组30 d IFN- γ 的表达与模型组相似,但随时间延长,两组IFN- γ 的表达均显著增高(图1D)。

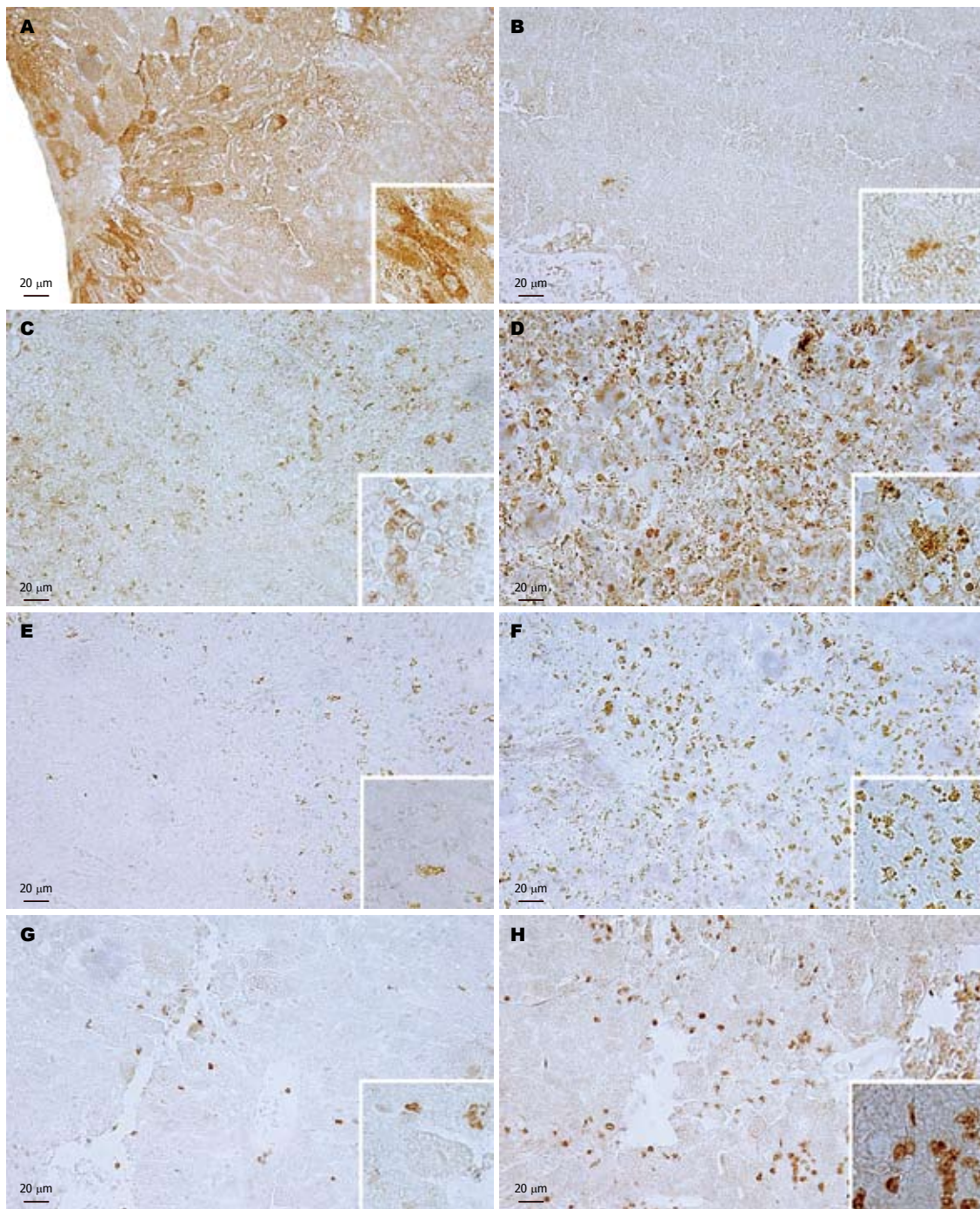
2.2.3 各组小鼠IgG免疫反应平均吸光度:表3显示不同时间段各组小鼠肝脏和脾脏内IFN- γ 免疫

反应平均吸光度的变化。

肝脏对照组少有IgG的表达,模型组IgG呈现出弱阳性,预防组及治疗组IgG的表达增多,并以治疗组最为明显,主要分布于肝血窦、小叶间静脉等血管腔内,还可见少量分布于小叶周边的IgG免疫反应阳性细胞。脾脏对照组内有较多IgG的表达,主要出现在脾血窦腔内,少数定位于浆细胞胞质内,模型组IgG的表达明显减弱(图1E),预防组和治疗组则显著增高(图1F),尤以治疗组为甚。

2.2.4 各组小鼠CD3免疫反应平均吸光度:表4显示不同时间段各组小鼠肝脏和脾脏内IFN- γ 免疫反应平均吸光度的变化。

肝脏对照组很少有CD3的表达,模型组CD3



同行评价
 本文具有较强科学性和可读性, 并创新性的探索中药制剂防治肝硬化的机制, 值得鼓励, 但中医理论和中药方剂的理论与解释稍差。

图 1 各组肝硬化小鼠免疫组织化学TGF-β1、IFN-γ、IgG及CD3的表达(免疫组化染色). A: CCl₄中毒150 d小鼠肝脏, TGF-β1在肝间质细胞和肝细胞内表达增强; B: HTGK治疗肝纤维化小鼠60 d肝脏, TGF-β1表达明显减弱, 仅出现于门管区间质细胞内; C: CCl₄中毒150 d小鼠脾脏, IFN-γ表达量少; D: HTGK预防肝硬化小鼠150 d脾脏, IFN-γ表达明显增多; E: CCl₄中毒150 d小鼠脾脏, IgG表达量少; F: HTGK治疗60 d肝硬化小鼠脾脏, IgG表达明显增多; G: CCl₄中毒120 d肝硬化小鼠肝脏, CD3阳性细胞数量较少, 主要分布于门管区; H: HTGK预防肝硬化小鼠120 d肝脏, CD3阳性细胞数量明显增多。

的表达增多, 主要分布于小叶周边间质细胞内(图1G)。预防组与治疗组CD3的表达增多明显(图1H), 主要表达于淋巴细胞及间质细胞。正常脾脏CD3主要表达于淋巴细胞, 模型组CD3阳性细胞较对照组明显减少, 而预防组与治疗组较模型组明显增多。

2.2.6 调控因子间的相关性: 各组肝脾组织内

TGF-β1的表达均与IFN-γ、IgG及CD3呈负相关关系($P < 0.05$)。肝脏内IFN-γ与IgG、CD3的表达成正相关关系($P < 0.05$, 图2)。

3 讨论

肝纤维化是多种慢性肝病向肝硬化发展的必经阶段, 主要表现为细胞外基质的过度沉积。造成

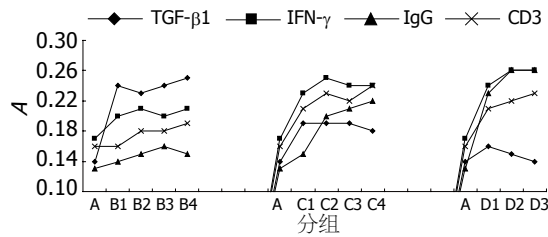


图2 肝硬化小鼠肝脏TGF- β 1、IFN- γ 、IgG及CD3表达的变化。A: 对照组; B1: 模型组60 d; B2: 模型组120 d; B3: 模型组150 d; B4: 模型组180 d; C1: 预防组60 d; C2: 预防组120 d; C3: 预防组150 d; C4: 预防组180 d; D1: 治疗组30 d; D2: 治疗组60 d; D3: 治疗组。

肝纤维化形成的因素很多, 至今尚未完全阐明。有资料表明, 肝纤维化的形成与机体免疫功能间密切相关。TGF- β 1是重要的免疫抑制因子, 在脾脏内由Th3细胞分泌, 其作用主要表现在抑制T细胞增殖、抑制NK细胞对激活的肝星状细胞的细胞毒作用, 限制细胞毒性T细胞的反应, 抑制IL-2、IFN- γ 的产生等^[1-3]。IFN- γ 属Th1源性细胞因子, 可通过抑制肝星状细胞的激活和阻断TGF- β 1的信号转导, 减少细胞外基质的合成, 抑制肝纤维化^[4-6]。联合应用IFN- γ 和血管紧张素转化酶抑制剂几乎可完全抑制肝纤维化的发展^[7]。

本实验结果显示, CCl₄中毒引起肝纤维化小鼠肝脾组织内TGF- β 1的表达均较正常对照组明显增高, IFN- γ 在肝脏的表达增高, 在脾脏则表达降低, IgG在肝脏及脾脏的表达均明显减少, CD3在肝脏的表达增加, 脾脏的表达减少。TGF- β 1的表达与IFN- γ 、IgG呈负相关关系。肝脾内IFN- γ 与IgG、CD3的表达呈正相关。这与以往的研究结果相似^[8], 说明脾脏内Th3细胞增多, 抑制Th1/Th2细胞的活化增生, 从而导致机体免疫功能低下。提示脾脏可能通过TGF- β 1的表达促进肝纤维化的形成; 汪谦 *et al*研究也表明脾脏在肝硬化过程中促进TGF- β 1的表达^[9]。IFN- γ 在肝脏的表达增高与潘海波 *et al*^[10]的报道一致, 说明由于肝内细胞外基质的沉积增多, 刺激机体促进IFN- γ 分泌增多, 从而制衡肝纤维化的发展。IFN- γ 在脾脏的表达降低表明Th1细胞因子含量减少, 提示Th2细胞因子优势表达; Th1/Th2细胞及其细胞因子网络的调节对维持机体正常的免疫功能至关重要。Th1细胞主要引起T淋巴细胞介导的细胞毒作用(CTL)和细胞免疫, Th2细胞主要功能为促进体液免疫反应, 研究证实, Th1/Th2细胞能相互拮抗, Th1细胞通过分泌IFN- γ 抑制Th2极化, Th2细胞也能通过分泌IL-4限制Th1型反应^[11-12]。Th1/Th2细胞的失衡导致细胞免疫功能低下, 促

进肝纤维化的形成^[13]。Th2细胞因子能增强前胶原1、3及基质金属蛋白酶2(MMP2)、MMP9和金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPs)的基因转录, 进一步促进肝纤维化的发展^[14]。

中医学是以阴阳五行、脏腑经络理论为构架, 反应人与环境关系的整体论。即以调整机体的整体状态, 而达到治疗某种疾病的目的。肝纤维化病机关键为: 湿热疫毒残留难尽是启动因子和持续因素, 正气虚弱是内因和转归, 淤血阻络是病理基础, 肝病传脾是必然演变过程。因此在肝纤维化的治疗上中医强调“顾正气”和“攻补兼施”^[15]。HTGK属纯植物药, 运用益气解毒, 扶正祛邪的中医理论, 以现代工艺提取黄芪、半枝莲、白芍等纯植物原料中的皂甙、黄酮等有效的活性成分, 来维持机体的动态平衡。本实验结果显示治疗组与预防组肝纤维化程度减轻, 表明HTGK具有明确的抗纤维化作用。结果证实经HTGK预防和治疗后肝脾组织内TGF- β 1的表达明显减少, IFN- γ 的表达明显增多, IgG与CD3的表达均明显增高。TGF- β 1与IFN- γ 、IgG和CD3呈负相关关系, 说明Th1细胞数量增多, Th3细胞数量减少, TGF- β 1的免疫抑制作用降低, Th1/Th2细胞的失衡状态得到改善, 细胞免疫和体液免疫功能均明显增强。提示HTGK抗纤维化作用的机制可能是通过促进IFN- γ 的分泌, 抑制TGF- β 1的表达, 恢复Th1/Th2细胞因子网络的平衡状态, 从而达到防治肝硬化的目的。

4 参考文献

- 1 Fantini MC, Becker C, Tubbe I, Nikolaev A, Lehr HA, Galle P, Neurath MF. Transforming growth factor beta induced FoxP3+ regulatory T cells suppress Th1 mediated experimental colitis. *Gut* 2006; 55: 671-680
- 2 Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 2006; 212: 28-50
- 3 Levings MK, Bacchetta R, Schulz U, Roncarolo MG. The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 129: 263-276
- 4 Weng HL, Cai WM, Liu RH. Animal experiment and clinical study of effect of gamma-interferon on hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 42-48
- 5 Weng HL, Wang BE, Jia JD, Wu WF, Xian JZ, Mertens PR, Cai WM, Dooley S. Effect of interferon-gamma on hepatic fibrosis in chronic hepatitis B virus infection: a randomized controlled study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 819-828
- 6 Song E, Chen J, Wang K, Zhang H, Su F, Wang M, Heemann U. Intrasplenic transplantation of syngenic hepatocytes modified by IFN-gamma

- gene ameliorates hepatic fibrosis in rats. *Transpl Int* 2002; 15: 472-478
- 7 Yoshiji H, Kuriyama S, Noguchi R, Yoshii J, Ikenaka Y, Yanase K, Namisaki T, Kitade M, Yamazaki M, Tsujinoue H, Fukui H. Combination of interferon-beta and angiotensin-converting enzyme inhibitor, perindopril, attenuates the murine liver fibrosis development. *Liver Int* 2005; 25: 153-161
- 8 Dong Y, Xi H, Yu Y, Wang Q, Jiang K, Li L. Effects of oxymatrine on the serum levels of T helper cell 1 and 2 cytokines and the expression of the S gene in hepatitis B virus S gene transgenic mice: a study on the anti-hepatitis B virus mechanism of oxymatrine. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 1299-1306
- 9 汪谦, 夏穗生, 姜汉英, 马绪贤, 朱帆, 左立群. 脾脏在大鼠肝硬化形成过程中免疫调控机制的探讨. *中华医学杂志* 1995; 75: 594-598
- 10 潘海波, 丁秀年. 细胞因子在实验性肝纤维化中动态变化及其意义. *中国民康医学杂志* 2004; 16: 1-3
- 11 Jiang R, Feng X, Guo Y, Lu Q, Hou J, Luo K, Fu N. T helper cells in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Chin Med J (Engl)* 2002; 115: 422-424
- 12 Dong C, Flavell RA. Th1 and Th2 cells. *Curr Opin Hematol* 2001; 8: 47-51
- 13 Sakaguchi E, Kayano K, Segawa M, Aoyagi M, Sakaida I, Okita K. [Th1/Th2 imbalance in HCV-related liver cirrhosis] *Nippon Rinsho* 2001; 59: 1259-1263
- 14 Sandler NG, Mentink-Kane MM, Cheever AW, Wynn TA. Global gene expression profiles during acute pathogen-induced pulmonary inflammation reveal divergent roles for Th1 and Th2 responses in tissue repair. *J Immunol* 2003; 171: 3655-3667
- 15 白宇宁, 刘绍能, 姚乃礼. 中医药抗肝纤维化的研究概况. *中国中医基础医学杂志* 2001; 7: 74-77

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009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, T_{1/2}不能写成tl/2或T_{1/2}, V_{max}不能V_{max}, 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 2009-01-08)

急性坏死性胰腺炎肠黏膜氧化应激损伤和HIF-1 α 的表达

崔培林, 吕栋, 张峻, 姚士伟, 王燕斌, 杨昭徐

■背景资料

肠黏膜屏障是维持机体内环境的重要组成部分, 其破坏可引起严重的全身炎症反应, 最终可引起多脏器衰竭。

崔培林, 吕栋, 张峻, 姚士伟, 王燕斌, 杨昭徐, 首都医科大学附属北京天坛医院消化内科 北京市 100050

崔培林, 北京协和医学院毕业, 博士, 主治医师, 主要从事消化系统疾病、肿瘤血管新生研究。

作者贡献分布: 此课题由崔培林设计, 杨昭徐指导; 由崔培林、吕栋、张峻、姚士伟及王燕斌共同操作完成。

通讯作者: 崔培林, 100050, 北京市, 北京天坛医院消化内科。cuipl@yahoo.cn

电话: 010-67096644

收稿日期: 2008-11-02 修回日期: 2008-12-01

接受日期: 2008-12-08 在线出版日期: 2009-01-08

Oxidative stress damage and HIF-1 α expression in rat intestinal mucosa during acute necrotic pancreatitis

Pei-Lin Cui, Dong Lv, Jun Zhang, Shi-Wei Yao, Yan-Bin Wang, Zhao-Xu Yang

Pei-Lin Cui, Dong Lv, Jun Zhang, Shi-Wei Yao, Yan-Bin Wang, Zhao-Xu Yang, Department of Gastroenterology, Beijing Tiantan Hospital Affiliated to Capital University of Medical Sciences, Beijing 100050, China

Correspondence to: Dr. Pei-Lin Cui, Department of Gastroenterology, Beijing Tiantan Hospital Affiliated to Capital University of Medical Sciences, Beijing 100050, China. cuipl@yahoo.cn

Received: 2008-11-02 Revised: 2008-12-01

Accepted: 2008-12-08 Published online: 2009-01-08

Abstract

AIM: To examine the role of oxidative stress in intestinal mucosal barrier damage during ANP, and to explore the putative mechanism of HIF-1 α during this process.

METHODS: Male Wistar rats were divided randomly into three groups: group A ($n = 18$) and B ($n = 18$) served as ANP models, group C ($n = 10$) was designated as a normal control (sham operation). In group A and C, rats were treated with normal saline therapy, while in group B, rats were treated with DMSO therapy. During the observation period, the morphological changes of intestinal mucosa and pancreatic tissue were observed, and the intestinal permeability was evaluated by FITC-labeled Dextran method and DAO activity detection. The activities of SOD, MPO and the level of MDA and GSH were measured

and also the expression of HIF-1 α protein was assayed.

RESULTS: During the observation period of ANP, the intestinal mucosal barrier function was damaged seriously and the intestinal permeability was increased. As early as 6h, the DAO activity in the mucosa was decreased obviously (0.43 ± 0.07 U/L vs 0.91 ± 0.11 U/L, $P < 0.05$) while was attenuated by administration of DMSO. In the serum, the detection of DAO activity showed an opposite results. Also in ANP group, the activity of SOD and the level of GSH were highly decreased (SOD: 12.12 ± 2.24 U/mg vs 25.12 ± 3.86 U/mg; GSH: 160.75 ± 24.25 mg/g vs 412.45 ± 45.60 mg/g, both $P < 0.01$), while the activity of MPO and the level of MDA were markedly increased (MPO: 1.32 ± 0.18 U/mg vs 0.63 ± 0.11 U/mg; MDA: 2.85 ± 0.21 nmol/mg vs 1.34 ± 0.12 nmol/mg, both $P < 0.01$). However, administration of DMSO attenuated the damage to some extent, and mucosal barrier function was improved ($P < 0.05$). And the injury induced by oxidative stress was limited to some extent ($P < 0.05$). Western blot showed the expression of HIF-1 α protein was up-regulated with ANP while down-regulated with DMSO.

CONCLUSION: The intestinal mucosal barrier is damaged during the process of ANP; oxidative stress plays an important role in the damage to mucosal barrier and OFR scavenger could maintain the integrity of mucosal barrier structure and function; HIF-1 α is involved in the protection effect on intestinal mucosal barrier under hypoxia induced by ANP, which could be regulated through attenuating the mucosal barrier damage when OFR scavenger is used.

Key Words: Acute necrotic pancreatitis; Intestinal mucosal barrier; Oxidative stress; Hypoxia-inducible factor-1 α ; Oxygen free radical

Cui PL, Lv D, Zhang J, Yao SW, Wang YB, Yang ZX. Oxidative stress damage and HIF-1 α expression in rat intestinal mucosa during acute necrotic pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(1): 24-30

■同行评议者

郭晓钟, 教授, 中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

摘要

目的: 探讨急性坏死性胰腺炎(ANP)时肠黏膜屏障的氧化应激损伤和HIF-1 α 的表达, 及其与黏膜损伤的关系。

方法: δ Wistar大鼠随机分为3组, A组(ANP组, $n = 18$), 诱导ANP模型; B组(DMSO组, $n = 18$), 诱导ANP前, 使用二甲基亚砷(DMSO)预处理组; C组(con组, $n = 10$)假手术组。A和C组术前30 min皮下注射生理盐水(0.2 mL/kg体质量), B组动物术前30 min皮下注射同等剂量的DMSO(0.2 mL/kg体质量), 并且实验前30 min每只动物饲入60 mg/100 g体质量的FITC-右旋糖酐。动物分别在手术后0, 6, 24 h点心脏取血后处死, 分别取胰头和末端回肠3-5 cm。观察胰腺和肠黏膜组织形态学改变, 测定肠黏膜组织中DAO、SOD、GSH、MPO、MDA含量, Western-blot测定肠黏膜中HIF-1 α 的表达, 并检测血清中二氮氧化酶(DAO)活性及FITC浓度。

结果: ANP时大鼠肠黏膜屏障功能严重破坏, 肠道通透性明显增加。ANP组6 h时黏膜中DAO的活性已经明显下降(0.43 ± 0.07 U/L vs 0.91 ± 0.11 U/L, $P < 0.05$), DMSO处理后DAO活性下降受抑。而血清中测定DAO活性正好相反。ANP组6 h黏膜组织中SOD、GSH活性就已有明显下降, 12 h最为明显(SOD: 12.12 ± 2.24 U/mg vs 25.12 ± 3.86 U/mg; GSH: 160.75 ± 24.25 mg/g vs 412.45 ± 45.60 mg/g, 均 $P < 0.01$), 而MPO活性及MDA浓度明显升高(MPO: 1.32 ± 0.18 U/mg vs 0.63 ± 0.11 U/mg; MDA: 2.85 ± 0.21 nmol/mg vs 1.34 ± 0.12 nmol/mg, 均 $P < 0.01$), 观察期限内一直处在较高水平。DMSO预处理组动物肠黏膜通透性有所改善, 但仍然高于正常($P < 0.05$)。使用DMSO后, 氧化应激反应及其产物有所减弱, 但仍然高于正常($P < 0.05$)。ANP时HIF-1 α 表达明显增加, 而DMSO的使用可使HIF-1 α 高表达下调。

结论: ANP时肠黏膜屏障结构和功能存在严重破坏; 氧化应激损伤是肠黏膜屏障损伤的一个重要因素, 而清除氧自由基能一定程度上减轻肠黏膜屏障损伤并能维护其功能; HIF-1 α 参与ANP肠黏膜屏障的修复和维持, 清除氧自由基减轻肠黏膜损伤可以调节HIF-1 α 表达。

关键词: 急性坏死性胰腺炎; 肠黏膜屏障; 氧化应激; 低氧诱导因子-1 α ; 氧自由基

崔培林, 吕栋, 张峻, 姚士伟, 王燕斌, 杨昭徐. 急性坏死性胰腺炎肠黏膜氧化应激损伤和HIF-1 α 的表达. 世界华人消化杂志

2009; 17(1): 24-30

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/24.asp>

0 引言

肠黏膜屏障一般是由机械、免疫、生物和化学屏障4部分构成, 是维持机体内环境稳定的重要器官之一^[1-3]。肠黏膜屏障的功能受损, 可引起肠道细菌的易位, 诱发肠源性感染, 继而可诱发全身炎症反应综合征, 甚至诱发多脏器功能不全和衰竭^[4-6]。而在众多严重疾病和创伤过程中, 肠黏膜屏障都会受到不同程度的损伤, 尤常见于急性坏死性胰腺炎^[7-8]。肠黏膜屏障损伤的机制也极为复杂, 缺血缺氧、理化免疫因素、肠道菌群的微生态变化、氧自由基及其他炎性介质等多种因素均参与其中^[5,9]。已经有大量研究表明在肠黏膜屏障损伤时, 氧化应激产物明显升高, 而抗氧化剂治疗可以一定程度上减轻损伤, 我们前期研究工作也已经充分证实^[10-12]。但是在氧自由基如何损伤肠黏膜屏障机制方面目前研究还不够深入。HIF-1 α 虽发现于肿瘤细胞, 与机体许多重大缺血缺氧性疾病的病理生理有关, 并与肠黏膜屏障结构和功能的修复和维持关系密切^[13-15]。本研究就为了探讨急性坏死性胰腺炎时肠黏膜屏障的氧化应激损伤和HIF-1 α 表达, 旨在深入探讨其两者之间与黏膜损伤有无关联。

1 材料和方法

1.1 材料 牛磺胆酸钠、FITC-右旋糖苷, DAO、SOD、GSH、MPO、MDA检测试剂盒购自北京化学试剂公司, 组织细胞裂解液、丙烯酰胺、N,N-亚甲双丙烯酰胺购自美国Sigma公司, HIF-1 α 兔多克隆抗体、 β -actin鼠多克隆抗体、羊抗兔多克隆抗体、羊抗鼠多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司, 低温组织匀浆机、高速台式冷冻离心机、垂直电泳槽、电转移装置、电泳仪、PVDF膜、ECL化学发光成像系统, 荧光及普通分光光度仪等由北京市神经外科研究所和中国医学科学院国家重点分子生物实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 造模及分组: 动物模型采用传统的逆行胰胆管注射法诱导急性坏死性胰腺炎(50 g/L牛磺胆酸钠)^[16]。 δ Wistar大鼠(体质量250-300 g), 实验前禁食(自由饮水)12 h, 随机数字法分为3组, A组为急性坏死性胰腺炎组(ANP), $n = 18$; B组二甲基亚砷(DMSO)处理组(DMSO), $n = 18$; C组为假手术组(对照组), $n = 10$ 。术前30 min B组动物皮

■ 研发前沿

本文主要研究氧化应激在ANP伴发的肠黏膜屏障损伤时所起的作用, 氧自由基清除剂能否减轻黏膜屏障损伤, 并进一步探讨减轻氧化应激损伤与HIF-1 α 表达有无关联。

■相关报道

已经有部分研究危重疾病伴发的肠黏膜屏障的损伤机制,涉及内容较多,其中对氧化应激损伤比较笼统,缺乏具体研究。HIF-1 α 与黏膜屏障的维护已有报道,且与OFR之间的关系研究较为复杂,在体外实验中,OFR能降低HIF-1 α 的表达,可能与转录后调控有关,但在体内目前比较复杂,因除能保护细胞外,本身还是一种炎症因子参与炎症反应。

下注射DMSO(0.2 mL/kg体重),A组和C组注射同等量的生理盐水(0.2 mL/kg体重)。动物分别在手术后0,6,24 h点杀死,取末端回肠3-5 cm,剔除系膜,清除肠内容物后取黏膜组织放入液氮中保存,随即进行以下实验。

1.2.2 胰腺和肠黏膜组织细胞形态学观察:动物处死后,分别取胰头和末端回肠部分,各分成两部分,一部分普通光镜检查,一部分放入20 g/L戊二醛固定液中送电镜检查。

1.2.3 肠黏膜通透性的测定:肠壁通透性用FITC标记的右旋糖酐法测定^[17]。实验前30 min每只动物饲入60 mg/100 g体质量的FITC-右旋糖酐(4000 kDa, 80 g/L),杀死动物前心脏取血测定血清中FITC浓度及血清中DAO的活性,同时,测定肠黏膜组织中的DAO活性。

1.2.4 肠黏膜组织中氧自由基产物的测定:从液氮中取冻存的新鲜黏膜组织200 mg,在液氮预冷的研钵中研碎组织后,加入冰生理盐水,在低温组织匀浆机按需制备100 g/L和10 g/L的组织匀浆,3000 r/min,10 min后去上清液备用。按试剂盒说明书严格操作,测定黏膜组织中的丙二醛(SOD)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)。

1.2.5 黏膜组织中HIF-1 α 蛋白的测定:取冻存的新鲜肠黏膜组织200 mg,同样在液氮预冷的研钵中研碎,加入组织细胞裂解液(含蛋白酶抑制剂),冰上放置20 min,13 000 r/min低温下离心15 min,取上清,用Bradford法进行蛋白定量后分装,放入-80 $^{\circ}$ C冰箱保存。用免疫印迹法测定总蛋白中HIF-1 α 含量,简单步骤如下:首先SDS-PAGE进行蛋白分离,再低温下(4 $^{\circ}$ C)转移到PDVF膜上进行免疫杂交,用50 g/L牛奶封闭液封闭非特异性抗原位点,PBST清洗后4 $^{\circ}$ C孵育一抗溶液(1:500)过夜,然后加二抗溶液(1:10000)孵育1-2 h,用ECL化学发光法显色并测定分析(GBISC, gene bio imaging system for chemiluminescence)。

统计学处理 使用SPSS10.0软件包对数据进行处理,所有数据均以mean \pm SD表示,符合正态分布的进行t检验或ANOVA,非正态分布资料用秩和检验; $P<0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 胰腺组织形态学 ANP组胰腺组织病变严重,间质水肿,小叶结构凌乱,可见大片出血和坏死灶,并可见炎性细胞浸润,24 h已可见明显钙化灶。DMSO处理组胰腺腺小叶结构病变有所减轻,出血坏死较同期A组动物轻,多为小灶性坏

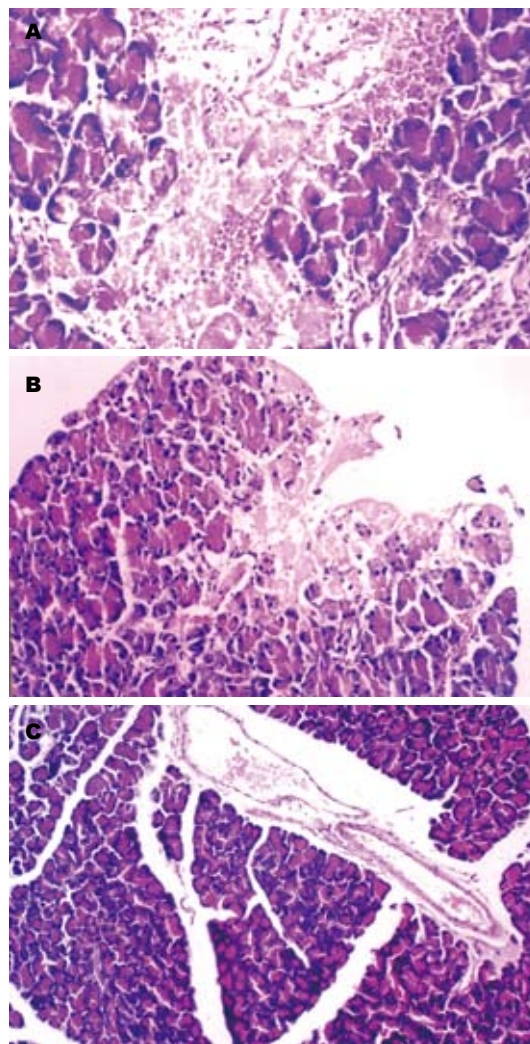


图1 胰腺组织形态学观察。A: ANP组($\times 200$); B: DMSO组($\times 200$); C: 正常组($\times 100$)。

死,间质中炎性细胞浸润较轻(图1)。

2.2 黏膜组织细胞形态学 光镜下见A组肠绒毛从肿胀、缩短、增粗到倒伏、融合、破损甚至断裂剥脱,固有层裸露。B组损伤较同期A组轻。C组为正常肠绒毛结构。

电镜下A组小肠黏膜上皮表面糖衣层消失,线粒体肿胀,结构不清晰。粗面内质网和滑面内质网呈不同程度扩张。细胞间连接部分增宽。随着时间延长,细胞间连接破坏严重,可见凋亡细胞。肠黏膜绒毛可见不同程度排列稀疏、断裂、脱落、缺损,似“破棉絮”样改变,重者微绒毛广泛脱落,其顶端呈“花瓣状”。B组肠绒毛结构及黏膜细胞损伤较同期A组轻,绒毛结构基本完整(图2)。

2.3 DMSO能改善大鼠ANP时肠黏膜通透性 ANP时大鼠肠黏膜屏障功能严重破坏,肠道通透性明显增加,FITC-Dextran外渗明显增加,观察期限内12 h最为明显($P<0.01$)。DMSO预处理

表 1 大鼠血清及肠黏膜组织匀浆中DAO活性 (U/L)

分组	血清			肠黏膜组织匀浆		
	0 h	6 h	12 h	0 h	6 h	12 h
正常组	1.26 \pm 0.32	1.30 \pm 0.23	1.18 \pm 0.27	0.95 \pm 0.06	0.91 \pm 0.11	0.89 \pm 0.13
ANP	1.19 \pm 0.30	3.12 \pm 0.43 ^a	3.89 \pm 0.64 ^b	0.93 \pm 0.02	0.43 \pm 0.07 ^a	0.37 \pm 0.10 ^b
DMSO	1.17 \pm 0.28	2.32 \pm 0.48 ^c	3.12 \pm 0.56 ^c	0.88 \pm 0.04	0.65 \pm 0.05 ^c	0.58 \pm 0.15 ^c

^a P <0.05, ^b P <0.01 vs 正常组; ^c P <0.05 vs ANP.

■ 创新盘点

ANP时肠黏膜屏障损伤机制复杂, 目前研究虽多但无具体, 本文就氧化应激一个方面对肠黏膜屏障的损伤机制进行探讨, 并阐明其与HIF-1 α 表达调节关系。

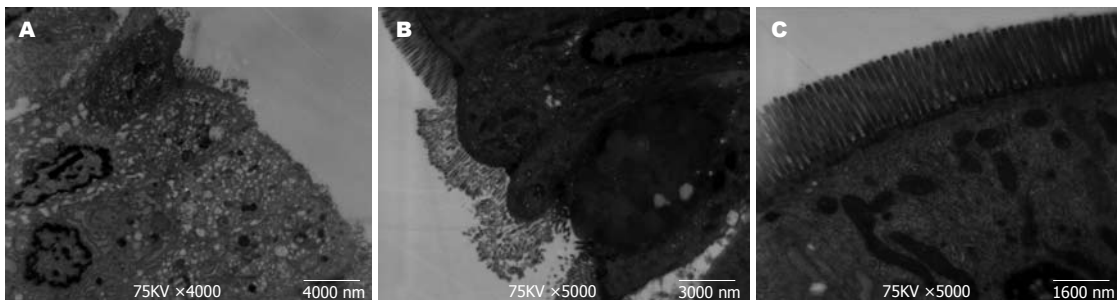


图 2 电镜下肠黏膜细胞及绒毛变化. A: ANP组(\times 4000); B: DMSO组(\times 5000); C: 正常组(\times 10000).

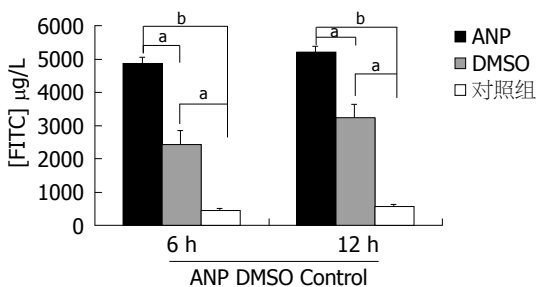


图 3 大鼠肠黏膜通透性变化. ^a P <0.05, ^b P <0.01.

组动物肠黏膜通透性有所改善(P <0.05), 但仍然高于正常(P <0.05, 图3). 黏膜组织中DAO活性检测结果显示, ANP 6 h时黏膜中DAO的活性已经明显下降(P <0.05), DMSO处理后DAO活性下降受抑(P <0.05). 而血清中测定DAO活性正好相反, ANP组明显升高(P <0.05), 在DMSO处理组明显低于ANP组(P <0.05), 但仍然高于正常(P <0.05, 表1).

2.4 肠黏膜组织中SOD、GSH、MPO、MDA浓度 观察期限内, ANP组6 h黏膜组织中SOD、GSH活性就已有明显下降, 12 h最为明显(ANP组 vs 对照组, SOD 12.12 \pm 2.24 U/mg vs 25.12 \pm 3.86 U/mg和GSH 160.75 \pm 24.25 mg/g vs 412.45 \pm 45.60 mg/g, P <0.01), 而MPO活性及MDA浓度明显升高(ANP vs 对照组, MPO 1.32 \pm 0.18 U/mg vs 0.63 \pm 0.11 U/mg和 MDA 2.85 \pm 0.21 nmol/mg vs 1.34 \pm 0.12 nmol/mg, P <0.01), 观察期限内一直

处在较高水平(图4). 使用DMSO后, 氧化应激反应及其产物有所减弱(P <0.05), 但仍然高于正常(P <0.05, 图4).

2.5 HIF-1 α 的表达 正常的小肠黏膜组织中, HIF-1 α 也有轻微表达, 与黏膜细胞处于缺氧状态有关, ANP时HIF-1 α 表达明显增加(P <0.05), 而DMSO的使用可以使HIF-1 α 高表达下调(图5), 说明DMSO可以通过清除氧自由基减轻肠黏膜损伤改善缺血缺氧状况, 使HIF-1 α 表达下调, 但维持在较高水平(P <0.05).

3 讨论

胰腺和继发其他器官感染目前仍是ANP患者的主要死亡原因, 占80%以上^[18-19]. 肠道是机体内最大的细菌和内毒素储存库, 正常情况下由于完整的黏膜屏障功能, 并不损害机体健康. 但在众多危重疾病包括ANP时, 肠道黏膜屏障功能受损, 肠道通透性增加, 导致肠道内细菌和内毒素移位进入血液和腹腔, 从而进一步激发炎症级联反应, 诱发SIRS, 最终导致MODS、MOF直至死亡^[8,20-22]. 而在ANP并发肠黏膜屏障损伤的种种机制中, 由于缺血缺氧、再灌注的多种原因产生的大量氧自由基是引起肠黏膜屏障损伤的一个重要因素. 我们在前期实验中已经初步证实氧自由基在ANP发病和并发的肠黏膜损伤中重要作用, 并预防性使用氧自由基清除剂取得一定的治疗效果, 但研究不够深入.

同行评价

本文结论可靠, 参考文献引用合理, 但文章的观察指标较为陈旧, 研究方法也不甚先进, 使得文章的科学性及其先进性不是很高。

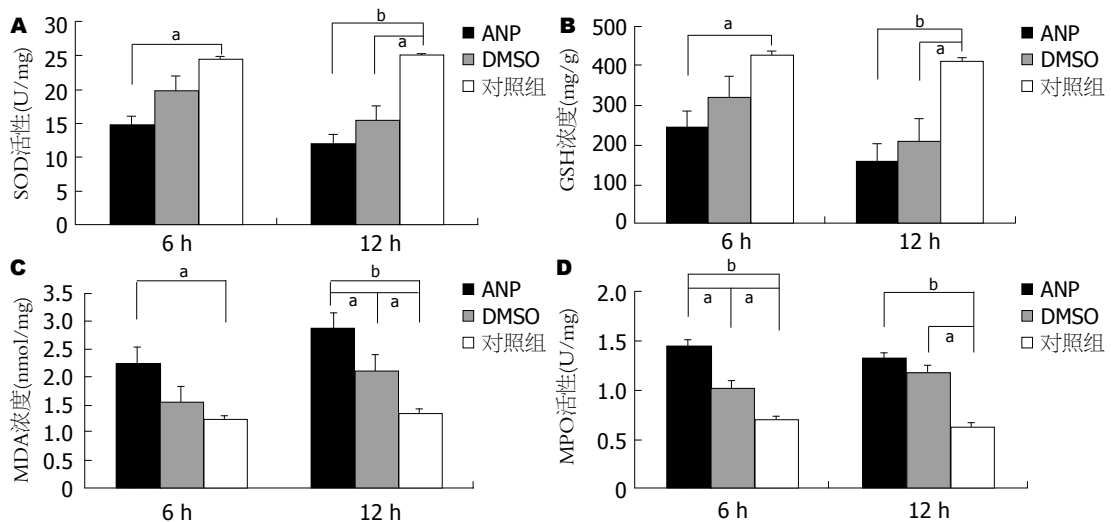


图4 肠黏膜组中SOD、GSH、MPO、MDA变化. A: SOD; B: GSH; C: MPO; D: MDA, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$.

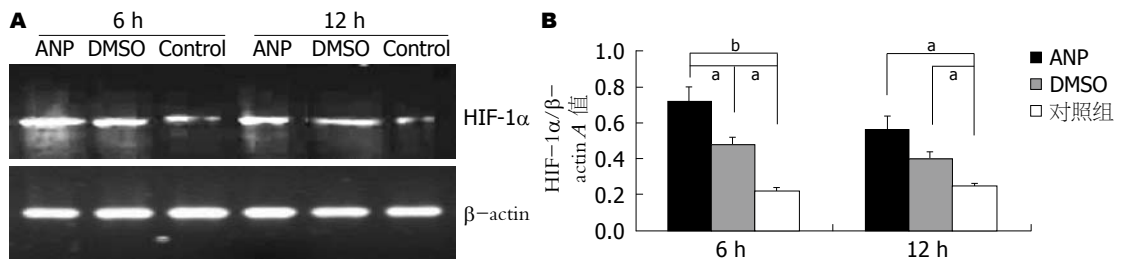


图5 肠黏膜组织中HIF-1α蛋白表达变化. A: 蛋白电泳显示肠黏膜组织中HIF-1α表达; B: GBIS半定量分析结果, 统计数据来自四次不同的具有代表性实验结果, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$.

本研究中我们同样制作了ANP动物模型, 形态学上从普通光镜到电镜下黏膜细胞、细胞间连接及肠微绒毛等超微结构上证实黏膜屏障结构受到严重破坏, 并通过FITC-Dextran外渗实验观察的肠道的通透性明显增加, 进一步证实黏膜屏障功能严重受损. DAO存在哺乳动物动物的黏膜和绒毛上层, 其中大部分存在于小肠黏膜绒毛, 其活性与绒毛高度和黏膜细胞合成核酸和蛋白相关, 是反映小肠黏膜屏障结构和功能理想指标. 本研究中小肠黏膜组织中DAO活性明显下降, 与此对应的血清中DAO活性上升, 提示黏膜屏障被破坏, DAO大量释放入血.

肠道拥有大量的黄嘌呤脱氢酶系统(XO), 当严重应激出现后, 肠道黏膜缺血损伤造成黏膜炎症, 就会通过黄嘌呤氧化脱氢酶(XD)系统产生氧自由基^[23-24]. 另外, 在再灌注出现后被多种因素激活中性粒细胞(PMN)通过细胞膜上的NADPH氧化酶, 诱导呼吸爆发(respiratory burst)产生, 释放大量的氧自由基及其衍生的生物活性物质, 进一步造成组织的严重损伤^[25-27]. 另外应激状态下抑制体内的重要抗氧化谷胱甘肽氧化还原系统明显受到抑制^[28-29], 使清除氧

自由基能力降低, 最终导致大量毒性氧自由基在组织细胞内堆积, 致使细胞的脂质过氧化, 从而使细胞蜕变, 最终引起细胞死亡. 另外激活的中性粒细胞还可以分泌血管活性物质如前列腺素、白三烯等均可使炎症进一步加重, 继发性恶性循环^[30]. 本研究中检测ANP时肠黏膜组织中抗氧化物质中SOD和GSH活性明显减弱, 而MDA含量明显增高, 证实大量氧自由基损伤黏膜组织, 机体内的抗氧化系统消耗并受抑. 而DMSO是一种有效的氧自由基清除剂, 本研究中发现预防使用DMSO后, 可明显减轻肠黏膜的损伤, 能有效的清除氧自由基, 改善体内氧化-还原系统的失衡, 减轻氧自由基对黏膜组织细胞的损伤, 改善肠黏膜的通透性, 从而有效的维护肠黏膜屏障结构和功能的完整性. MPO与激活的中性粒细胞产生的“呼吸爆发”密切相关^[31], 本实验中也发现ANP时MPO活性明显增强, 提示中性粒细胞大量蓄集在肠黏膜组织中, 呼吸爆发产生大量的氧自由基和其他活性物质, 对黏膜结构和功能造成严重损伤. DMSO的使用同样可以部分组织呼吸爆发的产生, 尤其是在6h时.

HIF-1作为核转录因子, 参与机体内许多

与低氧反应基因的调节, 包括120 kDa的 α 亚基和91-94 kDa的 β 亚基, α 亚基(HIF-1 α)蛋白受低氧调控, 常氧时可被蛋白酶体降解; 低氧或存在过渡金属(Co^{2+} , Ni^{2+} 和 Mn^{2+})及铁离子螯合剂时, HIF-1 α 蛋白稳定性增强不被降解, 与组成性表达的HIF-1 β 结合成二聚体, 通过核转位进入细胞核, 与目的基因的低氧反应元件(hypoxia response element, HRE)结合, 调节低氧相关基因的表达, 从而增强细胞对缺氧的适应能力以及改善因缺氧而诱导的凋亡, 使细胞保持旺盛的增殖能力^[32-34]. 众多的研究结果表明, 在小肠黏膜上皮细胞中, HIF-1 α 持续轻微表达, 可能与小肠黏膜细胞长期处于低氧状态并有很强的增殖能力有关, 因此对肠黏膜屏障结构和功能的维持具有非常重要的意义^[13-15, 35-37]. 本实验中发现观察期限内ANP动物小肠黏膜中HIF-1 α 表达明显增加, 明显高于正常时的表达水平, 提示ANP时造成肠黏膜细胞的缺血缺氧加重, 黏膜细胞通过自身HIF-1 α 的表达上调, 改善对缺氧的耐受并促进增殖维护黏膜屏障的完整. 令人感兴趣的是DMSO的使用能使HIF-1 α 的表达部分下调, 提示DMSO可以通过清除氧自由基减轻肠黏膜损伤改善缺血缺氧状况, 而反馈性使HIF-1 α 的表达下调. 但是氧自由基本身也是细胞中HIF-1 α 表达调节的重要调节因子, 本研究有待进一步更加深入.

总之, ANP时肠黏膜屏障的结构和功能受到严重破坏, 氧自由基是参与其中一个重要机制, 氧自由基清除剂能一定程度上维护肠黏膜屏障的结构和功能的完整; HIF-1 α 参与ANP肠黏膜屏障的修复和维持, 清除氧自由基减轻肠黏膜损伤可以调节HIF-1 α 表达.

4 参考文献

- Gasbarrini G, Montalto M. Structure and function of tight junctions. Role in intestinal barrier. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999; 31: 481-488
- Sakaguchi T, Brand S, Reinecker HC. Mucosal barrier and immune mediators. *Curr Opin Gastroenterol* 2001; 17: 573-577
- Berkes J, Viswanathan VK, Savkovic SD, Hecht G. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut* 2003; 52: 439-451
- Antequera R, Bretana A, Cirac A, Brito A, Romera MA, Zapata R. Disruption of the intestinal barrier and bacterial translocation in an experimental model of intestinal obstruction. *Acta Cient Venez* 2000; 51: 18-26
- O'Hara JR, Buret AG. Mechanisms of intestinal tight junctional disruption during infection. *Front Biosci* 2008; 13: 7008-7021
- Ding LA, Li JS, Li YS, Zhu NT, Liu FN, Tan L. Intestinal barrier damage caused by trauma and lipopolysaccharide. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2373-2378
- Chen J, Wang XP, Liu P, Wu K, Xu M, Yu XF, Wang GS. [Effects of continuous early enteral nutrition on the gut barrier function in dogs with acute necrotizing pancreatitis] *Zhonghua Yixue Zazhi* 2004; 84: 1726-1731
- Ammori BJ. Role of the gut in the course of severe acute pancreatitis. *Pancreas* 2003; 26: 122-129
- Hang CH, Shi JX, Li JS, Wu W, Yin HX. Alterations of intestinal mucosa structure and barrier function following traumatic brain injury in rats. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2776-2781
- Buchholz BM, Kaczorowski DJ, Sugimoto R, Yang R, Wang Y, Billiar TR, McCurry KR, Bauer AJ, Nakao A. Hydrogen inhalation ameliorates oxidative stress in transplantation induced intestinal graft injury. *Am J Transplant* 2008; 8: 2015-2024
- Assimakopoulos SF, Thomopoulos KC, Patsoukis N, Georgiou CD, Scopa CD, Nikolopoulou VN, Vagianos CE. Evidence for intestinal oxidative stress in patients with obstructive jaundice. *Eur J Clin Invest* 2006; 36: 181-187
- Theoharides TC, Doyle R, Francis K, Conti P, Kalogeromitros D. Novel therapeutic targets for autism. *Trends Pharmacol Sci* 2008; 29: 375-382
- Robinson A, Keely S, Karhausen J, Gerich ME, Furuta GT, Colgan SP. Mucosal protection by hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibition. *Gastroenterology* 2008; 134: 145-155
- Furuta GT, Turner JR, Taylor CT, Hershberg RM, Comerford K, Narravula S, Podolsky DK, Colgan SP. Hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of intestinal trefoil factor protects barrier function during hypoxia. *J Exp Med* 2001; 193: 1027-1034
- Kong T, Westerman KA, Faigle M, Eltzschig HK, Colgan SP. HIF-dependent induction of adenosine A2B receptor in hypoxia. *FASEB J* 2006; 20: 2242-2250
- Aho HJ, Koskensalo SM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1980; 15: 411-416
- Napolitano LM, Koruda MJ, Meyer AA, Baker CC. The impact of femur fracture with associated soft tissue injury on immune function and intestinal permeability. *Shock* 1996; 5: 202-207
- Carrall JK, Herrick B, Gipson T, Lee SP. Acute pancreatitis: diagnosis, prognosis, and treatment. *Am Fam Physician* 2007; 75: 1513-1520
- Walsh MK. Diagnosis, prognosis, and treatment of acute pancreatitis. *Am Fam Physician* 2008; 77: 594
- Laukoetter MG, Nava P, Nusrat A. Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 401-407
- Zhang XP, Zhang J, Song QL, Chen HQ. Mechanism of acute pancreatitis complicated with injury of intestinal mucosa barrier. *J Zhejiang Univ Sci B* 2007; 8: 888-985
- Ammori BJ. Gut barrier dysfunction in patients with acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002; 9: 411-412
- Mittal A, Phillips AR, Loveday B, Windsor JA. The potential role for xanthine oxidase inhibition in major intra-abdominal surgery. *World J Surg* 2008; 32: 288-295
- Miyazono Y, Gao F, Horie T. Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small

- intestinal toxicity in rats. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 1119-1127
- 25 Caputo FJ, Rupani B, Watkins AC, Barlos D, Vega D, Senthil M, Deitch EA. Pancreatic duct ligation abrogates the trauma hemorrhage-induced gut barrier failure and the subsequent production of biologically active intestinal lymph. *Shock* 2007; 28: 441-416
- 26 Ha EM, Oh CT, Bae YS, Lee WJ. A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science* 2005; 310: 847-850
- 27 Nakamura N, Morisaki H, Suzuki T, Yajima S, Katori N, Kotake Y, Funakoshi Y, Kawabata K, Yamada S, Ishizaka A, Takeda J. Inhibition of neutrophil elastase attenuates gut mucosal injury evoked by acute alveolar hypoxia in rabbits. *Shock* 2007; 28: 101-105
- 28 Ranganna K, Mathew OP, Yatsu FM, Yousefipour Z, Hayes BE, Milton SG. Involvement of glutathione/glutathione S-transferase antioxidant system in butyrate-inhibited vascular smooth muscle cell proliferation. *FEBS J* 2007; 274: 5962-5978
- 29 Burdo J, Schubert D, Maher P. Glutathione production is regulated via distinct pathways in stressed and non-stressed cortical neurons. *Brain Res* 2008; 1189: 12-22
- 30 Ginzberg HH, Cherapanov V, Dong Q, Cantin A, McCulloch CA, Shannon PT, Downey GP. Neutrophil-mediated epithelial injury during transmigration: role of elastase. *Am J Physiol* 2001; 281: G705-G717
- 31 Guilpain P, Servetaz A, Batteux F, Guillevin L, Mouthon L. Natural and disease associated anti-myeloperoxidase (MPO) autoantibodies. *Autoimmun Rev* 2008; 7: 421-425
- 32 Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 5680-5684
- 33 Chun YS, Kim MS, Park JW. Oxygen-dependent and -independent regulation of HIF-1alpha. *J Korean Med Sci* 2002; 17: 581-588
- 34 Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr. HIF1alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science* 2001; 292: 464-468
- 35 Karhausen J, Furuta GT, Tomaszewski JE, Johnson RS, Colgan SP, Haase VH. Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis. *J Clin Invest* 2004; 114: 1098-1106
- 36 Shah YM, Ito S, Morimura K, Chen C, Yim SH, Haase VH, Gonzalez FJ. Hypoxia-inducible factor augments experimental colitis through an MIF-dependent inflammatory signaling cascade. *Gastroenterology* 2008; 134: 2036-2048.e1-e3
- 37 Taylor CT, Colgan SP. Hypoxia and gastrointestinal disease. *J Mol Med* 2007; 85: 1295-1300

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009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. wcjd@wjgnet.com; (6)收稿及修回日期格式如: Received: Revised: . (常务副总编辑: 张海宁 2009-01-08)

依达拉奉对大鼠重症急性胰腺炎的保护作用

龚平, 张彧, 宋政军

龚平, 张彧, 大连医科大学第一医院急诊ICU 辽宁省大连市 116011

宋政军, 西安交通大学第一医院消化内科 陕西省西安市 710061

龚平, 硕士, 主治医师, 主要从事重症急性胰腺炎的基础与临床研究.

作者贡献分布: 此课题由龚平与宋政军设计; 研究过程及数据分析由龚平与张彧完成; 论文写作由龚平完成.

通讯作者: 龚平, 116011, 辽宁省大连市, 大连医科大学第一医院急诊ICU. gongp828@sohu.com

电话: 0411-83622841

收稿日期: 2008-11-19 修回日期: 2008-12-10

接受日期: 2008-12-15 在线出版日期: 2009-01-08

Protective effects of edaravone on rats with severe acute pancreatitis

Ping Gong, Yu Zhang, Zheng-Jun Song

Ping Gong, Yu Zhang, Emergency Intensive Care Unit, the First Hospital Affiliated to Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China

Zheng-Jun Song, Department of Gastroenterology, the First Hospital Affiliated to Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Ping Gong, Emergency Intensive Care Unit, the First Hospital Affiliated to Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China. gongp828@sohu.com

Received: 2008-11-19 Revised: 2008-12-10

Accepted: 2008-12-15 Published online: 2009-01-08

Abstract

AIM: To investigate the therapeutic effects and mechanism of edaravone on rats with severe acute pancreatitis (SAP) induced by L-arginine.

METHODS: A total of 60 rats were randomly and equally divided into three groups, namely control group, SAP model group and edaravone treatment group ($n = 20$). A SAP model was established by injecting intraperitoneally with L-arginine at a dose of 2.5 g/kg twice at an interval of 1 h, and injecting intravenously with edaravone 3 mg/kg, bid \times 3 d (edaravone treatment group). The characteristics and volume of ascites, the pathological changes of pancreatic tissue and the serum levels of amylase (AMY), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-6 and the contents of malonaldehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH)

in pancreatic tissue of rats and prognosis were compared after 72 h following administration of L-arginine.

RESULTS: Compared with control group, 72 h after administration of L-arginine, SAP model group showed typical histopathological changes of SAP, elevated the volume of ascites (5.16 ± 1.52 vs 0.50 ± 0.10 , $P < 0.01$), and significantly higher serum levels of AMY, TNF- α , IL-6 and content of MDA of pancreatic tissue (8967.5 ± 298.4 vs 720.1 ± 119.7 ; 103.98 ± 10.56 vs 41.59 ± 3.79 ; 548.57 ± 10.45 vs 198.34 ± 2.10 ; 35.6 ± 3.8 vs 7.9 ± 2.2 , all $P < 0.01$), and lower GSH and SOD in pancreatic tissue (7.2 ± 0.6 vs 17.1 ± 2.1 ; 7300 ± 1800 vs 28400 ± 2700 , both $P < 0.01$). Compared with SAP model group, 72 h after administration of L-arginine, significantly alleviated pathological lesions of SAP, decreased volume of ascites (4.05 ± 1.22 vs 53.16 ± 1.52 , $P < 0.05$), lower pathological scores ($P < 0.05$), lower serum levels of AMY, TNF- α , IL-6 and MDA in pancreatic tissue (7809.5 ± 158.3 vs 8967.5 ± 298.4 ; 79.80 ± 14.23 vs 103.98 ± 10.56 ; 467 ± 6.64 vs 548.57 ± 10.45 ; 29.1 ± 2.6 vs 35.6 ± 3.8 , all $P < 0.05$), and higher GSH and SOD in pancreatic tissue were observed in edaravone treatment group (8.7 ± 1.3 vs 7.2 ± 0.6 ; 114000 ± 27000 vs 7300 ± 1800 , both $P < 0.05$).

CONCLUSION: Edaravone can scavenge oxygen-derived free radicals, upgrade the contents of SOD and GSH in pancreatic tissue, decrease the serum levels of proinflammatory cytokines and, ameliorate the pathological lesions of pancreatic tissue in rats, and has a possibility of decreasing death rate.

Key Words: L-arginine; Severe acute pancreatitis; Edaravone; Mechanism

Gong P, Zhang Y, Song ZJ. Protective effects of edaravone on rats with severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(1): 31-35

摘要

目的: 探讨依达拉奉对L-精氨酸诱导的重症急性胰腺炎(SAP)大鼠的治疗作用及机制.

■背景资料

重症急性胰腺炎(SAP)起病急、进展快、病情凶险、死亡率很高,发病机制并不十分清楚,氧自由基对胰腺及胰外器官的损伤是各种病因所致的SAP共同发病环节,近年来抗氧化治疗受到重视.

■同行评议者

周国雄, 主任医师, 南通大学附属医院消化内科

■研发前沿

氧化应激在急性胰腺炎发病机制中的作用以及抗氧化治疗是当前研究的热点。依达拉奉是一种新型的自由基清除剂,大量基础和临床实验均证实它能够清除缺血性脑血管病的自由基,有保护大脑的作用,并且疗效确切,但他对SAP中氧化应激的作用未见报道。

方法: 将60只大鼠随机分为三组($n = 20$)。采用大鼠腹腔内分次注射大剂量L-精氨酸($2.5 \text{ g/kg} \times 2$, 间隔1 h)的方法制备SAP大鼠模型,治疗组大鼠腹腔内注射依达拉奉注射液 3 mg/kg , $\text{bid} \times 3 \text{ d}$ 。72 h后比较三组大鼠胰腺组织病理变化、腹水性状及量、血清淀粉酶(AMY)、TNF- α 、IL-6水平和胰腺组织丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、还原型谷胱甘肽(GSH)含量及预后。

结果: 72 h后,与对照组相比,SAP组出现典型的SAP病理形态改变,腹水量较多($5.16 \pm 1.52 \text{ vs } 0.50 \pm 0.10$, $P < 0.01$),且大鼠血清AMY、TNF- α 、IL-6及胰腺组织MDA均显著升高($8967.5 \pm 298.4 \text{ vs } 720.1 \pm 119.7$; $103.98 \pm 10.56 \text{ vs } 41.59 \pm 3.79$; $548.57 \pm 10.45 \text{ vs } 198.34 \pm 2.10$; $35.6 \pm 3.8 \text{ vs } 7.9 \pm 2.2$, 均 $P < 0.01$),胰腺组织抗氧化物质GSH、SOD明显降低($7.2 \pm 0.6 \text{ vs } 17.1 \pm 2.1$; $7300 \pm 1800 \text{ vs } 28400 \pm 2700$, 均 $P < 0.01$);与SAP组相比,治疗组胰腺组织病理损害减轻,腹水量减少($4.05 \pm 1.22 \text{ vs } 5.16 \pm 1.52$, $P < 0.05$),且组织病理评分较低($P < 0.05$),血清AMY、TNF- α 、IL-6及胰腺组织MDA明显降低($7809.5 \pm 158.3 \text{ vs } 8967.5 \pm 298.4$; $79.80 \pm 14.23 \text{ vs } 103.98 \pm 10.56$; $467 \pm 6.64 \text{ vs } 548.57 \pm 10.45$; $29.1 \pm 2.6 \text{ vs } 35.6 \pm 3.8$, 均 $P < 0.05$),胰腺组织GSH、SOD升高($8.7 \pm 1.3 \text{ vs } 7.2 \pm 0.6$; $114000 \pm 27000 \text{ vs } 7300 \pm 1800$, 均 $P < 0.05$)。

结论: 依达拉奉能清除氧自由基、提高胰腺组织抗氧化物质SOD和GSH含量,降低促炎细胞因子水平,可减轻胰腺组织的病理损害,并且有可能降低死亡率。

关键词: L-精氨酸; 重症急性胰腺炎; 依达拉奉; 作用机制

■相关报道

Roth *et al*认为氧化应激是由活性氧或活性氮大量产生或内源性抗氧化能力降低引起的;在各种危重病中,比如急性胰腺炎、脓毒症、创伤、烧伤、ARDS等,都存在氧化应激增强或抗氧化应激能力降低;活性氧或活性氮以前被认为是有害的,但他们还可以作为重要的信使分子参与基因调节,促进某些抑制炎症过程的细胞因子或黏附分子的合成。

龚平, 张戎, 宋政军. 依达拉奉对大鼠重症急性胰腺炎的保护作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(1): 31-35
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/31.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是胰腺内部及周边发生炎症和坏死,常并发多脏器功能衰竭,病情凶险,死亡率很高^[1-2]。其发病机制目前尚不完全清楚,但氧自由基对胰腺及胰外器官的损伤是各种病因所致的SAP的共同发病环节。依达拉奉(edaravone)是一种新型的自由基清除剂,临床上已经广泛用于改善缺血性脑损害,研究证实它具有独特的清除自由基、抑制脂质过氧化,减轻缺血再灌注的作用,

能抑制大脑的血管内皮细胞和神经细胞的过氧化作用^[3-5],但在重症胰腺炎中的作用尚未见报道。本实验旨在探索依达拉奉对SAP大鼠氧化应激的影响,为临床治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 SOD、MDA测定试剂盒,南京建成生物工程研究所; L-精氨酸,美国Sigma公司,使用时用生理盐水配成浓度为 200 g/L 的溶液; 大鼠IL-6及TNF- α ELISA试剂盒,武汉博士德公司; 依达拉奉注射液,南京先声东元制药有限公司。健康成年SD大鼠60只,体质量 $240-300 \text{ g}$,雌雄不限,由大连医科大学实验动物中心提供。将大鼠随机分为3组,即对照组、SAP组、依达拉奉治疗组(治疗组),每组20只。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备: 实验前后大鼠自由进食饮水。SAP组和治疗组大鼠分2次间隔1 h ip 200 g/L L-精氨酸溶液($2.5 \text{ g/kg} \times 2$)^[6-7]; 对照组同法注射等量生理盐水。

1.2.2 给药剂量及方式: 从首次ip 200 g/L L-精氨酸溶液前30 min开始,治疗组大鼠ip依达拉奉注射液 3 mg/kg , 2次/d,连续3 d^[8],其余两组同法予等量生理盐水。

1.2.3 主要检测指标及方法: (1)72 h后,每组大鼠用注射器刺入心脏采血 $4-8 \text{ mL}$,不加抗凝剂,血凝后 4°C 下 3000 r/min 离心10 min,取血清 $1.5-3 \text{ mL}$, -8°C 保存。ELISA法检测TNF- α 、IL-6;全自动生化仪检测AMY; (2)采血后大鼠立即断颈致死、剖腹,观察腹水性状及量(用注射器吸引腹水并收集于试管中)、胰腺外观,并立即在胰头、胰体、胰尾各取1块组织,加入预冷的生理盐水,在冰上碾成匀浆,离心取上清液,采用硫代巴比妥酸比色分析法测定MDA含量,黄嘌呤氧化酶法检测SOD活性,具体操作均严格按试剂盒说明书进行。 (3)组织病理学观察:大鼠处死后,另取胰腺组织,在 100 g/L 甲醛中固定,石蜡包埋切片,苏木精/伊红(HE)染色,光镜下观察,并按照Kusske方法^[9]根据水肿、炎症、出血、坏死程度不同分0-4分进行双盲法胰腺组织病理评分。

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件处理数据,计量资料以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,组间比较用 t 检验;计数资料用Fisher确切概率法检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胰腺的病理形态改变及评分

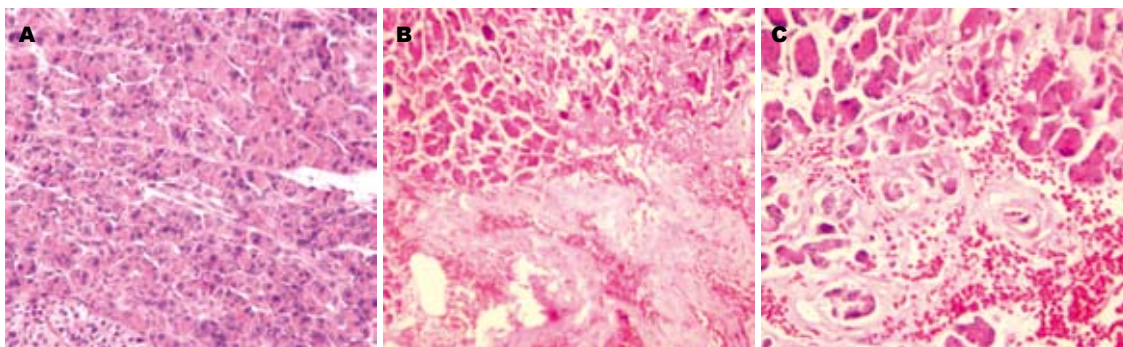


图 1 各组胰腺组织病理切片. A: 对照组(HE × 100); B: SAP组(HE × 200); C: 治疗组(HE × 200).

■ 创新盘点

本研究发现依达拉奉能清除由L-精氨酸诱导的大鼠SAP产生的氧自由基、提高胰腺组织抗氧化物质SOD和GSH含量,降低促炎细胞因子水平,减轻胰腺组织的病理损害,并有可能降低死亡率。

表 1 各组大鼠腹水量的比较 (mean ± SD)

	对照组	SAP组	治疗组
n	20	17	19
腹水量(mL)	0.50 ± 0.10	5.16 ± 1.52 ^b	4.05 ± 1.22 ^c

^bP<0.01 vs 对照组; ^cP<0.05 vs SAP组.

2.2.1 大体观察: 剖腹后, 对照组见少量清亮腹水, SAP组、治疗组均见淡红色腹水, 而治疗组腹水量较SAP组少(P<0.05, 表1). 对照组胰腺外观未见异常; SAP组和治疗组胰腺均可见明显充血水肿、坏死、胰周脂肪皂化, 治疗组程度较轻.

2.1.2 组织病理学变化: 对照组胰腺结构正常(图1A); SAP组大鼠胰腺分叶结构模糊, 大片腺泡细胞坏死和广泛炎细胞浸润, 间质水肿明显, 血管充血、出血, 并可见脂肪坏死(图1B); 治疗组上述改变较SAP组减轻(图1C).

2.1.3 组织病理评分: SAP组和治疗组4项评分均高于对照组(P<0.01); 治疗组4项评分均低于SAP组(P<0.05, 表2).

2.2 各组大鼠血清AMY、TNF-α、IL-6及胰腺组织MDA、SOD、GSH的检测结果 72 h后, SAP组和治疗组大鼠AMY、MDA、TNF-α、IL-6均显著高于对照组(P<0.01), SOD和GSH明显低于对照组(P<0.01); 但与SAP组比较, 治疗组大鼠AMY、MDA、TNF-α、IL-6均明显降低(P<0.05), SOD、GSH升高(P<0.05, 表3).

2.3 预后 在72 h内, SAP组大鼠死亡3只, 治疗组死亡1只, 对照组无死亡. 各组大鼠72 h死亡率: 对照组为0(0/20), SAP组15%(3/20), 治疗组5%(1/20), 提示治疗组死亡率低于SAP组, 但差异无统计学意义(P = 0.25).

3 讨论

目前已发现炎性介质、微循环障碍等因素参与

了SAP的发生发展^[10-15], 尤其是胰腺微循环障碍和缺血-再灌注损伤导致的氧自由基损害在SAP的进展中具有重要的作用^[16-19]. 氧自由基与SAP的发病以及胰外脏器损伤关系密切, 早期胰腺细胞损伤可导致胰腺腺泡细胞胰酶的激活, 诱发局部炎症反应, 引起炎症细胞释放大量的活性氧(reactive oxygen species, ROS)及炎性介质等, 氧化应激还与炎性介质发挥协同作用, 触发共同的信号传导通路, 主要通过促细胞丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和激活NF-KB等, 导致了炎症的级联扩增, 引起SIRS和MODS^[20-22]. 大量的氧自由基还直接损害蛋白质、核酸、脂质和多糖等大分子, 导致胰腺水肿、出血和组织变性、坏死. GSH、抗氧化酶SOD和脂质过氧化反应产物MDA含量可反映自由基水平^[23-24].

大鼠腹腔内注射大剂量L-精氨酸是一种非侵入性的建立SAP实验模型方法, 已经在国内外广泛使用. 单次注射大剂量L-精氨酸(5 g/kg), 大鼠死亡率高, 而分次腹腔内注射大剂量L-精氨酸(2.5 g/kg × 2, 间隔1 h)建立的SAP模型比较理想^[6-7]. 本实验中我们观察到腹腔内分次注射大剂量L-精氨酸72 h后出现典型的SAP病理形态及病理生理改变, 与对照组相比, 胰腺明显出血、坏死, 出现较多的血性腹水(P<0.01); 血清AMY、促炎细胞因子TNF-α和IL-6, 以及胰腺组织脂质过氧化反应产物MDA均显著升高(P<0.01), 而胰腺组织抗氧化物质GSH、SOD明显降低(P<0.01).

依达拉奉化学名为3-甲基-1-苯基-2-吡啶啉-5-酮, 是目前临床上广泛使用的一种新型自由基清除剂^[3-5,25-31]. 本研究结果显示, 诱发SAP 72 h后, 与SAP组相比, 达拉奉治疗组大鼠胰腺组织MDA明显降低(P<0.05), 抗氧化物质GSH、SOD升高(P<0.05); 血清AMY水平较低, 胰腺组织病理形态改变减轻, 腹水量减少(P<0.05), 组织病

■ 应用要点

该动物实验证实SAP时氧自由基大量产生, 而抗氧化应激能力明显不足, 依达拉奉能清除SAP大鼠的氧自由基、提高胰腺组织抗氧化物质的含量, 对大鼠SAP具有保护作用, 为其临床应用提供了理论依据, 但临床疗效需要进一步验证。

■名词解释

活性氧(ROS): 是指一组含有化学性质活泼的含氧功能基团的化合物, 包括含氧自由基、氢过氧化物、脂质过氧化物等。

表 2 各组大鼠胰腺组织病理评分 (mean ± SD)

分组	n	水肿	炎症	出血	坏死
对照组	20	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
SAP组	17	3.14 ± 0.52 ^b	3.19 ± 0.57 ^b	2.28 ± 0.39 ^b	2.62 ± 0.52 ^b
治疗组	19	2.68 ± 0.38 ^{bc}	2.81 ± 0.36 ^{bc}	1.79 ± 0.26 ^{bc}	2.09 ± 0.33 ^{bc}

^bP<0.01 vs 对照组; ^cP<0.05 vs SAP组。

表 3 各组大鼠血清AMY、TNF-α、IL-6及胰腺组织MDA、SOD、GSH的比较 (mean ± SD)

指标	对照组 (n = 20)	SAP组 (n = 17)	治疗组 (n = 19)
AMY(IU/L)	720.1 ± 119.7	8967.5 ± 298.4 ^a	7809.5 ± 158.3 ^{ab}
MDA(mol/kg)	7.9 ± 2.2	35.6 ± 3.8 ^a	29.1 ± 2.6 ^{ab}
SOD(kU/kg)	28400 ± 2700	7300 ± 1800 ^a	11400 ± 2700 ^{ab}
GSH(mg/kg)	17.1 ± 2.1	7.2 ± 0.6 ^a	8.7 ± 1.3 ^{ab}
TNF-α(ng/L)	41.59 ± 3.79	103.98 ± 10.56 ^a	79.80 ± 14.23 ^{ab}
IL-6(ng/L)	198.34 ± 2.10	548.57 ± 10.45 ^a	467.00 ± 6.64 ^{ab}

^bP<0.01 vs 对照组; ^cP<0.05 vs SAP组。

理评分较低($P<0.05$)。另外还发现, 促炎细胞因子TNF-α和IL-6也明显下降($P<0.05$)。这提示SAP时自由基大量产生, 清除氧自由基的能力明显不足, 而依达拉奉能清除氧自由基, 相应地提高抗氧化物质水平, 同时可降低促炎细胞因子水平, 减轻胰腺的病理损害。但是其上游调控机制并不清楚, 我们将在以后的实验中进一步研究。在本实验中还发现经依达拉奉治疗的大鼠死亡率低于未治疗的SAP组, 但差异无统计学意义($P=0.25$), 这可能受样本量小和观察时间短的影响。

总之, SAP时氧自由基大量产生, 而抗氧化应激能力明显不足, 依达拉奉能清除氧自由基、提高胰腺组织抗氧化物质SOD和GSH的含量, 降低促炎细胞因子水平, 减轻胰腺组织的病理损害, 并且有可能降低死亡率, 但是其临床效果需要进一步验证。

4 参考文献

- Fu CY, Yeh CN, Hsu JT, Jan YY, Hwang TL. Timing of mortality in severe acute pancreatitis: experience from 643 patients. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1966-1969
- Kong L, Santiago N, Han TQ, Zhang SD. Clinical characteristics and prognostic factors of severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3336-3338
- Yoshida H, Yanai H, Namiki Y, Fukatsu-Sasaki K, Furutani N, Tada N. Neuroprotective effects of edaravone: a novel free radical scavenger in cerebrovascular injury. *CNS Drug Rev* 2006; 12: 9-20
- Watanabe T, Tahara M, Todo S. The novel antioxidant edaravone: from bench to bedside. *Cardiovasc Ther* 2008; 26: 101-114
- Watanabe T, Tanaka M, Watanabe K, Takamatsu Y, Tobe A. [Research and development of the free radical scavenger edaravone as a neuroprotectant] *Yakugaku Zasshi* 2004; 124: 99-111
- Hegyí P, Rakonczay Z Jr, Sári R, Góg C, Lonovics J, Takács T, Czakó L. L-arginine-induced experimental pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2003-2009
- 尚宏清, 李非, 张再兴, 孙家邦. 分次大剂量L-精氨酸腹腔内注射致大鼠急性坏死性胰腺炎模型的研究. *首都医科大学学报* 2000; 21: 322-324
- Song Y, Gong YY, Xie ZG, Li CH, Gu Q, Wu XW. Edaravone (MCI-186), a free radical scavenger, attenuates retinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2008; 29: 823-828
- Kusske AM, Rongione AJ, Ashley SW, McFadden DW, Reber HA. Interleukin-10 prevents death in lethal necrotizing pancreatitis in mice. *Surgery* 1996; 120: 284-288; discussion 289
- 崔培林, 修瑞娟. 微循环障碍与急性胰腺炎. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2853-2855
- 张喜平, 李志军. 改善微循环障碍药物在治疗急性胰腺炎中的应用. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1867-1871
- Panek J, Zasada J, Poźniczek M. [Microcirculatory disturbance in the course of acute pancreatitis] *Przegl Lek* 2007; 64: 435-437
- Schneider L, Pietschmann M, Hartwig W, Marcos SS, Hackert T, Gebhard MM, Uhl W, Büchler MW, Werner J. Inosine reduces microcirculatory disturbance and inflammatory organ damage in experimental acute pancreatitis in rats. *Am J Surg* 2006; 191: 510-514
- Liu XM, Liu QG, Xu J, Pan CE. Microcirculation disturbance affects rats with acute severe pancreatitis following lung injury. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6208-6211
- Cuthbertson CM, Christophi C. Disturbances of the microcirculation in acute pancreatitis. *Br J Surg* 2006; 93: 518-530
- Park BK, Chung JB, Lee JH, Suh JH, Park SW, Song SY, Kim H, Kim KH, Kang JK. Role of oxygen free radicals in patients with acute pancreatitis. *World J*

- Gastroenterol* 2003; 9: 2266-2269
- 17 Tadao M, Yuji O. [Role of free radicals in the development of severe acute pancreatitis] *Nippon Rinsho* 2004; 62: 2015-2020
- 18 Brankov O, Shivachev Kh, Drebov R, Dumanov K. [Clinical manifestation of acute pancreatitis in children with caustic ingestion injury - the role of oxidative stress] *Khirurgiia (Sofia)* 2007; : 5-8
- 19 Shi C, Andersson R, Zhao X, Wang X. Potential role of reactive oxygen species in pancreatitis-associated multiple organ dysfunction. *Pancreatology* 2005; 5: 492-500
- 20 王艳红, 冯志杰, 郝晓. 急性胰腺炎与氧化应激. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1266-1272
- 21 Shi C, Zhao X, Wang X, Andersson R. Role of nuclear factor-kappaB, reactive oxygen species and cellular signaling in the early phase of acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 103-108
- 22 Roth E, Manhart N, Wessner B. Assessing the antioxidative status in critically ill patients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004; 7: 161-168
- 23 Abu-Hilal M, McPhail MJ, Marchand L, Johnson CD. Malondialdehyde and superoxide dismutase as potential markers of severity in acute pancreatitis. *JOP* 2006; 7: 185-192
- 24 Modzelewski B, Janiak A. [Lipid peroxidation product as prognostic factors in acute necrotizing pancreatitis] *Pol Merkur Lekarski* 2005; 19: 511-513
- 25 Higashi Y, Jitsuiki D, Chayama K, Yoshizumi M. Edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one), a novel free radical scavenger, for treatment of cardiovascular diseases. *Recent Patents Cardiovasc Drug Discov* 2006; 1: 85-93
- 26 Takumida M, Takeda T, Takeda S, Kakigi A, Nakatani H, Anniko M. Protective effect of edaravone against endolymphatic hydrops. *Acta Otolaryngol* 2007; 127: 1124-1131
- 27 Sumitomo K, Shishido N, Aizawa H, Hasebe N, Kikuchi K, Nakamura M. Effects of MCI-186 upon neutrophil-derived active oxygens. *Redox Rep* 2007; 12: 189-194
- 28 Dohi K, Satoh K, Nakamachi T, Yofu S, Hiratsuka K, Nakamura S, Ohtaki H, Yoshikawa T, Shioda S, Aruga T. Does edaravone (MCI-186) act as an antioxidant and a neuroprotector in experimental traumatic brain injury? *Antioxid Redox Signal* 2007; 9: 281-287
- 29 Akao T, Takeyoshi I, Totsuka O, Arakawa K, Muraoka M, Kobayashi K, Konno K, Matsumoto K, Morishita Y. Effect of the free radical scavenger MCI-186 on pulmonary ischemia-reperfusion injury in dogs. *J Heart Lung Transplant* 2006; 25: 965-971
- 30 Rao P, Maeda H, Yutong X, Yamamoto M, Hirose N, Sasaguri S. Protective effect of a radical scavenger, MCI-186 on islet cell damages induced by oxidative stress. *Transplant Proc* 2005; 37: 3457-3458
- 31 Iguchi T, Nishikawa M, Chang B, Muroya O, Sato EF, Nakatani T, Inoue M. Edaravone inhibits acute renal injury and cyst formation in cisplatin-treated rat kidney. *Free Radic Res* 2004; 38: 333-341

■同行评价

本文探讨依达拉奉对L-精氨酸诱导的重症急性胰腺炎大鼠的治疗作用及机制, 设计较科学, 数据可靠, 统计正确, 结果有一定的可靠性, 具有较好的临床参考价值。

编辑 史景红 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

**WJG 荣获 2007 年 “中国百种杰出学术期刊”
和 2008 年中国国际化精品科技期刊**

本刊讯 由中国科学技术信息研究所主办的中国科技论文统计结果发布会于2008-12-09在北京国际会议中心召开, 世界胃肠病学主编马连生和编辑部主任程剑侠参加此项发布会. 本会议介绍了中国精品科技期刊服务与保障系统, 中国科技论文研究项目进展及精品科技期刊遴选, 百篇最具影响学术论文评选, 世界科技产出趋势和利用科学计量学工具分析领域发展趋势以及发布了中国科技论文统计结果. 根据2007年度中国科技论文与引文数据库(CSTPCD2007)统计结果, WJG荣获2007年度“中国百种杰出学术期刊”称号, 同时被选入2008年中国国际化精品科技期刊, 中国精品科技期刊包括23种中国国际化精品期刊和301种中国精品科技期刊.(编辑:程剑侠 2009-01-08)

不同分子量壳寡糖对促胰岛细胞增殖、胰岛素分泌及调节餐后血糖的作用

刘冰, 秦贞奎, 林祥梅, 梅琳, 刘万顺, 韩宝芹

■背景资料

壳寡糖是壳聚糖的降解产物, 分子量小, 溶于水, 可被人体、动物及植物机体吸收利用。壳寡糖作为功能性食品具有提高机体免疫、抗肿瘤、调节血脂、抗感染、防治病原生物感染、促进双歧杆菌生长等功能, 尤其是在糖尿病的防治研究方面有潜在的应用价值。

刘冰, 秦贞奎, 林祥梅, 梅琳, 中国检验检疫科学研究院 北京市 100025

刘万顺, 韩宝芹, 中国海洋大学生命学院 山东省青岛市 266003

刘冰, 2007年中国海洋大学博士, 主要从事寡糖的活性研究。

国家科研院所基本科研业务费资助项目, No. 2008JK007

作者贡献分布: 刘冰与刘万顺对此文所作贡献均等; 此课题由刘冰, 秦贞奎及刘万顺设计; 研究过程由林祥梅, 梅琳及韩宝芹操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由韩宝芹提供; 数据分析由刘冰与梅琳完成; 本论文写作由刘冰, 秦贞奎及刘万顺完成。

通讯作者: 刘冰, 100025, 北京市朝阳区双桥中路, 中国检验检疫科学研究院。Iceicecream1221@126.com

电话: 010-85399005

收稿日期: 2008-10-10 修回日期: 2008-11-28

接受日期: 2008-12-01 在线出版日期: 2009-01-08

Antidiabetic effects of chitooligosaccharides with different molecular weights on pancreatic islet cells in streptozotocin-induced diabetic rats

Bing Liu, Zhen-Kui Qin, Xiang-Mei Lin, Lin Mei, Wan-Shun Liu, Bao-Qin Han

Bing Liu, Zhen-Kui Qin, Xiang-Mei Lin, Lin Mei, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025, China

Wan-Shun Liu, Bao-Qin Han, College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Supported by: the National Scientific Research-related Foundation of China, No. 2008JK007

Correspondence to: Bing Liu, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025, China. iceicecream1221@126.com

Received: 2008-10-10 Revised: 2008-11-28

Accepted: 2008-12-01 Published online: 2009-01-08

Abstract

AIM: To estimate effects of varying molecular chitooligosaccharides prepared by enzymatic hydrolysis on the proliferation of pancreatic islet cells, and to investigate the release of insulin and 2 h plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats.

METHODS: Chitooligosaccharides were prepared by enzymatic hydrolysis. The effects of varying molecular chitooligosaccharides on pro-

liferation of pancreatic islet cells and the release of insulin in vitro were detected using optical microscopy, MTT colorimetric assay and radioimmunoassay methods respectively; the general clinical symptoms, 2 h plasma glucose and oral glucose tolerance were examined to determine the effects of chitooligosaccharides on diabetic rats induced by streptozotocin.

RESULTS: The results indicated that chitooligosaccharides markedly accelerated the proliferation of the pancreatic β cells. Chitooligosaccharides had prominent effects on insulin release. Lower molecular chitooligosaccharides improved general clinical symptoms of DM rats, decreased the 2 h plasma glucose levels (22.13 ± 3.23 , 21.78 ± 3.09 , 21.32 ± 3.02 , 19.73 ± 4.12 , 17.88 ± 3.14 , 16.14 ± 3.55 vs 39.38 ± 3.08 , all $P < 0.01$) and improved glucose tolerance (101.19 ± 12.44 , 99.61 ± 13.11 , 96.79 ± 9.22 , 94.79 ± 13.20 , 89.41 ± 11.10 , 84.08 ± 5.93 vs 122.40 ± 12.05 , $P < 0.05$ or 0.01). 2-14 d culture of each group of islet cell biology activity was active with good response to glucose stimulation. In MVI group, significant difference was observed in insulin stimulation index compared with the control group (2.94 vs 2.01 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: Chitooligosaccharides possess various biological activities and can be used in the treatment of diabetes mellitus. The lower molecular chitooligosaccharide has better effect.

Key Words: Chitooligosaccharides; Diabetes mellitus; Plasma glucose; Oral glucose tolerance test; Pancreatic islet cells; Streptozotocin

Liu B, Qin ZK, Lin XM, Mei L, Liu WS, Han BQ. Antidiabetic effects of chitooligosaccharides with different molecular weights on pancreatic islet cells in streptozotocin-induced diabetic rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(1): 36-42

摘要

目的: 研究酶解法制备的不同分子量壳寡糖对胰岛 β 细胞系NIT-1的促增殖及胰岛素分泌

■同行评议者

吴健雄, 教授, 中国医学科学院, 中国协和医科大学肿瘤医院腹部外科; 曹志成, 英国生物医学科学研究所院士, 伊利沙伯医院临床肿瘤科

作用, 并进一步探讨在体内壳寡糖降低链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠的餐后2 h血糖的作用。

方法: 通过壳聚糖酶降解壳聚糖制备得到水溶性的不同分子量的壳寡糖, 在细胞水平上, 通过形态学观察、MTT比色法、放射免疫等方法研究不同分子量的壳寡糖对于胰岛β细胞系NIT-1细胞的增殖及促胰岛素分泌作用; 体内实验, 通过一般状态观察、餐后2 h血糖、尿糖、糖耐量测定研究了不同分子量壳寡糖对链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠降低餐后2 h血糖和改善葡萄糖耐量的作用。

结果: 不同分子量壳寡糖对于胰岛β细胞体外增殖具有明显的促进作用并可以显著促进胰岛β细胞的胰岛素分泌, 低分子量壳寡糖在体内能有效改善糖尿病大鼠的体重减轻、多饮、多食等症状, 降低餐后2 h血糖值(22.13 ± 3.23 , 21.78 ± 3.09 , 21.32 ± 3.02 , 19.73 ± 4.12 , 17.88 ± 3.14 , 16.14 ± 3.55 vs 39.38 ± 3.08 , 均 $P < 0.01$), 改善葡萄糖耐量(101.19 ± 12.44 , 99.61 ± 13.11 , 96.79 ± 9.22 , 94.79 ± 13.20 , 89.41 ± 11.10 , 84.08 ± 5.93 vs 122.40 ± 12.05 , $P < 0.05$ 或 0.01)。各组培养2-14 d的胰岛细胞的生物学活性活跃, 对葡萄糖刺激具有良好反应, 其中MVI组的胰岛素刺激指数与对照组比较有显著差异(2.94 vs 2.01 , $P < 0.05$)。

结论: 壳寡糖具有多种生物活性, 可以应用于糖尿病的治疗, 低分子量壳寡糖有较好的降血糖效果。

关键词: 壳寡糖; 糖尿病; 血糖; 糖耐量试验; 胰岛细胞; 链脲佐菌素

刘冰, 秦贞奎, 林祥梅, 梅琳, 刘万顺, 韩玉芹. 不同分子量壳寡糖对促胰岛细胞增殖、胰岛素分泌及调节餐后血糖的作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(1): 36-42

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/36.asp>

0 引言

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是一种常见的内分泌代谢病^[1], 具有遗传倾向, 是由于胰岛素绝对或相对不足所致的血糖及尿糖增高为主要特征的并导致糖、蛋白和脂肪代谢障碍全身慢性代谢异常, 常伴发心脑血管、肾、眼及神经等多种并发症, 危害性大. 据WHO报告, 糖尿病已成为世界上继恶性肿瘤、心脑血管病后第3位严重威胁人类健康的慢性非传染性疾病^[2]. 壳寡糖(chitooligosaccharides, COS)是壳聚糖的降解产物, 分子量小, 溶于水, 可被人体、动物及植物

机体吸收利用. 研究发现, 壳寡糖不仅具有和壳聚糖一些相似的性质, 而且一些生理活性或功能性质更加显著, 如提高机体免疫、抗肿瘤、降血脂、抗感染、防治病原生物感染、作为植物调节物质, 作为促进双歧杆菌生长因子的研究等^[3-7]. 其降血糖作用国内外已有报道, 但具体到什么分子量范畴的壳寡糖其降血糖作用最显著, 尚未见报道. 本实验以转基因小鼠的胰岛β细胞系NIT-1细胞株为研究对象, 从细胞水平研究了不同分子量壳寡糖促胰岛β细胞增殖和胰岛素分泌的作用. 并以全δ Wistar大鼠为实验动物, 对链脲佐菌素诱导的DM大鼠定量ig壳寡糖水溶液, 对其60 d内餐后2 h血糖, 60 d后葡萄糖耐量的改变状况作了一些初步探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 壳寡糖(COS, Mw分别为1200、3210、4321、5101、7681、9987 Da, 分别以MI、MII、MIII、MIV、MV、MVI表示)由本实验室制备, 其用于细胞培养时使用相应培养基溶解, 0.22 μm过滤除菌, 并稀释到相应浓度; NIT-1细胞株(转基因小鼠胰岛β细胞系)由中国海洋大学药物所提供; 封闭群纯系δ Wistar大鼠60只(200 ± 20 g, 二级标准)购自青岛市立医院动物试验中心, 批号: SCXK(鲁)20030010. 主要试剂: 胰岛素放射免疫分析测试盒(北京原子能研究所); MTT(美国Sigma公司); 盐酸二甲双胍(北京中会药业); 链脲佐菌素(STZ, 美国Sigma公司); 血糖测定试剂盒(南京建成科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 不同分子量COS的制备和纯化及其理化性质测定: 壳聚糖溶液加入壳聚糖酶, 于40℃在pH5.6条件下水解反应, 每隔一定时间取出部分酶解液, 加入三氯乙酸后离心除蛋白, 上清液加入10倍体积的无水乙醇中, 离心取沉淀, 无水乙醇洗3次, 40℃真空干燥得不同分子量COS粗品. 称取适量COS样品, 溶解于三蒸水中, Sephacryl S-100分离纯化, 收集主峰后冷冻干燥, 得到寡糖纯品测定其分子量, 脱乙酰度等理化性质, TSK-GEL G3 000PWXL柱分析纯度。

1.2.2 不同分子量COS在体外促胰岛β细胞增殖及胰岛素分泌的作用: (1)不同分子量COS对胰岛β细胞株的促增殖作用. 胰岛β细胞株NIT-1用含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液培养, 在培养瓶中长满至单层后, 2.5 g/L胰蛋白酶消化, 制成单细胞悬液, 以 $5.0 \times 10^7/L$ 的浓度

■ 研发前沿

研究发现, 分子量小于10000 Da的壳寡糖具有许多良好的生理活性, 但具体到什么分子量范畴的壳寡糖其降血糖作用最显著, 国内外尚未见报道。

■ 相关报道

乔新惠 *et al* 报道, 壳寡糖可使58%的非肥胖性糖尿病小鼠血糖明显降低, 42%的非肥胖性小鼠血糖降低虽不显著, 但可维持生命, 而对照组小鼠陆续死亡, 证明壳寡糖对非肥胖性糖尿病小鼠确有治疗作用, 可预防高血糖过早出现。任林 *et al* 报道, 壳寡糖对链脲佐菌素糖尿病小鼠有治疗作用, 服用壳寡糖21 d后小鼠血糖得以控制, 且肠道双歧杆菌数量明显增多。李邦良 *et al* 首次发现壳寡糖能抑制 α -葡萄糖苷酶的催化活性, 延长酶作用于底物的时间, 延缓葡萄糖的释放, 有类似阿卡波糖样的作用, 即在小肠中起抑制 α -葡萄糖苷酶类的作用。

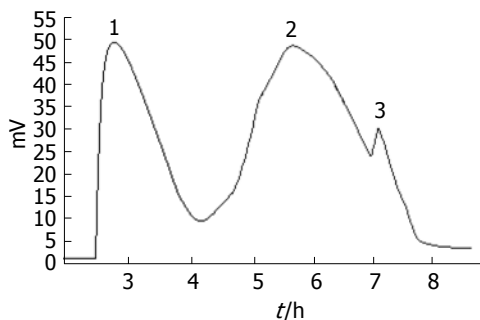


图1 Sephadex G-25柱分离酶解产物壳寡糖。

接种于96孔板中, 每孔加100 μ L, 并设不含细胞的空白调零孔, 在50 mL/L CO₂, 37°C, 饱和湿度的恒温培养箱中培养24 h后, 吸弃原培养液, 换成每孔100 μ L无血清培养液, 同步化24 h。之后换成含不同浓度COS的培养液(10、100、1000 mg/L), 每个浓度设置3个平行孔, 培养48 h后倒置显微镜100倍下拍片观察。然后每孔加入浓度为5 mg/L的MTT 20 μ L, 常规孵育4 h。吸弃培养液, 每孔加入100 μ L二甲基亚砷(DMSO), 震荡10 min, 使结晶物溶解充分均匀, 用酶标仪492 nm处比色, 测其各自的A值, 计算细胞增殖率(proliferation rate, PR), 实验结果重复3次。

胰岛 β 细胞接种于96孔板方法同上, 同时实验组加入最适浓度不同分子质量COS的培养液后, 在50 mL/L CO₂, 37°C, 饱和湿度的恒温培养箱中培养, 并设加入不含样品的培养液作为对照组, 分别在加样后24、48、72、120、168和216 h取出, MTT法于酶标仪上492 nm测吸光度值(A值), 记录结果, 绘制细胞生长曲线。(2)不同分子质量COS对胰岛细胞的促胰岛素分泌作用。胰岛 β 细胞接种于24孔培养板中方法同上, 每孔加1.0 mL, 置50 mL/L CO₂, 37°C, 饱和湿度培养箱中培养, 24 h细胞贴壁后, 吸去培养板中的培养液, 实验组加入最适浓度不同分子质量COS的培养液, 并设不含样品的1640培养液作为对照组, 对照组和试验组均设5个平行孔, 分别在加样后2、4、6、8、10、12和14 d取出, 用放射免疫法测定培养液中的胰岛素含量, 记录结果, 绘制COS促胰岛素分泌作用曲线。同时在培养6 d后进行胰岛素刺激释放试验, 吸出培养基, 将培养细胞用Hank's液洗净, 先后置于含5.6 mmol/L, 16.7 mmol/L葡萄糖的培养液中, 37°C各孵育2 h, 取培养液的上清液测定胰岛素释放量, 并计算刺激指数(stimulative index, SI)。

1.2.3 不同分子质量COS在体内调节糖尿病大鼠餐后血糖及糖耐量的作用: 大鼠称质量并按65

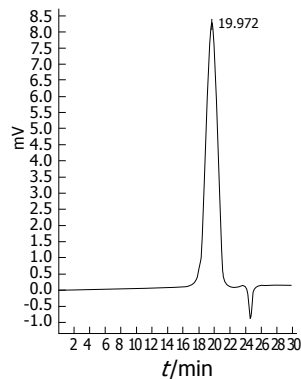


图2 壳寡糖的HPLC分析。

mg/kg ip链脲菌素溶液, 正常对照组注射等量的柠檬酸缓冲液。注射7 d后, 血糖>11.11 mmol/L者为成模标准。成模大鼠随机分组, 每组9只: 正常对照组(normal control)和阴性对照组(DM): 每日灌胃蒸馏水(10 mL/kg); 二甲双胍组(Met): 200 mg/(kg·d) ig大鼠; COS组(Mw分别为1200、3210、4321、5101、7681、9987 Da, 分别以M I、M II、M III、M IV、M V、M VI表示): 500 mg/(kg·d) ig大鼠。每10天采血1次, 葡萄糖氧化酶法测餐后2 h血糖值, 半定量试纸法测尿糖。60 d后, 大鼠灌胃葡萄糖水溶液(2.5 g/kg), 分别于给药后0.5、1、2 h眼眶后静脉丛采血, 描制血糖值随时间变化曲线。糖耐量曲线下面积(AUC) = 0.5 × 空腹血糖 + 0.5 h血糖 + 1.5 × 1 h血糖 + 2 h血糖。本研究动物实验经中国实验动物学会审核通过。

统计学处理 全部资料用mean ± SD表示, 采用SPSS11.0软件采用One-way ANOVA进行多组样本均数的比较, 组间比较采用Duncan's法, 显著性界值分别设定为0.05, 0.01。

2 结果

2.1 COS理化性质 COS粗品经Sephacryl S-100柱分离(图1), 收集峰1和峰2后冷冻干燥, 测定纯品为白色粉末, 易溶于水, 稀酸及稀碱溶液微溶于甲醇, 乙醇, 难溶于丙酮, 乙醚, 石油醚及氯仿等溶剂。水分含量10%, 灰分0.7%, 数均分子量分别为1200、3210、4321、5101、7681、9987 Da, 脱乙酰度90%, 重金属含量(以Pb计)6 mg/kg。TSK-GEL G3000PWXL色谱柱分析COS图谱(图2), Waters Breeze图形分析软件分析主峰面积占整个峰面积的99%。

2.2 不同分子质量COS对胰岛 β 细胞株的促增殖及胰岛素分泌的作用

2.2.1 不同分子质量COS对胰岛 β 细胞生长状态的影响: 经不同分子质量COS刺激生长48 h后, 继

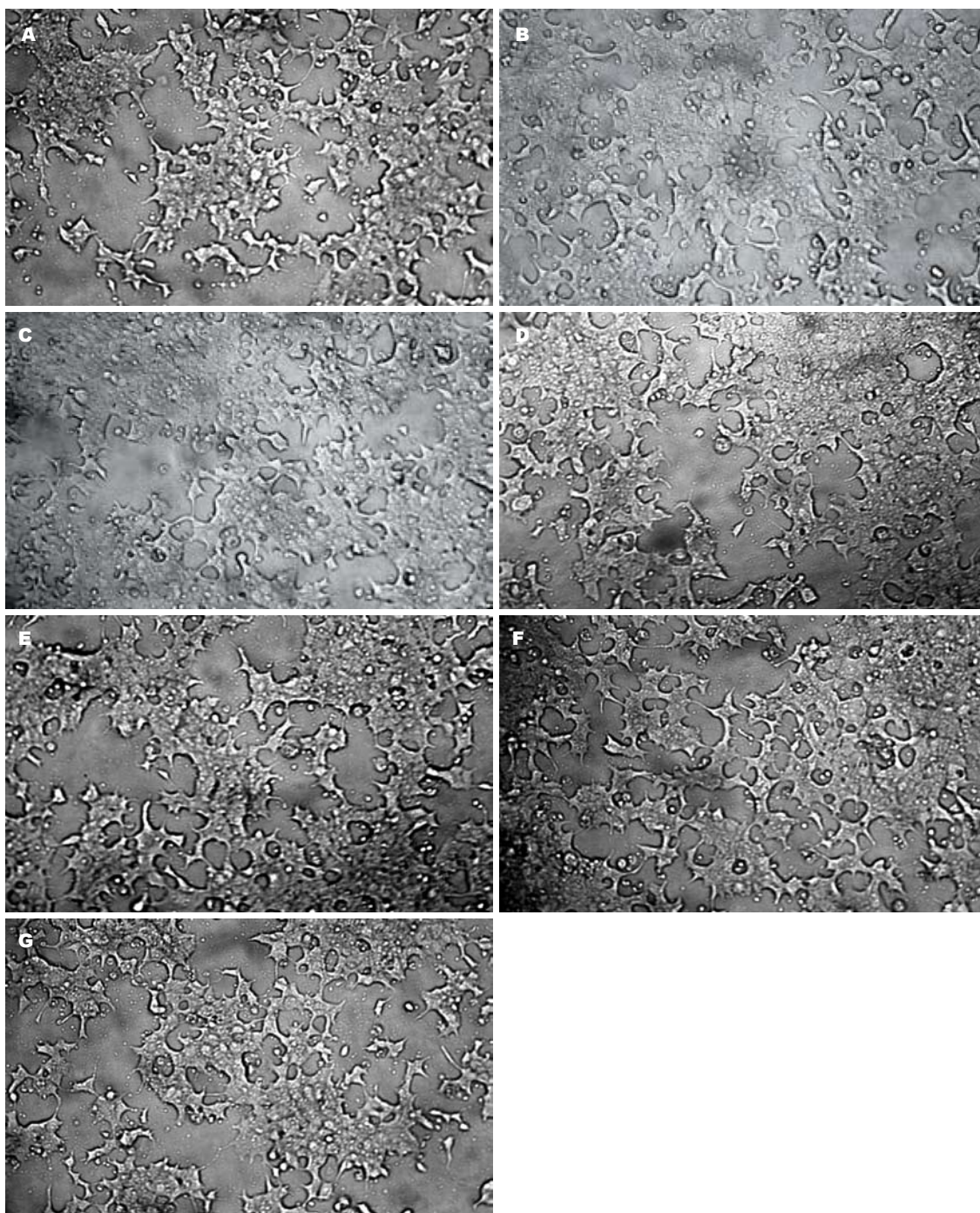


图 3 不同分子量COS对胰岛β细胞株的48 h促增殖作用(×100, 100 mg/L). A: 正常对照组; B: M I 处理组; C: M II 处理组; D: M III 处理组; E: M IV 处理组; F: M V 处理组; G: M VI 处理组.

■创新盘点

本研究用生物酶降解壳聚糖, 通过控制不同的酶解时间, 制备出了水溶性的不同分子量壳寡糖, 并通过细胞实验和动物实验, 从体内体外两个方面说明了分子质量的改变对壳寡糖降血糖功能改变的影响.

■应用要点

本研究评价了不同分子量壳寡糖对动物高血糖的调节功能作用, 为今后壳寡糖应用于糖尿病的研究提供了理论依据. 深入研究和探讨壳寡糖的降血糖机制, 将对糖尿病及其并发症的预防与治疗将会产生积极的意义.

表 1 不同分子量COS最适浓度对胰岛β细胞增殖率的影响 (100 mg/L)

	M I	M II	M III	M IV	M V	M VI
分子质量 (Da)	9987	7681	5101	4321	3210	1200
增殖率(%)	191.65	176.71	169.51	164.64	152.57	143.49

体透明、细胞及核膜界限清晰、状态良好, 其中大分子质量的COS M I 处理组作用最好(图3B).

2.2.2 MTT法检测不同分子量COS对胰岛β细胞的促增殖作用: 不同分子量COS对胰岛β细胞增殖作用的影响(图4, 表1). 由图4可以看出, 不同分子质量的COS对胰岛β细胞增殖作用的最适浓度均为100 mg/L, 随着分子质量的增大, 胰岛β细胞的相对增殖率也随之增大, 当COS分子质量为1200 Da, 细胞相对增殖率为143.49%;

续观察胰岛β细胞的生长状态, 发现细胞集落情况明显比对照组的密集(图3A)、胞质丰富、胞

■名词解释

1 壳寡糖(COS): 壳聚糖的降解产物, 分子量小, 溶于水, 可被人体、动物及植物机体吸收利用。

2 链脲佐菌素(STZ): 别名链脲菌素、链脲佐霉素, 是一种广谱抗菌素, 具有抗菌、抗肿瘤作用和致DM的不良反应。STZ对实验动物的胰岛 β 细胞具有高度选择性毒性作用, 是目前使用最广泛的DM动物模型化学诱导剂, 他可使多种动物如大鼠、小鼠、狗、猴、小羊、中国地鼠、豚鼠和兔等产生DM。

表 2 不同分子量COS对胰岛细胞刺激指数的作用 (100 mg/L)

	对照组	M I	M II	M III	M IV	M V	M VI
分子量(Da)	-	9987	7681	5101	4321	3210	1200
刺激指数(SI)	2.01	2.17	2.26	2.51 ^a	2.64 ^a	2.75 ^a	2.94 ^a

^a $P < 0.05$ vs 对照组。

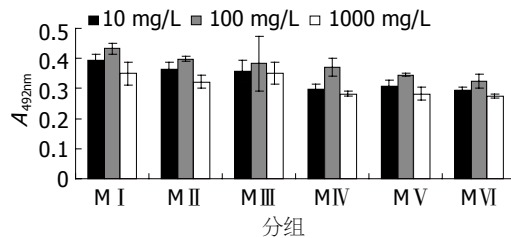


图 4 不同分子量COS对胰岛 β 细胞增殖的影响。

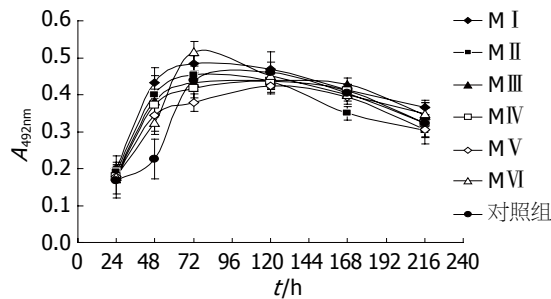


图 5 不同分子量COS对胰岛 β 细胞一代生长期的影响 (100 mg/L)。

而当细胞COS分子量增大至9987 Da, 细胞相对增殖率也增大为191.65%。

2.2.3 不同分子量COS对胰岛 β 细胞一代生长期的影响: MTT结果显示, 100 mg/L的不同分子量COS均可以显著促进胰岛 β 细胞的生长, 缩短潜伏期及对数生长期的时间, 72 h细胞密度即可达到最大, 到达平台期, 对照组要延迟48 h才能长满孔到达平台期且细胞活力低; 低分子质量的COS MVI组(Mw = 1200 Da), 在一代生长期可以显著促进胰岛细胞的生长, 72 h细胞密度达到最大, 活力高于其他组(图5)。

2.2.4 不同分子量COS对胰岛细胞的促胰岛素分泌作用: 6 d以后实验组与对照组相比较, 胰岛素释放量逐渐增高。在第10天时, 实验组与对照组差异最为明显, 试验结果显示, 随着分子质量的减小, 胰岛素释放量随之增大, COS分子质量为1200 Da的MVI组的促胰岛素分泌作用显著(图6)。培养第6天的胰岛细胞葡萄糖刺激实验显示, 16.7 mmol/L葡萄糖孵育的各组胰岛细胞, 其胰岛素释放量均大于2.8 mmol/L葡萄糖孵育的

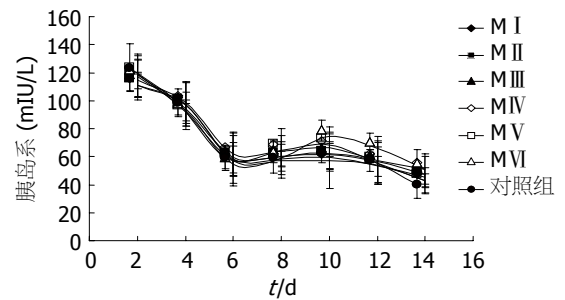


图 6 不同分子量COS对胰岛细胞的促胰岛素分泌作用。

各组胰岛细胞2.0倍以上。说明各组培养2-14 d的胰岛细胞生物学活性是活跃的, 对葡萄糖刺激具有良好反应。其中COS分子质量为1200 Da的MVI组, 胰岛素刺激指数为2.94倍, 与对照组2.01倍比较有显著差异($P < 0.05$, 表2)。

2.3 不同分子量COS对DM大鼠餐后2 h血糖及糖耐量的影响 从60 d前餐后2 h血糖变化上(表3), 可见不同分子质量的COS对2hPG均有不同程度的降低, 与阴性对照组比较有极显著差异($P < 0.01$)。随着分子质量的减小COS降糖率增加, COS MVI组的降血糖效果最好, 可使血糖降至16.14 mmol/L, 降糖率为47.48%。各试验组的葡萄糖糖耐量均有不同程度受损, 以阴性对照组(DM)组的糖耐量曲线下面积为100%, 则正常组糖耐量曲线下面积只占其17.69%, COS MVI组为68.69%, COS各组与阴性对照组比较均有显著差异。

3 讨论

COS是一种水溶性低聚糖类, 是壳聚糖经化学或酶降解后的产物, 具有良好的水溶性和独特的生理生化活性, 因而在医药、食品、化工及农业等领域具有广阔的应用前景^[8-10]。目前制备式生产COS的方法主要有化学降解法、物理降解法和生物酶降解法。化学降解法可以通过酸水解(盐酸、乙酸、磷酸、氢氟酸等)、氧化(过氧化氢、过硼酸钠、次氯酸钠等)和 NaNO_2 降解; 物理降解包括超声波降解、射线降解; 但最理想的方法是生物酶降解法。本研究利用本实验室自制的壳聚糖酶对壳聚糖进行了酶解, 通过控制不同的酶解时间, 制备出不同分子量级

表 3 不同分子量COS对DM大鼠餐后2 h血糖和葡萄糖耐量的影响 ($n = 9$, mean \pm SD)

分组	剂量mg/kg	餐后2 h血糖 (mmol/L)			葡萄糖耐量试验	
		0 d	60 d	降糖率(%)	AUC	比值
对照组	-	5.59 \pm 0.66 ^a	5.60 \pm 0.68 ^b	-0.27	21.66 \pm 6.18 ^b	17.69
Met	200	30.32 \pm 3.77	26.65 \pm 2.09 ^a	12.08	105.33 \pm 3.74	86.05
DM	-	29.58 \pm 3.83	39.38 \pm 3.08	-33.13	122.40 \pm 12.05	100.00
M I	500	32.23 \pm 4.03	22.13 \pm 3.23 ^b	31.34	101.19 \pm 12.44 ^a	82.67
M II	500	30.07 \pm 4.31	21.78 \pm 3.09 ^b	27.57	99.61 \pm 13.11 ^a	81.38
M III	500	28.16 \pm 4.14	21.32 \pm 3.02 ^b	24.29	96.79 \pm 9.22 ^b	79.08
M IV	500	32.93 \pm 3.67	19.73 \pm 4.12 ^b	40.09	94.79 \pm 13.20 ^b	77.44
M V	500	29.87 \pm 4.10	17.88 \pm 3.14 ^b	40.14	89.41 \pm 11.10 ^b	73.05
M VI	500	30.73 \pm 2.81	16.14 \pm 3.55 ^b	47.48	84.08 \pm 5.93 ^b	68.69

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs DM组.

水溶性的COS系列, 并进一步研究了不同分子量COS在体外促胰岛 β 细胞增殖和胰岛素分泌的作用及在体内调节链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠的餐后血糖的作用.

研究表明, 不同分子质量的COS对胰岛 β 细胞增殖作用的最适浓度均为100 mg/L, 在高浓度的情况下对细胞促生长均有抑制作用. 可能因为, 高浓度的情况下培养液的渗透压有变化, 使得细胞的生长环境受到影响. COS的分子质量对促胰岛 β 细胞增殖作用影响较大, 当细胞COS分子质量增大至9987 Da, 细胞相对增殖率为191.65%. 促增殖作用显著. 而分子质量为1200 Da的较低分子质量COS在一代生长期可以显著促进胰岛细胞的生长, 缩短潜伏期及对数生长期的时间, 72 h细胞密度即可达到最大, 到达平台期, 活力高于其他组, 且其促胰岛素分泌作用显著, 胰岛素刺激指数可达2.94倍. 不同分子质量的COS对DM大鼠60 d前后餐后2 h PG均有不同程度的降低, COS MVI组的降血糖效果最好, 可使血糖降至16.14 mmol/L, 降糖率为47.48%. COS各组糖耐量AUC较低, 与阴性对照组比较均有极显著差异($P < 0.01$), MVI组仅为68.69%, 效果最好.

COS的降血糖机制可能有以下几点: (1)COS可以调节糖尿病大鼠机体的酸碱平衡进而增加胰岛素的敏感性, COS呈碱性, 服用后能使体液pH值上升, 改变酸性体质, 增强细胞活性和对胰岛素的敏感性. 实验证明, 血液的pH值每下降0.1, 胰岛素的活性便降低30%. (2)COS能有效地促进胰岛细胞的增殖, 促进受损胰岛细胞的恢复等, 我们的实验证实了这一点, COS对于原代培养的大鼠胰岛细胞和胰岛 β 细胞株NIT-1体外增殖具有明显的促进作用可以显著缩

短一代生长期内潜伏期及对数生长期的时间并可以显著促进原代培养胰岛细胞的胰岛素分泌. (3)COS具有调节内分泌系统的功能, 能促进 β -细胞功能恢复, 通过其双向调节作用, 使胰岛素分泌量趋向正常, 以维持血糖的正常代谢.

4 参考文献

- Rubio MA, Arrieta JL, Ruiz M, Garrido J, Rubio JA, del Llano J, Casimiro C, Raigada F. Design and validation of a scale to assess preferences of type 2 diabetic patients towards different nutritional supplements. *Nutr Hosp* 2008; 23: 253-262
- Janghorbani M, Stenhouse EA, Jones RB, Millward BA. Is neighbourhood deprivation a risk factor for gestational diabetes mellitus? *Diabet Med* 2006; 23: 313-317
- Lin W, Hu X, Zhang W, Rogers WJ, Cai W. Hydrogen peroxide mediates defence responses induced by chitosans of different molecular weights in rice. *J Plant Physiol* 2005; 162: 937-944
- Je JY, Park PJ, Kim SK. Free radical scavenging properties of hetero-chitooligosaccharides using an ESR spectroscopy. *Food Chem Toxicol* 2004; 42: 381-387
- Lee SH, Suh JS, Kim HS, Lee JD, Song J, Lee SK. MR evaluation of radiation synovectomy of the knee by means of intra-articular injection of holmium-166-chitosan complex in patients with rheumatoid arthritis: results at 4-month follow-up. *Korean J Radiol* 2003; 4: 170-178
- Park PJ, Je JY, Kim SK. Free radical scavenging activity of chitooligosaccharides by electron spin resonance spectrometry. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 4624-4627
- Park PJ, Je JY, Kim SK. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of hetero-chitooligosaccharides prepared from partially different deacetylated chitosans. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 4930-4934
- Fernandes JC, Tavarua FK, Soares JC, Ramos OS, João Monteiro M, Pintado ME, Xavier Malcata F. Antimicrobial effects of chitosans and chitooligosaccharides, upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in food model systems. *Food Microbiol* 2008; 25: 922-928
- Oliveira EN Jr, El Gueddari NE, Moerschbacher BM,

同行评价

本研究科研思维较前沿, 实验设计较严谨, 实验操作步骤清晰, 但实验的最后一步设计欠妥. 总体来讲该研究具有临床、基础研究的科研价值.

- Peter MG, Franco TT. Growth of phytopathogenic fungi in the presence of partially acetylated chitooligosaccharides. *Mycopathologia* 2008; 166: 163-174
- 10 Jung WK, Moon SH, Kim SK. Effect of chitooligosaccharides on calcium bioavailability and bone strength in ovariectomized rats. *Life Sci* 2006; 78: 970-976
- 11 Liu B, Liu WS, Han BQ, Sun YY. Antidiabetic effects of chitooligosaccharides on pancreatic islet cells in streptozotocin-induced diabetic rats. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 725-731

编辑 史景红 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2007 年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序

代码	期刊名称	总被引频次			影响因子		
		数值	学科排名	离均差率	数值	学科排名	离均差率
1170	JOURNAL OF GERIATRIC CARDIOLOGY	19	44	-0.98	0.059	44	-0.89
G275	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	4431	1	3.46	0.745	10	0.38
G803	肝脏	467	28	-0.53	0.537	17	-0.01
G938	国际呼吸杂志	521	25	-0.48	0.386	32	-0.29
G415	国际内分泌代谢杂志	654	20	-0.34	0.520	19	-0.04
G939	国际脑血管病杂志	662	19	-0.33	0.480	22	-0.11
G501	临床肝胆病杂志	497	26	-0.50	0.318	36	-0.41
G291	临床骨科杂志	689	18	-0.31	0.455	25	-0.16
G658	临床荟萃	1169	13	0.18	0.233	40	-0.57
G257	临床内科杂志	651	21	-0.35	0.367	34	-0.32
G855	临床消化病杂志	292	36	-0.71	0.394	30	-0.27
G261	临床心血管病杂志	866	17	-0.13	0.474	24	-0.12
G293	临床血液学杂志	341	34	-0.66	0.347	35	-0.36
G491	岭南心血管病杂志	157	41	-0.84	0.110	43	-0.79
G662	内科急危重症杂志	276	37	-0.72	0.318	36	-0.41
G746	实用肝脏病杂志	297	35	-0.70	1.100	3	1.04
G190	世界华人消化杂志	2353	5	1.37	0.568	15	0.05
G800	胃肠病学	376	33	-0.62	0.372	33	-0.31
G326	胃肠病学和肝病杂志	468	27	-0.53	0.399	29	-0.26
G451	现代消化及介入诊疗	84	43	-0.92	0.230	41	-0.58
G083	心肺血管病杂志	214	40	-0.78	0.206	42	-0.62
G419	心血管病学进展	467	28	-0.53	0.419	27	-0.23
G260	心脏杂志	523	24	-0.47	0.392	31	-0.28
G610	胰腺病学	223	38	-0.78	0.282	38	-0.48
G234	中国动脉硬化杂志	869	16	-0.13	0.521	18	-0.04
G422	中国脑血管病杂志	223	38	-0.78	0.503	21	-0.07
G267	中国实用内科杂志	2121	7	1.13	0.601	13	0.11
G211	中国糖尿病杂志	1284	11	0.29	0.931	7	0.72
G203	中国心脏起搏与心电生理杂志	616	23	-0.38	0.599	14	0.11
G633	中国血液净化	449	31	-0.55	0.478	23	-0.12
G119	中国循环杂志	643	22	-0.35	0.411	28	-0.24
G231	中华肝脏病杂志	2746	4	1.76	1.056	4	0.95
G235	中华高血压杂志	982	15	-0.01	0.757	9	0.40
G639	中华老年多器官疾病杂志	143	42	-0.86	0.235	39	-0.57
G876	中华老年心脑血管病杂志	465	30	-0.53	0.431	26	-0.20
G150	中华老年医学杂志	1010	14	0.02	0.510	20	-0.06
G155	中华内分泌代谢杂志	1548	9	0.56	1.032	5	0.91
G156	中华内科杂志	3238	3	2.26	0.847	8	0.57
G161	中华肾脏病杂志	1477	10	0.49	1.018	6	0.88
G285	中华消化内镜杂志	1271	12	0.28	0.607	12	0.12
G168	中华消化杂志	2249	6	1.26	1.123	2	1.08
G892	中华心律失常学杂志	384	32	-0.61	0.568	15	0.05
G170	中华心血管病杂志	3705	2	2.73	1.217	1	1.25
G172	中华血液学杂志	1632	8	0.64	0.633	11	0.17
	平均值	994			0.541		

以上数据摘自《中国科技期刊引证报告》(2008年版). 科学技术文献出版社, 160-161.

缺血-再灌注损伤对大鼠肠黏膜及运动功能的影响

王宏

王宏, 天津医科大学总医院中医科 天津市 300052
王宏, 天津医科大学硕士, 主要从事消化临床及药理方向的研究。
通讯作者: 王宏, 300052, 天津市和平区鞍山道154号, 天津医科大学总医院中医科. hongrebecca@163.com
电话: 022-60362561
收稿日期: 2008-10-30 修回日期: 2008-12-04
接受日期: 2008-12-08 在线出版日期: 2009-01-08

Effects of ischemia-reperfusion injury on intestinal mucosa and colon motility in rats

Hong Wang

Hong Wang, Department of Traditional Chinese Medicine, General Hospital Affiliated to Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

Correspondence to: Hong Wang, Department of Traditional Chinese Medicine, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China. hongrebecca@163.com
Received: 2008-10-30 Revised: 2008-12-04
Accepted: 2008-12-08 Published online: 2009-01-08

Abstract

AIM: To set up an animal model of ischemia-reperfusion to explore the effects of different reperfusion time injury in rats and to find out a better model.

METHODS: The models of ischemia-reperfusion injury were randomly separated into 7 groups with 8 mice in each group. Model groups (Group Z) included limb ischemia-reperfusion (Z3-12, Z3-18, Z3-24); Group C was intestinal ischemia-reperfusion (C3-12, C3-18, C3-24). In Group Z, reperfusion was performed 3 h after ischemia and their mental status and vital signs were observed. All rats in group Z were sacrificed at 12, 18 and 24 h after reperfusion. Morphological changes of intestinal mucosa were observed through microscopy. Average contractile amplitude of colonic muscle strips was recorded using a multiscrptor. In group C, all rats were sacrificed 48 hours after reperfusion with different ischemia time (45, 60, 75 min). The same treatment was performed on group C.

RESULTS: In group Z, the rats' mental status

became worse and was less active. The pathological injury of intestinal was worse with reperfusion time passing. In comparison with the control group, the average contractile amplitude of colonic muscle strips was decreased in Z3-12 group and Z3-18 group (0.49 ± 0.02 , 0.46 ± 0.02 vs 0.51 ± 0.03 , both $P < 0.05$). In group C, the rats' mental status became worse, and was less active. The death rate was higher as the ischemia time increased, and the pathological changes of intestinal became worse either. In comparison with the control group, the average contractile amplitude of colonic muscle strips was decreased in C60-48 group (0.52 ± 0.03 vs 0.56 ± 0.03 , $P < 0.05$); but there was no difference between C45-48 and the control group.

CONCLUSION: Two types of models of ischemia-reperfusion result in morphological and functional injury; group Z became worse in intestine as the reperfusion time extended; group C became worse in intestine with the ischemia time extended. The model of limb ischemia-reperfusion is better than the intestinal one, because of its easy operation, less infection and lower death rates.

Key Words: Ischemia-reperfusion; Small intestine; Colon; Morphous; Motion

Wang H. Effects of ischemia-reperfusion injury on intestinal mucosa and colon motility in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(1): 43-48

摘要

目的: 建立缺血-再灌注动物模型, 研究时间变化对肠道损伤的动态影响, 探索肠道损伤的最佳动物模型。

方法: Wistar大鼠随机分成对照组和缺血再灌注组共7组, 每组8只。模型组分为肢体缺血再灌注组(Z组: Z3-12、Z3-18、Z3-24)和肠系膜上动脉缺血再灌注组(C组: C45-48、C60-48、C75-48)。Z组缺血3 h后再灌注, 分别于12 h、18 h、24 h处死, C组采用不同缺血时间(45、60、75 min), 均于再灌注48 h后处死。各实验组观察模型制备期间精神状态、生命体征;

■背景资料

目前, 大多采取肠系膜上动脉缺血再灌注、夹闭肝门动脉、腹主动脉等方法建立肠道损伤动物模型。然而, 这些方法存在伤口易感染, 死亡率较高等不足。

■同行评议者

程爱国, 教授, 华北煤炭医学院临床医学系

■研究前沿
缺血再灌注导致肠黏膜损伤是一个研究热点,涉及多个研究领域。

留取小肠、结肠组织,观察组织病理变化;多道生理记录仪记录大鼠结肠平滑肌收缩的振幅。

结果: Z组: 大鼠精神状态均呈现萎靡, 活动减少; 肠组织病理损伤随再灌注时间延长而加重; 肌条振幅下降, 与对照组相比Z3-12、Z3-18组结肠平滑肌振幅(0.49 ± 0.02 , 0.46 ± 0.02 vs 0.51 ± 0.03 , 均 $P < 0.05$)。C组: 大鼠精神差, 活动少, 竖毛, 贴笼, 3组均出现死亡并随缺血时间延长死亡率增加。肠组织病理损伤随缺血时间延长而加重, 结肠动力检测示C45-48组与对照组相比差别无统计学意义; 与正常组相比C60-48结肠肌条振幅有意下降(0.52 ± 0.03 vs 0.56 ± 0.03 , $P < 0.05$)。

结论: 两种缺血再灌注模型均可造成肠道形态和运动功能的损伤。Z组随再灌注时间的延长而加重; C组随缺血时间延长而加重; C组因其易操作、少感染、死亡率低等优点更适合作为肠道损伤的动物模型。

关键词: 缺血再灌注; 小肠; 结肠; 形态; 运动

王宏. 缺血-再灌注损伤对大鼠肠黏膜及运动功能的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(1): 43-48
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/43.asp>

0 引言

目前, 大多采取肠系膜上动脉缺血再灌注^[1-3]、夹闭肝门动脉^[4-5]、腹主动脉^[6]等方法造成肠道损伤。本实验拟对比肠系膜上动脉缺血再灌注模型和肢体缺血再灌注模型对大鼠肠道损伤的动态变化特点, 探索肠道损伤最佳动物模型, 为进一步研究肠动力损伤奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料 健康Wistar大鼠, 雌雄各半, 体质量 195 ± 15 g, 由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供, 许可证号SCXK-(军)2002-001。正常对照组(N), Z组统一缺血3 h, 按照再灌注时间不同分为12 h组(Z3-12), 18 h组(Z3-18)和24 h组(Z3-24); C组统一再灌注48 h, 按照缺血时间分为45 min组(C45-48), 60 min组(C60-48), 75 min组(C75-48)每组8只。实验动物适应性平衡饲养1 wk后用于实验。Olympus, BX-60光学显微, Image pro plus 6图像分析系统, SC-15型数控超级恒温槽(宁波), TSD-125C型张力传感器, MP-150型多导生理记录仪(Biopac), 竖型玻璃灌流浴槽(南开大学玻璃仪器厂); 100 g/L水合氯醛, 购自天津医

科大学总医院制剂室。

1.2 方法

1.2.1 模型制备: Z组: 在Yassin法^[7]基础上采用拉力法进行统一结扎力度的改良^[8]。实验动物均于造模前24 h禁食, 自由饮水。以100 g/L水合氯醛(3 mL/kg)行术前麻醉后, 结扎模型组及给药组大鼠双侧大腿根部, 持续3 h。迅速解除结扎, 分别行肢体再灌注12、18、24 h。C组: 麻醉方法同Z组, 实验台上仰卧固定, 腹部脱毛后取腹部正中切口进腹, 暴露肠系膜上动脉(superior mesenteric artery, SMA), 各组分别用无创夹夹闭其根部45, 60, 75 min松夹即为再灌注, 在进行SMA夹闭期间, 间断地向腹腔内注射等渗盐水, 以预防或减轻在松开动脉夹后出现的一过性低血容量反应。

1.2.2 组织病理标本制备: 实验大鼠采用颈椎脱臼处死法, 迅速取出距回肠末端10 cm处肠组织2 cm, 纵行剖开, 40 g/L中性甲醛固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 切片, HE染色, 光镜下观察。

1.2.3 肌条运动测定方法^[9]: 实验结束, 迅速取出近端结肠(盲肠与结肠交界处2 cm以下)5 cm, 制备8 mm×2 mm结肠环形肌条。将肌条固定于37℃恒温灌流浴槽内Krebs液中, 持续通入950 mL/L O₂和50 mL/L CO₂混合气体。肌条与张力传感器相连, 张力传感器给予1 g负荷, 记录肌条的等长机械收缩活动。

1.2.4 Krebs液的配制: 称取NaCl 120.6 mmol/L, KCl 5.9 mmol/L, CaCl₂ 2.5 mmol/L, MgCl₂ 1.2 mmol/L, NaHCO₃ 15.5 mmol/L, NaH₂PO₄ 1.2 mmol/L, 葡萄糖11.5 mmol/L, pH7.4。最后得到148.4 mmol/L Krebs液。

统计学处理 应用SPSS11.5统计软件分析, 采用单因素方差分析和 χ^2 检验进行组间比较。

2 结果

2.1 肢体缺血再灌注后大体表现 Z组: Z3-12组多数大鼠出现精神欠佳, 毛色少泽, 3只出现腹胀腹泻, 双后肢活动尚自如; Z3-18组精神差, 毛色晦暗, 腹胀腹泻, 双后肢活动欠佳; Z3-24组精神萎靡, 毛色晦暗, 多数出现腹胀及腹泻。其中死亡1只, 休克状态1只, 余者蜷缩、畏寒、活动少。C组: C45-48组大鼠精神不佳, 少活动, 贴笼, 死亡1只; C60-48组精神差, 竖毛, 死亡3只; C75-48组精神极差, 毛色晦暗, 少动, 偶有腹部抽搐, 死亡4只。

2.2 组织病理

2.2.1 镜下所见: 如图1所示, 正常组肠绒毛基本

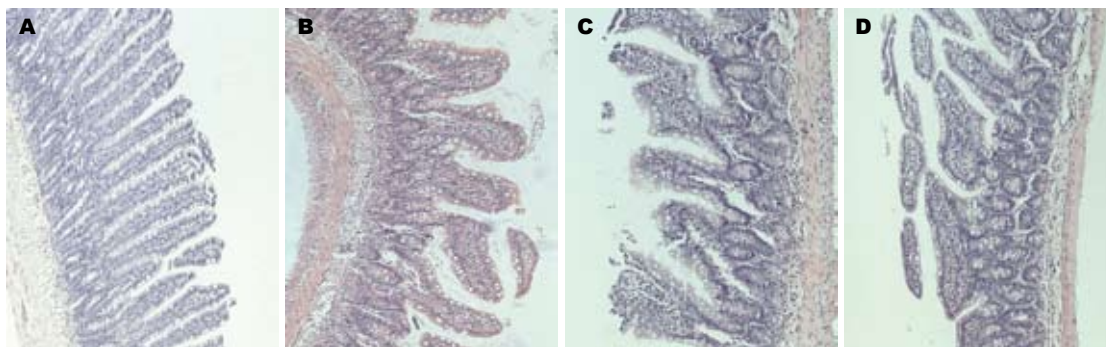


图 1 光镜下Z组肠道损伤的病理改变. A: N; B: Z3-12; C: Z3-18; D: Z3-24.

■ 相关报道

有研究表明缺血30 min再灌注60 min,可引起小肠上皮细胞脱落,绒毛尖端上皮抬高,与固有膜剥离,可见散在的溃疡和出血灶,并有大量的中性粒细胞浸润.缺血45 min再灌注60 min,出现了绒毛两侧上皮成块脱落,部分上皮完全脱落,仅存固有膜,肠壁变薄.

表 1 Z组肠绒毛形态分类的比较

分组	小肠绒毛分类						正常型肠绒毛	
	n	I	II	III	IV	V	n	%
N	160	60	62	30	8	0	152	95.0
Z3-12	160	54	36	44	23	3	134	83.3
Z3-18	160	48	33	47	34	8	118	73.8 ^{bc}
Z3-24	160	39	26	51	42	18	100	62.5 ^{bde}

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 正常组; ^cP<0.05, ^dP<0.01 vs Z3-12组; ^eP<0.05 vs Z3-18组.

表 2 C组肠绒毛形态分类的比较

分组	小肠绒毛的分类						正常型绒毛	
	n	I	II	III	IV	V	n	%
N	160	60	62	30	8	0	155	96.9
C45-48	160	33	50	46	24	7	129	80.6 ^a
C60-48	160	29	34	48	30	19	111	69.3 ^{bc}
C75-48	160	21	26	42	50	41	89	55.6 ^{bde}

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 正常组; ^cP<0.05, ^dP<0.01 vs C45-48组; ^eP<0.05 vs C60-48组.

正常. Z组: Z3-12组肠绒毛出现排列不整, 绒毛萎缩变短增粗; 间质充血、水肿, 部分检体淋巴管扩张、炎细胞浸润. Z3-18组肠绒毛排列不整, 绒毛萎缩、增粗, 部分绒毛脱落、缺损, 间质明显充血、水肿、淋巴管扩张, 大量炎细胞浸润; 上皮细胞排列不整, 变性坏死. Z3-24组绒毛增粗变短, 脱落、缺损, 上皮细胞变性坏死, 杯细胞增多, 肠隐窝明显肥厚, 且间质除充血、水肿、淋巴管扩张并见大量炎细胞浸润. 如图2所示, C组: C45-48组绒毛出现排列不整, 间质充血、水肿、淋巴管扩张、部分炎细胞浸润、绒毛萎缩变短增粗; C60-48组肠绒毛排列不整, 绒毛萎缩折断, 部分绒毛脱落、缺损, 间质明显充血、水肿、淋巴管扩张, 大量炎细胞浸润, 上皮细胞排列紊乱, 变性坏死. C75-48组绒毛增粗变短, 脱

落、缺损, 上皮细胞大量变性坏死, 间质除充血、水肿、淋巴管扩张并见大量炎细胞浸润, 部分黏膜下层与肌壁层分离.

2.2.2 小肠绒毛形态分类法: 将肠绒毛分为5类^[10], 每检体计数20根绒毛, I-III为正常型, IV-V为异常型, 计算正常型百分比. 与正常组相比Z组各组正常绒毛比率均呈有意下降(P<0.05); Z组组内比较, 与Z3-12组相比Z3-18组和Z3-24组正常绒毛比率呈有意下降(P<0.05), 与Z3-18组相比Z3-24组的正常绒毛比率呈有意下降(P<0.05, 表1). 与正常组相比C组各组正常绒毛比率均呈有意下降(P<0.05); C组组内比较, 与C45-48组相比C60-48组和C75-48组正常绒毛比率呈有意下降(P<0.05), 与C60-48组相比C75-48组的正常绒毛比率呈有意下降(P<0.05, 表2).

■创新盘点

采用较为简便易行、不会造成感染的动物模型方法;观察动态时间下的损伤肠道变化,探索损伤程度变化规律;进行运动功能实验,探讨肠动力损伤。

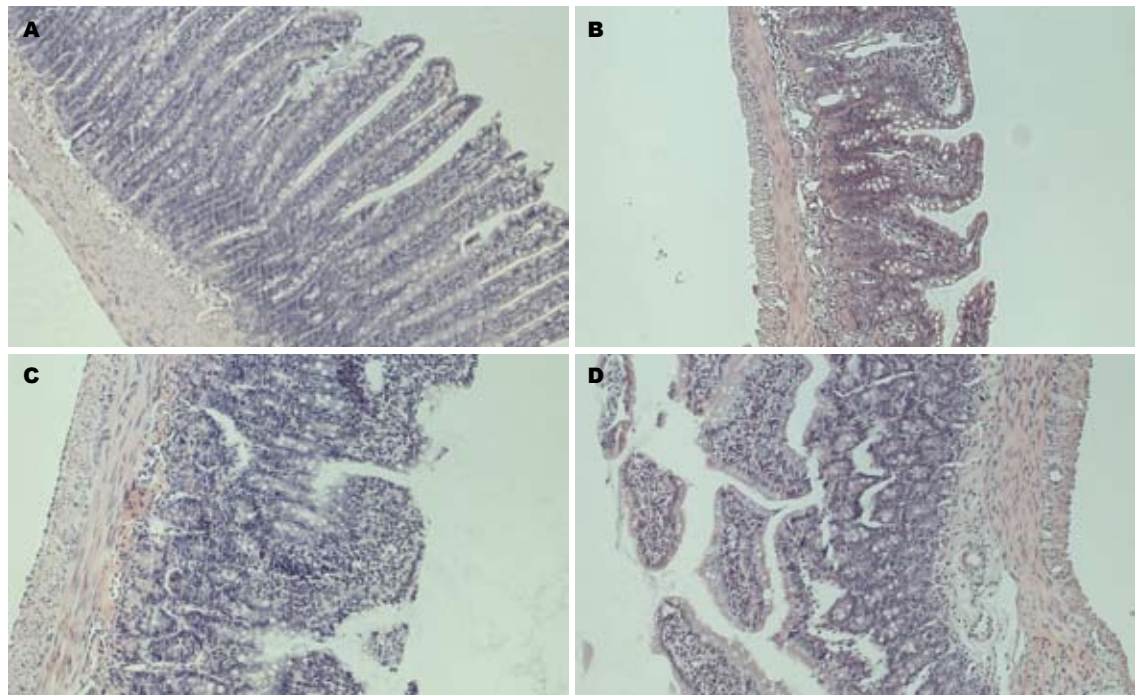


图2 光镜下C组肠道损伤的病理改变. A: N; B: C45-48; C: C60-48; D: C75-48.

表3 Z组结肠平滑肌肌条收缩振幅 (mean ± SD, n = 8)

分组	收缩波振幅(g)
N	0.51 ± 0.03
Z3-12	0.49 ± 0.02 ^a
Z3-18	0.46 ± 0.02 ^{bc}

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 正常组; ^cP<0.05 vs Z3-12组.

表4 C组结肠平滑肌肌条收缩振幅 (mean ± SD, n = 8)

分组	收缩波振幅(g)
N	0.56 ± 0.03
C45-48	0.56 ± 0.04
C60-48	0.52 ± 0.03 ^a

^aP<0.05 vs 正常组.

2.3 肢体缺血再灌注对结肠运动的影响 Z组中Z3-12组和Z3-18组较对照组结肠平滑肌收缩振幅下降, 差异有统计学意义(P<0.05, 表3), Z3-18组比Z3-12组收缩振幅下降, 也具有统计学意义(P<0.05, 表2). Z3-24组结肠肠壁变薄, 肌张力差, 不能耐受1 g前负荷, 无法测量其振幅. C组中C45-48组与正常组比较收缩振幅无统计学差异; C60-48组较对照组收缩振幅下降, 差异有统计学意义(P<0.05, 表4); C75-48组与Z3-24组情况相同不能耐受1 g前负荷, 无法测量其振幅.

3 讨论

肠系膜上动脉为肠道的主要血管, 当肠道处于缺血状态后其血流恢复需48 h^[11], 本实验探讨统一再灌注48 h, 而不同缺血时间状态下的肠道损伤的动态变化; 肢体缺血再灌注是利用统一拉力橡皮筋束缚大鼠双下肢股动静脉造成下肢缺血, 通过再灌注后产生的二次打击对其远端器官-肠道造成损伤, 故此采用统一缺血时间不同

再灌注时间观察肠道损伤的动态变化.

缺血再灌注损伤是一个复杂的生理病理改变^[12]. 机体在正常情况下, 循环血流的30%流经胃肠道. 当机体遭受严重创伤或休克时, 机体为了保护心、脑等重要器官, 使全身血液重新分配, 胃肠道血流明显减少. 若全身血流量减少10%, 即可导致胃肠道血流减少40%^[13], 造成了肠道的屏障损伤和动力障碍. 一般将肠屏障归纳为四部分: 机械屏障, 即黏膜上皮; 生物屏障, 即肠道内的常居菌群; 化学屏障, 即胃酸、胆汁、溶菌酶、黏多糖和蛋白分解酶等; 免疫屏障. 其中机械屏障尤其是小肠黏膜上皮细胞非常重要, 他在充满细菌和毒素的肠腔和其他组织及血液循环之间构建了一个物理性屏障, 一般意义上的肠屏障即指这层结构, 应激状态下, 其结构的完整性被破坏, 致使机械屏障作用减弱^[14-17]. 肠黏膜低灌注, 细胞因子作用及氧自由基损伤是肠黏膜三大主要致伤因素^[18]. 肠黏膜在解剖上有其特点: 小肠绒毛营养血管呈发夹状, 发夹顶端位

于绒毛顶部, 故其血供较差. 加之绒毛营养血管从母支直角分叉, 致营养绒毛血液的氧容量下降, 因此在病理情况下, 肠绒毛顶端更容易发生缺血性损害. 缺血缺氧时, 使得肠黏膜上皮水肿, 上皮细胞膜及细胞间连接断裂, 细胞坏死, 上皮从绒毛顶端开始脱落甚至黏膜全层脱落而形成溃疡, 导致肠通透性增加^[19], 肠血供减少越多, 肠壁细胞超微结构破坏就会越严重^[20]. 小肠在缺血再灌注后, 其黏膜和肌层均有白细胞的聚积和炎症反应并且减弱了肌肉的收缩功能, 同时肠黏膜的屏障功能受到破坏如肠黏膜上皮细胞的坏死、脱落、出血及溃疡等. T淋巴细胞还能调节小肠后微血管的炎症应答, 小肠内缺血再灌注损伤后伴随出现CD4⁺和CD8⁺和T淋巴细胞的募集反应, 该反应是由内皮MAdCAM-1介导的. T淋巴细胞调整了在发生缺血再灌注几小时后出现的多形核白细胞的募集反应, 这对于改善小肠缺血再灌注损伤后出现的炎症反应有很大意义^[21]. McCord(1985年)首次提出再灌注损伤的概念, 从此自由基在再灌注损伤中的作用得以重视. 氧自由基在再灌注期主要来自黄嘌呤氧化酶途径. 在缺血期, 肠黏膜中丰富的黄嘌呤脱氢酶转化为黄嘌呤氧化酶, 腺苷酸分解代谢为次黄嘌呤, 在缺血组织中累积. 再灌注期, 氧随着血流的恢复进入缺血组织, 在黄嘌呤氧化酶的作用下次黄嘌呤与氧分子作用生成黄嘌呤, 最终生成尿酸. 在这一过程中释放大量的氧自由基, 其具有强氧化性而能使脂质过氧化、蛋白变性, 从而产生细胞毒害作用^[22].

前人做过不同缺血、再灌注时间研究发现: 缺血15 min再灌注60 min的小鼠, 肠黏膜损伤的早期形态学改变为小肠绒毛上皮分离^[23]. 缺血30 min再灌注60 min, 小肠上皮细胞脱落, 绒毛尖端上皮抬高, 与固有膜剥离, 可见散在的溃疡和出血灶, 并有大量的中性粒细胞浸润^[24]. 缺血45 min再灌注60 min, 出现了绒毛两侧上皮成块脱落, 部分上皮完全脱落, 仅存固有膜, 肠壁变薄^[25]. 缺血1 h再灌注2 h, 有多部位不同程度的肠黏膜绒毛上皮脱落、黏膜下水肿、毛细血管扩张、瘀血^[26]. 缺血1 h再灌注3 h即可出现肠黏膜绒毛上皮下间隙增宽, 绒毛上皮与固有层剥离、脱落^[27]. 不同的缺血时间及再灌注时间, 均能造成小肠黏膜的损伤, 再灌注2-3 h时为早期, 晚期则可持续到再灌注后12-24 h甚至3-4 d^[28]. 从上述研究中难以发现缺血再灌注时间变化与损伤的程度之间的规律; 另外, 前期实验^[2]利用单一时间点探讨了肠屏障的损伤情况, 阐释了

肢体缺血再灌注模型对肠屏障具有损伤作用, 然而并未对其动态变化进行深入探讨, 故此, 本实验借鉴前人经验进行规律性研究, 结果提示: 两种动物模型在不同缺血、再灌注时间下均可对肠屏障损伤产生动态影响.

缺血再灌注不仅损伤肠屏障, 也对肠道功能具有损伤作用^[29], 可导致肠神经节细胞凋亡^[30]并对肠平滑肌收缩、传输功能产生影响^[31-33]. 结肠的血管不具有小肠的血管特点, 对于缺血再灌注损伤的耐受比小肠好, 肠黏膜损伤程度较轻^[34]. 细菌移位也是肠黏膜损伤的重要原因, 缺血再灌注后小肠出现细菌移位, 而结肠几乎没有发生移位, 黏膜损伤不明显^[35], 同时由于针对小肠屏障的研究目前开展较为普遍, 故此本实验重点探讨结肠动力损伤情况. 结肠是消化系的重要组成部分, 主要生理功能为吸收水分、某些电解质、短链脂肪酸和细菌的代谢产物, 贮存和排泄粪便. 结肠的精确运动形式主要表现为袋状往返运动、分节推进运动、多袋推进运动和蠕动等4种类型. 其运动的调控主要依赖于电活动在肠肌内的扩散, 肠内神经的反射, 交感、副交感神经的反射和激素调节. 针对缺血再灌注造成结肠动力损伤动态变化的探讨国内外较少. 前期实验结果表明, 肢体缺血再灌注可引发血清NO明显升高^[2], 可导致结肠运动功能障碍^[36-37]. 前人已证实^[38-39], 单一时间点的肢体缺血再灌注可以造成结肠动力障碍, 其机制与结肠平滑肌细胞内钙离子浓度相关, 由此推测本实验中出现的动力障碍变化可能与钙离子浓度变化相关, 今后将就此问题进行深入探讨. 本实验用37℃恒温、950 mL/L O₂、50 mL/L CO₂及Krebs液浸浴组织等方法模拟生态环境, 记录到的离体肌条活动稳定可靠, 可以直观的反映结肠运动情况, 便于观察动态时间变化下的动力损伤程度.

肠系膜上动脉缺血再灌注模型和肢体缺血再灌注模型, 均可造成肠屏障和肠动力的损伤, 然而肢体缺血再灌注模型因其易操作、无感染且死亡率低等特点更便于对肠道损伤的研究. 今后, 将就此模型对肠动力损伤的变化进行深入研究 and 探讨.

4 参考文献

- 1 邹积骏, 张家衡, 徐瑶, 延文. 加味枳术汤对大鼠肠黏膜屏障功能保护作用的病理观察. 湖北中医杂志 2008; 30: 10-11
- 2 Liu KX, Chen SQ, Huang WQ, Li YS, Irwin MG, Xia Z. Propofol pretreatment reduces ceramide

■应用要点

肢体缺血再灌注动物模型, 不仅可以作为肠黏膜损伤动态变化的造模方法, 还可用于探讨肠动力损伤的动态变化.

■同行评价

本研究作为今后深入研究肢体缺血再灌注性损伤对肠道四大屏障功能的影响是有意义的,具有参考价值。

- production and attenuates intestinal mucosal apoptosis induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Anesth Analg* 2008; 107: 1884-1891
- 3 Teke Z, Sacar M, Yenisey C, Atalay AO, Kavak T, Erdem E. Activated protein C attenuates intestinal mucosal injury after mesenteric ischemia/reperfusion. *J Surg Res* 2008; 149: 219-230
 - 4 韩丽莎, 王芳, 胡海, 张坤. 肝缺血-再灌注损伤致多脏器损伤的实验研究. *内蒙古医学杂志* 2007; 39: 156-158
 - 5 陈笑, 毛羽, 王植平. 肝门阻断对大鼠小肠形态学的影响. *中华实验外科杂志* 2004; 21: 229
 - 6 赵秀梅, 刘育英. 腹主动脉夹闭再灌注后多脏器血流量及血浆、淋巴液中TNF α 和IL-8水平的变化. *中国微循环* 2004; 12: 242-244
 - 7 Yassin MM, Barros D'Sa AA, Parks TG, McCaigue MD, Leggett P, Halliday MI, Rowlands BJ. Lower limb ischaemia-reperfusion injury alters gastrointestinal structure and function. *Br J Surg* 1997; 84: 1425-1429
 - 8 谢肄聪, 唐方. 藿香正气软胶囊对肠屏障功能保护作用的机理研究. *中国中药杂志* 2004; 29: 456-458
 - 9 周吕, 柯美云. 胃肠动力学: 基础与临床. 北京: 科学出版社, 1999: 293-303
 - 10 Lee FD, Tonar PG. Biopsy pathology of the small intestine. London: Chapman and Hall, 1980: 7-35
 - 11 胡森, 晋桦, 吕艺. 山羊低血容量性休克和复苏后胃肠粘膜内pH值的变化. *中国危重病急救医学* 1997; 9: 708-710
 - 12 Bastide M, Bordet R, Pu Q, Robin E, Puisieux F, Dupuis B. Relationship between inward rectifier potassium current impairment and brain injury after cerebral ischemia/reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 1309-1315
 - 13 刘春峰, 袁壮. 内脏缺血缺氧代谢障碍在SIRS和MODS中的作用. *小儿急救医学* 2000; 7: 180-182
 - 14 MacFie J, O'Boyle C, Mitchell CJ, Buckley PM, Johnstone D, Sudworth P. Gut origin of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity. *Gut* 1999; 45: 223-228
 - 15 尉秀清, 姚集鲁, 文卓夫. 肠道粘膜屏障功能及其临床检测. *国外医学·内科学分册* 2004; 31: 415-418
 - 16 王彤, 赵欣, 王尧华. 肠内早期中药干预对肠黏膜屏障的保护作用. *中国中西医结合外科杂志* 2003; 9: 410-412
 - 17 黎介寿. 加强对肠屏障功能障碍的研究. *中华医学杂志* 1999; 79: 581-582
 - 18 赵钢, 江伟, 徐惠芳. 大黄对肠缺血再灌注致大鼠炎症反应的防治作用. *南京铁道医学院学报* 2000; 19: 246-248
 - 19 张嘉, 刘瑞林, 刘牧林. 肠道屏障功能损伤机制的研究进展. *蚌埠医学院学报* 2005; 3: 277-280
 - 20 Yükses YN, Kologlu M, Daglar G, Doganay M, Dolapci I, Bilgihan A, Dolapci M, Kama NA. Intestinal ischemia-reperfusion injury augments intestinal mucosal injury and bacterial translocation in jaundiced rats. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 171-175
 - 21 Shigematsu T, Wolf RE, Granger DN. T-lymphocytes modulate the microvascular and inflammatory responses to intestinal ischemia-reperfusion. *Microcirculation* 2002; 9: 99-109
 - 22 Köksoy C, Kuzu MA, Ergün H, Demirpençe E, Zulfikaroglu B. Intestinal ischemia and reperfusion impairs vasomotor functions of pulmonary vascular bed. *Ann Surg* 2000; 231: 105-111
 - 23 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
 - 24 古松钢, 许建衡. 依达拉奉对大鼠肠缺血再灌注损伤的保护作用. *实用医学杂志* 2006; 22: 1117-1119
 - 25 谢宁, 谢静. 米贝拉地尔对大鼠肠缺血再灌注损伤的影响. *医学临床研究* 2008; 25: 219-221
 - 26 胡晓敏, 吕阳, 姚尚龙. 丙泊酚对大鼠肠缺血再灌注损伤的影响. *华中科技大学学报(医学版)* 2007; 36: 210-213
 - 27 程梦琳, 邱明义, 陶春晖, 温桂荣. 桃核承气汤对大鼠肠缺血再灌注损伤保护作用的实验研究. *山东中医杂志* 2006; 25: 689-692
 - 28 Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1359-1377
 - 29 Moore-Olufemi SD, Kozar RA, Moore FA, Sato N, Hassoun HT, Cox CS Jr, Kone BC. Ischemic preconditioning protects against gut dysfunction and mucosal injury after ischemia/reperfusion injury. *Shock* 2005; 23: 258-263
 - 30 Linhares GK, Martins JL, Fontanezzi F, Patrício Fdos R, Montero EF. Do lesions of the enteric nervous system occur following intestinal ischemia/reperfusion? *Acta Cir Bras* 2007; 22: 120-124
 - 31 Ladipo JK, Seidel SA, Bradshaw LA, Halter S, Wikswa JP Jr, Richards WO. Histopathologic changes during mesenteric ischaemia and reperfusion. *West Afr J Med* 2003; 22: 59-62
 - 32 Ballabeni V, Barocelli E, Bertoni S, Impicciatore M. Alterations of intestinal motor responsiveness in a model of mild mesenteric ischemia/reperfusion in rats. *Life Sci* 2002; 71: 2025-2035
 - 33 Attuwaybi BO, Hassoun HT, Zou L, Kozar RA, Kone BC, Weisbrodt NW, Moore FA. Hypothermia protects against gut ischemia/reperfusion-induced impaired intestinal transit by inducing heme oxygenase-1. *J Surg Res* 2003; 115: 48-55
 - 34 Chang JX, Chen S, Ma LP, Jiang LY, Chen JW, Chang RM, Wen LQ, Wu W, Jiang ZP, Huang ZT. Functional and morphological changes of the gut barrier during the restitution process after hemorrhagic shock. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5485-5491
 - 35 范华, 吴浩, 谭庆华, 胡兵, 唐承薇. 猕猴肠缺血再灌注后肠道菌群变化与肠黏膜屏障损伤的关系. *胃肠病学* 2006; 11: 268-272
 - 36 杜军, 侯艳, 刘景丽, 刘晓燕, 冯伟燕, 戈应滨. 一氧化氮对糖尿病小鼠近端结肠动力有抑制作用. *南京医科大学学报(自然科学版)* 2008; 28: 1109-1112
 - 37 Takahashi A, Tomomasa T, Kaneko H, Watanabe T, Tabata M, Morikawa H, Tsuchida Y, Kuwano H. Intestinal motility in an in vivo rat model of intestinal ischemia-reperfusion with special reference to the effects of nitric oxide on the motility changes. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 33: 283-288
 - 38 刘蓉, 唐方. 紫苏梗对大鼠离体结肠平滑肌条运动的影响. *中国现代医药杂志* 2007; 9: 28-29
 - 39 刘蓉, 唐方. 紫苏梗对大鼠离体结肠肌条运动的影响. *天津中医药* 2007; 24: 144-145

编辑 史景红 电编 何基才

西藏拉萨地区乙型肝炎病毒基因型分布及与肝病的关系

曹占良, 高英堂, 吉宗, 刘持佳, 鲍布和, 赵金梅

曹占良, 刘持佳, 鲍布和, 赵金梅, 中国人民解放军武警医学院附属医院检验科 天津市 300162
高英堂, 天津市第三中心医院 天津市人工细胞重点实验室 天津市 300120
吉宗, 中国人民解放军武警西藏总队医院检验科 西藏自治区拉萨市 85000
武警医学院院级科研基金资助项目, No. WY2004-15
天津市科委攻关基金资助项目, No. 05YFSZSF02500
作者贡献分布: 曹占良与高英堂对此文所作贡献均等; 此课题由曹占良与高英堂设计; 研究过程由吉宗, 刘持佳, 鲍布和及赵金梅操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由高英堂与曹占良提供; 数据分析由曹占良与高英堂完成; 本论文写作由曹占良与高英堂完成。
通讯作者: 高英堂, 300120, 天津市, 天津市第三中心医院, 天津市人工细胞重点实验室. gaoyt816@163.com
电话: 022-60578728 传真: 022-60578728
收稿日期: 2008-11-08 修回日期: 2008-12-12
接受日期: 2008-12-15 在线出版日期: 2009-01-08

Relationship between distribution of HBV genotypes and liver diseases in Lhasa

Zhan-Liang Cao, Ying-Tang Gao, Zong Ji, Chi-Jia Liu, Bu-He Bao, Jin-Mei Zhao

Zhan-Liang Cao, Chi-Jia Liu, Bu-He Bao, Jin-Mei Zhao, Department of Laboratory Diagnosis, the Affiliated Hospital of Medical College of Chinese People's Armed Polices Force, Tianjin 300162, China
Ying-Tang Gao, Tianjin Third Central Hospital of Tianjin in Key Laboratories, Tianjin 300120, China
Zong Ji, Chinese PLA Tibet Armed Police Corps Hospital Inspection Bureau, Tibet Autonomous Region, Lhasa 85000, China
Supported by: the Science and Research Foundation of Medical College of Chinese People's Armed Polices Force, No. WY2004-15; the Key Research Project of Science Committee of Tianjin, No.05YFSZSF02500
Correspondence to: Dr. Ying-Tang Gao, Tianjin Third Central Hospital of Tianjin in Key Laboratories, Tianjin 300120, China. gaoyt816@163.com
Received: 2008-11-08 Revised: 2008-12-12
Accepted: 2008-12-15 PUBLISHED online: 2009-01-08

Abstract

AIM: To study the distribution of HBV genotypes and the clinical relevance of genotype with hepatitis B in Lhasa, Tibet Autonomous Region of China.

METHODS: Ninety two HBV-infected cases were analyzed for genotypes using gene chip technology. And association between its epidemiology, DNA content, liver function, gender and ethnicity was investigated.

RESULTS: Seventy-three HBV DNA positive cases with varying genotypes showed significant differences ($\chi^2 = 7.179, P < 0.05$). Among HBV DNA positive samples, there were 32 cases of e antigen positive, and no significant difference was observed in the DNA content but significant difference was detected in the national e antigen positive rate ($\chi^2 = 8.423, P < 0.05$). Genotypes B and C were mostly present in the Han nationality, while D-type existed mainly in Tibetan. ALB was lower in type D,C than in B, but GLB was higher in B. CHB and LC were mainly present in patients D and C genotypes ($F = 3.832, P < 0.05$).

CONCLUSION: The HBV genotype DNA load shows no difference and no significant association between liver function enzymes and disease conditions, and protein changes are more notable. Patients with C or D genotype are more vulnerable to disease progression than those with B genotype in Lhasa, Tibet region.

Key Words: Hepatitis B virus; Genotype; Gene chip

Cao ZL, Gao YT, Ji Z, Liu CJ, Bao BH, Zhao JM. Relationship between distribution of HBV genotypes and liver diseases in Lhasa. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(1): 49-52

摘要

目的: 研究西藏拉萨地区HBV基因型的分布特点及基因型与临床肝病的相关性。

方法: 采用基因芯片技术对92例乙肝病毒感染者进行HBV基因分型, 并分析其流行病学、DNA含量、肝功能以及性别和民族之间的关系。

结果: 73例HBV DNA阳性者不同基因型在不同民族间存在统计学差异($\chi^2 = 7.179, P < 0.05$)。HBV DNA阳性标本中, e抗原阳性者32例, 不同基因型DNA含量之间无统计学差异, 但民族之间e抗原阳性率存在统计学差异($\chi^2 = 8.423, P < 0.05$)。B、C型较多的存在于汉族中, 而D型多存在于藏族中。不同酶类之间D基因型均高于C、B型, 仅在蛋白类之间存在统计学差异, D、C型ALB较B型低、而GLB较B型高。

背景资料

乙型肝炎病毒感染可引起急、慢性病毒性肝炎, 继而可发展为肝硬化、肝细胞癌, 已成为重要的公共卫生问题之一。我国乙型肝炎患者中基因型B多见于南方, C型多见于北方, D型仅见于西藏、新疆等少数民族地区, A和F型偶见, 未见E、G、H型。

同行评议者

李淑德, 主任医师, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

■ 研究前沿

西藏地域相对封闭,又靠近中亚地区,其HBV基因型的分布特点及其与临床肝病的相关性值得研究。

CHB、LC更多存在D、C基因型($F = 3.832$, $P < 0.05$)。

结论: 拉萨地区HBV各基因型DNA载量无差异,肝功酶类与病情变化无明显关系、蛋白类变化较显著,C、D基因型患者较B基因型易发生肝病进展。

关键词: 乙型肝炎病毒; 基因型; 基因芯片

曹占良, 高英堂, 吉宗, 刘持佳, 鲍布和, 赵金梅. 西藏拉萨地区乙型肝炎病毒基因型分布及与肝病的关系. 世界华人消化杂志 2009; 17(1): 49-52

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/49.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染可引起急、慢性病毒性肝炎,继而可发展为肝硬化、肝癌,已成为重要的公共卫生问题之一。HBV DNA含有部分双链结构,约由3200个碱基对组成,根据HBV全基因序列>92%的同源性,可将HBV分为A-H等8种基因型^[1-2]。我国乙型肝炎患者中基因型B多见于南方,C型多见于北方,D型仅见于西藏、新疆等少数民族地区,A和F型偶见,未见E、G、H型^[3-5]。西藏地域相对封闭,又靠近中亚地区,其HBV基因型的分布特点及其与临床肝病的相关性值得研究。本文在应用基因芯片技术检测西藏拉萨地区的乙肝病毒基因型^[6]的基础上,进一步了解其HBV基因型分布情况与临床肝病的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 92例血液标本均于2004年采自西藏拉萨地区武警西藏总队医院门诊及住院的HBV感染者,年龄4-67岁。汉族男21、女17例,藏族男26、女28例。其中73例血清HBV DNA阳性患者中,按2000年《病毒性肝炎防治方案》标准诊断为无症状乙型肝炎表面抗原携带者(asymptomatic HBsAg carrier, ASC)30例,慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)36例,肝硬化(liver cirrhosis, LC)7例。血清标本-80℃保存。荧光定量PCR仪(ABI Prism 7000 美国),DY2003生物芯片点样仪(中科院),CL-1000M紫外交联仪(美国UVP公司),7180生化分析仪(日本日立公司),DNA测序由北京三博远志公司完成。HBV DNA定量检测试剂盒(中山达安基因中心),芯片检测试剂、PCR产物克隆试剂、PCR引物及芯片探针等由天津市第三中心医院天津市人工细胞重点实验室制作。生化试剂

(北京科美东雅公司)。

1.2 方法

1.2.1 HBV DNA定量和标志物检测: 采用荧光定量-聚合酶链反应(FQ-PCR)法检测病毒定量。用酶联免疫法(ELISA)检测病毒标志物。HBV DNA提取、PCR扩增和数据分析均按达安基因诊断中心的试剂盒操作说明进行。

1.2.2 血生化指标: 用7180生化分析仪检测血清中总胆红素(T-BiL)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、谷氨酰转肽酶(γ -GT)、白蛋白(ALB)、球蛋白(GLB)等参数。

统计学处理 实验结果经 χ^2 检验及完全随机设计方差分析。应用SPSS13.0统计软件。

2 结果

2.1 HBV 基因分型芯片杂交 DNA基因分型芯片的制备与检测、结果判读 参见文献[6]。HBV基因分型芯片杂交图(见图1)。

2.2 HBV基因型分布 对73例HBV DNA阳性者进行基因分型,结果不同基因型在年龄、性别之间的分布差异无统计学意义,但不同民族间存在统计学差异($\chi^2 = 7.179$, $P < 0.05$)。B型较多的存在于汉族感染者中,而C、D型更多存在藏族感染者中(表1)。

2.3 不同基因型感染者血清HBV标志物比较 73例HBV DNA阳性标本中,e抗原阳性者32例,不同基因型DNA含量之间无统计学差异($F = 0.553$, $P > 0.05$),但民族之间e抗原阳性率存在统计学差异($\chi^2 = 8.423$, $P < 0.05$),B、C型较多的存在于汉族中,而D型多存在藏族中(表2)。

2.4 不同基因型与肝功能指数的关系 检测T-BiL、ALT、AST、 γ -GT、ALB、GLB参数,表明不同酶类之间D基因型均高于C、B型,仅在蛋白类之间存在统计学差异($P < 0.05$),D、C型ALB较B型低,而GLB较B型高(表3)。

2.5 HBV感染者基因型与临床表现比较 CHB、LC更多存在D、C基因型($P < 0.05$, 表4)。

3 讨论

HBV DNA含有部分双链结构,根据HBV全基因序列的同源性>92%或者S基因序列同源性>96%,可将HBV分为8种基因型^[1-2],HBV基因组核苷酸序列分析方法有多种,基因芯片(型特异探针反向杂交法)为目前比较理想实用的方法。因其具有高通量、并行、快速等特点,所以在病毒基因表达谱研究、病毒感染的诊断、病毒流行病学研究等方面被广泛应用^[7-8]。

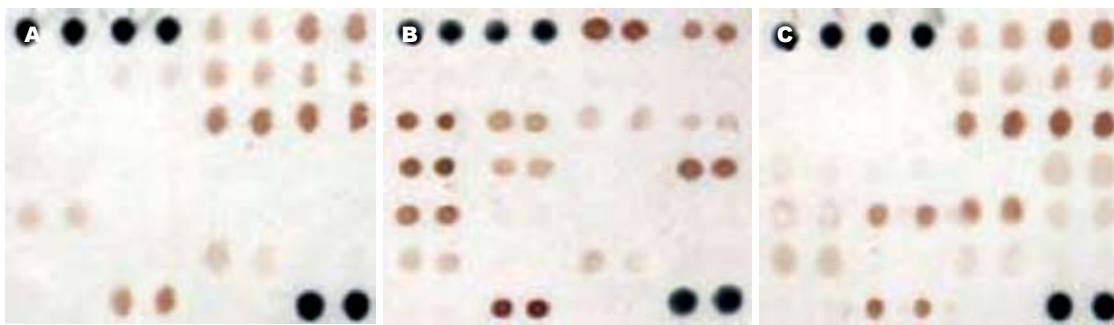


图 1 HBV基因分型芯片杂交图. A: 乙型肝炎病毒B基因型; B: C基因型; C: D基因型.

■ 相关报道

有学者认为与C型HBV相比, 感染B基因型的患者有较低的HBeAg阳性率和更快的血清转换率, 有报道HBeAg阳性率与基因型B和C之间无相关性, 也有报道HBeAg阳性率B基因型较C型高, 李威曾报道, 云南大理白族人群乙型肝炎病毒B、C基因型中HBeAg阳性率分别为68.3%、40.0%。

表 1 73例HBV感染者不同基因型分布

基因型	n(%)	性别		民族		年龄(岁)
		男 n(%)	女 n(%)	汉 n(%)	藏 n(%)	
B	13(17.8)	6(46.2)	7(53.8)	9(69.2)	4(30.8)	30.0 ± 6.1
C	18(24.7)	8(44.4)	10(55.6)	6(33.3)	12(66.7)	30.8 ± 17.2
D	39(53.4)	21(53.8)	18(46.2)	11(28.2)	28(71.8)	33.7 ± 16.7
B/D	3(4.1)	3(100.0)	0(0.0)	2(6.7)	1(3.6)	31.7 ± 7.7

民族间不同基因型构成, $\chi^2 = 7.179, P < 0.05$.

表 2 73例不同基因型感染者血清HBV标志物比较

基因型	n	HBV DNA (log10)	e抗原阳性			HBV DNA(log10)
			n(%)	汉 n(%)	藏 n(%)	
B	13	5.43 ± 2.92	7(53.8)	6(85.7)	1(14.3)	7.06 ± 1.72
C	18	3.96 ± 3.70	6(33.3)	4(66.7)	2(33.3)	7.38 ± 2.66
D	39	4.92 ± 4.51	19(48.7)	5(26.3)	14(73.7)	7.36 ± 2.63
B/D	3	2.24 ± 3.62	0			

不同基因型DNA含量, $F = 0.553, P > 0.05$; 民族间不同基因型e抗原阳性率, $\chi^2 = 8.423, P < 0.05$.

不同地区HBV的流行株各异, 其基因型与临床致病性的关系结论不一. 有学者认为与C型HBV相比, 感染B基因型的患者有较低的HBeAg阳性率和更快的血清转换率, 有报道HBeAg阳性率与基因型B和C之间无相关性, 也有报道HBeAg阳性率B基因型较C型高, 李威曾报道, 云南大理白族人群乙型肝炎病毒B、C基因型中HBeAg阳性率分别为68.3%、40.0%^[9-13]. Thakur *et al*在印度CHB患者中研究发现, D型与多种严重肝病如LC及肝细胞癌密切相关, 可预测年轻患者肝癌的发生^[14]. Mayerat *et al*对欧洲地区肝病患者研究表明, A型和D型相比, A型在慢性乙肝感染患者中更常见, 而急性感染患者中更普遍的为D基因型^[15]. 对亚洲肝病患者研究显示, 许多严重肝病的发生与基因型C的关系比

与基因型B更密切^[16]. 本次调查B、D基因型中HBeAg阳性率较高, 分别为53.8%、48.7%; C基因型中HBeAg阳性率为33.3%. 3种基因型DNA含量之间无统计学差异, e抗原阳性感染者B、C型更多的存在于汉族中, 说明与汉族迁移藏区有关; 而D型更多的存在于藏族中, 进一步说明该地区优势基因型为D型.

HBV的生物学特性因基因型不同各有差异. 本研究在基因型与肝功生化指标比中发现D基因型患者肝脏炎症程度较重, 其ALT、AST、 γ -GT水平较高于B、C基因型, 但无统计学差异 ($P > 0.05$). 在临床特征上, 基因型D与基因型A、B、C相比存在差异^[17], D型病毒变异株感染者的血清ALT水平高于其他基因型变异株感染者, 说明基因型D的肝炎活动程度可能较高. 较多的文献报道ALT与AST在基因型间无明显差异, 朱琪报道, B、C基因型间ALT与AST差异无统计学意义, 孔洪彬报道CHB C基因型患者肝功能指标ALT、AST、T-BIL均值高于B基因型, 差异无统计学意义^[18-19]. 本研究结果进一步表明各种基因型与肝功各酶类水平的关系差异无显著性. D、C基因型ALB水平较B型降低, 而GLB水平较B型升高, 蛋白之间差异存在统计学意义 ($P < 0.05$), 球蛋白的升高和白蛋白的降低往往提示着慢性肝病的迁延, LC患者的变化较CHB更加明显^[20], 然而肝组织病理学检查在衡量炎症活动度、纤

■同行评价

本研究设计合理, 结论可靠, 具有研究价值。

表 3 73例HBV感染者基因型与肝功能指标的关系

基因型	n	TBIL	ALT(U/L)	AST(U/L)	γ -GT(U/L)	ALB(g/L)	GLB(g/L)
B	13	15.9 ± 4.5	112.8 ± 86.7	55.1 ± 42.4	63.2 ± 38.6	38.2 ± 6.9	32.6 ± 6.6
C	18	16.5 ± 4.2	105.2 ± 79.6	51.5 ± 37.2	62.6 ± 40.7	35.8 ± 7.0	34.8 ± 6.4
D	39	16.7 ± 3.8	129.2 ± 94.7	75.6 ± 42.3	74.5 ± 45.2	35.2 ± 6.8	34.5 ± 6.9
B/D	3	15.3 ± 2.7	96.5 ± 68.5	57.3 ± 29.2	72.4 ± 38.1	35.3 ± 5.4	33.9 ± 5.8

ALB: $F = 7.626, P < 0.05$; GLB: $F = 3.181, P < 0.05$.

表 4 73例HBV感染者基因型与临床分型相关比较

临床分型	n	HBV基因型 n(%)			
		B	C	D	B/D
ASC	30	8(61.54)	7(38.89)	15(38.46)	0(0.0)
CHB	36	5(38.46)	9(50.00)	20(51.28)	2(66.67)
LC	7	0(0.0)	2(11.11)	4(10.26)	1(33.33)

$F = 3.832, P < 0.05$.

维化程度等方面依然是金标准。

HBV病毒的复制、肝病的演化及抗病毒治疗等均与HBV基因分型有关。对于西藏高原少数民族地区, 进一步了解HBV基因分布情况、研究基因型与临床肝病的关系, 对明确该地区HBV基因型分布、特点以及提高肝炎防治水平极为重要。

4 参考文献

- Mahoney FJ. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 351-366
- Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002; 83: 2059-2073
- Zeng G, Wang Z, Wen S, Jiang J, Wang L, Cheng J, Tan D, Xiao F, Ma S, Li W, Luo K, Naoumov NV, Hou J. Geographic distribution, virologic and clinical characteristics of hepatitis B virus genotypes in China. *J Viral Hepat* 2005; 12: 609-617
- 赵鸿, 李俊, 李兴丰, 斯崇文, 于敏, 公维波, 于岩岩, 王贵强. 感染乙型肝炎病毒不同基因型和亚型患者的临床特点分析. *中华流行病学杂志* 2007; 28: 74-77
- 高俊薇, 李雅娟, 庄辉, 李杰, 王佳, 董庆鸣, 陈雅洁, 牛俊奇, 马为民, 赵伟, 赵保安, 钟金群. 中国11城市乙型肝炎病毒慢性感染者中乙型肝炎病毒基因型分布. *中华流行病学杂志* 2007; 28: 315-318
- 曹占良, 高英堂, 刘霜, 景丽, 吉宗, 刘彤, 刘持佳, 杜智. 基因芯片技术检测西藏拉萨地区的乙型肝炎病毒基因型. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3500-3506
- Tang XR, Zhang JS, Zhao H, Gong YH, Wang YZ, Zhao JL. Detection of hepatitis B virus genotypes

using oligonucleotide chip among hepatitis B virus carriers in Eastern China. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1975-1979

- 彭俊平, 金奇. 基因芯片技术在病毒学研究中的应用现状. *病毒学报* 2003; 19: 281-283
- Lindh M, Hannoun C, Dhillon AP, Norkrans G, Horal P. Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers. *J Infect Dis* 1999; 179: 775-782
- Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Genotypes and clinical phenotypes of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1207-1209
- Lim CK, Tan JT, Khoo JB, Ravichandran A, Low HM, Chan YC, Ton SH. Correlations of HBV genotypes, mutations affecting HBeAg expression and HBeAg/ anti-HBe status in HBV carriers. *Int J Med Sci* 2006; 3: 14-20
- 蒋音, 翁上雅史, 蔡枫, 刘锦华, 巫善明. 乙型肝炎病毒基因分型与临床意义. *中华传染病杂志* 2006; 24: 417-419
- 李威, 张煜榕, 申元英, 任来峰, 沈茹, 李强, 赵海平. 云南大理白族人群乙型肝炎病毒基因型和亚型的分布. *中国病原生物学杂志* 2008; 21: 166-169
- Thakur V, Guptan RC, Kazim SN, Malhotra V, Sarin SK. Profile, spectrum and significance of HBV genotypes in chronic liver disease patients in the Indian subcontinent. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 165-170
- Mayerat C, Mantegani A, Frei PC. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J Viral Hepat* 1999; 6: 299-304
- 余伍忠, 陈虎山. 乙型肝炎病毒基因分型的临床意义. *中国优生与遗传杂志* 2007; 15: 126-127
- Kidd-Ljunggren K, Myhre E, Bläckberg J. Clinical and serological variation between patients infected with different Hepatitis B virus genotypes. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5837-5841
- 朱琪, 江家骥, 郑松龄, 黄祖雄, 柯坤宇, 胡盈莹, 郭锡麟. 乙型肝炎病毒B、C基因与临床关系的探讨. *海峡预防医学杂志* 2007; 13: 16-18
- 孔洪彬, 李友生, 李兴丰, 赵鸿. 慢性乙型肝炎病毒基因型和亚型分布及与临床关系的探讨. *中国实用内科杂志* 2007; 27: 1779-1781
- 于红缨, 邵凌云, 符政远, 蒋建勇, 王菲菲, 王金蕾, 孟成艳, 张文宏. 湖南省怀化市少数民族及汉族慢性乙型肝炎患者病毒基因分型及临床分析. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)* 2008; 2: 45-48

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

应用SELDI-TOF-MS技术初步建立结直肠癌分类树模型

范乃军, 高春芳, 王秀丽, 盛新华, 李冬晖, 郑国宝

范乃军, 盛新华, 中国人民解放军第二军医大学 上海市 200433

高春芳, 王秀丽, 李冬晖, 郑国宝, 中国人民解放军150中心医院全军肛肠外科研究所 河南省洛阳市 471031

范乃军, 中国人民解放军第二军医大学2006级外科学硕士在读, 主要从事胃肠道肿瘤蛋白质组学方面的研究。

作者贡献分布: 范乃军与高春芳对此文所作贡献均等; 此课题由范乃军, 高春芳, 盛新华, 郑国宝, 王秀丽及李冬晖设计; 研究过程由范乃军, 王秀丽及盛新华操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由王秀丽及李冬晖提供; 数据分析由王秀丽及范乃军完成; 本论文写作由范乃军完成。

通讯作者: 高春芳, 471031, 河南省洛阳市, 中国人民解放军150中心医院全军肛肠外科研究所. fandocor123@163.com
电话: 0379-64169001

收稿日期: 2008-09-27 修回日期: 2008-12-06

接受日期: 2008-12-08 在线出版日期: 2009-01-08

Identification of colorectal cancer patients by serum protein profile using surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

Nai-Jun Fan, Chun-Fang Gao, Xiu-Li Wang,
Xin-Hua Sheng, Dong-Hui Li, Guo-Bao Zheng

Nai-Jun Fan, Xin-Hua Sheng, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China
Chun-Fang Gao, Xiu-Li Wang, Dong-Hui Li, Guo-Bao Zheng, Institute of Anal-colorectal Surgery, No.150 Hospital of Chinese PLA, Luoyang 471031, Henan Province, China

Correspondence to: Chun-Fang Gao, Institute of Anal-colorectal Surgery, No.150 Hospital of Chinese PLA, Luoyang 471031, Henan Province, China. fandocor123@163.com

Received: 2008-09-27 Revised: 2008-12-06

Accepted: 2008-12-08 Published online: 2009-01-08

Abstract

AIM: To establish a serum protein fingerprinting technique coupled with a pattern-matching algorithm to distinguish colorectal cancer from healthy individuals.

METHODS: Serum samples were applied to metal affinity protein chips to generate mass spectra by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS). Protein peak identification and clustering were performed using the Biomarker Wizard software. Proteomic spectra of serum samples

from 84 colorectal cancer patients and age- and sex-matched 83 healthy individuals were used as a training set and a classification tree with 1 distinct protein masses was generated by using Biomarker Pattern software. The validity of the classification tree was then challenged with a blind test set including another 85 colorectal cancer patients and 83 healthy individuals. We additionally determined carcinoembryonic antigen (CEA) in all the serum samples included in the blind test set using an electrochemiluminescent immunoassay.

RESULTS: The software identified an average of 59 mass peaks/spectrum and 1 of the identified peaks at 5765 was used to construct the classification tree. The classification tree separated effectively colorectal cancer from healthy individuals, with a sensitivity of 98.81% and a specificity of 100.00%. The blind test challenged the model with a sensitivity of 97.65% and a specificity of 98.80%, and a positive predictive value of 98.81%, respectively. The specificity and sensitivity provided by CEA were significantly lower than that of the SELDI marker pattern ($P < 0.05$).

CONCLUSION: SELDI-TOF-MS technique can correctly distinguish colorectal cancer patients from healthy individuals and shows great potential for the development of a screening test for the detection of colorectal cancer.

Key Words: Surface enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry; Colorectal neoplasm; Seral biomarkers; Proteomics; Protein-chip array analysis

Fan NJ, Gao CF, Wang XL, Sheng XH, Li DH, Zheng GB. Identification of colorectal cancer patients by serum protein profile using surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(1): 53-58

摘要

目的: 分析结直肠癌期患者血清蛋白质组变化, 初步建立结直肠癌期分类树模型。

背景资料

结直肠癌的诊断及治疗发生了很大的改进, 但其发病率 and 死亡率并未发生根本的变化, 主要原因在于缺乏高灵敏度、特异度的早期诊断方法。SELDI-TOF-MS是蛋白质芯片和质谱技术的结合, 具有高通量、高灵敏度等技术优势, 可检测到传统方法检测不到的蛋白质或多肽, 已成为肿瘤蛋白质组学主要技术平台之一, 为肿瘤早期诊断的研究开拓了新的视野。

同行评议者

何超, 教授, 浙江大学医学院附属邵逸夫医院肛肠外科

■研发前沿

应用SELDI-TOF-MS技术进行比较蛋白质组学研究已成为疾病蛋白质组学研究的热点,不同的研究小组建立了多种疾病的血清或组织蛋白质质谱分类树模型,发现了一些有意义的蛋白质或多肽,但由于这些标志物多是低丰度、小分子量蛋白,其鉴定是一项具有挑战性的工作。

方法: 将335例血清样本(其中结直肠癌患者169例,健康人166例)随机分为训练组和测试组,将血清样本加至IMAC30-Cu²⁺蛋白芯片,利用SELDI-TOF-MS得到血清蛋白质质谱,利用Biomarker Wizard软件进行蛋白峰值鉴定和聚类.利用Biomarker Pattern以训练组建立由1个差异蛋白组成的结直肠癌期分类树模型,以测试组进行独立样本的双盲验证.另外,应用电化学发光免疫测定法检测测试组血清样本CEA.

结果: 软件识别了59个质峰,其中由质荷比为5765的蛋白构成的分类树模型可以有效鉴别结直肠癌患者与正常人,灵敏度和特异度分别是98.81%及100.00%,经双盲验证其灵敏度、特异度及阳性预测值分别是97.65%, 98.80%及98.81%. CEA的灵敏度及特异度低于SELDI分类树模型($P < 0.05$).

结论: SELDI-TOF-MS检测得到的血清蛋白质组分类树模型可以准确的鉴别结直肠癌患者与正常人,对结直肠癌的筛查有重要的意义.

关键词: 表面增强激光解析离子化飞行时间质谱仪; 结直肠癌; 血清生物标志物; 蛋白质组学; 蛋白质微阵列分析

范乃军, 高春芳, 王秀丽, 盛新华, 李冬晖, 郑国宝. 应用SELDI-TOF-MS技术初步建立结直肠癌分类树模型. 世界华人消化杂志 2009; 17(1): 53-58

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/53.asp>

0 引言

结直肠癌的发病率和死亡率在欧美及中国均居前列.目前结直肠癌的诊断及治疗较30年前发生了很大的改进,但其发病率和死亡率并未发生根本的变化,主要原因在于缺乏高灵敏度、特异度的早期诊断方法.表面增强激光解析离子化飞行时间质谱仪(surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, SELDI-TOF-MS)是蛋白质芯片和质谱技术的结合,在肿瘤标志物的发现和诊断方面已崭露巨大的潜力.结直肠散发性中分化腺癌是结直肠癌的主要病理类型.利用SELDI-TOF-MS和铜离子螯合蛋白芯片(IMAC30-Cu²⁺)检测了结直肠散发性中分化腺癌患者及正常人的血清样本,利用相关软件进行蛋白峰值鉴定和聚类,比较结直肠癌患者与正常人血清蛋白质组构型的变化,建立了由1个差异蛋白组成的结直肠癌血清蛋白分类树模型,并进行独立样本的双盲验证,可以准确的鉴别结直

肠癌与正常人,对结直肠癌的筛查有重要意义,现报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 结直肠散发性中分化腺癌患者血清标本169例来自中国人民解放军150中心医院2006-10/2008-03住院患者,健康志愿者血清标本166例来自2007年在中国人民解放军150中心医院健康体检者.取样人群有相似的暴露史,汉族,年龄范围为18-82岁,结直肠癌及正常人的性别比(男/女)分别是0.97及0.98,采用完全随机化的方法分别将样本分为训练组和测试组,2组中结直肠癌患者及正常人分别是84/83及85/83例,年龄、性别的差异无显著性.结直肠癌患者均经术后病理检查,根据AJCC的TNM分期2004确诊为结直肠中分化腺癌^[1],训练组I、II、III、IV期患者各13、37、25和9例,测试组I、II、III、IV期患者各13、36、26和10例,无家族史,正常人经纤维结肠镜、B超、ECG、血清CEA等检查,除外肿瘤及炎症性、代谢性等影响血清蛋白表达的相关疾病.告知所有受试者本人或其家属该研究的目的、方法及意义,经同意后,签署知情同意书.尿素、乙腈、三氟乙酸、SPA(sinapinic)、CHAPS、Tris-HCL等均购自Sigma公司,美国CIPHERGEN Biosystem公司的ProteinChip Biology System(PBS II+)及其配套的IMAC30-Cu²⁺蛋白芯片、SELDI-TOF-MS购自美国CIPHERGEN Biosystem公司.

1.2 方法

1.2.1 样品的收集: 清晨空腹采集肘静脉全血5 mL后立即放入4℃冰箱静置2 h, 4℃、1000 r/min离心30 min,吸取血清分装成100 μL/管,共4管,做好标记,置于-70℃冰箱保存,另取正常入血标本30mL进行预实验,处理方法同上,吸取血清分装成每管40 μL,共64管.

1.2.2 样品的准备及分组: 溶解冰冻血清并4℃、20000 g离心10 min,每个样品取20 μL血清,分别加40 μL U9缓冲液(含9 mol/L尿素, 2% CHAPS, 50 mmol/L Tris-HCl pH9.0), 4℃、200 r/min振荡30 min,使蛋白质变性.将120 μL结合/洗脱缓冲液(含100 mmol/L磷酸钠, 500 mmol/L氯化钠, pH7.0, 即IMAC缓冲液)加入1.5 mL离心管,每管加入10 μL变性后的血清样品, 4℃、200 r/min振荡30 min.将64份预实验样本分成8组,以8条IMAC30-Cu²⁺芯片检测,评价质谱图在芯片之间及同1芯片不同芯池之间的重复性.采用随机区组法将实验样本分为42组,每组8例分别加

■相关报道

Melle *et al*利用SELDI-TOF-MS和相关蛋白质组学技术发现和鉴定了S100A11在结直肠癌组织中的表达水平高于其在正常上皮和腺癌组织中的表达.

至同一条芯片的8个芯池A-H(每组正常人及结直肠癌患者各4例, 第42组结直肠癌患者5例, 正常人2例).

1.2.3 芯片的预处理: 预处理方法如文献[2]所述, 主要包括: 芯片每个芯池加入100 mmol/L CuSO_4 50 μL , 4 $^\circ\text{C}$, 200 r/min振荡5 min, 倒除 CuSO_4 残液, 去离子水冲洗5次后甩干, 每个芯池加入100 mmol/L醋酸钠(pH4.0)50 μL , 4 $^\circ\text{C}$ 、200 r/min振荡5 min, 倒除醋酸钠残液, 去离子水冲洗5次后甩干, 每个芯池加入150 μL IMAC缓冲液, 4 $^\circ\text{C}$ 、200 r/min振荡5 min后倒除残液重复1次, 每个芯池加入50 μL 稀释后的样品, 4 $^\circ\text{C}$ 、200 r/min振荡60 min后倒除残液, 以150 μL IMAC缓冲液冲洗3次, 每次4 $^\circ\text{C}$ 、200 r/min振荡5 min, 最后以1 mmol/L HEPES(pH7.0)快速冲洗; 取出芯片, 在每个芯池周围以疏水笔圈样品孔并风干; 取2 mg EAM(SPA)置于1.5 mL离心管中, 加入30 μL 乙腈和30 μL 1% TFA, 室温1800 r/min振荡5 min使SPA全部溶解, 离心1 min; 每个芯池加SPA 2次, 每次0.5 μL , 2次之间允许各孔风干.

1.2.4 芯片检测: 用加有all-in-one标准蛋白质的NP20芯片校正质谱仪, 设定仪器参数, 激光强度175, 检测灵敏度8, 优化相对分子质量范围1500-20000, 最佳聚焦中心6000, 数据采集参数范围20-80, 收集点数为100次. 在CIPHERGEN ProteinChip软件中设定读片程序读取芯片数据, 计算机以 1×10^9 Hz/s的速度获得原始数据并快速精确的绘制出蛋白质谱图, 其横坐标为质荷比(M/Z), 纵坐标为蛋白质相对含量.

1.2.4.1 蛋白质的M/Z: 结合EAM后的蛋白质在SELDI-TOF-MS氦氛激光器的激光轰击下电离, 带有电荷的蛋白质在加速电场的作用下, 不同质荷比的蛋白质在一定的真空管中飞行所需时间不同, 蛋白质M/Z与离子飞行时间的平方成正比. 由 $E = UZ = 1/2mv^2$ 和 $t = L/V$ 推出 $M/Z = Kt^2 = (2U/L^2)t^2$. 其中Z为离子所带电荷数, U为电压, V为飞行速度, L为加速飞行电场电压, K为常数.

1.2.4.2 蛋白质相对含量: 带有正电荷的蛋白质离子束在到达检测器的一瞬间, 电子倍增器将产生瞬时电流(瞬时电流 $I_t = Q/t$, 其中Q为t时刻检测器检测到的电荷数)转换成蛋白质相对含量.

1.2.5 血清样本CEA的检测: 应用电化学发光免疫测定法(试剂盒由郑州博赛生物试剂实验研究所提供)检测测试组168例受试者血清样本的CEA, $<5 \mu\text{g/L}$ 诊断为正常, $\geq 5 \mu\text{g/L}$ 诊断为结直肠癌.

表1 结直肠癌患者与正常人血清中的部分差异蛋白

差异蛋白的M/Z	结直肠癌组的均数	正常人组的均数	P	结直肠癌组的表达变化
3901	0.23	3.42	0	↓
4105	4.72	0.50	0	↑
4224	-0.16	4.11	0	↓
4499	6.89	0.88	0	↑
4943	6.01	0.29	0	↑
5765	38.30	0.39	0	↑
5785	14.20	0.32	0	↑
5921	0.41	10.87	0	↓
5970	6.52	1.93	0	↑
6289	5.16	0.75	0	↑
7398	3.46	0.20	0	↑
7596	40.34	4.82	0	↑
7617	13.30	0.92	0	↑
7638	4.01	-0.03	0	↑
7662	3.72	0.74	0	↑
7718	-0.67	6.84	0	↓
7966	10.79	4.27	0	↑
8761	3.53	0.67	0	↑
9118	9.66	1.54	0	↑

■创新盘点

利用SELDI-TOF-MS进行结直肠癌的比较蛋白质组学研究, 发现了多个有意义的蛋白, 科研设计严密, 结果符合统计学要求.

统计学处理 用Ciphergen ProteinChip软件和BioMarker Wizard软件对芯片检测得到的蛋白质相对含量及蛋白质M/Z数据按数据库挖掘要求进行处理. 通过BioMarker Wizard软件用方差分析对同一M/Z对应蛋白的相对含量在不同组间的差异进行统计学分析. 用数据挖掘软件Biomarker Pattern(其采用的是决策树方法对目标对象进行分类)对数据组及相关性进行分析. SPSS13.0用于分类树模型和CEA两种诊断方法的比较、分析一般病历资料、计算预试验样本中所选取3个M/Z对应蛋白相对含量的变异系数.

2 结果

2.1 质谱图分析 用BioMarker Wizard软件对结直肠癌84例和正常人83例的质谱图进行比较分析, 共检测到有差异的蛋白质峰59个(图1), 其中差异有显著性的有54个($P < 0.05$, 表1).

2.2 训练组在学习模式下结直肠癌分类树模型的建立 用BioMarker Wizard软件和Biomarker Pattern软件在学习模式下分析84例结直肠癌患者与83例正常人血清中蛋白质的组成, 结果发现M/Z为5765的蛋白组成的分类树模型可将结直肠癌患者与正常人准确的分组. 用此生物标志物分析数据共产生1个节点(图2): 在节点1处, 满足 $5765 \leq 3.325$ (终节点1)诊断为正常人, 满足

应用要点

SELDI-TOF-MS检测得到的血清蛋白质组分类树模型可用于结直肠癌的初步筛查,为血清标志物的发现提供了目标蛋白。

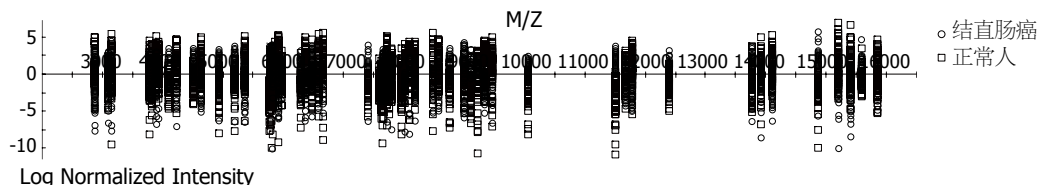


图1 结直肠癌与正常人不同M/Z对应蛋白相对含量的比较. Y轴: 蛋白的相对含量, X轴: 蛋白的M/Z.

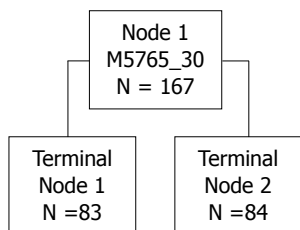


图2 可以鉴别结直肠癌与正常人的分类树模型. 满足 $5765 \leq 3.325$ (终节点1)诊断为正常人, 满足 $5765 > 3.325$ (终节点2)诊断为结直肠癌.

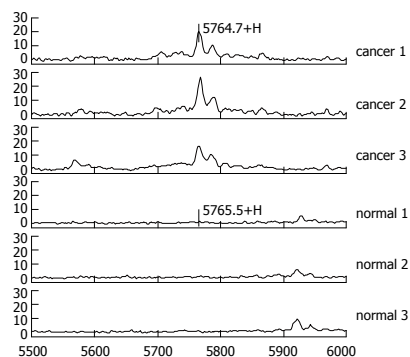


图3 M/Z 5765蛋白峰的相对含量在结直肠癌组高于正常人组(质谱图).

$5765 > 3.325$ (终节点2)诊断为结直肠癌.

2.3 训练组在学习模式下分类树模型的准确率 用Biomarker Pattern软件统计学分析结果显示: 训练组样本在学习模式下由M/Z为5765的蛋白组成的分类树模型在学习模式下可以将84例结直肠癌患者及83例健康志愿者完全正确分组, 正确率为100.00%(167/167).

2.4 训练组在测试模式下分类树模型的灵敏度、特异性及约登指数 训练组样本在测试模式下对上述分类树模型进行交叉验证, 结果83/84例结直肠癌患者被本方法正确诊断, 83/83例正常人被本法正确诊断, 灵敏度、特异性及约登指数(Youden's index, YI)分别为98.81%、100.00%和0.99.

2.5 独立样本双盲验证 另取结直肠癌患者血清标本各85例及正常人血清标本83例对分类树模型进行独立样本的双盲验证, 分类树模型可以将83/85例结直肠癌患者、82/83例正常人正确分组, 正确率、灵敏度、特异性、YI及阳性预测值分别为98.21%(165/168)、97.65%(83/85)、98.80%(82/83)、0.97和98.81%(83/84).

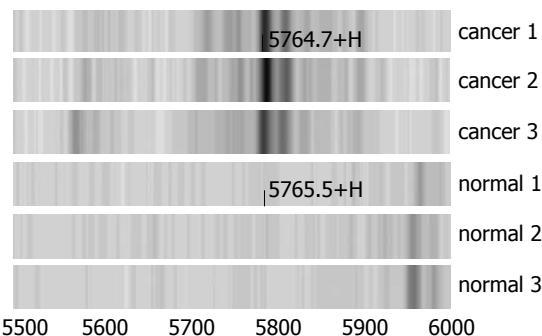


图4 M/Z 5765蛋白峰的相对含量在结直肠癌组高于正常人组(质谱图模拟胶图).

2.6 M/Z 5765蛋白峰在结直肠癌组与正常人组的含量差异 M/Z 5765蛋白峰的相对含量在结直肠癌组高于正常人组, 经方差分析其差异有显著性($P=0$, 图3-4).

2.7 质量控制和重复性 将同一志愿者的血清分成64份, 以8条IMAC30-Cu²⁺芯片检测, 从质谱图中随机挑选3个波峰, 计算其在不同芯片以及同1条芯片不同芯池之间相对强度的变异系数, 小于3%, 说明在不同芯片以及同1条芯片不同芯池之间M/Z和波峰强度具有较好的重复性.

2.8 血清样本CEA的检测 采用郑州博赛生物试剂实验研究所提供的试剂盒通过电化学发光免疫测定法检测了测试组168例样本的CEA, 正常参考值: $<5 \mu\text{g/L}$, 34/85例结直肠癌患者、30/83例正常人被正确诊断, 灵敏度、特异性和阳性检测率分别为40%、36.14%, 阳性检测率低于结直肠癌分类树模型($\chi^2 = 10.7, P < 0.005$).

3 讨论

结直肠癌是常见恶性肿瘤之一, 5年生存率随肿瘤分期的增高而显著降低^[3-5], 对不具有高危因素的结直肠癌患者在50岁前后切除而具有高危因素的结直肠癌患者在50岁之前切除可以显著降低结直肠癌的新发生率及死亡率^[6]. 因此早期诊断、及时治疗是提高结直肠癌预后的主要因素. 目前结直肠癌的诊断主要依赖于对高危人群进行体格检查、大便潜血试验、X线、CT、纤维结肠镜, 但是这些方法对结直肠癌的诊断

尤其是对 I 期的诊断较为困难. 发现对结直肠癌不同分期和亚型有意义的标志物对结直肠癌的预防、诊断及治疗有重要意义^[7-8]. 但是, 目前常用的血清标志物如CEA、CA19-9、CA242、CA72-4以及组织多肽抗原、组织多肽特意抗原等对结直肠癌的诊断灵敏度、特异度较低^[8]. 肿瘤的多因素特性表明多种标志物的联合检测对肿瘤的早期发现和诊断有重要意义^[9].

基因组学及蛋白质组学的迅速发展为结直肠癌诊断和标志物鉴定等方面的研究提供了新思路. 基因的功能不仅由排序决定, 他给予生命信息之多, 变异之广使罹病机制成了一个极其复杂的问题^[10]. 蛋白质由含特定DNA序列的氨基酸经四级结构装配而成, 不同的蛋白质由于组成的肽链和结构不同, 有着不同的生物学功能, 他直接反映基因给予的信息, 他的功能一旦出现异常就可引发疾病, 复杂的蛋白质组学模型可以反应多种组织的病理状态, 蛋白质组学技术可以鉴别肿瘤细胞的不同亚型, 通过对这些蛋白或肽的定量与定性研究, 可以发现肿瘤特异标志物. 因此, 研究蛋白质的组成及性质是揭示基因和疾病联结链条中的关键一环, 而肿瘤蛋白质组学为肿瘤标志物的发现提供了一个新的方法, 应用这种方法, 已经发现和鉴定了载脂蛋白A1等一些标志物^[11-13]. 肿瘤是一个多因素多阶段的慢性疾病, 在疾病发生发展的过程中, 一些肿瘤细胞的蛋白质或多肽可以被分泌到循环系统中, 血液的蛋白质组学可发生相应变化, 反映出机体的疾病状态, 从而使得应用血清进行结直肠癌蛋白质组学研究、发现患者的血清特异标志物成为一种可能. 而血清标志物的检测具有微创、患者易于接受等优点.

由美国CIPHERGEN Biosystems公司发明的SELDI-TOF-MS是蛋白质芯片和质谱技术的结合, 主要由蛋白质芯片、芯片阅读器和生物信息学三大部分组成, 其表面为可结合蛋白质的固体点表面, 检测的灵敏度高, 可把传统方法检测不到的蛋白和多肽检测出来, 可直接分析患者血清、淋巴液、脑脊液、尿液、细胞分泌液等样品而无需复杂的样品制备, 继Petricoin *et al*^[14]利用SELDI-TOF-MS分析了116例血清标本(其中卵巢癌50例, 正常对照66例)得出可以完全检出卵巢癌的血清蛋白质分类树模型之后, SELDI-TOF-MS广泛用于卵巢癌、前列腺癌、肝癌、食管癌、结直肠癌等多种肿瘤的研究, 已成为肿瘤蛋白质组学主要技术平台之

一. 结直肠散发性中分化腺癌是结直肠癌的主要病理类型, 选择该病理类型患者进行研究对结直肠癌的早期诊断有较好的代表性. 预实验表明在SAX2、WCX2和IMAC30-Cu²⁺这3种芯片之中, IMAC30-Cu²⁺芯片应用于SELDI-TOF-MS技术可以结合较多的蛋白, 得到稳定的质谱图, 因此我们选择了IMAC30-Cu²⁺芯片和SELDI-TOF-MS分析了335例血清样本(其中结直肠癌169例, 健康志愿者163例)的蛋白质谱图, 建立了由M/Z为5765的蛋白组成的分类树模型用于鉴别结直肠癌和正常人, 经独立样本的双盲验证其正确率、灵敏度、特异性、YI及阳性预测值分别为98.21%(165/168)、97.65%(83/85)、98.80%(82/83)、0.97和98.81%(83/84), 显著优于血清CEA的检测, 具有较好的诊断意义, 为结直肠癌分子诊断提供了潜在标志物.

今后我们将应用蛋白质组学技术鉴定所发现的差异蛋白及分类树模型中M/Z峰对应蛋白, 以便进一步提高诊断结直肠腺癌不同亚型和TNM临床分期的灵敏度和特异度, 明确这些蛋白的来源, 如宿主器官、肿瘤或代谢产物^[15-16]. 此外, 我们将用分类树模型鉴别结直肠癌与胃癌、食管癌等常见肿瘤.

总之, 我们应用SELDI-TOF-MS和IMAC30-Cu²⁺芯片发现了可以快速识别经病理确诊为结直肠癌患者的血清蛋白标志物. 结果表明应用SELDI-TOF-MS、IMAC30-Cu²⁺芯片和有效的分析软件可以得到能准确鉴别结直肠癌和正常人的血清分类树模型, 具有较高灵敏度、特异度及阳性预测值, 对提高结直肠癌的早期诊断水平、改善结直肠癌预后具有重要的潜在意义, 为结直肠癌血清标志物的鉴定提供了候选蛋白.

4 参考文献

- 1 Compton CC, Greene FL. The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond. *CA Cancer J Clin* 2004; 54: 295-308
- 2 Zhao G, Gao CF, Song GY, Li DH, Wang XL. [Identification of colorectal cancer using proteomic patterns in serum] *Ai Zheng* 2004; 23: 614-618
- 3 Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008; 58: 71-96
- 4 陈万青, 张思维, 李连弟, 鲁凤珠, 赵平, 邹小农, 陈永红. 中国部分市县1998-2002年肺癌的发病与死亡. *中国肿瘤* 2006; 15: 430-448
- 5 O'Connell JB, Maggard MA, Liu JH, Etzioni DA, Ko CY. Are survival rates different for young and older patients with rectal cancer? *Dis Colon Rectum* 2004; 47: 2064-2069
- 6 Sarfaty M, Wender R. How to increase colorectal cancer screening rates in practice. *CA Cancer J Clin*

■名词解释

SELDI-TOF-MS: 即表面增强激光解析离子化飞行时间质谱, 由美国Ciphergen Biosystems公司发明, 是蛋白质芯片和质谱技术的结合, 主要由蛋白质芯片、芯片阅读器和生物信息学三大部分组成, 其表面为可结合蛋白质的固体点表面, 具有高通量、高灵敏度等技术优势.

■同行评价

文章目的及结论明确, 实验方法较为先进, 统计分析结果较可靠, 参考文献引用恰当而充分, 内容及结论对结直肠癌的早期诊断有一定的临床应用价值。

- 2007; 57: 354-366
- 7 Crawford NP, Colliver DW, Galandiuk S. Tumor markers and colorectal cancer: utility in management. *J Surg Oncol* 2003; 84: 239-248
- 8 Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Klapdor R, Lamerz R, Nilsson O, Sturgeon C, Topolcan O. Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer* 2003; 39: 718-727
- 9 Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, Wang YY, Chan DW. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin Chem* 2002; 48: 1296-1304
- 10 Ezzell C. Beyond the human genome. *Sci Am* 2000; 283: 64-69
- 11 Zhang Z, Bast RC Jr, Yu Y, Li J, Sokoll LJ, Rai AJ, Rosenzweig JM, Cameron B, Wang YY, Meng XY, Berchuck A, Van Haaften-Day C, Hacker NF, de Bruijn HW, van der Zee AG, Jacobs IJ, Fung ET, Chan DW. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 5882-5890
- 12 Albrethsen J, Bogebo R, Gammeltoft S, Olsen J, Winther B, Raskov H. Upregulated expression of human neutrophil peptides 1, 2 and 3 (HNP 1-3) in colon cancer serum and tumours: a biomarker study. *BMC Cancer* 2005; 5: 8
- 13 Adam BL, Qu Y, Davis JW, Ward MD, Clements MA, Cazares LH, Semmes OJ, Schellhammer PF, Yasui Y, Feng Z, Wright GL Jr. Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res* 2002; 62: 3609-3614
- 14 Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, Mills GB, Simone C, Fishman DA, Kohn EC, Liotta LA. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002; 359: 572-577
- 15 Jones MB, Krutzsch H, Shu H, Zhao Y, Liotta LA, Kohn EC, Petricoin EF 3rd. Proteomic analysis and identification of new biomarkers and therapeutic targets for invasive ovarian cancer. *Proteomics* 2002; 2: 76-84
- 16 Poon TC, Johnson PJ. Proteome analysis and its impact on the discovery of serological tumor markers. *Clin Chim Acta* 2001; 313: 231-239

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009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 2009-01-08)

门脉高压性胃病的研究进展

金世柱, 孟祥伟, 韩明子

金世柱, 孟祥伟, 吉林大学白求恩医学部第一临床医学院消化内科 吉林省长春市 130021
韩明子, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150086
作者贡献分布: 金世柱, 孟祥伟与韩明子对此文所作贡献均等.
通讯作者: 孟祥伟, 130021, 吉林省长春市, 吉林大学白求恩医学部第一临床医学院消化内科. xiangweimeng2003@yahoo.com.cn
电话: 0431-85619108
收稿日期: 2008-10-29 修回日期: 2008-12-09
接受日期: 2008-12-15 在线出版日期: 2009-01-08

Advances in portal hypertension gastropathy

Shi-Zhu Jin, Xiang-Wei Meng, Ming-Zi Han

Shi-Zhu Jin, Xiang-Wei Meng, Department of Gastroenterology, the First Clinical College of Jilin University School of Norman Bethune Medicine, Changchun 130021, Jilin Province, China
Ming-Zi Han, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Correspondence to: Xiang-Wei Meng, Department of Gastroenterology, the First Clinical College of Jilin University School of Norman Bethune Medicine, Changchun 130021, Jilin Province, China. xiangweimeng2003@yahoo.com.cn
Received: 2008-10-29 Revised: 2008-12-09
Accepted: 2008-12-15 Published online: 2009-01-08

Abstract

Portal hypertension gastropathy (PHG) is defined as pathological changes of stomach mucosa, which are accompanied with portal hypertension, especially in liver cirrhosis patients. The main clinical manifestation is alimentary tract hemorrhage, which may lead to death of patients sometimes. This article aims to review the research advances in the pathogenic mechanism, endoscopic diagnosis, imaging diagnosis and treatment of portal hypertension gastropathy.

Key Words: Gastropathy; Portal hypertension

Jin SZ, Meng XW, Han MZ. Advances in portal hypertension gastropathy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(1): 59-62

摘要

门脉高压性胃病(portal hypertension

gastropathy, PHG)是指门脉高压症伴发的胃黏膜病变, 主要发生于肝硬化门脉高压症, 其临床主要表现为消化系出血症, 是上消化道出血的重要原因之一, 严重时危及生命. 近年来关于门脉高压性胃病的发病机制, 内镜下和影像学诊断、治疗发展较快. 本文就近年来门脉高压性胃病的研究作一综述.

关键词: 胃病; 门静脉高压

金世柱, 孟祥伟, 韩明子. 门脉高压性胃病的研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(1): 59-62
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/59.asp>

0 引言

门脉高压性胃病(portal hypertension gastropathy, PHG)是指门脉高压症伴发的胃黏膜病变, 主要发生于肝硬化门脉高压症患者, 也见于非肝硬化门脉高压症患者, 食管-胃底静脉曲张与PHG均为门脉高压所致, 两者可同时并存或单独存在^[1]. 临床主要表现为消化系出血症状, 是上消化道出血的重要原因之一, 严重时危及生命. 本文就近年来门脉高压性胃病的研究作一综述.

1 PHG的发病机制

1.1 门静脉高压 有研究^[1-3]认为门静脉压力升高与PHG的发生有相关性, 同时也和静脉曲张的存在及病变的范围密切相关, 但肝功的改变在门脉高压性胃病的发生中没有起到任何作用; 但国内石国梁^[4]认为肝硬化患者门脉高压性胃病发病率随肝功能分级及食管静脉曲张严重程度的增加而上升. 门静脉高压时, 胃黏膜血流动力学改变为高血容量和低灌注量, 由于血流缓慢, 黏膜下毛细血管和静脉扩张, 通透性增加, 血浆外渗透导致胃黏膜下动静脉短路, 血液重新分布, 有效血流量相对减少, 动脉血气氧饱和度下降, 组织缺氧, 局部胃黏膜组织损伤, 病变在胃体、贲门部明显. 硬化剂治疗食管曲张静脉似乎并不改变PHG发生的自然史^[5]. Merkel *et al*^[6]研究表明, PHG的轻重与门脉压力相关, 且经TIPS治疗或外科分流术后PHG病情明显改善. 另有研究表明^[7], 食管

■背景资料

近年来关于门脉高压性胃病的发病机制、内镜下和影像学诊断、治疗发展较快. 本文就近年来门脉高压性胃病的研究作一综述.

■同行评议者

吴泰璞, 教授, 山东省立医院肝胆外科

■研发前沿

近年来随着人们对PHG的发病机制、临床表现及治疗的研究不断深入,使得对PHG的认识更加全面.特别是在PHG的无创性诊断方面取得进展.人们将采用无创性的方法对PHG做出诊断及预测病情的转归.

胃底静脉曲张的内镜下硬化及套扎治疗则可能是PHG发生及加重的一个重要因素.

1.2 胃黏膜防御屏障破坏 肝硬化常合并内毒素血症,内毒素激活激肽系统,使组织缺血缺氧、细胞代谢障碍、黏膜抵抗力降低.大量研究认为热休克蛋白(HSP72)对胃黏膜有关键性的保护作用,而最近研究^[3]发生肝硬化大鼠胃黏膜HSP72表明明显减少,表明HSP72参与了PHG的形成.超微结构观察到PHG上皮细胞与毛细血管内皮细胞肿胀、增宽,毛细血管内皮细胞肥大,基底膜厚薄不均,窗孔增多,有时可见毛细血管破裂,红细胞溢出,并可见周围细胞平滑肌化^[8].

1.3 炎性介质的改变 商中华 *et al*^[9]采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)对44例肝硬化门静脉高压症患者PHG动态变化过程中病变部位的血管内皮生长因子(vessel endothelium growth factor, VEGF)及其受体FLT-1、FLK-1 mRNA的表达进行检测发现,VEGF及其受体FLT-1、FLK-1过度表达是门脉高压性胃病胃黏膜损害的重要因素之一.有研究^[10]认为,肝硬化门脉高压患者胃黏膜组织VEGF表达增高.PHG胃黏膜淤血、缺氧与VEGF增加存在互动关系,VEGF在PHG发病过程中的作用可能是有限的.环氧酶2(COX-2)和前列腺素I₂(PGI₂)在门脉高压性胃病的发生中起重要作用.国内张初民 *et al*^[11]研究认为肝硬化门脉高压性胃病患者血浆PI₂明显升高,作为具有扩张血管作用的炎性介质,在门脉高压性胃病发病中起重要作用.宗晔 *et al*^[12]通过研究认为门静脉高压是门静脉高压性胃病的必要条件,而其他因素,如血浆VIP水平与门静脉高压性胃病的发生也有一定关系.

1.4 门脉高压性胃病与幽门螺杆菌相关性 PHG的发生机理和影响因素至今仍不十分清楚.幽门螺杆菌(*H pylori*)是否参与PHG的发生、发展意见尚未统一^[13].国外学者Batmanabane *et al*^[14]认为*H pylori*感染与PHG的形成没有关系;国内周宇 *et al*^[15]认为*H pylori*感染对PHG发病影响不大.

1.5 内皮素在门脉高压性胃病中的作用 内皮素(endothelin, ET)是肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)最重要的血管活性物质之一,ET与HSC的相互作用由于对肝脏纤维化、肝内和肝外血管阻力和门静脉血流量的变化都起着关键作用.Wang *et al*^[16]在门脉结扎和四氯化碳的两种门脉高压大鼠模型中,发现门脉血中的ET与对照组相比无明显统计学差异,认为ET在这两

种模型的门脉高压形成中未起作用,ET的作用可能是保持血管张力,对抗血管扩张作用.

2 门脉高压性胃病的镜下诊断

近年来随着新的内镜介入治疗方法不断涌现,人们渐渐重视对PHG的研究^[2].

2.1 Mc Cormack分类 1985年Mc Cormack *et al*首次根据PHG的内镜下表现将其分为轻、重2型,轻者表现为:黏膜表面细小红点灶(red point lesion, RPL)或猩红热样疹(scarlastina rash);在条纹状外观的黏膜皱褶表面出现的表浅红斑(erythema);红色或粉红色水肿黏膜上出现细白色网状间隔,类似蛇皮样(snakeskin-like pattern, SLP)马赛克样改变(mosaic-like pattern, MLP).重度者可见散在的樱桃红样斑点(cheery-red spots, CRS)和(或)弥漫性出血性胃炎.其中以MLP最常见,多发生于胃底和胃体部.

2.2 PHG的内镜下诊断参考NIEC(the New Italian Endoscopic Club)分类^[17] NIEC认可了PHG内镜下共同的4种基本病变:马赛克样改变(mosaic-like pattern, MLP)、黏膜表面细小红点灶(red point lesion, RPL)、樱桃红样斑点(cheery-red spots, CRS)、黑棕色斑(black brown spots, BBS),他们进一步定义MLP是黄白色凹陷围绕的小多边形区,可分为轻度、中度及重度:轻度为弥漫性淡红区,中度为淡红区中心部有小红点,重度为弥漫性发红灶. RPL是指直径<1 cm、平坦状红点; CRS表现为直径>2 cm、类圆形红色突起; BBS呈黑色或褐色斑,形状不规则.

3 PHG影像诊断进展

3.1 门脉高压性胃病的CT诊断 Ishihara *et al*^[18]对32例肝硬化患者,其中10例内镜确诊为PHG,进行螺旋CT动态增强扫描研究,10例PHG患者中有9例在增强早期、晚期及延迟期均发现胃壁内层强化,其他22例肝硬化患者出现胃壁内层早期、晚期及延迟期强化的例数分别为16例、15例及5例.表明PHG者和不伴PHG者的肝硬化者胃壁内层延迟期强化具有显著性差异,延迟期胃壁内层强化反映胃黏膜层静脉淤血,因此胃壁内层延迟强化是PHG的一种可靠征象.

3.2 门脉高压性胃病的超声诊断 B超检查可以从多个指标间接反映门静脉高压的程度.张晓红 *et al*^[19]经超声检查指标对门脉高压性胃病进行预测.经超声和胃镜检查,筛选出与门脉高压性胃病相关且对其判断贡献较大的指标,建立回归方程.门静脉内径、脾长径、脾指数、脾

■相关报道

Yuksel *et al*报道,对门脉高压性食管静脉曲张的患者,分别进行食管曲张静脉套扎和硬化剂注射,两组比较,静脉曲张的再发生率没有明显的差异.

静脉内径、腹水、胆囊壁厚度与门脉高压性胃病呈正相关, 经logistic回归分析对门脉高压性胃病的综合判断符合率为79.3%。超声检查指标对肝硬化患者门脉高压性胃病判断符合率较高, 可由超声检查预测肝硬化门脉高压性胃病。夏建国 *et al*^[20]研究证实: 门脉高压时与门脉左支相连的侧支静脉为脐静脉, 彩色多普勒超声可以显示脐静脉及附脐静脉的解剖学特点和血流特征, 我们可以借此来诊断PHG的发生。

4 门脉高压性胃病的治疗现状

食管-胃底静脉曲张与PHG均为门脉高压所致, 两者可同时并存或单独存在^[1]。降低门脉压力是PHG的基本治疗方法。PHG的治疗关键在于降低门脉压力, 用药物降低肝硬化门脉高压是PHG治疗的研究热点^[21]。

4.1 门脉高压性胃病的药物治疗 众所周知, 门脉高压性胃病是肝硬化门脉高压的重要并发症, 也是并发上消化道出血的常见原因之一, 国外有文献报道门脉高压所致胃黏膜病变达94%-98%^[22]。瑞巴派特(商品名: 膜因思达)是一种胃黏膜保护剂, 临床上已用于治疗胃溃疡、急性胃炎、慢性胃炎的急性加重期胃黏膜病变的改善等, 国外临床研究还证实其对慢性肝病引起的胃黏膜病变也有一定疗效^[23]。多年临床已证实瑞巴派特对胃溃疡、急性胃炎、慢性胃炎的急性加重期胃黏膜病变的改善均有较好的疗效^[24-25]。研究表明瑞巴派特能刺激胃黏膜内源性前列腺素合成; 增加胃黏液糖蛋白复合物、促进损伤部位单层上皮细胞增殖; 抑制*H pylori*诱导的中性粒细胞激活; 抑制、清除胃部自由基, 从而明显改善胃黏膜损伤, 起保护胃黏膜作用^[26]。国内学者李琪 *et al*^[27]研究证实: 瑞巴派特能改善门脉高压性胃病患者的临床症状及胃黏膜病变。

吉林大学第二医院韩刚 *et al*^[28]经实验证实H₂受体拮抗剂甲氰咪胍通过拮抗肝硬化门脉高压症犬血中异常升高的组织胺的作用, 舒张肝血管床, 降低门脉血流阻力, 从而降低门脉压力, 同时使门脉及全肝血流量轻度增加, 而对全身血流动力学无不良影响。

黄会芳 *et al*^[31]经过实验观察汉防己甲素降低大鼠肝硬化门脉高压的疗效和对胃黏膜微循环及其超微结构的影响。认为活化的肝星状细胞在肝硬化、门脉高压发生发展过程中起核心作用; 另外, 转化生长因子-β可在转录和翻译水平上促进胶原等的合成, 抑制细胞外基质降解, 使肝内结缔组织生成增多, 汉防己甲素能影响

转化生长因子-β及其信号通路, 减少细胞外基质的合成, 间接使门脉压力下降^[30]。结果证实了汉防己甲素能有效、安全地降低大鼠肝硬化门脉压力, 可有效改善其胃黏膜微循环及超微的结果变化, 为临床治疗门脉高压性胃病提供实验依据^[31]。有报道^[5]在肝硬化门脉高压性胃病的大鼠模型中, 锌的衍生物, 特别是L-肌肽锌通过热休克蛋白72阻止胃黏膜损伤, 起到保护胃黏膜的作用。PHG壁细胞增生的机制尚不清楚, 但抗酸治疗不失为治疗PHG的方法之一^[32]。

4.2 门脉高压性胃病的介入治疗 李荣宽 *et al*对48例门脉高压性胃病患者行部分脾动脉栓塞术, 对比术前、术后的胃镜及超声检查指标, 结果发现术后患者的胃镜下表现及门静脉内径、门静脉平均血流速度、脾静脉内径、脾厚度等指标均改善。认为部分脾动脉栓塞术能够降低门静脉压力, 对门脉高压性胃病有治疗作用^[33]。目前有学者进行内镜下套扎联合脾动脉栓塞术治疗食管静脉曲张取得了较好的疗效^[34]。有报道, 对门脉高压性食管静脉曲张的患者, 分别进行食管曲张静脉套扎和硬化剂注射, 两组比较, 静脉曲张的再发生率没有明显的差异^[35]。有人采用氩离子气体凝固法治疗, 结果提示, 氩离子气体凝固法是一种安全有效的治疗方法^[36]。对于无法控制的PHG和静脉曲张破裂出血, 可采用食管切除术和全胃切除术肝移植可彻底治愈门脉高压, 因此对治疗PHG是有效的, 但目前主要问题是供肝的缺乏和移植肝病病毒性肝炎的复发^[37]。

5 结论

近年来随着人们对PHG的发病机制、临床表现及治疗的研究不断深入, 使得对PHG的认识更加全面。特别是在PHG的无创性诊断方面取得进展^[38]。人们将采用无创性的方法对PHG做出诊断及预测病情的转归。

6 参考文献

- 1 Mesihovic R, Prohic D, Gribajcevic M, Vanis N, Gornjakovic S, Sarac A. Portal hypertensive gastropathy (PHG). *Med Arh* 2004; 58: 377-379
- 2 Merli M, Nicolini G, Angeloni S, Gentili F, Attili AF, Riggio O. The natural history of portal hypertensive gastropathy in patients with liver cirrhosis and mild portal hypertension. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1959-1965
- 3 Garcia-Tsao G. Portal hypertension. *Curr Opin Gastroenterol* 2006; 22: 254-262
- 4 石国梁. 肝硬化患者门脉高压性胃病的胃镜检查与分析. *实用诊断与治疗杂志* 2007; 21: 117-118
- 5 Mikami K, Otaka M, Watanabe D, Goto T, Endoh A, Miura K, Ohshima S, Yoneyama K, Sato M, Shibuya T,

■应用要点

PHG的无创性诊断方面取得可喜的进展, 人们将采用无创性的方法对PHG做出诊断及预测病情的转归。

■名词解释

门脉高压性胃病 (PHG): 指门脉高压症伴发的胃黏膜病变, 主要发生于肝硬化门脉高压症患者, 也见于非肝硬化门脉高压症患者, 食管-胃底静脉曲张与PHG均为门脉高压所致, 两者可同时并存或单独存在。

■同行评价

本文对近年来门脉高压性胃病的研究进行了综述,分析了近几年门脉高压性胃病的发病机制及治疗现状的国内外研究进展,引用文献较新颖,论述条理性强,但缺乏作者本人见解。

- Segawa D, Kataoka E, Yoshino R, Takeuchi S, Sato W, Odashima M, Watanabe S. Zinc L-carnosine protects against mucosal injury in portal hypertensive gastropathy through induction of heat shock protein 72. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1669-1674
- 6 Merkel C, Schipilliti M, Bighin R, Bellini B, Angeli P, Bolognesi M, Vescovi F, Gatta A. Portal hypertension and portal hypertensive gastropathy in patients with liver cirrhosis: a haemodynamic study. *Dig Liver Dis* 2003; 35: 269-274
- 7 Elnaser SS, El-Ebiary S, Bastawi MB, Shafei AL, Abd-Elhafee A. Effect of endoscopic injection sclerotherapy and variceal ligation on development of portal hypertensive gastropathy and duodenopathy. *J Egypt Soc Parasitol* 2005; 35: 253-264
- 8 霍丽娟, 黄会芳, 杨保元. 缬沙坦和普萘洛尔降低门静脉压力疗效的实验研究. *中华肝脏病杂志* 2006; 14: 611-613
- 9 商中华, 张波, 陈海云, 董红霖, 王选, 祝庆华. 血管内皮生长因子及其受体在门脉高压性胃病中的表达及其意义. *中国综合临床* 2007; 23: 226-227
- 10 白云, 姜慧卿, 路新卿, 任锡玲. 血管内皮生长因子在门脉高压患者胃黏膜的表达. *胃肠病学和肝病学杂志* 2007; 16: 63-65
- 11 张初民, 韩盛玺. 门脉高压胃病与前列环素I₂的关系. *临床肝胆病杂志* 2008; 24: 34-35
- 12 宗晔, 赵海英, 吴咏冬, 张澍田. 肝硬化患者门静脉高压性胃病发病因素的研究. *胃肠病学* 2006; 11: 298-300
- 13 Zullo A, Romiti A, Rinaldi V, Vecchione A, Hassan C, Winn S, Tomao S, Attili AF. Gastric epithelial cell proliferation in patients with liver cirrhosis. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 550-554
- 14 Batmanabane V, Kate V, Ananthakrishnan N. Prevalence of Helicobacter pylori in patients with portal hypertensive gastropathy--a study from south India. *Med Sci Monit* 2004; 10: CR133-CR136
- 15 周宇, 叶文桃, 王皓, 伍灵达. 门脉高压性胃病与幽门螺杆菌相关性研究. *临床肝胆病杂志* 2004; 20: 33-34
- 16 Wang JJ, Gao GW, Gao RZ, Liu CA, Ding X, Yao ZX. Effects of tumor necrosis factor, endothelin and nitric oxide on hyperdynamic circulation of rats with acute and chronic portal hypertension. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 689-693
- 17 Primignani M, Carpinelli L, Preatoni P, Battaglia G, Carta A, Prada A, Cestari R, Angeli P, Gatta A, Rossi A, Spinzi G, De Franchis R. Natural history of portal hypertensive gastropathy in patients with liver cirrhosis. The New Italian Endoscopic Club for the study and treatment of esophageal varices (NIEC). *Gastroenterology* 2000; 119: 181-187
- 18 Ishihara K, Ishida R, Saito T, Teramoto K, Hosomura Y, Shibuya H. Computed tomography features of portal hypertensive gastropathy. *J Comput Assist Tomogr* 2004; 28: 832-835
- 19 张晓红, 郑荣琴, 卢翠蓉, 陈青, 杨绍基. 超声检查对肝硬化门脉高压性胃病的预测. *临床肝胆病杂志* 2004; 20: 30-31
- 20 夏建国, 李凤华, 朱彩霞, 方华, 唐韵. 门静脉高压脐静脉再通的超声检测及其临床意义. *中国超声诊断杂志* 2006; 7: 828-830
- 21 温冰. 门脉高压性胃病的研究进展. *临床消化病杂志* 2002; 14: 91-93
- 22 Luo RH, Zhao ZX, Zhou XY, Gao ZL, Yao JL. Risk factors for primary liver carcinoma in Chinese population. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4431-4434
- 23 Munz M, Kieu C, Mack B, Schmitt B, Zeidler R, Gires O. The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. *Oncogene* 2004; 23: 5748-5758
- 24 Park JE, Lee DH, Lee JA, Park SG, Kim NS, Park BC, Cho S. Annexin A3 is a potential angiogenic mediator. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 337: 1283-1287
- 25 Ohnishi A, Murakami S, Akizuki S, Mochizuki J, Echizen H, Takagi I. In vivo metabolic activity of CYP2C19 and CYP3A in relation to CYP2C19 genetic polymorphism in chronic liver disease. *J Clin Pharmacol* 2005; 45: 1221-1229
- 26 Duanmu Z, Weckle A, Koukouritaki SB, Hines RN, Falany JL, Falany CN, Kocarek TA, Runge-Morris M. Developmental expression of aryl, estrogen, and hydroxysteroid sulfotransferases in pre- and postnatal human liver. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316: 1310-1317
- 27 李琪, 周韦, 徐可树. 瑞巴派特对门脉高压性胃病的临床疗效观察. *胃肠病学和肝病学杂志* 2006; 15: 264-267
- 28 韩刚, 丁巍, 李金龙. H₂受体拮抗剂对门脉高压症门脉血液动力学影响的动物实验研究. *中国实验诊断学* 2005; 9: 724-726
- 29 Reynaert H, Thompson MG, Thomas T, Geerts A. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut* 2002; 50: 571-581
- 30 陈源文, 李定国, 吴建新, 陈颖新, 陆汉明. 粉防己碱对大鼠肝星状细胞跨膜信号转导的影响. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 609-610
- 31 黄会芳, 霍丽娟, 吴晓宁. 汉防己甲素对肝硬化大鼠胃黏膜微循环及超微结构的影响. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2337-2340
- 32 Mikami K, Otaka M, Watanabe D, Goto T, Endoh A, Miura K, Ohshima S, Yoneyama K, Sato M, Shibuya T, Segawa D, Kataoka E, Yoshino R, Takeuchi S, Sato W, Odashima M, Watanabe S. Zinc L-carnosine protects against mucosal injury in portal hypertensive gastropathy through induction of heat shock protein 72. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1669-1674
- 33 Zhou Y, Qiao L, Wu J, Hu H, Xu C. Comparison of the efficacy of octreotide, vasopressin, and omeprazole in the control of acute bleeding in patients with portal hypertensive gastropathy: a controlled study. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 973-979
- 34 李荣宽, 姜春萌. 部分脾动脉栓塞术对门脉高压性胃病的治疗作用研究. *中国医师进修杂志* 2006; 29: 47-48
- 35 王秀敏, 黄宏春, 董洪林, 娄磊. 内镜套扎加脾动脉栓塞治疗食管静脉曲张的疗效观察. *中华消化内镜杂志* 2005; 22: 120-121
- 36 Yüksel O, Köklü S, Arhan M, Yolcu OF, Ertuğrul I, Odemiş B, Altıparmak E, Sahin B. Effects of esophageal varice eradication on portal hypertensive gastropathy and fundal varices: a retrospective and comparative study. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 27-30
- 37 Sato T, Yamazaki K, Toyota J, Karino Y, Ohmura T, Akaike J, Kuwata Y, Suga T. Efficacy of argon plasma coagulation for gastric antral vascular ectasia associated with chronic liver disease. *Hepatol Res* 2005; 32: 121-126
- 38 Nair S, Singh R, Yoselewitz M. Correlation between portal/hepatic vein gradient and response to transjugular intrahepatic portosystemic shunt creation in refractory ascites. *J Vasc Interv Radiol* 2004; 15: 1431-1434
- 39 耿楠. 门脉高压性胃病无创性预测因素. *中国误诊学杂志* 2007; 7: 6792-6793

胃泌素释放肽受体在肿瘤治疗中的研究进展

赵开军, 沈建康

赵开军, 沈建康, 上海交通大学医学院附属瑞金医院神经外科上海市 200025

作者贡献分布: 本文由赵开军综述; 沈建康审核。

通讯作者: 沈建康, 200025, 上海市瑞金二路197号, 上海交通大学

医学院附属瑞金医院神经外科. shenjiankang2@163.com

电话: 021-64189914 传真: 021-63846480

收稿日期: 2008-11-25 修回日期: 2008-12-12

接受日期: 2008-12-15 在线出版日期: 2009-01-08

Advances of gastrin-releasing peptide receptor in treatment of tumors

Kai-Jun Zhao, Jian-Kang Shen

Kai-Jun Zhao, Jian-Kang Shen, Department of Neurosurgery, Ruijin Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

Correspondence to: Jian-Kang Shen, Department of Neurosurgery, Ruijin Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 197 Ruijin 2nd Road, Shanghai 200025, China. shenjiankang2@163.com

Received: 2008-11-25 Revised: 2008-12-12

Accepted: 2008-12-15 Published online: 2009-01-08

Abstract

The mammalian gastrin-releasing peptide (GRP), known as autocrine growth factors in tumors, is involved in the pathogenesis and progression of many human malignant tumors, and high expression of its receptor, GRPR, in a large spectrum of human cancers gives support to the conclusion that GRPR is a new molecular target in experimental and clinical cancer therapy. GRPRs may be potential carriers for cytotoxins, immunotoxins or radioactive compounds. Moreover, blocking gastrin-releasing peptide receptor signaling pathways by means of antisense oligonucleotide, RNA interference and its antagonists has exhibited impressive antitumor activity.

Key Words: Tumor; Bombesin; Gastrin releasing peptide; Receptor

Zhao KJ, Shen JK. Advances of gastrin-releasing peptide receptor in treatment of tumors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(1): 63-67

摘要

哺乳动物的胃泌素释放肽(gastrin-releasing

peptide receptor, GRP)在许多肿瘤中是一个自分泌生长因子,他涉及许多人类恶性肿瘤的发病机制和进展,在许多人类肿瘤中他的受体(GRPR)也是高表达的,这使得GRPR成为一个实验和临床治疗的新分子靶点.这里GRPRs可以作为细胞毒素、免疫毒素或者有放射活性化合物的有效传递体.而且,通过反义寡核苷酸、RNA干扰和GRPR拮抗物来封闭胃泌素释放肽信号通路后,结果都呈现出满意的抗肿瘤活性.

关键词: 肿瘤; 铃蟾肽; 胃泌素释放肽; 受体

赵开军, 沈建康. 胃泌素释放肽受体在肿瘤治疗中的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 17(1): 63-67

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/63.asp>

0 引言

胃泌素释放肽受体(gastrin-releasing peptide receptor, GRPR)通过与其配体结合活化来发挥广谱的生理病理学效应,其中涉及肿瘤的发生、增殖、血管形成和侵袭^[1].而且,胃泌素释放肽(GRP)与其他胃肠肽在肿瘤的发生中存在复杂的相互作用,GRPR的抑制也干扰相关的生长因子通路.因而,作为生长因子受体的GRPR成为肿瘤治疗的有效分子靶点.大量的研究表明,封闭GRPR信号通路可以有效的抑制肿瘤的生长,积极研究以GRPR为靶点的抗肿瘤机制,对于发展以GRPR为靶点的靶向化疗、靶向免疫治疗和靶向分子生物学治疗具有重要的意义.

1 GRPR在肿瘤中的分布特点是靶向治疗的分子基础

1.1 概况 哺乳动物的铃蟾素(bombesin, BN)受体家族包含3个G蛋白偶联的受体:神经介素B受体(neuromedin B receptor, NMBR)、胃泌素释放肽(gastrin-releasing peptide, GRP)受体和孤儿受体铃蟾素受体亚型3(BRS-3)^[2].GRP通过GRPR发挥作用,GRP除促进生长、调节胃肠运动和激素分泌外,也参与调节昼夜节律、记忆、焦虑/恐惧反应和摄食,并与炎症、类风湿性关节炎、退化

■背景资料

胃泌素释放肽(GRP)及其受体(GRPR)在许多人类肿瘤中共同高表达,GRP是一个自分泌生长因子,通过与相应受体的结合来促进瘤细胞增殖、血管生成、浸润转移等多个步骤.近年来的研究发现,对GRPR信号通路的封闭是一个相当有效的干预靶点.目前以GRPR为靶点的靶向免疫治疗、靶向化疗和靶向分子生物学治疗正在广泛的研究中,并且都取得了有意义的结果.

■同行评议者

葛海燕,教授,同济大学附属第十人民医院普通外科

■研发前沿

以GRPR为靶点的靶向化疗、靶向免疫治疗、靶向分子生物学治疗在动物实验中都取得了满意的结果,并且RC-3095已经进入临床一期实验,结果满意;研制更为有效的封闭GRPR信号通路的方法仍将是下一步的研究热点和重点;积极开发研制有效的BN/GRP拮抗剂进入临床实验是亟待解决的问题。

性病变、神经精神性疾病^[3]和肿瘤相关。

1.2 表达 GRPR在肿瘤中的表达情况与肿瘤的性质、类型、分化程度、级别、侵袭力的高低和时期等相关,GRPR在许多肿瘤中均存在表达,可以分布在瘤细胞、间质、血管和临近的黏膜组织与受侵的淋巴结中,铃蟾素受体的三个亚型在不同肿瘤中呈选择性表达或共表达。受体亚型的选择性表达为研制相应的配体类似物介导的靶向免疫治疗、化疗和肿瘤的早期诊断奠定了分子基础。最近发现,当胃泌素释放肽及其受体在结肠直肠癌中异常迷乱表达时,GRP可以通过上调热休克蛋白来促进CD16+/94+自然杀伤细胞与肿瘤细胞的结合并促进肿瘤细胞自溶,GRPR的高表达也许对抑制肿瘤的进展有所帮助^[4]。

1.3 诊断 早期诊断利于早期治疗。许多恶性肿瘤过度表达GRPR等生长因子受体,对受体易结合的天然肽进行修饰得到的衍生物易被放射性核素所标记,可实现对恶性肿瘤的早期诊断和满意定位,为肿瘤的早期治疗提供了可能。由于得结合物有效的宽量程、良好的摄取和对GRPR阳性肿瘤细胞高亲和力结合的特点,使^{99m}Tc标记的小分子肽在核医学中广泛使用。雨滨蛙肽是一个两栖类铃蟾素肽衍生物,^{99m}Tc-雨滨蛙肽因其优良的放射性标记和生物分布最近受到关注^[5]。此外,对GRPR有高选择性高亲和力的荧光探针也在研究试用中^[6]。

2 治疗

已知GRP在许多高表达GRPR的肿瘤中充当生长因子,GRPR是肿瘤治疗的有效靶点^[7]。以铃蟾素类似物为基础的靶向化疗可以明显提高对化疗药物的有效靶向传递,降低肿瘤耐药和化疗药物的不良反应;BN/GRP拮抗剂已经表现出良好的抗癌效应,同时RC-3095已经进入临床一期实验并取得良好的结果。此外,靶向免疫治疗、靶向分子生物学治疗(RNA干扰技术等)也表现出满意的抗癌效应。

2.1 肿瘤耐药 肿瘤耐药是化疗失败的重要原因之一。铃蟾素类似物是传送化疗药物和细胞毒因子的良好载体,AN-201是细胞毒根基但对肿瘤的生长没有显著影响,AN-215是AN-201和铃蟾素结合的物质,对BN/GRP受体有良好的亲和力和抗癌作用,并且不会诱导药物抗性^[8]。在裸鼠的5个乳癌细胞系嫁接体中,AN-215不能或只是很低的诱导多药抗性蛋白1(multidrug resistance 1, MDR1)、多药抗性相

关蛋白1(multidrug resistance-associated protein 1, MRP1)和乳腺癌抗性蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP)mRNA表达,并显著抑制了肿瘤细胞的生长,他的细胞毒根基AN-201在4个模型中没有显著影响。此外,在裸鼠恶性胶质瘤U-118MG细胞系嫁接体中使用AN-215治疗后发现:肿瘤的生长降低了50%,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的水平减少了45%,Bcl/Bas蛋白的相对比下降了将近90%,说明AN-215可通过多种机制抑制肿瘤生长^[9]。

2.2 靶向化疗 为了对肿瘤进行化疗药物的特异性传递,Safavy *et al*使用一个铃蟾素受体可以识别的肽和紫杉醇的结合物,结果药物对H1299非小细胞肺癌的毒性被提高了。Safavy *et al*最近又使用一个单种药物多配体的方法传送药物,这个化合物包括两个肽“爪”和一个紫杉醇(PTX)“尾”,初步证明在抗癌治疗中是有效的^[10]。此外,Safavy *et al*^[11]将紫杉醇(PTX, taxol)共轭结合到抗表皮生长因子受体(anti-EGFR)单克隆抗体(MAb)Erbiyux(C225)上构建了一个MAb介导的药物传送化合物模型,相对于单独使用药物或抗体来说,“药物抗体”(PTXC225)的杀细胞效应明显提高,这个方法也可以应用到GRPR这个分子靶点上。

2.3 靶向免疫治疗 他是以瘤细胞表面的BN/GRP-R为靶点和一个触发宿主免疫效应细胞的免疫启动分子相结合来引导免疫效应细胞趋向瘤细胞并介导对靶细胞杀伤的免疫疗法。当构建一个直接针对高亲和力的FcγRI(CD64)的铃蟾素和mAb的免疫交联物时,他是针对GRPR和免疫效应细胞为靶标的生物特异分子,免疫交联物不但可以识别4个SCCL细胞系又可以与FcγRI作用激活单核细胞和中性粒细胞,结果60%-98%的SCCL瘤细胞发生了溶胞现象^[12]。后来,有人设计了一个人工的BN/GRP拮抗剂(Antag2)并构建了一个生物特异性分子(BsMol),他们将生物特异性分子(BsMol)介导的靶向免疫治疗和化疗药物(紫杉醇、依托泊苷、顺铂)联合后显著提高了对小细胞肺癌的杀伤作用^[13]。最近,他们又合成了一个靶向GRPR并可以激活多克隆T淋巴细胞的生物特异性分子(OKT3xAntag2),他是通过共轭结合一个mAb OKT3(抗-CD3)和一个BN/GRP拮抗剂(Antag2)构建而成。结果:生物特异分子以一个低的效靶比例使小细胞肺癌的生长抑制达到40%-80%,

■相关报道

目前,生长因子受体涉及肿瘤发生进展的多个步骤。对不同生长因子的联合干预存在抗癌的协同效应。本文中介绍了联合使用BN/GRP拮抗剂RC-3940-II和GHRH拮抗剂MZ-J-7-118后的抗癌效果明显优于单独使用一种拮抗剂的抗癌效果;此外,靶向免疫治疗和化疗也是值得重视的策略。

并出现细胞凋亡和坏死^[14].

2.4 反义寡核苷酸治疗和RNA干扰技术 反义核酸可以在复制、转录、表达3个水平上发挥作用. 使用针对GRPR的反义(AS)寡核苷酸(ODNs)可以显著抑制人小细胞肺癌(small-cell lung cancer, SCLC)NCI-H345细胞的增殖, 接触反义寡核苷酸的瘤细胞在GRPR的表达数量上也会降低^[15]. 此外, 采用RNA干扰技术也是有效的策略, GRP/GRPR siRNA在人成神经细胞瘤中明显影响血管的发生, GRP或GRPR的沉默也显著抑制VEGF、p-Akt和p-mTOR的表达^[16]. RHBDF1是最近发现的一个新基因, 他编码的蛋白质主要定位于内质网上, 在1483头颈鳞癌细胞系中使用siRNA沉默RHBDF1基因后, 导致了一个GRP诱导的表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)和EGFR依赖的信号蛋白丝裂原激活的蛋白激酶(p44/42mitogen-activated proteinkinase, p44/42MAPK)和AKT磷酸化的抑制, 同时伴随着一个GRP诱导的存活、增殖和侵袭的抑制.

3 BN/GRP和GRPR拮抗物的抗癌机制

3.1 抑制瘤细胞增殖 铃蟾素样肽沿着脑肠轴充当神经递质并在许多组织中充当生长因子, 促进瘤细胞增殖, GRPR拮抗物完全可以逆转这个效应^[17]. 值得注意的是, 在U138-MG恶性胶质瘤中, 联合使用GRP和促进cAMP/PKA信号通路的方法可以促进瘤细胞增殖^[18], 对二者的共同干预是一个好的治疗策略.

3.2 下调生长因子的表达 EGFR在许多肿瘤中是一个活化的癌基因, GRPR在瘤细胞中可以介导EGFR的活化^[19], BN/GRP拮抗物(RC-3940-II、RC-3095)的抗癌效应与EGFR及EGFR mRNA的表达下调相关, 长期使用对抗物治疗后, 瘤细胞上GRPR和EGFR的表达显著下降. 此外, BN/GRP拮抗物的抗癌效应也涉及肿瘤内成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)-II、VEGF-A的信使RNA和蛋白表达的下降^[20].

3.3 干扰肿瘤血管生成、促进凋亡 已知GRPR在许多肿瘤血管上是高表达的. BN/GRP拮抗物可以抑制铃蟾素诱导的肿瘤生长和血管发生, GRP或GRPR的沉默也能抑制血管标志物(VEGF、p-Akt和p-mTOR)的表达. 最近, 为了提高肺癌的治疗, Kanashiro *et al*^[21]使用BN/GRP拮抗物和GHRH拮抗物联合处理裸鼠H-460和

A-549非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC)嫁接体. 结果两个瘤细胞系的生长抑制伴随着EGFR/HER家族成员29%-96%表达的下调, VEGF-A(19%-60%)和VEGF受体(VEGF-R1, 24%-74%; VEGF-R2, 25%-50%)的表达也降低了. 在H-460 NSCLC中发现Bax上调了21%-63%, 而Bcl-2下调了23%-39%. 可见, BN/GRP和GHRH拮抗物除了干扰血管生成, 抗癌效应也涉及下调EGFR/HER家族的表达及促进凋亡. 另外, 肾细胞癌的血管发生对GRPR的封闭也是敏感的, 预示着GRPR在肿瘤微循环中的重要作用^[22].

3.4 下调癌基因的表达 BN/GRP拮抗物RC-3095或RC-3940-II对卵巢癌细胞系OV-1063的生长抑制效应涉及癌基因*c-jun*和*c-fos*下调^[23]. 在培养的OV-1063瘤细胞中或在体内, 使用RC-3940-II处理后, *c-jun*和*c-fos*信使RNA的水平都会显著下调. 此外, 这两个拮抗物也抑制人乳腺癌细胞系MDA-MB-468和MDA-MB-435异种嫁接体在裸鼠内的生长, ErbB/HER受体家族信使RNA和蛋白水平的表达减少, *c-jun*和*c-fos*致癌基因的表达下降.

3.5 K-Ras、COX-2、pAkt和LRP的抑制以及WT p53的上调 Hohla *et al*^[24]采用BN/GRP拮抗物RC-3940-II对常位嫁接到裸鼠肺间质的H460和A549 NSCLC细胞系进行处理后发现: 肿瘤高表达GRPR, 嫁接物的生长受到将近30%-50%的抑制, 在H460NSCLC瘤细胞系中, 抗癌效应伴随着调控蛋白(K-Ras)、环氧化酶-2(COX-2)、磷酸化丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶B(phosphorylated Akt, pAkt)和磷酸化蛋白激酶ERK1/2(phosphorylated ERK1/2, pERK1/2)蛋白水平的显著下降及野生型P53蛋白(wild-type P53, WTP53)表达的增加; 在A549NSCLC中, pAkt和肺耐药相关蛋白显著的下调. 说明了BN/GRP拮抗物可以通过干扰生存通路、血管生成、肿瘤耐药和癌基因表达等多种途径抑制肿瘤进展.

3.6 抑制PI3/Pten/Akt信号通路 Akt是PI3/Pten/Akt信号通路的活性分子, 可将下游靶蛋白磷酸化, PTEN起负性调节作用. 对肿瘤抑制基因PTEN的下调是一个涉及GRP诱导成神经细胞瘤(neuroblastoma, NB)增殖的重要机制, GRP促进NB增殖是通过激活PI3/Akt信号通路实现的^[25]. PTEN除了对PI3/Akt信号通路负性调节外, PTEN也通过直接控制细胞凋亡途径拥有调节肿瘤细胞增殖的能力, PTEN可以抑制Mdm2

■创新盘点

本文详细总结了以GRPR为靶点的治疗进展. GRPR在多数人类肿瘤中的高分布特点利于肿瘤的早期诊断, 从而利于早期治疗. 以GRPR信号通路为基础, 靶向化疗、靶向免疫治疗和靶向分子生物学治疗为进行肿瘤治疗的方法学提供了参考和思路.

■应用要点

本文有利于推进以生长因子受体为靶点的基础研究,为临床提供参考和指导;可以借助GRPR有效靶向传递已经发现的化疗药物,提高化疗效果,降低不良反应;积极研制有效的BN/GRP拮抗物是一个治疗肿瘤的有效策略。

易位进入细胞核并快速在细胞质中降解,引起P53肿瘤抑制蛋白激活^[26],促进细胞凋亡.在成神经细胞瘤中,使用GRPR拮抗物GRP-H2756或siRNA抑制GRPR可以衰减铃蟾肽诱导的p-Akt,PI3K的抑制剂LY294002也能废除铃蟾肽诱导的p-Akt^[26].说明:GRPR封闭对NB的抗癌效应涉及PI3/PDEN/Akt信号通路的抑制.另外,GRPR介导调节C6胶质瘤细胞的增殖也依赖于PI3K机制^[27].

3.7 增强其他激素肽拮抗物的抗癌效应 在PC-3前列腺癌中,GRP拮抗物在增强生长激素释放激素(growth hormone-releasing hormone, GHRH)拮抗物抗癌效应的同时也涉及到对生长因子表达的抑制^[28].最近,Stangelberger *et al*^[29]研究了GHRH拮抗物(MZ-J-7-118和RC-J-29-18)、BN/GRP拮抗物(RC-3940-II and RC-3940-Et)以及联合使用MZ-J-7-118和RC-3940-II对裸鼠中PC-3和DU-145非雄激素依赖性前列腺癌嫁接体的影响.两种拮抗物的联合使用对肿瘤体积的抑制最强,二者联合对肿瘤的生长抑制存在协同效应。

4 结论

GRPR涉及肿瘤进展的各个步骤,GRPR是肿瘤治疗的有效分子靶点.目前,以GRPR为靶点的靶向免疫治疗、靶向化疗、靶向分子生物治疗都取得了有意义的进展,提示发展以生长因子受体为靶点的干预治疗是有效的抗癌策略.随着对生长因子信号通路作用机制的深入研究,在不久的将来,以GRPR为靶点的各种靶向治疗有望在临床治疗中得到应用。

5 参考文献

- 1 Perona R. Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors. *Clin Transl Oncol* 2006; 8: 77-82
- 2 Jensen RT, Battey JF, Spindel ER, Benya RV. International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states. *Pharmacol Rev* 2008; 60: 1-42
- 3 Roesler R, Henriques JA, Schwartsmann G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for psychiatric and neurological disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2006; 5: 197-204
- 4 Taglia L, Matusiak D, Benya RV. GRP-induced up-regulation of Hsp72 promotes CD16+/94+ natural killer cell binding to colon cancer cells causing tumor cell cytolysis. *Clin Exp Metastasis* 2008; 25: 451-463
- 5 Durkan K, Lambrecht FY, Unak P. Radiolabeling of bombesin-like peptide with ^{99m}Tc: ^{99m}Tc-litorin and biodistribution in rats. *Bioconjug Chem* 2007; 18:

- 6 1516-1520
- 6 Ma L, Yu P, Veerendra B, Rold TL, Retzlaff L, Prasanphanich A, Sieckman G, Hoffman TJ, Volkert WA, Smith CJ. In vitro and in vivo evaluation of Alexa Fluor 680-bombesin[7-14]NH₂ peptide conjugate, a high-affinity fluorescent probe with high selectivity for the gastrin-releasing peptide receptor. *Mol Imaging* 2007; 6: 171-180
- 7 Stangelberger A, Schally AV, Djavan B. New treatment approaches for prostate cancer based on peptide analogues. *Eur Urol* 2008; 53: 890-900
- 8 Buchholz S, Keller G, Schally AV, Halmos G, Hohla F, Heinrich E, Koester F, Baker B, Engel JB. Therapy of ovarian cancers with targeted cytotoxic analogs of bombesin, somatostatin, and luteinizing hormone-releasing hormone and their combinations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 10403-10407
- 9 Kanashiro CA, Schally AV, Nagy A, Halmos G. Inhibition of experimental U-118MG glioblastoma by targeted cytotoxic analogs of bombesin and somatostatin is associated with a suppression of angiogenic and antiapoptotic mechanisms. *Int J Oncol* 2005; 27: 169-174
- 10 Safavy A, Raisch KP, Matusiak D, Bhatnagar S, Helson L. Single-drug multiligand conjugates: synthesis and preliminary cytotoxicity evaluation of a paclitaxel-dipeptide "scorpion" molecule. *Bioconjug Chem* 2006; 17: 565-570
- 11 Safavy A, Bonner JA, Waksal HW, Buchsbaum DJ, Gillespie GY, Khazaeli MB, Arani R, Chen DT, Carpenter M, Raisch KP. Synthesis and biological evaluation of paclitaxel-C225 conjugate as a model for targeted drug delivery. *Bioconjug Chem* 2003; 14: 302-310
- 12 Chen J, Mokotoff M, Zhou JH, Fanger MW, Ball ED. An immunoconjugate of Lys3-bombesin and monoclonal antibody 22 can specifically induce FcγRI (CD64)-dependent monocyte- and neutrophil-mediated lysis of small cell carcinoma of the lung cells. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 425-434
- 13 Zhou J, Chen J, Mokotoff M, Zhong R, Shultz LD, Ball ED. Bombesin/gastrin-releasing peptide receptor: a potential target for antibody-mediated therapy of small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4953-4960
- 14 Zhou J, Chen J, Zhong R, Mokotoff M, Shultz LD, Ball ED. Targeting gastrin-releasing peptide receptors on small cell lung cancer cells with a bispecific molecule that activates polyclonal T lymphocytes. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2224-2231
- 15 Langer DA, Kautzman D, Kane MA. Inhibition of proliferation of human small cell lung cancer cells expressing an autocrine system for gastrin releasing peptide by antisense oligodeoxynucleotides to gastrin releasing peptide receptor. *Lung Cancer* 2002; 36: 235-242
- 16 Kang J, Ishola TA, Baregamian N, Mourot JM, Rychahou PG, Evers BM, Chung DH. Bombesin induces angiogenesis and neuroblastoma growth. *Cancer Lett* 2007; 253: 273-281
- 17 Pansky A, De Weerth A, Fasler-Kan E, Boulay JL, Schulz M, Ketterer S, Selck C, Beglinger C, Von Schrenck T, Hildebrand P. Gastrin releasing peptide-preferring bombesin receptors mediate growth of human renal cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 1409-1418
- 18 Farias CB, Lima RC, Lima LO, Flores DG, Meurer

- L, Brunetto AL, Schwartzmann G, Roesler R. Stimulation of proliferation of U138-MG glioblastoma cells by gastrin-releasing peptide in combination with agents that enhance cAMP signaling. *Oncology* 2008; 75: 27-31
- 19 Thomas SM, Grandis JR, Wentzel AL, Gooding WE, Lui VW, Siegfried JM. Gastrin-releasing peptide receptor mediates activation of the epidermal growth factor receptor in lung cancer cells. *Neoplasia* 2005; 7: 426-431
- 20 Bajo AM, Schally AV, Groot K, Szepeshazi K. Bombesin antagonists inhibit proangiogenic factors in human experimental breast cancers. *Br J Cancer* 2004; 90: 245-252
- 21 Kanashiro CA, Schally AV, Zarandi M, Hammann BD, Varga JL. Alterations of EGFR/HER, angiogenesis and apoptosis pathways after therapy with antagonists of growth hormone releasing hormone and bombesin in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* 2007; 30: 1019-1028
- 22 Heuser M, Schlott T, Schally AV, Kahler E, Schliephake R, Laabs SO, Hemmerlein B. Expression of gastrin releasing Peptide receptor in renal cell carcinomas: a potential function for the regulation of neoangiogenesis and microvascular perfusion. *J Urol* 2005; 173: 2154-2159
- 23 Chatzistamou I, Schally AV, Sun B, Armatos P, Szepeshazi K. Inhibition of growth of OV-1063 human epithelial ovarian cancers and c-jun and c-fos oncogene expression by bombesin antagonists. *Br J Cancer* 2000; 83: 906-913
- 24 Hohla F, Schally AV, Kanashiro CA, Buchholz S, Baker B, Kannadka C, Moder A, Aigner E, Datz C, Halmos G. Growth inhibition of non-small-cell lung carcinoma by BN/GRP antagonist is linked with suppression of K-Ras, COX-2, and pAkt. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 18671-18676
- 25 Qiao J, Kang J, Cree J, Evers BM, Chung DH. Gastrin-releasing peptide-induced down-regulation of tumor suppressor protein PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) in neuroblastomas. *Ann Surg* 2005; 241: 684-691; discussion 691-692
- 26 Ishola TA, Kang J, Qiao J, Evers BM, Chung DH. Phosphatidylinositol 3-kinase regulation of gastrin-releasing peptide-induced cell cycle progression in neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1770: 927-932
- 27 Flores DG, de Farias CB, Leites J, de Oliveira MS, Lima RC, Tamajusuku AS, Di Leone LP, Meurer L, Brunetto AL, Schwartzmann G, Lenz G, Roesler R. Gastrin-Releasing Peptide Receptors Regulate Proliferation of C6 Glioma Cells through a Phosphatidylinositol 3-Kinase-Dependent Mechanism. *Curr Neurovasc Res* 2008; 5: 99-105
- 28 Plonowski A, Schally AV, Varga JL, Rekasi Z, Hebert F, Halmos G, Groot K. Potentiation of the inhibitory effect of growth hormone-releasing hormone antagonists on PC-3 human prostate cancer by bombesin antagonists indicative of interference with both IGF and EGF pathways. *Prostate* 2000; 44: 172-180
- 29 Stangelberger A, Schally AV, Varga JL, Hammann BD, Groot K, Halmos G, Cai RZ, Zarandi M. Antagonists of growth hormone releasing hormone (GHRH) and of bombesin/gastrin releasing peptide (BN/GRP) suppress the expression of VEGF, bFGF, and receptors of the EGF/HER family in PC-3 and DU-145 human androgen-independent prostate cancers. *Prostate* 2005; 64: 303-315

■同行评价

本文主要论述了胃泌素释放肽受体(GRPR)在肿瘤治疗中的意义,包括肿瘤耐药、靶向治疗、靶向免疫治疗、反义核苷酸治疗和RNA干扰技术,以及BN/GRP拮抗物的抗癌机制等,简明扼要,能够反映该研究的最新成果。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志中文摘要要求

本刊讯 本刊中文摘要必须在350字左右,内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的),方法(必须包括材料或对象、应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写P, 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值). (常务副总编辑: 张海宇 2009-01-08)

P38丝裂原活化蛋白激酶信号通路与肝星状细胞

马超, 马红

■背景资料

肝纤维化是近年来的研究热点之一, 目前认为肝星状细胞的活化增殖并分泌大量细胞外基质是肝纤维化发生的中心事件, 然而对于HSC细胞内的信号机制仍不太明了。

马超, 马红, 首都医科大学附属北京友谊医院肝病中心 北京市 100050

作者贡献分布: 马超负责资料的搜集、整理及文章的撰写; 马红负责课题方向的选择及文章的审核。

通讯作者: 马红, 100050, 北京市, 首都医科大学附属北京友谊医院肝病中心. mc820927@yahoo.com.cn

电话: 010-63138728

收稿日期: 2008-11-04 修回日期: 2008-12-06

接受日期: 2008-12-08 在线出版日期: 2009-01-08

P38 mitogen-activated protein kinase signal pathway and hepatic stellate cells

Chao Ma, Hong Ma

Chao Ma, Hong Ma, Liver Research Center, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

Correspondence to: Hong Ma, Liver Research Center, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China. mc820927@yahoo.com.cn

Received: 2008-11-04 Revised: 2008-12-06

Accepted: 2008-12-08 Published online: 2009-01-08

Abstract

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) play a pivotal role in the transduction of extracellular signals to the nucleus, which results in numerous cellular responses, including proliferation, differentiation, and regulation of specific metabolic pathways. P38 MAPK is one of the MAPK-family groups. Hepatic stellate cells (HSCs) are the main effector cells in the occurrence of liver fibrosis, so this review describes P38 MAPK signal pathway and its role in HSCs.

Key Words: P38; Mitogen-activated protein kinase; Signal; Hepatic stellate cell

Ma C, Ma H. P38 mitogen-activated protein kinase signal pathway and hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(1): 68-73

摘要

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)是生物体内重要的信号转导系统之一, 是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 在细

胞的生长、发育、分化等方面发挥重要作用, P38丝裂原活化蛋白激酶(P38 MAPK)是其中的一个亚类。肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是肝纤维化形成过程中主要的效应细胞, 本文主要讨论P38 MAPK信号通路及其在肝星状细胞中发挥的作用。

关键词: P38; 丝裂原活化蛋白激酶; 信号; 肝星状细胞

马超, 马红. P38丝裂原活化蛋白激酶信号通路与肝星状细胞. *世界华人消化杂志* 2009; 17(1): 68-73

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/68.asp>

0 引言

肝星状细胞在肝纤维化形成过程中居核心地位^[1-2], 他的激活、增殖、并合成、分泌细胞外基质(extracellular matrix, ECM)等多种物质, 使ECM合成与降解失衡, 在肝脏内过度沉积, 肝脏结构改变, 导致肝纤维化^[3-4]。MAPK是细胞内主要的信号传递系统之一, 介导细胞内的多种生物学反应, 他主要包括细胞外调节激酶(extracellular signal regulated protein kinase, ERK), P38和c-Jun氨基末端激酶(JNK)/应激活化蛋白激酶(SAPK)、ERK5几个亚族, P38 MAPK是其中重要的一员, 在炎症、细胞应激、凋亡、细胞周期和生长等多种生理和病理过程中起重要作用^[5-6], 现就P38 MAPK信号通路及其在HSC中的作用作一综述。

1 P38 MAPK的组成

1993年Brewster *et al*^[7]在研究高渗环境对真菌的影响时发现了一种由360个氨基酸残基组成的分子量38 kDa的蛋白, 与已发现的JNK同属SAPK, 这就是P38 MAPK。哺乳动物P38 MAPK包括四种亚型 α , β , γ 和 δ , 其60%氨基酸序列是相同的, 但有着不同的表型及底物特异性。P38 α 、P38 β 分布广泛, P38 γ 主要存在于骨骼肌, P38 δ 主要在睾丸、胰腺、肾、小肠等器官表达^[8]。P38 MAPK可被细胞外的多种应激刺激(包括炎症因

■同行评议者

高润平, 教授, 吉林大学第一医院肝病科

子、紫外线、高渗、细胞毒物质等)激活^[9], 活化后的P38 MAPK调控下游多种酶及转录因子的基因表达活性, 进而调节细胞的功能。

2 P38 MAPK信号通路的活化

MAPK信号转导途径的激活是典型的三级酶促级联反应: MAPKKK(MAPK激酶的激酶)→MAPKK(MAPK激酶)→MAPK^[10]。P38 MAPK信号途径作为其中的一个亚类, 激活途径也相似。P38 MAPK的激活因子先激活上游的MAPKKK(包括MLK3、DLK、TAK等), 转而激活MKK3/MKK6, 磷酸化P38 MAPK 180位苏氨酸残基和182位酪氨酸残基^[11], 从而使P38 MAPK活化。虽然MKK4也可以激活P38 MAPK, 但没有特异性, 因为他也可以激活JNK, 而MKK3/MKK6则可特异性激活P38 MAPK^[12]。激活后的P38 MAPK可以调控下游多种酶及转录因子的基因表达活性^[13-14], 如MAPKAP2、ATF2、ELK1、MAX、ETS1、SAP1等, 进而调节细胞的生理功能^[15-16]。目前关于MAPKKK如何通过MKK激活P38激酶还不清楚, 仍需进一步的研究。

3 P38 MAPK信号通路的功能

P38 MAPK信号通路参与了细胞的生长发育及细胞间功能同步等多种生理过程, 与炎症及细胞周期调控密切相关。

有研究显示炎症刺激可激活P38 MAPK, 而P38 MAPK也可以调节TNF、IL-1、IL-6等致炎因子与IL-12等抗炎因子的生成, 影响生物体内致炎与抗炎因素的平衡, 从而决定炎症的进程^[17-18]。Smolen *et al*^[19]发现选择性阻断TNF、IL-1、IL-6等炎症因子, 可以阻止类风湿性关节炎患者关节炎的进展和关节结构破坏, 提示P38 MAPK与类风湿性关节炎有密切的关系^[20-21]。Dong *et al*^[22]研究P38 MAPK与心肺分流术(CPB)后肺的炎症反应的关系, 将成年♂SD大鼠随机分为对照组、手术组和SB预处理手术组(SB203580是P38 MAPK的特异性抑制剂), 在实验的不同时间点观察检测指标, 发现SB预处理的大鼠手术后肺的炎症反应减轻, P38 MAPK信号通路可上调TNF- α 、IL-1等致炎因子的表达, 说明P38 MAPK信号通路介导CPB术后肺的炎症反应, 提示P38 MAPK在炎症反应的调节中起重要作用。

P38 MAPK信号通路也参与对细胞凋亡的

调节^[23]。同型半胱氨酸50 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot 24\text{ h})$ 作用于肾小球膜细胞, 采用TUNEL和ssDNA法观测到细胞凋亡的增加, 细胞活性氧簇(ROS)含量也增加。同型半胱氨酸50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 作用20 min时细胞内P38 MAPK活性增强至最高, 而N-乙酰半胱氨酸与过氧化氢酶能减弱P38 MAPK的活性, 说明氧化应激起介导作用。研究者还发现乙酰半胱氨酸、过氧化氢酶和SB203580可抵消同型半胱氨酸诱导的凋亡效应, 提示同型半胱氨酸依赖氧化应激激活P38 MAPK信号通路促进肾小球膜细胞的凋亡^[24]。同样有研究发现局部应用P38 MAPK抑制剂可以减弱烧伤创面上皮细胞的凋亡^[25], 证明P38 MAPK在调节细胞凋亡中发挥作用。而此作用有可能是P38 MAPK活化后通过影响凋亡相关基因的表达实现的, 有待进一步的研究。

4 P38丝裂原活化蛋白激酶与HSC

肝星状细胞是肝纤维化的主要效应细胞^[26-27], 在各种因素作用下, 肝细胞、Kupffer细胞、内皮细胞和星状细胞自身可产生多种细胞因子与活化产物等, 这些因子可以通过各种信号通路调节HSC的功能^[28], 体外的环境刺激及药物等也可通过一定的信号通路调节HSC的功能, 在这些信号通路中P38 MAPK是其中重要的一条。

Schnabl *et al*^[29]利用从SD大鼠分离的HSC研究阻断TAK1/JNK和P38 MAPK信号通路后对其的影响。分离培养1 d的为静息态细胞, 培养5 d的可视为活化的星状细胞, 分别用表达TAK1的腺病毒载体、JNK的特异性阻断剂SP600125阻断JNK通路, P38 MAPK的特异性阻断剂SB203580阻断P38 MAPK信号通路。观察发现阻断TAK1/JNK和P38 MAPK可以降低静息HSC α -SMA蛋白的表达, 而对活化HSC基本没有影响。研究还发现阻断P38 MAPK可减少 $\alpha 1(\text{I})$ 型胶原mRNA的表达, 但促进HSC的增殖, 而阻断TAK1/JNK则起相反的作用。由此我们可以看出活化的P38 MAPK信号通路有抑制HSC增殖、增加胶原生成的功能。P38 MAPK对细胞周期有调节作用^[30], 有研究显示他可以抑制细胞周期蛋白D1的基因转录和蛋白合成, 这也可能是其抑制细胞增殖的原因之一。

4.1 P38 MAPK通路调节转化生长因子对HSC的作用 已经证实转化生长因子(TGF)是刺激HSC分泌ECM作用最强的细胞因子之一, TGF β 由Kupffer细胞、窦状内皮细胞、胆管上皮细胞、

■研发前沿

目前对于HSC中的信号转导, 研究较多的是各类促纤维化因子独立的信号系统, 期望能通过对特异信号的干预达到阻止其作用的目的, 然而对各类细胞因子间存在的共同信号通路及各细胞因子间与信号通路间的相互影响了解较少, 仍需要更深入的研究。

■相关报道

肝星状细胞内的信号转导, MAPK占重要地位, 除P38 MAPK外, 他的其余亚族JNK、ERK、ERK5在其中也发挥着重要作用, 阅读相关文献可以更全面了解MAPK在HSC中的作用。

■创新盘点

本篇文章主要选取了P38 MAPK这一条通路,介绍其对HSC的调节作用,并发现在各细胞因子间此通路普遍发挥作用,调节HSC细胞外基质的分泌,这对于了解此通路在肝纤维化中机制的作用有积极意义。

肝细胞和HSC等多种细胞所分泌,是肝内主要的纤维生成因子^[31]。Smad信号蛋白通路是TGF β 比较经典的信号转导通路^[32-33],然而近年的研究结果发现P38 MAPK在TGF β 介导的HSC效应中也发挥着重要的作用。曾有报道表明在培养的肌成纤维细胞(HSC转化而来)中,TGF β 可先激活P38 MAPK通路,然后进一步导致Smad3交联区磷酸化,促使Smad3和Smad4异体复合物形成并移位核内,结合到PAI-1启动子促进基因的表达^[34]。Tsukada *et al*^[35]发现5 μ g/L TGF β 作用HSC后,采用Western blot方法于60 min和120 min检测到P38 MAPK蛋白的表达(包含磷酸化蛋白),而用P38 MAPK的特异性阻断剂SB203580预孵育1 h,则可以阻断TGF β 诱导的P38 MAPK蛋白活性。他们还用转导了Ad5smad7的HSC,以阻断Smad信号通路,然后用TGF β 作用2 h,发现阻断Smad信号通路并不影响基础的和TGF β 诱导的P38 MAPK活性。同样地,阻断P38 MAPK也不影响Smad信号通路,说明P38 MAPK是TGF β 在HSC内可独立于Smad信号之外。研究者进一步研究了P38在调节HSC α 1(I)胶原基因表达中的作用,他们发现阻断P38 MAPK或Smad均可降低培养活化的和TGF β 诱导活化的HSC α 1(I)胶原基因的表达,而同时抑制两条通路则 α 1(I)胶原基因的表达几乎完全被阻断,P38既独立调节HSC α 1(I)胶原基因表达又与Smad有协同作用。此项研究还发现增加HSC α 1(I)胶原 mRNA稳定性是由P38 MAPK介导的。Varela-Rey *et al*^[36]也报道在CFSC-2GHSC系,TGF β 增加了P38 MAPK磷酸化作用,而SB203580可抑制TGF β 诱导的胶原mRNA产生。另外P38 MAPK信号通路对HSC基质金属蛋白酶的表达也有影响,Lechuga *et al*^[37]发现TGF β 在诱导 α 1(I)胶原mRNA表达的同时会引起MMP13 mRNA水平的急速降低,发生在TGF β 作用后6 h之内,并且伴随着MMP13基因转录的双倍增加和mRNA半衰期的5倍降低,之后MMP13 mRNA水平增加,至48 h达最大值。研究者同时研究了P38 MAPK蛋白在MMP13 mRNA水平上调中的作用,发现TGF β 能快速诱导P38 MAPK的活性,在5 min达最大,30 min后则低于对照值。TGF β 与SB203580的孵育实验显示阻断P38 MAPK虽然对MMP13 mRNA的基础表达没有影响,却能显著抑制TGF β 的诱导作用,不过对MMP13的蛋白表达没有抑制作用。以上研究揭示在TGF β 对HSC的调节作用中,P38 MAPK

信号通路发挥着重要的作用。

4.2 P38 MAPK通路调节瘦素对HSC的作用 瘦素在肝纤维化形成过程中也发挥了重要的作用^[38-39]。Cao *et al*^[40]研究瘦素诱导人HSC细胞系LX-2表达TIMP1的分子机制时发现,瘦素可磷酸化P38 MAPK蛋白并且呈剂量和时间依赖性。瘦素浓度达75 μ g/L时效应最明显,而在此浓度作用下2 h到24 h活性达峰值,约为对照组的3.6倍。进一步给予LX-2细胞JAK抑制剂AG490(50 μ mol/L)、过氧化氢酶(1000 units/mL)、SB203580(20 μ mol/L)或负性P38 MAPK突变体,发现均可抑制P38 MAPK的活性,但ERK抑制剂PD098059没有此效应,说明JAK和过氧化氢参与瘦素诱导的LX-2细胞内P38 MAPK途径的活化。抑制P38 MAPK通路也能抑制LX-2细胞瘦素诱导的TIMP1 mRNA的表达。研究者认为瘦素与受体结合,通过JAK途径诱发过氧化氢(H₂O₂)产生,进而诱导过氧化氢依赖的P38 MAPK的活化,活化的P38 MAPK参与对LX-2细胞TIMP1 mRNA的调节,他可以增加TIMP1 mRNA的稳定性,但对其基因启动子没有影响。瘦素对TIMP1基因启动子的调节作用由JAK-STAT、JAK-H₂O₂-ERK信号通路完成。瘦素对LX-2细胞MMP1、 α 1(I)胶原基因表达的信号途径与此相似,P38 MAPK蛋白主要调节基因的稳定性^[41]。Cao *et al*^[42]应用DLPC(双亚麻油酸磷脂胆碱)和SAME(腺苷甲硫氨酸)就是通过抑制H₂O₂介导的ERK与P38 MAPK通路,完全抑制了瘦素或menadione诱导的LX-2细胞 α 1(I)胶原基因表达,相似的也可以下调TIMP1基因表达^[43],为肝纤维化的治疗提供了可能的途径。

4.3 P38 MAPK通路调节血小板源性生长因子对HSC的作用 血小板源性生长因子(PDGF)是强大的促细胞分裂剂,是体内主要的促纤维化因子^[44-45]。现已发现4种亚型,且在HSC均有表达^[46]。Adachi *et al*^[47]研究了PDGF诱导HSC增殖效应及NAD(P)H氧化酶在其中的作用和信号机制。所用细胞来自LI-90细胞系和6周龄♀BALB/c小鼠分离的原代HSC。研究发现应用5、10、20 μ g/L PDGF-BB作用HSC24 h,与未受刺激的对照组相比,PDGF-BB可呈剂量依赖性促进LI-90细胞增殖,细胞数量明显增加,用Mn-TBAP(可清除细胞内的活性氧)预处理LI-90细胞30 min,发现可以明显抑制PDGF-BB的促增殖效应,且有剂量依赖性。研究中观察到PDGF-BB诱导星状细胞内表达NAD(P)H氧化酶,抑制该酶则抑

制了PDGF-BB的促增殖效应, 表明NAD(P)H氧化酶在PDGF-BB诱导HSC增殖中的重要作用. 研究者进一步分析了PDGF-BB的作用机制, ERK和P38 MAPK蛋白均被活化, 然而ERK抑制剂PD98059(25 $\mu\text{mol/L}$)、P38 MAPK抑制剂SB203580(25 $\mu\text{mol/L}$)预处理LI-90细胞1 h, 发现SB203580组的抑制增殖效应明显强于PD98059组. 抑制NAD(P)H氧化酶可抑制P38 MAPK活化, 但对ERK无影响, H_2O_2 与PDGF-BB共同孵育, 能抵消对P38 MAPK的抑制作用. 以上研究说明PDGF-BB可诱导HSC细胞NAD(P)H氧化酶的表达, 并生成活性氧进而通过P38 MAPK信号通路发挥促进HSC增殖的作用. 有趣的是Tangkijvanich *et al*^[48]曾发现PDGF-BB能促进肌成纤维细胞的迁移增殖, 并且诱导P38 MAPK及其下游效应分子的活化, 他们得出结论肌成纤维细胞的迁移由PDGF-BB通过P38 MAPK信号通路介导, 然而其增殖效应却由ERK介导而非P38 MAPK信号通路. 最近也有报道PDGF-D对体外培养的HSC和肝成纤维细胞有促有丝分裂与纤维生成作用, 并且检测到包括P38 MAPK在内的信号蛋白的活化, 但对P38 MAPK在其中发挥的作用未进行深入研究^[49].

4.4 P38 MAPK通路调节其他因素对HSC的作用 Varela-Rey *et al*^[36]用10 $\mu\text{g/L}$ TNF α 作用于CFSC-2GHSC 24 h, Western blot检测发现TNF α 降低P38 MAPK磷酸化水平, 并且此作用是依赖A-Smase的. 抑制P38 MAPK可抑制 $\alpha 1(\text{I})$ 型胶原mRNA的表达, 单用SB203580即可观察到, 若与TNF α 联用, 相比对照组可抑制80% $\alpha 1(\text{I})$ 型胶原mRNA的表达. Marra *et al*^[50]研究人HSC内CCL2(单核细胞趋化蛋白1)表达的信号机制, 用SB203580抑制P38 MAPK通路, 可阻断IL-1(20 $\mu\text{g/L}$)、或TNF α (100 $\mu\text{g/L}$)诱导的CCL2的基因与蛋白表达.

有研究表明Halofuginone(HAL)200 μM 可抑制HSCCFSC-2G的增殖和迁移, 上调MMP-3和MMP-13的表达, 2-3倍增加间质胶原酶的活性, 降低 $\alpha 1(\text{I})$ 原胶原和MMP-2的转录水平, 深入研究其作用机制, 发现P38 MAPK和NF- κB 信号途径被激活, 并且HAL对MMP-13的调节作用可被SB203580和MG132(抑制NF- κB)所阻断, 而抑制其他通路对其没有影响, 说明是这两条信号通路介导了HAL对星状细胞的效应^[51].

5 结论

P38 MAPK信号通路参与了对星状细胞的活化

增殖、迁移, 合成胶原、MMP、TIMP等多种生物学功能的调节. 不同的细胞因子或环境刺激及药物通过此通路可能产生不同的作用. P38 MAPK也可能与细胞内其他的信号通路产生交叉, 使作用机制更趋复杂, 在此我们主要探讨了P38 MAPK通路在HSC中发挥的作用. 目前人们对P38 MAPK的兴趣日渐增加, 但对其的认识仍有待深入. 研究P38 MAPK在调节HSC功能中的作用对于阐明肝纤维化的发病机制, 找到合适的防治肝纤维化的方法有着积极的意义.

6 参考文献

- Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 76-99
- Sato M, Suzuki S, Senoo H. Hepatic stellate Sato M, Suzuki S, Senoo H. Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct Funct* 2003; 28: 105-112
- Wells RG. Cellular sources of extracellular matrix in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 759-768, viii
- Tsukada S, Parsons CJ, Rippe RA. Mechanisms of liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2006; 364: 33-60
- Brown MD, Sacks DB. Compartmentalised MAPK pathways. *Handb Exp Pharmacol* 2008; : 205-235
- Aouadi M, Binetruy B, Caron L, Le Marchand-Brustel Y, Bost F. Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice. *Biochimie* 2006; 88: 1091-1098
- Brewster JL, de Valoir T, Dwyer ND, Winter E, Gustin MC. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* 1993; 259: 1760-1763
- Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773: 1358-1375
- Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001; 81: 807-869
- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 1999; 79: 143-180
- Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 1995; 270: 7420-7426
- Raingeaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Dérizaj B, Davis RJ. MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 1247-1255
- Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T, Nebreda AR. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 1994; 78: 1027-1037
- Zervos AS, Faccio L, Gatto JP, Kyriakis JM, Brent R. Mxi2, a mitogen-activated protein kinase that

■应用要点

干预肝星状细胞内的某些信号转导通路, 可能会达到阻止HSC的异常功能, 阻止肝纤维化的发展. 此文对于阐明肝星状细胞在肝纤维化的发病中的信号机制具有实际意义.

■同行评价

本文系统介绍了P38 MAPK信号通路在肝星状细胞生物学作用的调节功能,对于阐明肝星状细胞在肝纤维化的发病机制具有实际意义。

- recognizes and phosphorylates Max protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 10531-10534
- 15 Engel FB, Schebesta M, Duong MT, Lu G, Ren S, Madwed JB, Jiang H, Wang Y, Keating MT. p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes Dev* 2005; 19: 1175-1187
 - 16 de Angelis L, Zhao J, Andreucci JJ, Olson EN, Cossu G, McDermott JC. Regulation of vertebrate myotome development by the p38 MAP kinase-MEF2 signaling pathway. *Dev Biol* 2005; 283: 171-179
 - 17 Schindler JF, Monahan JB, Smith WG. p38 pathway kinases as anti-inflammatory drug targets. *J Dent Res* 2007; 86: 800-811
 - 18 Kumar S, Boehm J, Lee JC. p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2: 717-726
 - 19 Smolen JS, Steiner G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2: 473-488
 - 20 Ralph JA, Morand EF. MAPK phosphatases as novel targets for rheumatoid arthritis. *Expert Opin Ther Targets* 2008; 12: 795-808
 - 21 Schett G, Zwerina J, Firestein G. The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008; 67: 909-916
 - 22 Dong X, Liu Y, Du M, Wang Q, Yu CT, Fan X. P38 mitogen-activated protein kinase inhibition attenuates pulmonary inflammatory response in a rat cardiopulmonary bypass model. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006; 30: 77-84
 - 23 Dhingra S, Sharma AK, Singla DK, Singal PK. p38 and ERK1/2 MAPKs mediate the interplay of TNF-alpha and IL-10 in regulating oxidative stress and cardiac myocyte apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: H3524-H3531
 - 24 Shastry S, Ingram AJ, Scholey JW, James LR. Homocysteine induces mesangial cell apoptosis via activation of p38-mitogen-activated protein kinase. *Kidney Int* 2007; 71: 304-311
 - 25 Ipaktchi K, Mattar A, Niederbichler AD, Hoesel LM, Hemmila MR, Su GL, Remick DG, Wang SC, Arbabi S. Topical P38 MAPK inhibition reduces dermal inflammation and epithelial apoptosis in burn wounds. *Shock* 2006; 26: 201-209
 - 26 Friedman SL. Hepatic fibrosis-Overview. *Toxicology* 2008; 254: 120-129
 - 27 Li JT, Liao ZX, Ping J, Xu D, Wang H. Molecular mechanism of hepatic stellate cell activation and antifibrotic therapeutic strategies. *J Gastroenterol* 2008; 43: 419-428
 - 28 林羨屏, 王小众. 肝纤维化相关因子及其作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1037-1043
 - 29 Schnabl B, Bradham CA, Bennett BL, Manning AM, Stefanovic B, Brenner DA. TAK1/JNK and p38 have opposite effects on rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 2001; 34: 953-963
 - 30 Kiyono T. Molecular mechanisms of cellular senescence and immortalization of human cells. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11: 1623-1637
 - 31 Breitkopf K, Haas S, Wiercinska E, Singer MV, Dooley S. Anti-TGF-beta strategies for the treatment of chronic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29: 121S-131S
 - 32 Liu X, Hu H, Yin JQ. Therapeutic strategies against TGF-beta signaling pathway in hepatic fibrosis. *Liver Int* 2006; 26: 8-22
 - 33 Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 397-416
 - 34 Furukawa F, Matsuzaki K, Mori S, Tahashi Y, Yoshida K, Sugano Y, Yamagata H, Matsushita M, Seki T, Inagaki Y, Nishizawa M, Fujisawa J, Inoue K. p38 MAPK mediates fibrogenic signal through Smad3 phosphorylation in rat myofibroblasts. *Hepatology* 2003; 38: 879-889
 - 35 Tsukada S, Westwick JK, Ikejima K, Sato N, Rippe RA. SMAD and p38 MAPK signaling pathways independently regulate alpha1(I) collagen gene expression in unstimulated and transforming growth factor-beta-stimulated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 10055-10064
 - 36 Varela-Rey M, Montiel-Duarte C, Osés-Prieto JA, López-Zabalza MJ, Jaffrèzou JP, Rojkind M, Iraburu MJ. p38 MAPK mediates the regulation of alpha1(I) procollagen mRNA levels by TNF-alpha and TGF-beta in a cell line of rat hepatic stellate cells(1). *FEBS Lett* 2002; 528: 133-138
 - 37 Lechuga CG, Hernández-Nazara ZH, Domínguez Rosales JA, Morris ER, Rincón AR, Rivas-Estilla AM, Esteban-Gamboa A, Rojkind M. TGF-beta1 modulates matrix metalloproteinase-13 expression in hepatic stellate cells by complex mechanisms involving P38 MAPK, PI3-kinase, AKT, and p70S6k. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G974-G987
 - 38 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
 - 39 Bethanis SK, Theocharis SE. Leptin in the field of hepatic fibrosis: a pivotal or an incidental player? *Dig Dis Sci* 2006; 51: 1685-1696
 - 40 Cao Q, Mak KM, Ren C, Lieber CS. Leptin stimulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human hepatic stellate cells: respective roles of the JAK/STAT and JAK-mediated H₂O₂-dependent MAPK pathways. *J Biol Chem* 2004; 279: 4292-4304
 - 41 Cao Q, Mak KM, Lieber CS. Leptin represses matrix metalloproteinase-1 gene expression in LX2 human hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2007; 46: 124-133
 - 42 Cao Q, Mak KM, Lieber CS. DLPC and SAME prevent alpha1(I) collagen mRNA up-regulation in human hepatic stellate cells, whether caused by leptin or menadione. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 350: 50-55
 - 43 Cao Q, Mak KM, Lieber CS. DLPC and SAME combined prevent leptin-stimulated TIMP-1 production in LX-2 human hepatic stellate cells by inhibiting HO-mediated signal transduction. *Liver Int* 2006; 26: 221-231
 - 44 Czochra P, Kloplic B, Meyer E, Herkel J, Garcia-Lazaro JF, Thieringer F, Schirmacher P, Biesterfeld S, Galle PR, Lohse AW, Kanzler S. Liver fibrosis induced by hepatic overexpression of PDGF-B in transgenic mice. *J Hepatol* 2006; 45: 419-428
 - 45 Novosyadlyy R, Dudas J, Pannem R, Ramadori G, Scharf JG. Crosstalk between PDGF and IGF-I receptors in rat liver myofibroblasts: implication for liver fibrogenesis. *Lab Invest* 2006; 86: 710-723
 - 46 Breitkopf K, Roeyen C, Sawitzka I, Wickert L, Floege J, Gressner AM. Expression patterns of PDGF-A, -B, -C and -D and the PDGF-receptors alpha and beta in activated rat hepatic stellate cells (HSC). *Cytokine*

- 2005; 31: 349-357
- 47 Adachi T, Togashi H, Suzuki A, Kasai S, Ito J, Sugahara K, Kawata S. NAD(P)H oxidase plays a crucial role in PDGF-induced proliferation of hepatic stellate cells. *Hepatology* 2005; 41: 1272-1281
- 48 Tangkijvanich P, Santiskulvong C, Melton AC, Rozengurt E, Yee HF Jr. p38 MAP kinase mediates platelet-derived growth factor-stimulated migration of hepatic myofibroblasts. *J Cell Physiol* 2002; 191: 351-361
- 49 Borkham-Kamphorst E, van Roeyen CR, Ostendorf T, Floege J, Gressner AM, Weiskirchen R. Pro-fibrogenic potential of PDGF-D in liver fibrosis. *J Hepatol* 2007; 46: 1064-1074
- 50 Marra F, Delogu W, Petrai I, Pastacaldi S, Bonacchi A, Efsen E, Aleffi S, Bertolani C, Pinzani M, Gentilini P. Differential requirement of members of the MAPK family for CCL2 expression by hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G18-G26
- 51 Popov Y, Patsenker E, Bauer M, Niedobitek E, Schulze-Krebs A, Schuppan D. Halofuginone induces matrix metalloproteinases in rat hepatic stellate cells via activation of p38 and NFkappaB. *J Biol Chem* 2006; 281: 15090-15098

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志修回稿须知

本刊讯 为了保证作者来稿及时发表, 同时保护作者与世界华人消化杂志的合法权益, 本刊对修回稿要求如下.

1 修回稿信件

来稿包括所有作者签名的作者投稿函. 内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版版权转让给本刊编辑部.

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将修改后的稿件及光盘寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回的, 作重新投稿处理.

3 版权

本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负. 作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期); 起止页码. 如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有. 编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录. (常务副总编辑: 张海宁 2009-01-08)

外源性一氧化碳对小肠缺血再灌注大鼠多形核中性粒细胞聚集及血浆TNF- α 、IL-10的影响

韩宁, 李勇, 陈卫民

■背景资料

小肠缺血再灌注是临床常见的病理生理过程, 严重时可能导致多器官功能障碍综合征形成。而过去一直被认为是毒性气体的一氧化碳被发现作为一种细胞信使在生物体各种生理和病理过程中发挥着重要调节作用。

韩宁, 陈卫民, 中国医科大学附属盛京医院麻醉科 辽宁省沈阳市 110004

李勇, 辽河油田妇婴医院麻醉科 辽宁省盘锦市 124000

作者贡献分布: 此课题由韩宁与陈卫民设计; 研究过程由韩宁与李勇操作完成; 研究所用试剂及分析工具由陈卫民提供; 数据分析由韩宁完成; 本论文写作由韩宁, 李勇及陈卫民完成。

通讯作者: 韩宁, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院麻醉科. hann@sj-hospital.org
电话: 024-83955027

收稿日期: 2008-12-01 修回日期: 2008-12-10

接受日期: 2008-12-15 在线出版日期: 2009-01-08

Effects of exogenous carbon monoxide on polymorphonuclear neutrophil, TNF- α and IL-10 expression in rats with intestinal ischemia-reperfusion injury

Ning Han, Yong Li, Wei-Min Chen

Ning Han, Wei-Min Chen, Department of Anesthesiology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Yong Li, Department of Anesthesiology, Maternal and Child Hospital of Liaohe Oil Field, Panjin 124000, Liaoning Province, China

Correspondence to: Ning Han, Department of Anesthesiology, Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. hann@sj-hospital.org

Received: 2008-12-01 Revised: 2008-12-10

Accepted: 2008-12-15 Published online: 2009-01-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of carbon monoxide (CO) on multiple organ injury induced by intestinal ischemia-reperfusion (IIR) in rats.

METHODS: Sixty-four male Wistar rats were randomly allocated to eight groups with eight in each group. Different groups were handled. The numbers of PMN in different tissues were observed at light microscopy, and the plasma TNF- α , IL-10 concentrations were determined using radio-immunofunction method.

RESULTS: Marked differences in PMN of intestine, lung and liver were detected among

groups, but not in kidney (66 ± 6 vs 60 ± 4 , 55 ± 3 , 49 ± 4 , 42 ± 4 , 37 ± 3 , 30 ± 2 , 26 ± 2 ; 52 ± 5 vs 43 ± 5 , 42 ± 4 , 34 ± 2 , 32 ± 2 , 25 ± 2 , 23 ± 2 , 18 ± 2 ; 35 ± 3 vs 30 ± 3 , 26 ± 1 , 23 ± 2 , 20 ± 1 , 19 ± 1 , 16 ± 1 , all $P < 0.05$). Significant differences in TNF- α , IL-10 were detected among all group (3.15 ± 0.05 vs 2.37 ± 0.14 , 2.07 ± 0.07 , 1.89 ± 0.07 , 1.69 ± 0.09 , 1.53 ± 0.06 , 1.31 ± 0.06 , 1.15 ± 0.04 ; 138.9 ± 11.37 , 118.75 ± 7.69 , 100.55 ± 4.86 , 83.12 ± 5.13 , 61.41 ± 6.88 , 40.56 ± 2.85 vs 23.55 ± 4.94 , 23.55 ± 4.94 vs 36 ± 2.37 , all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Exogenous CO provides protection against multiple organ injury induced by IIR, partly through inhibiting PMN aggregation in tissues, inhibiting the elevation of TNF- α and promoting the release of IL-10.

Key Words: Carbon monoxide; Small intestine; Ischemia-reperfusion; Polymorphonuclear neutrophil; Tumor necrosis factor- α ; Interleukin-10

Han N, Li Y, Chen WM. Effects of exogenous carbon monoxide on polymorphonuclear neutrophil, TNF- α and IL-10 expression in rats with intestinal ischemia-reperfusion injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(1): 74-77

摘要

目的: 通过检测小肠缺血再灌注(IIR)大鼠不同组织内多形核中性粒细胞(PMN)聚集及血浆肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-10(IL-10)浓度的变化, 探讨外源性CO对IIR所致多器官损伤防治作用的机制。

方法: δ Wistar大鼠64只, 随机分为8组, 给予不同实验方法处理。实验结束时取不同组织光镜下计数PMN聚集情况, 取动脉血放免法检测血浆TNF- α 和IL-10浓度。

结果: 肠、肺和肝组织中PMN数目在各组存在差异(66 ± 6 vs 60 ± 4 , 55 ± 3 , 49 ± 4 , 42 ± 4 , 37 ± 3 , 30 ± 2 , 26 ± 2 ; 52 ± 5 vs 43 ± 5 , 42 ± 4 , 34 ± 2 , 32 ± 2 , 25 ± 2 , 23 ± 2 , 18 ± 2 ; 35 ± 3 vs 30 ± 3 , 26 ± 1 , 23 ± 2 , 20 ± 1 , 19 ± 1 , 16 ± 1)

■同行评议者

魏经国, 教授, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院放射科; 程爱国, 教授, 华北煤炭医学院临床医学系

1, 均 $P<0.05$); 肾组织中各组PMN数目无明显差异. 各组血浆TNF- α 、IL-10存在明显差异(3.15 ± 0.05 vs 2.37 ± 0.14 , 2.07 ± 0.07 , 1.89 ± 0.07 , 1.69 ± 0.09 , 1.53 ± 0.06 , 1.31 ± 0.06 , 1.15 ± 0.04 ; 138.9 ± 11.37 , 118.75 ± 7.69 , 100.55 ± 4.86 , 83.12 ± 5.13 , 61.41 ± 6.88 , 40.56 ± 2.85 vs 23.55 ± 4.94 , 23.55 ± 4.9415 vs 36 ± 2.37 , 均 $P<0.05$).

结论: 外源性CO对IIR所致器官损伤的防治作用可能是通过抑制IIR过程中PMN在组织中的聚集, 抑制TNF- α 产生和促进IL-10释放实现的.

关键词: 一氧化碳; 小肠; 缺血再灌注; 多形核中性粒细胞; 肿瘤坏死因子- α ; 白细胞介素-10

韩宁, 李勇, 陈卫民. 外源性一氧化碳对小肠缺血再灌注大鼠多形核中性粒细胞聚集及血浆TNF- α 、IL-10的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(1): 74-77

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/74.asp>

0 引言

小肠缺血再灌注(intestinal ischemia-reperfusion, IIR)过程中, 多形核中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophil, PMN)在组织中的聚集^[1]及多种细胞因子^[2]在小肠局部及全身的大量释放能互为因果的引起全身炎症反应综合征(systemic inflammation response syndrome, SIRS), 促炎因子与抑炎因子的严重失衡是最终导致多器官损伤的重要因素之一^[3-5]. 而过去一直被认为是一种毒性气体的一氧化碳(carbon monoxide, CO)现在经研究被发现作为一种细胞信使在人体各种生理和病理过程中发挥着重要调节作用. 本研究通过建立大鼠IIR模型, 观察外源性应用CO对大鼠不同组织内PMN聚集及血浆肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-10(IL-10)的影响, 进一步探讨外源性CO对IIR所致多器官损伤防治作用的机制.

1 材料和方法

1.1 材料 64只体质量220-260 g健康的 δ Wistar大鼠由中国医科大学实验动物中心提供, 标准一氧化碳气体由大连大特气体有限公司提供(压力9.0 MPa, 浓度 $250\times 10^{-6}/100\times 10^{-6}$, 空气平衡), 放免法TNF- α 与IL-10检测试剂盒(北京华英生物技术研究所提供); Olympus ML2000型显微镜由日本提供, GC-911- γ -放射免疫计数器由中国提供; Heraus-Biofuge-PrimoR型超速低温离心机由德国提供; B-D微量输液泵、B-D动静脉留置套管

针由美国提供.

1.2 方法

1.2.1 动物模型制作: 大鼠实验前禁食12 h, 自由饮水. 采用肠系膜上动脉(superior mesenteric artery, SMA)夹闭-开放方式复制IIR模型^[6]. 大鼠ip. 乌拉坦(1.0 g/kg)麻醉, 开放股静脉持续微泵输注乳酸钠林格氏液10 mL/(kg·h). 行颈动脉置管(用于测定动脉压及采血), 气管切开插管后接带单向活瓣T型管(活瓣能保证吸入气为所需气体, 呼出气进入大气), 保留自主呼吸. 常规消毒后取腹正中切口3-4 cm, 游离肠系膜上动脉, 血压平稳10 min后行显微手术用无损伤动脉夹关闭SMA起始部, 造成肠缺血; 缝合切口, 60 min后经原切口入腹腔, 去除动脉夹, 恢复小肠血供120 min, 即为IIR模型.

1.2.2 动物分组: 将大鼠随机分为8组, 每组8只. A组: 假手术对照组, 不阻断SMA, 其余手术过程同其他组; B组: 小肠缺血再灌注组, 经T型管吸入空气; C组: 缺血前10 min CO吸入组, 按吸入CO浓度(100 μ L/L, 250 μ L/L)分为两个亚组; D组: 再灌注开始时CO吸入组, 按吸入CO浓度(100 μ L/L, 250 μ L/L)分为两个亚组; E组: 再灌注后60 min CO吸入组, 按吸入CO浓度(100 μ L/L, 250 μ L/L)分为两个亚组.

1.2.3 组织中PMN计数: 实验结束时取右下肺、空肠、肝右叶、肾部分组织, 100 g/L甲醛固定, 脱水后常规石蜡包埋切片, 行HE染色, 普通光镜下观察. 双盲法高倍镜($\times 400$)下随机选择10个视野, 对其中PMN进行计数, 并取平均值.

1.2.4 血浆TNF- α 、IL-10浓度: 实验结束时经颈动脉取血2 mL, 静置10 min后4 $^{\circ}$ C 3600 r/min离心15 min取上清, 置于-20 $^{\circ}$ C冰箱保存待测. 采用放免法检测, 按试剂盒说明书操作, 由自动 γ -计数器直接读出结果.

统计学处理 数据以mean \pm SD表示. 采用SPSS13.0专业统计软件对数据进行单因素方差分析和 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 组织中PMN计数(表1)

2.1.1 肠 B组可见大量PMN聚集. C、D、E各组PMN数目少于B组($P<0.05$), 但多于A组($P<0.05$); 且C组<D组<E组, 组间有差异($P<0.05$); 各组内亚组PMN有差异, 且1组多于2组($P<0.05$).

2.1.2 肺 B组可见较多PMN聚集. C、D、E各组PMN数目明显少于B组($P<0.01$), 但多于

■ 研发前沿

CO现已发现在生物体内具有舒张血管和支气管平滑肌、抑制血小板聚集、抑制炎症反应、抗凋亡、抗增殖等多种生理学作用, 在神经、呼吸、循环等生理过程和抑制急性肺损伤、脏器缺血再灌注损伤、器官移植排斥反应等病理过程中发挥着重要调节作用.

应用要点

本研究检测不同组织内PMN聚集及血浆TNF- α 、IL-10浓度,探讨外源性CO对IIR所致多器官损伤防治作用的机制,为临床治疗MODS提供新的参考。

表1 大鼠各组织中PMN计数(个/HP, $n = 8$, mean \pm SD)

分组	A	B	C1	C2	D1	D2	E1	E2
肠	26 \pm 2	66 \pm 6 ^c	37 \pm 3 ^a	30 \pm 2 ^a	49 \pm 4 ^a	42 \pm 4 ^a	60 \pm 4 ^a	55 \pm 3 ^a
肺	18 \pm 2	52 \pm 5 ^c	25 \pm 2 ^a	23 \pm 2 ^a	34 \pm 2 ^a	32 \pm 2 ^a	43 \pm 5 ^a	42 \pm 4 ^a
肝	13 \pm 1	35 \pm 3 ^c	19 \pm 1 ^a	16 \pm 1 ^a	23 \pm 2 ^a	20 \pm 1 ^a	30 \pm 3 ^a	26 \pm 1 ^a
肾	14 \pm 2	16 \pm 1	13 \pm 1	14 \pm 1	13 \pm 1	12 \pm 2	12 \pm 2	12 \pm 1

^a $P < 0.05$ vs B组; ^c $P < 0.05$ vs A组.

分组	A	B	C1	C2	D1	D2	E1	E2
TNF- α	1.15 \pm 0.04	3.15 \pm 0.05 ^c	1.53 \pm 0.06 ^a	1.31 \pm 0.06 ^a	1.89 \pm 0.07 ^a	1.69 \pm 0.09 ^a	2.37 \pm 0.14 ^a	2.07 \pm 0.07 ^a
IL-10	15.36 \pm 2.37	23.55 \pm 4.94 ^c	118.75 \pm 7.69 ^a	138.9 \pm 11.37 ^a	83.12 \pm 5.13 ^a	100.55 \pm 4.86 ^a	40.56 \pm 2.85 ^a	61.41 \pm 6.88 ^a

^a $P < 0.05$ vs B组; ^c $P < 0.05$ vs A组.

A组($P < 0.05$); 且C组 $<$ D组 $<$ E组, 组间有差异($P < 0.05$); 各组内亚组PMN虽1组多于2组, 但无统计学差异.

2.1.3 肝 B组可见PMN聚集. C、D、E各组PMN数目少于B组($P < 0.05$), 但多于A组($P < 0.05$); 且C组 $<$ D组 $<$ E组, 组间有差异($P < 0.05$); 各组内亚组PMN有差异, 且1组多于2组($P < 0.05$).

2.1.4 肾 B、C、D、E各组PMN数目均与A组无明显差异.

2.2 血浆TNF- α 浓度的变化 与对照组A组比较, 单纯IIR的B组TNF- α 浓度明显升高($P < 0.05$). 外源性应用CO的C、D、E组TNF- α 浓度均明显低于单纯IIR的B组($P < 0.05$), 且C组 $<$ D组 $<$ E组($P < 0.05$). C、D、E各组内亚组比较, 2组均低于1组($P < 0.05$, 表2).

2.3 血浆IL-10浓度的变化 与对照组A组比较, 单纯IIR的B组IL-10浓度升高($P < 0.05$). 外源性应用CO的C、D、E组IL-10浓度均明显高于单纯IIR的B组($P < 0.05$), 且C组 $>$ D组 $>$ E组($P < 0.05$). C、D、E各组内亚组比较, 2组均高于1组($P < 0.05$, 表2).

3 讨论

IIR是临床常见的病理生理现象, 严重IIR可最终导致多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的形成^[1,6]. 如何有效地防治MODS的发生和发展一直是临床工作所关注的重要课题. 近年来已经有越来越多的研究发现, 过去一直认为CO是毒性气体分子,

而现在发现他作为一种细胞信使分子在生物体内具有舒张血管和支气管平滑肌、抑制血小板聚集、抑制炎症反应、抗凋亡、抗增殖等多种生理学作用^[7-10], 在神经、呼吸、循环等生理过程和抑制急性肺损伤、脏器缺血再灌注损伤、器官移植排斥反应等病理过程中发挥重要调节作用^[11-13]. 我们以前的研究已经表明, IIR能引起包括肠、肺、肝等在内的多器官损伤; 而在IIR不同阶段外源性应用CO对器官损伤能表现出不同程度的防治作用, 其作用机制尚不十分清楚^[14-15].

IIR导致MODS的发病机制目前尚未完全阐明. 有研究表明, PMN在组织内的聚集是MODS形成的重要环节之一: 病理过程中PMN被致炎因子激活而在组织内聚集, 同时脱颗粒、释放溶酶体酶, 其中弹性蛋白酶对血管和组织有较强的破坏性. 过度的炎症反应又可引起PMN呼吸爆发, 产生大量的超氧阴离子和过氧化氢能导致组织细胞和血管内皮细胞损伤; 同时PMN还能产生大量的脂质代谢产物, 如前列腺素、白三烯(IL)、血小板活化因子(PAF)等. 这些物质能使血管通透性增加而导致组织水肿, 也能引起微血管栓塞, 最终造成MODS^[3]. 本研究中发现外源性应用CO组比单纯IIR组不同组织中PMN聚集数目少, 且组织损伤程度轻, 说明CO通过某种途径抑制了IIR过程中PMN在组织中的聚集.

进一步的研究表明, IIR时肠道局部炎性细胞大量释放的细胞因子是引起PMN激活和聚

集的主要因素. 在这些细胞因子中TNF- α 作用居首位, 在受到致病因素作用后, 他产生最快、到达高峰时间最早, 并且能刺激其他几种促炎因子如IL-1、IL-6、IL-8、PAF等的产生和释放, 具有诱导内皮细胞活化、白细胞迁移、粒细胞脱颗粒及抑制纤溶反应、增加微血管通透性、促进血栓形成等广泛的生物学效应, 是引起SIRS形成的重要因素^[2]. IIR过程中促炎因子释放的同时还能反馈引起内源性抗炎介质的释放, 如IL-10, 又称细胞因子合成抑制因子(cytokine synthesis inhibitory factor, CSIF), 能够通过抑制单核巨噬细胞产生TNF- α 等促炎因子以达到制衡炎症反应的作用. 当IIR损伤严重引起大量炎症介质入血(瀑布样释放), 而内源性抗炎介质又不足以抵消其作用时, 细胞因子由保护作用转变为自身破坏作用, 不但损伤肠道局部组织细胞, 同时打击远隔器官, 最终导致MODS的发生^[4]. 本研究结果显示, 单纯IIR组(B组)大鼠血浆内TNF- α 、IL-10均有升高, TNF- α 升高更明显. 而外源性应用CO组(C、D、E组)TNF- α 明显降低且C组<D组<E组, IL-10明显升高C组>D组>E组; 250 μ L/L亚组比100 μ L/L亚组TNF- α 更低、IL-10更高. 结合我们以前研究得到的“外源性CO能够防治IIR所致多器官损伤”的结论, 本研究结果表明, CO能部分通过抑制TNF- α 产生和促进IL-10释放来调节IIR过程中细胞因子间的平衡, 从而抑制PMN在组织中的聚集, 抑制SIRS发生, 达到防治IIR所致多器官损伤的作用; 且浓度为250 μ L/L、缺血前应用这种作用更明显.

4 参考文献

- Schmeling DJ, Caty MG, Oldham KT, Guice KS, Hinshaw DB. Evidence for neutrophil-related acute lung injury after intestinal ischemia-reperfusion. *Surgery* 1989; 106: 195-201; discussion 201-202
- Caty MG, Guice KS, Oldham KT, Remick DG, Kunkel SI. Evidence for tumor necrosis factor-induced pulmonary microvascular injury after intestinal ischemia-reperfusion injury. *Ann Surg* 1990; 212: 694-700
- Koike K, Moore EE, Moore FA, Kim FJ, Carl VS, Banerjee A. Gut phospholipase A2 mediates neutrophil priming and lung injury after mesenteric ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1995; 268: G397-G403
- Stallion A, Kou TD, Latifi SQ, Miller KA, Dahms BB, Dudgeon DL, Levine AD. Ischemia/reperfusion: a clinically relevant model of intestinal injury yielding systemic inflammation. *J Pediatr Surg* 2005; 40: 470-477
- Cavaillon JM, Adrie C, Fitting C, Adib-Conquy M. Reprogramming of circulatory cells in sepsis and SIRS. *J Endotoxin Res* 2005; 11: 311-320
- Zhu Q, Qian X, Wang S, Yin T, Yang J, Xue Q, Xu B. A comparison of elderly and adult multiple organ dysfunction syndrome in the rat model. *Exp Gerontol* 2006; 41: 771-777
- Otterbein LE, Mantell LL, Choi AM. Carbon monoxide provides protection against hyperoxic lung injury. *Am J Physiol* 1999; 276: L688-L694
- Kohmoto J, Nakao A, Stolz DB, Kaizu T, Tsung A, Ikeda A, Shimizu H, Takahashi T, Tomiyama K, Sugimoto R, Choi AM, Billiar TR, Murase N, McCurry KR. Carbon monoxide protects rat lung transplants from ischemia-reperfusion injury via a mechanism involving p38 MAPK pathway. *Am J Transplant* 2007; 7: 2279-2290
- Raman KG, Barbato JE, Ifedigbo E, Ozanich BA, Zenati MS, Otterbein LE, Tzeng E. Inhaled carbon monoxide inhibits intimal hyperplasia and provides added benefit with nitric oxide. *J Vasc Surg* 2006; 44: 151-158
- Otterbein LE, Otterbein SL, Ifedigbo E, Liu F, Morse DE, Fearn C, Ulevitch RJ, Knickelbein R, Flavell RA, Choi AM. MKK3 mitogen-activated protein kinase pathway mediates carbon monoxide-induced protection against oxidant-induced lung injury. *Am J Pathol* 2003; 163: 2555-2563
- Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA, Choi AM. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 2000; 6: 422-428
- Lee S, Suk K. Heme oxygenase-1 mediates cytoprotective effects of immunostimulation in microglia. *Biochem Pharmacol* 2007; 74: 723-729
- Wen T, Zhao JY, Mei S, Guan L, Zhang YL. [Protective effect of heme oxygenase-1 and its reaction product, carbon monoxide on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in rats] *Beijing Daxue Xuebao* 2006; 38: 618-622
- 韩宁, 陈卫民. 外源性一氧化碳对小肠缺血再灌注大鼠血中碳氧血红蛋白的影响. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2923-2926
- 韩宁, 陈卫民. 外源性一氧化碳对小肠缺血再灌注大鼠不同器官超微结构及细胞凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3085-3091

同行评价

本研究目的明确, 手段先进, 数据准确, 论文结构严密, 是外源性一氧化碳对小肠缺血再灌注的深入性研究.

编辑 史景红 电编 何基才

溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜CINC-1及其受体CXCR2的表达及意义

张涛, 施斌, 陈建永, 潘锋

■背景资料

溃疡性结肠炎(UC)是一种原因尚不明的慢性非特异性肠道炎症,病理变化局限在黏膜层及黏膜下层,以隐窝结构扭曲及隐窝脓肿,大量的中性粒细胞及淋巴细胞浸润为主要特征。课题组在前期研究基础上,运用RT-PCR法、免疫组化染色检测大鼠CINC-1及CXCR2 mRNA及其蛋白的表达,发现CINC-1及其受体CXCR2的表达与UC炎症变化呈正相关。

张涛, 广州中医药大学脾胃研究所消化研究室 广东省广州市 510405
施斌, 杭州市第一人民医院中医科 浙江省杭州市 310003
陈建永, 潘锋, 杭州市红十字会医院消化科 浙江省杭州市 310003
浙江省中医药管理局基金资助项目, No. 2008CB060
通讯作者: 张涛, 510405, 广东省广州市白云区机场路12号, 广州中医药大学脾胃研究所. zhangxuan271@yahoo.com.cn
电话: 020-32720210
收稿日期: 2008-09-26 修回日期: 2008-12-06
接受日期: 2008-12-08 在线出版日期: 2009-01-08

Expression and significance of cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 and CXC chemokine receptor 2 in a rat model of colitis

Tao Zhang, Bin Shi, Jian-Yong Chen, Feng Pan

Tao Zhang, Laboratory of Gastroenterology, Institute of Spleen and Stomach, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Bin Shi, Department of Traditional Chinese Medicine, the First People's Hospital of Hangzhou City, Hangzhou 310003, Zhejiang Province, China

Jian-Yong Chen, Feng Pan, Department of Gastroenterology, Hangzhou Red Cross Hospital, Hangzhou 310003, Zhejiang Province, China

Supported by: the Funds from Traditional Chinese Medicine Administration of Zhejiang Province, No. 2008CB060

Correspondence to: Tao Zhang, Laboratory of Gastroenterology, Institute of Spleen and Stomach, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, 12 Jichang Road, Baiyun District, China. zhangxuan271@yahoo.com.cn

Received: 2008-09-26 Revised: 2008-12-06

Accepted: 2008-12-08 Published online: 2009-01-08

Abstract

AIM: To examine the expression and significance of cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1) and CXC chemokine receptor 2 (CXCR 2) in a rat model of colitis.

METHODS: A total of 36 SD rats were randomly and equally divided into 3 groups with twelve rats in each group. A rat model of ulcerative colitis was established by an enema of 100 mg/kg of TNBS and 500 mL/L ethanol. In model

group 1, rats were sacrificed on day 7. The other rats were sacrificed on day 14. The expression of CINC-1 and CXCR2 were detected using the technique of immunohistochemical staining and RT-PCR.

RESULTS: CXCR2 was predominantly expressed in the surface of neutrophil membrane and intestinal epithelial cell membrane. The mRNA and protein expression of CINC-1 and CXCR2 were on the increment in active UC. There was no association between UC and the expression of CINC-1 and CXCR2. Compared with normal group, there were significant differences between the mRNA and protein expression of CINC-1 in model group1 and model group 2 (1.77 ± 0.52 , 1.82 ± 0.24 vs 0.29 ± 0.10 ; 0.30 ± 0.01 , 0.31 ± 0.04 vs 0.18 ± 0.02 , all $P < 0.05$), also between the mRNA and protein expression of CXCR2 (1.66 ± 0.10 , 2.49 ± 0.29 vs 0.55 ± 0.13 ; 0.20 ± 0.03 , 0.23 ± 0.02 vs 0.16 ± 0.01 , all $P < 0.05$).

CONCLUSION: There is a positive correlation between UC and the expression of CINC-1 and CXCR2. Our data suggest that CINC-1 may mediate the infiltration of polymorph nuclear neutrophil mainly through CXCR 2. Meanwhile, this change induces experimental colitis.

Key Words: Ulcerative colitis; Cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1; CXC chemokine receptor 2; Reverse transcription polymerase chain-reaction; Immunohistochemistry assay

Zhang T, Shi B, Chen JY, Pan F. Expression and significance of cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 and CXC chemokine receptor 2 in a rat model of colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(1): 78-82

摘要

目的: 探讨溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)大鼠结肠黏膜中性粒细胞趋化因子-1(CINC-1)及其受体CXCR2的表达及意义。

方法: ♂ SD大鼠36只完全随机分为正常组、

■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

模型1组、模型2组, 共3组, 每组12只. 用2, 4, 6三硝基苯磺酸100 mg/kg灌肠建立大鼠溃疡性结肠炎模型, 7 d后处死模型1组动物, 14 d后处死模型2组动物. 运用RT-PCR法、免疫组化染色法分别检测各组大鼠CINC-1及CXCR2 mRNA及其蛋白的表达.

结果: CXCR2主要表达在中性粒细胞及肠上皮细胞膜表面. UC活动期CINC-1及CXCR2 mRNA及其蛋白表达明显呈上升趋势, 与炎症相关. 与正常组相比, 模型1组、2组CINC-1 mRNA及蛋白表达有显著差异(1.77 ± 0.52 , 1.82 ± 0.24 vs 0.29 ± 0.10 ; 0.30 ± 0.01 , 0.31 ± 0.04 vs 0.18 ± 0.02 , 均 $P < 0.05$); CXCR2 mRNA及蛋白表达也有显著差异(1.66 ± 0.10 , 2.49 ± 0.29 vs 0.55 ± 0.13 ; 0.20 ± 0.03 , 0.23 ± 0.02 vs 0.16 ± 0.01 , 均 $P < 0.05$).

结论: CINC-1及其受体CXCR2表达水平与UC炎症正相关, CINC-1可能通过CXCR2介导中性粒细胞浸润, 造成结肠炎症及组织损伤.

关键词: 溃疡性结肠炎; 中性粒细胞趋化因子-1; CX趋化因子受体-2; 逆转录聚合酶链式反应; 免疫组化染色法

张涛, 施斌, 陈建永, 潘峰. 溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜CINC-1及其受体CXCR2的表达及意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(1): 78-82

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/78.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种原因尚不明确的慢性非特异性肠道炎症, 病理变化局限在黏膜层及黏膜下层, 以隐窝结构扭曲及隐窝脓肿, 大量的中性粒细胞及淋巴细胞浸润为主要特征. 研究指出^[1], UC是在基因易患基础上, 结合多种因素如周围环境、遗传、结肠黏膜炎症-免疫系统共同作用所导致. 其中结肠黏膜免疫-炎症系统与肠道共生菌群之间的交互作用, 大量炎性细胞浸润及细胞因子的释放在UC发病中占据重要地位. 课题组在前期研究基础上, 运用RT-PCR法、免疫组化染色检测大鼠CINC-1及CXCR2 mRNA及其蛋白的表达, 发现CINC-1及其受体CXCR2的表达与UC炎症变化呈正相关. 本文初步探讨CINC-1及其受体CXCR2的表达在UC发病中的意义.

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级♂SD大鼠36只, 体质量为200±

20 g, 由浙江中医药大学动物实验中心提供[实验动物生产许可证: SCXK(浙)2005-0021]. 5% 2, 4, 6 TNBs 50 g/L购于Sigma公司(货号P2297). 无水乙醇购于上海国药集团. CINC-1抗大鼠抗体, 美国R&D公司出品; CXCR2抗大鼠抗体, 武汉博士德产品; 大鼠CINC-1、CXCR2、 β -actin基因引物, 上海生工生物技术有限公司合成.

1.2 方法

1.2.1 分组与造模: 大鼠称重量后, 随机分为3组, 每组12只. 除正常组外, 其余24只SD大鼠先给予250 g/L乌拉坦0.35 mL/100 g腹腔麻醉. 参照Morris *et al*^[2]报道TNBs造模法, 最佳剂量100 mg/kg计算, 用1 mL注射器抽吸TNBs原液(0.20 mL/100 g SD大鼠), 继续抽吸0.25 mL的500 mL/L乙醇混合后, 用聚丙烯管插入肛门上段8 cm后注入混合试剂. 6 h后观察造模大鼠, 约75%大鼠出现稀便和血便. 3 d后, 随机处死3只大鼠, 距肛门约7-8 cm处肉眼可见大小约0.3 cm×0.2 cm的溃疡面, 造模成功. 7 d后处死模型1组大鼠; 14 d后处死剩余大鼠. 迅速剖取距肛8 cm远端结肠, 分别置于100 g/L中性甲醛、液氮中备用.

1.2.2 结肠黏膜CINC-1及CXCR2表达: 采用链酶亲合素生物素复合物(SABC)法加微波修复. 具体步骤严格按试剂盒说明进行操作, 用已知阳性标本作阳性对照, 以PBS代替一抗作阴性对照. 在光镜下观察免疫组织化学染色结果, 染色阳性表达为胞质或胞膜呈棕褐色颗粒. 每张切片随机选取5个高倍视野, 计数10 000个细胞, 计算阳性细胞百分比.

1.2.3 CINC-1及CXCR2 mRNA的表达: 采用RT-PCR法检测. Rat CINC-1引物序列: 上游引物5'-TCCAAAAGATGCTAAAGGGTGT-3'下游引物5'-AAATAGGACCCTCAATAGAAATCG-3'; Rat CXCR2引物序列: 上游引物5'-CCACCTTC TGAGGAAGTCTTG-3'下游引物5'-TCCTGTT GCTGTGAGCTTGC-3'; β -actin引物序列: 上游引物5'-AAATAGGACCCTCAATAGAAATCG-3'下游引物5'-GCTGATCCACATCTGCTGGAA-3', 其扩增长度为210 bp(上海生工生物工程有限公司合成). TRIzol一步法提取组织总RNA, 取RNA产物10 μ g, 用M-MLV逆转录酶合成cDNA, 然后用PCR扩增仪进行PCR反应. 用20 g/L琼脂糖电泳, 电泳结束后置凝胶成像系统中进行分析, 计算与内参 β -actin的比值用以校正.

统计学处理 实验数据应用SPSS11.5 for Windows统计软件进行处理. 计量资料采用

■ 研究前沿

结肠黏膜免疫-炎症系统与肠道共生菌群之间的交互作用, 大量炎性细胞浸润及细胞因子的释放在UC发病中占据重要地位.

■ 相关报道

Williams *et al* 研究发现, UC 病变肠黏膜的 IL-8 水平明显高于正常组织, 且与黏膜的 PMN 数、病灶的大体炎症程度呈正相关。

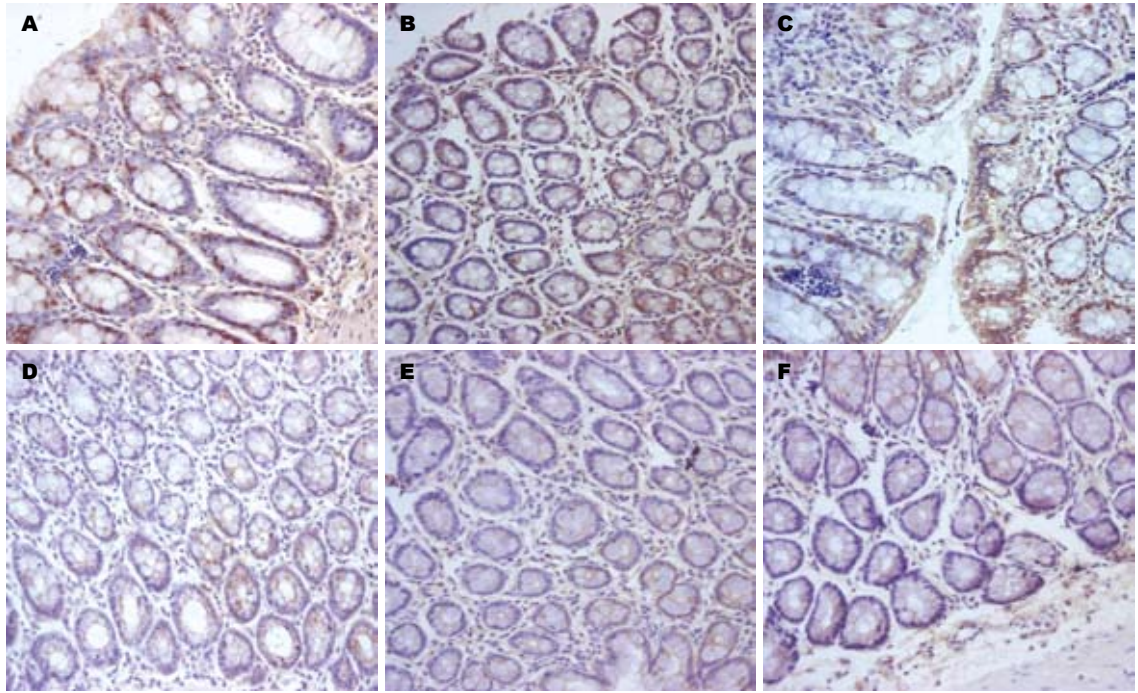


图 1 CINC-1及CXCR2蛋白表达免疫组化图像($\times 20$)。A: 模1 CINC-1; B: 模2 CINC-1; C: 正常CINC-1; D: 模1 CXCR2; E: 模2 CXCR2; F: 正常2 CXCR2。

表 1 CINC-1及CXCR2蛋白表达阳性总面积($\times 10^3, \mu\text{m}^2$)和阳性表达所占比值($n = 6, \%$)

分组	CINC-1		CXCR2	
	阳性总面积	阳性比值	阳性总面积	阳性比值
正常组	2338.76 \pm 625.16	0.18 \pm 0.02	2095.63 \pm 546.44	0.16 \pm 0.01
模型1组	4433.99 \pm 152.60 ^a	0.30 \pm 0.01 ^a	3863.01 \pm 375.32 ^a	0.20 \pm 0.03 ^a
模型2组	4521.78 \pm 214.93 ^b	0.31 \pm 0.04 ^b	4191.37 \pm 588.08 ^b	0.23 \pm 0.02 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.05$ vs 正常组。

mean \pm SD表示, 组间差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 经方差齐性检验后, 方差齐时用Scheffe法, 方差不齐时用Games-Howell法, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 CINC-1及CXCR2蛋白表达免疫组化图像分析结果 应用Image-pro PLUS 4.1版图像分析软件, 每个样本随机选取3个高倍视野, 计数10 000个细胞采用灰度值120-145, 计算阳性细胞数占总细胞数的百分比, 以此对相应蛋白的表达进行定量分析。CINC-1及CXCR2蛋白表达呈上升趋势, 与UC炎症活动呈正相关; 与正常组相比, 有显著性差异 $P < 0.05$ (表1, 图1)。

2.2 CINC-1及CXCR2 mRNA定量检测分析 应用凝胶成像分析系统(YLN-2000)进行密度扫描定量, 用目的基因与内参的比值来表示目的基

因mRNA的含量。与正常组相比, 模型1组及2组CINC-1、CXCR2 mRNA定量表达结果有显著性差异($P < 0.05$)。模型1组与模型2组相比, CINC mRNA表达无显著性差异($P > 0.05$); 而CXCR2 mRNA表达有显著性差异($P < 0.05$, 表2, 图2)。

3 讨论

中性粒细胞(polymorphnuclear neutrophil, PMN)是血液中数目最多的白细胞, 来源于骨髓的造血干细胞, 在骨髓中分化发育后, 进入血液或组织。PMN在先天免疫中具有重要的作用, 是炎症反应时最早到达感染或损伤部位的细胞, Lampinen *et al*^[3]研究指出PMN在急性和活动期UC中起重要作用。PMN在促炎细胞因子、趋化性物质、和趋化性细胞因子作用下发生活化。PMN的生物学功能与其胞质内的多种颗粒密切相关, 其吞噬、杀菌、细胞毒、趋化和迁移等

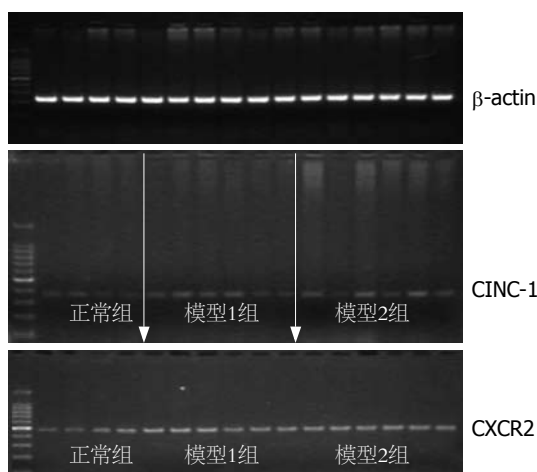


图 2 CINC-1及CXCR2 mRNA定量检测图像.

过程均由颗粒及其内容物如趋化因子及其受体等直接或间接介导.

趋化因子(chemokine)是能使细胞发生趋化作用的细胞因子总称, 最早发现于哺乳动物、鸟类及鱼类动物体内, 为一类结构功能相似, 分子量在8-10 kDa小分子质量蛋白质. 由中性粒细胞、单核细胞等多种细胞分泌产生, 主要表达于中性粒细胞、巨噬细胞等炎细胞表面, 亦可表达于上皮细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞等细胞^[4-5]. 根据多肽链一级构特点不同, 将趋化因子分为CXC亚家族和CC亚家族(C为半胱氨酸, X为任意氨基酸). CXC亚家族分子靠近N一端两个半胱氨酸之间有一个任意氨基酸, 主要作用于中性粒细胞, 对T、B等淋巴细胞也有趋化作用, 已发现16个CXC趋化因子^[6]. 趋化因子受体^[7]是一类介导趋化因子行使功能的GTP蛋白偶联的跨膜受体(GPCR), 通常表达于免疫细胞、内皮细胞等细胞膜上. 按趋化因子的分类, 将同CC类趋化因子结合的受体称为CC类受体(CCR), 同CXC类趋化因子结合的受体称为CXC类受体(CXCR)^[8-9]. 趋化因子受体与趋化因子相互作用, 通常一种趋化因子受体能与多个趋化因子相结合, 而一个趋化因子可能有多个高亲和性受体, 他们共同构成复杂的网络系统, 在炎症性肠病中起重要作用^[10].

研究发现UC活动期^[11-13], 大量炎症细胞包括中性粒细胞、淋巴细胞等募集到损伤组织, 免疫细胞克服血管内皮细胞屏障, 在体液和组织间穿行包括多个步骤, 即细胞随体液流动; 细胞被稳固黏附到血管内皮上; 细胞穿过内皮细胞间隙; 细胞迁移到特定组织中. 在此过程中, 趋化因子通过细胞内信号转导过程控制着渗出

表 2 CINC-1、CXCR2基因相对mRNA表达量 (n = 6, %)

分组	CINC-1	CXCR2
正常组	0.29 ± 0.10	0.55 ± 0.13
模型1组	1.77 ± 0.52 ^a	1.66 ± 0.10 ^a
模型2组	1.82 ± 0.24 ^c	2.49 ± 0.29 ^c

^aP<0.05, ^cP<0.05 vs 正常组.

同行评价

本文试图探讨UC大鼠结肠黏膜CINC-1及其受体CXCR2的表达及意义, 有一定新意.

细胞的选择性以及被选择细胞的稳固黏附. 表达增高的趋化因子除了对炎症细胞激活和趋化, 还能触发其他复杂的炎性活动, 包括颗粒胞吐、产生金属蛋白酶降解基质和上调氧化爆发等. 中性粒细胞趋化因子CINC-1^[14-15]是一种和人IL-8类似的鼠源性趋化性细胞因子, 被看作是IL-8家族的一员, 对嗜中性粒细胞有很强的趋化作用. Williams *et al*^[16]研究发现, UC病变肠黏膜的IL-8水平明显高于正常组织, 且与黏膜的PMN数、病灶的大体炎症程度呈正相关. 表明IL-8直接参与了UC的病理过程, 与炎症程度呈正相关. IL-8还可以促进PMN内容物的释放, 增加上皮细胞及单核细胞黏附分子的表达, 还能使肠成纤维细胞产生过量的基质降解酶, 破坏黏膜的完整性, 导致结肠组织损伤.

本研究初步发现活动性UC在炎症诱导下结肠组织中CINC-1蛋白及mRNA表达增高; CXCR2主要表达在浸润的中性粒细胞及结肠上皮细胞膜上, CINC-1及其受体CXCR2的水平与肠道炎症程度呈正相关. 课题组推测CINC-1可能通过结合CXCR2激活胞膜上的钙泵, 细胞向前方伸出片足, 使细胞移向产生趋化因子的部位, 当中性粒细胞在局部聚集后, 在细胞因子及某些因素作用下活化, 释放胞质内的颗粒, 出现瀑布式的级联反应, 破坏结肠上皮细胞屏障, 导致结肠组织损伤、溃疡形成. 关于CINC-1结合CXCR2细胞内信号转导, 调控相应基因的表达, 最终使中性粒细胞发生迁移、造成组织损伤; 以及拮抗CINC-1结合CXCR2, 能否缓解UC的效应, 尚需要通过靶向研究如基因敲除技术、细胞培养、体外试验等进一步深入探讨.

4 参考文献

- 1 Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. T cell apoptosis and inflammatory bowel disease. *Gut* 2004; 53: 1556-1558
- 2 Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989; 96: 795-803
- 3 Lampinen M, Sangfelt P, Taha Y, Carlson M.

- Accumulation, activation, and survival of neutrophils in ulcerative colitis: regulation by locally produced factors in the colon and impact of steroid treatment. *Int J Colorectal Dis* 2008; 23: 939-946
- 4 Shea-Donohue T, Thomas K, Cody MJ, Aiping Zhao, Detolla LJ, Kopydlowski KM, Fukata M, Lira SA, Vogel SN. Mice deficient in the CXCR2 ligand, CXCL1 (KC/GRO-alpha), exhibit increased susceptibility to dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. *Innate Immunol* 2008; 14: 117-124
 - 5 Buanne P, Di Carlo E, Caputi L, Brandolini L, Mosca M, Cattani F, Pellegrini L, Biorci L, Coletti G, Sorrentino C, Fedele G, Colotta F, Melillo G, Bertini R. Crucial pathophysiological role of CXCR2 in experimental ulcerative colitis in mice. *J Leukoc Biol* 2007; 82: 1239-1246
 - 6 Bizzarri C, Beccari AR, Bertini R, Cavicchia MR, Giorgini S, Allegretti M. ELR+ CXC chemokines and their receptors (CXC chemokine receptor 1 and CXC chemokine receptor 2) as new therapeutic targets. *Pharmacol Ther* 2006; 112: 139-149
 - 7 Sun J, Ramnath RD, Bhatia M. Neuropeptide substance P upregulates chemokine and chemokine receptor expression in primary mouse neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293: C696-C704
 - 8 Christopherson K 2nd, Hromas R. Chemokine regulation of normal and pathologic immune responses. *Stem Cells* 2001; 19: 388-396
 - 9 Kishimoto S, Haruma K, Tari A, Sakurai K, Nakano M, Nakagawa Y. Rebamipide, an antiulcer drug, prevents DSS-induced colitis formation in rats. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 1608-1616
 - 10 Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 2000; 95: 3032-3043
 - 11 Reddy KP, Markowitz JE, Ruchelli ED, Baldassano RN, Brown KA. Lamina propria and circulating interleukin-8 in newly and previously diagnosed pediatric inflammatory bowel disease patients. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 365-372
 - 12 Forbes E, Murase T, Yang M, Matthaei KI, Lee JJ, Lee NA, Foster PS, Hogan SP. Immunopathogenesis of experimental ulcerative colitis is mediated by eosinophil peroxidase. *J Immunol* 2004; 172: 5664-5675
 - 13 Yang SK, Choi MS, Kim OH, Myung SJ, Jung HY, Hong WS, Kim JH, Min YI. The increased expression of an array of C-X-C and C-C chemokines in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis: regulation by corticosteroids. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 126-132
 - 14 Reed KL, Fruin AB, Gower AC, Gonzales KD, Stucchi AF, Andry CD, O'Brien M, Becker JM. NF-kappaB activation precedes increases in mRNA encoding neurokinin-1 receptor, proinflammatory cytokines, and adhesion molecules in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 2366-2378
 - 15 Daig R, Andus T, Aschenbrenner E, Falk W, Schölmerich J, Gross V. Increased interleukin 8 expression in the colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1996; 38: 216-222
 - 16 Williams EJ, Haque S, Banks C, Johnson P, Sarsfield P, Sheron N. Distribution of the interleukin-8 receptors, CXCR1 and CXCR2, in inflamed gut tissue. *J Pathol* 2000; 192: 533-539

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009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密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密密度。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 2009-01-08)

心得安对食管曲张静脉套扎后再出血的影响

程文芳, 施瑞华, 陈晓星, 丁静

程文芳, 施瑞华, 陈晓星, 丁静, 南京医科大学第一附属医院
消化内科 江苏省南京市 210029
作者贡献分布: 此课题由程文芳设计; 研究过程主要由程文芳,
施瑞华, 陈晓星及丁静完成; 论文写作由程文芳完成。
通讯作者: 程文芳, 210029, 江苏省南京市, 南京医科大学第一
附属医院消化内科. chengwenfang@yahoo.com.cn
电话: 025-51865015
收稿日期: 2008-09-28 修回日期: 2008-11-03
接受日期: 2008-11-10 在线出版日期: 2009-01-08

Effects of propranolol on rebleeding following endoscopic esophageal variceal ligation: a prospective, controlled trial

Wen-Fang Cheng, Rui-Hua Shi, Xiao-Xing Chen,
Jing Ding

Wen-Fang Cheng, Rui-Hua Shi, Xiao-Xing Chen, Jing
Ding, Department of Gastroenterology, the First Affiliated
Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029,
Jiangsu Province, China

Correspondence to: Wen-Fang Cheng, Department of
Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing
Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province,
China, chengwenfang@yahoo.com.cn

Received: 2008-09-28 Revised: 2008-11-03

Accepted: 2008-11-10 Published online: 2009-01-08

Abstract

AIM: To observe the effects of propranolol on rebleeding following endoscopic esophageal variceal ligation.

METHODS: Seventy-eight patients undergoing esophageal varices received either ligation alone (control group: $n = 39$) or a combination of ligation and propranolol (propranolol group: $n = 39$). Twelve months after ligation, endoscopic evaluation of rebleeding, portal hypertensive gastropathy (PHG), esophageal varices and fundal varices was performed.

RESULTS: At the end of 12 mo after ligation, hemorrhagic rate was significantly lower in propranolol group than in the control group (38.70% vs 54.54%, $P < 0.05$). PHG incidence, the incidence of gastric vein, the recurrence rate of venous reflux were significantly lower in pro-

pranolol group than in control group (32.25% vs 57.57%, 25.80% vs 42.42%, 29.03% vs 39.39%, all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Propranolol reduces rebleeding after endoscopic esophageal variceal ligation, possibly through reducing the occurrences of PHG, esophageal varices and fundal varices.

Key Words: Propranolol; Ligation of esophageal varices; Rebleeding

Cheng WF, Shi RH, Chen XX, Ding J. Effects of propranolol on rebleeding following endoscopic esophageal variceal ligation: a prospective, controlled trial. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(1): 83-85

摘要

目的: 观察心得安对食管曲张静脉套扎后再出血的影响。

方法: 78例门脉高压性食管静脉曲张(esophageal varices, EV)患者, 分成单独套扎组(39例, 作为对照组)和心得安组(39例, 套扎后给予心得安, 10 mg, 3次/d, po)。比较两组套扎后12 mo内再出血率, 同时12 mo后复查胃镜, 比较两组患者门脉高压性胃病及胃底静脉曲张发生率。

结果: 套扎12 mo后再出血率心得安组明显低于对照组(38.70% vs 54.54%, $P < 0.05$)。心得安组门脉高压性胃病发生率、胃底静脉曲张发生率、食管静脉曲张再发率均明显低于对照组(32.25% vs 57.57%, 25.80% vs 42.42%, 29.03% vs 39.39%, 均 $P < 0.05$)。

结论: 心得安可降低食管曲张静脉套扎后再出血, 其原因是心得安能够降低套扎后的门脉高压性胃病和食管、胃底静脉曲张的发生。

关键词: 心得安; 食管静脉曲张套扎; 再出血

程文芳, 施瑞华, 陈晓星, 丁静. 心得安对食管曲张静脉套扎后再出血的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17(1): 83-85
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/83.asp>

背景资料

食管曲张静脉套扎后再出血率仍然很高, 寻找预防或降低套扎后再出血的方法可进一步提高套扎的疗效, 有重要的临床意义。

同行评议者

黄晓东, 副主任医师, 武汉市中心医院消化内科; 董蕾, 教授, 西安交通大学第二附属医院消化内科

■相关报道

心得安已报道用于食管胃底静脉曲张出血的预防治疗。

0 引言

食管静脉曲张(esophageal varices, EV)破裂出血是肝硬化致死的重要原因之一,食管曲张静脉套扎术(esophageal varices ligation, EVL)因其疗效好,创伤小,已成为EV的重要治疗手段,但再出血率仍然很高,影响其疗效。因此,寻找预防或降低套扎后再出血的方法可进一步提高套扎的疗效,有重要的临床意义。本实验通过前瞻对照研究观察心得安对食管静脉曲张套扎后再出血的影响,探索预防套扎后再出血的方法。

1 材料和方法

1.1 材料 本组患者为2004-10/2007-12在我院住院接受食管曲张静脉套扎的患者共78例。男42例,女36例,年龄32-82(平均53±17)岁。入选适应证为:(1)急性EV破裂出血;(2)既往有EV破裂出血史;(3)外科手术后EV再发者;(4)不适合手术治疗者(据中华医学会消化内镜分会推荐的“食管胃静脉曲张内镜下诊断和治疗规范”^[1])。有下列之一的不纳入本研究:(1)有肝癌、其他系统恶性肿瘤、尿毒症等严重疾病;(2)合并有胃底静脉曲张(gastric varices, GV);(3)有大量腹水、肝性脑病、严重黄疸;(4)无法复查胃镜的;(5)有心动过缓、心功能不全、哮喘的。将患者分成2组,一组只给予套扎(39例,作为对照组),另一组套扎后给予心得安口服(39例,心得安组)。

1.2 方法

1.2.1 套扎治疗和心得安的服用: 选用Olympus公司GIF-240胃镜, Cook公司6环或10连环套扎器,一次套扎6-10环,部分患者2 wk后再重复一次,直至曲张静脉基本消失或缩小为F1。治疗和胃镜复查由同一操作者完成。所有的患者均知情同意。心得安开始给予10 mg/次,每日3次口服,然后调整剂量让心率降低25%但心率不低于55次/min。连续服用12 mo。

1.2.2 内镜检查: 出血的患者均作胃镜明确出血的原因;再分别在套扎后2 wk及12 mo由同一操作者复查胃镜,主要观察的内容:套扎后的溃疡、套扎后的胃底曲张静脉、再发的食管曲张静脉以及门脉高压性胃病(PHG)。内镜下PHG的诊断:据McCormack标准^[2],内镜下PHG分型分成2型。轻型表现为:(1)黏膜表面细小点灶或猩红热疹;(2)黏膜红色斑;(3)黏膜蛇皮样或马赛克样改变。重型表现为:在轻度的基础上出现散在的樱桃红样斑点和(或)弥漫出血性胃炎。再发的食管曲张静脉表现为食管原来没有曲张静脉重新出现F2或F3的曲张静脉或F1曲张静脉发展

■创新盘点

本文通过前瞻对照研究发现心得安可降低套扎后PHG、GV、EV的发生率而减低套扎后的再出血,为套扎后常规应用心得安提供依据。

表1 两组患者的临床特点

分组	对照组	心得安组	P
n	39	39	
年龄(岁)	52 ± 15(33-75)	54 ± 16(34-78)	0.78
性别(男/女)	23/17	25/14	0.75
白蛋白(g/L)	28.8 ± 0.6	29.1 ± 0.5	0.89
Child分级(A/B/C)	8/29/2	6/31/2	0.12
手术(脾切+断流)	25	23	0.78
EV(F2/F3)	10/29	11/28	0.96
PHG	7(13.9%)	6(15.4%)	0.19

表2 套扎后6 mo和12 mo再出血发生率

随访时间	分组	n	套扎后 溃疡	PHG	EV	GV	总发生率(%)
6 mo	心得安组	34	3	1	2	2	23.52
	对照组	36	3	2	2	3	27.77
12 mo	心得安组	31	3	2	3	4	38.70(12/31)
	对照组	33	3	4	5	6	54.54(18/33) ^a

^aP<0.05 vs 心得安组。

成F2或F3的曲张静脉。

统计学处理 统计学分析采用SPSS13.0分析软件,两组间率的比较用 χ^2 检验,均值比较用t检验。

2 结果

2.1 临床特点(表1)

2.2 随访情况 39例给药组有3例因用心得安低于55次/min而不适停药,6 mo时2例失访,12 mo失访5例。39例对照组6 mo时有3例失访,12 mo增至6例。

2.3 套扎后的再出血 套扎后6 mo内两组出血率没有区别,但12 mo内两组出血率区别有显著性。出血的原因2 wk内主要为套扎后的溃疡,2 wk后主要是PHG、并发的GV及再发的EV的破裂(表2)。

2.4 套扎12 mo内患者的PHG、GV、EV的发生率 套扎后12 mo内心得安组患者的PHG、GV及EV发生率明显低于对照组,二者差异均有显著性(表3)。

3 讨论

尽管食管曲张静脉套扎术已成为EV的治疗手段,但套扎后再出血是影响其疗效的重要原因。国内曾有报道为50.0%^[3],我们这组患者套扎后1年内再出血率为54.54%,与其相似。可见食管曲张静脉套扎后再出血发生率仍是很高,因此,如何预防和降低套扎后再出血有重要的临床意义。

影响套扎后再出血的因素很多, 我们观察到: 2 wk内再出血的原因主要是套扎环的脱落、套扎部位伤口愈合不佳或是溃疡的形成, 以及残留的曲张静脉的再破裂。而远期再出血的主要原因包括: 门脉高压性胃病(portal hypertensive gastropathy, PHG)、GV破裂以及再发EV破裂的出血。PHG发病机制尚不十分清楚, 可能与胃血流量、胃肠激素及门静脉压力改变有关, 其中门静脉压力升高是其发生的最重要的因素。正常时, 胃壁黏膜下存在大量闭锁状态动静脉分流, 门静脉高压时处于闭锁状态动静脉分流被动开放, 动脉血直接到静脉, 黏膜有效血容量减少, 使黏膜缺血、缺氧; 同时由于回流障碍, 使胃黏膜充血淤血及渗透性增加。因此, 有学者认为: 门静脉高压导致胃壁动静脉分流异常开放是PHG最基本的原因^[4]。食管静脉曲张套扎后, 门静脉经食管静脉侧支循环关闭, 门静脉压力进一步升高, 这会导致或加重PHG。另外套扎后, 食管曲张静脉消失, 远端胃黏膜的血流量, 无改变, 而近端胃黏膜(胃体、胃底)的血流量较套扎前明显增多, 而近端胃静脉血流受阻, 导致胃黏膜淤血, 使得胃黏膜下动静脉短路开放, 也会导致或加重PHG^[5]。可见, 门静脉压力进一步升高是套扎后PHG发生或加重的始动因素。

GV也是食管曲张静脉套扎后的一个重要并发症, 我们这组患者为42.42%, 其发生率较高, 与其他学者报道相似^[6]。与PHG发生机理相似: 食管曲张静脉套扎后食管曲张静脉消失, 胃底黏膜血流量较套扎前明显增多, 而近端胃静脉血流受阻, 使得胃黏膜下动静脉短路开放, 导致GV发生。另外, 血液循环中血管活性物质及一氧化氮升高可能也是促进GV发生的因素之一^[6]。

食管曲张静脉的再发是由于: 食管黏膜表面与黏膜下及肌层静脉存在许多交通支和穿静脉, 尽管套扎能够消除黏膜表面的曲张静脉, 但这些穿静脉可再沿黏膜生长, 在门静脉高压存在下, 新生的静脉会增大而至曲张。

总之, 门脉高压性胃病、GV以及再发EV三大导致套扎后再出血的原因的始动因素仍是门静脉的高压, 如能降低门静脉的压力就有可能预防套扎后的再出血。已证实: 心得安能够降低门静脉压力, 其主要机理为: (1)对心脏 β 受体有阻滞作用, 能降低心脏指数, 减少内脏血流量, 降低门脉血流量减少; (2)阻滞心外 β 受体, 使 α 受体兴奋, 内脏循环阻力增高, 门脉血流量减少。本研究

表 3 套扎后12 mo PHG、GV及EV再发率(%)

分组	PHG	GV	EV
心得安组	32.25(10/31)	25.80(8/31)	29.03(9/31)
对照组	57.57(19/33) ^a	42.42(14/33) ^a	39.39(13/33) ^a

^a $P < 0.05$ vs 心得安组。

发现: 心得安组套扎后一年内的出血率为38.71%显著低于对照组(54.54%), 说明心得安能够有效降低套扎后的再出血。但在6 mo时心得安组再出血率为: 23.52%, 稍低于对照组(27.77%), 二者差异无显著性, 这可能由于PHG一般在套扎后6 mo才达到一个高峰, 而套扎后胃底静脉的发生、食管静脉再生也需要较长的时间^[7]。因此, 长期服用心得安才能预防套扎后的再出血。

进一步观察发现: 套扎后服用心得安后, 1年内PHG、GV以及再发EV的发生率均明显低于对照组, 其他学者也得到相似的结果^[7]。可见心得安可以通过降低门静脉压力来降低PHG、GV及EV的发生, 进而降低套扎后再出血的发生。

总之, 心得安可降低食管曲张静脉套扎后再出血, 这种作用是由于它能降低门静脉压力来降低套扎后的门脉高压性胃病和食管、胃底曲张静脉的发生。

4 参考文献

- 1 中华医学会消化内镜分会. 食管胃静脉曲张内镜下诊断和治疗规范. 中华消化内镜杂志 2004; 21: 149-151
- 2 McCormack TT, Sims J, Eyre-Brook I, Kennedy H, Goepel J, Johnson AG, Triger DR. Gastric lesions in portal hypertension: inflammatory gastritis or congestive gastropathy? *Gut* 1985; 26: 1226-1232
- 3 龙泽民, 欧阳玉洁, 林一平, 邹兵. 奥美拉唑和心得安预防内镜下食管静脉曲张套扎术后破裂再出血. 西安交通大学学报(医学版) 2006; 27: 516-517
- 4 管洪庚, 陈易人, 钱海鑫. 门静脉高压性胃病动物模型复制及发病机理研究. 中华实验外科杂志 1999; 16: 84-85
- 5 Yoshikawa I, Murata I, Nakano S, Otsuki M. Effects of endoscopic variceal ligation on portal hypertensive gastropathy and gastric mucosal blood flow. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 71-74
- 6 Yüksel O, Köklü S, Arhan M, Yolcu OF, Ertuğrul I, Odemiş B, Altıparmak E, Sahin B. Effects of esophageal varice eradication on portal hypertensive gastropathy and fundal varices: a retrospective and comparative study. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 27-30
- 7 Lo GH, Lai KH, Cheng JS, Hsu PI, Chen TA, Wang EM, Lin CK, Chiang HT. The effects of endoscopic variceal ligation and propranolol on portal hypertensive gastropathy: a prospective, controlled trial. *Gastrointest Endosc* 2001; 53: 579-584

■同行评价

心得安预防食管曲张静脉出血的临床疗效早已被肯定, EVL后常规使用心得安已在临床普遍应用, 但是和对照组进行系统的对照研究报道不多, 是该文章的一个特点。

同源异形盒基因CDX2的表达与胃黏膜肠上皮化生类型的关系

王旭光, 张忠, 孙丽萍, 袁媛

■背景资料

胃黏膜肠上皮化生(肠化生)是胃癌发生前的重要阶段,究竟何种类型肠化生可发展为胃癌,目前尚无客观的分类方法。

王旭光, 张忠, 沈阳医学院病理教研室 辽宁省沈阳市 110034
孙丽萍, 袁媛, 中国医科大学第一医院普通外科研究所暨肿瘤研究所第三研究室 辽宁省沈阳市 110001

辽宁省科技攻关计划基金资助项目, No. 20072255001-1

作者贡献分布: 此课题由王旭光和袁媛共同设计; 研究标本由袁媛提供; 病理诊断由王旭光和袁媛共同完成; 研究过程由王旭光、张忠和孙丽萍操作完成; 论文撰写由王旭光完成。

通讯作者: 袁媛, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学第一医院普通外科研究所暨肿瘤研究所第三研究室, 辽宁省高校肿瘤病因与预防重点实验室。

yyuan@mail.cmu.edu.cn

电话: 024-83282153 传真: 024-83282292

收稿日期: 2008-11-04 修回日期: 2008-12-03

接受日期: 2008-12-08 在线出版日期: 2009-01-08

Relationship between the expression of CDX2 and different types of gastric intestinal metaplasia

Xu-Guang Wang, Zhong Zhang, Li-Ping Sun, Yuan Yuan

Xu-Guang Wang, Zhong Zhang, Pathology Department of Shenyang Medical College, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Li-Ping Sun, Yuan Yuan, Cancer Control Laboratory of Cancer Institute and General Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by: the Key Scientific and Technological Project from Liaoning Province, No. 20072255001-1

Correspondence to: Professor Yuan Yuan, Cancer Control Laboratory of Cancer Institute and General Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, 155 Nanjing North Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. yyuan@mail.cmu.edu.cn

Received: 2008-11-04 Revised: 2008-12-03

Accepted: 2008-12-08 Published online: 2009-01-08

Abstract

AIM: To inquire the relationship between the expression of CDX2 and different types of gastric intestinal metaplasia.

METHODS: Expression of CDX2 in 58 normal gastric mucosa, 184 IM and 36 gastric cancer were detected using immunohistochemical method. One hundred and eighty four IM cases were classified into three subtypes, including 81

cases of IM I, 62 cases of IM II and 41 cases of IM III using HID-ABpH2.5-PAS methods.

RESULTS: The positive rates of CDX2 expression in IM and gastric cancer were significantly higher than normal gastric mucosa in which negative expression was detected ($P < 0.01$), but lower than IM (27.8% vs 59.8%, $P < 0.01$). The positive rates of CDX2 expression in IM I and IM II were significantly higher than either gastric cancer group or IM III. However, there was no significant difference between IM III and gastric cancer group. CDX2 was located in IM cellular nucleus.

CONCLUSION: The IM without expression of CDX2 has close relationship with gastric cancer, and CDX2 is a valuable biomarker to judge the differentiation of IM.

Key Words: Intestinal metaplasia; CDX2; Gastric cancer

Wang XG, Zhang Z, Sun LP, Yuan Y. Relationship between the expression of CDX2 and different types of gastric intestinal metaplasia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(1): 86-89

摘要

目的: 探讨CDX2表达与胃黏膜肠化生类型的关系。

方法: 利用免疫组化技术检测58例正常胃黏膜、184例肠化生和36例胃癌组织CDX2表达; 利用HID-ABpH2.5-PAS将184例肠化生分为I型81例, II型62例和III型41例。

结果: 正常胃黏膜CDX2阴性表达, 胃癌组织CDX2表达高于正常胃黏膜($P < 0.01$), 低于肠化生黏膜(59.8% vs 27.8%, $P < 0.01$); I型、II型肠化生CDX2表达高于胃癌和III型肠化生, 差异均有统计学意义。唾液酸黏蛋白着色的I型肠化生CDX2呈清晰着色, 硫酸黏蛋白着色的III型肠化生CDX2未见着色。

■同行评议者

熊斌, 教授, 武汉大学中南医院肿瘤科

结论: CDX2可作为判断肠化生分化程度的指标。

关键词: 肠化生; CDX2; 胃癌

王旭光, 张忠, 孙丽萍, 袁媛. 同源异形盒基因CDX2的表达与胃黏膜肠上皮化生类型的关系. 世界华人消化杂志 2009; 17(1): 86-89

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/86.asp>

0 引言

胃黏膜肠上皮化生(肠化生)与胃癌关系密切^[1-3], 是胃癌发生前的重要阶段. 目前, 国内外普遍根据黏蛋白染色和组织学形态不同, 将肠化生分为 I (完全性), II (不完全性), III型(不完全性), 认为III型(不完全性)肠化生与胃癌关系密切. 但是, 并不是所有 I、II 型肠化生均不发展为胃癌, 也不是所有III型肠化生均发展为胃癌. 究竟何种类型的肠化生可发展为胃癌, 一直困扰着广大学者. 近年来, 人们试图从不同角度对肠化生进行分型并探讨其与胃癌的关系.

正常胃黏膜上皮细胞、肠化生上皮细胞和胃癌上皮细胞各有不同的形态学特点, 其区别是由于细胞分化异常所致. 同源异形盒基因 CDX2 是一种肠上皮特异性转录因子, 可控制肠上皮细胞的分化和成熟^[4], 其在不同类型肠化生的表达及其与不同类型肠化生的关系尚不清楚. 我们检测不同类型肠化生 CDX2 的表达, 探讨其在肠化生分型中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 278例胃黏膜活检及血清学标本, 取自辽宁省庄河地区接受胃癌筛查者. 本研究经中国医科大学伦理委员会批准, 以问卷调查和病例记录方法收集所有研究对象的年龄、性别和相关资料, 并与患者签署了知情同意书. 每个患者取新鲜胃黏膜3块, 其中包括胃体、胃角和胃窦各1块, 950 mL/L乙醇固定, 石蜡包埋, 制成3张5 μm切片, 进行HE、HID-ABpH2.5-PAS黏蛋白组织化学染色及CDX2免疫组织化学染色. HID-ABpH2.5黏蛋白组织化学染色试剂盒购于上海仁宝公司. 鼠抗人CDX2 mAb、免疫组化二步法试剂盒和DAB试剂盒均购于北京中杉金桥生物技术有限公司.

1.2 方法

1.2.1 高二铁胺-阿辛蓝pH2.5-雪夫试剂(HID-ABpH2.5-PAS)黏蛋白组织化学染色: 根据形态

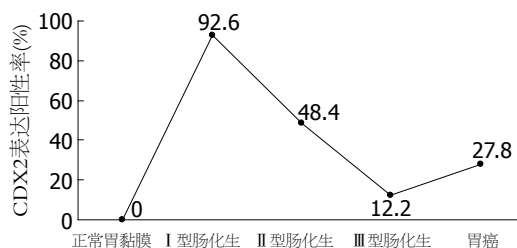


图1 不同胃黏膜病变CDX2的表达.

学、细胞分化程度及分泌黏蛋白不同将肠化生分为 I 型(完全性)、II 型(不完全性)和III型(不完全性)^[5].

1.2.2 Power Vision™免疫组织化学染色: 进行 CDX2 蛋白检测, 一抗稀释度 1:50, 以 PBS 代替一抗作为阴性对照, 以已知的阳性组织作为阳性对照, 细胞核出现清晰的棕黄色颗粒定为阳性.

统计学处理 采用 SPSS11.5 软件进行组间 χ^2 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义.

2 结果

58例正常胃黏膜未见CDX2表达. 36例胃癌组织CDX2表达阳性率为27.8%(10/36), 肠型胃癌CDX2表达阳性率为63.6%(7/11), 弥漫型胃癌CDX2表达阳性率为12%(3/25), 差异有统计学意义($P < 0.01$). 184例肠化生CDX2表达阳性率为59.8%(110/184), 明显高于正常胃黏膜, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 也高于胃癌组织($P < 0.01$). 经HID-ABpH2.5-PAS染色, 分为 I 型肠化生组81例, II 型肠化生组62例, III型肠化生组41例. I 型肠化生→II 型肠化生→III型肠化生黏膜, CDX2表达由高到低, 阳性率分别为 92.6%(75/81), 48.4%(30/62), 12.2%(5/41), 组间差异有统计学意义($P < 0.01$, 图1). I、II、III型肠化生黏膜CDX2表达均高于正常胃黏膜($P < 0.01$); I、II型肠化生黏膜CDX2表达明显高于胃癌组织(分别 $P < 0.01$, $P < 0.05$), III型肠化生黏膜CDX2表达与胃癌组织相比, 差别无统计学意义(图2A-F).

CDX2着色部位在细胞核, 在肠化生黏膜中观察到CDX2着色与黏蛋白类型有关, 黏蛋白染色为兰色(含有唾液酸黏液)的部位CDX2着色清晰, 而黑色部位(含有硫酸性黏液)未见CDX2着色(图2G-H).

3 讨论

同源异形盒基因及其相关蛋白是以核转录调节

■研发前沿
如何从新的角度更客观的区分可癌变的肠化生是今后的研究重点.

■相关报道
关于CDX2在胃癌及肠化生表达的文章很多, 但是并没有将CDX2作为划分肠化生分型的指标.

■创新盘点

本文选择控制肠上皮分化的特异性因子CDX2作为研究指标,以肠化生分化程度与胃癌的关系为切入点,从分化角度探讨CDX2在肠化生分型中的作用。

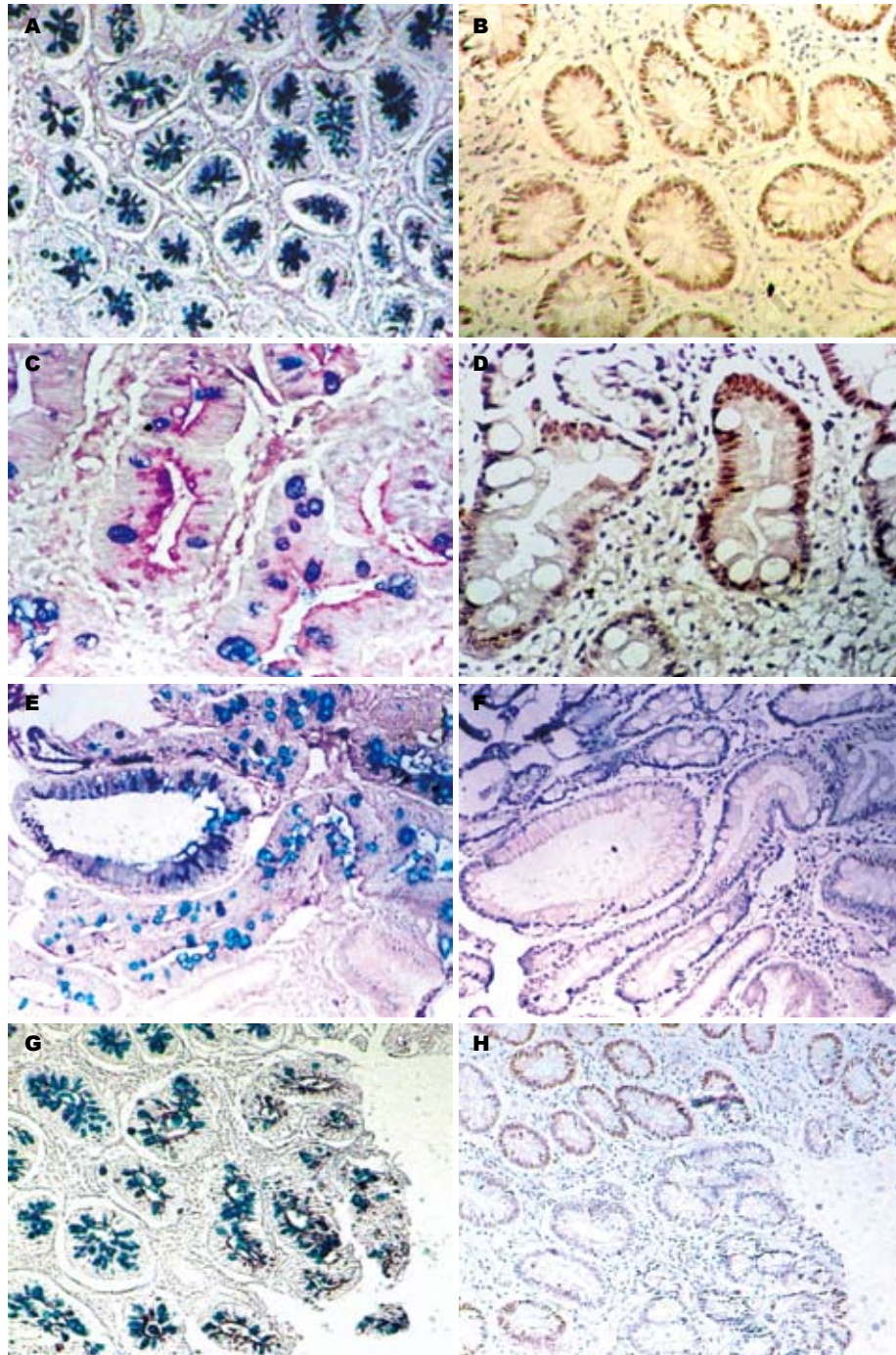


图 2 不同类型肠化生黏膜CDX2的表达. A: I型肠化生(HID-AB-pH2.5-PAS染色 $\times 400$); B: I型肠化生CDX2阳性表达($\times 400$); C: II型肠化生(HID-AB-pH2.5-PAS染色 $\times 400$); D: II型肠化生CDX2阳性表达($\times 400$); E: III型肠化生(HID-AB-pH2.5-PAS染色 $\times 400$); F: III型肠化生CDX2阴性表达($\times 400$); G: I和III型混合肠化生(HID-AB-pH2.5-PAS染色 $\times 200$); H: I和III型混合肠化生免疫组化染色($\times 200$). 粘蛋白着蓝色部位CDX2阳性表达;粘蛋白着黑色部位CDX2阴性表达。

因子的形式调节生物结构和细胞分化的一类基因家族^[6]。CDX2是其中之一,最早由Mlodzik于果蝇中分离成功,主要分布于内胚层来源的肠道上皮和胰腺的导管及腺泡上皮,其编码的蛋白CDX2的主要功能是控制结肠和小肠上皮分化^[7-8]。人们在体外细胞系中发现CDX2具有显著的诱导分化的作用,人为导入CDX2基因的未分化结肠癌细胞系中,可以检测到明显的细胞分化现象,如产生分化特异性标志物蔗糖麦芽糖酶和乳糖酶,诱导细胞向肠上皮分化^[9]。还有研究显示CDX2基因敲除的小鼠,消化系畸形发育

且内胚层细胞无法发育成小肠或结肠上皮,而出现息肉样病变及鳞状化生^[10]。但是CDX2在不同类型肠化生中的表达及在肠化生分型中的作用目前还不十分清楚。

本研究结果显示在正常胃黏膜CDX2表达为阴性,在胃癌组织CDX2的表达高于正常胃黏膜组织,且主要表达于肠型胃癌,在弥漫型胃癌中低表达或不表达。国外研究显示在64%的肠型胃癌可检测到CDX2表达,在其他类型胃癌CDX2不表达^[11]。但是,关于CDX2与肿瘤的分化程度的关系,尚不统一,部分学者认为CDX2与

肿瘤的分化程度无关; 其他学者认为CDX2与细胞分化程度呈正相关. 本组实验显示在分化程度较高的肠型胃癌CDX2表达高于分化程度较低的弥漫型胃癌, CDX2反应了胃癌的分化程度.

在此基础上进一步检测CDX2在肠化生及不同类型肠化生黏膜中CDX2的表达. 结果显示, 在肠化生黏膜CDX2表达阳性率显著高于正常胃黏膜和胃癌组织, 在I, II, III型肠化生黏膜CDX2表达阳性率逐渐下降, I, II型肠化生黏膜CDX2表达高于胃癌组, III型肠化生组CDX2表达阳性率低于胃癌组, 但差异无统计学意义. 提示CDX2阴性的肠化生分化不成熟, CDX2的表达反映出肠化生的分化程度. 推测从I → II → III型肠化生, 由于分化程度逐渐降低, CDX2表达量逐渐降低, 至III型肠化生, CDX2表达明显降低, 但是仍能保留部分功能, 能够调控下游肠上皮黏蛋白分泌有关的因子, 黏蛋白染色阳性, 而此时已经丧失了向成熟肠上皮分化的能力, 表现为潘氏细胞缺如, 杯状细胞呈高柱状, 腺管迂曲等不成熟的形态学改变. 当CDX2降低到一定水平时, 其调控肠上皮分化的能力已殆尽, 调控肠上皮黏蛋白的分泌功能丧失, 进而发生胃癌. 对36例胃癌组织进行了黏蛋白染色, 结果证实在癌组织中黏蛋白染色均为阴性. 提示CDX2不表达肠化生可能发展为胃癌, CDX2可作为肠化生分型, 并判断其分化程度的候选指标. 在临床上, 可以对CDX2不表达的肠化生进行定期随访, 探讨其应用价值.

此外, 在实验中还发现I型肠化生-主要是杯状细胞含有唾液酸黏蛋白, 杯状细胞呈蓝色, CDX2表达阳性率高, 细胞核呈深棕色; 在部分II和大多数III型肠化生-主要在柱状细胞中含有硫酸黏蛋白的部位, 柱状细胞呈黑色, CDX2呈阴性表达, 提示CDX2的表达与肠化生黏蛋白的类型及酸性环境有关, 有研究显示食管黏膜细胞的细胞系长期培养于酸性培养基中, CDX2的表达增强, 细胞向肠黏膜上皮化生^[12]. 但是关于CDX2表达是否与硫酸和唾液酸黏蛋白不同酸

性环境有关, 尚需进一步研究.

4 参考文献

- 1 Walker MM. Is intestinal metaplasia of the stomach reversible? *Gut* 2003; 52: 1-4
- 2 Kang JY, Finlayson C, Maxwell JD, Neild P. Risk of gastric carcinoma in patients with atrophic gastritis and intestinal metaplasia. *Gut* 2002; 51: 899
- 3 Suriani R, Venturini I, Taraglio S, Mazzucco D, Grosso S, Predebon S, Mamo C, Tremosini S, Ballesini P, Borghi A, Zeneroli ML. Type III intestinal metaplasia, Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma risk index in an Italian series of 1750 patients. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 285-288
- 4 Zhang MQ, Lin F, Hui P, Chen ZM, Ritter JH, Wang HL. Expression of mucins, SIMA, villin, and CDX2 in small-intestinal adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol* 2007; 128: 808-816
- 5 Filipe ML, Potet F, Bogomoletz WV, Dawson PA, Fabiani B, Chauveinc P, Fenzy A, Gazzard B, Goldfain D, Zeegen R. Incomplete sulphomucin-secreting intestinal metaplasia for gastric cancer. Preliminary data from a prospective study from three centres. *Gut* 1985; 26: 1319-1326
- 6 Beck F. Homeobox genes in gut development. *Gut* 2002; 51: 450-454
- 7 Shi XY, Bhagwandeem B, Leong AS. CDX2 and villin are useful markers of intestinal metaplasia in the diagnosis of Barrett esophagus. *Am J Clin Pathol* 2008; 129: 571-577
- 8 Gross I, Duluc I, Benameur T, Calon A, Martin E, Brabletz T, Kedinger M, Domon-Dell C, Freund JN. The intestine-specific homeobox gene Cdx2 decreases mobility and antagonizes dissemination of colon cancer cells. *Oncogene* 2008; 27: 107-115
- 9 Beck F, Chawengsaksophak K, Luckett J, Giblett S, Tucci J, Brown J, Poulsom R, Jeffery R, Wright NA. A study of regional gut endoderm potency by analysis of Cdx2 null mutant chimaeric mice. *Dev Biol* 2003; 255: 399-406
- 10 Beck F, Chawengsaksophak K, Waring P, Playford RJ, Furness JB. Reprogramming of intestinal differentiation and intercalary regeneration in Cdx2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 7318-7323
- 11 Seno H, Oshima M, Taniguchi MA, Usami K, Ishikawa TO, Chiba T, Taketo MM. CDX2 expression in the stomach with intestinal metaplasia and intestinal-type cancer: Prognostic implications. *Int J Oncol* 2002; 21: 769-774
- 12 Marchetti M, Caliot E, Pringault E. Chronic acid exposure leads to activation of the cdx2 intestinal homeobox gene in a long-term culture of mouse esophageal keratinocytes. *J Cell Sci* 2003; 116: 1429-1436

■同行评价

本文涉及的内容研究文章较多, 无创新性, 但对临床诊疗有一定意义.

编辑 李军亮 电编 何基才

肝癌患者血液RASSF1A基因甲基化的检测及其临床意义

仇小强, 陈 罡, 余红平, 胡 浪

■背景资料

肝癌(HCC)是我国发病率较高的恶性肿瘤之一,在广西尤为高发,目前仍无特异性的早期诊断指标。本文通过探讨研究RASSF1A在HCC患者血清中甲基化的情况,为研究HCC发生机制及寻求新的早期无创性肿瘤标志物提供一定的科学依据。

仇小强, 余红平, 胡浪, 广西医科大学公共卫生学院流行病学教研室 广西壮族自治区南宁市 530021
陈罡, 广西医科大学基础医学院病理教研室 第一附属医院 病理科 广西壮族自治区南宁市 530021
广西医疗卫生重点科研基金资助项目, No. 200513
作者贡献分布: 此课题由仇小强、胡浪及余红平设计; 研究过程实验操作由仇小强、胡浪及陈罡完成, 仇小强负责技术指导; 数据分析由胡浪完成; 本论文写作由胡浪及陈罡完成, 仇小强及余红平负责论文修改工作。
通讯作者: 胡浪, 530021, 广西壮族自治区南宁市双拥路22号, 广西医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学教研室。 hulang2000060@sina.com
电话: 0771-5358490
收稿日期: 2008-10-15 修回日期: 2008-11-10
接受日期: 2008-11-10 在线出版日期: 2009-01-08

Detection of RASSF1A promoter hypermethylation in plasma of patients with primary hepatocellular carcinoma and its clinical significance

Xiao-Qiang Qiu, Gang Chen, Hong-Ping Yu, Lang Hu

Xiao-Qiang Qiu, Hong-Ping Yu, Lang Hu, Department of Epidemiology and Statistics, Guangxi Medical University, Nanning 530021 Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Gang Chen, Department of Pathology, Guangxi Medical University, Nanning 530021 Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: the Medical Major Scientific Research Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 200513
Correspondence to: Lang Hu, Department of Epidemiology and Statistics, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. hulang2000060@sina.com

Received: 2008-10-15 Revised: 2008-11-10
Accepted: 2008-11-10 Published online: 2009-01-08

Abstract

AIM: To investigate the promoter methylation of Ras association domain family 1A (RASSF1A) in the serum of HCC and to explore the significance and value of the promoter methylation of RASSF1A as a new tumor molecular marker in early stage noninvasive diagnosis of HCC.

METHODS: Promoter methylation of RASSF1A status in the serum of HCC patients ($n = 35$) and normal controls ($n = 10$) were detected by meth-

ylation-specific PCR (MSP).

RESULTS: RASSF1A promoter methylation was detected in 14 cases (40%) in the serum from 35 HCC patients, while no RASSF1A methylation was detected in 10 normal controls. No association was found between serum RASSF1A methylation and the clinicopathological parameters, such as sex, para-cirrhosis, HBV, AFP, tumor size, tumor capsular, portal vein tumor embolus or pathological grade.

CONCLUSION: The promoter methylation of RASSF1A may play an important role in tumor genesis of HCC and act as a new tumor molecular marker for HCC.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Ras association domain family 1A; Promoter methylation; Serum

Qiu XQ, Chen G, Yu HP, Hu L. Detection of RASSF1A promoter hypermethylation in plasma of with primary hepatocellular carcinoma and its clinical significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(1): 90-93

摘要

目的: 探讨原发性肝细胞癌(HCC)患者血清中RASSF1A甲基化状况及RASSF1A甲基化作为一种新的肿瘤分子标志物在HCC早期无创性诊断中的意义和价值。

方法: 应用甲基化特异性PCR(MSP)技术检测35例HCC患者血清和10例健康对照血清中RASSF1A启动子区甲基化状况。

结果: 35例HCC患者血清中RASSF1A启动子区甲基化阳性率为40%, 10份健康对照血清中未出现RASSF1A基因甲基化。RASSF1A基因甲基化与HCC患者性别、伴肝硬化、乙肝表面抗原、甲胎蛋白、肿瘤大小、有无包膜、有无门静脉癌栓及病理分级等临床病理参数无关。

结论: RASSF1A基因甲基化在HCC的发生中起重要作用, RASSF1A基因甲基化可能是HCC新的肿瘤分子标志物。

■同行评议者

李瑗, 主任医师, 广西肿瘤医院病理研究室; 杜祥, 教授, 复旦大学附属肿瘤医院病理科

关键词: 原发性肝细胞癌; RASSF1A; 启动子区甲基化; 血清

仇小强, 陈罡, 余红平, 胡浪. 肝癌患者血液RASSF1A基因甲基化的检测及其临床意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(1): 90-93
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/90.asp

0 引言

RAS相关区域家族1A(ras association domain family 1A gene, RASSF1A)是新近从3号染色体短臂克隆出来的新型候选抑癌基因, 因其表达产物中含有与Ras蛋白结构相关区域, 故而得名^[1]. 该基因启动子异常甲基化而失活的现象在多种恶性肿瘤血液及组织标本中得到证实, 如肺癌^[2]、胆囊癌^[3]、乳腺癌^[4-5]、肾癌^[6]、前列腺癌^[7-8]、子宫内膜癌^[9]、膀胱癌^[10]、胆管癌^[11]、胃癌^[12-13]、肠癌^[13-14]等. RASSF1A的高甲基化为恶性肿瘤的诊断提供了新的角度. 原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国高发肿瘤之一, 但HCC早期诊断仍是当前研究的一个难点. 赵强子 *et al*^[15], Yeo *et al*^[16]及Zhang *et al*^[17]在HCC患者血清中检测到了RASSF1A基因的高甲基化. 为了进一步证实HCC血清中RASSF1A基因启动子区CpG岛异常高甲基化对早期诊断的意义, 我们应用MSP技术检测35例HCC患者血清样本RASSF1A启动子甲基化状况, 探讨RASSF1A甲基化与HCC发生发展的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 HCC血清标本35例为广西医科大学第一附属医院肝胆外科2006-02/2006-07患者治疗前标本, 患者均为病理学检查证实, 符合2001年全国肝癌学术会议制定的肝癌诊断标准^[18]. 35例HCC患者中男29例(82.9%), 女6例(29.1%); 年龄为26-68(平均为50±14.7)岁; 乙型肝炎感染30例(85.7%). 病理证实HCC合并肝硬化23例(65.7%), 合并慢性肝炎21例(60%). 10例健康对照血清来自健康献血者, 其中男7例, 女3例, 平均年龄为48±13.2岁. 核酸提取试剂盒(DNA Blood Midi Kit)购自德国Qiagen公司; 基因修饰试剂盒(CpGenome™ DNA Modification Kit S7820)购自美国Chmicon公司; RASSF1A基因PCR扩增试剂盒(CpG WIZ RASSF1A Amplification Kit S7813)购自美国Chmicon公司.

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取: 血清DNA提取按照DNA Blood

Midi Kit说明书进行, 每份样本采用0.8 mL血清. 提取的DNA纯度用紫外分光光度计检测, 吸光度 A_{260}/A_{280} 比值在1.6-1.8之间, DNA样本立即进行实验或保存于-20℃.

1.2.2 基因修饰: 按CpGenome™ S7820试剂盒说明把胞嘧啶转化为尿嘧啶, 进行基因修饰.

1.2.3 甲基化特异性PCR(MSP)检测: 非甲基化特异引物(U)和甲基化特异引物(M)为针对RASSF1A基因启动子及第一外显子CpG岛序列设计, 由Chmicon公司提供. 其中U引物PCR产物为108 bp, M引物为111 bp. PCR扩增体系如下: 10×PCR Buffer 2.5 μL; 2.5 mmol/L dNTP 2.5 μL; U, M或W primers 1.0 μL; “hot start” enzyme(5 U/μL)0.2 μL; dH₂O 16.8 μL; Template DNA(50 mg/L)2.0 μL. 总体积25.0 μL. 反应条件: 95℃预变性5 min; 95℃变性(45 s)、55℃退火(45 s)、72℃延伸(60 s)共35 cycles; 最后72℃延伸5 min. PCR扩增产物10 μL进行20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 若仅U引物能扩增出条带, 且目的条带位置正确(108 bp), 可判断为甲基化阴性; 若仅M引物出现条带(111 bp), 判断为完全甲基化; 如U和M引物出现条带, 且目的条带位置正确, 判为部分甲基化. 完全甲基化及部分甲基化均为甲基化阳性.

统计学处理 应用SPSS13.0统计软件对数据进行 χ^2 检验, 以 $P<0.05$ 判为差异有显著性意义.

2 结果

HCC患者血清RASSF1A启动子区甲基化阳性率为40%(14/35), 10份健康对照血清中未见RASSF1A基因甲基化阳性. 血清RASSF1A基因甲基化发生情况与患者各临床病理参数无明显相关(表1).

3 讨论

2000年, Dammann *et al*^[11]分离出一种能与DNA修补蛋白XPA相互作用的一种候选cDNA, 其核苷酸序列的碳端与鼠Ras效应蛋白Nore1和Maxp1高度同源, 遂命名为Ras相关区域家族1, 即RASSF1基因; 同时还发现, 由于该基因不同的剪接和使用启动子的不同, 存在3种不同的转录本(转录本A、B和C). 其中RASSF1A含1 α 和2 α , 其cDNA全长1873 bp. 该基因出现异常, 如发生3p21区的杂合性缺失, 启动子区域CpG岛异常高甲基化而导致其转录“沉默”时, 影响其功能的发挥, 则可能导致肿瘤的形成^[3,19-23]. RASSF1A基因在恶性肿瘤中频繁的甲基化的特点, 使之被广泛应用于肿瘤表遗传学研究^[4,24-29].

■创新点

本文阐释了广西地区HCC患者血清中RASSF1A的甲基化情况, 为HCC的具体发生机制及早期诊断提供一定的科学依据.

■研发前沿

目前关于肿瘤的早期诊断的发展备受关注, 也是HCC的研究热点, HCC的早期诊断方法有待于进一步研究.

■相关报道

相关研究发现 RASSF1A 在多种恶性肿瘤的组织及血清中出现甲基化, 明显高于非癌组织及正常血清, RASSF1A 有潜力成为新的肿瘤标记基因。

表 1 血清 RASSF1A 基因甲基化与 HCC 临床病理参数的关系

临床病理资料	n	阳性	χ^2 值	P值
年龄				
≥50	16	6	0.077	0.782
<50	19	8		
性别				
男	28	12	0.476	0.490
女	7	2		
病理分级				
I - II	20	8	0.000	1.000
III - IV	15	6		
HBV				
阳性	30	11	0.972	0.324
阴性	5	3		
伴肝硬化				
有	23	10	0.338	0.561
无	12	4		
AFP(μg/L)				
≥400	24	9	0.199	0.656
<400	11	5		
门脉癌栓				
有	6	2	0.134	0.714
无	29	12		
包膜				
有	14	5	0.179	0.673
无	21	9		
肿瘤直径(cm)				
≥5	26	11	0.224	0.636
<5	9	3		

肿瘤的早期无创诊断主要针对体液检查. 研究结果显示: 肿瘤患者体液中存在 RASSF1A 基因启动子区 CpG 岛异常甲基化, 为肿瘤患者的早期无创性诊断提供了新的思路. 研究发现: 50% 肺癌患者痰液^[30]、84% 肺癌患者血清^[31]、35% 膀胱癌患者尿液^[32]、56%-60% 的乳腺癌患者血清^[5,33-34]及 5% 的未分化鼻咽癌^[35]中均可检测到 RASSF1A 异常甲基化. 因此检测体液中 RASSF1A 异常甲基化对肿瘤的无创性诊断有重要意义. 本研究对 35 例 HCC 患者血清进行 RASSF1A 基因启动子区 CpG 岛异常甲基化检测, 结果 14 例为阳性, 占总体 40%, 10 份健康对照血清无一例出现 RASSF1A 基因甲基化, 提示相对于正常对照, HCC 患者血清中异常甲基化的游离 RASSF1A 基因与 HCC 发生有关. 本研究结果与赵强子 *et al*^[15](41.5%, 17/41) 及 Yeo *et al*^[16](42.5%, 17/40) 的研究结果相近, 但却低于 Zhang *et al*^[17] 的研究结果(70%, 35/50), 可能与病例数与病例来源有关. Yeo *et al*^[16] 发现 HCC 血清中 RASSF1A 基

因甲基化与肿瘤大小有关, 肿瘤越大越容易发生 RASSF1A 甲基化, 但与其余临床病理参数无关. 本研究中血清 RASSF1A 基因甲基化与临床病理资料未显示相关性, 与赵强子 *et al*^[15] 结果一致, 提示 HCC 患者血清中 RASSF1A 基因甲基化可能是肿瘤形成的早期事件, 血清 RASSF1A 的检测有早期预示肿瘤的作用. 另外, 由于 RASSF1A 基因甲基化检测的肿瘤特异性及敏感性, 对术后患者进行血清 RASSF1A 基因甲基化检测有望提示肿瘤复发, 有助于 HCC 预后判断及及时治疗.

总之, 本研究通过检测 HCC 血清中 RASSF1A 启动子区异常甲基化, 分析了 RASSF1A 甲基化与 HCC 发生的可能关系. RASSF1A 基因甲基化可能成为 HCC 新的敏感的肿瘤分子标志物, 检测 RASSF1A 基因甲基化对 HCC 早期无创性诊断及判断复发有一定的临床意义和价值.

4 参考文献

- Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet* 2000; 25: 315-319
- Sung JS, Han SG, Whang YM, Shin ES, Lee JW, Lee HJ, Ryu JS, Choi IK, Park KH, Kim JS, Shin SW, Chu EK, Kim YH. Putative association of the single nucleotide polymorphisms in RASSF1A promoter with Korean lung cancer. *Lung Cancer* 2008; 61: 301-308
- Kee SK, Lee JY, Kim MJ, Lee SM, Jung YW, Kim YJ, Park JY, Bae HI, Hong HS, Yun YK, Kim SG, Kim DS. Hypermethylation of the Ras association domain family 1A(RASSF1A) gene in gallbladder cancer. *Mol Cells* 2007; 24: 364-371
- Li Y, Wei Q, Cao F, Cao X. Expression and promoter methylation of the RASSF1A gene in sporadic breast cancers in Chinese women. *Oncol Rep* 2008; 19: 1149-1153
- Shukla S, Mirza S, Sharma G, Parshad R, Gupta SD, Ralhan R. Detection of RASSF1A and RARBeta hypermethylation in serum DNA from breast cancer patients. *Epigenetics* 2006; 1: 88-93
- Peters I, Vaske B, Albrecht K, Kuczyk MA, Jonas U, Serth J. Adiposity and age are statistically related to enhanced RASSF1A tumor suppressor gene promoter methylation in normal autopsy kidney tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 2526-2532
- Jagadeesh S, Sinha S, Pal BC, Bhattacharya S, Banerjee PP. Methylation reverses an epigenetically silenced tumor suppressor gene RASSF1A in human prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 362: 212-217
- Kawamoto K, Okino ST, Place RF, Urakami S, Hirata H, Kikuno N, Kawakami T, Tanaka Y, Pookot D, Chen Z, Majid S, Enokida H, Nakagawa M, Dahiya R. Epigenetic modifications of RASSF1A gene through chromatin remodeling in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2541-2548
- Pallarés J, Velasco A, Eritja N, Santacana M, Dolcet X, Cuatrecasas M, Palomar-Asenjo V, Catusés L, Prat J, Matias-Guiu X. Promoter hypermethylation and reduced expression of RASSF1A are frequent

■应用要点

实验结果说明 RASSF1A 甲基化在 HCC 的发生中发挥作用, 检测 RASSF1A 甲基化指标可能有助于 HCC 早期诊断, 并为 HCC 临床基因治疗提供新的治疗思路.

- molecular alterations of endometrial carcinoma. *Mod Pathol* 2008; 21: 691-699
- 10 Hu J, Li H, Shi T, Ma X, Wang B, Xu H, Ai X, Ju Z, Wang C, Zhang G, Zhang X. Relationship between the expression of RASSF1A protein and promoter hypermethylation of RASSF1A gene in bladder tumor. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 2008; 28: 182-184
 - 11 Chen YJ, Tang QB, Zou SQ. Inactivation of RASSF1A, the tumor suppressor gene at 3p21.3 in extrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1333-1338
 - 12 Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 192-198
 - 13 Wang YC, Yu ZH, Liu C, Xu LZ, Yu W, Lu J, Zhu RM, Li GL, Xia XY, Wei XW, Ji HZ, Lu H, Gao Y, Gao WM, Chen LB. Detection of RASSF1A promoter hypermethylation in serum from gastric and colorectal adenocarcinoma patients. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3074-3080
 - 14 Xu XL, Yu J, Zhang HY, Sun MH, Gu J, Du X, Shi DR, Wang P, Yang ZH, Zhu JD. Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3441-3454
 - 15 赵强子, 祁志芳, 魏万礼, 李开宗, 窦科峰. 肝癌患者血清RASSF1A异常甲基化检测的意义. *第四军医大学学报* 2006; 27: 1577-1579
 - 16 Yeo W, Wong N, Wong WL, Lai PB, Zhong S, Johnson PJ. High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A in tumor and plasma of patients with hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2005; 25: 266-272
 - 17 Zhang YJ, Wu HC, Shen J, Ahsan H, Tsai WY, Yang HI, Wang LY, Chen SY, Chen CJ, Santella RM. Predicting hepatocellular carcinoma by detection of aberrant promoter methylation in serum DNA. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2378-2384
 - 18 Liu Q, Yue XQ, Ren RZ, Ma CH, Ling CQ. [Characteristics of sublingual venae in primary liver cancer patients in different clinical stages] *Zhongxiyi Jiehe Xuebao* 2004; 2: 175-177
 - 19 Deng ZH, Wen JF, Li JH, Xiao DS, Zhou JH. Activator protein-1 involved in growth inhibition by RASSF1A gene in the human gastric carcinoma cell line SGC7901. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1437-1443
 - 20 Negraes PD, Favaro FP, Camargo JL, Oliveira ML, Goldberg J, Rainho CA, Salvadori DM. DNA methylation patterns in bladder cancer and washing cell sediments: a perspective for tumor recurrence detection. *BMC Cancer* 2008; 8: 238
 - 21 Umemura S, Fujimoto N, Hiraki A, Gemba K, Takigawa N, Fujiwara K, Fujii M, Umemura H, Satoh M, Tabata M, Ueoka H, Kiura K, Kishimoto T, Tanimoto M. Aberrant promoter hypermethylation in serum DNA from patients with silicosis. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1845-1849
 - 22 Inda MM, Castresana JS. RASSF1A promoter is highly methylated in primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Neuropathology* 2007; 27: 341-346
 - 23 Maat W, van der Velden PA, Out-Luiting C, Plug M, Dirks-Mulder A, Jager MJ, Gruis NA. Epigenetic inactivation of RASSF1a in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 486-490
 - 24 Lai HC, Lin YW, Chang CC, Wang HC, Chu TW, Yu MH, Chu TY. Hypermethylation of two consecutive tumor suppressor genes, BLU and RASSF1A, located at 3p21.3 in cervical neoplasias. *Gynecol Oncol* 2007; 104: 629-635
 - 25 Riquelme E, Tang M, Baez S, Diaz A, Pruyas M, Wistuba II, Corvalan A. Frequent epigenetic inactivation of chromosome 3p candidate tumor suppressor genes in gallbladder carcinoma. *Cancer Lett* 2007; 250: 100-106
 - 26 Lázcoz P, Muñoz J, Nistal M, Pestaña A, Encío I, Castresana JS. Frequent promoter hypermethylation of RASSF1A and CASP8 in neuroblastoma. *BMC Cancer* 2006; 6: 254
 - 27 Wong ML, Tao Q, Fu L, Wong KY, Qiu GH, Law FB, Tin PC, Cheung WL, Lee PY, Tang JC, Tsao GS, Lam KY, Law S, Wong J, Srivastava G. Aberrant promoter hypermethylation and silencing of the critical 3p21 tumour suppressor gene, RASSF1A, in Chinese oesophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2006; 28: 767-773
 - 28 Choi YL, Kang SY, Shin YK, Choi JS, Kim SH, Lee SJ, Bae DS, Ahn G. Aberrant hypermethylation of RASSF1A. *Virchows Arch* 2006; 448: 331-336
 - 29 Shen WJ, Dai DQ, Teng Y, Liu HB. Regulation of demethylation and re-expression of RASSF1A gene in gastric cancer cell lines by combined treatment of 5-Aza-CdR and NaB. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 595-600
 - 30 Honorio S, Agathangelou A, Schuermann M, Pankow W, Viacava P, Maher ER, Latif F. Detection of RASSF1A aberrant promoter hypermethylation in sputum from chronic smokers and ductal carcinoma in situ from breast cancer patients. *Oncogene* 2003; 22: 147-150
 - 31 Hsu HS, Chen TP, Hung CH, Wen CK, Lin RK, Lee HC, Wang YC. Characterization of a multiple epigenetic marker panel for lung cancer detection and risk assessment in plasma. *Cancer* 2007; 110: 2019-2026
 - 32 Chan MW, Chan LW, Tang NL, Lo KW, Tong JH, Chan AW, Cheung HY, Wong WS, Chan PS, Lai FM, To KF. Frequent hypermethylation of promoter region of RASSF1A in tumor tissues and voided urine of urinary bladder cancer patients. *Int J Cancer* 2003; 104: 611-616
 - 33 Dulaimi E, Hillinck J, Ibanez de Caceres I, Al-Saleem T, Cairns P. Tumor suppressor gene promoter hypermethylation in serum of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6189-6193
 - 34 Rykova EI, Skvortsova TE, Hoffmann AL, Tamkovich SN, Starikov AV, Bryzgunova OE, Permiakova VI, Warnecke JM, Sczakiel G, Vlasov VV, Laktionov PP. [Breast cancer diagnostics based on extracellular DNA and RNA circulating in blood] *Biomed Khim* 2008; 54: 94-103
 - 35 Wong TS, Kwong DL, Sham JS, Wei WI, Kwong YL, Yuen AP. Quantitative plasma hypermethylated DNA markers of undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2401-2406

■同行评价

本文研究内容有意义, 结果可信, 文字流利, 引用的参考文献较新。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

胆囊占位病变中P53和K-ras的表达及其临床意义

王延召, 于则利, 张立军

■背景资料

原发性胆囊癌早期诊断困难, 预后差。研究胆囊癌形成和发展以及高侵袭、高转移等恶性生物学行为的发生机制, 对提高临床早期诊断和治疗及预后非常重要。

王延召, 北京大学首钢医院普外二科 北京市 100044
于则利, 张立军, 首都医科大学附属同仁医院普外科 北京市 100730
北京市优秀人才资助项目, No. 2005
通讯作者: 张立军, 100730, 北京市东城区东交民巷1号, 首都医科大学附属同仁医院普外科. zhjl1968@126.com
电话: 010-58268539
收稿日期: 2008-03-12 修回日期: 2008-08-31
接受日期: 2008-09-08 在线出版日期: 2009-01-08

Expression of P53 and K-ras in benign neoplasms and carcinoma of gallbladder

Yan-Zhao Wang, Ze-Li Yu, Li-Jun Zhang

Yan-Zhao Wang, the Second Department of General Surgery, Peking University Shougang Hospital, Beijing 100044, China

Ze-Li Yu, Li-Jun Zhang, Department of General Surgery, Tongren Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100730, China

Supported by: the Beijing Bonzer Person Supoport Project, No. 2005

Correspondence to: Li-Jun Zhang, Department of General Surgery, Tongren Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100730, China. zhjl1968@126.com

Received: 2008-03-12 Revised: 2008-08-31

Accepted: 2008-09-08 Published online: 2009-01-08

Abstract

AIM: To detect the expression of P53 and K-ras in gallbladder benign lesions and malignant diseases, and to examine their clinical significance.

METHODS: Twenty specimens with cholesterol polyps, 22 with adenoma of gallbladder, 25 with primary gallbladder cancer (PGC) (including 5 with atypical hyperplasia and carcinoma in situ) were examined in this study for P53 and K-ras' expressions using immunohistochemistry. A statistical analysis was performed.

RESULTS: Aberrant expression of P53 and K-ras was present in benign lesions. The positive rate was significantly higher in patients with adenoma of gallbladder than with cholesterol polyps (72.7% vs 35.0%, $P = 0.014$; 90% vs 75.0%, $P = 0.167$). Expression of P53 and K-ras was the lowest in patients with cholesterol polyps. Paired

comparison between P53 and K-ras showed no significant difference, which indicated a possible synergistic interaction in development of gallbladder cancer.

CONCLUSION: Expression of P53 and K-ras shows significant difference and its positive rates are on the increase among cholesterol polyps, adenoma of gallbladder and primary gallbladder cancer (PGC).

Key Words: Gallbladder carcinoma; Cholecyst adenoma; Cholecyst polyps; P53; K-ras

Wang YZ, Yu ZL, Zhang LJ. Expression of P53 and K-ras in benign neoplasms and carcinoma of gallbladder. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(1): 94-96

摘要

目的: 研究P53和K-ras蛋白在胆囊良性占位病变和胆囊癌组织中的表达及差异, 探讨其临床意义。

方法: 应用免疫组织化学方法检测20例胆固醇息肉、22例胆囊腺瘤、25例胆囊癌(含有5例重度非典型增生原位癌)组织中P53和K-ras蛋白的表达, 进行统计学分析。

结果: 胆囊良性病变的黏膜组织中存在P53和K-ras的异常表达, 其中, 胆囊腺瘤患者的阳性表达显著高于胆囊胆固醇息肉患者(72.7% vs 35.0%, $P = 0.014$; 90% vs 75.0%, $P = 0.167$); 胆固醇性息肉患者的P53和K-ras表达较低。配对比较的P53和K-ras表达结果无差异, 两者可能在胆囊癌的发生过程中有协同性作用。

结论: 胆固醇性息肉、胆囊腺瘤、胆囊癌患者的病变组织中P53和K-ras蛋白的表达有显著性差异, 表达阳性率呈现上升趋势。

关键词: 胆囊癌; 胆囊腺瘤; 胆固醇息肉; P53; K-ras

王延召, 于则利, 张立军. 胆囊占位病变中P53和K-ras的表达及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2009; 17(1): 94-96
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/94.asp>

■同行评议者

傅华群, 教授, 南昌大学第二附属医院普外科

0 引言

原发性胆囊癌(primary gallbladder carcinoma, PGC)早期诊断困难, 预后差. 研究胆囊癌形成和发展以及高侵袭、高转移等恶性生物学行为的发生机制, 对提高临床早期诊断和治疗及预后非常重要. 为进一步了解胆囊良、恶性占位性病变中P53和K-ras的表达情况, 探讨其阳性表达的临床意义.

1 材料和方法

1.1 材料 收集我科经手术治疗、病理证实的患者: 胆固醇性息肉20例, 男11例, 女9例, 年龄27-70(平均年龄49.2)岁; 胆囊腺瘤22例, 男6例, 女16例, 年龄34-74(平均年龄57.4)岁; 进展期胆囊癌20例, 男7例, 女13例, 年龄35-73(平均年龄为63)岁. 重度不典型增生及原位癌5例, 男2例, 女3例, 年龄44-65(平均年龄58)岁.

1.2 方法 病理标本处理采用免疫组织化学ABC法, 一抗为兔抗人P53和K-ras单抗, 二抗为鼠抗兔二抗, 以上试剂均购自重庆Boston公司. 蜡块切片按说明书进行预处理, 并按照标准ABC法步骤进行染色处理. 抗体稀释工作浓度为1:100. 用已知的P53和K-ras蛋白阳性的胆囊癌组织作阳性对照, 以PBS液代替一抗作阴性对照. 同时应用间质组织作为病理正常阴性对照. 结果判定: 采用1:100抗体工作浓度, 显微镜下控制反应时间, 反应时间以阳性对照细胞胞质或胞核内出现棕黄色细颗粒为准. 结果判断采用4级半定量法评估阳性表达强度: Olympus显微镜下($\times 400$)观察每张切片, 随机选取带有胆囊黏膜或肿瘤组织的5个不重复视野, 按切片中染色阳性细胞数占镜下黏膜细胞总数或肿瘤细胞的比例划分, 无明确阳性细胞为“-”; 阳性细胞数 $<10\%$ 为“+”; 阳性细胞数 $10\%-50\%$ 为“++”; 阳性细胞数 $>50\%$ 为“+++”.

统计学处理 应用SPSS12.0统计软件处理检验结果, 采用行 \times 列的 χ^2 检验比较分析组间的阳性率的差异, 配对 χ^2 检验用于不同抗体阳性率的比较分析.

2 结果

2.1 P53的表达 P53在胆固醇性息肉和胆囊腺瘤中的整体阳性率为54.8%, 而恶性病变者为92%($P = 0.01$), 两者之间的差异有显著的统计学意义. 就性别差异而言, 所有的研究标本中男性阳性率(65.6%)与女性(71.4%)之间无显著性

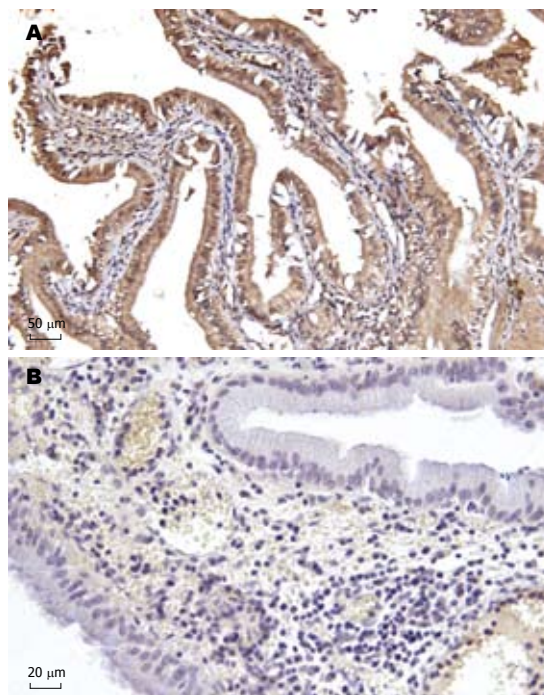


图1 P53染色阳性 and 阴性病例. A: 强阳性; B: 阴性.

差异($P = 0.609$). 年龄60岁以上(63.3%)和60岁以下(62.7%), 差异无显著性($P = 0.943$). 胆囊腺瘤的阳性率72.7%, 而胆固醇性息肉者阳性率为35.0%, 表达率间有明显的差异($P = 0.014$, 图1).

2.2 K-ras在胆囊良性占位病变和胆囊癌组织中的表达 K-ras在胆固醇性息肉和腺瘤中的总体阳性率为83.3%, 而恶性则为92%, 两者无显著性差异($P = 0.314$), 间质组织中未见阳性表达. 然而进一步的分析提示前两者弱阳性较多, 将弱阳性与阴性病例合并后提示: 前两者弱阳性与阴性占60%, 后者仅32%, 两者之间有差异性($P = 0.042$). 就性别而言, 两者之间差异无显著性($P = 0.352$). 胆囊腺瘤的阳性率为90%, 胆固醇性息肉阳性者75.0%, 胆囊腺瘤和胆固醇性息肉($P = 0.167$)间阳性率的比较无显著性差异. 若将弱阳性和阴性合并, 结果分析提示: 胆囊腺瘤的阴性和弱阳性率为45.5%, 胆固醇性息肉为75%, 无明显差异($P = 0.051$, 图2).

2.3 配对比较 本研究所有标本两种蛋白表达的总体配对比较, 差异无显著性($P = 0.603$), 良性胆囊病变中的配对比较也无显著性差异($P = 0.056$), 同时对胆固醇性息肉、胆囊腺瘤进行的配对比较显示 P 值分别为0.08和0.125, 均无明显的统计学意义.

3 讨论

正常的野生型P53蛋白, 由于半衰期短, 应用免疫

■ 研发前沿

正常的野生型P53蛋白, 由于半衰期短, 应用免疫组化的方法在细胞中常不能检测到其存在; 当其发生突变时, 由于结构异常, 不易分解代谢, 半衰期延长, 从而得以检测.

■同行评价

本文观察了三组临床病例, 比较了胆囊癌、胆囊良性病变及胆囊息肉组织中的P53和K-ras的表达. 得出了有规律性得结果, 有一定的科学意义, 但临床适应性不够.

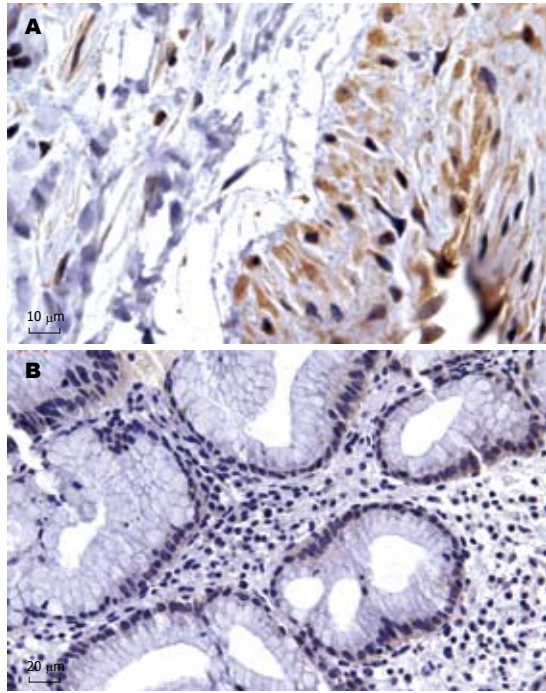


图 2 K-ras染色结果. A: 强阳性; B: 阴性.

组化的方法在细胞中常不能检测到其存在; 当其发生突变时, 由于结构异常, 不易分解代谢, 半衰期延长, 从而得以检测. 结构的改变导致其失去了监视并诱导变异细胞凋亡灭活的功能, 致使细胞变异存留并发展, 进而可能发展为肿瘤^[1-2]. 本实验结果表明: 与间质细胞相比, 从胆固醇性息肉、胆囊腺瘤以及胆囊癌患者的黏膜细胞中, 均存在着P53蛋白的表达异常, 病变不同表达检出率有较明显差异. 故我们推断P53的变异与这一肿瘤发生过程相关, 胆囊腺瘤高表达, 预示发生肿瘤的可能性较之胆固醇性息肉的更高, 这之前邹声泉等的研究结论相似^[3]. K-ras基因编码P21ras蛋白, 通常作为分子信号传导通路而存在^[1,4]. 在正常组织中可有低水平的表达; 如发生变异, 其结构异常的蛋白可与GTP持续结合,

不被释放、水解破坏, 故易被检测; 同时此种结合可以过度激活细胞的代谢活动, 促进细胞的增殖与转化^[5]. 本实验中以腺瘤患者的表达水平较高, 与胆固醇性息肉的比较虽然未发现明显的差异性, 但是胆固醇性息肉表达相对较低, 由此我们认为: 胆囊腺瘤代谢增生及分化活跃, 在不断的接受K-ras变异导致的正反馈的过程中可发生进一步的分子变异, 致使肿瘤的最终发生成为可能, 但是K-ras变异通过实验可以看出较广泛的分布于所选的标本中, 故在肿瘤的发生中的作用有待于进一步的探讨. 对两种蛋白的配对分析可以看出, 差异无显著性, 可以认为两种蛋白的表达在同一样本中检测结果的一致阳性率较高, 因此两者在肿瘤的发生机制上可能起到协同作用.

基因异常是肿瘤发生的基础, 通过本研究发现胆囊良性病变黏膜组织中存在P53和K-ras的异常表达, 而胆囊腺瘤的阳性率更高, 则其演变发展为胆囊癌的可能性更大. 胆固醇性息肉患者的P53和K-ras表达较低, 故恶变的可能性较腺瘤为小. 实验数据配对比较发现P53和K-ras表达结果无差异, 提示两者可能在肿瘤的发生上起协同性作用.

4 参考文献

- 1 姚兵, 孙家骏, 邓勇, 景鸿恩, 郭新建, 于志敏. ras和p53基因在原发性胆囊癌早期诊断中的应用研究. 中华肝胆外科杂志 2004; 10: 457-459
- 2 耿志坚, 童淑兰, 殷梅英, 费绍华, 叶龙珍, 杨玲芳. 胆囊癌DNA含量、ER、PR、P53、P21表达与预后的意义. 现代肿瘤医学 2003; 11: 168-170
- 3 Zhang L, Zhou SQ. DNA content and gene expression in Adnoma-Carcinoma asequence of gallbladder carcinogenesis. Chin Ger J Clin Oncol 2003; 2: 102-103
- 4 Yamagata S, Muto T, Uchida Y, Masaki T, Higuchi Y, Sawada T, Hirooka T. Polypoid growth and K-ras codon 12 mutation in colorectal cancer. Cancer 1995; 75: 953-957
- 5 孔琦, 黄强. 胆管癌分子生物学研究进展. 肝胆外科杂志 2004; 12: 393-395

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

中国科技期刊引证报告(核心版)发布世界华人消化杂志 2007年影响因子 0.568

本刊讯 2007年世界华人消化杂志的总被引频次为2353, 位居全部1723种中国科技论文统计源期刊的第86位, 内科医学类28中期刊的第5位. 2007年世界华人消化杂志的影响因子为0.568, 内科医学类28中期刊的第15位. 即年指标00.082, 他引率0.69, 引用刊数372种, 扩散因子15.81, 学科影响指标0.54. (编辑: 程剑侠 2009-01-08)

复发性急性胰腺炎临床特征及诊治分析84例

李鹏, 李晓云, 李郁

李鹏, 李晓云, 四川省泸州医学院附属医院消化内科 四川省泸州市 646000

李郁, 四川省泸州医学院附属医院心内科 四川省泸州市 646000

作者贡献分布: 李鹏与李晓云对此文贡献均等; 此课题由李晓云负责设计与修改; 研究过程李晓云与李鹏完成; 数据分析由李郁与李鹏完成; 本论文写作由李鹏与李郁完成。

通讯作者: 李晓云, 646000, 四川省泸州市太平街25号, 四川省泸州医学院附属医院消化内科. physician_lee@sina.com
电话: 0830-3165331

收稿日期: 2008-10-22 修回日期: 2008-11-11

接受日期: 2008-11-17 在线出版日期: 2009-01-08

Rational diagnosis and therapy for recurrent acute pancreatitis: a clinical analysis of 84 cases

Peng Li, Xiao-Yun Li, Yu Li

Peng Li, Xiao-Yun Li, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Yu Li, Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Correspondence to: Xiao-Yun Li, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, 25 Taiping Street, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. physician_lee@sina.com

Received: 2008-10-22 Revised: 2008-11-11

Accepted: 2008-11-17 Published online: 2009-01-08

Abstract

AIM: To investigate the characteristics of etiology, clinical features and endoscopic manifestations and prevention methods of recurrent acute pancreatitis.

METHODS: The clinical data of 84 patients with recurrent acute pancreatitis (recurrence group) and 67 patients with incipient acute pancreatitis (control group) at our hospital from September 2001 to December 2007 were retrospectively analyzed; the results of imaging changes and endoscopy therapy were reviewed as well.

RESULTS: Incidence rate of biliary tract diseases was significantly higher in relapse group than in the control group (60.7% vs 38.8%, $P < 0.01$). Radiation pain, jaundice, intestinal obstruction

were increased in the relapse group than in the control group, but there was no marked difference. Crude echo (38.3%), pancreatic duct dilation (21.3%), cholecystitis, the common bile duct stone were also significantly higher in relapse group than in control group. ERCP showed that stones and common bile duct dilation were significantly higher in relapse group than in control group (35.8% vs 11.6%, 32.1% vs 9.3%, $P < 0.05$). Of 84 RAP cases, 20 underwent surgical treatment, 48 conservative treatment, and 16 endoscopy therapy. Three died in each surgery group and conservative treatment group, and none in endoscopy therapy group.

CONCLUSION: Recurrent acute pancreatitis often results from biliary tract diseases including cholelithiasis, chronic cholecystitis, inappropriate eating habit and alcohol use. Rational diagnosis and therapy is important measure to prevent relapse. Endoscopy therapy for RAP is safe, minimally invasive and effective, and is recommended for wide use.

Key Words: Recurrent acute pancreatitis; Etiology; Endoscope; Diagnosis; Therapy

Li P, Li XY, Li Y. Rational diagnosis and therapy for recurrent acute pancreatitis: a clinical analysis of 84 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(1): 97-101

摘要

目的: 探讨复发性急性胰腺炎(recurrent acute pancreatitis, RAP)的病因, 临床、内镜、影像学表现及治疗。

方法: 回顾性分析我院2001-9/2007-12收治的84例RAP(复发组)及67例初发性急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)(对照组)患者的临床资料, 包括临床表现、内镜、影像学特征、治疗及预后。

结果: 复发组中胆道疾患发病率显著高于对照组(60.7% vs 38.8%, $P < 0.01$)。复发组中放射痛、黄疸、肠梗阻的发生率较对照组升高, 但无统计学意义。复发组胰腺回声粗强者

■背景资料

随着生活水平的提高、饮食结构的改变, 酗酒、暴饮暴食及过多摄入油腻食物加之肥胖、高脂血症、脂肪肝、糖尿病及代谢综合征的发病率增加, 急性胰腺炎的发病率呈上升趋势。临床上复发性急性胰腺炎是急性胰腺炎的一种特殊类型, 其确切病因目前尚不清楚, 反复发作可导致慢性胰腺炎。因而寻找和处理急性胰腺炎复发的影响因素和诊断治疗新技术具有重要临床意义。

■同行评议者

樊晓明, 主任医师, 复旦大学附属金山医院消化科; 陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科

■研发前沿

20世纪内镜介入技术的飞速发展, RAP的诊治亦发生了划时代的变革, 超声内镜(EUS)、内镜逆行胰胆管造影(ERCP)及内镜下括约肌切开术(EST)的广泛开展, 为RAP的诊断和治疗提供了新的技术和方法. 因而内镜下诊治成为临床研究RAP的热点与重点.

(38.3%)、胰管扩张者(21.3%), 胆囊炎症、结石和胆总管的发生率也显著高于对照组; ERCP复发组发现胆总管结石、扩张者显著高于对照组(35.8% vs 11.6%, 32.1% vs 9.3%, $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$). 84例RAP患者中20例手术治疗, 48例保守治疗, 16例内镜治疗, 其中手术治疗和保守治疗各死亡患者3例, 内镜治疗无死亡.

结论: RAP最常见病因为胆道疾患、饮食不当、酗酒; 明确病因后积极治疗原发病因, 可有效减少其复发; 内镜下诊断和介入治疗是微创、疗效确切的手段, 值得临床进一步推广.

关键词: 复发性急性胰腺炎; 病因; 内镜; 诊断; 治疗

李鹏, 李晓云, 李郁. 复发性急性胰腺炎临床特征及诊治分析84例. 世界华人消化杂志, 2009; 17(1): 97-101

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/97.asp>

0 引言

近年来随着生活水平的提高、饮食结构的改变, 酗酒、暴饮暴食及过多摄入油腻食物加之肥胖、高脂血症、脂肪肝、糖尿病及代谢综合征的发病率增加, 急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)的发病率呈上升趋势. 在综合治疗及个体化治疗的原则下, 约70%-80%的患者获得了较好的疗效, 但有一部分患者经治愈后反复发作, 称为复发性急性胰腺炎(recurrent acute pancreatitis, RAP). RAP是AP的一种特殊临床类型, 其反复发作可导致慢性胰腺炎, 严重危害人们的健康. 本文通过比较初发和复发性急性胰腺炎的临床特点, 分析国人RAP的常见病因, 内镜下诊治新技术, 以期指导临床预防和提高诊治水平.

1 材料和方法

1.1 材料 收集我院2001-09/2007-12收治的确诊为AP患者中548例, 其中诊断为RAP的患者84例, 复发率为15.32%; 84例RAP患者中, 男46例, 女38例, 男女之比为1.21:1, 年龄16-83(平均 45.28 ± 13.74)岁. 选取同时期住院67例初次发作的病例作为对照组, 其中男28例, 女39例, 男女之比为1:1.39, 年龄14-78(平均 48.75 ± 11.61)岁.

1.2 方法

1.2.1 诊断标准: AP诊断参照中华医学会消化病学分会胰腺疾病学组制定的中国急性胰腺炎诊治指南(草案)^[1]. 复发性急性胰腺炎的诊断标准: 急性胰腺炎患者经保守或手术治疗后临床症状

和体征消失, 血、尿淀粉酶恢复正常, 其他化验指标如淀粉酶、血常规、肝肾功能和血糖等恢复正常或基本正常, 进低脂半流质饮食无特殊不适反应后给予出院. 出院后再次出现急性胰腺炎症状, 伴有血、尿淀粉酶升高, 并通过实验室和影像学检查除外慢性胰腺炎者.

1.2.2 研究方法: 对上述所有患者的病历资料进行回顾性分析, 每个病例资料都统计在一个标准的表格中, 分析其病史及发作次数、病因、每次复发的临床表现和体征、类型、并发症、诊断资料、相关的辅助检查结果、治疗及转归情况.

统计学处理 采用SPSS13.0进行统计分析. 本研究资料均为计数资料, 对其构成比的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义.

2 结果

2.1 复发病因与分型 84例RAP中, 胆源性51例(60.7%), 其中胆石症(包括胆道微结石)32例、胆囊炎21例、胆囊切除术后20例, 显著高于对照组(60.7% vs 38.8%, $P < 0.01$), 饮食因素(高脂饮食、暴饮暴食)10例(11.9%)、酒精性10例(11.9%)、代谢性因素(合并高脂血症、脂肪肝、糖尿病)8例(9.5%)、特发性3例(3.6%)、其他Oddi括约肌功能障碍和胰腺肿瘤各1例(表1). 其中有11人为3次以上发作(胆囊多发结石/微小结石4例, 胆囊切除术后4例, 高脂血症3例). 84例RAP中, 重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)18例(21.4%), 轻症急性胰腺炎(mild acute pancreatitis, MAP)66例(78.6%). 两组病例在年龄、性别、病情程度方面比较差异无统计学意义.

2.2 临床特征 本组84例RAP患者, 以上腹痛为主要表现者65例(77.4%); 腹胀者24例(28.6%); 恶心呕吐者22例(26.2%); 发热者32例(38.1%); 较对照组升高的临床表现有: 放射痛29例; 黄疸21例; 麻痹性肠梗阻11例, (34.5% vs 17.9%, 25.0% vs 13.4%, 13.1% vs 7.5%); 出现胰源性腹水、胸水者6例(7.1%); 出现少尿者5例(6.0%); 出现呼吸困难者5例(6.0%); 继发性血糖升高者4例(4.8%). RAP的并发症中, 急性液体聚集34例(40.5%), 胰腺坏死14例(16.7%), 急性假性囊肿12例(14.3%), 胰腺脓肿8例(9.5%), 多器官功能衰竭6例(7.1%), 休克4例(4.8%), 消化道出血3例(3.6%), 胰性脑病2例(2.4%), 弥散性血管内凝血1例(1.2%).

2.3 实验室检查 本组84例RAP患者, 血、尿淀粉

■相关报道

Gullo *et al*总结了1990-1994年欧洲五个国家的1068例急性胰腺炎患者, 对其中的288例RAP进行研究. 发现酗酒是最常见的原因, 其次是胆石症, 高脂血症和胰腺分裂也比较常见, 特发性胰腺炎仍占有较高的比例; 《中国急性胰腺炎诊治指南》推荐在有条件的单位, 对于怀疑或已经证实的急性胆源性胰腺炎, 应早期内镜下行ENBD或EST治疗.

酶均升高, 其中血淀粉酶升高 >500 U苏氏单位者72例, 伴血钙下降 <1.75 mmol/L者3例. 53例患者白细胞升高, 其中 $>16.0 \times 10^9/L$ 者9例, 血糖升高 >10.0 mmol/L者37例, 肝功能损害27例(ALT、AST、GGT、ALP升高伴或不伴TBIL、DBIL升高), 肾功能异常15例(血尿素氮及血肌酐升高, 出现蛋白尿、镜下血尿、白细胞尿).

2.4 影像学检查 两组患者均行腹部B超检查, 了解有无胆石症、胆囊炎、肝内外胆管结石和胆总管扩张; 有无胰腺形态学变化、回声情况、水肿、坏死及积液等; 有无胸腹水. 其中83例(复发组47例, 对照组36例)患者行CT检查, 主要了解胰腺及胰周的形态学变化. B超检查发现, 复发组胰腺回声增强者达38.3%(18/47), 胰管扩张者达21.3%(10/47), 均显著高于对照组; 胆石症25.5%(12/47), 胆囊炎21.3%(10/47), 胆总管扩张19.1%(9/47), 也显著高于对照组. CT检查结果提示, 复发组出现胰腺肿大48.9%(23/47), 胰周积液、脂肪间隙模糊36.2%(17/47), 胰腺假性囊肿27.7%(13/47), 胰管扩张19.1%(9/47); 对照组分别为25.0%(9/36)、16.7%(6/36)、8.3%(3/36)、5.6%(2/36).

2.5 内镜检查 25例(复发组14例, 对照组11例)行超声内镜(endoscopic ultrasonography, EUS)检查, 71例(复发组39例, 对照组32例)行内镜逆行胆胰管造影(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)检查; 主要观察有无胰管扩张、结石、不规则、受压, 胰腺分裂、胆总管狭窄、扩张、结石、走行异常, 壶腹部狭窄, Oddi括约肌功能障碍(sphincter of oddi dysfunction, SOD)、胆道微结石, 胰腺肿瘤和慢性胰腺炎. 复发组ERCP发现胆总管结石、扩张者显著高于对照组; 主胰管结石、扩张、狭窄及乳头部病变发生率在复发组也明显增多, 但无统计学意义(表2). 另外复发组中有2例为胰腺分裂, 1例胰胆管合流异常.

2.6 治疗方法 本组84例RAP患者中20例手术治疗, 48例保守治疗, 16例内镜下治疗. 48例保守治疗者给予禁食、胃肠减压、抑酸、抑制胰酶分泌、抗炎、补液、维持水、电解质及酸碱平衡及中西医结合等综合治疗, 其中3例死亡(1例死于ARDS, 1例死于胰腺坏死合并败血症、DIC, 1例死于胰性脑病). 对20例胆石症、胆囊炎, 胰腺出血坏死严重, 并发胰腺脓肿, 假性囊肿者予以外科手术治疗. 术式根据患者具体情况选择胆囊切除、胆总管探查、T管引流、胰

表1 复发组与对照组病因比较 $n(\%)$

病因	复发组	对照组	χ^2 值	P值
胆源性	51(60.7)	26(38.8)	7.159	0.007
饮食因素	10(11.9)	13(19.4)	1.623	0.203
酒精性	10(11.9)	11(16.4)	0.634	0.426
代谢性	8(9.5)	5(7.5)	0.201	0.654
特发性 ¹	3(3.6)	8(11.9)	2.725	0.099
其他 ¹	2(2.4)	4(6.0)	0.493	0.482

¹连续性校正 χ^2 值.

包膜切开引流、囊肿穿刺引流、腹腔灌洗、胰坏死组织清除, 胰周腹膜后病灶清除+灌洗引流等. 其中3例死亡(2例死于多器官功能衰竭, 1例死于胰腺坏死合并全身炎症反应综合征). 16例内镜下治疗患者首先给予抑酸、抑酶、抗炎等治疗, 再根据具体情况选择内镜治疗时机. 内镜治疗前先行ERCP或EUS检查以明确梗阻部位、性质及程度后决定内镜治疗方法. 对插管容易、胆汁流出较通畅、胆总管及乳头无明显狭窄, 胆总管结石 >2 cm估计取石困难者, 行内镜下鼻胆管引流(endoscopic nasobiliary drainage, ENBD); 对乳头结石嵌顿、胆总管结石 ≤ 2 cm、乳头狭窄、胰胆管下段狭窄等梗阻明显者行内镜下十二指肠乳头切开术(endoscopic sphincterotomy, EST). EST后采用网篮取石, 尽可能取尽结石, 取石后放置ENBD. 对不能取出结石或未取尽结石者, 则待胰腺炎好转后择期根据具体情况选择内镜再次取石或外科手术治疗. 行ERCP+EST和/或ERCP+ENBD患者胰胆管引流通畅, 梗阻得以解除, 黄疸逐渐消退, 腹痛、腹胀有所缓解; 血象、总胆红素及其他生化指标逐渐降至正常; 随访期未再复发且内镜治疗中未见相关内镜治疗严重并发症; 行内镜治疗者无患者死亡.

3 讨论

RAP是指临床上发作次数超过1次的急性胰腺炎, 每次发作均有典型AP的临床表现, 而在急性发作期后, 胰腺腺体的形态和功能正常, 不致遗留不可逆的组织损害或永久的外分泌和(或)内分泌功能障碍. RAP发作可轻可重, 轻型者胰腺仅有水肿等病理改变, 且很快恢复正常; 重症者胰腺发生出血、坏死, 病死率较高^[2].

研究发现, 70%左右的RAP病例可从病史、体征、实验室检查、B超、CT、EUS、MRCP或ERCP找到复发原因^[3]. RAP的病因总结归

■创新盘点

本文着重对RAP的内镜下诊治进行分析, 为临床RAP的诊断、治疗开辟新途径.

■应用要点

本文通过比较复发和初发性急性胰腺炎的临床特点,分析我国人群RAP的常见病因,内镜下诊治新技术,以期指导临床预防和提高诊治水平。

表 2 复发组与对照组病例EUS/ERCP检查结果比较分析 n(%)

分组	n	胆总管			胆囊结石	主胰管					乳头部		胰胆管合流异常
		狭窄	结石	扩张		狭窄	结石	扩张	分裂	肿瘤	狭窄	憩室	
复发组	53	10(18.9)	19(35.8) ^b	17(32.1) ^a	20(37.7) ^a	6(11.3)	5(9.4)	4(7.5)	2(3.8)	1(1.9)	4(7.5)	7(13.2)	1(1.9)
对照组	43	0	5(11.6)	4(9.3)	8(18.6)	0	0	2(4.7)	0	0	0	3(7.0)	0

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 对照组.

纳为:机械性、代谢性、毒素、药物性、混合性、遗传性及自身免疫性.引起机械性阻塞的原因可以是先天异常(如胰腺分裂、环状胰腺、胆总管囊肿、胰胆管异常联合等),也可以是获得性的,包括胆石症、Oddi括约肌功能障碍、壶腹周围憩室,胆总管囊肿, Vater乳头和胰胆管结合处的良性/恶性肿瘤,主胰管器质性狭窄及囊样赘生物等.代谢性因素主要为:高脂血症和高钙血症.毒素如蝎毒、有机磷酸盐及二甲氧甲烷中毒等以及大量酒精摄入也为RAP独立的病因.混合性因素包括血管性疾病、结核、病毒和寄生虫感染、热带性胰腺炎等.遗传性胰腺炎和胰腺囊性纤维化可能是遗传性因素中两个重要的疾病^[4].本组病例中,无论是初发组还是复发组,胆道疾病都是最主要的发病因素.同时本研究还发现复发次数越多患者,胆道疾病因素所占比重就越大,其中近一半为胆囊结石术后,虽再次行影像学检查未发现胆道再结石或狭窄,但胆道微结石或括约肌功能障碍不能排除;可见胆囊切除术并不能很好地防止AP再发,此时可开展EUS或ERCP检查以明确病因.临床上某些不明病因的RAP病例行EST可能对预防再次发作有益^[5].在西方国家,酒精性因素是RAP发生的常见原因^[6-7],本研究资料显示,酒精性因素高达11.9%(10/84),这可能与川南、贵州地区的酒文化有关.男性饮酒的比例和饮酒量均较女性高,因而可解释复发组中男性比例高于女性.近年来,高脂血症、脂肪肝、糖尿病及代谢综合征的患者逐渐增多,代谢性因素引起胰腺炎复发受到关注^[8].本研究中因代谢性引起RAP者占9.5%(8/84),与初发者相比,其所占比例有所升高.随着新的技术的不断应用于临床,特发性胰腺炎中的不少病因已探明,多为胆道或胰管括约肌功能障碍、胆道微结石、遗传性或混合性因素所致^[3].因而临床工作中应加强对患者饮食和生活方式的宣传教育(如忌暴饮暴食及油腻饮食、戒烟、戒酒,停止使用可能诱发胰腺炎的药物);密切监测血脂、血钙并合理

控制血脂、血钙水平对预防RAP具有十分积极的意义.

RAP的检查步骤和方法可总结归纳为三个阶段:第一阶段检查(非侵入性检查)包括血清淀粉酶和脂肪酶测定、血脂和血钙测定、B超、CT、MRI/MRCP检查、CA19-9和CEA测定;第二阶段检查(多为侵入性检查)包括十二指肠镜检查、EUS、ERCP;第三阶段检查(非常规检查)包括Oddi括约肌测压法(SOM)、经ERCP细胞学或组织学检查、超声内镜引导下细针穿刺活检、胰蛋白酶缺乏基因分析和囊性纤维化跨膜传导调节因子检查、自身免疫指标、多种病毒以及 α 1-抗胰蛋白酶、免疫球蛋白检测等^[9].我们的体会是:通过动态影像学检查(CT或MRI/MRCP)除外胰腺肿瘤后,在仍未明确病因者可先行EUS替代ERCP做初步检查.EUS可敏感的诊断胆总管结石/胆道微结石,胰腺分裂,环状胰腺,胆胰交界处异常,并可排除胰腺肿瘤及慢性胰腺炎,并且为ERCP下治疗提供资料^[10].ERCP下行SOM是诊断SOD的“金标准”,可对胰管狭窄患者行胰管刷洗细胞学检查,如检查阴性可行超声内镜下细针穿刺(EUS-FNA).如上述检查仍未明确病因者,则应考虑遗传基因检测如阳离子胰蛋白酶原基因(PRSS1),1型丝氨酸蛋白酶抑制剂Kazal(SPINK1)和囊性纤维化跨膜传导调节因子(CFTR)以及自身免疫指标检测,排除遗传性和自身免疫性胰腺炎的诊断^[11-12].

RAP患者经明确病因或怀疑其发病原因后应积极进行各种相应的检查与治疗^[9].RAP的内科治疗与AP相同.近年来,随着消化内镜技术的发展,越来越多的实践证明内镜下诊治是临床AP及RAP诊治手段的突破.RAP复发因素中适应内镜下诊断和治疗的包括:(1)胆总管结石,包括胆道微结石;(2)先天性胆胰解剖异常(如胆总管囊肿,十二指肠重复/憩室,胰腺分裂);(3)壶腹部良性和恶性病变;(4)胰腺囊性肿瘤,包括胰腺浆液性囊腺瘤和黏液性囊性肿瘤(包括导管内乳

头状黏液瘤(pancreatic intraepithelial neoplasias, IPMNs); (5)胰管狭窄, 结石和肿瘤; (6)Oddi括约肌功能障碍(SOD); (7)胆道和胰腺寄生虫^[5]. 内镜下乳头括约肌切开术(EST)可解决胆管结石(包括微结石)、Oddi括约肌功能障碍和壶腹狭窄; 对胰管狭窄患者可行胰管内支架置入术; 对胰腺分裂患者可行胰管内支架引流、副乳头气囊扩张后放置胰管支架或副乳头括约肌成形术^[13]. 本组16例行内镜治疗者使胰胆管引流通畅, 梗阻得以解除, 黄疸逐渐消退, 腹痛、腹胀有所缓解; 血象、胆红素及其他生化指标逐渐降至正常, 且死亡率明显低于保守治疗与手术治疗者; 在随访期末再复发亦未见相关内镜治疗的严重并发症. 因而, 内镜下治疗RAP是微创、安全、疗效确切的手段, 值得临床推广.

4 参考文献

- 1 王兴鹏. 中国急性胰腺炎诊治指南(草案). 中华消化杂志 2004; 24: 190-192
- 2 Gao YJ, Li YQ, Wang Q, Li SL, Li GQ, Ma J, Zeng XZ, Huang LY, Yuan SA, Liu CA, Wang FX. Analysis of the clinical features of recurrent acute pancreatitis in China. *J Gastroenterol* 2006; 41: 681-685
- 3 Al-Haddad M, Wallace MB. Diagnostic approach to patients with acute idiopathic and recurrent pancreatitis, what should be done? *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1007-1010
- 4 Zhang W, Shan HC, Gu Y. Recurrent acute pancreatitis and its relative factors. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3002-3004
- 5 Baillie J. Endoscopic therapy in acute recurrent pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1034-1037
- 6 Gullo L, Migliori M, Pezzilli R, Oláh A, Farkas G, Levy P, Arvanitakis C, Lankisch P, Beger H. An update on recurrent acute pancreatitis: data from five European countries. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1959-1962
- 7 Pelli H, Lappalainen-Lehto R, Piironen A, Sand J, Nordback I. Risk factors for recurrent acute alcohol-associated pancreatitis: a prospective analysis. *Scand J Gastroenterol* 2008; 43: 614-621
- 8 孙诚谊, 潘耀振. 高脂血症性急性胰腺炎的发病机制及诊疗进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 343-349
- 9 Kinney TP, Freeman ML. Approach to acute, recurrent, and chronic pancreatitis. *Minn Med* 2008; 91: 29-33
- 10 Petrone MC, Arcidiacono PG, Testoni PA. Endoscopic ultrasonography for evaluating patients with recurrent pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1016-1022
- 11 Keim V. Role of genetic disorders in acute recurrent pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1011-1015
- 12 Pezzilli R. Acute recurrent pancreatitis: an autoimmune disease? *World J Gastroenterol* 2008; 14: 999-1006
- 13 Fogel EL, Toth TG, Lehman GA, DiMagno MJ, DiMagno EP. Does endoscopic therapy favorably affect the outcome of patients who have recurrent acute pancreatitis and pancreas divisum? *Pancreas* 2007; 34: 21-45

■同行评价

本文就复发性胰腺炎作了分析探讨, 有一定的临床意义.

编辑 史景红 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009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 2009-01-08)

IL-21受体在溃疡性结肠炎中的表达及对促炎症细胞因子分泌的诱导作用

夏兴洲, 刘占举

■背景资料

许多促炎症细胞因子参与了UC的免疫病理损伤, IL-21在一些自身免疫性疾病发病过程中起着重要作用, 本文研究IL-21对UC患者外周血和肠黏膜组织内淋巴细胞的免疫调节。

夏兴洲, 郑州大学第五附属医院消化内科 河南省郑州市450052
刘占举, 郑州大学第二附属医院消化内科 河南省郑州市450014
教育部新世纪优秀人才支持计划基金资助项目, No. NECT-05-0609
河南省卫生厅科技攻关基金资助项目, No. 200704009
作者贡献分布: 此课题由刘占举设计; 实验操作与论文写作由夏兴洲与刘占举完成。
通讯作者: 刘占举, 450014, 河南省郑州市经八路2号, 郑州大学第二附属医院消化内科. zhanjuliu@yahoo.com
电话: 0371-63939084
收稿日期: 2008-11-06 修回日期: 2008-12-11
接受日期: 2008-12-15 在线出版日期: 2009-01-08

IL-21 receptor is highly expressed and induces proinflammatory cytokine secretion in patients with ulcerative colitis

Xing-Zhou Xia, Zhan-Ju Liu

Xing-Zhou Xia, Department of Gastroenterology, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Zhan-Ju Liu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 2 Jingba Road, Zhengzhou 450014, Henan Province, China
Correspondence to: Professor Dr. Zhan-Ju Liu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China. zhanjuliu@yahoo.com
Received: 2008-11-06 Revised: 2008-12-11
Accepted: 2008-12-15 Published online: 2009-01-08

Abstract

AIM: To explore the role of IL-21 receptor (IL-21R) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and lamina propria mononuclear cells (LPMC) for patients with ulcerative colitis (UC).

METHODS: Peripheral blood samples and colonic biopsies were obtained from 28 patients with UC and 22 healthy controls. Expression of IL-21R in peripheral blood or lamina propria CD4⁺, CD8⁺ T cells, B cells and NK cells was analyzed using flow cytometry. Cytokine secretion by PBMC or LPMC under stimulation with IL-21 and anti-CD3 was detected using ELISA.

RESULTS: Expression of IL-21R was significantly higher in peripheral blood and lamina propria CD4⁺, CD8⁺ T cells, B cells and NK cells of UC patients than in healthy controls (PBMC: 8.42 ± 2.14 vs 3.46 ± 0.54, 10.35 ± 2.17 vs 5.28 ± 2.2, 7.27 ± 1.15 vs 2.35 ± 0.41, 12.55 ± 3.12 vs 5.45 ± 1.06; LPMC: 22.44 ± 3.46 vs 6.26 ± 1.15, 24.48 ± 4.57 vs 6.87 ± 1.02, 16.24 ± 3.10 vs 5.56 ± 1.44, 23.54 ± 4.12 vs 8.45 ± 1.68, all *P* < 0.05). PBMC or LPMC from UC patients, when stimulated with IL-21 and anti-CD3, produced significantly higher levels of TNF-α, IFN-γ and IL-2 compared with healthy controls (346 ± 72 vs 120 ± 27, 3048 ± 426 vs 1182 ± 242; 625 ± 113 vs 154 ± 35, 3827 ± 418 vs 1520 ± 304, all *P* < 0.05)

CONCLUSION: IL-21R is significantly increased in PBMC and LPMC from UC patients, and IL-21 induces proinflammatory cytokine secretion. It suggests that IL-21 is associated with intestinal mucosal injury and that target therapy directed against IL-21 may be used to treat UC patients.

Key Words: Ulcerative colitis; Peripheral blood mononuclear cells; Lamina propria mononuclear cells; Interleukin-21; Receptor

Xia XZ, Liu ZJ. IL-21 receptor is highly expressed and induces proinflammatory cytokine secretion in patients with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(1): 102-105

摘要

目的: 探讨IL-21对UC患者外周血和肠黏膜固有层组织内淋巴细胞的免疫病理调节。

方法: 收集28例UC患者和22例健康成人外周血标本和肠黏膜活检标本, 分离外周血单个核淋巴细胞(PBMC)和肠黏膜固有层单个核淋巴细胞(LPMC), 利用流式细胞仪检测IL-21R在CD4⁺、CD8⁺ T细胞、B细胞和NK细胞表面表达。培养PBMC和LPMC, 使用IL-21和抗CD3单抗体外刺激, 48 h后收集上清液, 使用ELISA检测促炎症细胞因子(TNF-α、IFN-γ、IL-2)分泌, 分析IL-21在疾病发展过

■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

程中的免疫病理作用.

结果: UC患者外周血和肠黏膜固有层组织内CD4⁺、CD8⁺ T细胞、CD20⁺ B细胞和CD56⁺ NK细胞表达IL-21R水平比健康者显著升高(PBMC: 8.42 ± 2.14 vs 3.46 ± 0.54 , 10.35 ± 2.17 vs 5.28 ± 2.2 , 7.27 ± 1.15 vs 2.35 ± 0.41 , 12.55 ± 3.12 vs 5.45 ± 1.06 ; LPMC: 22.44 ± 3.46 vs 6.26 ± 1.15 , 24.48 ± 4.57 vs 6.87 ± 1.02 , 16.24 ± 3.10 vs 5.56 ± 1.44 , 23.54 ± 4.12 vs 8.45 ± 1.68 , 均 $P < 0.05$). 体外培养PBMC或LPMC, 使用IL-21刺激, 发现IL-21可显著诱导UC患者的PBMC和LPMC激活, 并分泌高水平的TNF- α 和IFN- γ (346 ± 72 vs 120 ± 27 , 3048 ± 426 vs 1182 ± 242 ; 625 ± 113 vs 154 ± 35 , 3827 ± 418 vs 1520 ± 304 , 均 $P < 0.05$).

结论: IL-21R参与肠黏膜炎症损伤, 阻断IL-21生物学效应可能治疗UC的发生.

关键词: 溃疡性结肠炎; 外周血单个核淋巴细胞; 肠黏膜固有层单个核淋巴细胞; 白介素-21; 受体

夏兴洲, 刘占举. IL-21受体在溃疡性结肠炎中的表达及对促炎症细胞因子分泌的诱导作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(1): 102-105
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/102.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是发生在肠道黏膜慢性非特异性炎症性疾病, 其发病机制仍然不清楚. 近年来研究发现, UC的发生与肠黏膜组织内免疫系统对肠腔内细菌微生物抗原应答异常、肠黏膜上皮屏障损伤、患者的基因遗传因素等有关^[1-7]. 大量研究发现在UC患者炎症肠黏膜组织内有大量激活的淋巴细胞浸润, 并分泌高水平的促炎症细胞因子(如TNF- α 、IL-1、IL-8、IL-15等), 这些促炎症细胞因子在肠黏膜炎症损伤过程中起着重要作用. IL-21是由CD4⁺ T细胞分泌的细胞因子, 其受体(IL-21R)主要表达在T、NK、B细胞和树突状细胞上^[8-9]. 本研究主要检测IL-21R在UC患者外周血单个核淋巴细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)和肠黏膜固有层单个核淋巴细胞(lamina propria mononuclear cells, LPMC)表达, 并探讨IL-21对UC患者外周血和肠黏膜固有层组织内淋巴细胞的免疫病理调节.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2006-06/2008-06郑州大学第二附

属医院消化内科门诊或/和住院的活动性UC患者26例, 男15例, 女11例, 年龄31-64(平均为39.2)岁. 其中15例接受了柳氮磺吡啶、甲硝唑和/或泼尼松治疗, 所有患者均未接受任何免疫抑制剂治疗, 未合并其他自身免疫性疾病(如风湿性疾病、系统性红斑狼疮、银屑病)和HIV感染. UC患者的临床诊断根据临床症状、体征、结肠镜检查结果和组织病理学检查等, 诊断符合中华医学会消化病学分会炎症性肠病学科组制定的诊断指南^[10]. 另外, 选择22例健康者作对照研究, 男12例, 女10例, 年龄24-45(平均为34.5)岁. 所有研究对象均征求同意后进行研究, 并取得医院科研部分的同意后进行. 淋巴细胞分离液购于上海试剂二厂; 小鼠抗人IL-21R单抗购于美国R&D公司; 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的小鼠抗人CD4、CD8、CD20、CD56单抗、藻红蛋白(PE)标记的羊抗小鼠单抗均购于美国BD PharMingen公司; RPMI 1640培养液、胎牛血清、链霉素、青霉素、谷氨酰胺和庆大霉素均购于美国GIBCO公司(Grand Island, NY, USA). EDTA.Na₂、二硫苏糖醇、分离肠黏膜固有层淋巴细胞分离液(Percoll)购于美国Sigma公司. 其他普通化学试剂均为国产分析级.

1.2 方法

1.2.1 PBMC和LPMC分离过程: 采集所有对象EDTA-Na₂抗凝外周静脉血5-10 mL, 使用淋巴细胞分离液分离PBMC, 使用生理盐水稀释细胞成 1×10^9 /L浓度待用. 在接受电子结肠镜检查时, 于病变部位取7-8块活检标本, 其中3块使用100 g/L中性甲醛固定, 常规石蜡包埋、切片、HE染色, 行常规病理组织学检查; 5块立即放置于4℃含有庆大霉素的RPMI 1640培养液中, 送到实验室进行细胞分离和培养. 待活检组织转送到实验室后, 用含有庆大霉素的RPMI 1640培养液清洗, 去除表面黏膜和血液, 用于分离LPMC, 方法参见文献^[11-12].

1.2.2 流式细胞仪分析IL-21R水平表达: 将PBMC和LPMC用生理盐水洗涤2次, 然后使用FITC标记的CD4或CD8或CD20或CD56单抗染色, 于4℃避光作用20 min, 用生理盐水洗涤2次去除未结合的抗体; 然后使用抗人IL-21R抗体染色上述细胞, 于4℃避光作用30-60 min, 用生理盐水洗涤2次去除未结合的抗体, 再使用PE标记的羊抗小鼠二抗染色, 使用30 g/L多聚甲醛溶液0.5 mL固定上述细胞, 最后使用流式细胞仪(美国BD公司FACScan)检测CD4⁺、CD8⁺ T细

■创新盘点

本文使用流式细胞仪详细分析UC患者外周血和肠黏膜组织内淋巴细胞IL-21R表达水平, 体外细胞培养发现IL-21可诱导UC患者淋巴细胞分泌促炎症细胞因子.

■ 相关报道

IL-21R在类风湿关节炎患者关节滑液中T细胞表达增高,并诱导TNF和IL-1分泌.已报道IL-21在UC患者炎症肠黏膜组织表达增高,并诱导肠黏膜组织内成纤维母细胞分泌基质金属蛋白酶.

表 1 IL-21R在PBMC中表达水平 (mean ± SD, %)

分组	n	CD4 ⁺ T细胞	CD8 ⁺ T细胞	CD20 ⁺ B细胞	CD56 ⁺ NK细胞
UC患者	26	8.42 ± 2.14 ^a	10.35 ± 2.17 ^a	7.27 ± 1.15 ^a	12.55 ± 3.12 ^a
健康者	22	3.46 ± 0.54	5.28 ± 2.2	2.35 ± 0.41	5.45 ± 1.06

^aP<0.05 vs 健康者.

表 2 IL-21R在LPMC中表达水平 (mean ± SD, %)

分组	n	CD4 ⁺ T细胞	CD8 ⁺ T细胞	CD20 ⁺ B细胞	CD56 ⁺ NK细胞
UC患者	20	22.44 ± 3.46 ^a	24.48 ± 4.57 ^a	16.24 ± 3.10 ^a	23.54 ± 4.12 ^a
健康者	16	6.26 ± 1.15	6.87 ± 1.02	5.56 ± 1.44	8.45 ± 1.68

^aP<0.05 vs 健康者.

表 3 IL-21 诱导PBMC和LPMC细胞因子分泌 (mean ± SD, ng/L)

	n	IFN- γ	TNF- α	IL-2	IL-4
UPBMC					
健康者	26	1182 ± 242	120 ± 27	585 ± 112	86 ± 21
UC患者	22	3048 ± 426 ^a	346 ± 72 ^a	613 ± 138	92 ± 32
LPMC					
健康者	20	1520 ± 304	54 ± 35	776 ± 154	112 ± 26
UC患者	16	3827 ± 418 ^a	625 ± 113 ^a	821 ± 181	134 ± 33

^aP<0.05 vs 健康者.

胞、CD20⁺B细胞、CD56⁺NK细胞表达IL-21R水平.利用CellQuest软件分析样本中IL-21R阳性细胞表达水平^[13].

1.2.3 IL-21诱导细胞因子水平测定:首先将24孔培养板用小鼠抗人CD3单克隆抗体(克隆UCHT1、工作浓度5 mg/L)包被过夜.将PBMC或LPMC(1×10^6 /L)放于剩有1 mL RPMI 1640培养液的24孔培养板中培养,并加用IL-21(50 μ g/L)体外刺激.细胞培养液的配制和培养条件见文献^[11-13].经培养48 h,收集上清液,采用ELISA方法检测TNF- α 、IFN- γ 、IL-2和IL-4水平,具体参照我们近期报道文献^[11-13].

统计学处理 数据以mean ± SD表示,采用t检验进行数据分析,检验水准 $\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 PBMC表达IL-21R水平 UC患者外周血中CD4⁺、CD8⁺T细胞、CD20⁺B细胞、CD56⁺NK细胞IL-21R阳性表达率比健康者明显升高(P<0.05,表1).

2.2 LPMC表达IL-21R水平 UC患者LPMC中IL-21R阳性的CD4⁺T、CD8⁺T、CD20⁺B和CD56⁺NK细胞比健康对照显著增多(P<0.05,表2).

2.3 IL-21诱导UC患者PBMC和LPMC分泌促炎症细胞因子 IL-21可诱导UC患者PBMC和LPMC分泌高水平的TNF- α 和IFN- γ ,而IL-2和IL-4水平UC和健康对照组之间无统计学意义(P>0.05,表3).

3 讨论

文献报道显示,在UC患者的外周血和肠壁黏膜组织中,存在有大量激活的炎症细胞浸润,如CD4⁺T细胞、B细胞、巨噬细胞和树突状细胞,并产生大量的辅助T细胞(Th)2样促炎症细胞因子(如IL-4、IL-5、IL-13)^[1-7].IL-21来源于激活的CD4⁺T细胞,其受体(IL-21R)主要表达在CD4⁺、CD8⁺T细胞、B细胞和NK细胞等表面^[8-9].近年来国内外学者已经进行了IL-21对各种淋巴细胞的免疫调节以及在自身免疫性疾病(如类风湿关节炎、多发硬化)的研究,已证实IL-21参与了这些自身免疫性疾病的发展过程^[8-9].我们前

期工作证实^[13], 在类风湿性关节炎患者的关节滑膜组织内IL-21R表达显著升高, 体外培养发现IL-21可以显著地诱导上述患者外周血和关节滑液内T细胞激活, 并产生大量的促炎症细胞因子, 如TNF- α 和IFN- γ , 提示IL-21参与了关节滑膜组织慢性炎症发生。

已有研究报道^[14], 在炎症性肠病患者, 尤其是克罗恩病患者的炎症肠黏膜组织内IL-21 mRNA水平增高, IL-21可以诱导肠黏膜组织内单个核淋巴细胞增殖, 分泌高水平的促炎症介质(如TNF- α 、IFN- γ)等。同时文献报道证实, IL-21可以诱导炎症性肠病患者肠黏膜组织内成纤维母细胞表达高水平的基质金属蛋白酶(如MMP-1, -2, -3, -9), 参与肠黏膜组织的炎症损伤^[15]。本研究发现UC患者外周血和肠黏膜组织内的CD4⁺、CD8⁺T细胞、B细胞和NK细胞IL-21R表达显著升高, 其可能的机制是在活动性UC病变时, 上述淋巴细胞可能受到肠道内细菌抗原等的刺激, 诱导上述淋巴细胞激活。另外, 体外实验发现, IL-21可以诱导UC患者外周血和肠黏膜组织内淋巴细胞激活, 分泌高水平的促炎症细胞因子, 进一步放大肠黏膜局部炎症反应。近来, 文献报道提示在小鼠关节炎动物模型中使用IL-21R融合蛋白阻断IL-21R信号传递, 可以显著地阻断小鼠关节炎的发生^[16]。而本研究结果提示在UC患者外周血和肠黏膜组织内淋巴细胞IL-21R表达增高, 并能诱导淋巴细胞分泌促炎症介质。因此, 本结果为将来在临床上实施靶向性阻断IL-21R信号治疗UC奠定了重要的理论基础。

4 参考文献

- 1 刘占举, 王丽萍. 肠黏膜先天性免疫应答与炎症损伤. 胃肠病学 2007; 12: 120-123
- 2 Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2007; 117: 514-521
- 3 申民强, 刘占举. 炎症性肠病患者NK细胞激活和效应应答. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3173-3177
- 4 任宏宇, 邹开芳. 炎症性肠病肠黏膜组织内淋巴细胞激活和效应应答. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3178-3180
- 5 刘丽娜, 梁丽娜. 炎症性肠病与肠黏膜免疫调节细胞. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3181-3186
- 6 白爱平. 炎症性肠病肠黏膜屏障损伤机制. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3187-3191
- 7 吴小平, 欧阳春晖. 防御素与炎症性肠病. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3204-3207
- 8 Leonard WJ, Spolski R. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 688-698
- 9 Spolski R, Leonard WJ. Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 57-79
- 10 中华医学消化病学分会炎症性肠病协作组. 中国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见. 中华内科杂志 2008; 47: 73-79
- 11 刘占举, 酒金霞. CD40辅助信号诱导对炎症性肠病患者淋巴细胞细胞因子分泌的影响. 郑州大学学报(医学版) 2006; 50: 823-825
- 12 Liu Z, Jiu J, Liu S, Fa X, Li F, Du Y. Blockage of tumor necrosis factor prevents intestinal mucosal inflammation through down-regulation of interleukin-23 secretion. *J Autoimmun* 2007; 29: 187-194
- 13 Li J, Shen W, Kong K, Liu Z. Interleukin-21 induces T-cell activation and proinflammatory cytokine secretion in rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 2006; 64: 515-522
- 14 Monteleone G, Monteleone I, Fina D, Vavassori P, Del Vecchio Blanco G, Caruso R, Tersigni R, Alessandroni L, Biancone L, Naccari GC, MacDonald TT, Pallone F. Interleukin-21 enhances T-helper cell type I signaling and interferon-gamma production in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2005; 128: 687-694
- 15 Monteleone G, Caruso R, Fina D, Peluso I, Gioia V, Stolfi C, Fantini MC, Caprioli F, Tersigni R, Alessandroni L, MacDonald TT, Pallone F. Control of matrix metalloproteinase production in human intestinal fibroblasts by interleukin 21. *Gut* 2006; 55: 1774-1780
- 16 Young DA, Hegen M, Ma HL, Whitters MJ, Albert LM, Lowe L, Senices M, Wu PW, Sibley B, Leathurby Y, Brown TP, Nickerson-Nutter C, Keith JC Jr, Collins M. Blockade of the interleukin-21/interleukin-21 receptor pathway ameliorates disease in animal models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 1152-1163

■同行评价
本文科学性较强, 结果可信, 有一定理论意义和潜在的应用价值。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

中国科技期刊引证报告(核心版)发布 WJG 2007年影响因子 0.745

本刊讯 2007年World Journal of Gastroenterology(WJG)的总被引频次为4431, 位居全部1723种中国科技论文统计源期刊的第14位, 内科医学类28中期刊的第1位。2007年WJG的影响因子为0.745, 内科医学类28中期刊的第10位。即年指标0.163, 他引率0.85, 引用刊数482种, 扩散因子10.88, 学科影响指标0.73。(编辑: 程剑侠 2009-01-08)

原发性胆汁性肝硬化并结节病1例

雷静静, 周力, 陈佳

■背景资料

72.4% PBC的患者可出现肝外系统表现, 包括干燥综合征、自身免疫性甲状腺炎、间质性肾炎、系统性硬化症等自身免疫性疾病, 但罕有淋巴结肿大的表现。

雷静静, 周力, 贵阳医学院附属医院消化内科 贵州省贵阳市 550004

陈佳, 贵阳医学院附属医院病理科 贵州省贵阳市 550004

作者贡献分布: 课题设计由雷静静完成; 研究过程由雷静静、周力及陈佳操作完成; 病理图片及说明由陈佳提供; 论文写作由雷静静完成, 周力负责审校。

通讯作者: 雷静静, 550004, 贵州省贵阳市, 贵阳医学院附属医院消化内科。1330858@163.com

电话: 0851-6774245

收稿日期: 2008-10-09 修回日期: 2008-11-01

接受日期: 2008-11-10 在线出版日期: 2009-01-08

Primary biliary cirrhosis complicated with sarcoidosis: one-case analysis

Jing-Jing Lei, Li Zhou, Jia Chen

Jing-Jing Lei, Li Zhou, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Jia Chen, Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Correspondence to: Jing-Jing Lei, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical college, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. 1330858@163.com

Received: 2008-10-09 Revised: 2008-11-01

Accepted: 2008-11-10 Published online: 2009-01-08

Abstract

Co-existence of primary biliary cirrhosis and sarcoidosis is rare in clinical practice. This paper reports a middle-aged female, who was admitted to hospital due to yellow skin and sclera for over 1 year and gradual aggravation for half a year. After treatment, M2 antibody, a highly specific marker for primary biliary cirrhosis, was detected. Furthermore, lymph node sarcoidosis was diagnosed by lymph node histology.

Key Words: Primary biliary cirrhosis; Sarcoidosis; Woman; Histological biopsy

Lei JJ, Zhou L, Chen J. Primary biliary cirrhosis complicated with sarcoidosis: one-case analysis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(1): 106-108

摘要

原发性胆汁性肝硬化并结节病在临床相当罕

见。本文报道1例中年女性患者, 因皮肤巩膜黄染1年余, 进行性加重6 mo入院。入院后给予保肝退黄降酶等治疗, 经查体、血尿便常规以及免疫全套等检查, 确诊为原发性胆汁性肝硬化, 并且经淋巴结活检诊断为淋巴结病。

关键词: 原发性胆汁性肝硬化; 结节病; 女性; 组织活检

雷静静, 周力, 陈佳. 原发性胆汁性肝硬化并结节病1例. *世界华人消化杂志* 2009; 17(1): 106-108

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/106.asp>

0 引言

结节病(sarcoidosis)可引起肝的肉芽肿样变, 偶尔会出现胆汁淤积的表现, 类似于原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC), 两者都可以引起全身多系统表现, 既有相同点, 又有不同点, 国外曾有两病并发的报道^[1], 但国内未见报道。我们发现1例患者, 其血清学和组织学表现, 支持其为原发性胆汁性肝硬化和结节病的重叠, 报道如下。

1 病例报告

患者, 女, 58岁, 因“皮肤巩膜黄染1年余, 进行性加重6 mo”入院。1年前不明原因出现皮肤巩膜黄染, 尿黄如浓茶色, 无其他不适, 曾就诊我院门诊查肝功能示转氨酶、胆红素升高。B超示“胆囊结石、息肉, 肝左叶血管瘤”, 间断服用“消炎利胆片”治疗, 无效。6 mo前皮肤巩膜黄染逐渐加深, 伴乏力、纳差、厌油, 无发热、恶心、呕吐、黑便、牙龈出血、少尿、腹胀、腹痛、意识障碍, 病后体质量减轻10 kg, 近3年每于冬季出现皮肤瘙痒。既往史: 20年前患“双下肢静脉曲张”, 3年前于“44医院”手术治疗, 期间发现“胆囊息肉”, 余个人史无特殊。查体: 生命征平稳, 慢性肝病面容, 全身皮肤巩膜重度黄染, 未见肝掌, 蜘蛛痣。右锁骨上触及2 cm×2 cm肿大淋巴结1枚, 右腋下、双侧腹股沟区各触及黄豆-花生大小淋巴结4-5枚, 质硬, 活动、

■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; 丁惠国, 主任医师, 首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科

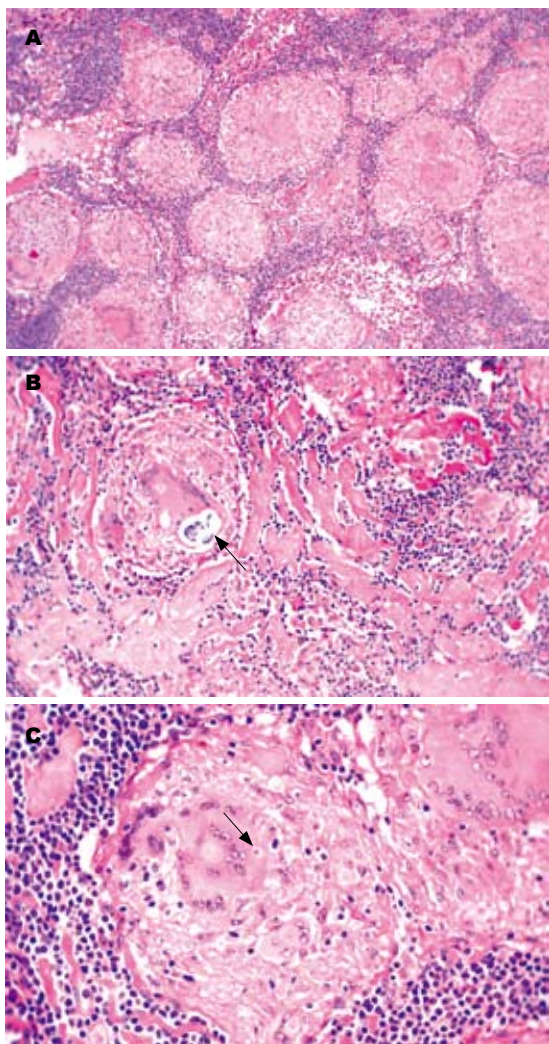


图1 淋巴结组织活检HE染色. A: 类上皮细胞构成肉芽肿, 无干酪样坏死($\times 100$); B: 肉芽肿可见嗜碱性, 层状的Schaumann小体(箭头所示, $\times 200$); C: 多核巨细胞内见嗜酸性星状小体(箭头所示, $\times 400$).

无触痛. 双肺无特殊, 心前区闻及2/6-3/6级收缩期杂音. 腹平软, 无压痛反跳痛, 肝于剑下6 cm触及, 质硬, 表面光滑, 无触痛, 肋下未及, 脾于肋下3 cm触及, 质硬, 表面光滑, 无触痛. 肝上界位于右锁骨中线第5肋间, 肝肾区无叩痛, 移动性浊音阴性, 双下肢不肿. 辅查: (1)血常规: WBC: $2.19 \times 10^9/L$, HGB: 115 g/L, PLT: $93 \times 10^9/L$. (2)尿常规: 尿胆红素: 强阳性, 尿胆原33 $\mu\text{mol/L}$. (3)大便常规: 正常. (4)肝功能: ALT: 170.1 U/L, AST: 346.07 U/L, TB: 319.43 $\mu\text{mol/L}$, DB: 244.43 $\mu\text{mol/L}$, GLB: 36.08 g/L, GGT: 309.09 U/L, ALP: 469.28 U/L, CHE: 3271.91 U/L. (5)肾功正常. 入院诊断: 1、肝功能损害原因? (1)病毒性肝炎? (2)自身免疫性肝病? 2、淋巴结肿大原因? 淋巴瘤待排; 3、结石性胆囊炎.

入院给予“凯时, 肝宁, 甘利欣, 熊去氧胆

酸”等保肝退黄降酶治疗, 进一步查乙肝两对半: 抗-HBc阳性, 余阴性; HBV DNA阴性. 免疫全套: RF阴性, 抗中性粒细胞胞质抗体(ANCA)阴性, ENA多肽抗体谱阴性, 抗核糖体抗体阴性, 抗平滑肌抗体(SMA)阴性, 抗dsDNA抗体阴性, 抗核抗体(ANA)1:100阳性, 抗线粒体抗体(AMA)及AMA-M2阳性. IgG: 30214 mg/L(正常值: 12870 ± 1350 mg/L), IgM: 1746 mg/L(正常值: 1080 ± 240 mg/L), IgA: 1012 mg/L(正常值: 2350 ± 340 mg/L), AFP阴性, 凝血功能正常. Coombs试验阴性, 抗结核抗体阴性, PPD试验阳性. 胸片和胸部CT均未见异常. 腹部增强CT提示: 肝右前叶门静脉期与延迟期见直径14 mm \times 14 mm类圆形影未强化区, 余肝染色未见异常, 肝内胆管未见扩张, 胆囊壁增厚, 强化均匀, 其内见高密度结石影, 胰腺、脾脏染色正常, 脾脏增大, 双侧肾脏增强后也未见异常, 肾盂、输尿管未见扩张积水征象, 肝门区肠系膜根部、心包周围及腹膜后见多发淋巴结肿大, 部分融合, 未见明显强化. 诊断: (1)符合恶性淋巴瘤表现, 肝右叶多发低密度影, 考虑肝浸润. (2)结石性胆囊炎. (3)脾大. 第一次淋巴结活检报告淋巴结肉芽肿性炎, 未见确切干酪样坏死, 全院会诊后行第二次淋巴结活检, 确诊为淋巴结结节病(图1). 最后诊断: 原发性胆汁性肝硬化并淋巴结结节病, 因患者拒绝使用强的松, 继用原方案治疗. 20 d后复查肝功能回示: ALT: 54.14 U/L, AST: 74.40 U/L, TB: 299.64 $\mu\text{mol/L}$, DB: 229.39 $\mu\text{mol/L}$, CHE: 3148.35 U/L, GGT: 259.14 U/L, ALP: 390.24 U/L, 全身深浅淋巴结无变化, 自请出院.

2 讨论

据目前诊断PBC标准^[2]: (1)中年以上女性, 有皮肤瘙痒、黄疸、肝脾肿大. (2)有显著胆汁淤积性黄疸的生化表现: STB、DB明显增高, 以DB升高为主, GGT、ALP明显升高. (3)IgM明显增高, AMA及AMA-M2阳性. (4)CT和MRI未见肝内外胆管扩张, 可排除肝外梗阻性黄疸. (5)肝炎标志物及免疫相关检查不支持病毒性肝病和自身免疫性肝病, 也无药物性肝病和酒精性肝病的诊断依据, 临床诊断PBC成立.

PBC属于自身免疫性疾病, 除肝内表现外, 72.4%的患者可出现肝外系统表现, 但罕有全身淋巴结肿大^[3], 本患者入院体检发现淋巴结肿大, 其原因曾被考虑为PBC的系统表现、结核、淋巴瘤、转移性肝癌等, 最终病理学检查诊断为淋巴结结节病.

■ 研发前沿

PBC和结节病的发病均有遗传背景, 也均涉及到免疫反应, 关于两病是同一患者伴发的两个病, 还是一个病是另一个的并发症, 有待于进一步的观察和研究.

■ 创新盘点

PBC和结节病均可应用激素和免疫抑制剂治疗, 且都可获得一定疗效, 尽管两种疾病的临床表现和病理学特征有重叠, 但不尽一致, 本文报道一例, 以期对进一步研究两个疾病有无内在联系, 起到抛砖引玉的作用.

■同行评价

PBC合并结节病临床十分少见, 本病例资料完整、可靠, 诊断明确, 对临床医生认识该病有一定帮助。

结节病是一种多系统器官受累的肉芽肿性疾病, 其病理特点是非干酪样坏死性类上皮肉芽肿。其临床表现与PBC既有相似点, 又有不同点: 两者均有肝脏的肉芽肿样变和细胞介导免疫反应的抑制, 但AMA阳性提示PBC^[4], Kveim-Siltzbach试验阳性提示结节病, 肺部淋巴结肿大和呼吸系统表现多支持结节病, PBC免疫球蛋白IgM增高, 而结节病IgG增高。最后, PBC女性占明显优势, 而结节病无明显性别差异, 血清血管紧张素转换酶水平的增高也有助结节病与原发性胆汁性肝硬化的鉴别^[5]。

3 参考文献

- 1 Maddrey WC. Sarcoidosis and primary biliary cirrhosis. Associated disorders? *N Engl J Med* 1983; 308: 588-590
- 2 姚光弼. 原发性胆汁性肝硬化的诊断. *中华肝脏病杂志* 2002; 10: 378-379
- 3 Burnevich EZ, Lopatkina TN. [System manifestations of primary biliary cirrhosis] *Klin Med (Mosk)* 2006; 84: 42-46
- 4 Munoz LE, Thomas HC, Scheuer PJ, Doniach D, Sherlock S. Is mitochondrial antibody diagnostic of primary biliary cirrhosis? *Gut* 1981; 22: 136-140
- 5 Studdy P, Bird R, James DG. Serum angiotensin-converting enzyme (SACE) in sarcoidosis and other granulomatous disorders. *Lancet* 1978; 2: 1331-1334

编辑 史景红 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志名词术语标准

本刊讯 本刊名词术语一律标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD₅₀, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等。为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上。中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤)。通常应小写。(常务副总编辑: 张海宁 2009-01-08)

《世界华人消化杂志》投稿须知

1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志(ISSN 1009-3079, CN 14-1260/R)》是一本全国性开放获取(open access, OA)同行评议多学科的服务于核心胃肠病学和肝病专家学术类旬刊。OA最大的优点是面向全国本领域专家及公众开放无需注册, 免费获取PDF等格式的全文, 切实破除了传统性期刊阻碍科学研究成果快速传播的障碍。OA是一项真正意义上的公益性科学传播工具, 实现了读者、作者和社会三个价值最大化的目标, 努力推进本学科的繁荣和发展。

读者价值最大化应该有两层含义, 一是指期刊为读者提供高质量的各种评论性和原创性文章的内容, 读者无需花钱买内容、买信息, 可直接、随时阅读或下载使用, 这样就无形之中扩大了读者队伍; 二是读者最大限度地从期刊上获得了本领域的前沿进展等各类和自己研究相关的信息后, 满足了自己了解的欲望, 必然不会无所作为, 他们会将信息再利用, 或在此基础上, 提出新的观点; 或提出不同的看法, 形成百家争鸣之态。以上两层含意相结合, 大批的读者以“无障碍”方式接触到最新科研成果, 通过发挥他们的能动性, 最大程度上实现了其价值的最大化。作者价值最大化是指期刊为作者提供了OA的平台, 对于作者来说, 自己的论文能够得到最大程度的传播和使用, 这就是作者追求的目标和最渴望得到的结果。社会价值最大化是指期刊发表高质量的原发性文章, 引领本领域所产生的社会作用。

《世界华人消化杂志》每期160页, 定价24元, 全年864元, 邮发代号82-262, 由《世界华人消化杂志》编辑部出版。《世界华人消化杂志》主要报道胃肠病学、肝胆病学、胰腺病学、内镜介入与消化外科等多学科的评论及基础研究和临床实践等各类文章, 具体内容涉及: 食管疾病, 如反流性食管炎、Barrett's食管、食管静脉曲张和食管癌等; 胃部疾病, 胃食管反流性疾病、胃炎、胃动力障碍、胃出血、胃癌和幽门螺杆菌感染等; 肠道疾病, 如肠道出血、肠穿孔、肠梗阻、肠道炎症(如IBD/CD等)、肠道感染、大肠癌和大肠腺瘤等; 肝胆部疾病如病毒性肝炎、肝硬化、脂肪肝、肝纤维化、肝衰

竭、胆石病、胆汁郁积、梗阻性黄疸、肝癌、胆囊癌、胆管癌和门静脉高压等; 胰腺疾病, 如胰腺炎和胰腺癌等; 全身性疾病涉及消化系统, 如自身免疫性及瘀胆性疾病、腹腔疾病、消化不良和代谢性疾病等; 以及与以上疾病相关的基因及基因组学、微生物及分子生物学、病因学、流行病学、免疫学、临床内外科诊断与治疗(如影像、化疗、移植、营养等); 除以上外, 本刊也报道诊断与筛选、内窥镜检查法、影像及先进技术。

《世界华人消化杂志》被国际检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊和中国知识资源总库收录。2007年度世界华人消化杂志的总被引频次为2353, 位居内科学类44种期刊的第5位; 影响因子为0.568, 位居内科医学类44种期刊的第15位。世界华人消化杂志的即年指标0.082, 他引率0.69, 地区分布数30, 基金论文比0.37, 国际论文比0.00, 学科影响指标0.54。

1.2 栏目 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。

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals). 见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47.

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊, 中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(国家科技部, 2003年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2004年版)收录的学术期刊。
《世界华人消化杂志》编辑部, 100025, 北京市朝阳区, 东四环中路62号楼远洋国际中心D座903室, 电话: 010-59080038, 传真: 010-85381893, Email: wcyj@wjgnet.com; www.wjgnet.com

多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称. 医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文. 公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD₅₀, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qiqong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标. 静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min) ÷ E%(仪器效率) ÷ 60 = Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成tl/2或T, Vmax不能Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基

水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; *Ibid*, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °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.

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为M_r 30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即A_r(A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-、±及-后列出. 如37.6±1.2°C, 45.6±24岁, 56.4±0.5 d. 3.56±0.27 pg/ml应为3.56±0.27 ng/L, 131.6±0.4 mmol/L, t = 28.4±0.2°C. BP用kPa(mmHg), RBC数用×10¹²/L, WBC数用×10⁹/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm×6 cm×4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B₁₂用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把1×10⁻³ g与5×10⁻⁷ g之类改成1 mg与0.5 μg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能

写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1:1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45 × 10⁻⁶; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

2.5 统计学符号 (1)*t*检验用小写*t*; (2)*F*检验用英文大写*F*; (3)卡方检验用希文小写 χ^2 ; (4)样本的相关系数用英文小写*r*; (5)自由度用希文小写 ν ; (6)样本数用英文小写*n*; (7)概率用英文斜体大写*P*. 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 统计学显著性用^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01(*P*>0.05不注). 如同一表中另有一套*P*值, 则^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01; 第三套为^e*P*<0.05, ^f*P*<0.01等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如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!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 男, 1966-02-26生, 河北省定县人, 汉族. 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川, 庞丽娟, 陈玲, 杨兰, 张金芳, 齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲, 杨兰, 张金芳, 蒋金芳, 杨磊, 李锋及曹秀

World Journal of Gastroenterology
自2005-01-01起
为周刊发行, 每月
7、14、21、28日
出版. 北京报刊发
行局发行, 邮发代
号: 82-261.

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起改为旬刊发行, 每月8、18、28日出版. 北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-262.

峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川, 杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川, 庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾病研究所.

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致.

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”.

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致.

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象. 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要

真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 P , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值).

3.11 正文标题层次为 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 正文内序号连排用(1), (2), (3). 以下逐条陈述.

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系.

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可.

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论.

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾.

图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: ...; B: ...; C: ...; D: ...; E: ...; F: ...; G: ... 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 第3套为^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$. P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、- 应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达. 黑白图请附黑白照片, 并考入磁盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴.

致谢后加冒号,排在讨论后及参考文献前,左齐。

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名,则需在“Pang *et al*”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码号。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,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年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。期刊:序号,作者(列出全体作者),文题,刊名,年,卷,起页-止页, PMID和DOI编号;书籍:序号,作者(列出全部),书名,卷次,版次,出版地,出版社,年,起页-止页。参考文献格式如下:

- 1 Jung EM, Clevert DA, Schreyer AG, Schmitt S, Rennert J, Kubale R, Feuerbach S, Jung F. Evaluation of quantitative contrast harmonic imaging to assess malignancy of liver tumors: A prospective controlled two-center study. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 6356-6364 [PMID: 18081224; DOI: 10.3748/wjg.13.6356]
- 2 马连生, 潘伯荣, 马景云. 世界胃肠病学杂志英文版的现状. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 855-863
- 3 Lam SK. Academic investigator's perspectives of medical treatment for peptic ulcer. In: Swabb EA, Azabo S, eds. *Ulcer disease: investigation and basis for therapy*. New York: Marcel Dekker, 1991: 431-450
- 4 尚克中, 陈九如. *胃肠道造影原理与诊断*. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1995: 382-385
- 5 网络版的发表前链接 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。

4 投稿方式

接受在线投稿,不接受其他方式的投稿,如

E-mail、打印稿。在线投稿网址: <http://wcjd.wjgnet.com>。无法在线提交的通过 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14-28 d。所有的来稿均经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1本样刊及10套单行本(稿酬)。

5 修回稿须知

5.1 修回稿信件 来稿包括所有作者签名的作者投稿函。内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表,所有作者均符合作者条件,所有作者均同意该文代表其真实研究成果,保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、职称、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系,修改并最终审核核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信,保证无泄密,如果是几个单位合作的论文,则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版版权转让给本刊编辑部。

5.2 稿件修改 来稿经同行专家审查后,认为内容需要修改、补充或删除时,本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改,而作者必须于15 d内将修改后的稿件及光盘寄回编辑部,同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统;逾期寄回,所造成的问题由作者承担责任。

5.3 版权 本论文发表后作者享有非专有版权,文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流,但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年;卷(期):起-止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动,须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意,其编辑版权属本刊所有。

《世界华人消化杂志》编辑部
北京百世登生物医学科技有限公司
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号楼
远洋国际中心D座903室
电话: 010-5908-0038
传真: 010-8538-1893
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

World Journal of Gastroenterology 创刊于1995-10-01, 原刊名《*China National of New Gastroenterology*》, 1995-06-27 国科发信字(95) 225号 批准国内外公开发行。1998-02-12 经国家科学技术部和国家新闻出版总署批准更名为 *WJG*, 国科发信字(1998)027号。2002-11-14 经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001158号。

致谢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!

曹志成 院士

香港伊丽莎白医院临床肿瘤部、肿瘤科研部

陈国凤 主任医师

中国人民解放军第302医院感染七科

陈卫昌 教授

苏州大学附属第一医院消化内科

程爱国 教授

华北煤炭医学院临床医学系

陈贻胜 教授

福建省立医院消化内科

丁惠国 主任医师

首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科

董蕾 教授

西安交通大学第二附属医院消化内科

杜祥 教授

复旦大学附属肿瘤医院病理科

樊晓明 主任医师

复旦大学附属金山医院消化科

房静远 教授

上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所

傅华群 教授

南昌大学第二附属医院普外科

高润平 教授

吉林大学第一医院肝病科

葛海燕 教授

同济大学附属第十人民医院普通外科

郭晓钟 教授

中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

何超 教授

浙江大学医学院附属邵逸夫医院肛肠外科

黄晓东 副主任医师

武汉市中心医院消化内科

金瑞 教授

首都医科大学附属北京佑安医院消化科

李淑德 主任医师

中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

李媛 教授

广西肿瘤研究所

刘杞 教授

重庆医科大学病毒性肝炎研究所

唐霓 副研究员

重庆医科大学教育部感染性疾病分子生物学重点实验室

唐文富 副教授

四川大学华西医院中西医结合科

唐晓鹏 教授

中南大学肝病研究所, 中南大学湘雅二医院感染科

王凤山 教授

中国医科大学附属第一医院肝胆外科

吴健雄 教授

中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤医院腹部外科

吴泰璜 教授

山东省立医院肝胆外科

熊斌 教授

武汉大学中南医院肿瘤科

杨维良 教授

哈尔滨医科大学附属第二医院普外四科

殷正丰 教授

中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院

周国雄 主任医师

南通大学附属医院消化内科