

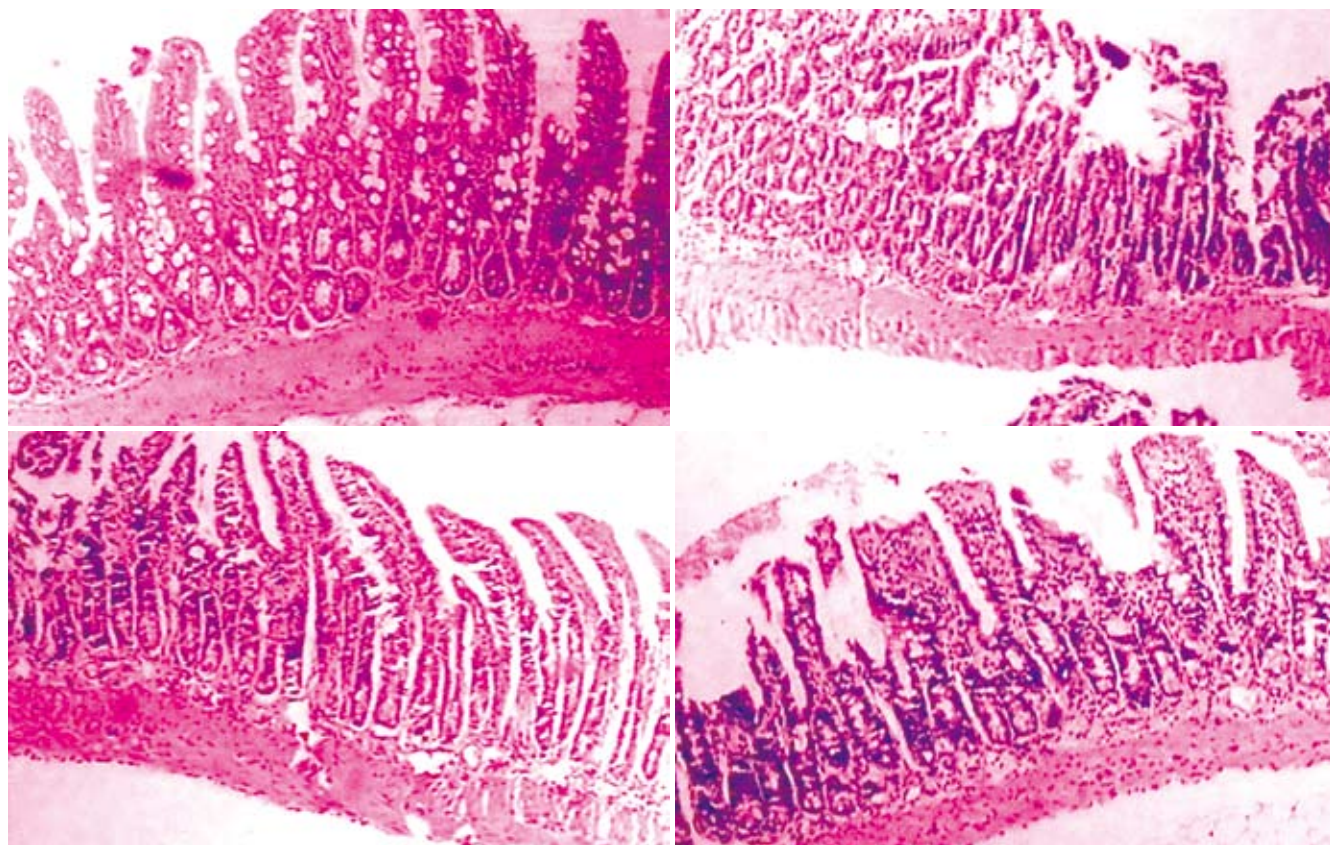
ISSN 1009-3079  
CN 14-1260/R

# 世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2009年6月8日 第17卷 第16期 (Volume 17 Number 16)



16 / 2009

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

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  
田宇彬教授  
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  
魏睦新教授  
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  
阴赧宏研究员  
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6月8日 第17卷 第16期 (总第276期)

述 评	1591 炎症性肠病易感基因研究进展 沈秀云, 施瑞华
基础研究	1602 光敏剂PpIX亚细胞分布方式对食管癌细胞光动力学效应的影响 汲振余, 范天黎, 赵立群, 杨小静, 裘一兵, 张聚真, 张亚冰, 孙子, 裘宋良, 杨观瑞 1609 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸对大鼠肝移植急性排斥反应的影响 刘燕南, 韦军民, 乔江春, 朱明炜 1614 $p21^{WAF1}$ 基因对人胰腺癌细胞系BxPC-3增殖的抑制作用 张学彦, 姜仪增, 刘志强, 景德怀, 关景明, 刘伟 1621 结肠黏膜低度炎症对大鼠内脏感觉的影响 王承党, 郑雪雁, 郑玮玮 1626 基于生物信息学的植物乳酸杆菌表层黏附蛋白的筛选及鉴定 沈通一, 张明, 周玉坤, 陈红旗, 张鹏, 杭晓敏, 秦环龙
临床研究	1632 西安地区幽门螺杆菌 <i>cagA</i> , <i>iceA</i> 基因与其所致疾病的相关性 张翔, 阎志, 曲凯, 徐纪茹, 韩燕, 乔文, 陈艳炯
文献综述	1638 氨假说和细胞因子在肝性脑病发病中的研究进展 汪照函, 刘沛 1643 急性胰腺炎肠道功能障碍的发病机制与治疗 陈玉梅, 冯志杰 1649 IL-23在炎症性肠病中的免疫调节作用 崔轶, 黄志刚, 刘占举
研究快报	1655 5-氮-2-脱氧胞苷联合曲古抑菌素A对人胃癌细胞系MGC-803生物学行为的影响 郑向欣, 王建 1660 HBx上调HepG2细胞DNA修复酶hMTH1表达的意义 郭晓榕, 程斌, 郑要初, 王颖, 王凡, 夏秀梅, 黎培员
临床经验	1665 超声内镜对胃癌外科手术及内镜下黏膜可切除性的评价 贾业贵, 邓长生 1669 胰岛素样生长因子结合蛋白2在非酒精性脂肪肝早期诊断中的价值 童诚, 强晖, 肖明兵, 张艳, 周国雄, 倪润洲 1672 肝纤维化患者血清差异蛋白质的筛选 罗新华, 程明亮, 杨勤, 张权 1676 原发性胆汁性肝硬化AMA-M <sub>2</sub> 阴性患者的临床及病理特点 李祥金, 杨晋辉 1680 Belghiti悬挂法在解剖性半肝切除术中的应用 朱新华, 仇毓东, 吴亚夫, 周建新, 江春平, 丁义涛

	<p>1684 内镜联合早期肠内营养治疗急性重症胆源性胰腺炎31例 周文策, 张辉, 李汛, 李玉民, 张磊, 孟文勃, 朱晓亮</p> <p>1689 肠型白塞氏病临床病理特征分析3例 张淑坤, 王建国, 周世英, 张梦岚, 吴彩虹</p> <p>1693 10日序贯疗法治疗幽门螺杆菌感染39例 胡水清, 张玫</p>
<b>致 谢</b>	1696 致谢世界华人消化杂志编委
<b>消 息</b>	<p>1601 世界华人消化杂志栏目设置</p> <p>1608 第二十一次全国中西医结合消化学术会议征文通知</p> <p>1620 世界华人消化杂志参考文献要求</p> <p>1642 《世界胃肠病学杂志》(英文版)成功通过评审被PMC收录</p> <p>1654 世界华人消化杂志计量单位标准</p> <p>1659 世界华人消化杂志英文摘要要求</p> <p>1664 《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆2008年版《中文核心期刊要目总览》</p> <p>1668 2007年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序</p> <p>1679 世界华人消化杂志标点符号用法</p> <p>1688 2009年广东省中西医结合、中医脾胃消化病学术会议暨国家级继续教育项目消化病进展研讨班征文通知</p> <p>1692 第九届全国消化系恶性病变介入诊疗研讨会暨内镜/介入新技术论坛征文通知</p> <p>1695 世界华人消化杂志投稿方式</p>
<b>封面故事</b>	<p>Liu J, Wan R, Xu XF, Wang XP, Yang WJ, Xia YJ, Liu H, Yan QL, Yan DX, Guo CY. Effect of Lianshu preparation on lipopolysaccharide-induced diarrhea in rats. <i>World J Gastroenterol</i> 2009; 15(16): 2009-2015 <a href="http://www.wjgnet.com/1007-9327/15/2009.asp">http://www.wjgnet.com/1007-9327/15/2009.asp</a></p>
<b>本期责任人</b>	<p>编务 刘晓芳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 何基才; 责任编辑 李军亮; 英文编辑 张海宁, 张晓枚; 审核编辑 张海宁; 形式规范 马连生</p>

# 世界华人消化杂志

## Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名  
陈可冀 题写版权刊名  
(旬刊)

创 刊 1993-01-15  
改 刊 1998-01-25  
出 版 2009-06-08  
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: wcjd@wjgnet.com  
<http://www.wjgnet.com>

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

**印刷** 北京科信印刷厂

**发行** 国内: 北京报刊发行局  
国外: 中国国际图书贸易总公司  
(100044, 北京市399信箱)

**订购** 全国各地邮电局

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

世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录。

世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(<http://wcjd.wjgnet.com>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流。

### 特别声明

本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。

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

June 2009 Contents in Brief Volume 17 Number 16

<b>EDITORIAL</b>	1591 Research progress in susceptible genes of inflammatory bowel disease <i>Shen XY, Shi RH</i>
<b>BASIC RESEARCH</b>	1602 Effects of subcellular localization pattern of PpIX on photodynamic efficiency in esophageal cancer cells <i>Ji ZY, Fan TL, Zhao LQ, Yang XJ, Qiu YB, Zhang JZ, Zhang YB, Sun Y, Qiu SL, Yang GR</i> 1609 Effects of omega-3 fatty acid transfusion on acute rejection in rat liver transplantation <i>Liu YN, Wei JM, Qiao JC, Zhu MW</i> 1614 Inhibitory effect of $p21^{WAF1}$ gene transfection on proliferation of human pancreatic cancer cell line BxPC-3 <i>Zhang XY, Jiang YZ, Liu ZQ, Jing DH, Guan JM, Liu W</i> 1621 Dextran sulfate sodium-induced low grade mucosal inflammation activates visceral hypersensitivity in rats <i>Wang CD, Zheng XY, Zheng WW</i> 1626 Identification and screening of <i>Lactobacillus plantarum</i> surface layer adhesive protein based on bioinformatics <i>Shen TY, Zhang M, Zhou YK, Chen HQ, Zhang P, Hang XM, Qin HL</i>
<b>CLINICAL RESEARCH</b>	1632 Association of <i>cagA</i> and <i>iceA</i> genotypes with <i>Helicobacter pylori</i> related diseases in Xi'an area <i>Zhang X, Yan Z, Qu K, Xu JR, Han Y, Qiao W, Chen YJ</i>
<b>REVIEW</b>	1638 Advance in roles of ammonia and cytokines in hepatic encephalopathy <i>Wang ZH, Liu P</i> 1643 Pathogenesis and treatment of intestinal dysfunction in acute pancreatitis <i>Chen YM, Feng ZJ</i> 1649 Immunoregulatory effects of IL-23 on inflammatory bowel disease <i>Cui Y, Hang ZG, Liu ZJ</i>
<b>RAPID COMMUNICATION</b>	1655 Effects of 5-aza-2-deoxycytidine and trichostatin A on biological behavior in MGC-803 cells <i>Zheng XX, Wang J</i> 1660 Significance of HBx gene up-regulated expression of DNA repair enzyme hMTH1 in the HepG2 cells <i>Guo XR, Cheng B, Zheng YC, Wang Y, Wang F, Xia XM, Li PY</i>
<b>CLINICAL PRACTICE</b>	1665 Evaluation of endoscopic ultrasound in gastric cancer surgery and endoscopic mucosal resectability <i>Jia YG, Deng CS</i> 1669 Value of insulin-like growth factor binding protein 2 in early diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease <i>Tong C, Qiang H, Xiao MB, Zhang Y, Zhou GX, Ni RZ</i> 1672 Screening of differential serum proteins in patients with hepatic fibrosis <i>Luo XH, Cheng ML, Yang Q, Zhang Q</i>

	<p>1676 Clinical and pathological features of primary biliary cirrhotic patients with negative anti-mitochondria antibody M<sub>2</sub> subtype <i>Li XJ, Yang JH</i></p> <p>1680 Belghiti's liver hanging maneuver in anatomic semi-hepatectomy <i>Zhu XH, Qiu YD, Wu YF, Zhou JX, Jiang CP, Ding YT</i></p> <p>1684 Combination of endoscopy and enteric nutrition in treatment of acute severe biliary pancreatitis: an analysis of 31 cases <i>Zhou WC, Zhang H, Li X, Li YM, Zhang L, Meng WB, Zhu XL</i></p> <p>1689 Clinicopathological features of intestinal Behcet's disease: an analysis of 3 cases <i>Zhang SK, Wang JG, Zhou SY, Zhang ML, Wu CH</i></p> <p>1693 A 10-day sequential therapy for <i>Helicobacter pylori</i>-infected patients: an analysis of 39 cases <i>Hu SQ, Zhang M</i></p>
<b>ACKNOWLEDGMENT</b>	1696 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
<b>COVER</b>	<p><i>Liu J, Wan R, Xu XF, Wang XP, Yang WJ, Xia YJ, Liu H, Yan QL, Yan DX, Guo CY.</i> Effect of Lianshu preparation on lipopolysaccharide-induced diarrhea in rats. <i>World J Gastroenterol</i> 2009; 15(16): 2009-2015 <a href="http://www.wjgnet.com/1007-9327/15/2009.asp">http://www.wjgnet.com/1007-9327/15/2009.asp</a></p>
<b>RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE</b>	<p>Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Ji-Cai He</i>  Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i> English Language Editor: <i>Hai-Ning Zhang, Xiao-Mei 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** June 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: [wjcd@wjgnet.com](mailto:wjcd@wjgnet.com)

#### PRINTING

Beijing Kexin Printing House

#### PUBLISHING

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

#### OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

#### HONORARY EDITOR-IN-CHIEF

Bo-Rong Pan

#### EDITOR-IN-CHIEF

Lian-Sheng Ma

#### SCIENCE EDITORS

Director: Hai-Ning Zhang

#### SUBSCRIPTION

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

#### CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

#### COPYRIGHT

© 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](http://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*

# 炎症性肠病易感基因研究进展

沈秀云, 施瑞华

沈秀云, 施瑞华, 南京医科大学第一附属医院消化内科 江苏省南京市 210029

施瑞华, 教授, 主任医师, 主要从事上消化系统肿瘤的基础与临床研究。

作者贡献分布: 本文综述由沈秀云完成, 施瑞华审校。

通讯作者: 施瑞华, 210029, 江苏省南京市, 南京医科大学第一附属医院消化内科。ruihuashi@126.com

电话: 025-83718836-6032

收稿日期: 2009-03-18 修回日期: 2009-04-22

接受日期: 2009-04-27 在线出版日期: 2009-06-08

## Research progress in susceptible genes of inflammatory bowel disease

Xiu-Yun Shen, Rui-Hua Shi

Xiu-Yun Shen, Rui-Hua Shi, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Rui-Hua Shi, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. ruihuashi@126.com

Received: 2009-03-18 Revised: 2009-04-22

Accepted: 2009-04-27 Published online: 2009-06-08

### Abstract

The mechanism of inflammatory bowel disease (IBD) is partially understood, but it is certain that a genetic predisposition, through the inheritance of a number of contributory genetic polymorphisms, contributes to the pathogenesis of IBD. These variant forms of genes may be associated with an abnormal response to normal luminal bacteria. Those genes that have been consistently associated with IBD thus far primarily fall into one of three classes: those affecting bacterial recognition, those affecting immune response, and a third group affecting mucosal transport polarity or mucosal transporter function. This article reviews the IBD related genes mentioned above.

**Key Words:** Inflammatory bowel disease; Ulcerative colitis; Crohn's disease; Susceptibility genes

Shen XY, Shi RH. Research progress in susceptible genes of inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(16): 1591-1601

### 摘要

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的发生与基因多态性所致的遗传易感性相关, 目前研究已发现许多IBD相关基因及易感突变位点. 这些基因可能与机体针对肠腔正常菌群产生异常免疫反应有关, 大致可分为细菌识别相关基因、免疫应答相关基因以及黏膜转运和极性相关基因3类. 本文将就这些基因与IBD遗传易感性关系的研究进展作一介绍.

**关键词:** 炎症性肠病; 溃疡性结肠炎; 克罗恩病; 易感基因

沈秀云, 施瑞华. 炎症性肠病易感基因研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(16): 1591-1601

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1591.asp>

### 0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是胃肠道慢性非特异性炎症性疾病, 主要包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD). 过去欧洲和北美人群中IBD发病率较高, 亚洲人群发病率较低, 然而近20年来IBD在亚洲人群中的发病呈现明显增高趋势. IBD的病因和发病机制尚未完全明确, 目前认为IBD的发病是由环境、遗传、感染和免疫等多种因素相互作用所致. 同卵双生子高共患病率, IBD的家族聚集现象和IBD发病的种族差异性提示遗传因素在其发病中的重要作用. 近年来研究表明肠黏膜屏障功能异常与IBD发病关系密切<sup>[1]</sup>. 肠腔表面积很大, 由上皮细胞紧密连接而成, 长期暴露于各种食物成分、共生菌及病原菌. 肠道上皮有重要的屏障功能, 在多数情况下, 上皮细胞对各种损伤稳定应答, 炎症处于限制状态. IBD发生时, 肠黏膜屏障功能障碍, 黏膜通透性增高, 导致肠腔内细菌、抗原等物质移位至黏膜固有层而激活免疫细胞, 诱导黏膜过度免疫反应的发生, 继而进一步破坏肠黏膜屏障, 加重黏膜异常免疫反应. 自从2001年 Hugot *et al*<sup>[2]</sup>发现CARD15/NOD2与CD发病显著相关以来, 现在已有许多有关基因与IBD相关性

### ■背景资料

过去欧洲和北美人群中IBD发病率较高, 亚洲人群发病率较低, 然而近20年来IBD在亚洲人群中的发病呈现明显增高趋势. IBD的病因和发病机制尚未完全明确, 目前认为IBD的发病是由环境、遗传、感染和免疫等多种因素相互作用所致. 同卵双生子高共患病率, IBD的家族聚集现象和IBD发病的种族差异性提示遗传因素在其发病中的重要作用.

### ■同行评议者

潘秀珍, 教授, 福建省立医院消化内科



## ■ 研发前沿

位于人类6号染色体短臂上的主要组织相容性复合体基因, 因其在免疫应答和免疫调节中的重要作用成为近十几年来遗传学和免疫学的研究热点。

的报道, 其中大约有9个基因位点经相关性研究得到证实。根据其功能大致可分为以下3类: 细菌识别相关基因、免疫应答相关基因以及黏膜转运和极性相关基因。本文将分别予以阐述。

### 1 细菌识别相关基因

1.1 CARD15/NOD2 胱冬酶吸引域家族成员15(caspase-activation recruitment domain 15, CARD15)/核苷酸结合寡聚域2(nucleotide-binding oligomerization domain 2, NOD2)是第一个被发现的CD易感基因, 位于16号染色体着丝粒旁的IBD1位点。他主要在巨噬细胞及小肠腺特有的潘氏细胞中表达, 负责编码NOD2蛋白。其基本功能包括激活Casepase介导细胞凋亡, 诱导NF- $\kappa$ B活化引发炎症反应和作为细菌胞壁成分胞乙酰二聚肽(muramyl dipeptide, MDP)的受体识别细菌, 从而刺激抗菌肽(antimicrobial peptide)如 $\alpha$ -防御素等的分泌以保护宿主免受侵犯。目前该基因上已有3个突变明确为CD发病的独立危险因子<sup>[3]</sup>, 其中2个为单核苷酸改变, 即rs2066844(p. R702W)和rs2066845(p. G908R), 另1个系在11外显子的3020核苷酸处插入1个胞嘧啶(3020insC), 导致1007密码子的第2个核苷酸移码突变, 发生Leu1007Pro氨基酸改换(Leu1007fs), 终止密码子提前, 使其编码的蛋白质丢失最后33个氨基酸导致NF- $\kappa$ B活性的降低, 机体先天性低反应, 从而诱导机体对肠道细菌异常强烈的免疫反应引起CD发生。对爱尔兰<sup>[4]</sup>及欧洲犹太人群<sup>[5]</sup>的研究提示CARD15的另外2个突变rs2066842(p. P268S)及IVS8<sup>+158</sup>(JW1)可能与CD相关, 但是否导致编码的NOD2蛋白功能发生改变及是否与其他基因单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点存在不平衡连锁尚有待进一步研究。虽然前3种突变已被证明与CD相关, 但在不同人种中, 其出现频率及与疾病相关程度不同。德系和西班牙系犹太人CD患者中3种主要突变频率均显著增高, 前者3种突变携带率明显高于后者<sup>[6]</sup>。荷兰人群<sup>[7]</sup>中CD发病与G908R和Leu1007fs有关。瑞典人群<sup>[8]</sup>中CD发病与R702W和G908R突变有关, 而与Leu1007fs无关, 相反在丹麦人群<sup>[9]</sup>中Leu1007fs为主要突变型。捷克人群<sup>[10]</sup>中CD患者1007fs、G908R和P268S 3种突变频率明显高于对照组, 回归分析提示1007fs、G908R、R702W分别与CD密切相关, 而P268S与CD没有独立的关联。对土耳其人群<sup>[11]</sup>的研究未发现上述5种突

变与IBD发病相关。对日本<sup>[12]</sup>及我国香港<sup>[13]</sup>、浙江<sup>[14]</sup>、湖北<sup>[15]</sup>和广东<sup>[16]</sup>等地区人群的研究未发现上述3个西方人常见的CARD15/NOD2基因多态性位点与亚洲人IBD发病相关。最近, 龙靖华 *et al*<sup>[17]</sup>发现我国人群CD患者中存在CARD15/NOD2基因P268S突变, 且与患者的发病年龄、病变部位和并发症相关。目前国外研究多认为CARD15基因型与临床表型相关。Lesage *et al*<sup>[18]</sup>、Ahmad *et al*<sup>[19]</sup>、Vermeire *et al*<sup>[20]</sup>的研究均提示CARD15基因突变与早年发病及回肠受累关系密切。近年来, CARD15与其他易感基因的关系也逐渐受到关注, Linderson *et al*<sup>[21]</sup>研究发现CARD15/NOD2与另一个重要的IBD易感基因TNF- $\alpha$ 的启动子的基因多态性间存在关联, 二者相互作用, 影响TNF- $\alpha$ 的表达。Gazouli *et al*<sup>[22]</sup>认为CARD15/NOD2和TLR4或CD14之间的相互作用可增加IBD尤其是CD的发病危险性。最近Beynon *et al*<sup>[23]</sup>研究发现CARD15的基因型影响外周血单核细胞包括TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-1 $\beta$ 和IL-12 p40等在内的多种MDP相关的细胞因子的表达水平。在今后的研究中弄清CARD15/NOD2与其他因子之间相互作用的机制将是非常重要的。

1.2 ATG16L1 自噬相关16样1(autophagy-related 16-like 1, ATG16L1)基因位于2q37.1, 主要表达于肠上皮细胞和CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD19<sup>+</sup>淋巴细胞, 其编码的ATG16L1蛋白是一种涉及处理细胞内细菌的自噬小体代谢途径的蛋白, 该蛋白在处理胞内细菌感染时发挥重要作用, 如他可抑制巨噬细胞内结核分枝杆菌的生长, 敲除ATG16L1基因会降低HeLa细胞对沙门氏菌的吞噬作用<sup>[24]</sup>。Hampe *et al*通过全基因组扫描及回归分析筛选出与CD相关的ATG16L1基因SNP位点rs2241880(Thr300Ala, p. T300A), 并通过大样本量的实验证实欧洲人此位点的多态性与CD易感性相关, 与UC无关; 且此突变导致CD的发病风险与CARD15显著相关<sup>[25-26]</sup>。目前该位点与CD的关系已在西方人群中得到反复验证<sup>[27-31]</sup>。对日本人群<sup>[32]</sup>及我国人群<sup>[33]</sup>的研究均未发现该多态性位点与CD相关。最近Fowler *et al*<sup>[34]</sup>研究发现此突变与UC的发生负相关。在澳大利亚<sup>[34]</sup>及北欧<sup>[26,35]</sup>人群中的研究显示T300A突变与回肠型CD显著相关。

1.3 HBD-2、HBD-3和HBD-4 近来, 抗菌肽(antimicrobial peptide)作为固有免疫系统的一分子在抵御微生物中的作用越来越受到重视。防御素(defensin)是哺乳动物体内发现的、在

宿主防御中起重要作用的一类广谱抗菌肽. 根据其基因及蛋白水平结构特点分为 $\alpha$ 和 $\beta$ 两型, 后者又分为4个亚型, 即人类 $\beta$ 防御素1, 2, 3和4(human beta defensins B1, B2, B3 and B4, HBD-1, HBD-2, HBD-3和HBD-4), 其中HBD-2是一种低相对分子质量富含半胱氨酸的抗菌肽. 近年研究表明, HBD-2是第一个在防御应答时于转录水平有所上调的防御素, 且在宿主防御特别是在黏膜表面抵御革兰阴性菌和真菌方面具有重要作用. 携带突变型CARD15基因的CD患者回肠Paneth细胞中,  $\alpha$ -防御素水平特异性偏低, 最近, 人们发现在IBD患者结肠中,  $\beta$ -防御素的表达水平也是下调的. 可以推测, 这些抗菌肽的缺失会促进IBD患者的炎症反应. 在IBD患者肠道黏膜上皮中 $\beta$ -防御素的编码基因HBD-2, HBD-3和HBD-4存在着不同水平的表达<sup>[36-37]</sup>. 他们表达水平的差异并非由各自基因的突变所致, 在人类8号染色体的防御素位点上广泛存在着DNA拷贝数的多态性<sup>[38]</sup>, 这可能是 $\beta$ -防御素表达水平不同的发生机制. 最近有研究显示 $\beta$ -防御素位点上HBD-2基因拷贝数减少者更易患结肠型CD, UC患者结肠浆细胞大量聚集且HBD表达水平明显高于正常对照<sup>[39]</sup>, 因此我们可以推测上述基因的低拷贝导致了防御素低水平表达, 减弱了结肠黏膜屏障的抗菌能力, 促进了IBD的发生.

## 2 免疫应答相关基因

2.1 MHC 位于人类6号染色体短臂上的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)基因, 因其在免疫应答和免疫调节中的重要作用成为近十几年来遗传学和免疫学的研究热点. MHC区域目前被认为与多种免疫系统疾病的发生、发展相关. 早期研究提示该区域内的一些基因的变异与IBD发病相关. 一项对于2004年间研究的IBD相关基因的Meta分析<sup>[40]</sup>发现包含了MHC基因的IBD3位点(6p21)与IBD, 尤其是UC关系最为恒定. 在与哺乳动物免疫防御和自身免疫密切相关的基因组中, MHC所含基因最为密集, 这一复合体可分为I、II、III 3个亚群, 具高度多态性. 在MHC基因中, 研究最多的是编码细胞表面抗原呈递蛋白的4种MHC基因, 即MHC-A、B、C和D. MHC-A、B、C属于MHC-I, MHC-D属于MHC-II.

近年一些研究发现靠近MHC-B的非经典I类基因, 如MHC-I类相关基因A(MHC class I

chain-related gene A, MICA)和MHC-I类相关基因B(MHC class I chain-related gene B, MICB), 与IBD存在关联<sup>[41-45]</sup>, 但另一些研究却未能得出类似结论<sup>[46-47]</sup>. Orchard *et al*<sup>[43]</sup>研究发现在英国人中, MIC-A $\times$ 007与UC易感性相关. 对我国人群的研究亦证实MICA-A5.1和MICB-CA18<sup>[45]</sup>与国人UC有相关性. 而Glas *et al*<sup>[30]</sup>在德国人群中所作的研究未发现此关系. 与健康对照相比, 日本UC患者中MICA基因5号外显子微卫星多态性等位基因A6的出现频率较高<sup>[42]</sup>, 但他们随后进行的研究显示这一差异是由于其与MHC-B52连锁不平衡所致<sup>[46]</sup>. 正常情况下, MICA和MICB分子与其表达于NK细胞、T细胞和巨噬细胞上的受体NKG2D结合, 共同激发上述细胞的活性, 当细菌或病毒感染时表达增加. Perera *et al*<sup>[41]</sup>研究发现UC患者肠黏膜上皮细胞MICA/MICB表达缺失. 因此, 两者部分基因的突变, 可能通过与受体结合能力的改变影响免疫系统的活性.

与MHC-I类基因相比, MHC-II类基因与IBD关系更为密切. MHC-II主要包含MHC-DQ、DP、DR, 属于免疫球蛋白超基因家族, 对T细胞免疫应答及B细胞产生抗体均有重要作用. Stokkers *et al*<sup>[48]</sup>就HLA-DR和HLA-DQ与IBD的关系进行了Meta分析, 发现他们与IBD尤其是UC密切相关. 这一关系已在许多不同人群中得到验证<sup>[49-52]</sup>. 另外, Silverberg *et al*<sup>[53]</sup>研究发现MHC-DRB1 $\times$ 0103与CD累及结肠有关. 但MHC-II类基因区DR、DP和DQ 3个与IBD相关的位点, 在MHC-II类基因上紧密连锁, 而非独立存在, 哪个为初级, 哪个为次级相关尚待进一步研究.

同样位于IBD3区的MHC-III编码另外一些免疫因子, 包括补体C3、C4, B因子和其他一些促进细胞因子生成的免疫因子, 如TNF- $\alpha$ . TNF- $\alpha$ 基因启动区域的6个单核苷酸多态性(TNF-1031T/C、-863C/A、-857C/T、-380G/A、-308G/A、-238G/A)与IBD遗传易感性的关系在人群中报道不一. van Heel *et al*<sup>[54]</sup>在457个北欧高加索家族中研究了4种SNPs(-1031T/C、-863C/A、-857C/T、-308G/A)与IBD、UC和CD的关系, 遗传不平衡法分析显示, 在不携带CARD15 3种易感突变的患者中, -857C/T与UC和CD相关, 然而van Heel *et al*<sup>[54]</sup>亦发现此SNP与其他易感基因存在不平衡连锁, 尚不能确定为致病因素. Cucchiara *et al*<sup>[55]</sup>在意大利IBD患者中发现TNF-308G/A与CD及UC均显著相关, 而TNF-

## ■ 相关报道

自从2001年Hugot *et al*发现CARD15/NOD2与CD发病显著相关以来, 现在已有许多有关基因与IBD相关性的报道, 其中大约有9个基因位点经相关性研究得到证实.

### ■应用要点

全基因组扫描方法与传统方法相结合用以探索基因变异与发病风险的关系已使人们对于IBD的发生发展的认识有了很大提高。

857C/T与之无相关性。部分人群,如土耳其<sup>[56]</sup>及印度人群<sup>[57]</sup>中研究提示TNF- $\alpha$ 基因多态性与IBD并无明确关联。宋瑛 *et al*<sup>[58]</sup>及曹倩 *et al*<sup>[59]</sup>对我国人群的研究发现UC患者TNF-308A基因型频率和等位基因频率显著高于健康对照,但同时有研究未能得出相同结果<sup>[60]</sup>。捷克人群<sup>[61]</sup>中的研究提示TNF-308G/A与CD病情活动指数,并发病的出现等临床表现型有关。Levine *et al*<sup>[62]</sup>发现TNF-863A与病变累及回肠呈反相关,与孤立性结肠炎及家族聚集性正相关。

2.2 IL-23R 白介素23受体(interleukin-23 receptor, IL-23R)基因位于1p31区,编码炎症细胞因子IL-23的受体的亚单位。在一项全基因组关联分析(genome wide association, GWA)的研究中, Duerr *et al*<sup>[63]</sup>发现该基因编码区一个不常见的变异(rs11209026, p. Arg381Gln)对IBD易感性有保护作用。最近,世界各研究中心进行的实验中,在欧洲儿童<sup>[64-66]</sup>和成人IBD<sup>[27,29,31,50,67-71]</sup>患者中均验证了IL-23R与IBD,尤其是CD的相关性。

IL-23是一个由亚单位*p19*和白介素12(IL-12)的组成部分*p40*通过二硫键形成的异源二聚体分子,是IL-12细胞因子家族的新成员。IL-23除了与IL-12共用受体亚单位IL-12R $\beta$ 1外,还有一个自身特有的受体亚单位即IL-23R。IL-23对于T-辅助细胞的分化有重要作用,在CD中发挥主导调节作用<sup>[72-73]</sup>。在T细胞缺失小鼠上,IL-23通过固有免疫参与肠道炎症的发生,并与IL-12相互作用。因此, Neurath<sup>[72]</sup>提出IL-23能够激活并维持肠道的固有免疫反应和T细胞介导的免疫反应,致病的T细胞可能因为某一导致IL-23R失活的功能性SNP而未被激活,削弱的IL-23信号传导可能降低固有免疫的效力,从而使炎症反应受到抑制,避免IBD发生。临床上IL-12/IL-23亚单位的抗体的试验也有效地减少了CD的症状<sup>[74]</sup>,进一步说明了IL-23通路在CD发生过程中的重要作用。

2.3 Toll样受体 Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)是近年来发现的重要的免疫受体,他通过识别病原体,能立即启动先天性免疫,并通过信号传导启动获得性免疫。目前已发现至少11个TLR家族成员,他们分布于各个脏器,针对不同的病原体独立或联合发挥其识别作用,调节免疫反应。不同TLR之间胞内区相似而胞外区同源性较差,胞外区结构的差异决定了他们各自有特征性的配体。TLR4主要识别G-菌的胞壁脂多糖(lipopolysaccharide, LPS); TLR9则感应细菌

DNA中的未甲基化CpG。目前LPS激活TLR4的过程部分明确,配体诱导TLR4二聚体形成进而激活至少2条信号通路:通过MyD88-或TRAF6-依赖途径激活NF- $\kappa$ B和/或干扰素调节因子3(interferon regulatory factor 3, IRF3)。

TLR4基因定位于染色体9q区。与其他候选基因不同,全基因组扫描并未有该基因片段与IBD相关的提示。在一项病例对照研究中, Franchimont *et al*<sup>[75]</sup>发现Asp299Gly(869C/T)的多态性与CD和UC存在明显相关。这一结果尚未得到很好的重复<sup>[76-78]</sup>,但许多在高加索人群中<sup>[75,78-83]</sup>中所进行的研究都显示在CD与UC患者中,299Gly的出现频率高于对照组。Browning *et al*<sup>[84]</sup>的研究及Meta分析亦支持TLR4与IBD相关。我国湖北人群<sup>[85]</sup>中的研究未发现此SNP与IBD易感性相关。TLR9基因定位于3p21.3区。与TLR4类似,这一基因也并未在全基因组扫描的研究中有阳性发现。在一个小样本量的研究中发现TLR9基因上的1237C/T和2848A/G 2个SNP与IBD相关。Török *et al*<sup>[86]</sup>人在德国人群中的研究认为1237C/T与CD相关而与UC无关。Hong *et al*<sup>[78]</sup>在新西兰高加索人群中的研究未能得出上述结论,但他们所作的Meta分析支持1237C/T与CD相关。van Hell *et al*<sup>[87]</sup>在英国高加索人群中选取7例携带野生型CARD15的健康对照和19例携带CARD15突变纯合子的CD患者进行研究,发现TLR9对CpGDNA(TLR9配体)的应答取决于CARD15基因的多态性。

### 3 黏膜转运和极性相关基因

3.1 SLC22A4和SLC22A5 IBD5区域(5q31-q33)与成人患CD关系密切,溶质携带物家族22A4和22A5(solute carrier family 22A4/22A5, SLC22A4/22A5)即存在于这一区域。SLC22A4/22A5基因的主要功能是转运肠道中的1-肉毒碱和清除肠道中的阳离子药物。Peltekova *et al*<sup>[88]</sup>对IBD5中的5个基因进行测序,鉴定出10个SNP,其中的2个分别存在于SLC22A4(1672C/T)和SLC22A5(207G/C),二者存在不平衡连锁。但其他研究<sup>[89]</sup>并未有类似发现。已有许多研究<sup>[87,90-92]</sup>证实这两种SNP与白种人CD发病相关,但在日本<sup>[93]</sup>及我国<sup>[94]</sup>人群中的研究未发现上述基因变异。Mirza *et al*<sup>[95]</sup>报道对于至少含一个CARD15易感突变的患者,IBD5基因与CD发病相关,而在没有CARD15易感突变者,IBD5基因的变异没有此效应。

白种人中CD患者的5q31区存在基因的易感突变的证据由来已久. 一些学者<sup>[88-96]</sup>认为这2个SNP就是致病的基因突变, 然而后续的研究<sup>[89]</sup>又认为1672C/T与207G/C与CD发病无关或者5q31区的其他位点的变异也与CD发生有关.

3.2 ABCB1 ATP结合盒转运子B1(ATP-binding cassette subfamily B member 1, ABCB1)位于7q21.1(含49-587 bp不等的28个外显子, cDNA全长4.5 kb, 基因全长210 kb), 又被称为多药耐药基因1(multidrug resistance gene 1, MDR1). 他编码一种ATP依赖的转运蛋白(P-糖蛋白或P-gp). P-gp在包括肠上皮在内的多种组织高表达, 可将进入胞内的药物, 细菌毒素和化学物质等主动泵出细胞, 保护上皮免受有毒物质侵犯. 其表达具有个体差异性, 从而影响个体对药物的耐受能力. 在这一基因片段上已发现了不下300个SNPs, 其中一部分SNP与多种癌症, HIV感染, 高胆固醇血症和帕金森病的易感性相关, 亦有一些SNP与IBD有关<sup>[97]</sup>. 研究发现P-gp表达缺失的mdr1a<sup>-/-</sup>小鼠肠上皮通透性增加<sup>[98]</sup>, 且此类小鼠可作为理想的IBD动物模型. IBD患者肠上皮P-gp表达亦有下降<sup>[99]</sup>. 目前已发现3个SNP位点<sup>[100-102]</sup>即外显子21上的G2677T/A, 26上的C3435T和1B上的T129C与P-gp低水平表达有关. 高加索人G2677T/A与C3435T基因存在连锁不平衡<sup>[97]</sup>.

2项基因连锁扫描和有关Meta分析提示IBD与7q区相关<sup>[40,103]</sup>. Onnie *et al*<sup>[97]</sup>针对二者之间关系进行了Meta分析, 发现了较强的支持ABCB1与UC相关的依据. C3435T的统计学意义最大, G2677A/T次之. Annese *et al*<sup>[104]</sup>所作的Meta分析提示3435T等位基因和3435TT基因型与UC显著相关, 而与CD无关, 亦未发现G2677T/A与IBD相关. Fiedler *et al*<sup>[105]</sup>的研究提示G2677T/A与C3435T的多态性与UC早年发病有关.

3.3 DLG5 人类DLG5(*drosophila discs large homologue 5*)是果蝇dlg基因的同源基因, 定位于10q23, 202 kDa, 广泛表达于肠道、心脏、胎盘等组织. 他属于编码参与胞内信号传导的蛋白的骨架的MAGUK(membrane associated guanylate kinase homologs)家族. 作为该家族的一个典型成员, DLG5有4个PDZ(PSD-95/Discs large/zona occludens)结构域, 1个SH3(Scr homology 3), 1个GUK(guanylate kinase)结构域. 结构域多提示DLG5蛋白与其他蛋白相互作用的潜力. Nakamura *et al*<sup>[106]</sup>人发现他与红细胞膜蛋白P55的GUK结构域相作用, 二者在胞膜上结合形成异

二聚体, 聚集胞内分子保持上皮细胞结构, 并且可以传递胞外信号至胞膜. 因此, 此蛋白与上皮完整性与极性的保持有关.

IBD特征之一是肠上皮屏障功能受损(肠泄漏). 现有关于DLG5的数据提示该基因可能为IBD易感基因. SNP G113A能导致氨基酸替换(R30Q), 可能通过阻止DLG5骨架形成<sup>[107]</sup>进而损伤肠道屏障功能. 最近, Friedrichs *et al*<sup>[108]</sup>发现DLG5亦属于CARD蛋白家族, 可能通过NF- $\kappa$ B或Caspase途径参与CD的发生.

Stoll小组<sup>[107]</sup>对DLG5单体型作分析发现其有4个较普遍的单体型, 分别为A、B、C、D, 在早期关于DLG5的研究中, 人们通常关注以下3种变异: (1)非同义编码SNP G113A(R30Q), 即D单体型的标签SNP(haplotype tag SNP, htSNP), 在高加索人中发生率约10%<sup>[107]</sup>; (2)出现率相对较少的非同义编码SNP P1371Q<sup>[110]</sup>; (3)A单体型的8个htSNP<sup>[107]</sup>. Slovak *et al*<sup>[100]</sup>研究发现前两种使CD发病风险增加而A单体型与低发病风险相关.

早期曾有2个家庭的病例研究和1项病例对照研究证实上述关系. 在随后的1项病例对照研究和家庭病例研究中上述结果得到了重复<sup>[107,109]</sup>. 然而后来的一系列试验都未能验证R30Q增加发病风险, A单体型降低风险这一结论<sup>[110-118]</sup>. P1371Q与CD的关系只在1项研究中得到了验证<sup>[117]</sup>, 另外4项均未能<sup>[109,94,114-115]</sup>. 新西兰人群<sup>[119]</sup>中的研究显示rs2289311变异(A单体型的htSNP)可全面降低IBD发病风险, 小组分析显示在有IBD家族史和有肠外表现的UC患者中, 这一关系尤为明显. 然而未发现R30Q和P1371Q与IBD的关系, 关于R30Q病例对照研究的Meta分析也未能发现其与IBD相关. Friedrichs *et al*<sup>[120]</sup>、Tenesa *et al*<sup>[121]</sup>、Biank *et al*<sup>[122]</sup>及Browning *et al*<sup>[123]</sup>的研究提示R30Q对CD患者易感性的影响存在性别差异, 突变型的携带可能降低女性患CD的危险性, 而增加男性的患病风险. 这可能是上述实验的结果不一致的原因, 对性别进行分层分析可能有助明确DLG5与CD发病的关系. Yamazaki *et al*<sup>[93]</sup>在日本人群中的研究发现DLG5存在其他SNP, 如rs3758462与CD相关. 在我国人群中所作研究尚未发现上述与白种人IBD相关的DLG5变异.

#### 4 结论

遗传因素是IBD发病过程中的一个重要因素. 全基因组扫描法与传统方法相结合用以探索基因

#### ■同行评价

本文立题有依据, 目的明确, 重点突出, 文字简洁, 参考文献引用合理, 为IBD发病机制提供理论依据, 对临床IBD的防治有积极参考意义.

变异与发病风险的关系已使人们对于IBD的发生发展的认识有了很大提高. 自第1个CD易感基因CARD15/NOD2明确以来, 已相继发现了许多与IBD发病相关的易感基因和易感SNP位点, 有关基因型与临床表型的关系也有大量报道. 可以明确的是IBD是一种复杂的多基因疾病, 其易感性涉及多个基因位点, 且有着显著的种族差异性. 具体的发病机制及如何将其运用于IBD患者的诊断、治疗尚待进一步研究. 迄今为止还没有找到与我国乃至亚洲IBD人群明显相关的基因和SNP位点, 因此有必要在亚洲人群中展开大规模的易感基因及易感突变位点的筛查.

## 5 参考文献

- Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007; 448: 427-434
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 599-603
- Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJ, Mascheretti S, Sanderson J, Forbes A, Mansfield J, Schreiber S, Lewis CM, Mathew CG. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 867-874
- Arnott ID, Nimmo ER, Drummond HE, Fennell J, Smith BR, MacKinlay E, Morecroft J, Anderson N, Kelleher D, O'Sullivan M, McManus R, Satsangi J. NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe? *Genes Immun* 2004; 5: 417-425
- Sugimura K, Taylor KD, Lin YC, Hang T, Wang D, Tang YM, Fischel-Ghodsian N, Targan SR, Rotter JI, Yang H. A novel NOD2/CARD15 haplotype conferring risk for Crohn disease in Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 509-518
- Karban A, Waterman M, Panhuysen CI, Pollak RD, Neshet S, Datta L, Weiss B, Suissa A, Shamir R, Brant SR, Eliakim R. NOD2/CARD15 genotype and phenotype differences between Ashkenazi and Sephardic Jews with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1134-1140
- van der Linde K, Boor PP, Houwing-Duistermaat JJ, Crusius BJ, Wilson PJ, Kuipers EJ, de Rooij FW. CARD15 mutations in Dutch familial and sporadic inflammatory bowel disease and an overview of European studies. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007; 19: 449-459
- Törkvist L, Noble CL, Lördal M, Sjöqvist U, Lindfors U, Nimmo ER, Russell RK, Löfberg R, Satsangi J. Contribution of CARD15 variants in determining susceptibility to Crohn's disease in Sweden. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 700-705
- Ernst A, Jacobsen B, Østergaard M, Okkels H, Andersen V, Dagilene E, Pedersen IS, Thorsgaard N, Drewes AM, Krarup HB. Mutations in CARD15 and smoking confer susceptibility to Crohn's disease in the Danish population. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 1445-1451
- Ince AT, Hatirnaz O, Ovuñç O, Ozbek U. 1007fs, G908R, R702W mutations and P268S, IVS8+158 polymorphisms of the CARD15 gene in Turkish inflammatory bowel disease patients and their relationship with disease-related surgery. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 1683-1692
- Hradsky O, Lenicek M, Dusatkova P, Bronsky J, Nevala J, Valtrova V, Kotalova R, Szitanyi P, Petro R, Starzykova V, Bortlik M, Vitek L, Lukas M, Cinek O. Variants of CARD15, TNFA and PTPN22 and susceptibility to Crohn's disease in the Czech population: high frequency of the CARD15 1007fs. *Tissue Antigens* 2008; 71: 538-547
- Inoue N, Tamura K, Kinouchi Y, Fukuda Y, Takahashi S, Ogura Y, Inohara N, Núñez G, Kishi Y, Koike Y, Shimosegawa T, Shimoyama T, Hibi T. Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 123: 86-91
- Leong RW, Armuzzi A, Ahmad T, Wong ML, Tse P, Jewell DP, Sung JJ. NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 1465-1470
- 高敏, 曹倩, 罗灵和, 吴敏良, 胡伟玲, 姒健敏. NOD2/CARD15基因多态性与克罗恩病患者相关性研究. *中华内科杂志* 2005; 44: 210-212
- Guo QS, Xia B, Jiang Y, Qu Y, Li J. NOD2 3020insC frameshift mutation is not associated with inflammatory bowel disease in Chinese patients of Han nationality. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1069-1071
- Li M, Gao X, Guo CC, Wu KC, Zhang X, Hu PJ. OCTN and CARD15 gene polymorphism in Chinese patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4923-4927
- 龙靖华, 智发朝, 张迎春, 张以洋, 钟长青, 姚国鹏, 陈正彦, 林勇, 智佳, 关婧. NOD2/CARD15基因突变与中国人克罗恩病相关性的研究. *胃肠病学* 2007; 12: 327-330
- Lesage S, Zouali H, Cézard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Modigliani R, Gower-Rousseau C, Macry J, Merlin F, Chamaillard M, Jannot AS, Thomas G, Hugot JP; EPWG-IBD Group; EPIMAD Group; GETAID Group. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 845-857
- Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, Mulcahy-Hawes K, Marshall SE, Orchard TR, Crawshaw J, Large O, de Silva A, Cook JT, Barnardo M, Cullen S, Welsh KI, Jewell DP. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 854-866
- Vermeire S, Wild G, Kocher K, Cousineau J, Dufresne L, Bitton A, Langelier D, Pare P, Lapointe G, Cohen A, Daly MJ, Rioux JD. CARD15 genetic variation in a Quebec population: prevalence, genotype-phenotype relationship and haplotype structure. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 74-83
- Linderson Y, Bresso F, Buentke E, Pettersson S, D'Amato M. Functional interaction of CARD15/NOD2 and Crohn's disease-associated TNFalpha

- polymorphisms. *Int J Colorectal Dis* 2005; 20: 305-311
- 22 Gazouli M, Mantzaris G, Kotsinas A, Zacharatos P, Papalambros E, Archimandritis A, Ikonomopoulos J, Gorgoulis VG. Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 681-685
- 23 Beynon V, Cotofana S, Brand S, Lohse P, Mair A, Wagner S, Mussack T, Ochsenkühn T, Folwaczny M, Folwaczny C, Glas J, Török HP. NOD2/CARD15 genotype influences MDP-induced cytokine release and basal IL-12p40 levels in primary isolated peripheral blood monocytes. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 1033-1040
- 24 Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, Green T, Kuballa P, Barmada MM, Datta LW, Shugart YY, Griffiths AM, Targan SR, Ippoliti AF, Bernard EJ, Mei L, Nicolae DL, Regueiro M, Schumm LP, Steinhardt AH, Rotter JL, Duerr RH, Cho JH, Daly MJ, Brant SR. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet* 2007; 39: 596-604
- 25 Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, Albrecht M, Mayr G, De La Vega FM, Briggs J, Günther S, Prescott NJ, Onnie CM, Häsler R, Sipos B, Fölsch UR, Lengauer T, Platzer M, Mathew CG, Krawczak M, Schreiber S. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 2007; 39: 207-211
- 26 Prescott NJ, Fisher SA, Franke A, Hampe J, Onnie CM, Soars D, Bagnall R, Mirza MM, Sanderson J, Forbes A, Mansfield JC, Lewis CM, Schreiber S, Mathew CG. A nonsynonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5. *Gastroenterology* 2007; 132: 1665-1671
- 27 Roberts RL, Geary RB, Hollis-Moffatt JE, Miller AL, Reid J, Abkevich V, Timms KM, Gutin A, Lanchbury JS, Merriman TR, Barclay ML, Kennedy MA. IL23R R381Q and ATG16L1 T300A are strongly associated with Crohn's disease in a study of New Zealand Caucasians with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 2754-2761
- 28 Büning C, Durmus T, Molnar T, de Jong DJ, Drenth JPH, Fiedler T, Gentz E, Todorov T, Haas V, Buhner S, Sturm A, Baumgart DC, Nagy F, Lonovics J, Landt O, Kage A, ning H, Nickel R, ttner J, Lochs H, Schmidt HHJ, Witt H. A study in three European IBD cohorts confirms that the ATG16L1 c.898A > G (p.Thr300Ala) variant is a susceptibility factor for Crohn's disease. *J Crohn's Colitis* 2007; 1: 70-76
- 29 Lakatos PL, Szamosi T, Szilvasi A, Molnar E, Lakatos L, Kovacs A, Molnar T, Altorjay I, Papp M, Tulassay Z, Miheller P, Papp J, Tordai A, Andrikovics H. ATG16L1 and IL23 receptor (IL23R) genes are associated with disease susceptibility in Hungarian CD patients. *Dig Liver Dis* 2008; 40: 867-873
- 30 Glas J, Konrad A, Schmechel S, Dambacher J, Seiderer J, Schroff F, Wetzke M, Roeske D, Török HP, Tonenchi L, Pfennig S, Haller D, Griga T, Klein W, Epplen JT, Folwaczny C, Lohse P, Göke B, Ochsenkühn T, Mussack T, Folwaczny M, Müller-Myhsok B, Brand S. The ATG16L1 gene variants rs2241879 and rs2241880 (T300A) are strongly associated with susceptibility to Crohn's disease in the German population. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 682-691
- 31 Weersma RK, Zhernakova A, Nolte IM, Lefebvre C, Rioux JD, Mulder F, van Dullemen HM, Kleibeuker JH, Wijmenga C, Dijkstra G. ATG16L1 and IL23R are associated with inflammatory bowel diseases but not with celiac disease in the Netherlands. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 621-627
- 32 Yamazaki K, Onouchi Y, Takazoe M, Kubo M, Nakamura Y, Hata A. Association analysis of genetic variants in IL23R, ATG16L1 and 5p13.1 loci with Crohn's disease in Japanese patients. *J Hum Genet* 2007; 52: 575-583
- 33 智佳, 智发朝, 陈正彦, 姚国鹏, 关婧, 林勇, 张迎春. 自噬体基因ATG16L1多态性与炎症性肠病的相关性研究. *南方医科大学学报* 2008; 28: 649-651
- 34 Fowler EV, Doecke J, Simms LA, Zhao ZZ, Webb PM, Hayward NK, Whiteman DC, Florin TH, Montgomery GW, Cavanaugh JA, Radford-Smith GL. ATG16L1 T300A shows strong associations with disease subgroups in a large Australian IBD population: further support for significant disease heterogeneity. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 2519-2526
- 35 Van Limbergen J, Russell RK, Nimmo ER, Drummond HE, Smith L, Anderson NH, Davies G, Gillett PM, McGrogan P, Weaver LT, Bisset WM, Mahdi G, Arnott ID, Wilson DC, Satsangi J. Autophagy gene ATG16L1 influences susceptibility and disease location but not childhood-onset in Crohn's disease in Northern Europe. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 338-346
- 36 Wehkamp J, Stange EF. NOD2 mutation and mice: no Crohn's disease but many lessons to learn. *Trends Mol Med* 2005; 11: 307-309
- 37 Aldred PM, Hollox EJ, Armour JA. Copy number polymorphism and expression level variation of the human alpha-defensin genes DEFA1 and DEFA3. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 2045-2052
- 38 Fellermann K, Stange DE, Schaeffeler E, Schmalzl H, Wehkamp J, Bevins CL, Reinisch W, Teml A, Schwab M, Lichter P, Radlwimmer B, Stange EF. A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *Am J Hum Genet* 2006; 79: 439-448
- 39 Rahman A, Fahlgron A, Sitohy B, Baranov V, Zirakzadeh A, Hammarström S, Danielsson A, Hammarström ML. Beta-defensin production by human colonic plasma cells: a new look at plasma cells in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 847-855
- 40 van Heel DA, Fisher SA, Kirby A, Daly MJ, Rioux JD, Lewis CM. Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 763-770
- 41 Perera L, Shao L, Patel A, Evans K, Meresse B, Blumberg R, Geraghty D, Groh V, Spies T, Jabri B, Mayer L. Expression of nonclassical class I molecules by intestinal epithelial cells. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 298-307
- 42 Sugimura K, Ota M, Matsuzawa J, Katsuyama Y, Ishizuka K, Mochizuki T, Mizuki N, Seki SS, Honma T, Inoko H, Asakura H. A close relationship of triplet repeat polymorphism in MHC class I chain-

- related gene A (MICA) to the disease susceptibility and behavior in ulcerative colitis. *Tissue Antigens* 2001; 57: 9-14
- 43 Orchard TR, Dhar A, Simmons JD, Vaughan R, Welsh KL, Jewell DP. MHC class I chain-like gene A (MICA) and its associations with inflammatory bowel disease and peripheral arthropathy. *Clin Exp Immunol* 2001; 126: 437-440
- 44 Ding Y, Xia B, Lü M, Zhang Y, Li J, Ye M, Luo H, Yu J, Zhang X, Tan J. MHC class I chain-related gene A-A5.1 allele is associated with ulcerative colitis in Chinese population. *Clin Exp Immunol* 2005; 142: 193-198
- 45 Lü M, Xia B, Li J, Ye M, Zhang X, Tan Q. MICB microsatellite polymorphism is associated with ulcerative colitis in Chinese population. *Clin Immunol* 2006; 120: 199-204
- 46 Seki SS, Sugimura K, Ota M, Matsuzawa J, Katsuyama Y, Ishizuka K, Mochizuki T, Suzuki K, Yoneyama O, Mizuki N, Honma T, Inoko H, Asakura H. Stratification analysis of MICA triplet repeat polymorphisms and HLA antigens associated with ulcerative colitis in Japanese. *Tissue Antigens* 2001; 58: 71-76
- 47 Glas J, Martin K, Brännler G, Kopp R, Folwaczny C, Weiss EH, Albert ED. MICA, MICB and C1\_4\_1 polymorphism in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Tissue Antigens* 2001; 58: 243-249
- 48 Stokkers PC, Reitsma PH, Tytgat GN, van Deventer SJ. HLA-DR and -DQ phenotypes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Gut* 1999; 45: 395-401
- 49 Lappalainen M, Halme L, Turunen U, Saavalainen P, Einarsdottir E, Färkkilä M, Kontula K, Paavola-Sakki P. Association of IL23R, TNFRSF1A, and HLA-DRB1\*0103 allele variants with inflammatory bowel disease phenotypes in the Finnish population. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 1118-1124
- 50 Trachtenberg EA, Yang H, Hayes E, Vinson M, Lin C, Targan SR, Tyran D, Erlich H, Rotter JL. HLA class II haplotype associations with inflammatory bowel disease in Jewish (Ashkenazi) and non-Jewish caucasian populations. *Hum Immunol* 2000; 61: 326-333
- 51 Yoshitake S, Kimura A, Okada M, Yao T, Sasazuki T. HLA class II alleles in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *Tissue Antigens* 1999; 53: 350-358
- 52 王丽英, 王江滨, 陈永胜. 人类白细胞抗原基因多态性与炎症性肠病遗传易感关系的分析. *中华消化杂志* 2005; 25: 247-248
- 53 Silverberg MS, Mirea L, Bull SB, Murphy JE, Steinhart AH, Greenberg GR, McLeod RS, Cohen Z, Wade JA, Siminovitch KA. A population- and family-based study of Canadian families reveals association of HLA DRB1\*0103 with colonic involvement in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2003; 9: 1-9
- 54 van Heel DA, Udalova IA, De Silva AP, McGovern DP, Kinouchi Y, Hull J, Lench NJ, Cardon LR, Carey AH, Jewell DP, Kwiatkowski D. Inflammatory bowel disease is associated with a TNF polymorphism that affects an interaction between the OCT1 and NF(-kappa)B transcription factors. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 1281-1289
- 55 Cucchiara S, Latiano A, Palmieri O, Canani RB, D'Inca R, Guariso G, Vieni G, De Venuto D, Riegler G, De'Angelis GL, Guagnozzi D, Bascietto C, Miele E, Valvano MR, Bossa F, Annese V; Italian Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha but not MDR1 influence response to medical therapy in pediatric-onset inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 44: 171-179
- 56 Celik Y, Dagli U, Kiliç MY, Törüner M, Ozen SC, Ozkan M, Soykan I, Cetinkaya H, Ulker A, Ozden A, Bozdayi AM. Cytokine gene polymorphisms in Turkish patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 559-565
- 57 Mittal RD, Manchanda PK, Bid HK, Ghoshal UC. Analysis of polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha and polymorphic xenobiotic metabolizing enzymes in inflammatory bowel disease: study from northern India. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 920-924
- 58 宋瑛, 吴开春, 张沥, 郝志明, 李红涛, 张玲霞, 乔泰东, 李彩宁, 樊代明. 肿瘤坏死因子基因多态性与炎症性肠病的相关性分析. *中华消化杂志* 2005; 25: 202-206
- 59 曹倩, 高敏, 周刚, 朱琴, 吴敏良, 胡伟玲, 姚健敏. 肿瘤坏死因子基因多态性与溃疡性结肠炎相关性研究. *中华消化杂志* 2006; 26: 460-463
- 60 袁岸龙, 夏冰, 侯炜, 余玉红, 毛琳. 肿瘤坏死因子- $\alpha$ 基因多态性与炎症性肠病的相关性研究. *中华消化杂志* 2004; 24: 243-244
- 61 Sýkora J, Subrt I, Didek P, Siala K, Schwarz J, Machalová V, Varvarovská J, Pazdiora P, Pozler O, Stozický F. Cytokine tumor necrosis factor-alpha A promoter gene polymorphism at position -308 G-->A and pediatric inflammatory bowel disease: implications in ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 42: 479-487
- 62 Levine A, Karban A, Eliakim R, Shaoul R, Reif S, Pacht A, Wardi J, Yakir B, Silver EL. A polymorphism in the TNF-alpha promoter gene is associated with pediatric onset and colonic location of Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 407-413
- 63 Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, Dassopoulos T, Bitton A, Yang H, Targan S, Datta LW, Kistner EO, Schumm LP, Lee AT, Gregersen PK, Barmada MM, Rotter JL, Nicolae DL, Cho JH. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006; 314: 1461-1463
- 64 Baldassano RN, Bradfield JP, Monos DS, Kim CE, Glessner JT, Casalunovo T, Frackelton EC, Otieno FG, Kanterakis S, Shaner JL, Smith RM, Eckert AW, Robinson LJ, Onyiah CC, Abrams DJ, Chiavacci RM, Skraban R, Devoto M, Grant SF, Hakonarson H. Association of variants of the interleukin-23 receptor gene with susceptibility to pediatric Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 972-976
- 65 Dubinsky MC, Wang D, Picornell Y, Wrobel I, Katzir L, Quiros A, Dutridge D, Wahbeh G, Silber G, Bahar R, Mengesha E, Targan SR, Taylor KD, Rotter JL. IL-23 receptor (IL-23R) gene protects against pediatric Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 511-515
- 66 Van Limbergen J, Russell RK, Nimmo ER, Drummond HE, Smith L, Davies G, Anderson NH, Gillett PM, McGrogan P, Hassan K, Weaver L, Bisset WM, Mahdi G, Wilson DC, Satsangi J. IL23R Arg381Gln is associated with childhood onset inflammatory bowel disease in Scotland. *Gut* 2007;

- 56: 1173-1174
- 67 Cummings JR, Ahmad T, Geremia A, Beckly J, Cooney R, Hancock L, Pathan S, Guo C, Cardon LR, Jewell DP. Contribution of the novel inflammatory bowel disease gene IL23R to disease susceptibility and phenotype. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 1063-1068
- 68 Büning C, Schmidt HH, Molnar T, De Jong DJ, Fiedler T, Bühner S, Sturm A, Baumgart DC, Nagy F, Lonovics J, Drenth JP, Landt O, Nickel R, Büttner J, Lochs H, Witt H. Heterozygosity for IL23R p.Arg381Gln confers a protective effect not only against Crohn's disease but also ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26: 1025-1033
- 69 Márquez A, Mendoza JL, Taxonera C, Díaz-Rubio M, De La Concha EG, Urcelay E, Martínez A. IL23R and IL12B polymorphisms in Spanish IBD patients: no evidence of interaction. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 1192-1196
- 70 Taylor KD, Targan SR, Mei L, Ippoliti AF, McGovern D, Mengesha E, King L, Rotter JL. IL23R haplotypes provide a large population attributable risk for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 1185-1191
- 71 Baptista ML, Amarante H, Picheth G, Sdepanian VL, Peterson N, Babasukumar U, Lima HC, Kugathasan S. CARD15 and IL23R influences Crohn's disease susceptibility but not disease phenotype in a Brazilian population. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 674-679
- 72 Neurath MF. IL-23: a master regulator in Crohn disease. *Nat Med* 2007; 13: 26-28
- 73 Caprioli F, Pallone F, Monteleone G. Th17 immune response in IBD: A new pathogenic mechanism. *J Crohn's Colitis* 2008; 2: 291-295
- 74 Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, Elson CO, Sandborn WJ, Present D, Dolin B, Goodman N, Groden C, Hornung RL, Quezado M, Yang Z, Neurath MF, Salfeld J, Veldman GM, Schwertschlag U, Strober W. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 2004; 351: 2069-2079
- 75 Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, Pierik M, Van Steen K, Gustot T, Quertinmont E, Abramowicz M, Van Gossun A, Devière J, Rutgeerts P. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 2004; 53: 987-992
- 76 Baumgart DC, Büning C, Geerds L, Schmidt HH, Genschel J, Fiedler T, Gentz E, Molnar T, Nagy F, Lonovics J, Lochs H, Wiedenmann B, Nickel R, Witt H, Dignass A. The c.1-260C>T promoter variant of CD14 but not the c.896A>G (p.D299G) variant of toll-like receptor 4 (TLR4) genes is associated with inflammatory bowel disease. *Digestion* 2007; 76: 196-202
- 77 Oostenbrug LE, Drenth JP, de Jong DJ, Nolte IM, Oosterom E, van Dullemen HM, van der Linde K, te Meerman GJ, van der Steege G, Kleibeuker JH, Jansen PL. Association between Toll-like receptor 4 and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 567-575
- 78 Hong J, Leung E, Fraser AG, Merriman TR, Vishnu P, Krissansen GW. TLR2, TLR4 and TLR9 polymorphisms and Crohn's disease in a New Zealand Caucasian cohort. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1760-1766
- 79 Brand S, Staudinger T, Schnitzler F, Pfennig S, Hofbauer K, Dambacher J, Seiderer J, Tillack C, Konrad A, Crispin A, Göke B, Lohse P, Ochsenkühn T. The role of Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms and CARD15/NOD2 mutations in the susceptibility and phenotype of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 645-652
- 80 Lakatos PL, Lakatos L, Szalay F, Willheim-Polli C, Osterreicher C, Tulassay Z, Molnar T, Reinisch W, Papp J, Mozsik G, Ferenci P. Toll-like receptor 4 and NOD2/CARD15 mutations in Hungarian patients with Crohn's disease: phenotype-genotype correlations. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1489-1495
- 81 Arnott ID, Nimmo ER, Drummond HE, Fennell J, Smith BR, MacKinlay E, Morecroft J, Anderson N, Kelleher D, O'Sullivan M, McManus R, Satsangi J. NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe? *Genes Immun* 2004; 5: 417-425
- 82 Braat H, Stokkers P, Hommes T, Cohn D, Vogels E, Pronk I, Spek A, van Kampen A, van Deventer S, Peppelenbosch M, Hommes D. Consequence of functional Nod2 and Tlr4 mutations on gene transcription in Crohn's disease patients. *J Mol Med* 2005; 83: 601-609
- 83 Gazouli M, Mantzaris G, Kotsinas A, Zacharatos P, Papalambros E, Archimandritis A, Ikonomopoulos J, Gorgoulis VG. Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 681-685
- 84 Browning BL, Huebner C, Petermann I, Gearry RB, Barclay ML, Shelling AN, Ferguson LR. Has toll-like receptor 4 been prematurely dismissed as an inflammatory bowel disease gene? Association study combined with meta-analysis shows strong evidence for association. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 2504-2512
- 85 熊利芬, 夏冰, 姜黎, 郭秋莎, 孙泽群. TLR4基因 Asp299Gly及TLR2基因Arg753Glu、Arg677Trp多态性与中国湖北汉族炎症性肠病无相关性. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 212-215
- 86 Török HP, Glas J, Tonenchi L, Bruennler G, Folwaczny M, Folwaczny C. Crohn's disease is associated with a toll-like receptor-9 polymorphism. *Gastroenterology* 2004; 127: 365-366
- 87 van Heel DA, Ghosh S, Hunt KA, Mathew CG, Forbes A, Jewell DP, Playford RJ. Synergy between TLR9 and NOD2 innate immune responses is lost in genetic Crohn's disease. *Gut* 2005; 54: 1553-1557
- 88 Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, Newman B, Van Oene M, Cescon D, Greenberg G, Griffiths AM, St George-Hyslop PH, Siminovitch KA. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet* 2004; 36: 471-475
- 89 Fisher SA, Hampe J, Onnie CM, Daly MJ, Curley C, Purcell S, Sanderson J, Mansfield J, Annesse V, Forbes A, Lewis CM, Schreiber S, Rioux JD, Mathew CG. Direct or indirect association in a complex disease: the role of SLC22A4 and SLC22A5 functional variants in Crohn disease. *Hum Mutat* 2006; 27: 778-785
- 90 Gazouli M, Mantzaris G, Archimandritis AJ, Nasioulas G, Anagnou NP. Single nucleotide polymorphisms of OCTN1, OCTN2, and DLG5



- genes in Greek patients with Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7525-7530
- 91 Török HP, Glas J, Tonenchi L, Lohse P, Müller-Myhsok B, Limbersky O, Neugebauer C, Schnitzler F, Seiderer J, Tillack C, Brand S, Brännler G, Jagiello P, Epplen JT, Griga T, Klein W, Schiemann U, Folwaczny M, Ochsenkühn T, Folwaczny C. Polymorphisms in the DLG5 and OCTN cation transporter genes in Crohn's disease. *Gut* 2005; 54: 1421-1427
- 92 Törkvist L, Noble CL, Lördal M, Sjöqvist U, Lindfors U, Nimmo ER, Löfberg R, Russell RK, Satsangi J. Contribution of the IBD5 locus to Crohn's disease in the Swedish population. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 200-206
- 93 Yamazaki K, Takazoe M, Tanaka T, Ichimori T, Saito S, Iida A, Onouchi Y, Hata A, Nakamura Y. Association analysis of SLC22A4, SLC22A5 and DLG5 in Japanese patients with Crohn disease. *J Hum Genet* 2004; 49: 664-668
- 94 Li M, Gao X, Guo CC, Wu KC, Zhang X, Hu PJ. OCTN and CARD15 gene polymorphism in Chinese patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4923-4927
- 95 Mirza MM, Fisher SA, King K, Cuthbert AP, Hampe J, Sanderson J, Mansfield J, Donaldson P, Macpherson AJ, Forbes A, Schreiber S, Lewis CM, Mathew CG. Genetic evidence for interaction of the 5q31 cytokine locus and the CARD15 gene in Crohn disease. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 1018-1022
- 96 Newman B, Gu X, Wintle R, Cescon D, Yazdanpanah M, Liu X, Peltekova V, Van Oene M, Amos CI, Siminovitch KA. A risk haplotype in the Solute Carrier Family 22A4/22A5 gene cluster influences phenotypic expression of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2005; 128: 260-269
- 97 Onnie CM, Fisher SA, Pattni R, Sanderson J, Forbes A, Lewis CM, Mathew CG. Associations of allelic variants of the multidrug resistance gene (ABCB1 or MDR1) and inflammatory bowel disease and their effects on disease behavior: a case-control and meta-analysis study. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 263-271
- 98 Collett A, Higgs NB, Gironella M, Zeef LA, Hayes A, Salmo E, Haboubi N, Iovanna JL, Carlson GL, Warhurst G. Early molecular and functional changes in colonic epithelium that precede increased gut permeability during colitis development in *mdr1a*(-/-) mice. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 620-631
- 99 Blokzijl H, Vander Borgh S, Bok LI, Libbrecht L, Geuken M, van den Heuvel FA, Dijkstra G, Roskams TA, Moshage H, Jansen PL, Faber KN. Decreased P-glycoprotein (P-gp/MDR1) expression in inflamed human intestinal epithelium is independent of PXR protein levels. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 710-720
- 100 Slovak ML, Kopecky KJ, Wolman SR, Henslee-Downey JP, Appelbaum FR, Forman SJ, Blume KG. Cytogenetic correlation with disease status and treatment outcome in advanced stage leukemia post bone marrow transplantation: a Southwest Oncology Group study (SWOG-8612). *Leuk Res* 1995; 19: 381-388
- 101 Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, Liu X, Tariq M, Mobarek A, Thornton N, Folayan GO, Githang'a J, Indalo A, Ofori-Adjei D, Price-Evans DA, McLeod HL. MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 217-221
- 102 Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y, Takahashi M, Kurata Y, Kigawa J, Higuchi S, Terakawa N, Otsubo K. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 297: 1137-1143
- 103 Satsangi J, Parkes M, Louis E, Hashimoto L, Kato N, Welsh K, Terwilliger JD, Lathrop GM, Bell JL, Jewell DP. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet* 1996; 14: 199-202
- 104 Annese V, Valvano MR, Palmieri O, Latiano A, Bossa F, Andriulli A. Multidrug resistance 1 gene in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3636-3644
- 105 Fiedler T, Büning C, Reuter W, Pitre G, Gentz E, Schmidt HH, Büttner J, Ockenga J, Gerloff T, Meisel C, Lochs H, Roots I, Köpke K, John A. Possible role of MDR1 two-locus genotypes for young-age onset ulcerative colitis but not Crohn's disease. *Eur J Clin Pharmacol* 2007; 63: 917-925
- 106 Nakamura H, Sudo T, Tsuiki H, Miyake H, Morisaki T, Sasaki J, Masuko N, Kochi M, Ushio Y, Saya H. Identification of a novel human homolog of the *Drosophila* *dlg*, *P-dlg*, specifically expressed in the gland tissues and interacting with p55. *FEBS Lett* 1998; 433: 63-67
- 107 Stoll M, Corneliussen B, Costello CM, Waetzig GH, Mellgard B, Koch WA, Rosenstiel P, Albrecht M, Croucher PJ, Seegert D, Nikolaus S, Hampe J, Lengauer T, Pierrou S, Foelsch UR, Mathew CG, Lagerstrom-Fermer M, Schreiber S. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2004; 36: 476-480
- 108 Friedrichs F, Henckaerts L, Vermeire S, Kucharzik T, Seehafer T, Möller-Krull M, Bornberg-Bauer E, Stoll M, Weiner J 3rd. The Crohn's disease susceptibility gene DLG5 as a member of the CARD interaction network. *J Mol Med* 2008; 86: 423-432
- 109 Daly MJ, Pearce AV, Farwell L, Fisher SA, Latiano A, Prescott NJ, Forbes A, Mansfield J, Sanderson J, Langelier D, Cohen A, Bitton A, Wild G, Lewis CM, Annese V, Mathew CG, Rioux JD. Association of DLG5 R30Q variant with inflammatory bowel disease. *Eur J Hum Genet* 2005; 13: 835-839
- 110 Medici V, Mascheretti S, Croucher PJ, Stoll M, Hampe J, Grebe J, Sturniolo GC, Solberg C, Jahnsen J, Moum B, Schreiber S, Vatn MH. Extreme heterogeneity in CARD15 and DLG5 Crohn disease-associated polymorphisms between German and Norwegian populations. *Eur J Hum Genet* 2006; 14: 459-468
- 111 Lakatos PL, Fischer S, Claes K, Kovacs A, Molnar T, Altorjay I, Demeter P, Tulassay Z, Palatka K, Papp M, Rutgeerts P, Szalay F, Papp J, Vermeire S, Lakatos L. DLG5 R30Q is not associated with IBD in Hungarian IBD patients but predicts clinical response to steroids in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 362-368
- 112 Noble CL, Nimmo ER, Drummond H, Smith L, Arnott ID, Satsangi J. DLG5 variants do not influence susceptibility to inflammatory bowel disease in the Scottish population. *Gut* 2005; 54:

- 1416-1120
- 113 Vermeire S, Pierik M, Hlavaty T, Claessens G, van Schuerbeeck N, Joossens S, Ferrante M, Henckaerts L, Bueno de Mesquita M, Vlietinck R, Rutgeerts P. Association of organic cation transporter risk haplotype with perianal penetrating Crohn's disease but not with susceptibility to IBD. *Gastroenterology* 2005; 129: 1845-1853
- 114 Büning C, Geerdts L, Fiedler T, Gentz E, Pitre G, Reuter W, Luck W, Buhner S, Molnar T, Nagy F, Lonovics J, Dignass A, Landt O, Nickel R, Genschel J, Lochs H, Schmidt HH, Witt H. DLG5 variants in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 786-792
- 115 Tremelling M, Waller S, Bredin F, Greenfield S, Parkes M. Genetic variants in TNF-alpha but not DLG5 are associated with inflammatory bowel disease in a large United Kingdom cohort. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 178-184
- 116 Ferraris A, Torres B, Knafelz D, Barabino A, Lionetti P, de Angelis GL, Iacono G, Papadatou B, D'Amato G, Di Ciommo V, Dallapiccola B, Castro M. Relationship between CARD15, SLC22A4/5, and DLG5 polymorphisms and early-onset inflammatory bowel diseases: an Italian multicentric study. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 355-361
- 117 Newman WG, Gu X, Wintle RF, Liu X, van Oene M, Amos CI, Siminovitch KA. DLG5 variants contribute to Crohn disease risk in a Canadian population. *Hum Mutat* 2006; 27: 353-358
- 118 Pearce AV, Fisher SA, Prescott NJ, Onnie CM, Pattni R, Green P, Forbes A, Mansfield J, Sanderson J, Schreiber S, Lewis CM, Mathew CG. Investigation of association of the DLG5 gene with phenotypes of inflammatory bowel disease in the British population. *Int J Colorectal Dis* 2007; 22: 419-424
- 119 Browning BL, Huebner C, Petermann I, Demmers P, McCulloch A, Geary RB, Barclay ML, Shelling AN, Ferguson LR. Association of DLG5 variants with inflammatory bowel disease in the New Zealand Caucasian population and meta-analysis of the DLG5 R30Q variant. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 1069-1076
- 120 Friedrichs F, Brescianini S, Annese V, Latiano A, Berger K, Kugathasan S, Broeckel U, Nikolaus S, Daly MJ, Schreiber S, Rioux JD, Stoll M. Evidence of transmission ratio distortion of DLG5 R30Q variant in general and implication of an association with Crohn disease in men. *Hum Genet* 2006; 119: 305-311
- 121 Tenesa A, Noble C, Satsangi J, Dunlop M. Association of DLG5 and inflammatory bowel disease across populations. *Eur J Hum Genet* 2006; 14: 259-260; author reply 260-261
- 122 Biank V, Friedrichs F, Babusukumar U, Wang T, Stoll M, Broeckel U, Kugathasan S. DLG5 R30Q variant is a female-specific protective factor in pediatric onset Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 391-398
- 123 Browning BL, Annese V, Barclay ML, Bingham SA, Brand S, Büning C, Castro M, Cucchiara S, Dallapiccola B, Drummond H, Ferguson LR, Ferraris A, Fisher SA, Geary RB, Glas J, Henckaerts L, Huebner C, Knafelz D, Lakatos L, Lakatos PL, Latiano A, Liu X, Mathew C, Müller-Myhsok B, Newman WG, Nimmo ER, Noble CL, Palmieri O, Parkes M, Petermann I, Rutgeerts P, Satsangi J, Shelling AN, Siminovitch KA, Török HP, Tremelling M, Vermeire S, Valvano MR, Witt H. Gender-stratified analysis of DLG5 R30Q in 4707 patients with Crohn disease and 4973 controls from 12 Caucasian cohorts. *J Med Genet* 2008; 45: 36-42

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 •

## 世界华人消化杂志栏目设置

**本刊讯** 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确. (常务副总编辑: 张海宁 2009-06-08)

# 光敏剂PpIX亚细胞分布方式对食管癌细胞光动力学效应的影响

汲振余, 范天黎, 赵立群, 杨小静, 裘一兵, 张聚真, 张亚冰, 孙予, 裘宋良, 杨观瑞

## ■背景资料

食管癌是世界范围内常见的消化系统恶性肿瘤之一, 提高食管癌治疗效果的关键是早期发现、早期诊断、早期治疗。但早期癌术后远期死亡原因中复发癌是主要的, 所以早期食管癌的综合治疗对提高生存率非常重要。

汲振余, 赵立群, 杨小静, 裘一兵, 张聚真, 张亚冰, 孙予, 裘宋良, 杨观瑞, 郑州大学医药科学研究院肿瘤室 河南省郑州市 450052

范天黎, 郑州大学基础医学院肿瘤室 河南省郑州市 450001  
汲振余, 医学博士, 研究员, 主要从事食管癌光动力学和早期癌变机制研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30873002

作者贡献分布: 此课题由汲振余、赵立群、裘宋良及杨观瑞设计; 研究过程由汲振余、范天黎、赵立群、杨小静、裘一兵、张聚真、张亚冰及孙予完成; 汲振余与杨观瑞进行图片和实验数据分析并完成写作。

通讯作者: 汲振余, 研究员, 450052, 河南省郑州市大学路40号, 郑州大学医药科学研究院肿瘤室. jizhenyu@zzu.edu.cn  
电话: 0371-66658232

收稿日期: 2009-03-03 修回日期: 2009-04-20

接受日期: 2009-04-27 在线出版日期: 2009-06-08

## Effects of subcellular localization pattern of PpIX on photodynamic efficiency in esophageal cancer cells

Zhen-Yu Ji, Tian-Li Fan, Li-Qun Zhao, Xiao-Jing Yang, Yi-Bing Qiu, Ju-Zhen Zhang, Ya-Bing Zhang, Yu Sun, Song-Liang Qiu, Guan-Rui Yang

Zhen-Yu Ji, Li-Qun Zhao, Xiao-Jing Yang, Yi-Bing Qiu, Ju-Zhen Zhang, Ya-Bing Zhang, Yu Sun, Song-Liang Qiu, Guan-Rui Yang, Department of Oncology, Academy of Medical and Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Tian-Li Fan, Department of Oncology, School of Basic Medicine, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30873002

Correspondence to: Zhen-Yu Ji, Department of Oncology, Academy of Medical and Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. jizhenyu@zzu.edu.cn

Received: 2009-03-03 Revised: 2009-04-20

Accepted: 2009-04-27 Published online: 2009-06-08

## Abstract

**AIM:** To study the effects of subcellular localization pattern of PpIX on photodynamic efficiency in esophageal cancer cell lines.

**METHODS:** KYSE-450, KYSE-70 and Het-1A cells were treated with ALA, exogenous PpIX and MitoTracker, respectively. The subcellular localization patterns of PpIX were observed

using fluorescence microscopy. Mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) after ALA-PDT and PpIX-PDT was measured using JC-1 flow cytometry. The morphological study of mitochondria after ALA-PDT and PpIX-PDT was performed with electron microscopy. MTS was used to examine the cell survival rate.

**RESULTS:** The granular patterns and distribution of fluorescence in the extranuclear fraction of the cells were similar for both ALA-derived endogenous PpIX and the MitoTracker in all cell lines; however, exogenous PpIX was diffusely distributed in the whole cytoplasm of cells. After 12 h of ALA-based PDT, the percentages were increased to 22%, 52% and 33% in the KYSE-450, KYSE-70 and Het-1A cell lines, respectively; where only 15%, 14% and 18% of the depolarized cell fractions were seen following PDT with exogenous PpIX. As early as 1 h after photodynamic treatment, some of the mitochondria were already damaged by ALA-PDT with unclear cristae, vacuoles and swelling; while the mitochondrial ultrastructure was still well preserved 1 h later following PDT with exogenous PpIX. ALA-mediated PDT was significantly more efficient than PDT with exogenous PpIX in killing cells in all the 3 cell lines.

**CONCLUSION:** Different subcellular location of photosensitizer may affect the PDT efficacy. Mitochondria are more sensitive and may be important targets for PDT. This finding suggests that new photosensitizers with mitochondrially-localizing property may be designed for improvement of PDT effectiveness in the future.

**Key Words:** Esophageal cancer; Photodynamic therapy; Photosensitizer;  $\delta$ -aminolevulinic acid; PpIX

Ji ZY, Fan TL, Zhao LQ, Yang XJ, Qiu YB, Zhang JZ, Zhang YB, Sun Y, Qiu SL, Yang GR. Effects of subcellular localization pattern of PpIX on photodynamic efficiency in esophageal cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(16): 1602-1608

## 摘要

**目的:** 探讨不同来源的光敏剂PpIX在食管癌

## ■同行评议者

沈琳, 主任医师, 北京大学临床肿瘤医院消化内科

细胞中的亚细胞分布与光动力学效应的关系.

**方法:** KYSE-450、KYSE-70和Het-1A细胞分别用ALA和外源性PpIX以及MitoTracker Green处理, 相差荧光显微镜观察不同来源的PpIX在细胞内的定位. 利用JC-1-流式细胞方法检测ALA-PDT和PpIX-PDT后细胞线粒体膜电位( $\Delta\Psi_m$ )的改变. 利用电镜观察ALA-PDT和PpIX-PDT后细胞线粒体的超微结构, 观察PpIX的不同细胞分布形式对线粒体损伤的形态学改变. MTS法测定PDT处理后的细胞存活率.

**结果:** 由ALA产生的内源性光敏剂PpIX荧光主要分布在线粒体, 与MitoTracker Green显示的线粒体荧光分布在相同的区域, 而外源性PpIX荧光信号则弥漫性分布于整个细胞质. KYSE-450、KYSE-70和Het-1A细胞经ALA-PDT 12 h后, 膜电位受损细胞分别达到22%、52%和33%, 而外源性PpIX-PDT 12 h后线粒体受损细胞率仅分别为15%、14%和18%. 电镜观察结果显示, ALA-PDT后仅1 h一些线粒体即已出现受损状态, 可见线粒体内嵴不明显, 出现空泡和膨胀. 但外源性PpIX-PDT后1 h细胞内大部分线粒体仍保持完整结构. ALA-PDT的细胞杀伤效果明显好于外源性PpIX-PDT.

**结论:** 光敏剂的不同亚细胞定位影响了食管癌细胞PDT的功效, PDT造成的线粒体的损伤在肿瘤细胞杀伤过程中起非常重要的作用, 提示以线粒体为靶点的光敏剂是未来光敏剂研制的重点.

**关键词:** 食管癌; 光动力学; 光敏剂; 氨基酮戊酸; 原卟啉IX

汲振余, 范天黎, 赵立群, 杨小静, 裘一兵, 张聚真, 张亚冰, 孙予, 裘宋良, 杨观瑞. 光敏剂PpIX亚细胞分布方式对食管癌细胞光动力学效应的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(16): 1602-1608

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1602.asp>

## 0 引言

光动力学疗法(photodynamic therapy, PDT)是利用一定波长的光激发光敏剂, 在分子氧存在下产生光化学或光物理学反应, 导致沉积光敏剂的病变部位产生不可逆的损伤<sup>[1]</sup>, 因而PDT的细胞毒性效果则依赖于光敏剂在细胞内的选择性累积. 但以往一些研究证实这些选择性累积是不同的, 细胞内线粒体、溶酶体、质膜、内质

网、高尔基复合体及肿瘤组织的血管系统都可能成为PDT的结合位点<sup>[2]</sup>. 光敏剂在肿瘤细胞内的亚细胞分布方式也决定了光动力学效应作用位点<sup>[3]</sup>, 因而有可能影响到PDT细胞毒性的差异. 本研究拟利用氨基酮戊酸( $\delta$ -aminolevulinic acid, ALA)以及外源性原卟啉IX(PpIX)作为光敏剂, 研究不同来源的PpIX在人食管鳞癌细胞系KYSE-450、KYSE-70及人食管上皮永生细胞系Het-1A中的分布特征以及与光动力学效应的关系, 为新光敏剂的开发和治疗手段的改善提供依据.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 5-ALA和PpIX由PhotoCure ASA(挪威)提供. 避光下称取100 mg PpIX, 加至20 mL二甲亚砜(DMSO)内, 磁力搅拌器搅拌后, 超声波处理2 h以上, 使其充分溶解, 然后用细胞培养液稀释至所需浓度, DMSO终浓度不超过10 g/L. 高分化食管鳞癌细胞KYSE-450和低分化食管鳞癌细胞KYSE-70由美国ATCC提供. 荧光分光光度计为LS-5型(Perkin Elmer). PDT光辐射仪为PCI Biotech公司(挪威)生产. 流式细胞仪为BD FACSDiVa Option(BD Biosciences公司, 美国). 荧光显微镜为Nikon Eclips E800, 附带-60℃高分辨率CCD成像设备. MTS为Promega产品. JC-1由美国Biotium公司生产. ATP定量测定试剂盒来自Sigma公司. RPMI 1640培养液及其他试剂均购自Sigma.

### 1.2 方法

**1.2.1 PpIX亚细胞定位的观察:** 生长至80%左右融合的KYSE-450、KYSE-70和Het-1A细胞用胰蛋白酶-EDTA消化, 接种 $4 \times 10^5$ 个细胞至6孔培养板, 每孔含4 mL RPMI 1640培养基(含100 g/L小牛血清). 37℃ 50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱培养过夜, 使细胞充分贴壁. 次日用无血清RPMI 1640培养基洗涤2次, 分别用含1.5 mmol/L ALA的无血清培养液孵育细胞3.5 h, 用含1  $\mu$ mol/L PpIX的无血清培养液孵育细胞2 h. 各培养板孔内再加入500 nmol/L MitoTracker Green FM, 37℃ CO<sub>2</sub>培养箱继续孵育细胞30 min. 弃培养液, 细胞用冷PBS洗涤2次, 荧光显微镜观察结果. 激发波长为380-420 nm, 散射波长为630 $\pm$ 20 nm. MitoTracker Green FM荧光信号激发波长为465-495 nm, 散射波长为515-555 nm.

**1.2.2 线粒体膜电位( $\Delta\Psi_m$ )测定:** 细胞接种至6孔培养板. 用1 mmol/L的ALA处理细胞, 方法

## ■ 研发前沿

目前有关PDT的作用机制和影响PDT疗效因素, 特别是新型光敏剂的研发并了解其在肿瘤组织内的不同分布和亚细胞分布方式、光敏作用的具体靶细胞器及对光动力学效应的影响成为关注热点.

## ■相关报道

Morgan *et al* 报道 ALA-PDT 主要诱导线粒体的损伤, 这是由于 ALA 是细胞内血红素合成途径中的中间产物, 而血红素的合成是在线粒体内进行的。细胞吸收的光敏剂或内部合成的内源性光敏剂并不总位于光化学敏感位点, 研究这些光化学敏感位点与 PDT 的关系有助于寻找提高 PDT 效能的手段。

同上。KYSE-450 细胞用 0.4  $\mu\text{mol/L}$  的 PpIX 处理, KYSE-70 和 Het-1A 用 0.2  $\mu\text{mol/L}$  的 PpIX 处理, 使其能在细胞内产生相同水平的 PpIX。用 ALA 处理的细胞(红光, 波长  $>600\text{ nm}$ ), KYSE-450 的光照射剂量为 7.2  $\text{J}/\text{cm}^2$ , KYSE-70 和 Het-1A 的光照射剂量为 3.6  $\text{J}/\text{cm}^2$ 。用 PpIX 处理的 3 种细胞, 光照射剂量均为 14.4  $\text{J}/\text{cm}^2$ 。光处理完毕后弃去原培养液, 加入 100  $\mu\text{L}$  含 100  $\text{g/L}$  小牛血清的新鲜培养液, 暗处 37 $^{\circ}\text{C}$   $\text{CO}_2$  培养箱孵育 12 h。刮取细胞, 14 000  $\text{r}/\text{min}$  离心 5 min, 弃上清, 细胞沉淀用 0.5  $\text{mL}$  1 $\times$  反应缓冲液重悬, 14 000  $\text{r}/\text{min}$  离心 5 min, 弃上清。加入 0.5  $\text{mL}$  JC-1 工作液使细胞沉淀重悬, 37 $^{\circ}\text{C}$  温箱内孵育 15 min。用 1  $\text{mL}$  1 $\times$  反应缓冲液洗涤 2 次, 最后用 0.5  $\text{mL}$  1 $\times$  反应缓冲液重悬细胞, 流式细胞仪测定。

1.2.3 线粒体结构的电镜观察: KYSE-450、KYSE-70 和 Het-1A 细胞分别用 ALA、PpIX 处理和光照射, 方法和剂量同 1.2.2。对照组细胞不用 ALA 或 PpIX 孵育, PDT 处理方法相同。光处理完毕后加入 4  $\text{mL}$  含 100  $\text{g/L}$  小牛血清的新鲜培养液, 暗处 37 $^{\circ}\text{C}$   $\text{CO}_2$  培养箱孵育 1 h 后收获细胞。PBS 洗涤, 细胞沉淀用含 10  $\text{g/L}$  戊二醛和 40  $\text{g/L}$  甲醛的二甲基砷酸盐(cacodylate)缓冲液悬浮, 固定细胞过夜。用 10  $\text{g/L}$  四氧化锇(osmium tetroxide)的二甲基砷酸盐缓冲液再固定细胞 1 h。脱水处理: 分别于 700、900、960  $\text{mL/L}$  的乙醇浸泡各 3 次, 每次 10 min, 最后浸泡于环氧丙烷(propylene oxide)中。细胞包埋入环氧树脂(Epon/Araldite), 玻璃刀切片, 于玻片上以甲苯胺蓝(toluidine blue)染色, 普通光学镜观察定位。用钻石刀做超薄切片, 乙酸双氧铀(uranyl acetate)和柠檬酸铅染色, 电镜观察。

1.2.4 光动力学处理和细胞存活活性的测定(MTS法): 接种  $1 \times 10^4$  个细胞至 96 孔培养板, 37 $^{\circ}\text{C}$  50  $\text{mL/L}$   $\text{CO}_2$  培养箱培养过夜, 用 200  $\mu\text{L}$  无血清 RPMI 1640 培养基洗涤 2 次。加入 100  $\mu\text{L}$  含 1  $\text{mmol/L}$  的 ALA 或各浓度的 PpIX 的无血清 RPMI 1640 培养液, 暗处 37 $^{\circ}\text{C}$   $\text{CO}_2$  培养箱孵育 4 h。PDT 光辐射仪进行光处理, 波长  $>600\text{ nm}$ , 光流速 15  $\text{W}/\text{m}^2$ 。光处理完毕后立即弃去原培养液, 加入 100  $\mu\text{L}$  含 100  $\text{g/L}$  小牛血清的新鲜培养液, 暗处 37 $^{\circ}\text{C}$   $\text{CO}_2$  培养箱孵育 24 h。经光动力学处理的细胞, 每孔加入 20  $\mu\text{L}$  MTS 液(浓度为 5  $\text{g/L}$ ), 37 $^{\circ}\text{C}$  温箱内孵育 1 h 后, 取出冷至室温, 酶标仪测定 492  $\text{nm}$  处的光吸收值。所有试验均设 6 个平行孔, 至少重复 2 次。以无 ALA 但用相同光剂量处理的对照孔设置为 100%, 其他试验孔以此为对照计算

细胞存活率(%)。

统计学处理 采用 SigmaPlot 软件 Student's *t*-test, 所有数据以 mean  $\pm$  SD 表示,  $P < 0.05$  为有显著差异。

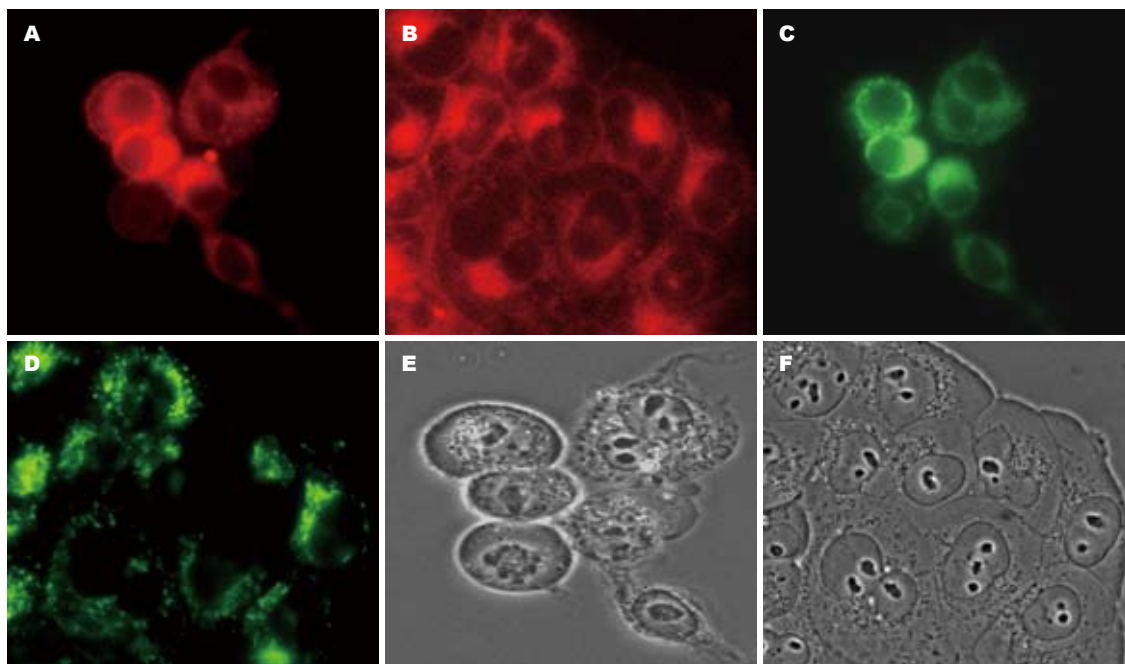
## 2 结果

2.1 ALA 产生的内源性 PpIX 和外源性 PpIX 的亚细胞分布 由于 PpIX 与蛋白质有很高的亲和能力而造成 PpIX 外分泌至细胞外介质, 我们使用含 ALA 或 PpIX 的无血清培养液处理细胞。由 ALA 产生的内源性光敏剂 PpIX 荧光主要分布在胞质内, 与 MitoTracker Green FM 显示的线粒体荧光分布在相同的区域, 说明由 ALA 产生的内源性 PpIX 主要分布于线粒体。然而外源性 PpIX 由于主要是靠渗透作用进入细胞, 其荧光信号弥漫性分布于整个细胞质, 完全区别于 MitoTracker Green FM 荧光显示的线粒体位置(图 1)。

2.2 ALA-PDT 和 PpIX-PDT 对线粒体膜电位的破坏 对照组细胞无光敏剂孵育, 仅用光处理, 测定结果发现仅有不足 10% 的细胞线粒体膜电位消失(图 2)。KYSE-450、KYSE-70 和 Het-1A 细胞经 ALA-PDT 12 h 后, 线粒体受损的细胞分别达到 22%、52% 和 33%, 而外源性 PpIX-PDT 12 h 后线粒体受损细胞率仅分别为 15%、14% 和 18%, 表明 ALA-PDT 比外源性 PpIX-PDT 更趋向于破坏线粒体。

2.3 PDT 后线粒体结构的电镜观察 由图 3 可见, ALA-PDT 后仅 1 h, 一些线粒体即已出现受损状态, 图中可见线粒体内嵴不明显, 出现空泡和膨胀。但外源性 PpIX-PDT 后 1 h, 细胞内大部分线粒体仍保持完整结构。图中显示的应用不同光敏剂而出现的线粒体形态学上的变化差异, 进一步证实 ALA-PDT 初始的细胞内损伤是源于对线粒体的破坏作用。3 种细胞系均出现相同的实验结果。

2.4 ALA-PDT 和 PpIX-PDT 对细胞的不同杀伤作用 KYSE-450 用 0.4  $\mu\text{mol/L}$  外源性 PpIX 处理、KYSE-70 和 Het-1 细胞用 0.2  $\mu\text{mol/L}$  的外源性 PpIX 处理, 能与 1  $\text{mmol/L}$  的 ALA 处理后产生相同浓度的胞内 PpIX, 以比较 ALA-PDT 和 PpIX-PDT 之间的光动力效果。细胞 PDT 处理后, 随光剂量的增强, PDT 后 24 h 细胞的存活率逐渐下降(图 4)。虽然 ALA 和外源性 PpIX 在细胞内产生相同水平的胞内 PpIX, 但 ALA-PDT 的细胞杀伤效果明显好于以外源性 PpIX 作为光敏剂的 PDT ( $P < 0.01$ ), 所有 3 种细胞均有相同的结果。由



**■应用要点**  
本研究利用能在细胞内产生内源性光敏剂PpIX的ALA和外源性PpIX作为光敏剂处理细胞, 研究不同来源的PpIX在人食管鳞癌细胞系KYSE-450、KYSE-70及人食管上皮永生细胞系Het-1A中的分布特征以及与光动力学效应的关系, 以期为新光敏剂的开发和治疗手段的改善提供实验依据。

图 1 ALA产生的内源性PpIX和外源性PpIX在KYSE-450细胞中的亚细胞分布( $\times 600$ )。A: ALA-PpIX; B: Exo-PpIX; C: MitoTracker; D: MitoTracker; E: Phase-contrast; F: Phase-contrast.

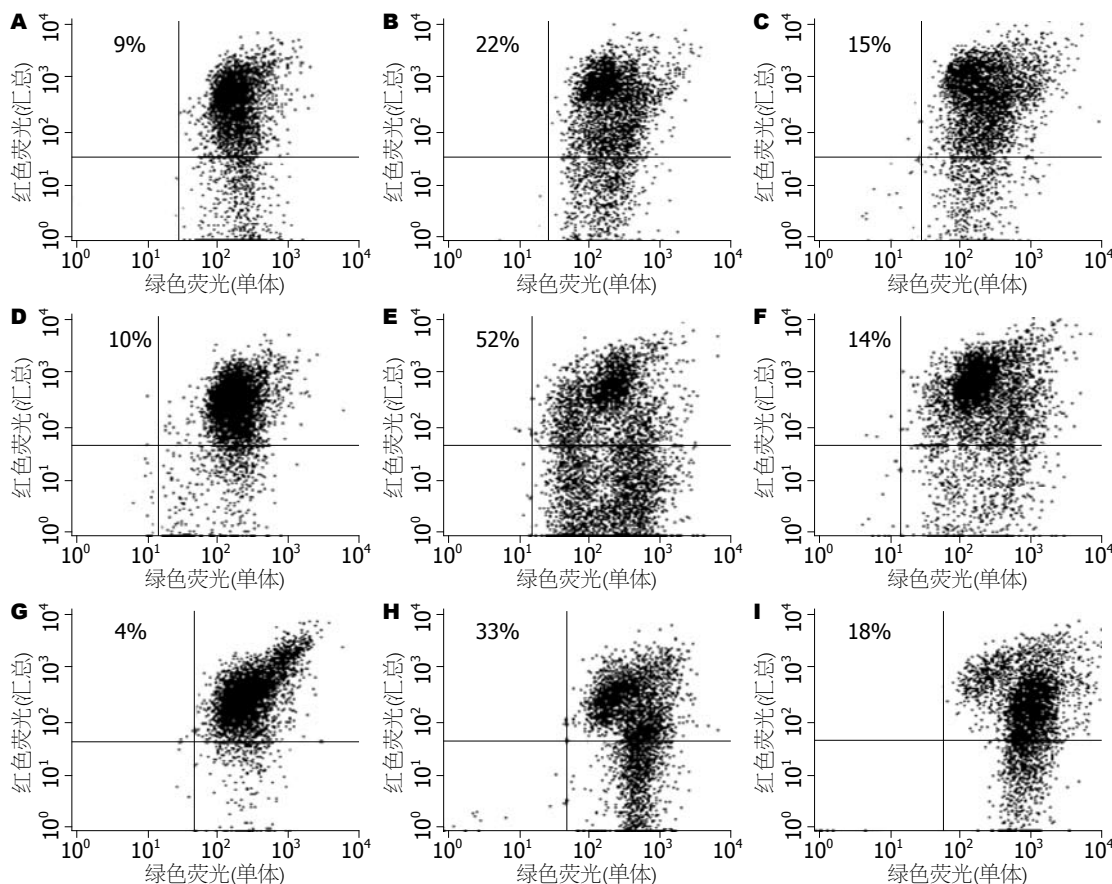


图 2 ALA-PDT和PpIX-PDT对线粒体膜电位( $\Delta\Psi_m$ )的破坏。A-C: KYSE-450; D-F: KYSE-70; G-I: Het-1A; A、D、G: 对照组; B、E、H: ALA; C、F、I: Exo-PpIX; 图中的百分数为 $\Delta\Psi_m$ 消失细胞的百分比。

于由ALA产生的内源性PpIX主要分布于线粒体, 而外源性PpIX弥漫性分布于整个细胞质, 因而

本结果提示线粒体的损伤在细胞杀伤过程中起非常重要的作用, 线粒体是PDT的一个重要

### ■名词解释

光动力学疗法: 经口服或局部应用的光敏剂能选择性积蓄于肿瘤细胞和组织内, 在分子氧的存在下, 经特定波长的可见光激发能产生单态氧和氧自由基等活性物质, 导致肿瘤细胞凋亡或坏死。

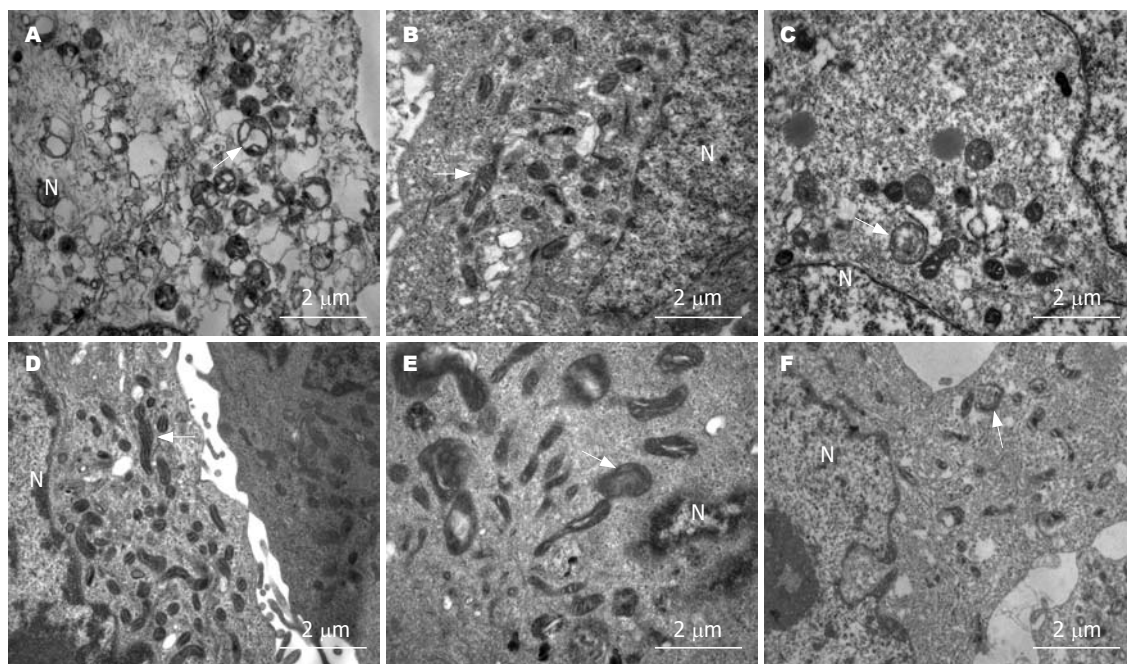


图3 电镜显示的PDT对线粒体超微结构的损伤。N: 细胞核; 箭头: 线粒体。A: KYSE-450用ALA处理; B: KYSE-450用Exo-PpIX处理; C: KYSE-70用ALA处理; D: KYSE-70用Exo-PpIX处理; E: Het-1A用ALA处理; F: Het-1A用Exo-PpIX处理。

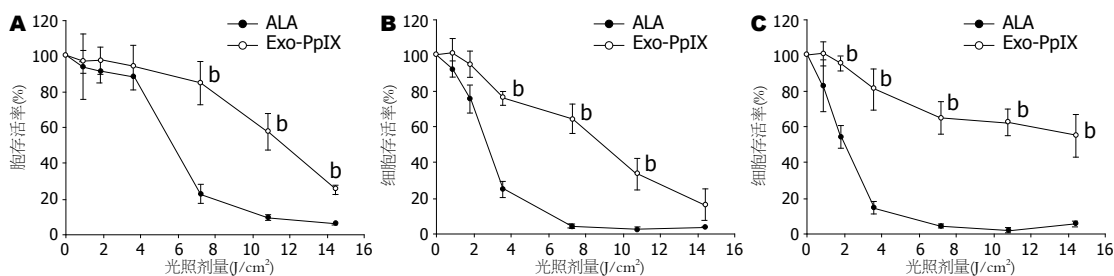


图4 ALA-PDT和PpIX-PDT后细胞的存活活性。A: KYSE-450; B: KYSE-70; C: Het-1A。<sup>b</sup>*P* < 0.01 vs ALA-PDT组。

靶细胞器。

### 3 讨论

PDT虽已被广泛应用于一些肿瘤组织及癌前病变组织的治疗<sup>[4-6]</sup>, 然而其确切机制仍不十分清楚。研究开发更理想的新光敏剂以提高PDT的临床疗效是目前PDT领域研究的重点之一<sup>[7]</sup>, 因此关于光敏剂在肿瘤组织内的不同分布方式和其亚细胞不同分布方式、光敏作用的具体靶细胞器及对光动力学效应的影响, 仍需更多的了解。ALA本身不具备光敏作用, 是内源性光敏剂PpIX前体。内源性光敏剂PpIX是细胞内血红素(Heme)生物合成的中间产物, 在线粒体内形成<sup>[8-9]</sup>。本研究利用能在细胞内产生内源性光敏剂PpIX的ALA和外源性PpIX作为光敏剂处理细胞, 观察PpIX在食管鳞癌细胞(KYSE-450、KYSE-70)和食管上皮永生细胞(Het-1A)内的亚细胞分布形式、PDT作用位点及与PDT细胞杀

伤效果之间的关系。研究发现用ALA和外源性光敏剂作用细胞后, 细胞内PpIX的分布方式明显不同。由ALA产生的内源性光敏剂PpIX主要分布在线粒体, 少部分结合于胞质膜, 而外源性PpIX由于其脂溶性的特性, 被细胞吸收后主要由渗透和扩散作用, 弥漫性分布于整个细胞质。因光敏剂受光的激发所产生的对肿瘤细胞起主要毒性作用的单态氧(singlet oxygen, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>)的寿命和扩散距离非常短(寿命小于0.05 μs, 扩散半径小于0.02 μm), 因而PDT的作用位点就仅限于光敏剂所处的位置<sup>[4,10-11]</sup>。

线粒体是细胞有氧呼吸的基地和供能的场所, 对维持细胞的生命活动功能至关重要, 而且也对细胞凋亡信号途径的起始起中心作用<sup>[12-13]</sup>, 因此不难理解线粒体应是潜在的PDT重要靶位点。线粒体具有丰富的内膜, 内膜向内凹陷形成线粒体嵴(crista), 是实现电子传递的支架, 在电子传递过程中将氧化反应的能量转变成ATP的

形式为细胞供能. 由于PDT效应对参与氧化磷酸化过程的一些成分作用, 如ATP合成酶复合体的光氧化作用(photooxidation)<sup>[10]</sup>, 导致线粒体内膜膜电位( $\Delta\Psi_m$ )消失, 氧化磷酸化解体, 能量合成能力受损, 线粒体膜的通透性增加, 转运复合孔开放释放出一些与凋亡相关的因子, 如凋亡诱导因子(AIF)、caspase和SMAC(second mitochondria-derived activator of caspases)等而启动了细胞凋亡的产生<sup>[14]</sup>. 除结合于线粒体上的光敏剂对线粒体的直接破坏外, 其他间接途径也可影响线粒体功能, 如溶酶体上的光敏剂受光激发后也能释放出某些蛋白酶, 裂解Bid产生较短的具有促凋亡活性的tBid, 参与了线粒体凋亡途径<sup>[15]</sup>. 为探讨光敏剂的不同亚细胞分布形式对线粒体的损伤及与PDT的细胞杀伤能力之间的关系, 我们分别用PpIX的前体ALA(PpIX主要产生并定位于线粒体)和造成弥漫性分布的外源性PpIX处理细胞, 结果发现ALA-PDT后出现更多的细胞线粒体膜电位去极化, 表明内源性光敏剂PpIX能更有效地破坏线粒体功能. PDT后线粒体超微结构的形态学变化如线粒体内嵴减少或消失, 出现空泡和肿胀等, 进一步证实线粒体是ALA-PDT的主要靶作用位点. 这些结果与内源性PpIX的亚细胞分布相互印证.

但在3种细胞, ALA-PDT对细胞的杀伤效果均显著高于外源性PpIX-PDT. 由于本实验使用的ALA和外源性PpIX的浓度能产生相同水平的细胞内PpIX, 因而光动力学效果的差异可能与内、外源性PpIX在细胞内的分布方式不同有关, 说明线粒体对PDT刺激更加敏感. 由于脂溶性光敏剂易于被血清中的低密度脂蛋白结合而利于运输和被肿瘤细胞吸收, 因此Barge *et al*<sup>[16]</sup>利用脂类取代基如胆固醇基(cholesteryl)和辛氧基(octyloxy)与光敏剂SiPc作用合成新的SiPc衍生物(Chol-O-SiPc和Octo-O-SiPc), 以增强其脂溶性, 发现其PDT效果大大增强. 脂类基团不仅能增强其运输能力和细胞的吸收能力, 而且能结合到与细胞凋亡和/或坏死有关的主要细胞器如线粒体, 内质网和高尔基复合体等, 推测这可能是增强PDT细胞杀伤能力的主要原因. 另外光敏物质在细胞内的定位也决定了是以凋亡为主还是以坏死为主. 因为研究发现, 结合到线粒体上的光敏剂通过释放一些凋亡诱导因子和细胞色素C能结合并活化caspase-9, caspase-9又激活caspase-3, 通过对Caspase活化DNA酶(caspase-activated dnase, CAD)的抑制子(inhibitor

of caspase-activated Dnase, ICAD)的蛋白水解作用而激活CAD<sup>[17]</sup>. 活性形式的CAD从胞质转至胞核, 引起染色质凝集和DNA片断化, 主要诱导凋亡<sup>[4,18]</sup>, 而结合到溶酶体上或胞质膜上的光敏剂, 则在受光激发后破坏细胞膜的完整结构, 造成肿胀和膜泡形成, 并破坏溶酶体膜结构, 释放出组织蛋白酶<sup>[19]</sup>, 主要以引起细胞坏死为主. 由于诱导凋亡是PDT的主要机制之一, 因此我们认为这种光敏剂不同的亚细胞定位造成的不同细胞杀伤效果可能与是否有效诱导细胞凋亡有关.

光敏剂、合适波长的光和分子氧已知是PDT效应的3个必要因素. 然而越来越多的证据表明, PDT的临床治疗效果也依赖于光敏剂在肿瘤组织和肿瘤细胞内的分布形式<sup>[2]</sup>. 线粒体由于在能量新陈代谢中的重要作用, 使其成为PDT的重要靶位点. 本研究表明光动力学效应对细胞线粒体的损伤与PpIX在细胞内的分布有关, 而且分布于线粒体的PpIX比弥漫分布于细胞质的PpIX具有更强的PDT效应. 结果提示能作用于线粒体的光敏剂是未来新光敏剂研制的重点. 因而一种光敏剂的PDT效果不能单纯靠细胞积聚程度和光激活敏感性来判断, 更重要的是在细胞内的分布位置, 研究这些光化学敏感位点与PDT的关系有助于寻找提高PDT效能的手段.

#### 4 参考文献

- 汲振余, 禹丽娜, 杨观瑞, 索振河, Nesland JM, 彭迁. 肿瘤光动力学疗法的机制. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1879-1884
- Peng Q. Editorial: photodynamic therapy and detection. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2006; 25: 1-5
- Peng Q, Nesland JM. Effects of photodynamic therapy on tumor stroma. *Ultrastruct Pathol* 2004; 28: 333-340
- 汲振余, 赵立群, 杨观瑞, 薛乐勋, 索振河, Nesland JM, 彭迁. 食管鳞癌细胞分化状态对内源性光敏剂PpIX产量的影响及对PDT的应答. 世界华人消化杂志 2006; 14: 6-11
- Juzeniene A, Peng Q, Moan J. Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis. *Photochem Photobiol Sci* 2007; 6: 1234-1245
- Dögnitz N, Salomon D, Zellweger M, Ballini JP, Gabrecht T, Lange N, van den Bergh H, Wagnières G. Comparison of ALA- and ALA hexyl-ester-induced PpIX depth distribution in human skin carcinoma. *J Photochem Photobiol B* 2008; 93: 140-148
- Wainwright M. Photodynamic therapy: the development of new photosensitisers. *Anticancer Agents Med Chem* 2008; 8: 280-291
- Kinzler I, Haseroth E, Hauser C, Rück A. Role of mitochondria in cell death induced by Photofrin-PDT and ursodeoxycholic acid by means of SLIM. *Photochem Photobiol Sci* 2007; 6: 1332-1340
- Juarranz A, Jaén P, Sanz-Rodríguez F, Cuevas J, González S. Photodynamic therapy of cancer. Basic

#### ■同行评价

本研究选题较好, 实验过程严谨, 结论可靠, 具有重要的应用价值.



- principles and applications. *Clin Transl Oncol* 2008; 10: 148-154
- 10 Tsai JC, Wu CL, Chien HF, Chen CT. Reorganization of cytoskeleton induced by 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy and its correlation with mitochondrial dysfunction. *Lasers Surg Med* 2005; 36: 398-408
- 11 Ji Z, Yang G, Shahzidi S, Tkacz-Stachowska K, Suo Z, Nesland JM, Peng Q. Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha overexpression by cobalt chloride enhances cellular resistance to photodynamic therapy. *Cancer Lett* 2006; 244: 182-189
- 12 Hilf R. Mitochondria are targets of photodynamic therapy. *J Bioenerg Biomembr* 2007; 39: 85-89
- 13 Lu Y, Jiao R, Chen X, Zhong J, Ji J, Shen P. Methylene blue-mediated photodynamic therapy induces mitochondria-dependent apoptosis in HeLa cell. *J Cell Biochem* 2008; 105: 1451-1460
- 14 Furre IE, Møller MT, Shahzidi S, Nesland JM, Peng Q. Involvement of both caspase-dependent and -independent pathways in apoptotic induction by hexaminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy in human lymphoma cells. *Apoptosis* 2006; 11: 2031-2042
- 15 Reiners JJ Jr, Caruso JA, Mathieu P, Chelladurai B, Yin XM, Kessel D. Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves Bid cleavage. *Cell Death Differ* 2002; 9: 934-944
- 16 Barge J, Decréau R, Julliard M, Hubaud JC, Sabatier AS, Grob JJ, Verrando P. Killing efficacy of a new silicon phthalocyanine in human melanoma cells treated with photodynamic therapy by early activation of mitochondrion-mediated apoptosis. *Exp Dermatol* 2004; 13: 33-44
- 17 Lechardeur D, Dougaparsad S, Nemes C, Lukacs GL. Oligomerization state of the DNA fragmentation factor in normal and apoptotic cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 40216-40225
- 18 Kessel D, Luguya R, Vicente MG. Localization and photodynamic efficacy of two cationic porphyrins varying in charge distributions. *Photochem Photobiol* 2003; 78: 431-435
- 19 Nagata S, Obana A, Gohto Y, Nakajima S. Necrotic and apoptotic cell death of human malignant melanoma cells following photodynamic therapy using an amphiphilic photosensitizer, ATX-S10(Na). *Lasers Surg Med* 2003; 33: 64-70

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 •

### 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2009-07-23/26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:2009-06-30。

#### 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,rxhnhk@sina.com或czs.xiaohua@163.com

## ω-3多不饱和脂肪酸对大鼠肝移植急性排斥反应的影响

刘燕南, 韦军民, 乔江春, 朱明炜

刘燕南, 韦军民, 乔江春, 朱明炜, 卫生部北京医院普通外科北京市 100730

刘燕南, 医学博士, 主要从事肝胆结石、肝胆胰肿瘤的外科治疗, 在肝脏移植临床与基础方面也有较深入的研究。

作者贡献分布: 刘燕南与韦军民对此文所作贡献均等; 此课题由刘燕南与韦军民设计; 研究过程由刘燕南操作完成; 研究所用新试剂由韦军民提供; 数据分析由乔江春与朱明炜完成; 本论文写作由刘燕南完成。

通讯作者: 韦军民, 主任医师, 100730, 北京市东城区东单大华路1号, 卫生部北京医院普通外科。weijunmin@263.net  
电话: 010-85136262

收稿日期: 2009-03-18 修回日期: 2009-04-15

接受日期: 2009-04-20 在线出版日期: 2009-06-08

### Effects of omega-3 fatty acid transfusion on acute rejection in rat liver transplantation

Yan-Nan Liu, Jun-Min Wei, Jiang-Chun Qiao, Ming-Wei Zhu

Yan-Nan Liu, Jun-Min Wei, Jiang-Chun Qiao, Ming-Wei Zhu, Department of General Surgery, Beijing Hospital, Beijing 100730, China

Correspondence to: Jun-Min Wei, Department of General Surgery, Beijing Hospital, 1 Dongdan Dahua Road, Dongcheng District, Beijing 100730, China. weijunmin@263.net

Received: 2009-03-18 Revised: 2009-04-15

Accepted: 2009-04-20 Published online: 2009-06-08

### Abstract

**AIM:** To discuss the effect of omega-3 fatty acid on liver function, receiver's immunologic function and acute rejection following orthotopic liver transplantation in rats.

**METHODS:** Orthotopic liver transplantation using two-cuff technique from BN (RT1n) to Lewis (RT1l) was performed in 18 rats. After transplantation, the internal jugular vein tube was catheterized and the solution was given through a micro-pump. Normal saline was given to the NS group ( $n = 6$ ), parenteral nutrition to PN group ( $n = 6$ ), and parenteral nutrition + Omega-3 fatty acid to OM group ( $n = 6$ ). At 7<sup>th</sup> day, the liver function, levels of cytokines (IL-2, IL-4, IL-10,  $\gamma$ -IFN) and pathological changes of the liver were observed. The percentage of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T lymphocytes were analyzed using flow-cytometry.

**RESULTS:** There were no significant differences among NS, PN and OM groups in liver function. In OM group, the CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T lymphocytes were significantly decreased, compared with NS group and PN group (26.86%  $\pm$  1.60% vs 31.32%  $\pm$  5.92%, 32.87%  $\pm$  2.744%; 28.65%  $\pm$  1.40% vs 30.08%  $\pm$  1.37%, 30.64%  $\pm$  1.47%; 3.89%  $\pm$  0.20% vs 4.75%  $\pm$  0.46%, 5.27%  $\pm$  0.20%; 13.31%  $\pm$  2.06% vs 22.08%  $\pm$  3.81%, 21.00%  $\pm$  3.46%, all  $P < 0.05$ ). The ratio of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> of OM group was significantly decreased, compared with the other two groups (0.94  $\pm$  0.001 vs 1.04  $\pm$  0.01, 1.07  $\pm$  0.001,  $P < 0.05$ ). The levels of IL-2 and  $\gamma$ -IFN of OM group were significantly elevated, compared with NS group and PN group (20.17  $\pm$  2.87 ng/L vs 35.47  $\pm$  8.94 ng/L, 35.92  $\pm$  3.31 g/L, 2.12  $\pm$  0.84 ng/L vs 28.30  $\pm$  6.25 ng/L, 28.38  $\pm$  11.07 ng/L, all  $P < 0.05$ ). The pathology examination showed that the rejection activity index (RAI) of OM group were significantly decreased, compared with PN group or NS group ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Omega-3 fatty acid decreases the secretion of IL-2 and  $\gamma$ -IFN, inhibits the T lymphocytes, especially the help T lymphocytes, and alleviates the acute rejection.

**Key Words:** Liver transplantation; Fatty acids; Omega-3; Graft rejection; T-lymphocytes; Cytokines

Liu YN, Wei JM, Qiao JC, Zhu MW. Effects of omega-3 fatty acid transfusion on acute rejection in rat liver transplantation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(16): 1609-1613

### 摘要

**目的:** 探讨大鼠肝移植术后应用 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸对移植肝脏功能、受体免疫功能、急性排斥反应的影响。

**方法:** 二袖套法大鼠肝移植18例, 术后颈内静脉插管, 微量泵匀速输注液体。盐水NS组( $n = 6$ )输注生理盐水, 肠外营养PN组( $n = 6$ )输注营养液, 脂肪酸OM组( $n = 6$ )输注营养液+ $\omega$ -3脂肪酸乳。术后第7天, 留取肝组织标本病理检查, 取血清检测生化指标及IL-2、IL-4、IL-10、

### ■背景资料

在大鼠心脏移植中, $\omega$ -3脂肪酸可使移植受体排斥反应减轻、延长受体存活时间及免疫抑制剂不良反应方面得以改善。本研究通过给肝移植大鼠静脉输注 $\omega$ -3脂肪酸, 观察 $\omega$ -3脂肪酸对肝脏功能、受体免疫功能、急性排斥反应的影响。

### ■同行评议者

黄志勇, 副教授, 华中科技大学同济医学院普外科

## ■ 相关报道

Ogita *et al* 术前给予受体大鼠 $\omega$ -3脂肪酸饮食, 第19天行小肠移植, 术后发现受体IL-1 $\beta$ 、TNF和IL-2表达水平较对照组降低. Schmöcker *et al* 发现在小鼠化学性肝损伤时, 给予 $\omega$ -3脂肪酸可以抑制TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、 $\gamma$ -IFN和IL-6的表达, 从而抑制炎症反应.

$\gamma$ -IFN等细胞因子含量, 余血清检测生化指标, 流式细胞检测CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T细胞和CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T细胞.

**结果:** 各组生化结果比较无统计学意义. 与NS组和PN组比较, OM组CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T细胞含量下降(26.86% $\pm$ 1.60% *vs* 31.32% $\pm$ 5.92%, 32.87% $\pm$ 2.744%; 28.65% $\pm$ 1.40% *vs* 30.08% $\pm$ 1.37%, 30.64% $\pm$ 1.47%; 3.89% $\pm$ 0.20% *vs* 4.75% $\pm$ 0.46%, 5.27% $\pm$ 0.20%; 13.31% $\pm$ 2.06% *vs* 22.08% $\pm$ 3.81%, 21.00% $\pm$ 3.46%, 均 $P$ <0.05). OM组CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>与NS组和PN组比较下降有差异(0.94 $\pm$ 0.001 *vs* 1.04 $\pm$ 0.01, 1.07 $\pm$ 0.001, 均 $P$ <0.05). OM组IL-2、 $\gamma$ -IFN含量与NS组和PN组比较下降(20.17 $\pm$ 2.87 ng/L *vs* 35.47 $\pm$ 8.94 ng/L, 35.92 $\pm$ 3.31 ng/L, 2.12 $\pm$ 0.84 ng/L *vs* 28.30 $\pm$ 6.25 ng/L, 28.38 $\pm$ 11.07 ng/L, 均 $P$ <0.05). 病理学检查移植肝排斥反应强度(RAI)评分OM组与PN组、NS组比较下降有差异(均 $P$ <0.05).

**结论:** 静脉输注 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸可以通过抑制IL-2和 $\gamma$ -IFN, 抑制T淋巴细胞, 更显著的降低CD4<sup>+</sup>辅助性T细胞比例, 减轻排斥反应.

**关键词:** 肝移植;  $\omega$ -3脂肪酸; 器官排斥; T淋巴细胞; 淋巴因子

刘燕南, 韦军民, 乔江春, 朱明炜.  $\omega$ -3多不饱和脂肪酸对大鼠肝移植急性排斥反应的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(16): 1609-1613

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1609.asp>

## 0 引言

脂肪酸是人体必须营养素, 具有广泛而重要的生物功能, 其中多不饱和脂肪酸, 尤其是 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸( $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids,  $\omega$ -3 PUFAs)可通过多种机制影响免疫细胞的功能, 对机体免疫功能有较强的调节作用, 对免疫性疾病和炎症性疾病具有治疗作用. 已经发现鱼油对心血管、肝脏、肾脏等组织器官具有保护作用<sup>[1-2]</sup>. 在大鼠心脏移植中,  $\omega$ -3脂肪酸可使移植受体排斥反应减轻、延长受体存活时间及免疫抑制剂不良反应方面得以改善<sup>[3]</sup>. 本研究通过给肝移植大鼠静脉输注 $\omega$ -3脂肪酸, 观察 $\omega$ -3脂肪酸对肝脏功能、受体免疫功能、急性排斥反应的影响.

## 1 材料和方法

1.1 材料 选用近交系健康雄性BN(RT1n)大鼠作为供

体, Lewis(RT11)大鼠为受体, 体质量200-300 g, 供、受体体质量相仿, 购自北京维通利华公司. 美国BD公司FACS Calibur流式细胞仪, 瑞士Tecan SUNRISE酶标仪, 德国Perfusor segura FT, B. Braun Melsunge AG微量输液泵. 20%力能中链链脂肪乳(250 mL含大豆油25 g、中链甘油三酸酯25 g、卵磷脂3 g)、8.5%乐凡命(18AA-II, 氨基酸含量为85 g/L)、水乐维他、安达美、维他利匹特和尤文 $\omega$ -3鱼油脂肪乳注射液为华瑞制药公司产品. 抗大鼠CD4、CD25、CD8、CD28荧光抗体购自BD公司. 大鼠IL-2、IL-4、IL-10、 $\gamma$ -IFN定量酶联检测试剂盒购自上海森雄科技实业有限公司.

## 1.2 方法

1.2.1 分组及给药: 大鼠术前测质量, 原位肝移植手术方法参照Kamada *et al*<sup>[4]</sup>的二袖套法肝移植方法. 大鼠采用随机数字表法分3组, 肝移植后6 h颈内静脉插管, 微量泵匀速输注液体. 生理盐水NS组( $n$  = 6)输注生理盐水, 速度8.9 mL/(kg·h), 不禁食. 肠外营养PN组( $n$  = 6)术后禁食水, 输注PN液, 速度8.9 mL/(kg·h), PN液配置参照马正伟 *et al*<sup>[5]</sup>的方法, PN液提供非蛋白热量为741.8 kJ/(kg·d), 氮量1.5 g/(kg·d), 非蛋白热量: 氮 = 494.5 kJ : 1 g, 糖脂供能比6 : 4. 脂肪酸OM组( $n$  = 6)术后禁食水, 输注PN和 $\omega$ -3脂肪乳液2 mL/(kg·d). 因血管吻合口出血、气栓、血栓及静脉插管并发症等技术原因而死亡的, 不进入实验.

1.2.2 肝脏病理观察: 每组术后7 d输液停止6 h后测体质量, 大鼠麻醉后剖腹, 留取肝组织标本. 用100 g/L甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 切片厚度为3-4  $\mu$ m, HE染色, 光镜下观察. 按Banff分级法计算移植肝排斥反应强度计分(rejection activity index, RAI)<sup>[6]</sup>.

1.2.3 流式细胞检测T细胞亚群: 腹主动脉取血0.5 mL, EDTA抗凝. CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T细胞测定: 取专用试管3支, 分别加入IgG-FITC、IgG-PE、CD25-PE、CD4-FITC、CD28-PE、CD8-FITC各2  $\mu$ L, 立即加入EDTA抗凝血100  $\mu$ L并充分混匀后, 室温(20 $^{\circ}$ C-25 $^{\circ}$ C)避光放置15 min, 每管加溶血剂2 mL, 充分混匀后, 室温(20 $^{\circ}$ C-25 $^{\circ}$ C)避光放置10 min, 1200 r/min离心5 min弃上清液, 用PBS洗涤2次后, 加入含10 g/L多聚甲醛的PBS 250  $\mu$ L(4 $^{\circ}$ C)待测, 1 wk内用流式细胞仪检测. 采用CellQuest软件获取数据和分析, 全淋巴细胞门, 分析门内CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>细胞亚群, 结果以

表 1 T细胞亚群含量 (%)

分组	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>
NS组	31.32 ± 5.92	30.08 ± 1.37	4.75 ± 0.46	22.08 ± 3.81
PN组	32.87 ± 2.744	30.64 ± 1.47	5.27 ± 0.20	21.00 ± 3.46
OM组	26.86 ± 1.60 <sup>a</sup>	28.65 ± 1.40 <sup>a</sup>	3.89 ± 0.20 <sup>a</sup>	13.31 ± 2.06 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 其他各组同一T细胞亚群.

表 2 三组血清IL-2、IL-4、IL-10、 $\gamma$ -IFN含量 (ng/L)

分组	IL-2	IL-4	IL-10	$\gamma$ -IFN
NS组	35.47 ± 8.94	43.45 ± 10.10	125.73 ± 28.57	28.30 ± 6.25
PN组	35.92 ± 3.31	41.53 ± 3.37	127.29 ± 5.23	28.38 ± 11.07
OM组	20.17 ± 2.87 <sup>a</sup>	31.74 ± 5.09	122.03 ± 36.00	2.12 ± 0.84 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 同组其他指标.

CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>细胞分别占淋巴细胞的百分率来表示.

1.2.4 血清学指标检测: 腹主动脉取血6-8 mL, 4°C 3000 r/min离心10 min, 取上清置于-80°C冰箱保存待测. 用双抗体夹心ABC-ELISA法测定血清IL-2、IL-4、IL-10、 $\gamma$ -IFN含量. 余血清检测生化指标.

**统计学处理** 本组数据以mean ± SD表示, 组间比较采用 $t$ 检验, 所有统计采用SPSS11.0计算机统计软件进行数据分析.

## 2 结果

2.1 体质量 术后7 d输液停止6 h后测体质量, 体质量NS组平均降低59 ± 39.9 g, PN组平均增长10.5 ± 4.7 g, OM组平均增长6.5 ± 5.9 g. NS组与PN组、OM组相比下降有差异( $P < 0.05$ ). PN与OM组比较, 没有差异( $P > 0.05$ ).

2.2 生化指标水平 ALT在NS组为65.00 ± 24.26 U/L, PN组47.50 ± 33.23 U/L, OM组37.33 ± 1.53 U/L; AST在NS组为201.33 ± 89.91 U/L, PN组303.50 ± 229.80 U/L, OM组174.33 ± 61.33 U/L; TBIL在NS组为1.03 ± 0.15  $\mu$ mol/L, PN组0.85 ± 0.07  $\mu$ mol/L, OM组0.87 ± 0.15  $\mu$ mol/L. 各组生化结果比较没有差异( $P > 0.05$ ).

2.3 T细胞亚群含量 OM组CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>T细胞与NS组比较下降有差异(26.86% ± 1.60% vs 31.32% ± 5.92%, 28.65% ± 1.40% vs 30.08% ± 1.37%, 3.89% ± 0.20% vs 4.75% ± 0.46%, 13.31% ± 2.06% vs

22.08% ± 3.81%, 均 $P < 0.05$ ), 与PN组比较下降有差异(26.86% ± 1.60% vs 32.87% ± 2.744%, 28.65% ± 1.40% vs 30.64% ± 1.47%, 3.89% ± 0.20% vs 5.27% ± 0.20%, 13.31% ± 2.06% vs 21.00% ± 3.46%, 均 $P < 0.05$ ). OM组CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比NS组和PN组降低有差异(0.94 ± 0.001 vs 1.04 ± 0.01, 1.07 ± 0.001, 均 $P < 0.05$ , 表1).

2.4 细胞因子 OM组IL-2、 $\gamma$ -IFN与NS组比较下降有差异(20.17 ± 2.87 ng/L vs 35.47 ± 8.94 ng/L, 2.12 ± 0.84 ng/L vs 28.30 ± 6.25 ng/L, 均 $P < 0.05$ ), 与PN组比较下降有差异(20.17 ± 2.87 ng/L vs 35.92 ± 3.31 ng/L, 2.12 ± 0.84 ng/L vs 28.38 ± 11.07 ng/L, 均 $P < 0.05$ ). OM组IL-4、IL-10与NS组、PN组比较降低没有差异( $P > 0.05$ , 表2).

2.5 病理评分 NS组RAI评分为7.17 ± 0.98分, PN组RAI评分为6.17 ± 0.75分, OM组RAI评分为4.33 ± 0.52分, OM组与PN组、NS组比较排斥反应减轻有差异( $P < 0.05$ , 图1).

## 3 讨论

肝移植术后排斥反应是一个以细胞免疫为主的复杂病理生理过程, T淋巴细胞在诱发肝移植术后排斥反应及诱导肝移植免疫耐受方面有着十分重要的作用. T淋巴细胞按其功能可分为多个亚群, 主要有CD4<sup>+</sup>辅助性T细胞(helper T cell, Th)、CD8<sup>+</sup>杀伤性T细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)、抑制性T细胞(suppressor T cell, Ts)和调节性T细胞(regulatory T cell, Treg). Th细胞分为Th1和Th2细胞. Th1细胞分泌IL-2、 $\gamma$ -IFN等

### ■应用要点

$\omega$ -3 PUFAs对多种免疫细胞具有抑制作用, 使其在移植免疫治疗中具有较好的应用前景.

### ■同行评价

本研究实验手段和技术路线设计合理,结果可靠,为 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸的临床应用范围提供理论基础和实验依据,具有指导和参考价值。

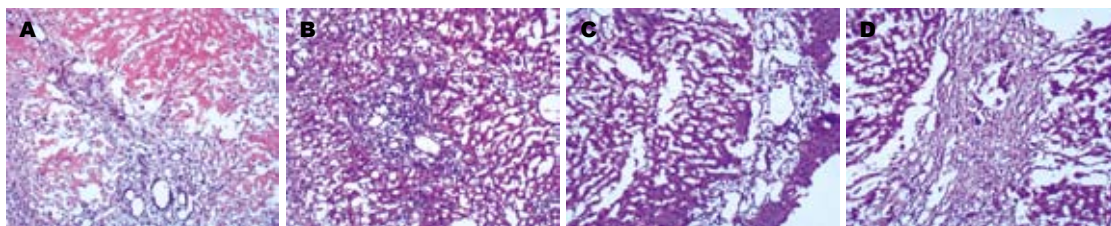


图1 移植后第7天, PN组与OM组肝脏病理变化(HE  $\times$  100)。A: PN组大量淋巴细胞浸润至小叶区并伴有肝实质细胞的大片坏死; B: PN组静脉内皮炎和胆管内皮炎; C: OM组汇管区少量淋巴细胞浸润; D: OM组肝组织结构形态完好与正常大鼠的肝脏形态结构基本接近。

细胞因子,移植后IL-2、 $\gamma$ -IFN水平的升高是与急性排斥反应密切相关<sup>[7-8]</sup>。Th2细胞主要分泌IL-4、IL-10等细胞因子,可以诱导特异性细胞免疫耐受<sup>[9-10]</sup>。Treg为CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T细胞,他可以抑制效应性T细胞的增殖及其细胞因子和抗体的产生,发挥免疫调节作用<sup>[11]</sup>。CTL可以通过释放颗粒酶、穿孔素和Fas/FasL途径诱导细胞凋亡,特异性直接杀伤靶细胞,参与急性排斥反应<sup>[12]</sup>。CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> Ts细胞可以抑制抗原呈递细胞的活化,对活化的CD4<sup>+</sup> T细胞进行了抑制,从而诱导免疫耐受的形成。Liu *et al*<sup>[13]</sup>在研究大鼠肝移植急性排斥反应过程中,给急性排斥大鼠输注CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> TS细胞可以显著抑制肝脏急性排斥反应。

近期的研究发现, $\omega$ -3 PUFAs对多种免疫细胞具有抑制作用,使其在移植免疫治疗中具有较好的应用前景。 $\omega$ -3脂肪酸影响免疫细胞功能的机制包括: $\omega$ -3脂肪酸能置换细胞膜磷脂中的花生四烯酸,竞争环氧合酶和脂氧合酶从而减少来源于花生四烯酸的炎性介质,减轻炎症反应。 $\omega$ -3脂肪酸也可通过改变细胞膜磷脂脂肪酸构成来影响细胞膜流动性及膜上相关信号分子、酶、受体的功能,从而改变信号传导过程。此外通过影响酶或细胞因子的基因表达、抑制促炎症因子产生、调节黏附分子表达来调节免疫功能<sup>[14]</sup>。

实验证实 $\omega$ -3脂肪酸可以在体内、体外抑制多种细胞因子的表达。Ogita *et al*<sup>[15]</sup>术前给予受体大鼠 $\omega$ -3脂肪酸饮食,第19天行小肠移植,术后发现受体IL-1 $\beta$ 、TNF和IL-2表达水平较对照组降低。Schmöcker *et al*<sup>[16]</sup>发现在小鼠化学性肝损伤时,给予 $\omega$ -3脂肪酸可以抑制TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、 $\gamma$ -IFN和IL-6的表达,从而抑制炎症反应。Alexander *et al*<sup>[17]</sup>总结在体内、体外,鱼油可以抑制IL-2、IL-4、IL-10、 $\gamma$ -IFN的分泌。但也有人发现,鱼油喂养的小鼠脾细胞在有丝分裂原

刺激时较对照组 $\gamma$ -IFN分泌显著减少,IL-4分泌减少但没有统计学差异<sup>[18]</sup>。我们的研究也发现肝移植术后给予输注 $\omega$ -3脂肪酸,细胞因子IL-2和 $\gamma$ -IFN分泌较NS组和PN组显著降低,而细胞因子IL-4和IL-10分泌较NS组和PN组降低,但没有统计学意义。说明 $\omega$ -3脂肪酸可以抑制移植术后Th1细胞因子IL-2和 $\gamma$ -IFN的分泌。

Grimm *et al*在大鼠心脏移植中,实验组给予鱼油(富含 $\omega$ -3脂肪酸)强化的脂肪乳剂,而不进行免疫抑制剂干预<sup>[19-20]</sup>。结果显示,实验组移植物存活时间显著延长,与急性排斥反应密切相关的IL-6明显减少,外周血T细胞数显著下降,免疫组织化学发现,移植体内多形核中性粒细胞、巨噬细胞、NK细胞、T细胞及B细胞的浸润下降了50%以上。他们认为给予鱼油后,特异性免疫细胞的活化以及向移植体内的浸润和增殖明显受抑制,这可以用体内细胞因子的产生减少来解释,而这些细胞数的下降反过来又使细胞因子的产生进一步减少。同样的结果也见于大鼠肾脏移植,Kort *et al*<sup>[21]</sup>发现肾脏移植后早期口服鱼油,可以改善移植肾功能、降低排斥死亡率。在临床肾移植中,van der Heide *et al*<sup>[22]</sup>给肾移植术后患者口服鱼油1年,环孢霉素A剂量与对照组相同,发现鱼油组急性排斥发生率降低,1年存活率延长。我们的组织病理学显示,给予 $\omega$ -3脂肪酸后OM组排斥反应较对照NS组和PN组减轻,但不能完全逆转排斥反应。同时我们发现,OM组CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T细胞与对照NS组、PN组比较均显著降低,说明 $\omega$ -3脂肪酸可以明显抑制移植术后外周血T淋巴细胞各亚群,这可能与IL-2分泌受抑制有关。而实验OM组CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>下降显著,表明 $\omega$ -3脂肪酸对CD4<sup>+</sup> Th细胞亚群抑制更明显,进一步减少IL-2、 $\gamma$ -IFN分泌,抑制T淋巴细胞的增殖、活化,从而减轻了对靶器官的杀伤,起到减轻排斥反应的作用。而TS和Treg细胞与 $\omega$ -3脂

肪酸减轻大鼠肝移植排斥反应的效应无关。

我们的研究中也发现, 与PN组、OM组相比, NS组大鼠术后体质量减轻较明显, 与肝移植术后, 大鼠进食较差, 而肠外营养可以很好补充营养, PN组、OM组大鼠术后体质量增加明显。 $\omega$ -3脂肪酸对术后生化指标没有显著影响。

$\omega$ -3 PUFAs不仅可以作为营养支持物质提供能量, 而且他可以通过抑制Th1类细胞因子IL-2和 $\gamma$ -IFN, 抑制T淋巴细胞亚群, 更显著地降低Th细胞比例, 减轻排斥反应。 $\omega$ -3 PUFAs目前已经开始在临床移植中研究和应用。可以预见, $\omega$ -3 PUFAs在器官移植中将有广泛的应用前景。

#### 4 参考文献

- Bonis PA, Chung M, Tatsioni A, Sun Y, Kupelnick B, Lichtenstein A, Perrone R, Chew P, DeVine D, Lau J. Effects of omega-3 fatty acids on organ transplantation. *Evid Rep Technol Assess (Summ)* 2005; : 1-11
- 张鸣, 李波.  $\omega$ -3多不饱和脂肪酸的免疫调节作用及其在器官移植中的应用. *中国普外基础与临床杂志* 2007; 14: 497-501
- Alexander JW. Role of immunonutrition in reducing complications following organ transplantation. *Transplant Proc* 2000; 32: 574-575
- Kamada N, Calne RY. A surgical experience with five hundred thirty liver transplants in the rat. *Surgery* 1983; 93: 64-69
- 马正伟, 刘利东, 李昆, 张玉君, 陈利均, 董家鸿. 肝移植大鼠肠外营养模型的建立与评价. *第三军医大学学报* 2004; 26: 2054-2056
- Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document. *Hepatology* 1997; 25: 658-663
- Boleslawski E, Conti F, Sanquer S, Podevin P, Chouzenoux S, Batteux F, Houssin D, Weill B, Calmus Y. Defective inhibition of peripheral CD8+ T cell IL-2 production by anti-calcineurin drugs during acute liver allograft rejection. *Transplantation* 2004; 77: 1815-1820
- Wang YL, Tang ZQ, Gao W, Jiang Y, Zhang XH, Peng L. Influence of Th1, Th2, and Th3 cytokines during the early phase after liver transplantation. *Transplant Proc* 2003; 35: 3024-3025
- He XY, Chen J, Verma N, Plain K, Tran G, Hall BM. Treatment with interleukin-4 prolongs allogeneic neonatal heart graft survival by inducing T helper 2 responses. *Transplantation* 1998; 65: 1145-1152
- Tashiro H, Shinozaki K, Yahata H, Hayamizu K, Okimoto T, Tanji H, Fudaba Y, Yamamoto H, Fan X, Ito H, Asahara T. Prolongation of liver allograft survival after interleukin-10 gene transduction 24-48 hours before donation. *Transplantation* 2000; 70: 336-339
- Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 531-562
- 王琳, 窦科峰. T淋巴细胞与肝移植免疫. *国外医学·外科学分册* 2005; 32: 339-342
- Liu Y, Chen N, Chen G, You P. The protective effect of CD8+CD28- T suppressor cells on the acute rejection responses in rat liver transplantation. *Transplant Proc* 2007; 39: 3396-3403
- 夏延平, 苏宜香. n-3多不饱和脂肪酸影响炎症及免疫分子机制研究进展. *现代免疫学* 2004; 24: 517-519
- Ogita K, Suita S, Taguchi T, Yamanouchi T, Nakamura M, Taguchi S, Nishimoto Y, Uesugi T. Effects of omega-3 fatty acids in rat allogeneic small intestinal transplantation. *Pediatr Surg Int* 2003; 19: 157-161
- Schmöcker C, Weylandt KH, Kahlke L, Wang J, Lobeck H, Tiegs G, Berg T, Kang JX. Omega-3 fatty acids alleviate chemically induced acute hepatitis by suppression of cytokines. *Hepatology* 2007; 45: 864-869
- Alexander JW. Immunonutrition: the role of omega-3 fatty acids. *Nutrition* 1998; 14: 627-633
- Wallace FA, Miles EA, Evans C, Stock TE, Yaqoob P, Calder PC. Dietary fatty acids influence the production of Th1- but not Th2-type cytokines. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 449-457
- Grimm H, Tibell A, Norrlind B, Schott J, Bohle RM. Nutrition and allojection impact of lipids. *Transpl Immunol* 1995; 3: 62-67
- Grimminger F, Grimm H, Führer D, Papavassilis C, Lindemann G, Blecher C, Mayer K, Tabesch F, Krämer HJ, Stevens J, Seeger W. Omega-3 lipid infusion in a heart allotransplant model. Shift in fatty acid and lipid mediator profiles and prolongation of transplant survival. *Circulation* 1996; 93: 365-371
- Kort WJ, de Keijzer MH, Hekking-Weijma I, Vermeij M. Dietary fatty acids and kidney transplantation in the rat. *Ann Nutr Metab* 1991; 35: 148-157
- van der Heide JJ, Bilo HJ, Donker JM, Wilmink JM, Tegzess AM. Effect of dietary fish oil on renal function and rejection in cyclosporine-treated recipients of renal transplants. *N Engl J Med* 1993; 329: 769-773

编辑 李军亮 电编 何基才

# $p21^{WAF1}$ 基因对人胰腺癌细胞系 BxPC-3 增殖的抑制作用

张学彦, 姜仪增, 刘志强, 景德怀, 关景明, 刘伟

## ■背景资料

$p21$  是细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 (CKI) 家族成员, 是胰腺癌中经常失活的基因, 与胰腺癌的发生、发展密切相关。P21 蛋白抑制 DNA 复制必需因子-增殖细胞核抗原 (PCNA) 和各种 Cyclin-CDK 复合物, 使得增殖细胞在  $G_1$  向 S 期过渡受阻。

张学彦, 刘志强, 景德怀, 关景明, 哈尔滨医科大学附属二院消化科, 黑龙江省哈尔滨市 150086

姜仪增, 科尔沁区第一人民医院消化科 内蒙古自治区通辽市 028000

刘伟, 哈尔滨医科大学附属二院分子实验中心 黑龙江省哈尔滨市 150086

张学彦, 副主任医师, 医学博士, 主要从事消化系统肿瘤的防治研究。

黑龙江省科技计划攻关重点项目基金资助项目, No. GB05C401-09

黑龙江省教育厅科学技术研究基金资助项目, No. 11521191

黑龙江省卫生厅科研基金资助项目, No. 2007-304

作者贡献分布: 此课题由张学彦与关景明设计; 研究过程由张学彦、姜仪增、刘志强、景德怀及刘伟操作完成; 研究所用试剂及分析工具部分由刘伟提供; 数据分析与论文写作由张学彦完成。

通讯作者: 张学彦, 副主任医师, 150086, 黑龙江省哈尔滨市学府路 246 号, 哈尔滨医科大学附属二院消化科。zycxw@sina.com

电话: 0451-86605143

收稿日期: 2009-02-28 修回日期: 2009-04-30

接受日期: 2009-05-05 在线出版日期: 2009-06-08

## Inhibitory effect of $p21^{WAF1}$ gene transfection on proliferation of human pancreatic cancer cell line BxPC-3

Xue-Yan Zhang, Yi-Zeng Jiang, Zhi-Qiang Liu, De-Huai Jing, Jing-Ming Guan, Wei Liu

Xue-Yan Zhang, Zhi-Qiang Liu, De-Huai Jing, Jing-Ming Guan, Department of Gastroenterology, the Second Hospital Affiliated to Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Yi-Zeng Jiang, Department of Gastroenterology, the Kerqin First People's Hospital, Tongliao 028000, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Wei Liu, Center of Molecular Biology Experiments, the Second Hospital Affiliated to Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Supported by: the Science and Technology Plan Tackle Key Problem Emphases Item Foundation of the Science and Technology Office Heilongjiang Province, No. GB05C401-09; the Scientific Research Foundation of the Education Office Heilongjiang Province, No. 11521191; and the Scientific Research Foundation of the Sanitation Office Heilongjiang Province, No. 2007-304

Correspondence to: Dr. Xue-Yan Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, 246 Xuefu Road, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. zycxw@sina.com

Received: 2009-02-28 Revised: 2009-04-30

Accepted: 2009-05-05 Published online: 2009-06-08

## ■同行评议者

刘海林, 主任医师, 上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科; 陈其奎, 教授, 中山大学附属第二医院消化内科

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of  $p21^{WAF1}$  ( $p21$ ) gene transfection on the proliferation of human

pancreatic cancer line BxPC-3.

**METHODS:** According to the different transfected plasmid and whether the transfection was performed, 3 groups were formed. For  $p21$  transfection group, pCDNA3.1 (+)- $p21$  was transfected into BxPC-3 cell by the vector of Lipofectamine2000. For empty plasmid transfection group, pCDNA3.1 (+)-neo plasmid was transfected into BxPC-3 cell with the same method as the blank control group. For non-transfection group, the BxPC-3 cell was not transfected as the negative control group. The expression of  $p21$  was evaluated using RT-PCR and Western blot. The proliferation and apoptosis were determined by MTT, flow cytometry and transmission electron microscopy.

**RESULTS:** After transfection, the expression of  $p21$  mRNA and P21 protein was up regulated, and the cell growth was decreased. High protein expression of P21 BxPC-3 cell cycle was arrested at  $G_1/S$  phase, the population of  $G_1$  phase was significantly increased, compared with the empty plasmid transfection group or the non-transfection group ( $59.887\% \pm 3.700\%$  vs  $47.443\% \pm 6.354\%$ ,  $49.223\% \pm 2.226\%$ ,  $P < 0.05$ ), the S phase population was significantly decreased ( $21.277\% \pm 2.080\%$  vs  $35.247\% \pm 3.966\%$ ,  $36.013\% \pm 1.540\%$ ,  $P < 0.01$ ), and a Sub- $G_1$  peak (apoptosis peak) appeared. Cell apoptosis by transmission electron microscopy was observed in the pCDNA3.1 (+)- $p21$  transfection group BxPC-3 cells.

**CONCLUSION:** After  $p21$  gene transfection, BxPC-3 cell proliferation is significantly arrested and apoptosis could be induced *in vitro*.

**Key Words:**  $p21^{WAF1}$ ; Gene transfection; Pancreatic cancer

Zhang XY, Jiang YZ, Liu ZQ, Jing DH, Guan JM, Liu W. Inhibitory effect of  $p21^{WAF1}$  gene transfection on proliferation of human pancreatic cancer cell line BxPC-3. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(16): 1614-1620

## 摘要

**目的:** 探讨  $p21^{WAF1}$  ( $p21$ ) 基因转染对人胰腺癌

细胞系 BxPC-3 细胞增殖的影响。

**方法:** 根据转染质粒的不同和是否进行质粒转染分为 3 组,  $p21$  转染组、空载体转染组和未转染组。应用 RT-PCR 和 Western blot 方法检测转染细胞的  $p21$  基因表达变化; 流式细胞仪分析细胞周期变化, 用 MTT、流式细胞仪和透射电镜检测转染外源  $p21$  基因对 BxPC-3 细胞增殖和凋亡的影响。

**结果:**  $p21$  转染组细胞存在  $p21$  mRNA 高表达和 P21 蛋白高表达;  $p21$  转染组细胞生长速度低于对照空载体转染组和未转染组; 流式细胞仪观察到 P21 蛋白高表达使 BxPC-3 细胞发生  $G_1/S$  阻滞,  $G_1$  期细胞比例显著高于空载体组和未转染组 ( $59.887\% \pm 3.700\%$  vs  $47.443\% \pm 6.354\%$ ,  $49.223\% \pm 2.226\%$ ,  $P < 0.05$ ), S 期显著低于空载体组和未转染组 ( $21.277\% \pm 2.080\%$  vs  $35.247\% \pm 3.966\%$ ,  $36.013\% \pm 1.540\%$ ,  $P < 0.01$ ), 并出现亚  $G_1$  峰(凋亡峰)。透射电镜亦发现  $p21$  转染组发生细胞凋亡。

**结论:**  $p21$  基因转染可以抑制人胰腺癌细胞系 BxPC-3 细胞增殖并能诱导其发生细胞凋亡。

**关键词:**  $p21^{WAF1}$ ; 基因转染; 胰腺癌

张学彦, 姜仪增, 刘志强, 景德怀, 关景明, 刘伟.  $p21^{WAF1}$  基因对人胰腺癌细胞系 BxPC-3 增殖的抑制作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(16): 1614-1620

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1614.asp>

## 0 引言

$p21^{WAF1}$  ( $p21$ ) 是近年来发现的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(cyclin-dependent kinase inhibitors, CKI)家族成员, 可与 cyclin-CDK 复合物结合, 抑制其活性并诱导细胞周期阻滞<sup>[1]</sup>。已证实胰腺癌的发生与  $p21$  基因表达降低有关。为探讨恢复  $p21$  表达是否有抑制人胰腺癌细胞增殖的作用, 我们采用脂质体介导将  $p21$  转染到人胰腺癌细胞系 BxPC-3 中, 以研究其对胰腺癌细胞生长的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 委托上海生工公司全基因合成  $p21$  的插入片段, 克隆构建  $p21$  真核表达质粒 pCDNA3.1(+)- $p21$ 。BxPC-3 细胞株购自中国科学院上海细胞所。TRIzol 试剂盒是 Gibco 公司产品, Taq 酶为上海生工公司产品, 逆转录试剂盒、限制性内切酶、转染级质粒中量提取试剂盒为 Promega

公司产品。  $p21$  小鼠抗人单抗为 Neo Markers 公司产品。辣根酶标山羊抗小鼠 IgG 为北京中杉金桥公司产品。Actin beta(ACTB) 抗体和 Western blot 发光试剂为 Santa Cruz 公司产品。脂质体 Lipofectamine2000 购于 Invitrogen 公司。T4 连接酶是 MBI 公司产品。凝胶回收试剂盒为上海生工公司产品。引物由上海生工公司合成, 并进行质粒测序。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养:** 人胰腺癌 BxPC-3 细胞系在  $37^{\circ}\text{C}$  50 mL/L  $\text{CO}_2$  饱和湿度条件下, 用含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养传代, 取对数生长期细胞进行相关实验。

**1.2.2  $p21$  真核表达质粒的克隆:** 委托上海生工公司制备  $p21$  的插入片段, 两端设计添加 BamH I 和 EcoR I 酶切位点, 对此插入片段和 pCDNA3.1(+)-空载体进行 BamH I 和 EcoR I 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳, 回收酶切产物, 使用 T4 DNA 连接酶连接  $p21$  目的片段和 pCDNA3.1(+)-载体, 称为 pCDNA3.1(+)- $p21$ , 将其转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 挑取单克隆, 双酶切鉴定后用 pCDNA3.1(+)-载体的测序引物 T7 测序。

**1.2.3 RT-PCR 检测 BxPC-3 细胞  $p21$  mRNA 表达:** 用 TRIzol 试剂盒提取细胞总 RNA。逆转录 cDNA 第一链合成: 反应体系 20  $\mu\text{L}$ , 含随机引物 0.5  $\mu\text{g}$ , 逆转录酶 200 U, RNA 1.0  $\mu\text{g}$ , dNTP 0.5 mmol/L, Rnasin 20 U,  $37^{\circ}\text{C}$  60 min,  $95^{\circ}\text{C}$  5 min。PCR 反应: 反应体系 25  $\mu\text{L}$ , 含  $\text{Mg}^{2+}$  2.5 mmol/L, dNTP 0.5 mmol/L, cDNA 2  $\mu\text{L}$ , TaqDNA 合成酶 2 U, 上下游引物各 0.4  $\mu\text{mol/L}$ 。  $p21$  引物(退火  $56^{\circ}\text{C}$ , 产物 218 bp): 上游 5'-TGTCGGTCAGAACCCATG-3', 下游: 5'-GTGGGAAGGTAGAGCTTGG-3'。  $\beta$ -actin 引物(退火  $56^{\circ}\text{C}$ , 产物 100 bp): 上游: 5'-CC CAGCACAATGAAGATCAAGATCAT-3', 下游 5'-ATCTGCTGGAAGGTGGACAGCGA-3'。反应 35 个循环。产物经 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 照相。

**1.2.4 基因转染:** (1) 分组: 根据转染质粒的不同和是否进行质粒转染分为 3 组, 每组 3 个样本。  $p21$  转染组: 采用 Lipofectamine2000 脂质体介导转染, 将 pCDNA3.1(+)- $p21$  真核表达质粒导入 BxPC-3 细胞; 空载体转染组: 用 pCDNA3.1(+)-neo 空载体以上述相同方法转染, 作为阴性对照; 未转染组: 不进行转染的同期培养的 BxPC-3 细胞, 作为空白对照。(2) 转染方法: 按照 Lipofectamine2000 说明书进行。采用 6 孔板转染细胞, 每孔用 2 mL 无抗生素生长培养基

### ■ 研发前沿

针对细胞周期进行的抗肿瘤治疗是研究热点, 基因治疗是抗肿瘤治疗的发展方向, 亟待研究的问题是选择何种恰当、有效的基因, 以何种安全、方便、有效的方式导入受体。



### ■ 相关报道

陆澄 *et al* 及杨勇 *et al* 发现 *p21* 基因失活在胰腺癌发生发展机制中起着重要作用, 认为 *p21* 的缺失是胰腺癌的早期事件, *p21* 对胰腺癌的转移有明显的抑制作用. Wang *et al* 发现 FoxM1 siRNA 通过增强 *p21* 表达而抑制了胰腺癌的侵袭力和血管生成.

含  $5 \times 10^5$  个细胞制板, 每孔用  $5 \mu\text{g}$  DNA,  $15 \mu\text{L}$  Lipofectamine2000. 转染48 h后加入G418终浓度为400 mg/L的选择培养基. 每2-4 d更换培养基, 4 wk后挑选阳性克隆扩大培养. (3)转染细胞 *p21* 基因检测: RT-PCR检测 *p21* 基因方法同上. Western blot检测外源P21蛋白. 提取细胞总蛋白, 用Bradford法定量.  $50 \text{ g/L}$  积层胶、 $120 \text{ g/L}$  SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 进行一抗、酶标二抗孵育和显色, 并照相.

1.2.5 生长曲线(MTT法): 取对数生长期细胞按  $3 \times 10^6/\text{L}$  接种96孔板, 每孔加入MTT溶液( $5 \text{ g/L}$ )  $20 \mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  温育4 h, 每孔加入  $180 \mu\text{L}$  二甲基亚砜, 振荡10 min, 选490 nm波长, 在酶标仪上测定吸光度值, 每隔24 h测定1次, 连续测定7 d, 绘制细胞生长曲线, 计算生长抑制率. 生长抑制率 = (对照组A值-实验组A值)/对照组A值  $\times 100\%$ .

1.2.6 流式细胞仪检测: 取各组细胞, 每组  $1 \times 10^6$  个细胞, 用磷酸缓冲液(PBS)洗2次, 加入  $700 \text{ mL/L}$  冷乙醇  $4^\circ\text{C}$  固定24 h, PBS洗2次, 用RNA酶( $50 \text{ mg/L}$ )于  $37^\circ\text{C}$  处理30 min, 加碘化丙啶( $100 \text{ mg/L}$ )染色, 避光30 min, 进行流式细胞仪测定.

1.2.7 透射电镜: 取各组细胞, 每组  $1 \times 10^6$  个细胞, 用PBS洗2次,  $1500 \text{ r/min}$  离心10 min, 加入  $30 \text{ g/L}$  戊二醛固定1 wk, 按常规制备电镜标本, 送透射电镜检测.

**统计学处理** 数据以  $\text{mean} \pm \text{SD}$  表示, 应用SPSS11.0统计软件, 采用单因素方差分析, 多个均数之间两两比较 *q* 检验.

## 2 结果

### 2.1 pcDNA3.1(+)-*p21* 质粒鉴定

2.1.1 限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切鉴定: 重组质粒约5.9 kb, 双酶切后产生约5.4 kb、471 bp的2个片段, 分别为pcDNA3.1(+)载体及目的片段, 证明已将目的基因克隆入pcDNA3.1(+)载体(图1).

2.1.2 测序鉴定结果: 测序结果与GenBank比对, 证明pcDNA3.1(+)中插入片段为Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor 1A(*p21*, Cip1)(CDKN1A), transcript variant 1, mRNA. NM\_000389.2; GI: 17978496. 无碱基序列突变(图2).

2.2 BxPC-3细胞及转染细胞 *p21* 基因表达检测 RT-PCR发现未转染组和空载体转染BxPC-3细胞 *p21* 基因mRNA低表达, 而在 *p21* 转染细胞中 *p21* 基因mRNA高表达, 扩增得到218 bp片段, 可

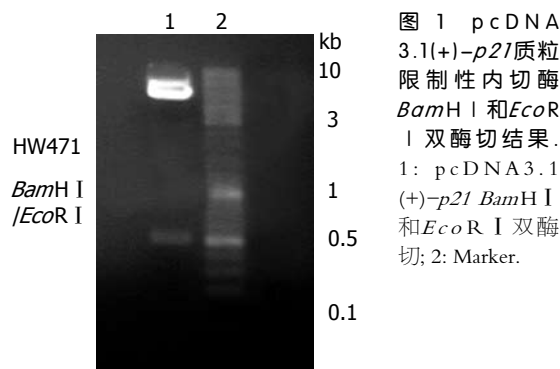


图1 pcDNA3.1(+)-*p21*质粒限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切结果. 1: pcDNA3.1(+)-*p21* *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切; 2: Marker.

证明 *p21* 已成功转染入受体癌细胞并可高表达(图3). Western blot证实未转染和空载体转染组P21蛋白低表达, *p21* 转染组P21蛋白高表达, 可证明 *p21* 已成功转染入受体癌细胞并可高表达(图4).

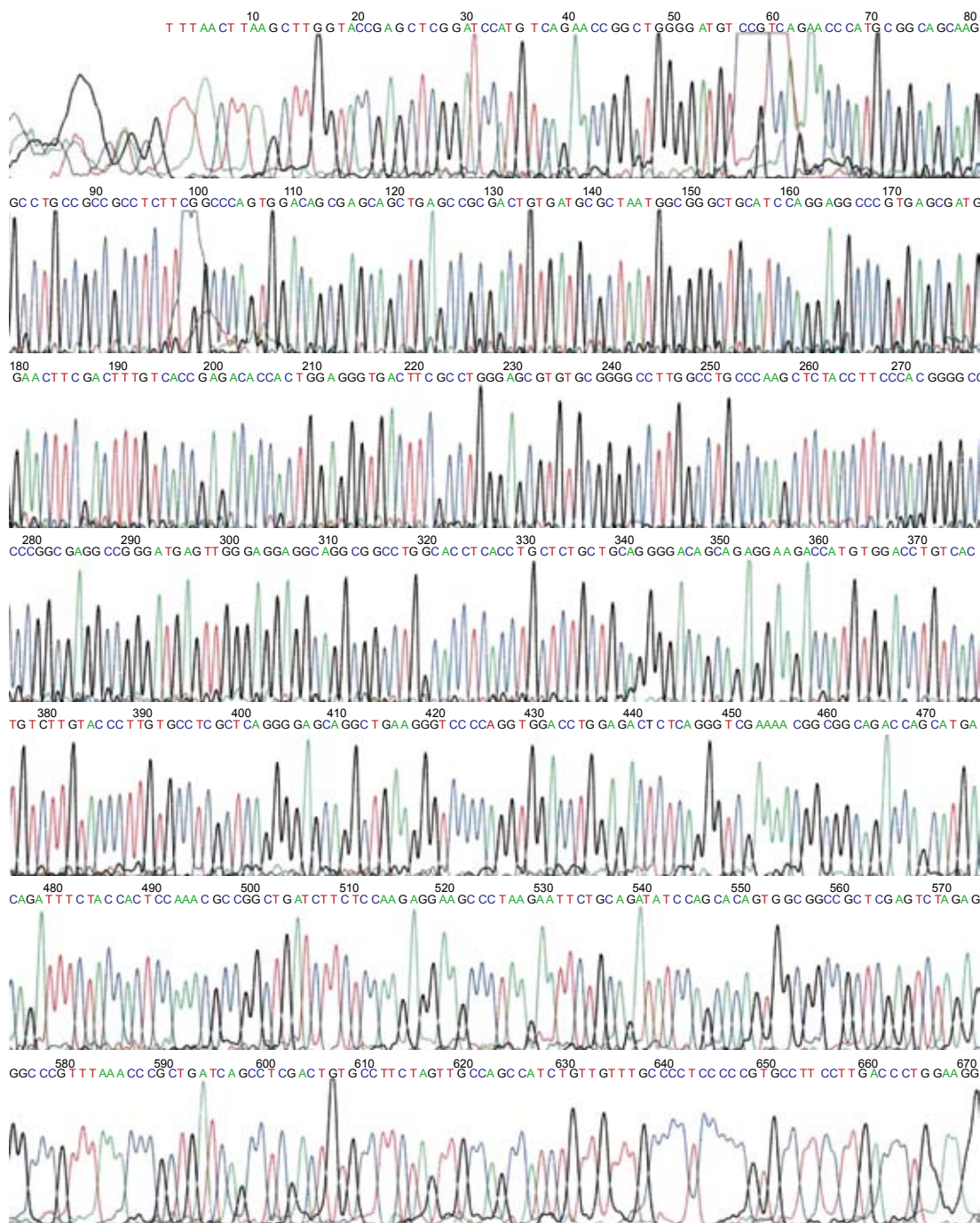
2.3 生长曲线 空载体转染组和未转染组细胞的生长曲线较为接近, 而 *p21* 转染组细胞的生长曲线则位于前两者的下方, 说明neo转染后其增殖特性未受影响, 细胞在转染 *p21* 基因后其增殖特性受到抑制. 在第3天增殖开始被抑制, 生长抑制率为25.9%, 随时间延长抑制率逐渐升高, 至第7天生长抑制率达48.2%(图5).

2.4 细胞周期 P21蛋白高表达使BxPC-3细胞发生  $G_1/S$  阻滞,  $G_1$  期细胞比例显著高于空载体组和未转染组( $59.887\% \pm 3.700\%$  vs  $47.443\% \pm 6.354\%$ ,  $49.223\% \pm 2.226\%$ ,  $P < 0.05$ ), S期比例显著低于空载体组和未转染组( $21.277\% \pm 2.080\%$  vs  $35.247\% \pm 3.966\%$ ,  $36.013\% \pm 1.540\%$ ,  $P < 0.01$ ), 并出现亚  $G_1$  峰(凋亡峰)(图6, 表1).

2.5 细胞形态学变化 倒置显微镜可见细胞生长受到抑制, 细胞传代时间延长, 核分裂相减少, 细胞数量相对较少, 可见部分细胞缩小、变圆, 自瓶壁脱落, 悬浮于培养液中, 未转染组和空载体转染组细胞相比无明显差别, 生长旺盛, 贴壁良好, 细胞密度相对较大. 透射电镜可见空白对照及空载体转染组细胞生长状态较好, 未见凋亡形态学改变, 核浆比例大, 圆形核仁多, 细胞表面绒毛密集排列, 双层核膜结构清晰, 胞质内有丰富的游离核蛋白体. *p21* 转染组可见部分细胞发生凋亡, 细胞体积变小, 表面绒毛消失, 核固缩, 染色质形成高密度斑块. 细胞质内出现大量脂滴, 部分线粒体出现髓样变, 游离核糖体减少(图7).

## 3 讨论

胰腺癌是常见的消化系统恶性肿瘤之一, 严重



■ 创新盘点

本研究将 *p21* 转染到人胰腺癌细胞系 BxPC-3, 研究其对胰腺癌细胞生长的影响, 探讨恢复 *p21* 表达是否有抑制人胰腺癌细胞增殖的作用, 这可能是胰腺癌基因治疗的一种新途径。

图 2 pcDNA3.1(+)-*p21* 测序结果.

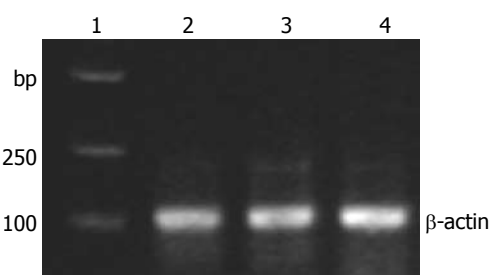
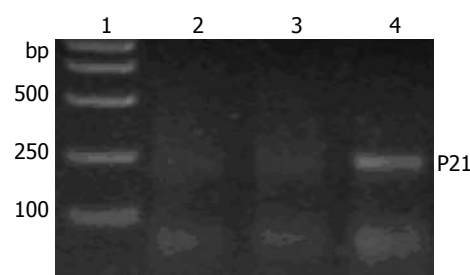


图 3 BxPC-3 细胞 *p21* mRNA 表达. 1: Marker; 2: 未转染组; 3: 空载体转染组; 4: *p21* 转染组.

威胁人类健康, 其临床特点是恶性度高, 侵袭力强, 普遍对化疗药耐药, 病死率高<sup>[2]</sup>. 我国胰腺癌

的发病率逐年升高, 因此, 探索其基因治疗是当今攻克癌症的主要研究方向, 探寻胰腺癌新的

■应用要点

本研究提示*p21*转染对胰腺癌有明显的生长抑制作用并能诱导细胞凋亡, *p21*转染的优点是其片段长度小, 克隆和转染操作比较方便, 是具有应用前景的基因治疗的很好的靶基因.

表 1 *p21*转染对BxPC-3细胞周期的影响 (% , mean ± SD)

分组	细胞周期百分比			
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub> /M	S	凋亡率
未转染组	49.223 ± 2.226	14.763 ± 5.860	36.013 ± 1.540	0.085 ± 0.074
空载体转染组	47.443 ± 6.354	17.310 ± 3.703	35.247 ± 3.966	0.105 ± 0.059
<i>p21</i> 转染组	59.887 ± 3.700 <sup>a</sup>	18.837 ± 5.778	21.277 ± 2.080 <sup>b</sup>	10.907 ± 2.278 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 空载体转染组, 空白对照组.

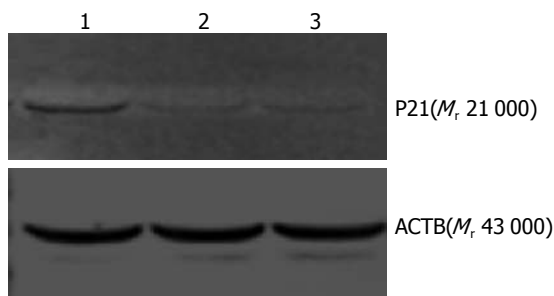


图 4 转染细胞P21蛋白检测. 1: *p21*转染组; 2: 空载体转染组; 3: 未转染组.

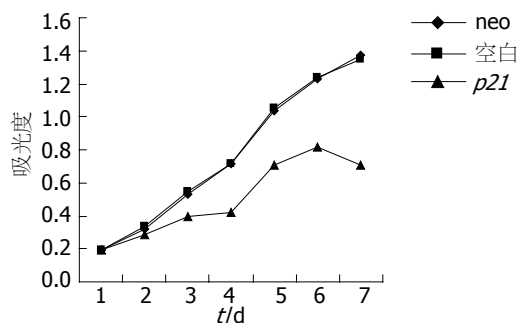


图 5 *p21*转染BxPC-3细胞生长曲线.

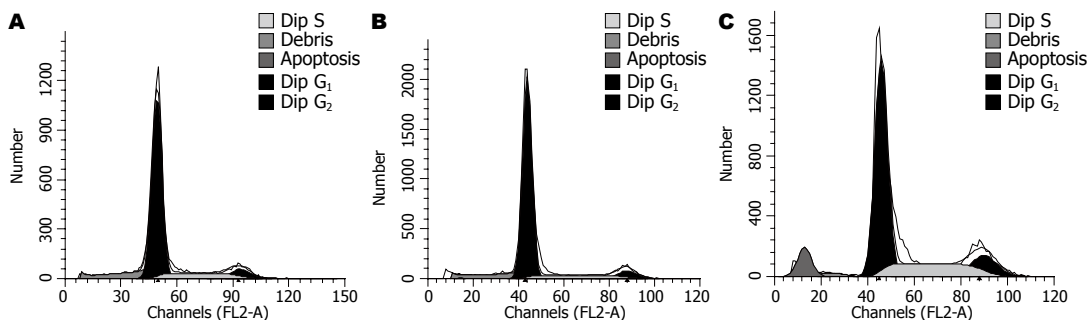


图 6 *p21*转染对BxPC-3细胞周期的影响. A: 未转染组; B: 空载体转染组; C: *p21*转染组.

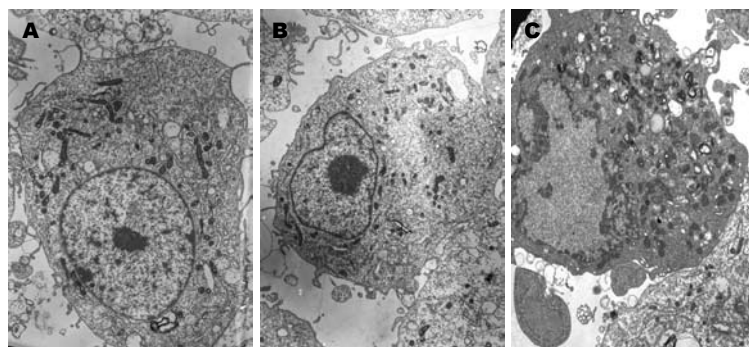


图 7 *p21*转染BxPC-3细胞电镜表现. A: 未转染组; B: 空载体转染组; C: *p21*转染组.

基因治疗方法具有重要意义.

*p21*是近年来发现的一类CKI分子, 编码由164个氨基酸残基组成的蛋白质, 相对分子质量为21 kDa, 是非常重要的抑癌基因. *p21*也称野生型*p53*激活片段1(wild-type *p53* activated fragment 1, WAF1)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子1A(cyclin-dependent kinase inhibitor

1A, CDKN1A)、细胞周期蛋白依赖性激酶相互作用蛋白1(cyclin dependent kinase interacted protein 1, CIP1)、CDK2结合蛋白20(CDK2-associated protein-20, CAP20)、衰老细胞释放的抑制因子(senescent cell-derived inhibitor, SDI)等, 这些名字从不同角度反映*p21*的功能. P21蛋白有C端和N端, C端抑制DNA复制必需因子-增

增殖细胞核抗原(proliferating-cell nuclear antigen, PCNA), N端抑制Cyclin-CDK, 并且N端Cyclin-CDK2抑制区也抑制细胞生长<sup>[3]</sup>. P21蛋白可以和PCNA结合形成复合物(*p21*、CyclinE、cdk2及PCNA四联复合物), 抑制Rb磷酸化, 从而抑制DNA的复制而使细胞周期中止. P21蛋白广泛地抑制各种Cyclin-CDK复合物, 如CyclinD-CDK4、CyclinE-CDK2和CyclinA-CDK2. 通过对CDK和PCNA的双重抑制作用, P21可阻止DNA受损后进入S期, 使细胞有足够的时间进行DNA修复, 从而阻止被损伤DNA的修复, 维持细胞遗传信息的稳定性<sup>[4]</sup>, 从而使得增殖细胞在G<sub>1</sub>向S期过渡受阻, 以便修复受损的DNA或最终导致细胞的凋亡.

*p21*在人的肿瘤细胞表达为可抑制肿瘤细胞的生长, 一旦*p21*丧失, 导致细胞周期失控; 有*p53*基因突变或缺失的细胞, *p21*产生减少或缺乏, 不能调节CDK复合物活性及PCNA的DNA复制功能, 不能协调细胞周期进程或产生异常的DNA复制, 从而导致基因组不稳定, 可导致细胞癌变<sup>[4]</sup>. 在胃癌、结肠癌、膀胱癌、卵巢癌和胆管癌中*p21*基因的表达与肿瘤的预后明显相关<sup>[5]</sup>. 通过改变*p21*基因的表达可以起到调节肿瘤生长的作用, 如陆丽华 *et al*<sup>[6]</sup>发现药物氧化苦参碱通过上调细胞周期负调控因子*p21*基因表达, 来发挥其抗结肠癌肿瘤细胞作用. 耿长新 *et al*<sup>[7]</sup>发现多烯紫杉醇使人肝癌细胞*p21*表达上调, 从而发挥对该肿瘤的生长抑制作用. 反之亦然, 郭晓榕 *et al*<sup>[8]</sup>发现HBx基因可下调*p21* mRNA的表达, 从而促进细胞增殖、抑制细胞凋亡.

胰腺癌Smads失活报道很多, 相应其下游*p21*基因表达失活<sup>[9]</sup>. *p21*基因失活在胰腺癌发生发展机制中起着重要作用<sup>[10-12]</sup>. 而且多种药物和化合物抑制胰腺癌的作用机制与诱导*p21*基因表达有关<sup>[2,13-22]</sup>, Wang *et al*<sup>[23]</sup>还发现FoxM1 siRNA通过增强*p21*表达而抑制了胰腺癌的侵袭力和血管生成. 上述发现说明*p21*可作为胰腺癌基因治疗的候选基因.

我们发现BxPC-3细胞在转染*p21*基因而产生P21蛋白高表达后, 其增殖明显受到抑制. 在接种第3天增殖开始被抑制, 随时间延长抑制率逐渐升高, 至第7天与对照组比较生长抑制率达48.2%. 流式细胞仪检测发现有明显的G<sub>1</sub>/S期阻滞, 出现凋亡特征性的亚G<sub>1</sub>峰, 透射电镜亦发现细胞凋亡发生. 本研究提示*p21*转染对胰腺癌有明显的生长抑制作用并能诱导细胞凋亡, 这为

胰腺癌的基因治疗提供了一种新途径, *p21*转染的优点是其片段长度小, 克隆和转染操作比较方便, 是具有应用前景的基因治疗的很好的靶基因.

#### 4 参考文献

- Chen J, Killary AM, Sen S, Amos CI, Evans DB, Abbruzzese JL, Frazier ML. Polymorphisms of p21 and p27 jointly contribute to an earlier age at diagnosis of pancreatic cancer. *Cancer Lett* 2008; 272: 32-39
- Arnold NB, Arkus N, Gunn J, Korc M. The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces growth inhibition and enhances gemcitabine-induced cell death in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 18-26
- Chen J, Jackson PK, Kirschner MW, Dutta A. Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature* 1995; 374: 386-388
- Datta K, Babbar P, Srivastava T, Sinha S, Chattopadhyay P. p53 dependent apoptosis in glioma cell lines in response to hydrogen peroxide induced oxidative stress. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34: 148-157
- Rose SL, Goodheart MJ, DeYoung BR, Smith BJ, Buller RE. p21 expression predicts outcome in p53-null ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1028-1032
- 陆丽华, 冉志华. 氧化苦参碱对人结肠癌细胞P21, P27, Cyclin E1及CDK2表达的影响. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1353-1357
- 耿长新, 曾昭冲, 周长宏, 王吉耀, 元玉琴. 多烯紫杉醇体内对肝癌化疗及其对p21和bcl-2表达影响. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2848-2852
- 郭晓榕, 程斌, 郑要初, 林松挺, 黎培员. HBx基因下调p21对HepG2细胞增殖与凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2080-2085
- Kloth JN, Kenter GG, Spijker HS, Uljee S, Corver WE, Jordanova ES, Fleuren GJ, Gorter A. Expression of Smad2 and Smad4 in cervical cancer: absent nuclear Smad4 expression correlates with poor survival. *Mod Pathol* 2008; 21: 866-875
- 陆澄, 曾水林, 张鄂华, 杨鹏. 胰腺癌组织中P21(WAF1)、转化生长因子 $\alpha$ 、表皮生长因子受体表达与神经浸润转移的关系. *南通大学学报(医学版)* 2006; 26: 21-35
- 杨勇, 黄允宁, 苏刚, 杨世杰. P53、P21 WAF1和CDK4在胰腺癌组织中的表达. *宁夏医学杂志* 2008; 30: 199-201
- 杨勇, 曹农, 朱有权, 周彦明, 曾峰, 冯颖. 胰腺癌中和的p21WAF1、cyclinD1CDK4表达意义及其相互关系. *中国肿瘤临床* 2005; 32: 252-255
- Cheng F, McLaughlin PJ, Verderame MF, Zagon IS. The OGF-OGFr axis utilizes the p21 pathway to restrict progression of human pancreatic cancer. *Mol Cancer* 2008; 7: 5
- Haefner M, Bluethner T, Niederhagen M, Moebius C, Wittekind C, Mossner J, Caca K, Wiedmann M. Experimental treatment of pancreatic cancer with two novel histone deacetylase inhibitors. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3681-3692
- Pellizzaro C, Speranza A, Zorzet S, Crucil I, Sava G, Scarlata I, Cantoni S, Fedeli M, Coradini D. Inhibition of human pancreatic cell line MIA PaCa2 proliferation by HA-But, a hyaluronic butyric ester:

#### ■同行评价

本研究具有一定的探索性价值, 对治疗胰腺癌提供了一些有价值的信息.

- a preliminary report. *Pancreas* 2008; 36: e15-e23
- 16 Schwartz GG, Eads D, Naczki C, Northrup S, Chen T, Koumenis C. 19-nor-1 alpha,25-dihydroxyvitamin D2 (paricalcitol) inhibits the proliferation of human pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* 2008; 7: 430-436
- 17 Bader Y, Hartmann J, Horvath Z, Saiko P, Grusch M, Madlener S, Maier S, Oehler L, Fritzer-Szekeres M, Heller N, Alken RG, Krupitza G, Szekeres T. Synergistic effects of deuterium oxide and gemcitabine in human pancreatic cancer cell lines. *Cancer Lett* 2008; 259: 231-239
- 18 Shankar S, Ganapathy S, Hingorani SR, Srivastava RK. EGCG inhibits growth, invasion, angiogenesis and metastasis of pancreatic cancer. *Front Biosci* 2008; 13: 440-452
- 19 Wiseman DA, Werner SR, Crowell PL. Cell cycle arrest by the isoprenoids perillyl alcohol, geraniol, and farnesol is mediated by p21(Cip1) and p27(Kip1) in human pancreatic adenocarcinoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 320: 1163-1170
- 20 Donadelli M, Dalla Pozza E, Costanzo C, Scupoli MT, Piacentini P, Scarpa A, Palmieri M. Increased stability of P21(WAF1/CIP1) mRNA is required for ROS/ERK-dependent pancreatic adenocarcinoma cell growth inhibition by pyrrolidine dithiocarbamate. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1763: 917-926
- 21 Salabat MR, Ding XZ, Flesche JB, Ujiki MB, Robin TP, Talamonti MS, Bell RH Jr, Adrian TE. On the mechanisms of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced growth arrest in pancreatic cancer cells. *Pancreas* 2006; 33: 148-155
- 22 李智, 秦阳, 郭克建. 维生素D衍生物EB1089对胰腺癌细胞系生长抑制作用的实验研究. *沈阳医学院学报* 2005; 7: 78-80
- 23 Wang Z, Banerjee S, Kong D, Li Y, Sarkar FH. Down-regulation of Forkhead Box M1 transcription factor leads to the inhibition of invasion and angiogenesis of pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67: 8293-8300

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<sup>[1]</sup>报告……,潘伯荣 *et al*<sup>[2-5]</sup>认为……;PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>.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 2009-06-08)

## 结肠黏膜低度炎症对大鼠内脏感觉的影响

王承党, 郑雪雁, 郑玮玮

王承党, 郑雪雁, 郑玮玮, 福建医科大学附属第一医院消化内科 福建医科大学消化系病研究室 福建省福州市 350005  
王承党, 主任医师, 消化内科主任, 研究生导师, 从事功能性胃肠病及胃肠肽类激素、炎症性肠病的研究。

福建医科大学第一临床医学院学科带头人基金资助项目, No. JXK200701

作者贡献分布: 王承党负责课题设计、数据处理和论文撰写; 研究过程由郑雪雁和郑玮玮完成。

通讯作者: 王承党, 主任医师, 350005, 福建省福州市, 福建医科大学附属第一医院消化内科, 福建医科大学消化系病研究室。

wangcdhl@sina.com

电话: 0591-87982521

收稿日期: 2009-03-06 修回日期: 2009-04-08

接受日期: 2009-04-13 在线出版日期: 2009-06-08

### Dextran sulfate sodium-induced low grade mucosal inflammation activates visceral hypersensitivity in rats

Cheng-Dang Wang, Xue-Yan Zheng, Wei-Wei Zheng

Cheng-Dang Wang, Xue-Yan Zheng, Wei-Wei Zheng, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, the Institute of Digestive Diseases of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China

Supported by: the Foundation for Young Teachers of the First College of Fujian Medical University, No. JXK200701

Correspondence to: Cheng-Dang Wang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, the Institute of Digestive Diseases of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China. wangcdhl@sina.com

Received: 2009-03-06 Revised: 2009-04-08

Accepted: 2009-04-13 Published online: 2009-06-08

### Abstract

**AIM:** To investigate the role of low grade mucosal inflammation (LGMI) induced by dextran sulfate sodium (DSS) in visceral sensitivity of the rats.

**METHODS:** Forty healthy male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into LGMI group and control group ( $n = 20$ ). LGMI was induced by addition of 15 g/L DSS to drinking water for 7 d, and then distilled water for another 7 d. The control group rats were given distilled water alone. At the 14th day, abdominal withdrawal reflex (AWR) and myoelectric amplitude (MA) of the oblique externus abdominis muscle were recorded respectively after colonic distention by

balloon with ascending internal pressure from 20 mmHg to 80 mmHg. The colonic tissue samples were taken for histopathologic examinations (HE staining), and the expressions of c-fos, substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the intumescencia lumbalis were detected using immunohistochemistry.

**RESULTS:** The colonic mucosal inflammation score in LGMI rats was  $1.56 \pm 0.78$ , significantly higher than that in control rats ( $0.46 \pm 0.54$ ,  $P = 0.003$ ). Neither the AWR score nor the MA had significant difference between the two groups when the internal balloon pressure was 20 mmHg. When the pressure was up to 40, 60, 80 mmHg, the AWR score and the MA in LGMI rats were significantly higher than those in the control group (all  $P < 0.05$ ). The expression of c-fos, SP and CGRP in LGMI were respectively higher than those in controls ( $165.26 \pm 10.12$  vs  $126.52 \pm 11.48$ ,  $134.28 \pm 10.62$  vs  $120.82 \pm 8.92$ ,  $157.66 \pm 6.25$  vs  $118.67 \pm 5.68$ , all  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Low grade inflammation of colonic mucous induced by DSS in rats may promote expression of the c-Fos, SP, and CGRP in the intumescencia lumbalis, and activate the visceral hypersensitivity, which underlies IBS.

**Key Words:** Irritable bowel syndrome; Low grade mucosal inflammation; Visceral hypersensitivity; Abdominal withdrawal reflex; Myoelectric amplitude of oblique externus abdominis muscle; Dextran sulfate sodium

Wang CD, Zheng XY, Zheng WW. Dextran sulfate sodium-induced low grade mucosal inflammation activates visceral hypersensitivity in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(16): 1621-1625

### 摘要

**目的:** 探讨结肠黏膜低度炎症(low grade mucosal inflammation, LGMI)对大鼠内脏感觉的影响。

**方法:** 健康♂SD大鼠40只, 随机分为LGMI组和对照组( $n = 20$ )。LGMI组大鼠给予15 g/L葡聚糖硫酸钠(DSS)饮用7 d, 然后饮用蒸馏水7 d, 对照组大鼠饮用蒸馏水。第14天进行气

### ■背景资料

已经明确内脏感觉过敏、肠动力紊乱在IBS的发生中起重要作用。近年来研究发现IBS患者的结肠和回肠存在黏膜低度炎症(LGMI), 但是这种炎症是否会激活内脏感觉系统尚未引起重视。

### ■同行评议者

李定国, 教授, 上海交通大学医学院(原上海第二医科大学)附属新华医院消化内科; 刘占举, 教授, 同济大学附属第十人民医院胃肠内科

## ■研究前沿

本文已经提示结肠黏膜低度炎症可以诱发内脏感觉过敏,但是,哪些因子起作用、如何发挥作用、相应的抑制剂是否能够纠正这种作用,都值得研究;在临床方面,IBS(特别是感染后IBS)患者中有多少比例存在低度炎症、如何消除这种炎症的影响也都缺乏研究。

囊扩张大鼠腹部回缩反射(AWR)评分和腹壁肌电测定;实验结束后取结肠组织作常规病理学检查;免疫组织化学染色观察腰膨大部脊髓c-Fos、P物质(SP)和降钙素基因相关肽(CGRP)表达变化。

**结果:** LGMI组大鼠结肠黏膜炎症评分为 $1.56 \pm 0.78$ 分,对照组为 $0.46 \pm 0.54$ 分,2组比较差异有显著性意义( $P = 0.003$ )。当结肠气囊压力为20 mmHg时,2组大鼠的AWR评分和腹壁肌电幅值差异均无统计学意义;当气囊压力为40、60、80 mmHg时, LGMI组的AWR评分和腹壁肌电幅值明显高于对照组(均 $P < 0.05$ )。LGMI组大鼠腰骶段脊髓c-Fos、SP、CGRP的平均吸光度值均高于对照组( $165.26 \pm 10.12$  vs  $126.52 \pm 11.48$ ,  $134.28 \pm 10.62$  vs  $120.82 \pm 8.92$ ,  $157.66 \pm 6.25$  vs  $118.67 \pm 5.68$ , 均 $P < 0.01$ )。

**结论:** LGMI触发了内脏感觉过敏,可能在IBS的发病中起重要作用。

**关键词:** 肠易激综合征; 黏膜低度炎症; 内脏感觉过敏; 腹壁退缩反射; 腹壁肌电; 葡聚糖硫酸钠

王承党, 郑雪雁, 郑玮玮. 结肠黏膜低度炎症对大鼠内脏感觉的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(16): 1621-1625  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1621.asp>

## 0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)的发病机制尚未完全明确,肠道运动功能紊乱和内脏感觉过敏被认为是重要病理生理学改变。近年来研究发现IBS患者的结肠和回肠存在黏膜低度炎症(low grade mucosal inflammation, LGMI),这种炎症可能会激活内脏感觉系统。本研究通过葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)诱导大鼠结肠LGMI,探讨LGMI对大鼠内脏感觉的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康♂ Sprague-Dawley大鼠,清洁级,体质量 $180 \pm 31$  g,购于上海斯莱克实验动物中心。正常饲养2 wk,混合配方饲料喂养,自由进食、饮水。DSS(MW = 36 000-44 000,硫磺含量为18%-20%)购自美国MP Biomedicals Inc., CA;浓缩型兔抗大鼠c-fos多克隆抗体(工作浓度1:200)、浓缩型兔抗大鼠P物质多克隆抗体(工作浓度1:400)、浓缩型兔抗大鼠CGRP多克隆抗体(工作浓度1:200)均购自武汉博士德生物工程技术有限公司;二步法免疫组化检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 分组及处理:** 将40只SD大鼠随机分为对照组(Control组)和低度炎症组(LGMI组),每组20只。参考张艳丽 *et al*<sup>[1]</sup>和Kim *et al*<sup>[2]</sup>的方法, LGMI组大鼠给予15 g/L DSS水溶液自由饮用7 d,然后再自由饮用蒸馏水7 d。对照组给予蒸馏水自由饮用14 d。第14天时进行相关实验研究。

**1.2.2 结肠扩张AWR评分:** 禁食24 h、不禁水。20 g/L戊巴比妥腹腔内注射麻醉,将带气囊的导管由肛门逆行插入,至距肛口约6 cm处,用缝线固定。大鼠苏醒并适应后开始测定。气囊内压由20 mmHg起,每隔5 min压力递升20 mmHg,直至80 mmHg,根据大鼠腹部回缩反射(abdominal withdrawal reflex, AWR)进行评分<sup>[3]</sup>: 0分,结肠扩张时无反应;1分,结肠扩张时身体静止不动,头部运动减少;2分,结肠扩张时腹部肌肉收缩,但腹肌未抬离桌面;3分,结肠扩张时腹肌收缩并抬离桌面;4分,结肠扩张时骨盆抬起,身体呈弓形。

**1.2.3 结肠扩张时腹壁肌电测定:** 按照文献[4]方法并略作改进。电极置于大鼠腹股沟韧带上方、距中线1.5 cm的腹外斜肌上,2电极间距3-4 cm,电极另一端连接电生理记录仪。结肠内置管和气囊压力改变与AWR相同,气囊内压由20 mmHg起,每隔5 min压力递升20 mmHg,直至80 mmHg,每种压力维持20 s,记录不同压力下腹外斜肌放电幅值,间期休息至少5 min。电生理记录仪参数设置:采集频率:2 kHz,扫描速度:200 ms/div,灵敏度:200  $\mu$ V,时间常数:0.001 s,滤波频率:3 kHz。

**1.2.4 结肠标本病理学检查:** 实验结束后,20 g/L戊巴比妥腹腔内注射麻醉大鼠,打开胸腔,经心脏灌入40 g/L多聚甲醛的0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(pH7.4),然后迅速剖取结肠,距肛门约0.5 cm取结肠组织1 cm $\times$ 0.5 cm,以40 g/L甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,连续冠状切片,片厚4  $\mu$ m,做HE染色,根据Kruschewski法<sup>[5]</sup>进行病理学评分:隐窝结构改变(3-6分)、固有层炎症细胞数量(0-3分)、杯状细胞死亡(1分)、黏膜下纤维组织增生(1分),各项的总分:0分为无炎症、1-4分为低度炎症、5-8分为中度炎症、9-11分为重度炎症。

**1.2.5 腰膨大部脊髓免疫组化染色:** 取腰膨大部(L6-S1)脊髓,浸入40 g/L多聚甲醛固定液4 $^{\circ}$ C过夜,清水冲洗6 h,再用乙醇脱水、石蜡包埋、连续冠状切片,片厚4  $\mu$ m。SP法对c-fos、P物质(SP)和降钙素基因相关肽(CGRP)进行免疫组织化学染色。染色后将切片置于400倍光学显微镜下观察阳性神经元染色情况,随机选取脊髓灰质背

表 1 不同结肠扩张压力时大鼠AWR评分及腹壁肌电变化

	结肠扩张压力(mmHg, $n = 12$ )				结肠扩张压力(mmHg, $n = 8$ )			
	20	40	60	80	20	40	60	80
	AWR评分(分)				腹壁肌电幅值			
对照组	1.12 ± 0.52	1.17 ± 0.72	2.42 ± 1.00	3.33 ± 0.49	16.79 ± 4.69	22.98 ± 6.15	28.89 ± 7.36	33.80 ± 8.42
LGMI组	1.27 ± 0.65	2.42 ± 0.52	3.26 ± 0.52	3.75 ± 0.45	20.06 ± 10.70	36.27 ± 7.20	47.74 ± 14.95	59.14 ± 13.16
<i>P</i> 值	0.605	0.002	0.037	0.020	0.502	0.003	0.003	0.000

## ■ 创新盘点

本研究应用低浓度的葡聚糖硫酸钠溶液成功诱导出结肠黏膜低度炎症大鼠模型, 这种模型稳定、制作简单、重复性好, 并且证实这种低度炎症可以诱发内脏感觉过敏。

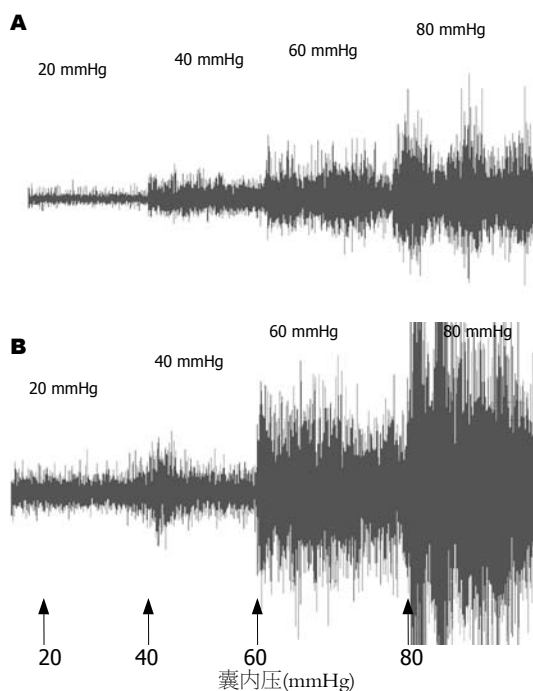


图 1 大鼠腹壁肌电图. A: 对照组; B: LGMI组.

角处10个高倍视野, 利用数字显微摄像系统和图像分析系统对其平均吸光度值(IA)进行计算。

**统计学处理** 数据以mean ± SD表示, 以Student *t*检验进行分析, 设 $\alpha = 0.05$ . 采用SPSS 12.0作统计学处理。

## 2 结果

**2.1 病理学检查** 实验过程中无大鼠死亡. LGMI组大鼠结肠黏膜层及黏膜下层淋巴细胞等炎症细胞数量增多、组织充血, 但腺体排列整齐, 无上皮坏死、糜烂、隐窝脓肿、肉芽组织形成等. 对照组黏膜上皮完整, 腺体排列整齐, 无明显炎症和组织充血. LGMI组病理学评分为 $1.56 \pm 0.78$ , 对照组评分为 $0.46 \pm 0.54$ , 差异有显著性意义( $P = 0.003, n = 20$ ), 因此, LGMI组大鼠属于结肠LGMI.

**2.2 结肠扩张时AWR评分** 气囊压力为20 mmHg时, 2组大鼠均无明显行为学改变. 从40-80 mmHg, 2组大鼠出现不同程度的行为学改变, LGMI组大

表 2 腰骶段脊髓的c-fos、SP、CGRP表达(IA值)

	c-fos	SP	CGRP
对照组	126.52 ± 11.48	120.82 ± 8.92	118.67 ± 5.68
LGMI组	165.26 ± 10.12	134.28 ± 10.62	157.66 ± 6.25
<i>P</i> 值	0.002	0.002	0.007

鼠的AWR评分均高于对照组( $P < 0.05$ , 表1).

**2.3 结肠扩张时腹壁肌电变化** 气囊压力为20 mmHg时, 2组大鼠的腹壁肌电幅值差异无统计学意义( $P = 0.502$ ). 从40-80 mmHg, LGMI组的腹壁肌电幅值均高于对照组( $P < 0.01$ , 表1, 图1).

**2.4 腰骶段脊髓的c-fos、SP、CGRP表达** c-fos阳性表达呈棕褐色颗粒状, 位于神经细胞核内. 结肠扩张后, 2组大鼠腰骶段脊髓均有c-fos表达, 以脊髓背角处最为密集. LGMI组大鼠腰骶段脊髓c-fos IA为 $165.26 \pm 10.12$ , 对照组为 $126.52 \pm 11.48$ , 差异有显著性意义( $P = 0.002$ ).

SP阳性神经纤维集中分布于脊髓的背角浅层, 呈对称分布, 两侧无明显差别, 呈棕黄色颗粒或细丝状. LGMI组IA为 $134.28 \pm 10.62$ , 对照组为 $120.82 \pm 8.92$ , 差异有显著性意义( $P = 0.002$ ).

CGRP表达于脊髓背角浅层, 呈深褐色, 为胞质内致密均匀分布, 体积较大的神经元细胞( $\Phi > 50 \mu\text{m}$ )染色较深, 体积较小的神经元细胞染色浅或不染色. LGMI组IA为 $157.66 \pm 6.25$ , 对照组为 $118.67 \pm 5.68$ , 差异有显著性意义( $P = 0.007$ , 表2, 图2).

## 3 讨论

本研究利用15 g/L DSS诱导SD大鼠结肠炎, 经病理学检测符合“低度炎症”的表现, 这种低度炎症可以使大鼠对结肠扩张刺激的内脏感觉过敏, 同时使腰骶段脊髓c-fos、SP、CGRP表达上调。

IBS的发病机制尚未完全清楚, 但已经明确内脏感觉过敏、肠动力紊乱在IBS症状的发生中起重要作用. 近年来研究发现IBS患者虽然没



### 应用要点

结肠黏膜低度炎症诱发内脏感觉过敏,如果能够消除这种炎症,就可能降低内脏感觉的敏感性。

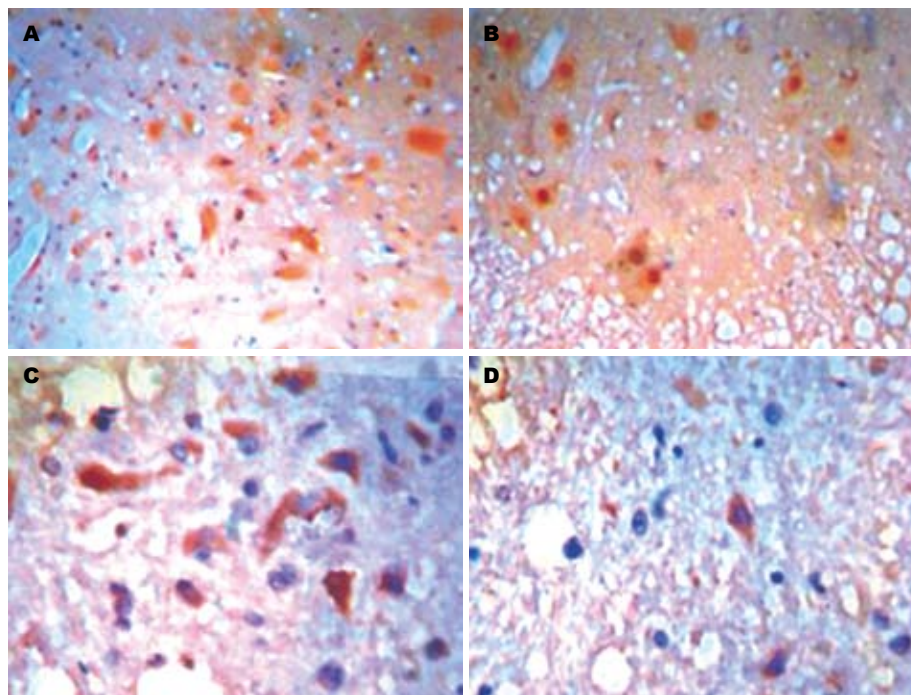


图 2 腰骶段脊髓的SP、CGRP表达. A: LGMI组(SP × 100); B: 对照组(SP × 100); C: LGMI组(CGRP × 400); D: 对照组(CGRP × 400).

有肉眼可见的肠道结构改变,但是与健康志愿者相比,IBS患者回肠和结肠黏膜中免疫细胞数量明显增加,如肠嗜铬细胞、肥大细胞、T细胞、巨噬细胞等<sup>[6-10]</sup>,尽管其细胞数量远少于UC患者,但已经说明这部分IBS患者存在肠黏膜炎症和免疫细胞功能活化<sup>[11]</sup>,这种炎症常常被称为低度炎症.在本研究中,大鼠先饮用15 g/L DSS水溶液7 d,停止给药7 d以后结肠黏膜中仍然有低度炎症存在,这种情况类似于感染后IBS患者的表现. Chadwick *et al*<sup>[12]</sup>研究发现: 40% IBS患者结肠活检组织标本在显微镜下可见非特异性炎症表现,如中性粒细胞、肥大细胞和T细胞的浸润; 50% IBS患者肠道黏膜活检组织的常规病理学检测虽然是正常的,但经过免疫组织化学染色就会发现其上皮内淋巴细胞和固有层CD25<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>T细胞数量增加.

这种结肠LGMI是否对内脏感觉过敏有影响呢? 本研究发现,在大鼠对结肠扩张的感受压力范围内,不论是AWR评分、腹壁肌电幅值、还是脊髓与痛觉有关的神经递质或介质的表达水平, LGMI组大鼠均明显高于对照组. 这说明炎症因素参与了内脏感觉的产生和传导,即LGMI导致SD大鼠对结肠机械扩张的内脏敏感性增高,与国外研究结果相一致<sup>[13-15]</sup>,这些表现与IBS的特征吻合.

IBS患者结肠活检组织释放的介质可以使培养的鼠类感觉神经元致敏,将这些活检组织标本的培养上清液灌入小鼠结肠中 can 导致小鼠躯体感觉过敏和内脏感觉过敏,这种促伤害

感受效应可以被丝氨酸蛋白酶抑制剂和PAR2拮抗剂所阻断,提示IBS患者结肠黏膜释放的各种介质和蛋白酶可通过PAR2介导直接刺激感觉神经元、导致内脏感觉过敏<sup>[16]</sup>.

内脏感觉过敏的机制中除了中枢性因素之外,肠黏膜传入系统的外周致敏和“静息的”伤害感受器的复苏可能是内脏感觉过敏的关键性因素. 免疫细胞及炎症介质可以使黏膜传入神经末梢致敏<sup>[17]</sup>、脊髓背角神经元上SP表达增高<sup>[18]</sup>,即内脏感觉系统的敏化. LGMI及其释放的各种介质作用于外周感受器,经三级神经元传递至中枢: 初级神经元(I级神经元)位于背根神经节,其一轴突投射至外周组织,接受感受器传来的信号,另一轴突投射至脊髓背角的灰质,将信号传至脊髓背角神经元(II级神经元), II级神经元的轴突交叉至对侧脊索、上行至丘脑、网状结构和中脑,丘脑和网状结构中的III级神经元再投射至大脑皮质、前扣带回(ACC)和岛叶等,编码内脏感觉的性质、定位、强度等. 同时,大脑又通过延髓下行抑制系统作用于脊髓背角,影响内脏感觉信号的传入. 这一完整的感觉传导通路即脑-肠轴<sup>[19]</sup>,其中脊髓背角起着承上启下的关键作用.

脊髓背角c-fos蛋白是神经元被内脏伤害性刺激所激活的标志物,其表达水平与刺激强度相关<sup>[20]</sup>. SP是脊髓水平传递伤害性信息的兴奋性神经递质, SP及其受体分布在脊髓的 I、II及IV层,参与疼痛信息的传递, SP升高的水平与炎症引起的腹痛程度密切相关<sup>[21]</sup>. CGRP是外周

感觉传入神经中与SP共存的一种神经肽, 是痛觉及痛觉过敏所必需的物质<sup>[22]</sup>。本研究发现: 与对照组相比, LGMI组大鼠脊髓背角的c-fos、SP、CGRP表达都明显增高, 而且LGMI组大鼠的SP阳性表达扩展到 I -IV层(正常大鼠脊髓SP主要表达在 I 层), 即LGMI大鼠的脊髓水平上与痛觉有关的多种兴奋性神经递质表达增强, 提示结肠LGMI已经造成脊髓背角的兴奋性增高, 使大鼠内脏感觉过敏。

此外, LGMI还可以引起非炎症部位感觉过敏<sup>[18]</sup>。三硝基苯磺酸诱发豚鼠回肠炎之后, 尽管结肠黏膜没有炎症, 但远端结肠黏膜下神经元特性发生改变、含5-HT的肠嗜铬细胞数量增加, 同时结肠黏膜上皮细胞生理功能(如膜电流和离子通道)也发生改变。因此, 肠道一个部位的炎症, 可以改变非炎症部位的肠神经反射回路和上皮细胞功能, 成为肠道炎症后非炎症部位功能改变的基础<sup>[23]</sup>。

总之, DSS诱导的大鼠结肠黏膜低度炎症可以使脊髓背角c-fos、SP、CGRP等与痛觉有关的神经递质表达上调, 增强对结肠机械扩张的敏感性, 即结肠黏膜低度炎症触发了内脏感觉过敏, 可能在IBS的发病中起重要作用。

#### 4 参考文献

- 张艳丽, 王承党. 葡聚糖硫酸钠结肠炎模型的制作方法、特点和影响因素. 胃肠病学 2006; 11: 56-58
- Kim TW, Seo JN, Suh YH, Park HJ, Kim JH, Kim JY, Oh KI. Involvement of lymphocytes in dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 302-305
- La JH, Sung TS, Kim HJ, Kim TW, Kang TM, Yang IS. Peripheral corticotropin releasing hormone mediates post-inflammatory visceral hypersensitivity in rats. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 731-736
- Benmansour S, Cecchi M, Morilak DA, Gerhardt GA, Javors MA, Gould GG, Frazer A. Effects of chronic antidepressant treatments on serotonin transporter function, density, and mRNA level. *J Neurosci* 1999; 19: 10494-10501
- Kruschewski M, Foitzik T, Perez-Cantó A, Hübotter A, Buhr HJ. Changes of colonic mucosal microcirculation and histology in two colitis models: an experimental study using intravital microscopy and a new histological scoring system. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 2336-2343
- Bradesi S, McRoberts JA, Anton PA, Mayer EA. Inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome: separate or unified? *Curr Opin Gastroenterol* 2003; 19: 336-342
- O'Sullivan M, Clayton N, Breslin NP, Harman I, Bountra C, McLaren A, O'Morain CA. Increased mast cells in the irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2000; 12: 449-457
- Spiller RC, Jenkins D, Thornley JP, Hebden JM, Wright T, Skinner M, Neal KR. Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute Campylobacter enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut* 2000; 47: 804-811
- Dupont AW. Post-infectious irritable bowel syndrome. *Curr Gastroenterol Rep* 2007; 9: 378-384
- Spiller RC. Role of infection in irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol* 2007; 42 Suppl 17: 41-47
- Ohman L, Isaksson S, Lundgren A, Simrén M, Sjövall H. A controlled study of colonic immune activity and beta7+ blood T lymphocytes in patients with irritable bowel syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 980-986
- Chadwick VS, Chen W, Shu D, Paulus B, Bethwaite P, Tie A, Wilson I. Activation of the mucosal immune system in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2002; 122: 1778-1783
- Collins SM, McHugh K, Jacobson K, Khan I, Riddell R, Murase K, Weingarten HP. Previous inflammation alters the response of the rat colon to stress. *Gastroenterology* 1996; 111: 1509-1515
- La JH, Kim TW, Sung TS, Kang JW, Kim HJ, Yang IS. Visceral hypersensitivity and altered colonic motility after subsidence of inflammation in a rat model of colitis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2791-2795
- Coates MD, Johnson AC, Greenwood-Van Meerveld B, Mawe GM. Effects of serotonin transporter inhibition on gastrointestinal motility and colonic sensitivity in the mouse. *Neurogastroenterol Motil* 2006; 18: 464-471
- Cenac N, Andrews CN, Holzhausen M, Chapman K, Cottrell G, Andrade-Gordon P, Steinhoff M, Barbara G, Beck P, Bunnett NW, Sharkey KA, Ferraz JG, Shaffer E, Vergnolle N. Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. *J Clin Invest* 2007; 117: 636-647
- Bueno L, Fioramonti J, Delvaux M, Frexinos J. Mediators and pharmacology of visceral sensitivity: from basic to clinical investigations. *Gastroenterology* 1997; 112: 1714-1743
- De Giorgio R, Barbara G, Blennerhassett P, Wang L, Stanghellini V, Corinaldesi R, Collins SM, Tougas G. Intestinal inflammation and activation of sensory nerve pathways: a functional and morphological study in the nematode infected rat. *Gut* 2001; 49: 822-827
- 周吕, 柯美云. 神经胃肠病学与动力-基础与临床. 北京: 科学出版社, 2005: 143-170
- Ghanima A, Bennis M, Rampin O. c-Fos expression as endogenous marker of lumbosacral spinal neuron activity in response to vaginocervical-stimulation. *Brain Res Brain Res Protoc* 2002; 9: 1-8
- Bueno L, Fioramonti J. Effects of inflammatory mediators on gut sensitivity. *Can J Gastroenterol* 1999; 13 Suppl A: 42A-46A
- Friese N, Diop L, Chevalier E, Angel F, Rivière PJ, Dahl SG. Involvement of prostaglandins and CGRP-dependent sensory afferents in peritoneal irritation-induced visceral pain. *Regul Pept* 1997; 70: 1-7
- O'Hara JR, Lomax AE, Mawe GM, Sharkey KA. Ileitis alters neuronal and enteroendocrine signalling in guinea pig distal colon. *Gut* 2007; 56: 186-194

#### ■同行评价

本文分析了在结肠黏膜低度炎症状态下, 内脏神经的感觉变化, 对IBS治疗提供了重要的理论依据。

# 基于生物信息学的植物乳酸杆菌表层黏附蛋白的筛选及鉴定

沈通一, 张明, 周玉坤, 陈红旗, 张鹏, 杭晓敏, 秦环龙

## ■背景资料

肠道内的乳酸杆菌作为一种益生菌, 是肠道生物屏障的重要组成部分, 他可以通过其竞争黏附作用有效抑制条件致病菌对肠上皮的定植, 进而抑制细菌移位起到了屏障功能。近来研究较多的黏附分子包括脂磷壁酸(LTA)、细胞外多糖(EPS)、细胞表层蛋白等, 其中细胞表层蛋白起着关键性的作用。由于表层的膜蛋白特有的亲疏水性结构所导致的生化纯化及结构功能分析的困难, 使其相比可溶性蛋白, 较少深入研究。

沈通一, 张明, 周玉坤, 陈红旗, 张鹏, 杭晓敏, 秦环龙, 上海交通大学附属第六人民医院外科 上海市 200233  
杭晓敏, 上海交通大学昂立微生物研究所 上海市 200233  
沈通一, 主治医师, 医学博士, 主要从事外科营养和肠道微生态的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30672044

作者贡献分布: 沈通一与秦环龙对此文作贡献均等; 此课题由沈通一与秦环龙设计; 研究过程由沈通一、张明、周玉坤、陈红旗及张鹏操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由沈通一提供; 数据分析由沈通一完成; 本论文写作由沈通一与秦环龙完成。

通讯作者: 秦环龙, 教授, 200233, 上海市宜山路600号, 上海交通大学附属第六人民医院普外科. hlqin@sjtu.edu.cn

电话: 021-64361349 传真: 021-64368920

收稿日期: 2009-03-24 修回日期: 2009-04-23

接受日期: 2009-05-11 在线出版日期: 2009-06-08

## Identification and screening of *Lactobacillus plantarum* surface layer adhesive protein based on bioinformatics

Tong-Yi Shen, Ming Zhang, Yu-Kun Zhou, Hong-Qi Chen, Peng Zhang, Xiao-Min Hang, Huan-Long Qin

Tong-Yi Shen, Ming Zhang, Yu-Kun Zhou, Hong-Qi Chen, Peng Zhang, Huan-Long Qin, Department of Surgery, the Shanghai Sixth People Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China  
Xiao-Min Hang, Shanghai Onlly Microbiology Institution, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30672044

Correspondence to: Professor Huan-Long Qin, Department of Surgery, the Shanghai Sixth People Hospital, Shanghai Jiao Tong University, 600 Yishan Road, Shanghai 200233, China. hlqin@sjtu.edu.cn

Received: 2009-03-24 Revised: 2009-04-23

Accepted: 2009-05-11 Published online: 2009-06-08

## Abstract

**AIM:** To identify, screen and verify the surface layer protein of *Lactobacillus plantarum* CGMCC NO.1258 based on the adhering character of the *Lactobacillus*.

**METHODS:** Surface layer protein was extracted by guanidine hydrochloride and ultracentrifugation. The band contained the adhering protein was found by Western blot method using the hrp-labeled mucin as the antibody, and was analyzed by mass spectrometry and TPP software to

detect the potential proteins. Fragments of these proteins were cloned and expressed, and these purified proteins were screened by Western blot to find out the target protein. Meanwhile the adhesive protein of the germ was extracted by mucin linked sepharose-4B and was further verified with Western blot using the prepared polyclonal antibody of the target protein.

**RESULTS:** The surface layer of *Lactobacillus* was isolated. The electrophoresis and Western blot result showed that the positive band which reacted with the HRP labeled mucin existed in 30 kDa. This band analyzed by LC-MS/MS and the TPP software contained five kind of protein including GTP-binding protein TypA (GBP), pyruvate oxidase (PO), cell division initiation protein FtsQ (CD), integral membrane protein (IMP), late competence protein (LCP). These proteins were cloned and expressed fragmentally. The positive band in the Western blot showed that the second section of the integral membrane protein (IMP2) was the target protein. In the further Western blot verification with the polyclonal antibody prepared by the IMP2 showed the positive band in the adhesive proteins of the germ.

**CONCLUSION:** The surface layer adhesive protein of *Lactobacillus plantarum* cgmcc N01258 is an integral membrane protein, and the adhering region is located at the second fragment of the amino acid sequence.

**Key Words:** *Lactobacillus plantarum*; Surface layer adhering protein; Protein expression; Bioinformatics

Shen TY, Zhang M, Zhou YK, Chen HQ, Zhang P, Hang XM, Qin HL. Identification and screening of *Lactobacillus plantarum* surface layer adhesive protein based on bioinformatics. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(16): 1626-1631

## 摘要

**目的:** 筛选、鉴定及验证植物乳酸杆菌 CGMCC No. 1258 表层黏附蛋白。

**方法:** 用盐酸胍结合超速离心法提取表层膜

## ■同行评议者

王健生, 教授, 西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

蛋白, 通过HRP标记的黏蛋白作抗体Western blot找到含有黏附蛋白的条带进行质谱分析, 生物信息学的TPP软件分析获得可能的蛋白, 进行蛋白的分段表达克隆, 并对纯化的蛋白用Western blot进行再次鉴定找到靶蛋白. 同时将黏蛋白连接的sepharose 4B柱提取菌体黏附蛋白, 通过制备的靶蛋白多克隆抗体对菌体黏附蛋白作Western blot进一步验证.

**结果:** 表层蛋白提取后, 电泳及Western blot结果显示30-33 kDa处可及HRP标记的黏蛋白结合的阳性条带, 随后进行质谱及TPP分析获得的蛋白为: (1)A型GTP连接蛋白; (2)丙酮酸氧化酶; (3)细胞分裂激活蛋白; (4)整合膜蛋白; (5)后期能力蛋白. 并进行克隆表达及分段表达, 并在此后的Western blot鉴定中呈强阳性条带显示靶蛋白是整合膜蛋白的第2段. 在应用该靶蛋白制备的多克隆抗体进一步Western blot验证试验中发现同菌体黏附蛋白相作用的强阳性条带.

**结论:** 植物乳酸杆菌表层黏附蛋白为整合膜蛋白, 并且该蛋白的黏附区域位于其第2段氨基酸序列中.

**关键词:** 植物乳酸杆菌; 表层黏附蛋白; 蛋白表达; 生物信息学

沈通一, 张明, 周玉坤, 陈红旗, 张鹏, 杭晓敏, 秦环龙. 基于生物信息学的植物乳酸杆菌表层黏附蛋白的筛选及鉴定. 世界华人消化杂志 2009; 17(16): 1626-1631  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1626.asp>

## 0 引言

肠道内的乳酸杆菌作为一种益生菌, 是肠道生物屏障的重要组成部分, 他可以通过其竞争黏附作用有效抑制条件致病菌对肠上皮的定植, 进而抑制细菌移位起到了屏障功能<sup>[1-2]</sup>. 近来研究较多的黏附分子包括脂磷壁酸(lipoteichoic acids, LTA)、细胞外多糖(extracellular polysaccharide, EPS)、细胞表层蛋白等, 其中细胞表层蛋白起着关键性的作用<sup>[3]</sup>. 由于表层的膜蛋白特有的亲疏水性结构所导致的生化纯化及结构功能分析的困难, 使其相比可溶性蛋白, 较少深入研究<sup>[4]</sup>. 受此影响, 国内外对乳酸杆菌同肠上皮黏附过程中的起作用的表层膜蛋白的报道较少, 为进一步研究乳酸杆菌和肠上皮的黏附机制, 本研究以植物乳酸杆菌CGMCC No. 1258(*Lactobacillus plantarum* CGMCC No. 1258, *L. plantarum* CGMCC No. 1258)为对象, 对其表层黏附蛋白进行反复的筛选和鉴定, 进一步验

证其作用.

## 1 材料和方法

1.1 材料 *L. plantarum* CGMCC No. 1258由交通大学昂立微生物研究所提供. 超速离心机购自Beckman公司. Mucin购自Sigma公司, Fermentas蛋白Marker及Cell Signal生物素标记Marker购自吉泰公司. 表达质粒pET16b购自Novagen公司, 在多克隆位点添加了*Bgl* II和*Xho* I酶切位点. 限制性内切酶、连接酶、及TaqDNA聚合酶和IPTG均购自MBI公司. 质粒提取试剂盒、DNA凝胶回收试剂盒AXgen和HRP标记的山羊抗鼠IgG购于北京中杉生物工程公司. DH10B细胞由本室保存. 引物合成及测序工作由生工完成.

### 1.2 方法

1.2.1 *L. plantarum*的培养和表层蛋白的提取: 将*L. plantarum* CGMCC No. 1258接种于新鲜配置的MRS液体培养基, 37°C 200 r/min培养24 h. 将菌液3500 g, 4°C离心20 min, 去除上清, 再用PBS混匀3500 g, 4°C离心20 min, 去除上清后加入2 mol/L盐酸胍室温200 r/min, 3 h. 将菌液6000 g, 4°C离心20 min取上清液置半透膜内0.01 mol/L的PBS透析过夜, 加入离心管放进4°C超速离心机40 000 g, 离心60 min, 小心抽去上清. 沉淀溶于0.1 mol/L的PBS, 放于70°C恒温水槽孵育30 min, 16 000 g, 4°C离心20 min, 上清液移出后即可进行后续Western blot操作.

1.2.2 对黏蛋白作辣根过氧化物酶(HRP)标记: 根据Rojas *et al*<sup>[5]</sup>的方法, 取黏蛋白溶解于0.1 mol/L碳酸盐缓冲液中(pH9.5), 配置成4 g/L的黏蛋白溶液. 将辣根过氧化物酶(HRP)8 mg溶解于2 mL蒸馏水中, 配置成HRP溶液, 然后加入至400 μL新鲜配置的0.1 mol/L过碘酸钠溶液中, 混合物室温下搅拌20 min, 然后置于0.001 mol/L(pH4.4)乙酸盐缓冲液中, 4°C透析过夜. 取出透析后的HRP, 加入0.1 mol/L碳酸盐缓冲液中(pH9.5)20 μL调节pH至9.0-9.5, 取1 mL黏蛋白和1 mL HRP溶液混合, 置于室温下混合搅拌2 h, 然后加入新鲜配置的4 mg/L硼氢化钠溶液100 μL以去除连接反应. 混合液置于0.1 mol/L(pH7.4)的硼酸缓冲液中4°C透析过夜, 标记好的黏蛋白等体积加入80%甘油, -20°C保存<sup>[6]</sup>.

1.2.3 表层蛋白的Western blot分析: 表达产物经SDS-PAGE电泳, 采用10%分离胶和5%浓缩胶的不连续浓度梯度, 恒压60V 30 min, 后改120 V 90 min. 电泳完毕后, 部分胶用考马斯亮蓝进行染色, 另一部分胶移至电转膜仪上, 100 V 120 min,

■**研发前沿**  
肠道屏障破坏引起的细菌移位是当前研究的热点, 而通过乳酸杆菌改善肠道菌群进而保护肠道屏障功能是今后研究的方向.

## ■ 相关报道

Granato *et al* 将 *L. johnsonii* NCC533(La1) 用 LiCl 分离到一种 50 kDa 的表面蛋白, 能够介导 La1 对 Caco-2 细胞及黏蛋白的黏附, 通过测序和比对结果表明, 他与 *L. plantarum* WCFS-1 的 EF-Tu 在氨基酸序列上有 83% 的同源性, 并通过重组 EF-Tu 竞争抑制了 La1 对 Caco-2 细胞的黏附。

表 1 PCR 中各蛋白及片段所用引物

基因名称	上游引物	下游引物
PO	atcagatctgATGGCAAAGATGATTGAAGC	atcctcgagCTATTCGACGTTGAACTCCT
GB	atcagatctgTTGAAATTTAGAGATGATAT	atcctcgagTTACTTGTTCATTTTACGCT
CD	atcagatctgGTGGGTGTGATGGCCATTTT	atcctcgagTCAATTATTCTGATTCTTGA
LC	atcagatctgGTGCTAGCATGCCTACTGTG	atcctcgagTTAACGTGCTAGCGTTAGCC
IMP1	atcagatctgTTGAAGACAGTACGGAAGAT	atcctcgagAATCGCAGCAAGATCAACGC
IMP2	atcagatctgAATACTAATTCTAATAGTAC	atcctcgagAAGATAGAGTTCCTGATTTTC
IMP3	atcagatctgAAGCCAACCGTTACCGAAA	atcctcgagTTTTAGTCCTGGTGTGTGAT

用半干转移系统将蛋白转印至 PVDF 膜上, 根据同细菌表面黏附蛋白可以同黏蛋白特异性结合的原理, 加入 1 : 600 稀释的 HRP 标记的黏蛋白作为抗体, 同 PVDF 膜上的相关蛋白进行杂交, 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 30 min, ECL 显色检测目的蛋白。

1.2.4 LC-MS/MS: 根据 Western blot 结果选取 PAGE 胶上蛋白条带, 通过液质联用 (LC-MS/MS) 测定氨基酸序列, 并通过 Sequest 软件做初步分析. 根据质谱分析的结果, 通过生物信息数据分析软件 (trans-proteomics pipeline, TPP) 软件包及 FASTA 软件进一步筛选分析相关蛋白。

1.2.5 初筛蛋白基因的克隆: MS 结果发现可能是以下 5 种蛋白: (1) A 型 GTP 连接蛋白 (GTP-binding protein TypA, GBP); (2) 丙酮酸氧化酶 (pyruvate oxidase, PO); (3) 细胞分裂激活蛋白 (cell division initiation protein FtsQ, CD); (4) 整合膜蛋白 (integral membrane protein, IMP); (5) 后期能力蛋白 (late competence protein, LCP), 分别对其进行克隆和表达 (表 1); 应用 expasy (<http://cn.expasy.org/>) 中的 TMHMM 工具, 显示跨膜区. 并根据蛋白质序列分析对 Integral membrane protein 的膜外部分作分段表达. 以 GenBank 中各蛋白的基因序列为模板, 设计引物 (表 1), 进行 PCR 反应. 反应程序为基因组 DNA 经 94℃ 变性 3 min; 随后按 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 2 min; 30 个循环, 72℃ 10 min. PCR 结束后 10 g/L 琼脂糖电泳鉴定。

PCR 产物经过 AXgen 胶试剂盒回收后, 与原核表达载体 pET16b 同时用核酸内切酶 *Bgl* II 和 *Xho* I 酶切过夜, 以 T4 连接酶连接, 构建原核重组表达质粒. 然后转化 DH10B 感受态, 铺板, 挑选单克隆培养, 菌液 PCR 筛选阳性克隆的质粒进行测序, 测序结果用在线程序 BLAST 进行比较。

1.2.6 初筛蛋白的表达: 将测序正确的克隆抽质粒, 转化 BL21(DE3) 感受态, 次日挑取菌落接种于含氨苄和氯霉素 TB 培养基, 37℃ 200 r/min

到 A 值 0.6 时, 加 IPTG, 并调整 IPTG, 终浓度为 1 mmol/L, 诱导时间 3 h, 以期获得重组蛋白的表达. 诱导结束, 经离心收集细菌后, 冰浴下超声裂解细菌. 4℃, 14 000 r/min 离心 10 min 分离上清. 上清中加入 His-Tag Fusion Protein Purification bead, 震荡 30 min 纯化浓缩上清中的蛋白。

1.2.7 表达蛋白的 Western blot 分析: 方法同前, 纯化的蛋白经 SDS-PAGE 电泳, 部分胶用考马斯亮蓝进行染色, 另一部分胶转印至 PVDF 膜上, 加入 1 : 600 稀释的 HRP 标记的黏蛋白进行杂交, ECL 显色检测目的蛋白。

1.2.8 表层黏附蛋白多克隆抗体制备: 将确定的靶蛋白纯化, 按常规方法免疫家兔. 首次免疫时, 按每只家兔 600 μg 的剂量, 将纯化得到的蛋白溶于 PBS (终浓度为 2 g/L) 中, 加入等体积的弗氏完全佐剂, 充分乳化后背部皮下及腹股沟多点注射; 每点 200 μg 乳化抗原. 加强免疫, 抗原用量为初次免疫的一半, 加弗氏不完全佐剂, 于前次免疫后的 2 wk 进行. 最后 1 次加强免疫后的 14 d 后放血, 取血清. 免疫血清用抗原亲和层析柱进行纯化, -20℃ 保存。

多克隆抗体鉴定: (1) Western blot 鉴定: 方法同前, 将 1、10、100 pg 的纯化的重组蛋白作 SDS-PAGE 分离, 转移到 PVDF 膜上, 加入纯化后的兔抗 IMP2 多克隆抗体 (1 : 10000 稀释), 然后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗, ECL 检测. (2) ELISA 检测: 将纯化的重组蛋白用 PBS 稀释至 1 mg/L, 按照 100 μL/孔的量包被到聚苯乙烯反应 (PVC) 板上, 4℃ 过夜包被; 用 PBST 洗涤 3 次, 然后按照 200 μL/孔的量加入封闭液; 用 PBST 洗涤 3 次, 每孔加入 100 μL 倍比的免疫血清, 同时设正常兔血清作为阴性对照, 每个样品设 2 个复孔, 37℃ 孵育 2 h; 用 PBST 洗涤 3 次, 每孔均加入 100 μL PBS (含 1 g/L BSA) 稀释的二抗 (辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗, 1 : 5000 稀释, Santa Cruz), 37℃ 孵育 1 h; 用 PBST 洗涤 3 次, 加入

表 2 表达蛋白

编号	蛋白名称	PI	GenBank登录号	表达途径
No.1	丙酮酸氧化酶	5.0	ABC47131.1	全长
No.2	细胞分裂激活蛋白	10.32	NP_785691.1	全长
No.3	A型GTP-结合蛋白	5.12	NP_785653.1	全长
No.4	后期能力蛋白	9.84	NP_784489.1	全长
No.5	整合膜蛋白	10.02	NP_785773.1	3段

## ■ 创新盘点

本研究通过使用TPP等生物信息学软件过滤可以减少分析质谱海量数据的难度, 通过对蛋白表达进行验证可以使实验更具说服力。

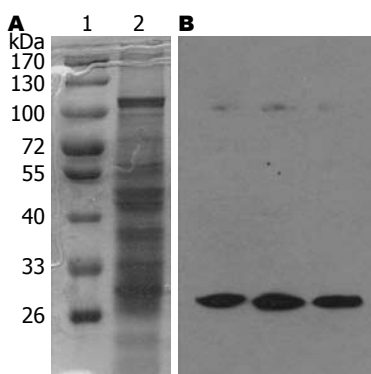


图 1 乳酸杆菌菌体表层黏附蛋白的鉴定结果. A: SDS-PAGE电泳; 1: Marker; 2: 表层蛋白; B: 表层蛋白的Western blot.

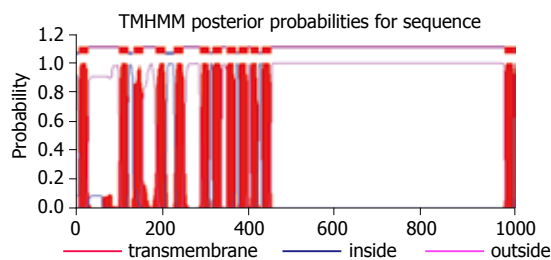


图 2 蛋白序列分析.

50  $\mu$ L OPD显色液, 室温避光显色10-15 min, 用25  $\mu$ L 2 mol/L的硫酸终止反应; 在490 nm波长下用酶标仪读数.

1.2.9 全菌体黏附蛋白的纯化: 菌液离心后, 先用PBS将细菌沉淀洗2-3遍, 然后按10-50 mL裂解液/1 g湿菌体加入裂解液重悬菌体, 裂解液的成分: 50 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 2 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, pH值8.5-9.0, 加溶菌酶至100 mg/L, 0.5% Triton X-100, 1 mL/L的蛋白酶抑制剂PMSF. 进行超声粉碎, 超声功率300 W, 时间20 min. 离心后收取上清中的可溶性蛋白. 蛋白溶液过空sepharose 4B柱去除非特异结合的蛋白, 蛋白溶液过黏蛋白连接的sepharose 4B柱, 柱上的黏附蛋白用20 mmol/L的1, 3-二氨基丙烷(1, 3-diaminopropane, DAP)洗脱而得到纯化的全菌体黏附蛋白<sup>[7]</sup>.

1.2.10 Western blot第3次验证: 具体方法同前, 将纯化全菌体黏附蛋白作SDS-PAGE电泳分离, 转移到PVDF膜上, 加入纯化后的兔抗IMP2多克隆抗体(1: 10 000稀释), 然后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗, ECL检测.

## 2 结果

2.1 乳酸杆菌菌体表层黏附蛋白的鉴定 对照Marker可在100-130、55、35-40、30-33 kDa等位置有多条条带(图1A). 在PVDF膜的30 kDa处有一强阳性条带, 黏附蛋白位于这条带中(图1B).

2.2 LC-MS/MS和数据分析: 数据库检索分析

以及ProteinProphet算法<sup>[8]</sup>进行结果过滤, 结果显示有5种蛋白(表2)同植物乳酸菌WCFS的蛋白库符合率达到90%. 其中, 整合膜蛋白分为3段蛋白片段(图2), 分别称为IMP1(SEQ ID No: 1中第32-100位序列)、IMP2(SEQ ID No: 1中第455-755位序列)、IMP3(SEQ ID No: 1中第693-993位序列).

2.3 蛋白的克隆、表达和纯化 通过PCR对*L. plantarum* CGMMCC No. 1258的目标基因进行扩增. PCR产物电泳后在10 g/L琼脂凝胶的1500-500 bp位置呈现单根条带, 其结果符合预期(图3). PCR产物经琼脂糖凝胶电泳分离纯化后重组到PET-16B载体中. 质粒转化感受态DH10B并测序. 结果显示*L. plantarum* CGMMCC No. 1258的扩增基因同GenBank中的*L. plantarum* WSFC资料一致. 随后含有目的基因的质粒转入*E. coli* BL21. isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside(IPTG)诱导3 h. 超声裂解细胞, His-tag fusion protein purification beads抽提纯化目的蛋白. 蛋白洗脱后100 g/L SDS-PAGE电泳分离同时用HRP-mucin作抗体Western blot分析(图3C). 结果显示所有目的蛋白表达量均占菌体总蛋白的90%以上. PVDF膜IMP2的30 kDa处有一相同形状的强阳性条带, 即黏附蛋白, 而其他蛋白未见阳性条带. Western blot结果显示纯化的IMP2蛋白就是目的蛋白.

2.4 黏附蛋白多克隆抗体的鉴定 Western blot检测结果显示, 重组蛋白IMP2免疫新西兰兔制备的多克隆抗体能很好地和IMP2特异性结合, 即

### ■应用要点

乳酸杆菌可通过宿主表面的蛋白、糖蛋白和糖脂,识别其特异受体,并通过菌体特异性配体进一步与宿主细胞相应的受体之间特异性的结合。

表 3 间接法ELISA检测兔抗IMP2多克隆抗体效价

名称	阴性血清	空白对照	IM2抗体	IM2抗体	IM2抗体	IM2抗体	IM2抗体	IM2抗体
抗体稀释度	1/1000	1/1000	1/16 000	1/64 000	1/256 000	1/512 000	1/1 024 000	1/2 048 000
A值	0.023	0.021	2.772	2.635	2.580	2.218	1.799	1.186

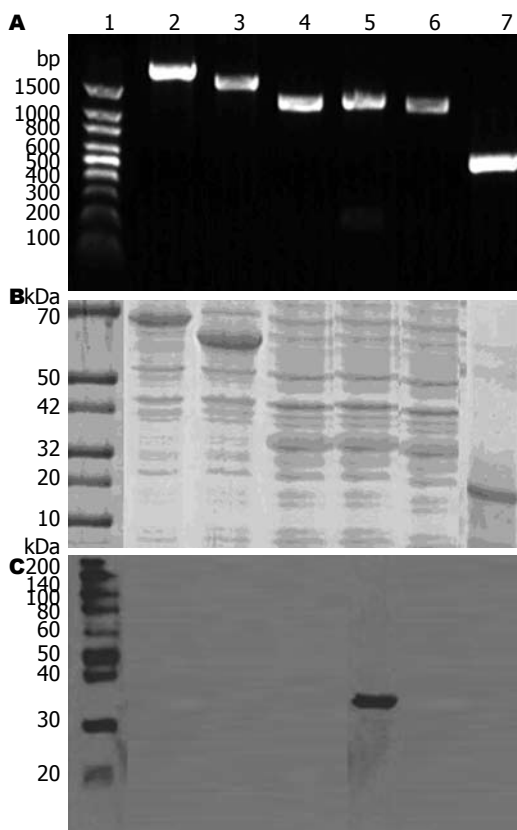


图 3 表层黏附蛋白的表达和鉴定. A: *L. plantarum* CGMCC No. 1258目的基因的PCR扩增; B: 表达蛋白的SDS-PAGE电泳; C: Western blot鉴定黏附蛋白(HRP-mucin).

即使是含量为1 pg的IMP2在PVDF膜上也能够很好的分辨出来(图4). 采用间接ELISA法(表3)检测多克隆抗体的效价, 结果表明本实验所获得的兔抗IMP2多克隆抗体用包被IMP2进行质量鉴定, 效价为 $1:2 \times 10^6$ , A值为1.186.

2.5 Western blot对IMP2的验证 通过mucin-sepharose 4B column亲和纯化的全菌体黏附蛋白电泳后, 用抗IMP2多克隆抗体作Western blot分析, 结果可见40-50 kDa有与理论相符的阳性条带(图5), 这结果反映了IMP2存在于全菌体黏附蛋白中.

### 3 讨论

本研究将质谱分析结果同*L. plantarum* WCFS-1的蛋白库比对, 并通过对相关蛋白的表达和筛选, 在国际上首次发现*L. plantarum* CGMCC No. 1258表层存在着同肠道内黏蛋白黏附的整

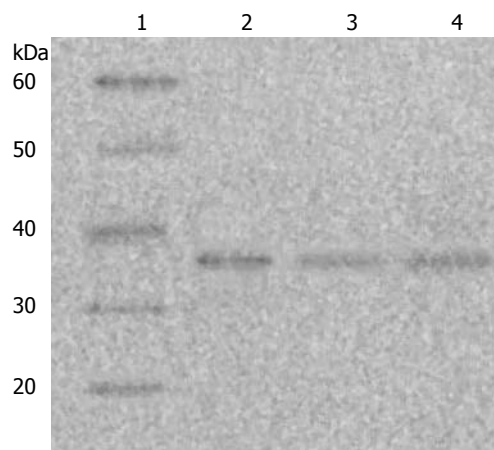


图 4 Western blot鉴定抗体的灵敏度. 1: Marker; 2: IMP2(1 pg); 3: IMP2(10 pg); 4: IMP2(100 pg).

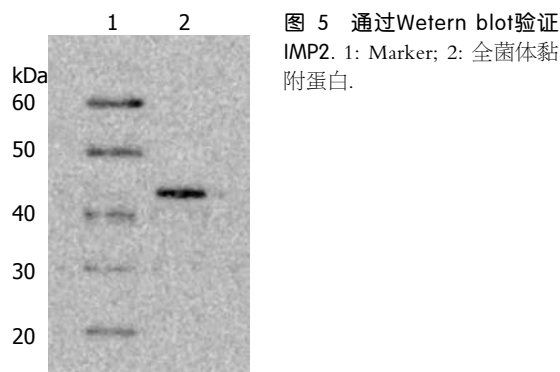


图 5 通过Western blot验证IMP2. 1: Marker; 2: 全菌体黏附蛋白.

合膜蛋白(integral membrane protein, IMP, GI: 28378881), 其氨基酸序列和*L. plantarum* WCFS-1的蛋白序列同源. 在以往的研究中, Rojas *et al*<sup>[5]</sup>根据乳酸杆菌同黏蛋白的黏附作用, 以黏蛋白作为抗体, 用HRP标记后与*L. fermentum* 104R的菌体表层蛋白作Western blot, 通过肽段测序鉴定了菌体表面蛋白中参与黏附的蛋白. Granato *et al*<sup>[9]</sup>将*L. johnsonii* NCC533(La1)用LiCl分离到一种50 kDa的表面蛋白, 能够介导La1对Caco-2细胞及黏蛋白的黏附, 通过测序和比对结果表明, 他与*L. plantarum* WCFS-1的EF-Tu在氨基酸序列上有83%的同源性, 并通过重组EF-Tu竞争抑制了La1对Caco-2细胞的黏附. 这些报道奠定了对黏附蛋白的研究基础, 我们在此基础上通过生物信息学软件对质谱分析结果检索过滤, 并对多种可能蛋白的表达纯化和鉴定, 是一种基于生物信息学的

新的黏附蛋白筛选和鉴定方法. 一方面我们在提取的表层蛋白中找到能与黏蛋白相作用的靶蛋白IMP2, 并制备多克隆抗体; 另一方面通过用黏蛋白sepharose 4B柱获得纯化的全菌体黏附蛋白, 用IMP2多克隆抗体在Western blot中验证该全菌体黏附蛋白同前面获取的靶蛋白IMP2是一致的, 这又进一步验证了前期的结果, 使实验结果更有说服力, 对后续生物学分析和功能验证更有价值.

质谱分析技术(mass spectrometry, MS)已经成为生命科学领域广泛应用和有效的分析方式<sup>[10-11]</sup>. 他虽然具有高通量, 大规模的特点, 但数据的庞大也为他以后的分析和筛选带来了困难. 利用SEQUEST软件(Thermo Fisher Inc.)进行质谱的数据库检索分析, 得到样本中蛋白质成分, 然后利用TPP软件<sup>[8]</sup>进行结果过滤, 减小实验假阳性结果<sup>[12-13]</sup>. 通过该软件我们将原来83个蛋白缩减到了5个同源性达到90%以上的蛋白, 精确了研究对象的范围. 蛋白克隆表达过程中, 我们利用pET16b在多克隆位点添加*Bgl* II和*Xho* I酶切位点以达到各个基因在同一个载体表达, 相互作为参照, 取得很好的效果, 除LCP蛋白的表达量不高外, 其他蛋白的表达量可达500 mg/L左右, 而LCP蛋白没有高表达的原因尚需进一步探讨. 由于IMP蛋白含有1100个氨基酸, 用常规方法作表达存在一定的困难, 我们对其进行跨膜区域的分析(TMhMM软件<sup>[14-15]</sup>), 发现N端100个左右的氨基酸和C端450个氨基酸为膜位区域, 除去膜位蛋白, 其余序列我们分3段来表达, 每段200-300个左右氨基酸. 并且在克隆表达后每个蛋白增加一段17个氨基酸的HIS tag(MGHHHHHHHHHHSEFAD), 目前我们的技术尚没有能力将他去除. 在随后的Western blot结果显示IMP的第2段(IMP2, 从第455个氨基酸到755个氨基酸)表达蛋白呈强阳性, 表明该段蛋白能与肠上皮表面黏蛋白相识别并杂交, 而且由于其他几个表达蛋白均含有相同的tag而与黏蛋白没有结合, 故该段tag对黏附作用没用影响.

不同菌株的乳酸杆菌黏附蛋白在抑制病原菌的黏附方面作用是高度特异和复杂的, 他需要一步步的分类进行鉴定及反复的验证. 如何准确地找到这些黏附蛋白仍旧是一个问题. 我们的研究不仅找到了黏附蛋白IMP及初步发现该蛋白的黏附区域, 更重要的是他提供了一种基于生物信息学的新方法. 虽然目前存在着通过已知的黏附结构域来找到黏附蛋白的方法, 但是他也存在着已知结构域的数量限制. 随

着生物信息学及系统生物学的广泛应用, 我们相信对乳酸杆菌同肠上皮的黏附及保护机制将不再困难.

#### 4 参考文献

- 1 Shen TY, Qin HL, Gao ZG, Fan XB, Hang XM, Jiang YQ. Influences of enteral nutrition combined with probiotics on gut microflora and barrier function of rats with abdominal infection. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4352-4358
- 2 Horie M, Ishiyama A, Fujihira-Ueki Y, Sillanpää J, Korhonen TK, Toba T. Inhibition of the adherence of *Escherichia coli* strains to basement membrane by *Lactobacillus crispatus* expressing an S-layer. *J Appl Microbiol* 2002; 92: 396-403
- 3 Vélez MP, De Keersmaecker SC, Vanderleyden J. Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol Lett* 2007; 276: 140-148
- 4 Wells JM, Mercenier A. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2008; 6: 349-362
- 5 Rojas M, Ascencio F, Conway PL. Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 2330-2336
- 6 Wang B, Wei H, Yuan J, Li Q, Li Y, Li N, Li J. Identification of a surface protein from *Lactobacillus reuteri* JCM1081 that adheres to porcine gastric mucin and human enterocyte-like HT-29 cells. *Curr Microbiol* 2008; 57: 33-38
- 7 Moncada D, Keller K, Chadee K. Entamoeba histolytica cysteine proteinases disrupt the polymeric structure of colonic mucin and alter its protective function. *Infect Immun* 2003; 71: 838-844
- 8 Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2003; 75: 4646-4658
- 9 Granato D, Bergonzelli GE, Pridmore RD, Marvin L, Rouvet M, Corthésy-Theulaz IE. Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infect Immun* 2004; 72: 2160-2169
- 10 Principe S, Maras B, Schininà ME, Pocchiari M, Cardone F. Unraveling the details of prion (con)formation(s): recent advances by mass spectrometry. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2008; 11: 697-707
- 11 Chen CH. Review of a current role of mass spectrometry for proteome research. *Anal Chim Acta* 2008; 624: 16-36
- 12 Palmblad M, Bindschedler LV, Cramer R. Quantitative proteomics using uniform (15)N-labeling, MASCOT, and the trans-proteomic pipeline. *Proteomics* 2007; 7: 3462-3469
- 13 Keller A, Eng J, Zhang N, Li XJ, Aebersold R. A uniform proteomics MS/MS analysis platform utilizing open XML file formats. *Mol Syst Biol* 2005; 1: 2005.0017
- 14 Schneider G, Fechner U. Advances in the prediction of protein targeting signals. *Proteomics* 2004; 4: 1571-1580
- 15 Do JH, Choi DK. Computational approaches to gene prediction. *J Microbiol* 2006; 44: 137-144

#### ■同行评价

本研究设计合理, 结果可靠, 对于探讨细菌表层黏附蛋白及其黏附机制具有一定的科学意义.



# 西安地区幽门螺杆菌 *cagA*, *iceA* 基因与其所致疾病的相关性

张翔, 阎志, 曲凯, 徐纪茹, 韩燕, 乔文, 陈艳炯

## ■背景资料

临床发现不同地区人群中 *H pylori* 感染率不同, 而感染后也并非全部发病且表现的疾病类型不同。诸多研究显示 *H pylori* 具有高度变异性及基因型别多样性的特点, 越来越多的证据提示这种多样性与临床结局有密切关系。因此研究本地区 *H pylori* 毒力基因型别对 *H pylori* 致病机制的揭示具有重要意义。

张翔, 阎志, 曲凯, 徐纪茹, 陈艳炯, 西安交通大学医学院免疫学与病原生物学系 陕西省西安市 710061

韩燕, 西安交通大学医学院遗传与分子生物学系 陕西省西安市 710061

乔文, 西安交通大学医学院第一附属医院消化内科 陕西省西安市 710061

张翔, 临床医学七年制学生, 目前从事临床生产实习。

国家大学生创新性实验基金资助项目, No. 610737

作者贡献分布: 张翔、阎志及曲凯对此文所作贡献均等; 此课题由陈艳炯、徐纪茹、张翔、阎志及曲凯设计; 临床标本采集和疾病诊断由乔文、张翔、阎志及曲凯完成; 研究过程由张翔、阎志、曲凯及韩燕操作完成; 数据分析由张翔、阎志及曲凯完成; 本论文写作由张翔完成。

通讯作者: 陈艳炯, 副教授, 710061, 陕西省西安市, 西安交通大学医学院免疫学与病原生物学系, chenyanjiong@mail.xjtu.edu.cn  
收稿日期: 2009-04-04 修回日期: 2009-05-08

接受日期: 2009-05-11 在线出版日期: 2009-06-08

## Association of *cagA* and *iceA* genotypes with *Helicobacter pylori* related diseases in Xi'an area

Xiang Zhang, Zhi Yan, Kai Qu, Ji-Ru Xu, Yan Han, Wen Qiao, Yan-Jiong Chen

Xiang Zhang, Zhi Yan, Kai Qu, Ji-Ru Xu, Yan-Jiong Chen, Department of Immunology and Pathogenic Biology, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Yan Han, Department of Genetics and Molecular Biology, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Wen Qiao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Supported by: the National Innovative Research Foundation for College Students, No. 610737

Correspondence to: Yan-Jiong Chen, Department of Immunology and Pathogenic Biology, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. chenyanjiong@mail.xjtu.edu.cn

Received: 2009-04-04 Revised: 2009-05-08

Accepted: 2009-05-11 Published online: 2009-06-08

## Abstract

**AIM:** To study the impact of *cagA*, *iceA* genes and their synergy on the outcome of *H pylori* infection so as to explore the dominant genotypes of *H pylori* that induce certain diseases in Xi'an area.

**METHODS:** One hundred and one *H pylori*-positive specimens from the patients after gastroscopy were preliminarily selected using the rapid

urease test (RUT) and 91 eligible cases were chosen from them using the method of polymerase chain reaction (PCR) to amplify *ureC*. The subtypes of *cagA*, *iceA* genes were detected by PCR and agarose gel electrophoresis. Relationship between different combinations of genotypes and disease was analyzed using  $\chi^2$  test and Fisher exact test.

**RESULTS:** The *cagA*-positive rate was 79.1%, and the overall detection rate of *iceA* was 75.82%, in which the detection rate of *iceA1* was 50.5% and that of *iceA2* was 38.5%. The positive rate of *cagA*<sup>+</sup>/*iceA1*<sup>+</sup> was higher than that of other groups. Each gene alone or genes in different combinations didn't show any statistical significance in clinical outcomes. The relevance existed in *iceA* and *cagA*. 229 bp, 334 bp, 439 bp, 549 bp and 229 bp+334 bp fragments of the genes were found in *iceA2*.

**CONCLUSION:** *cagA*<sup>+</sup>/*iceA1*<sup>+</sup> is the dominant genotype of *H pylori* in Xi'an area. Neither a single gene nor the combination of *cagA*, *iceA1*, *iceA2* are helpful in predicting the clinical outcome of *H pylori* infection. We may find synergy with the *iceA* and *cagA*. *iceA2* shows greater variability in Xi'an area.

**Key Words:** *Helicobacter pylori*; *cagA*; *iceA*; Polymerase chain reaction

Zhang X, Yan Z, Qu K, Xu JR, Han Y, Qiao W, Chen YJ. Association of *cagA* and *iceA* genotypes with *Helicobacter pylori* related diseases in Xi'an area. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(16): 1632-1637

## 摘要

**目的:** 研究幽门螺杆菌(*H pylori*)*cagA*、*iceA* 基因及其不同组合对 *H pylori* 感染结局的影响, 探讨西安地区 *H pylori* 的优势致病基因型。

**方法:** 用快速尿素酶试验(rapid urease test, RUT)筛选出 *H pylori* 阳性胃黏膜标本 101 例, 细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 用聚合酶链反应(PCR)扩增尿素酶 C(*ureC*)基因的方法筛选出 *H pylori* 阳性标本 91 例。经 PCR 及

## ■同行评议者

郑鹏远, 教授, 郑州大学第二附属医院消化科

琼脂糖凝胶电泳对*cagA*, *iceA*的基因亚型进行检测, 用 $\chi^2$ 检验以及Fisher精确检验分析各基因及其不同组合与疾病的相关性。

**结果:** *cagA*基因的阳性率为79.1%, *iceA*的总检出率为75.82%, 其中*iceA1*为50.5%, *iceA2*为38.5%, *cagA*<sup>+</sup>/*iceA1*<sup>+</sup>的检出率高于其他组, 单一基因及其不同组合在各疾病组中分布没有显著差异. *iceA*与*cagA*存在相关性. *iceA2*分别发现有229、334、439、549 bp以及229 bp+334 bp的基因片段。

**结论:** *cagA*<sup>+</sup>/*iceA1*<sup>+</sup>是西安地区*H pylori*的优势致病基因型, *cagA*、*iceA1*、*iceA2*各单一基因以及其不同组合与感染的临床结局无关. *iceA*与*cagA*基因可能存在协同作用, 该地区*iceA2*基因有较大的变异性。

**关键词:** 幽门螺杆菌; *cagA*; *iceA*; 聚合酶链反应

张翔, 阎志, 曲凯, 徐纪茹, 韩燕, 乔文, 陈艳炯. 西安地区幽门螺杆菌*cagA*, *iceA*基因与其所致疾病的相关性. 世界华人消化杂志 2009; 17(16): 1632-1637

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1632.asp>

## 0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)是一类主要定居于人类胃内的革兰氏阴性弯曲菌, 是胃黏膜炎症的明确病因, 是慢性胃炎向胃黏膜不典型增生及胃癌发展的重要启动因子<sup>[1]</sup>, 并与消化性溃疡和黏膜相关性淋巴样组织淋巴瘤(mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma, MALT)等疾病的发生发展密切相关<sup>[2]</sup>. 临床研究发现, *H pylori*的感染率在发展中国家达80%, 但是近20%-30%的感染者不发病, 50%以上的感染者仅有不同程度的慢性炎症, 10%-15%可发生消化性溃疡, 只有极少数发生胃部恶性肿瘤<sup>[3]</sup>. 依据染色体DNA和特异性位点的片段长度多态性(RFLP)分析、随机扩增多态性DNA的PCR分析、DNA指纹分析等大量研究显示: *H pylori*具有高度变异性及基因型多样性的特点, 越来越多的证据提示这种多样性与临床结局有密切关系<sup>[4]</sup>, 但目前尚未发现明确与胃癌等疾病发生紧密相关的*H pylori*毒力基因<sup>[5]</sup>. *H pylori*所致疾病的种类与所含毒力因子的差异是否有关成为目前争议的热点。

目前, 已知*H pylori*可能的毒力基因包括*cagA*、*iceA*等, 不同毒力基因型及其组合形式与相关胃肠道疾病的关系在不同地区报道存在

差异. 普遍认为, *H pylori*菌株具有较强的地域差异, 欧美地区*H pylori*的*cagA*和*iceA1*与消化性溃疡密切相关. 而在亚太地区, 绝大多数*H pylori*为*cagA*阳性菌株, 其在消化性溃疡, 胃癌以及慢性胃炎中的阳性率无显著差别, 单一*H pylori*毒力基因与胃癌缺乏相关性<sup>[5]</sup>. 近年来, 国内有报道称*iceA1*亚型菌株与重度炎症关系密切<sup>[6]</sup>, *cagA*和*iceA1*可能存在协同作用<sup>[7]</sup>. 在西安地区有研究显示*iceA1*, *iceA2*单基因型与*H pylori*感染后的临床结局无明显相关性<sup>[8]</sup>. 本地区*cagA*和*iceA*的不同组合以及其协同作用对临床结局的影响目前尚未见报道。

本研究采用PCR方法对临床获得的西安地区*H pylori*菌株进行致病基因检测, 以期得到不同基因型与所致疾病的相关性, 为*H pylori*的致病机制的揭示以及*H pylori*相关胃肠道疾病的精细诊断、特异性治疗、感染预后判断等提供依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选取2007-07/2008-08在西安交通大学医学院第一附属医院消化内科接受胃镜检查的具有上消化道症状患者, 详细记录受检者的服药史, 家族史, 居住地以及生活习惯等. 胃炎的诊断依据悉尼胃炎新分类标准并结合我国2000年全国慢性胃炎研讨会制定的标准进行, 消化性溃疡及胃癌的诊断结合胃镜下所见及病理学诊断结果得出. 于胃窦部取新鲜胃黏膜活组织进行快速尿素酶试验(rapid urease test, RUT). 筛选出RUT试验阳性的胃黏膜活检标本101例, 其中男52例, 女49例, 年龄15-93(平均46.12)岁. 将胃黏膜活检组织迅速置于-80℃冰箱中保存. 细菌基因组DNA提取试剂盒、PCR试剂(2×Taq PCR MasterMix、10×Buffer、TaqDNA聚合酶、dNTP)均购自北京天根生物制品有限公司; Marker I 和Marker II 购自北京天为时代科技有限责任公司; 实验所用引物委托北京奥科生物技术有限责任公司合成; 主要仪器Gradient温度梯度扩增仪、基因扩增仪为MJ公司生产; 水平电泳仪为北京六一仪器厂生产; Gene Genius凝胶图像分析仪为美国Sygene公司生产。

### 1.2 方法

**1.2.1 胃黏膜组织中*H pylori*基因组DNA的提取:** 将-80℃保存的胃黏膜活组织置于细菌提取缓冲液(GA缓冲液)200 μL中, 充分冲洗, 间断震荡5 min. 用细菌基因组DNA提取试剂盒(离心柱型)进行DNA的提取. DNA液于-20℃保存, 备用。

### ■ 研发前沿

*H pylori*菌株具有较强的地域差异, 其是否致病有赖于*H pylori*菌株的不同、宿主的差异以及他们之间特异性的联系. 目前已知的*H pylori*可能的毒力基因包括*cagA*、*iceA*等, 然而不同毒力基因型及其组合与相关胃肠道疾病的关系不同地区报道差异较大, *H pylori*所致疾病的种类与所含毒力因子的差异是否有关成为目前争议的热点。

## ■ 相关报道

欧美地区报道 *H pylori* 的 *cagA* 和 *iceA1* 与消化性溃疡密切相关。而亚太地区的研究显示, 绝大多数 *H pylori* 为 *cagA* 阳性菌株, 其在消化性溃疡、胃癌以及慢性胃炎中的阳性率无显著差别, 单一 *H pylori* 毒力基因与胃癌缺乏相关性。这种不同正体现了 *H pylori* 感染菌株的地域差异。

表 1 目的基因引物序列、产物的大小及扩增条件

基因	引物序列(5'→3')	产物大小(bp)	扩增条件
<i>ureC</i>	TGGGACTGATGGCGTGAGGG	820	94°C 1 min, 55°C 1 min,
	AAGGGCGTTTTAGATTTTT		72°C 1 min (30 cycles)
<i>cagA</i>	GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG	349	94°C 1 min, 55°C 1 min,
	CTGCAAAAGATTGTTTGGCAGA		72°C 40 s (30 cycles)
<i>iceA1</i>	GTGTTTTTAACCAAAGTATC	246	94°C 1 min, 50°C 1 min,
	CTATAGCCAGTCTCTTTGCA		72°C 40 s (30 cycles)
<i>iceA2</i>	GTTGGGTATATCACAATTTAT	229, 334,	94°C 1 min, 50°C 1 min,
	TTGCCCTATTTCTAGTAGGT		72°C 40 s (30 cycles)

1.2.2 *H pylori* 尿素酶C(*ureC*)及致病基因(*cagA*、*iceA1*和*iceA2*基因)的检测: 实验所用引物序列<sup>[9-10]</sup>及扩增条件见表1。聚合酶链反应体系为20 μL, *ureC*的反应体系包括引物各1 μL, 扩增的dNTP各2 μL, TaqDNA聚合酶1 μL, 10× Buffer 2.5 μL, *cagA*和*iceA1*的反应体系包括引物各0.5 μL, 扩增的dNTP各1.6 μL, TaqDNA聚合酶0.2 μL, 10× Buffer 2 μL, *iceA2*的反应体系包括引物各0.5 μL, 2× Taq PCR MasterMix 15 μL, 热循环结束后, 取PCR扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳(*ureC*: 10 g/L琼脂糖凝胶, 60 mV, 30 min; *cagA*、*iceA1*和*iceA2*: 15 g/L琼脂糖凝胶, 100 mV, 100 min), 在凝胶成像系统下观察照相, 记录结果。

**统计学处理** 用Excel建立数据库, 使用SPSS 13.0统计软件对数据进行 $\chi^2$ 检验或者Fisher精确检验,  $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 *ureC*基因片段扩增结果 101例RUT试验阳性的胃黏膜标本中有91例得到预期大小的扩增产物(图1A), 阳性率为90.1%。其中来自慢性浅表性胃炎(CSG)患者39例, 慢性萎缩性胃炎(CAG)患者27例, 消化性溃疡(PU)患者22例, 胃癌(GC)患者3例(表2)。

2.2 *cagA*和*iceA*基因在不同疾病中的检出情况 *cagA*、*iceA1*及*iceA2*基因扩增片段正确(图1B-F), *cagA*的阳性率为79.1%, 在各类疾病组中都占有优势。*iceA*的总检出率为75.82%, 其中*iceA1*的阳性率为50.5%, *iceA2*的阳性率为39.6%(表2), *cagA*<sup>+</sup>、*iceA1*<sup>+</sup>及*iceA2*<sup>+</sup>在各疾病组中分布差异没有统计学意义( $P > 0.05$ )。

2.3 *cagA*、*iceA1*及*iceA2*基因的不同组合及其与疾病的关系 *cagA*<sup>+</sup>/*iceA1*<sup>+</sup>是本地区的优势菌株。*cagA*<sup>+</sup>/*iceA*<sup>+</sup>组中各疾病的检出率差别没有统计

表 2 *cagA*、*iceA1*及*iceA2*在不同疾病中的检出 n(%)

分组	<i>cagA</i>	<i>iceA1</i>	<i>iceA2</i>	合计
CSG	30(76.9)	22(56.4)	17(43.6)	39(42.9)
CAG	23(85.2)	15(55.6)	8(29.6)	27(29.7)
PU	16(72.7)	9(40.9)	9(40.9)	22(24.2)
GC	3(100)	0(0.0)	2(66.7)	3(3.3)
合计	72(79.1)	46(50.5)	36(39.6)	91(100.0)

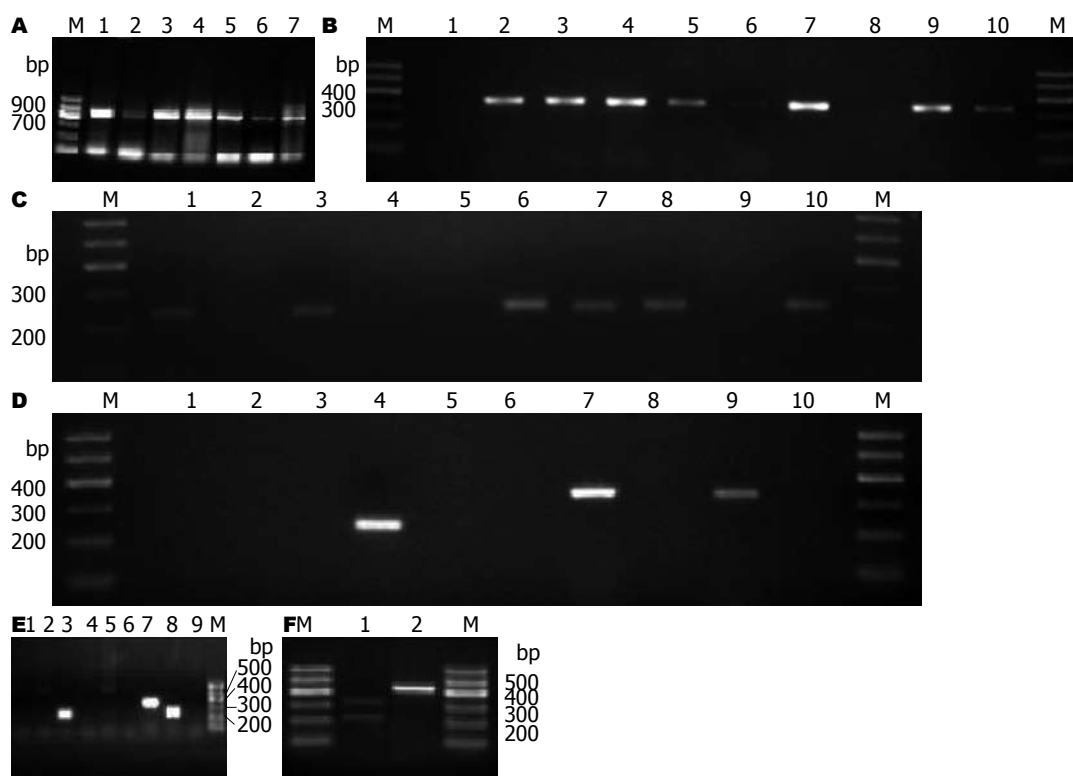
学意义( $P > 0.05$ , 表3)。

2.4 *iceA*与*cagA*的相关性 *cagA*阳性的菌株中*iceA*的阳性亦较高, *cagA*阳性82例, *iceA*阳性70例, *iceA*与*cagA*有相关性( $r = 0.264$ ), 存在统计学上的差异( $\chi^2 = 6.347$ ,  $P = 0.012$ )。

2.5 *iceA2*的变异性 本研究显示*iceA2*有很大的变异性, 分别发现有229、334、439、549、229 bp+334 bp同时具有的基因片段(图1D-F, 表4)。*iceA1*、*iceA2*同时阳性的有12例(13.19%), 其中CSG7例(58.3%), CAG2例(16.7%), PU3例(25%)。同一疾病*iceA*亚型分布没有显著性差异( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

*H pylori*的高感染率与其感染后的低发病率之间的矛盾提示, 宿主的遗传异质性, 菌株的基因多态性以及环境等因素都可能与临床结局密切相关。环境方面, 虽然有学者认为*H pylori*感染与饮食等因素可能存在相关性<sup>[11]</sup>, 但由于感染大多始于儿童时期, 故而其影响相对较小<sup>[12]</sup>。在宿主的遗传因素方面, 近年来已有研究证明主要与组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC), 白介素-1(interleukin 1, IL-1)等遗传多态性相关<sup>[13-14]</sup>; 而在菌株方面, *H pylori*基因多态性成为揭开*H pylori*感染不同结局机制的突破口之一, 相关毒力基因的拥有或缺失、某些位点等位基因分布的差异都可能导致宿主产



**■ 创新盘点**  
 本文结果发现西安地区感染的优势菌株型别为 *cagA*<sup>+</sup>/*iceA1*<sup>+</sup> 型, *cagA*、*iceA1*、*iceA2* 各单一基因以及其不同组合与感染的临床结局无关, 再次证实了亚洲与欧美 *H pylori* 的不同. *iceA2* 分别发现有 229、334、439、549、229 bp+334 bp 同时具有的基因片段. 这提示本地区 *iceA2* 基因结构具有很大的变异性.

图 1 基因PCR产物琼脂糖凝胶电泳图. A: *ureC*; B: *cagA*; C: *iceA1*; D-F: *iceA2*; M: DNA分子质量标准; A1-A7: *ureC*(820 bp) 阳性; B1, B8: *cagA* 阴性; B2-B7, B9, B10: *cagA*(349 bp) 阳性; C1, C3, C6-C8, C10: *iceA1*(246 bp) 阳性; C2, C4-C5, C9: *iceA1* 阴性; D4, E3, E8: *iceA2*(229 bp) 阳性; D7, D9, E7: *iceA2*(334 bp) 阳性; F2: *iceA2*(439 bp) 阳性; E1, E2, E5: *iceA2*(549 bp) 阳性; F1: *iceA2*(229 bp+334 bp) 阳性; D1-D3, D5-D6, D8, D10, E4, E6, E9: *iceA2* 阴性.

表 3 *cagA*、*iceA1*及*iceA2*的不同组合在不同疾病之间的检出 *n*(%)

	CSG	CAG	PU	GC
<i>cagA</i> <sup>+</sup> / <i>iceA1</i> <sup>+</sup> / <i>iceA2</i> <sup>+</sup>	3(7.69)	2(7.4)	3(13.64)	0(0.00)
<i>cagA</i> <sup>+</sup> / <i>iceA1</i> <sup>+</sup> / <i>iceA2</i> <sup>-</sup>	13(33.3)	12(44.4)	6(27.27)	0(0.00)
<i>cagA</i> <sup>+</sup> / <i>iceA1</i> <sup>-</sup> / <i>iceA2</i> <sup>+</sup>	9(23.08)	4(14.81)	6(27.27)	2(66.67)
<i>cagA</i> <sup>+</sup> / <i>iceA1</i> <sup>-</sup> / <i>iceA2</i> <sup>-</sup>	5(12.82)	5(18.52)	1(4.55)	1(33.33)
<i>cagA</i> <sup>-</sup> / <i>iceA1</i> <sup>+</sup> / <i>iceA2</i> <sup>+</sup>	4(10.26)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
<i>cagA</i> <sup>-</sup> / <i>iceA1</i> <sup>+</sup> / <i>iceA2</i> <sup>-</sup>	2(5.13)	1(3.70)	0(0.00)	0(0.00)
<i>cagA</i> <sup>-</sup> / <i>iceA1</i> <sup>-</sup> / <i>iceA2</i> <sup>+</sup>	1(2.56)	2(7.40)	0(0.00)	0(0.00)
<i>cagA</i> <sup>-</sup> / <i>iceA1</i> <sup>-</sup> / <i>iceA2</i> <sup>-</sup>	2(5.13)	1(3.70)	6(27.27)	0(0.00)

生不同的临床结局. 然而公认的毒力基因与疾病的临床相关性仍然是一个争议的热点<sup>[15]</sup>. 因此, 检测 *H pylori* 的基因型别、正确评价其多态性对其致病相关因素的揭示以及相关疾病的个体化诊断和治疗具有重要意义. 鉴于 *H pylori* 存在较强的地域差异<sup>[16]</sup>, 本研究用PCR方法检测西安地区人群感染的 *H pylori* 菌株 *cagA*, *iceA* 2 个毒力基因. 结果显示西安地区感染的优势菌株型别为 *cagA*<sup>+</sup>/*iceA1*<sup>+</sup> 型, *cagA* 的检出率为 79.1%, *iceA* 的检出率为 75.82%, 其中 *iceA1* 的阳性率为 50.5%, *iceA2* 的阳性率为 38.5%, 与亚洲地区的

报道<sup>[17-18]</sup>相似, 而与欧美等国家的报道<sup>[19-20]</sup>差异较大.

*cagA* 编码的毒素相关蛋白, 是 *H pylori* 分泌的一种能引起炎症反应的毒素. *iceA* 是 Peek et al<sup>[21]</sup>(1998)根据 *H pylori* 与胃黏膜黏附可能诱导毒力相关基因表达这一假说, 通过比较黏附和未黏附于人胃上皮细胞的 *H pylori* 溃疡株和胃炎株的 mRNA 转录发现的. 国内外的诸多报道<sup>[22-23]</sup>均表明 *cagA* 可以增加胃十二指肠疾病的危险性, 但其在消化性溃疡、胃癌以及慢性胃炎中的阳性率无显著差异, 仅有部分研究提示

## ■应用要点

本研究分析了西安地区*H pylori*致病基因型的分布,探讨了致病基因的疾病相关性,为*H pylori*的致病机制的揭示以及*H pylori*相关胃肠道疾病的精细诊断、特异性治疗、感染预后判断等提供依据。

表 4 *iceA2*基因扩增片段在不同疾病之间的检出率(%)

分组	229 bp	334 bp	439 bp	549 bp	229 bp+334 bp
CSG	5(29.4)	4(23.5)	1(5.88)	6(35.3)	1(5.88)
CAG	6(70.5)	1(12.5)	0(0.00)	1(12.5)	0(0.00)
PU	4(44.4)	3(33.3)	0(0.00)	2(22.2)	0(0.00)
GC	1(50.0)	1(50.0)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)

*cagA*与消化性溃疡密切相关<sup>[24-25]</sup>。而关于*iceA*各基因与疾病的关系,不同国家不同地区的报道差异很大: van Doorn *et al*<sup>[10]</sup>对荷兰地区94例胃黏膜标本的研究以及Caner *et al*<sup>[26]</sup>对土耳其46份菌株的研究,均提示*iceA1*与消化性溃疡有很强的相关性;而*iceA2*则与慢性胃炎的联系紧密。巴西有报道称*iceA2*与慢性胃炎的发生密切相关<sup>[19]</sup>;另有学者认为*iceA2*与消化性溃疡密切相关,而*iceA1*与消化性溃疡成负相关<sup>[27]</sup>;另有研究认为*iceA1*与慢性胃炎的发生有关<sup>[28]</sup>,而大多数亚太地区的研究显示*iceA*与临床结局无相关性<sup>[16-17,29]</sup>。

本研究没有发现*cagA*, *iceA1*与*iceA2*及其不同组合在慢性浅表性胃炎、慢性萎缩性胃炎、消化性溃疡、胃癌中的分布存在差异。我们分析推测与下列因素有关: (1)*cagA*基因在不同的*H pylori*菌株中显示出一定的多态性,基因中存在较多的DNA重复序列,从而导致不同CagA蛋白变异体的出现; (2)*iceA*在大多数*H pylori*菌株中可能并不是编码一个功能蛋白,而是在其转录水平调节腺嘌呤甲基转移酶yIM的表达,通过DNA甲基化水平的改变来调控相关毒素基因的表达,从而间接参与*H pylori*的致病作用<sup>[30]</sup>; *iceA*的表达与宿主黏膜的应答密切相关,由宿主因素决定的翻译水平与疾病的发展密切相关<sup>[31]</sup>; (3)*H pylori*菌株基因型别存在地域差异; (4)临床结局除与细菌本身有关之外,还与宿主以及细菌与宿主之间的相互作用等因素有关; (5)存在多种致病基因,协同或者拮抗细菌的毒力。

目前,对于*cagA*、*iceA*之间的协同作用及其与胃十二指肠疾病之间的关系还不清楚。各地报道也有差异。Peek *et al*以及国内部分学者认为*cagA*和*iceA1*可能存在协同作用<sup>[7,21]</sup>。而van Doorn *et al*<sup>[10]</sup>的研究显示相反的结果。我们的研究显示, *iceA*基因与*cagA*基因存在相关性,西安地区*H pylori*菌株*iceA*与*cagA*可能有协同作用,基于我们的样本例数较少,并且本地区*iceA*基因以及*cagA*基因阳性率都较高,此结果有待于

进一步研究与分析。

*iceA2*基因含有105个核苷酸的重复序列<sup>[10]</sup>,可以显示不同的类型。本研究发现,西安地区*iceA2*的基因结构具有很大的遗传异质性,分别发现有229、334、439、549、229 bp+334 bp同时具有的基因片段。229 bp与334 bp 2个条带的同时存在(占2.86%)提示有可能存在混合感染的情况,较国内其他地区少见。我们推测*iceA2*基因的不同类型的出现与其105个核苷酸的序列重复次数有关,这也许是*iceA2*基因多样性地区差异的表现类型。由于本研究*iceA2*阳性例数较少,未发现*iceA2*基因型变异在不同疾病之间显著性差异。*iceA2*的变异性机制还有待于进一步研究。

值得一提的是,本研究中由RUT筛选出的101例患者胃黏膜*H pylori*阳性标本中,有10例*ureC* PCR结果阴性。提示RUT存在假阳性结果,可能的原因为碱性胆汁返流入胃,污染胃活检标本致其表面pH>6.0,从而引起RUT试验弱阳性,亦或非*H pylori*类螺杆菌属细菌感染胃黏膜亦可出现RUT试验阳性。

## 4 参考文献

- 1 佟书娟, 陈军, 詹臻, 杨丹丹, 刘亚军. 胃癌组织中幽门螺杆菌*cagA*和*vacA*的表达及其感染的相关性. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2632-2635
- 2 De Luca A, Iaquinto G. Helicobacter pylori and gastric diseases: a dangerous association. *Cancer Lett* 2004; 213: 1-10
- 3 许庆党, 段广才, 郑鹏远, 郑云鹏. 幽门螺杆菌基因型与慢性胃炎和消化性溃疡的相关性. 中国热带医学 2007; 7: 704-706
- 4 Lu H, Hsu PI, Graham DY, Yamaoka Y. Duodenal ulcer promoting gene of Helicobacter pylori. *Gastroenterology* 2005; 128: 833-848
- 5 张万岱, 萧树东, 胡伏莲, 林三仁, 胡品津, 刘文忠, 王继德, 徐智民, 成虹. 对幽门螺杆菌若干问题共识意见. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2457-2458
- 6 张彩凤, 夏永华, 韩宇, 常廷民. 幽门螺杆菌*iceA*基因型与胃黏膜病变的相关性. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2312-2315
- 7 张彩凤, 林志辉. 幽门螺杆菌*iceA*、*cagA*相关性研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2006; 15: 584-586
- 8 庄坤, 张军, 张玲霞, 张沂, 张建中. 西安地区幽门螺杆菌*iceA1*、*iceA2*和*babA2*基因型与致病性的研究. 细胞与分子免疫学杂志 2007; 23: 520-522
- 9 Fujimoto S, Marshall B, Blaser MJ. PCR-based

- restriction fragment length polymorphism typing of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 331-334
- 10 van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, de Boer W, Quint W. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1998; 115: 58-66
  - 11 Ruggiero P, Rossi G, Tombola F, Pancotto L, Lauretti L, Del Giudice G, Zoratti M. Red wine and green tea reduce H pylori- or VacA-induced gastritis in a mouse model. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 349-354
  - 12 Karhukorpi J, Yan Y, Kolho KL, Rautelin H, Lahti M, Sirviö A, Riiipinen K, Lindahl H, Verkasalo M, Fagerholm R, Karttunen R. *cagA*, *vacA* and *iceA* virulence genes of *Helicobacter pylori* isolates of children in Finland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19: 790-793
  - 13 Bartchewsky W Jr, Martini MR, Masiero M, Squassoni AC, Alvarez MC, Ladeira MS, Salvatore D, Trevisan M, Pedrazzoli J Jr, Ribeiro ML. Effect of *Helicobacter pylori* infection on IL-8, IL-1beta and COX-2 expression in patients with chronic gastritis and gastric cancer. *Scand J Gastroenterol* 2009; 44: 153-161
  - 14 Nguyen TN, Barkun AN, Fallone CA. Host determinants of *Helicobacter pylori* infection and its clinical outcome. *Helicobacter* 1999; 4: 185-197
  - 15 林孜, 张曙, 吴云林. 幽门螺杆菌基因特征与宿主临床结果相关性研究进展. *胃肠病学和肝病学杂志* 2008; 17: 527-531
  - 16 Chomvarin C, Namwat W, Chaicumpar K, Mairiang P, Sangchan A, Sripa B, Tor-Udom S, Vilaichone RK. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA* and *babA2* genotypes in Thai dyspeptic patients. *Int J Infect Dis* 2008; 12: 30-36
  - 17 Ko JS, Kim KM, Oh YL, Seo JK. *cagA*, *vacA*, and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* in Korean children. *Pediatr Int* 2008; 50: 628-631
  - 18 Lin YF, Gong ST, Ou WJ, Pan RF, Huang H, He WE, Liu LY, Huo XH, Chen BX. [Genotypic study on the *Helicobacter pylori vacA*, *cagA* and *iceA* genes in the infected children in Guangzhou area] *Zhonghua Erke Zazhi* 2007; 45: 703-707
  - 19 Gatti LL, Módena JL, Payão SL, Smith Mde A, Fukuhara Y, Módena JL, de Oliveira RB, Brocchi M. Prevalence of *Helicobacter pylori cagA*, *iceA* and *babA2* alleles in Brazilian patients with upper gastrointestinal diseases. *Acta Trop* 2006; 100: 232-240
  - 20 Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashima K, Graham DY. Relationship between *Helicobacter pylori iceA*, *cagA*, and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2274-2279
  - 21 Peek RM Jr, Thompson SA, Donahue JP, Tham KT, Atherton JC, Blaser MJ, Miller GG. Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacter pylori* gene, *iceA*, that is associated with clinical outcome. *Proc Assoc Am Physicians* 1998; 110: 531-544
  - 22 宫月华, 柳云恩, 孙丽萍, 董楠楠, 袁媛. 中国辽宁地区人群幽门螺杆菌感染菌株与相关性胃疾病的关系. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3462-3467
  - 23 Andreson H, Lõivukene K, Sillakivi T, Maarooos HI, Ustav M, Peetsalu A, Mikelsaar M. Association of *cagA* and *vacA* genotypes of *Helicobacter pylori* with gastric diseases in Estonia. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 298-300
  - 24 Salehi Z, Jelodar MH, Rassa M, Ahaki M, Mollasalehi H, Mashayekhi F. *Helicobacter pylori cagA* status and peptic ulcer disease in Iran. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 608-613
  - 25 Momenah AM, Tayeb MT. *Helicobacter pylori cagA* and *iceA* genotypes status and risk of peptic ulcer in Saudi patients. *Saudi Med J* 2007; 28: 382-385
  - 26 Caner V, Yilmaz M, Yoneti N, Zencir S, Karagenc N, Kaleli I, Bagci H. H pylori *iceA* alleles are disease-specific virulence factors. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2581-2585
  - 27 Ashour AA, Collares GB, Mendes EN, de Gusmão VR, Queiroz DM, Magalhães PP, de Carvalho AS, de Oliveira CA, Nogueira AM, Rocha GA, Rocha AM. *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian children and adults. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1746-1750
  - 28 Wu CC, Chou PY, Hu CT, Liu ZC, Lin CY, Tseng YH, Lin NT. Clinical Relevance of the *vacA*, *iceA*, *cagA*, and *flaA* genes of *Helicobacter pylori* strains isolated in Eastern Taiwan. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2913-2915
  - 29 Wong BC, Yin Y, Berg DE, Xia HH, Zhang JZ, Wang WH, Wong WM, Huang XR, Tang VS, Lam SK. Distribution of distinct *vacA*, *cagA* and *iceA* alleles in *Helicobacter pylori* in Hong Kong. *Helicobacter* 2001; 6: 317-324
  - 30 Donahue JP, Peek RM, Van Doorn LJ, Thompson SA, Xu Q, Blaser MJ, Miller GG. Analysis of *iceA1* transcription in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2000; 5: 1-12
  - 31 Peek RM Jr, van Doorn LJ, Donahue JP, Tham KT, Figueiredo C, Blaser MJ, Miller GG. Quantitative detection of *Helicobacter pylori* gene expression in vivo and relationship to gastric pathology. *Infect Immun* 2000; 68: 5488-5495

#### ■同行评价

本研究选题较好, 设计合理, 结果可靠, 具有较好的学术价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

# 氨假说和细胞因子在肝性脑病发病中的研究进展

汪照函, 刘沛

## ■背景资料

肝性脑病是急慢性肝损伤致死性并发症之一,其发病机制复杂,目前认为其可能机制有氨假说、细胞因子理论、苯二氮卓类受体假说和低血钠假说等,其中氨假说较其他假说最为让人接受,研究最多。

汪照函, 刘沛, 中国医科大学附属第一医院传染科 辽宁省沈阳市 110001

作者贡献分布: 本文写作由汪照函完成, 刘沛审核。

通讯作者: 刘沛, 教授, 110001, 辽宁省沈阳市南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院传染科. syliupeit2003@yahoo.com.cn  
电话: 024-83283091

收稿日期: 2009-03-29 修回日期: 2009-05-05

接受日期: 2009-05-11 在线出版日期: 2009-06-08

## Advance in roles of ammonia and cytokines in hepatic encephalopathy

Zhao-Han Wang, Pei Liu

Zhao-Han Wang, Pei Liu, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Professor Pei Liu, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of China Medical University, 155 Nanjing North Street, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. syliupeit2003@yahoo.com.cn

Received: 2009-03-29 Revised: 2009-05-05

Accepted: 2009-05-11 Published online: 2009-06-08

## Abstract

Hyperammonia theory has been thought as a most feasible mechanism of hepatic encephalopathy following liver injury. Astroglial swelling was reckoned as pathological basis of hepatic encephalopathy. Many assumed mechanisms include oxidative stress activation, mitochondrial permeability transition and glutamine theory, by which ammonia acts on astroglial swelling. Cytokines have influence on the development of hepatic encephalopathy. There are mutual effects of both ammonia and cytokines inducing hepatic encephalopathy.

Key Words: Ammonia; Cytokine; Hepatic encephalopathy; Astroglial swelling

Wang ZH, Liu P. Advance in roles of ammonia and cytokines in hepatic encephalopathy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(16): 1638-1642

## 摘要

氨假说被认为是肝损伤致肝性脑病重要机制之一。星状胶质细胞水肿是肝性脑病的病理基

础,而氨主要通过氧化应激激活、线粒体膜通透性转变和谷氨酰胺假说造成胶质细胞水肿。细胞因子对肝性脑病的发生也存在着影响。氨假说和细胞因子作用对肝性脑病的发生存在着一些共同机制。

关键词: 氨假说; 细胞因子; 肝性脑病; 星状胶质细胞水肿

汪照函, 刘沛. 氨假说和细胞因子在肝性脑病发病中的研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(16): 1638-1642

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1638.asp>

## 0 引言

肝性脑病起病急,在一些导致肝衰竭的肝损伤疾病和中毒中易被诱发,表现为突然发作的精神错乱、谵妄、昏迷,有较高病死率<sup>[1-2]</sup>。在肝性脑病的病因研究中,氨假说、细胞因子假说、低血钠假说、苯二氮卓类受体假说等研究较广,其中氨假说、细胞因子假说引人注目,研究最多。本文重点对氨假说、细胞因子假说的研究进展作一综述。

## 1 肝性脑病的病理基础

尸体解剖和动物实验发现脑水肿和星状胶质细胞水肿是肝性脑病的病理基础<sup>[3]</sup>。甚至在急性肝损伤疾病的死亡病例中,约有30%的患者死于脑水肿和颅内高压导致的脑疝<sup>[4]</sup>。在急性肝衰竭患者中,弥散加权磁共振成像发现细胞水肿现象,表现为细胞内水份的堆积而造成细胞外间隙的狭小<sup>[5]</sup>。在慢性肝损伤导致的脑衰竭疾病中,星状胶质细胞常常表现阿尔茨海默Ⅱ型星形细胞增生特征。表现为星形细胞体积增大、核淡染、染色质向核膜周边分布<sup>[6]</sup>。

## 2 血氨与肝性脑病

血氨增高被认为是肝性脑病发生的主要病因。Bhatia *et al*研究发现动脉血氨浓度>124 μmol/L与重型肝性脑病和脑水肿发生相关,且预测死亡率的精确度达80%<sup>[7]</sup>。目前认为细胞水肿造成

## ■同行评议者

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

星状胶质细胞功能如清除兴奋性神经递质, 维持胶质细胞-神经元连接作用失调, 进一步造成神经元的损伤. 星状胶质细胞是脑内主要的细胞成分, 数量上超过了神经细胞的9倍, 体积上在脑皮质中甚至超过了1/3<sup>[8]</sup>. 即使是轻度的星状胶质细胞水肿也能造成胞外间隙显著减小, 因而星状胶质细胞体积的变化是造成脑细胞外液容量改变的机制之一<sup>[9]</sup>. 而胞外间隙的减小限制了分子在脑内的弥散, 且使得各种离子, 兴奋性神经递质和神经毒性代谢产物的堆积, 继而造成神经元损伤. 肝坏死患者发生脑水肿极为有害, 而血氨升高被认为是造成脑水肿的最主要原因之一<sup>[10]</sup>. 目前, 国内外关于血氨升高如何引起星状胶质细胞形态改变机制的研究较多, 综合起来, 包括有直接毒性作用, 氧化应激作用, 线粒体通透性转变和谷氨酰胺等学说. 其中, 谷氨酰胺机制包括传统的谷氨酰胺渗透机制和近年来提出的特洛伊效应<sup>[11-12]</sup>.

**2.1 氧化应激作用** 氧化应激作用是肝性脑病中氨致神经毒性的重要机制之一. 原因如下: (1) 在动物模型和星状胶质细胞培养中, 胞外氨浓度增高造成了星状胶质细胞出现了脂质过氧化现象. (2) 氨浓度增高使得胶质细胞产生自由基, 这在动物实验和体外细胞培养都得到了证实. 自由基的产生可伴随谷胱甘肽水平的减少, 同时可有抗氧化酶如谷胱甘肽过氧化物酶, 超氧化物歧化酶的降低. (3) 证实了氧化应激在体内均能造成星状细胞的水肿. 一些抗氧化物, 如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、维生素E能阻止此效应. (4) 在肝性脑病动物模型中发现NO合成酶的活性和基因表达水平增高, 且使用NO供体如亚硝基乙酰青霉胺(*S-nitroso-N-acetylpenicillamine*, SNAP)和3-吗啉-斯德酮亚胺(3-morpholinolinosydnonimine, SIN-1)使得体外胶质细胞肿胀, 而用NO合成酶抑制物*N*-硝基-*L*-精氨酸甲酯(*N-nitro-L-arginine methyl ester*, *L-NAME*)则使得水肿减轻. (5) 目前使用的有效缓解肝衰竭患者脑水肿治疗措施中, 如低温疗法、*N*-乙酰半胱氨酸、甘露醇和吡啶美辛都具有抗氧化或抗炎效应. 目前认为氧化应激作用的机制有造成胞膜和线粒体损伤, 使得离子转运系统功能转变等<sup>[12-16]</sup>.

**2.2 线粒体通透性转变** 氨浓度增高使得体外培养的星状胶质细胞发生线粒体通透性改变, 这可能与氨的氧化应激作用及促钙内流的效应有关. 整个过程具有钙离子依赖性, 表现为线粒体

通透性转换孔突然开放, 造成了线粒体内膜的塌陷, 对质子、电子以及其他溶质通透性增加, 进而导致线粒体功能不全, 能量衰竭以及自由基的产生. 严重时, 甚至造成胶质细胞的凋亡或坏死<sup>[17]</sup>. 其过程能被环孢素A所特异性阻断. 这种效应导致星状胶质细胞水肿可能与产生氧化应激以及能量供给不足有关<sup>[18]</sup>.

### 2.3 谷氨酰胺机制

**2.3.1 谷氨酰胺渗透物质学说:** 在急性肝衰竭患者中, 在星状胶质细胞谷氨酰胺合成酶作用下, 血氨升高使得其代谢产物谷氨酰胺浓度升高. 胞内谷氨酰胺作为渗透物使得胞内渗透压增加, 从而继发水分子内流, 造成星状胶质细胞水肿. 同时, 为了平衡渗透压, 胞内渗透压调节物肌醇逸出胞外使得细胞对氨损伤敏感性增加<sup>[12]</sup>.

**2.3.2 特洛伊效应:** 许多研究观察表明上一学说具有相当的可疑性. Zwingmann *et al* 发现在急性肝衰竭中谷氨酰胺浓度并不与细胞水肿相关<sup>[19]</sup>. 低氧治疗脑水肿并不伴随谷氨酰胺浓度的降低. Jayakumar *et al* 认为氨致星状胶质细胞水肿伴随胞质谷氨酰胺水平延迟增高甚至不伴增高<sup>[16]</sup>. 然而, 谷氨酰胺在脑水肿机制中具有极为重要的作用. 事实证明, 谷氨酰胺合成酶抑制剂*L*-蛋氨酸磺酸盐(*methionine sulfoximine*)能够有效阻止脑水肿和颅内高压的发生<sup>[20]</sup>. 微透析法测得脑谷氨酰胺的水平与颅内压水平具有相关性<sup>[21]</sup>. 对此, 一些学者提出了特洛伊效应, 认为在氨与谷氨酸合成谷氨酰胺之后, “秘密”进入线粒体, 在激活的磷酸化的谷氨酰胺酶作用下释放出氨, 进一步造成了自由基的产生, 线粒体膜通透性转变效应, 最后导致了细胞水肿<sup>[11-12]</sup>.

**2.4 其他** 还有学者认为氨造成细胞水肿发生可能与能量衰竭有关, 主要为限制 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶作用和刺激大量乳酸的产生<sup>[22-23]</sup>, 可能与信号蛋白激酶机制有关, 丝裂原活化蛋白激酶可能是星状胶质细胞水肿的原因之一<sup>[24]</sup>; 甚至和基因表达改变有关, 研究发现在急性肝衰竭模型中, 谷氨酸转运体, 外周苯二氮卓类受体和四型水通道蛋白表达都有所改变<sup>[25]</sup>.

## 3 细胞因子与肝性脑病

氨中毒在肝衰竭致肝性脑病中并不是唯一机制. 首先, 在急性肝衰竭中, 即使是设立血氨 $>200 \mu\text{mol/L}$ 标准, 也不能确立患者完全发生肝性脑病<sup>[26]</sup>. Ong *et al* 研究得出血氨和肝性脑病具有一定的相关性, 但两者水平相互间存在着重叠<sup>[27]</sup>.

### ■ 研发前沿

国外对氨假说和细胞因子理论研究深入, 各抒己见. 从肝性脑病的病理基础, 氨假说的氧化应激理论、线粒体膜通透性转变理论和谷氨酰胺学说到细胞因子的内皮细胞激活理论和穿过血脑屏障机制均有过报道.



## ■ 相关报道

目前认为外周血氨的升高和肝性脑病的发生和严重程度据有一定的相关性。有的学者认为在肝损伤中血脑屏障对氨的通透性增加造成氨进入脑中中枢增多对胶质细胞水肿产生影响。也有人认为高血氨症和内毒素对脑血流产生影响,造成颅内高压。

甚至在一些肝性脑病患者中存在正常值范围内的血氨水平<sup>[28]</sup>。而2例对照研究中肝硬化志愿者注射氨液并未发生肝性脑病<sup>[29]</sup>。因此,人们认为还存在着其他机制影响着肝性脑病的发生。一些学者发现外周血炎性细胞因子和肝衰竭致肝性脑病的发生具有一定的关联<sup>[4,30-31]</sup>。

**3.1 外周炎性细胞因子作用机制** 由于血脑屏障的存在,大分子非脂溶性物质包括细胞因子(15-20 kDa)不能进入内皮细胞脑侧。然而,通过“细胞因子介导血管内皮细胞活化”作用,某些细胞因子如TNF- $\alpha$ 、IL-1和IFN- $\gamma$ 影响内皮细胞间黏附因子(内皮细胞-白细胞黏附因子、细胞间黏附因子、血管内皮细胞黏附因子)的表达,从而造成了大分子在血脑屏障的逃逸<sup>[32]</sup>。活化作用主要表现为细胞因子激活诱导型NO合成酶的活性,使得具有细胞毒性的活性氮化合物持续性增加<sup>[33]</sup>。我们的实验证明了,在大鼠急性肝衰竭模型中,TNF- $\alpha$ 造成了血脑屏障对伊文思蓝可逆性通透性增加<sup>[34]</sup>。体外实验也有类似的报道<sup>[35]</sup>。一些研究表明外周细胞因子可以通过一些途经影响脑功能<sup>[36-37]</sup>。(1)外周神经作用:一些外周炎性细胞因子,通过激动存在于外周神经组织,主要是迷走神经上的IL-1受体,对脑内产生作用。(2)脑血管第二信使作用:实验证明在外周炎性细胞因子作用于脑血管后,存在着血管内皮内NO合成酶mRNA高表达和COX-2 mRNA表达现象。(3)穿透脑屏障和绕过脑屏障作用:Banks *et al*发现人重组IL-1 $\alpha$ 可通过皮下注射进入脑组织,提示了脑屏障中存在细胞因子饱和性转运机制,甚至细胞因子可以进入缺乏血脑屏障的脑组织,如松果体、脑末端血管球等,继而引起其他脑实质的变化<sup>[38]</sup>。

**3.2 中枢炎性细胞因子作用机制** 中枢细胞因子对比外周细胞因子更容易产生神经作用,且比外周细胞因子作用大。在脑内,主要由激活的小胶质细胞和星状胶质细胞产生细胞因子。早期主要产生TNF- $\alpha$ ,继而诱导IL-1和IL-6产生。在肝性脑病患者中,一些炎性细胞因子总是同时升高,且颅内压力的增高和肝性脑病程度具有一定的相关性。一些研究表明,炎性细胞因子之间存在着一定的协同作用,相互作用比单一效应更能引起神经细胞和胶质细胞的损伤。这都揭示着细胞因子作用之间的网络效应。炎性细胞因子对于神经的损伤作用主要通过激动NMDA受体产生效应以及促进诱导型NO合成酶的表达,可进一步产生关键酶的蛋白质酪氨酸效应,

使谷氨酸转运体失活,谷氨酰胺酶磷酸化激活。这也揭示着氨-细胞因子-谷氨酰胺之间存在一定的关联和共同途径<sup>[4,31,39]</sup>。

## 4 氨和细胞因子的共同机制

一些学者认为外周细胞因子和氨造成肝性脑病协同作用和可能协同作用。有人报道TNF- $\alpha$ 能增加大鼠皮质和纹状体的外周苯二氮卓类受体表达<sup>[40]</sup>,体外实验也证明了这一点<sup>[41]</sup>。血氨增高使得星形胶质细胞对 $\gamma$ -氨基丁酸吸收减少,使GABA受体传入电位增高<sup>[42]</sup>。两者的协同作用使得GABA受体复合体抑制性电位传导增多,因而肝性脑病偏向抑郁性发作<sup>[4,43]</sup>。炎性细胞因子诱导脑血管内皮细胞NO合成酶的表达,扩张脑血管从而增加脑血流,引起颅内压增高。在急性肝衰竭中,血氨和颅内压增高有一定的关联。因此,细胞因子和氨造成的颅内压增高有无协同作用,共同机制,值得进一步探讨<sup>[44]</sup>。Lockwood *et al*使用临床PET检查证实了肝性脑病情况下,血脑屏障对氨的通透性增加,其差别有显著意义<sup>[45]</sup>,其数据得到另外一些实验的支持<sup>[46-47]</sup>。但也有相反的研究报道<sup>[48-49]</sup>。近年数位经进一步论证还是支持了Lockwood *et al*的实验结果<sup>[50-51]</sup>。体外实验证实了TNF- $\alpha$ 和IL-6增加脑内皮细胞模型中氨的通透<sup>[52]</sup>。究竟细胞因子在体内能否引起血脑屏障的通透性改变,如果影响又是何机制,尚未得到证实。

## 5 结论

肝衰竭所致肝性脑病的机制复杂,目前国外热衷于研究氨假说和细胞因子作用以及其他学说分别及共同的作用,成果较以前有着重大的进步,但离结论尚有较远的距离。从基础研究来看,氨和细胞因子在致病作用中起着较为关键的作用,但正如文中所述,氨在进入脑中枢的过程和进一步的作用,其过程和作用是否得到细胞因子的“帮助”值得人们去探讨。从临床上来说,使用肠道降氨类药物如乳果糖和新霉素和注射降血氨药物如L-鸟氨酸-L-门东氨酸(ornithine-aspartate, OA)对肝衰竭致肝性脑病患者有着较好的疗效,静脉滴注高渗葡萄糖和甘露醇等脱水药也能很好的防治脑水肿,这些都能使得部分肝衰竭患者免于诱发肝性脑病,得到很好的救治。也许将来采用拮抗炎性细胞因子制剂和使用定位脑中枢的抗氧化药物等措施也会成为肝性脑病患者治疗手段。

## 6 参考文献

- 1 Detry O, De Roover A, Honore P, Meurisse M. Brain edema and intracranial hypertension in fulminant hepatic failure: pathophysiology and management. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7405-7412
- 2 Córdoba J, Mínguez B. Hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis* 2008; 28: 70-80
- 3 Häussinger D, Schliess F. Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. *Gut* 2008; 57: 1156-1165
- 4 Shawcross D, Jalan R. The pathophysiologic basis of hepatic encephalopathy: central role for ammonia and inflammation. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 2295-2304
- 5 Ranjan P, Mishra AM, Kale R, Saraswat VA, Gupta RK. Cytotoxic edema is responsible for raised intracranial pressure in fulminant hepatic failure: in vivo demonstration using diffusion-weighted MRI in human subjects. *Metab Brain Dis* 2005; 20: 181-192
- 6 Seiler N. Ammonia and Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 2002; 41: 189-207
- 7 Bhatia V, Singh R, Acharya SK. Predictive value of arterial ammonia for complications and outcome in acute liver failure. *Gut* 2006; 55: 98-104
- 8 Norenberg MD. Astroglial dysfunction in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 1998; 13: 319-335
- 9 Häussinger D. The role of cellular hydration in the regulation of cell function. *Biochem J* 1996; 313 (Pt 3): 697-710
- 10 Wendon J, Lee W. Encephalopathy and cerebral edema in the setting of acute liver failure: pathogenesis and management. *Neurocrit Care* 2008; 9: 97-102
- 11 Albrecht J, Norenberg MD. Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology* 2006; 44: 788-794
- 12 Norenberg MD, Jayakumar AR, Rama Rao KV, Panickar KS. New concepts in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Metab Brain Dis* 2007; 22: 219-234
- 13 Brahma B, Forman RE, Stewart EE, Nicholson C, Rice ME. Ascorbate inhibits edema in brain slices. *J Neurochem* 2000; 74: 1263-1270
- 14 Reddy PV, Murthy ChR, Reddanna P. Fulminant hepatic failure induced oxidative stress in nonsynaptic mitochondria of cerebral cortex in rats. *Neurosci Lett* 2004; 368: 15-20
- 15 Norenberg MD, Jayakumar AR, Rama Rao KV. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2004; 19: 313-329
- 16 Jayakumar AR, Rao KV, Murthy ChR, Norenberg MD. Glutamine in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Neurochem Int* 2006; 48: 623-628
- 17 Rama Rao KV, Jayakumar AR, Norenberg MD. Role of oxidative stress in the ammonia-induced mitochondrial permeability transition in cultured astrocytes. *Neurochem Int* 2005; 47: 31-38
- 18 Rose C, Kresse W, Kettenmann H. Acute insult of ammonia leads to calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes, an effect of pH. *J Biol Chem* 2005; 280: 20937-20944
- 19 Zwingmann C, Chatauret N, Rose C, Leibfritz D, Butterworth RF. Selective alterations of brain osmolytes in acute liver failure: protective effect of mild hypothermia. *Brain Res* 2004; 999: 118-123
- 20 Blei AT. The pathophysiology of brain edema in acute liver failure. *Neurochem Int* 2005; 47: 71-77
- 21 Tofteng F, Hauerberg J, Hansen BA, Pedersen CB, Jörgensen L, Larsen FS. Persistent arterial hyperammonemia increases the concentration of glutamine and alanine in the brain and correlates with intracranial pressure in patients with fulminant hepatic failure. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006; 26: 21-27
- 22 Murthy CR, Norenberg MD. Suppression of ammonia-induced swelling by aspartate but not by ornithine in primary cultures of rat astrocytes. *Neurochem Int* 2002; 41: 171-176
- 23 Rao KV, Norenberg MD. Cerebral energy metabolism in hepatic encephalopathy and hyperammonemia. *Metab Brain Dis* 2001; 16: 67-78
- 24 Jayakumar AR, Panickar KS, Murthy ChR, Norenberg MD. Oxidative stress and mitogen-activated protein kinase phosphorylation mediate ammonia-induced cell swelling and glutamate uptake inhibition in cultured astrocytes. *J Neurosci* 2006; 26: 4774-4784
- 25 Rama Rao KV, Norenberg MD. Aquaporin-4 in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2007; 22: 265-275
- 26 Bernal W, Hall C, Karvellas CJ, Auzinger G, Sizer E, Wendon J. Arterial ammonia and clinical risk factors for encephalopathy and intracranial hypertension in acute liver failure. *Hepatology* 2007; 46: 1844-1852
- 27 Ong JP, Aggarwal A, Krieger D, Easley KA, Karafa MT, Van Lente F, Arroliga AC, Mullen KD. Correlation between ammonia levels and the severity of hepatic encephalopathy. *Am J Med* 2003; 114: 188-193
- 28 Jensen DM. Portal-systemic encephalopathy and hepatic coma. *Med Clin North Am* 1986; 70: 1081-1092
- 29 Odeh M, Sabo E, Srugo I, Oliven A. Relationship between tumor necrosis factor-alpha and ammonia in patients with hepatic encephalopathy due to chronic liver failure. *Ann Med* 2005; 37: 603-612
- 30 Odeh M. Pathogenesis of hepatic encephalopathy: the tumour necrosis factor-alpha theory. *Eur J Clin Invest* 2007; 37: 291-304
- 31 Wright G, Shawcross D, Olde Damink SW, Jalan R. Brain cytokine flux in acute liver failure and its relationship with intracranial hypertension. *Metab Brain Dis* 2007; 22: 375-388
- 32 Duchini A. The role of central nervous system endothelial cell activation in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Med Hypotheses* 1996; 46: 239-244
- 33 Lamas S, Michel T, Brenner BM, Marsden PA. Nitric oxide synthesis in endothelial cells: evidence for a pathway inducible by TNF-alpha. *Am J Physiol* 1991; 261: C634-C641
- 34 Lü S, Song HL, Liu P. [Effect of tumor necrosis factor-alpha on blood-brain barrier permeability in mice with acute liver necrosis] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2005; 13: 858-859
- 35 Mark KS, Miller DW. Increased permeability of primary cultured brain microvessel endothelial cell monolayers following TNF-alpha exposure. *Life Sci* 1999; 64: 1941-1953
- 36 Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune

## ■同行评价

本文较全面地总结了氨假说和细胞因子-炎症反应在肝性脑病中的重要机制, 论点正确。论据较充分, 可能为肝性脑病的治疗提供新的靶点。

- system. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 595-638
- 37 Hosoi T, Okuma Y, Nomura Y. The mechanisms of immune-to-brain communication in inflammation as a drug target. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2002; 1: 257-262
- 38 Banks WA, Kastin AJ, Broadwell RD. Passage of cytokines across the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation* 1995; 2: 241-248
- 39 Chao CC, Hu S, Ehrlich L, Peterson PK. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha synergistically mediate neurotoxicity: involvement of nitric oxide and of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Behav Immun* 1995; 9: 355-365
- 40 Bourdiol F, Toulmond S, Serrano A, Benavides J, Scatton B. Increase in omega 3 (peripheral type benzodiazepine) binding sites in the rat cortex and striatum after local injection of interleukin-1, tumour necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *Brain Res* 1991; 543: 194-200
- 41 Oh YJ, Francis JW, Markelonis GJ, Oh TH. Interleukin-1-beta and tumor necrosis factor-alpha increase peripheral-type benzodiazepine binding sites in cultured polygonal astrocytes. *J Neurochem* 1992; 58: 2131-2138
- 42 Ahboucha S, Butterworth RF. Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at GABA from the molecular standpoint. *Metab Brain Dis* 2004; 19: 331-343
- 43 Jones EA. Potential mechanisms of enhanced GABA-mediated inhibitory neurotransmission in liver failure. *Neurochem Int* 2003; 43: 509-516
- 44 Häussinger D, Görg B, Reinehr R, Schliess F. Protein tyrosine nitration in hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2005; 20: 285-294
- 45 Lockwood AH, Yap EW, Wong WH. Cerebral ammonia metabolism in patients with severe liver disease and minimal hepatic encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab* 1991; 11: 337-341
- 46 Raichle ME, Larson KB. The significance of the NH<sub>3</sub>-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>(4) equilibrium on the passage of 13N-ammonia from blood to brain. A new regional residue detection model. *Circ Res* 1981; 48: 913-937
- 47 Ahl B, Weissenborn K, van den Hoff J, Fischer-Wasels D, Köstler H, Hecker H, Burchert W. Regional differences in cerebral blood flow and cerebral ammonia metabolism in patients with cirrhosis. *Hepatology* 2004; 40: 73-79
- 48 Keiding S, Sørensen M, Bender D, Munk OL, Ott P, Vilstrup H. Brain metabolism of 13N-ammonia during acute hepatic encephalopathy in cirrhosis measured by positron emission tomography. *Hepatology* 2006; 43: 42-50
- 49 Sørensen M, Keiding S. New findings on cerebral ammonia uptake in HE using functional (13)N-ammonia PET. *Metab Brain Dis* 2007; 22: 277-284
- 50 Lockwood AH, Wack DS. The brain permeability-surface product for ammonia. *Hepatology* 2006; 44: 1052-1053; author reply 1053-1054
- 51 Lockwood AH. Controversies in ammonia metabolism: implications for hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2007; 22: 285-289
- 52 Duchini A, Govindarajan S, Santucci M, Zampi G, Hofman FM. Effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 on fluid-phase permeability and ammonia diffusion in CNS-derived endothelial cells. *J Investig Med* 1996; 44: 474-482

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 •

《世界胃肠病学杂志》(英文版)  
成功通过评审被 PMC 收录

本刊讯 PubMed Central(PMC)是由美国国家医学图书馆(NLM)下属国家生物技术信息中心(NCBI)创立的开放存取(Open Access)的生物医学和生命科学全文数据库。此数据库只收录采取国际同行评审制度评议的期刊,并对收录期刊有较高的科学、编辑及数据文件质量要求。

截至目前,我国只有两本期刊被PMC收录。《浙江大学学报B》(英文版)(*Journal of Zhejiang University Science B*)是我国第一本通过PMC评审并于2006-03-15被收录的期刊。《世界胃肠病学杂志》(英文版)(*World Journal of Gastroenterology*)第二本通过PMC评审并于2009-03-26被收录,全文免费向公众开放,见: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/tocrender.fcgi?journal=818&action=archive> (编辑部主任:程剑侠 2009-06-08)

# 急性胰腺炎肠道功能障碍的发病机制与治疗

陈玉梅, 冯志杰

陈玉梅, 冯志杰, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省石家庄市 050000  
作者贡献分布: 陈玉梅与冯志杰对此文所作贡献均等; 论文写作由陈玉梅完成, 冯志杰审核。  
通讯作者: 冯志杰, 主任医师, 教授, 050000, 河北省石家庄市, 河北医科大学第二医院消化内科. zhijiefeng2005@126.com  
电话: 0311-66002951  
收稿日期: 2009-03-08 修回日期: 2009-04-10  
接受日期: 2009-04-13 在线出版日期: 2009-06-08

## Pathogenesis and treatment of intestinal dysfunction in acute pancreatitis

Yu-Mei Chen, Zhi-Jie Feng

Yu-Mei Chen, Zhi-Jie Feng, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China  
Correspondence to: Professor Zhi-Jie Feng, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. zhijiefeng2005@126.com  
Received: 2009-03-08 Revised: 2009-04-10  
Accepted: 2009-04-13 Published online: 2009-06-08

### Abstract

Acute pancreatitis can lead to bowel dysfunction, including the intestinal barrier injury and intestinal motility disorder. A large number of pathogenic bacteria will breed and transfer to other organs through the damaged intestinal mucosa, which can aggravate pancreatitis and cause multiple organ dysfunctions. In this paper, the pathogenesis and treatment of acute pancreatitis with intestinal dysfunction are summarized.

Key Words: Acute pancreatitis; Bowel dysfunction; Pathogenesis; Treatment

Chen YM, Feng ZJ. Pathogenesis and treatment of intestinal dysfunction in acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(16): 1643-1648

### 摘要

急性胰腺炎可导致肠道功能障碍, 包括肠道屏障损伤和肠道动力障碍, 此时肠道中滋生大量致病菌, 他们可通过破损的肠黏膜易位至其他

器官, 加重胰腺炎病情, 并可引起多器官功能障碍. 本文综述了近年来急性胰腺炎肠道功能障碍的发病机制和治疗进展.

关键词: 急性胰腺炎; 肠道功能障碍; 发病机制; 治疗

陈玉梅, 冯志杰. 急性胰腺炎肠道功能障碍的发病机制与治疗. *世界华人消化杂志* 2009; 17(16): 1643-1648  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1643.asp>

### 0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP), 特别是重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)可伴有麻痹性肠梗阻, 肠黏膜屏障损害, 肠道细菌和内毒素移位, 引起肠源性感染, 甚至可引起多器官功能障碍, 随着研究的不断深入, 病死率已由20世纪80年代的70%-85%, 降至近年的10%-20%. 本文对AP肠道功能障碍的发病机制和治疗作一综述.

### 1 AP肠道功能障碍的发生机制

#### 1.1 肠道屏障损伤

1.1.1 肠道机械屏障损伤: 肠黏膜上皮细胞层的完整性及上皮细胞间的紧密连接, 形成了机体防止肠道内细菌发生移位的机械屏障, 是保持肠屏障功能的主要因素. 许多临床与动物实验均证明SAP存在肠机械屏障损害, 主要表现为黏膜细胞凋亡、血液循环障碍以及大量炎性介质激活介导的黏膜损伤. (1)肠黏膜细胞凋亡: Kudari *et al*<sup>[1]</sup>通过制造AP模型观察到大肠绒毛上皮细胞在急性期即出现凋亡, 伴随病程的延长会出现肠道组织明显损伤. 癌基因中**bcl-2**是备受关注的与细胞凋亡相关的基因之一, **bcl-2**抑制凋亡, **bax**诱导细胞凋亡. 有人在胰腺炎中发现肠黏膜**bcl-2**表达下降, 而**bax**表达上升<sup>[2]</sup>. 在SAP中, caspase激活在加速细胞肠上皮细胞的凋亡中起关键作用, 通过加速细胞凋亡破坏肠黏膜, 引起肠道通透性增加以及内毒素移位<sup>[3]</sup>. Yasuda *et al*<sup>[4]</sup>观察胰腺炎造模成功6 h后, 即发生回肠黏膜凋亡加快, 并且证实血小板活化因

### ■背景资料

急性胰腺炎易并发多器官功能损伤, 肠道功能障碍是常见的胰腺外器官损伤之一, 由于肠道是应激反应的中心器官, 可加重胰腺炎病情, 甚至造成患者死亡. 因此, 肠道功能障碍的合理治疗是改善急性胰腺炎预后的重要措施.

### ■同行评议者

陈其奎, 教授, 中山大学附属第二医院消化内科

## ■ 研发前沿

应用促动力剂和中医药法改善肠动力障碍等方面, 尽管取得了一定的疗效, 但目前多以动物实验研究为主, 尚缺乏大样本的临床对照研究。

子水平与黏膜凋亡呈正相关, 说明血小板活化可能加速了细胞凋亡。(2) 血液循环障碍: 肠道低灌注在AP并发肠道屏障功能损伤中发挥重要作用, 尿液中肠脂肪酸结合蛋白(intestinal fatty acid binding protein, IFABP)升高是肠道缺血的敏感指标; AP发生时, 由于严重炎症反应导致大量液体丢失, 引起内脏血管收缩, 肠道缺血、缺氧造成黏膜上皮的直接损伤以及缺血再灌注带来的氧自由基继发性肠黏膜损伤, 造成了肠黏膜通透性增加<sup>[5-6]</sup>。临床上最严重的肠道缺血表现为肠坏死、狭窄或瘘管形成。Hirota *et al*<sup>[7]</sup>对120例胰腺炎患者进行了回顾性调查, 其中60名重症患者合并缺血性肠坏死(患病率为4.2%)。Takahashi *et al*<sup>[8]</sup>通过对48例AP死亡者进行尸体解剖, 发现其中13例存在缺血性小肠结肠炎。(3) 炎性反应介质: 已有越来越多的实验证明, 一些细胞因子、炎性产物在肠黏膜屏障损害中起关键作用。核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)是一种具有多向转录调节作用的蛋白质, 活化的NF- $\kappa$ B能与DNA特定的 $\kappa$ B位点结合, 启动和调节众多炎性介质参与炎性反应、免疫反应有关基因的转录。Gray *et al*<sup>[9]</sup>报道胰腺炎会引起NF- $\kappa$ B的大量激活。国内学者顾新华 *et al*<sup>[10]</sup>发现SAP大鼠肠黏膜内出现NF- $\kappa$ B-P65大量表达, 且在造模后3 h达到高峰, 以后逐渐减少, 说明在SAP早期肠道黏膜内NF- $\kappa$ B就有大量活化, 介导肠道黏膜损害, 扩大炎症反应。

1.1.2 肠道免疫屏障损伤: 肠道免疫屏障主要由分泌至肠黏膜表面及肠腔中的免疫球蛋白和肠道黏膜内以淋巴细胞为主体的肠道相关淋巴组织共同构成, 可以阻止细菌穿过肠壁, 并且能够捕获黏膜内的细菌, 因此肠道免疫损伤在其屏障损伤中发挥着不可忽视的作用。分泌型免疫球蛋白A(secretory immunoglobulin A, sIgA)是体内分泌量最大的免疫球蛋白, 是构成肠道免疫屏障的主要组成部分, 对肠道菌群中的G杆菌具有特殊亲和力, 而后者是创伤后细菌移位及脓毒血症的主要病原菌, 因此, sIgA是保护肠道屏障的重要物质。实验发现, SAP大鼠肠内容物中sIgA含量较对照组明显减少, 同时血清中TNF- $\alpha$ 含量显著升高, 且血清中TNF- $\alpha$ 含量与肠内容物中sIgA含量呈显著负相关, 这表明在SAP时TNF- $\alpha$ 与肠道免疫屏障破坏有关, 其机制可能为SAP时TNF- $\alpha$ 直接破坏肠黏膜上皮细胞, 引起肠道微循环障碍, 肠黏膜缺血缺氧破坏了肠道免疫细胞生存环境, 使肠道免疫屏障储备耗竭,

免疫细胞分泌功能减退。TNF- $\alpha$ 还引起肝脏损伤, 使sIgA合成减少, 导致肠内容物中的sIgA含量减少, 肠道免疫屏障受到损伤<sup>[11]</sup>。

肠道相关淋巴组织是免疫屏障的一个组成部分, 他包括黏膜固有淋巴细胞、浆细胞、淋巴滤泡、肠壁集合淋巴组织和肠系膜淋巴结。肠道固有淋巴细胞主要包括IgA浆细胞CD4<sup>+</sup> T辅助细胞。Qiao *et al*<sup>[12]</sup>在胰腺炎大鼠发现, 肠道黏膜固有层CD3<sup>+</sup> T和CD4<sup>+</sup> T细胞亚群百分比正常组显著降低, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值下降。CD4<sup>+</sup> T细胞作为肠道固有淋巴细胞, 是肠道免疫屏障一个组成部分, 他的比例减少会影响肠道免疫功能, 破坏其抵御细菌的能力。

1.1.3 肠道化学屏障损伤: 肠道内的各种消化液, 包括胃酸、胆汁、胰液、肠液等共同构成了肠道的化学屏障。AP时由于长期禁食, 缺乏食物对肠道的有效刺激, 肠蠕动减弱, 黏液分泌减少, 肠上皮更新减慢, 中和毒素能力下降, 肠腔内细菌过长, 从而促进细菌移位。SAP时, 肠黏膜血供减少, 黏膜表面绒毛变短, 杯状细胞脱落或功能下降, 黏液分泌减少, 肠黏膜的化学屏障因之受损, 进而导致肠道细菌和内毒素进入血液循环<sup>[13-14]</sup>。

1.1.4 肠道生物屏障损伤: 健康机体的肠道内存在大量细菌和其他微生物, 不同种类的肠道细菌之间维持着精细而复杂的平衡状态, 共同构成了肠道的生物屏障。Romond *et al*<sup>[15]</sup>通过制作感染人类菌群的小鼠模型, 研究了双歧杆菌属与肠道细菌易位的关系, 发现双歧杆菌可以抑制肠道细菌易位到血液、肝脏和肺脏, 而脆弱类杆菌可促进肠道细菌易位到血液、肝脏和肺脏, 梭状芽孢杆菌在远端回肠对肠道细菌易位起到加强作用。双歧杆菌属可以抑制细菌易位, 而大肠杆菌促进细菌易位, 所以, 大肠杆菌的数量增加以及双歧杆菌减少, 破坏了肠道抵御细菌易位的屏障功能。有研究在AP大鼠造模成功后6或12 h, 发现在结肠和远端回肠厌氧菌和双歧杆菌明显减少, 而大肠杆菌的数量明显增加。通过组织细菌培养, 肠道细菌移居肠外器官也得到了证实<sup>[16]</sup>。这说明AP时破坏了肠道正常菌群之间的平衡, 使肠道抵御细菌移位的生物屏障功能大大降低。

1.2 肠道动力障碍 AP并发肠动力障碍在临床十分常见, 主要表现为肠麻痹, 肠胀气。移行运动复合波(migrating motor complex, MMC)与肠道运动功能有关, 他是起源于胃, 经小肠向下传递的一段运动事件, 为空腹期的主要模式。然

而, MMC也可起自小肠的任何部位, 并由此向下传递, 他周期越短肠道运动能力越强反之越弱. 实验发现, 胰腺炎大鼠空肠MMC周期由正常组的 $14.1 \pm 0.2$ 增加到 $22.4 \pm 1.9$ , 且胰腺炎越重空肠MMC周期越长, 说明胰腺炎是通过影响空肠MMC周期来抑制肠道运动功能<sup>[17]</sup>. P物质存在于小肠平滑肌兴奋性运动神经元中, 他可以促进肠道运动, 因此他的减少会影响肠道动力功能. Seerden *et al*<sup>[18]</sup>通过实验证实, 胰腺炎能造成胃排空和肠道传输延迟, 其原因可能通过抑制P物质使肠道肌束的收缩能力下降, 运动功能减退. 肠道动力障碍还与胃肠激素的分泌量有关, 其中胃动素(motilin, MTL)、胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)会增强肠蠕动, 而血管活性肠肽会抑制肠的蠕动. 国内学者徐敏 *et al*<sup>[19]</sup>发现AP肠功能障碍患者的血清MTL、CCK 浓度均较正常对照者显著下降.

## 2 AP肠道功能障碍的治疗

AP能引起肠道功能障碍已得到证实, 但就治疗方法而言目前还没找到一种特效疗法, 现就目前发现的一些方法进行总结.

### 2.1 促进肠道屏障功能的恢复

2.1.1 抑制细胞凋亡、拮抗炎症反应: AP会加重肠黏膜细胞凋亡, 因此抑制细胞凋亡可能起到保护作用. Nakajima *et al*<sup>[20]</sup>通过AP大鼠发现胰腺炎组大鼠肠黏膜凋亡加快, 绒毛高度明显降低, 微血管密度下降, 并且存在细菌易位, 给予血管内皮生长因子后, 可以明显降低细胞凋亡, 改善绒毛高度, 增加微血管密度, 减少细菌易位. Shinzeki *et al*<sup>[21]</sup>发现经腹腔注射含氧perfluorochemical(含氟化合物)在胰腺炎进展12 h后能使肠道移至肠系膜淋巴结的细菌从60%降至37%, 24 h后能明显降低细菌菌落检出率; 经TUNEL对肠上皮细胞进行检测, 发现含氧perfluorochemical能明显抑制肠上皮细胞凋亡, 保护肠道黏膜完整性, 达到减少细菌移位的作用. 有研究显示, 血小板活化因子拮抗剂lexipafant(BB-882)可减少胰腺炎大鼠全身IL-1 $\beta$ 水平及肠道白细胞聚集, 降低肠黏膜通透性, 维护肠道的功能<sup>[22]</sup>. 随机试验发现, 感染性休克患者应用血小板活化因子拮抗剂治疗后, 能降低多器官功能障碍的发病率<sup>[23]</sup>. 因此我们推测血小板活化因子拮抗剂lexipafant(BB-882)应用到AP患者身上也会起到保护肠道功能的作用.

2.1.2 改善微循环: 许多临床与动物实验均证实

SAP存在肠道血液黏度增高, 微循环障碍, 因此改善微循环可促进肠道黏膜屏障恢复. Juvonen *et al*<sup>[24]</sup>发现胰腺炎时肠道血管低灌注, 通过猪的胰腺炎模型证实了早期进行液体复苏能够恢复肠道灌注, 进而防止多器官功能衰竭的形成. 谷氨酰胺是一种特殊的氨基酸, 不仅有营养作用, 而且药理作用也愈来愈受到人们的广泛关注, 他是核酸、核苷酸和蛋白质的重要前驱物, 有促进免疫、改善肠道微循环, 维持肠道机能等功效, 其机制可能为通过改善肠道微循环发挥保护作用. Foitzik *et al*<sup>[25]</sup>建立AP大鼠肠道损伤模型, 在给予谷氨酰胺48 h后, 应用微循环显微镜观察肠道微血管流量, 发现谷氨酰胺能明显增加胰腺炎组大鼠肠道微血管血流量, 减少肠道通透性, 降低胰腺炎死亡率. 胸段硬膜外镇痛可以改善胰腺炎肠道黏膜灌注, Freise *et al*<sup>[26]</sup>将30只胰腺炎大鼠分为治疗组和对照组进行研究, 发现对照组大鼠毛细血管灌注减少, 毛细血管间区增加了24%, 血流量减少了50%; 施行胸段硬膜外镇痛后毛细血管灌注恢复至正常, 血流量转为正常水平, 且胸段硬膜外镇痛使胰腺炎大鼠的7 d生存率由33%增至73%, 证实了胸段硬膜镇痛可改善肠道微循环并降低胰腺炎死亡率.

2.1.3 补充益生菌: 通过补充外源性益生菌, 调节肠道菌群之间平衡, 减少细菌易位, 达到保护肠道作用. van Minnen *et al*<sup>[27]</sup>将APSD大鼠分为安慰剂组和益生菌治疗组, 应用实时定量PCR进行大鼠肠道组织细菌定量, 结果发现安慰剂组十二指肠潜在病原菌群为 $5.0 \pm 0.7$  CFU/g, 而给予益生菌治疗组十二指肠潜在病原菌群为 $3.5 \pm 0.3$  CFU/g( $P < 0.05$ ); 安慰剂组易位至胰腺的细菌为 $5.38 \pm 1.0$  CFU/g, 而给予益生菌治疗组易位至胰腺的细菌为 $3.1 \pm 0.5$  CFU/g( $P < 0.05$ ), 从而说明益生菌能够抑制AP大鼠肠道病原菌的生长, 维护肠道菌群之间平衡, 减少细菌易位. 早期应用益生菌调节肠道菌群还有助于控制全身炎症反应, 减少感染症并发症. Besselink *et al*<sup>[28]</sup>设计的双盲安慰剂多中心随机对照试验, 将200名AP患者随机分为益生菌组和安慰剂组, 腹痛出现72 h后, 每天2次通过鼻腔肠管给予益生菌治疗28 d或至出院, 结果发现益生菌治疗组感染并发症明显低于安慰剂组. 近来研究发现, synbiotic2000(一种新的合生素由四种不同前益生菌和益生菌高菌落单位组成)能够通过改善肠道菌群, 降低胰腺炎多器官功能障碍的发生率. Oláh

### ■创新盘点

本文着重介绍了肠道屏障损伤在急性胰腺炎肠道功能障碍发生中的作用, 包括肠道机械屏障、免疫屏障、化学屏障和生物屏障损伤, 尽管多为动物实验研究结果, 但为进一步的临床研究提供了理论基础.

### ■应用要点

在临床上补充益生菌、尽早给予肠内营养、肠道清洗和应用促动力剂等措施可有效改善急性胰腺炎患者的肠道功能障碍。

*et al*<sup>[29]</sup>通过前瞻性随机双盲对照研究,将62名SAP患者随机分为synbiotic2000(治疗组)和益生菌(对照组),进行至少1 wk的治疗,显示全身炎症反应综合征和多器官功能衰竭总的发病率明显不同(治疗组:对照组为8:14,  $P<0.05$ ),而且晚期多器官功能障碍发生率治疗组明显低于对照组,所以早期进行synbiotic2000治疗,可以降低胰腺炎后期多器官功能障碍的并发症。

**2.1.4 合理的肠内营养:** AP时长期禁食和胃肠外营养可损伤肠黏膜屏障功能,诱发细菌移位,掌握好进食时机对肠道功能恢复具有重要意义。目前主张早期肠内营养,因为肠黏膜的新陈代谢能量主要来自肠道营养物质,肠内营养可以保护肠黏膜屏障,防止细菌和内毒素易位。*Wojtuń et al*<sup>[30]</sup>进行随机临床研究,采用肠内营养可以改善患者的临床症状和预后,减少胰腺炎的并发症和死亡率,缩短患者的住院周期,降低花费。*Casas et al*<sup>[31]</sup>对22例SAP患者随机分为肠内营养组和肠外营养组,结果在治疗10 d内两组患者的C-反应蛋白、TNF- $\alpha$ 、IL-6水平;前白蛋白,白蛋白含量没有明显差异,但肠外营养组有7例出现了严重并发症,而肠内营养组4例出现严重并发症;另外肠外营养组有3例需要手术治疗,2例患者死亡,而肠内营养组没有出现需要手术治疗的死亡的患者,因此认为肠内营养有利于减轻胰腺炎患者并发症,降低死亡率。早期进行肠内营养,还可以减少胰腺坏死、胰腺脓肿等胰腺感染并发症<sup>[32]</sup>,另外给予肠内营养的方式不同也会起到不同的治疗效果。无论口服、鼻胃管、鼻十二指肠管进行肠内营养均会刺激胰液分泌,*Kaushik et al*<sup>[33]</sup>发现中远端空肠置管给予营养元素可以避免刺激胰液分泌,起到更好的肠内营养的效果。

**2.1.5 肠道清洗:** AP引起肠道屏障功能损伤,大量细菌移位肠外器官,肠道在全身炎症反应并发症中发挥重要作用,肠道清洗可能会减轻肠道损伤,减少细菌移位,从而降低胰腺炎病情。*孙君军 et al*<sup>[34]</sup>选择40例发病在72 h内的SAP患者,随机分为治疗组(20例)和对照组(20例)。治疗组患者入院后即行常规治疗,1%利多卡因经肾囊行胰周区域封闭术和稀碘伏液清洁灌肠术;经上述治疗,如病情持续恶化,则中转手术,术中行胰区和肠系膜上动脉周围区域用1%利多卡因直接封闭,术后经胰区引流管间断快速滴入1%利多卡因以代替肾囊封闭术;术后的其他治疗同非手术病例。对照组行常规保守和/或手术治

疗,结果证明经肾囊胰周区域封闭及用药、稀碘伏清洁肠道法等治疗能有效防治SAP的恶化发展,预后好,且技术简单、费用低、住院时间短。*Yol et al*<sup>[35]</sup>将40只胰腺炎大鼠随机分成2组,第1组经开腹胃穿刺术将硅胶管引入空肠近端,将大量聚乙二醇3500注入空肠进行6 h的全肠道冲洗;第2组不予任何治疗,结果显示72 h后治疗组血淀粉酶、乳酸脱氢酶、乳酸、丙氨酸转氨酶均明显低于非治疗组,治疗组肠系膜细菌阳性率为30%,而非治疗组为90%,治疗组仅有1只检出远端细菌移位(肝脏),而非治疗组检出8只(肝脏5、脾脏2、胰腺1);剩余大鼠治疗组存活时间(11 d)远远高于非治疗组存活时间(6.8 d)。所以全肠道冲洗能减低胰腺炎血中酶类,减少肠道细菌移位,延长存活时间。

**2.2 改善肠动力障碍** AP,尤其是SAP,由于应激反应和腹腔神经丛受炎性肠液刺激,以及胃肠激素变化,引起肠道运动功能减退,甚至麻痹性肠梗阻,因而改善胃肠麻痹,恢复肠动力和吸收功能,是AP的治疗目标之一。促动力剂能促进胃肠蠕动,克服因各种原因引起的胃肠动力不足。5-羟色胺受体激动剂Tegaserod,作为促动力剂的一种,能改善肠道动力障碍。*Seerden et al*<sup>[36]</sup>应用25个玻璃球灌胃后不同时间段测量他们的运动变化来反映小肠动力功能,发现AP组小鼠小肠动力明显下降,给予Tegaserod后能明显改善小肠动力障碍,利用Trendelenburg装置(胃肠电生理活动检测仪)对结肠蠕动进行观察发现,AP组蠕动波幅下降,蠕动收缩间歇增加;给予Tegaserod能缩短结肠蠕动收缩间歇。即5-HT4受体激动剂Tegaserod能改善AP诱导的肠动力障碍。红霉素是一种大环内酯类抗生素。1984年Ittoh和Pilot *et al*相继研究证实红霉素具有促胃肠动力作用,此后各国学者对红霉素的促动力作用做了大量研究。红霉素的促胃肠动力作用及机制研究表明其对全胃肠道均有不同程度的促动力作用,促进胃窦收缩,改善胃窦、十二指肠功能的协调性;诱导胃肠道移行复合运动(MMC);促进结肠运动及胆囊收缩等。目前认为红霉素的促动力机制主要是一种胃动素激动剂。*傅凤霞 et al*<sup>[37]</sup>由胆总管逆行注射牛黄胆酸钠诱导大鼠AP,随后分别灌服清胰汤和红霉素,并设对照组进行比较,结果表明,小剂量的红霉素没有杀菌抗炎的作用但可以改善AP的胃肠动力。AP早期进行胃肠减压,应用硫酸镁、杜秘克可起到促进肠蠕动的作用。

早在20世纪70年代就有中药“大承气汤”促进胃肠蠕动, 增强运动功能和增加肠道容积的研究报告. 一些方剂如: 柴胡、枳实、厚朴、玄明粉均促进小肠蠕动, 前两者还能促进胃排空, 生大黄促进肠蠕动与收缩功能. 潘泻苷是一种天然的泻剂和利胆剂, 他能促使肠黏液增加, 杯状细胞增殖, 肠细胞修复, 肠能动性恢复<sup>[38]</sup>. 清胰汤通过刺激肌电活动加快胃肠蠕动改善肠道动力紊乱<sup>[39]</sup>. 近年来发现电针能改善AP患者的肠动力障碍, 王新宇 *et al*<sup>[40]</sup>将94例AP患者, 分为电针治疗组56例和对照组38例, 两组在予以抗感染、抑制胰腺分泌、改善微循环、胃黏膜保护剂同时, 电针治疗组选取双侧足三里、上巨虚、悬钟、公孙、太冲, KWD2808 I 多功能电针治疗仪电针治疗, 每次60 min, 每日2次, 共5 d, 结果显示电针能显著提高AP患者的胃肠动力.

目前改善AP胃肠动力的方法不多, 还没有发现一种能改善AP肠动力功能的特效疗法.

### 3 结论

AP易并发肠道功能障碍, 其发病机制尚不明确, 他可能与肠道屏障损伤(包括肠道机械、免疫、化学和生物屏障损伤)及肠道动力障碍有关. 在治疗上包括通过抑制细胞凋亡、抗炎症反应、改善微循环、补充益生菌、给予合理的肠内营养和肠道清洗等以改善AP肠道屏障损伤, 应用促动力剂和中医疗法改善肠动力障碍等方面, 尽管取得了一定的疗效, 但目前多以动物实验研究为主, 尚缺乏大样本的临床对照研究.

### 4 参考文献

- 1 Kudari A, Wig JD, Vaiphei K, Kochhar R, Majumdar S, Gupta R, Yadav TD, Doley RP. Histopathological sequential changes in sodium taurocholate-induced acute pancreatitis. *JOP* 2007; 8: 564-572
- 2 Jha RK, Yong MQ, Chen SH. The protective effect of resveratrol on the intestinal mucosal barrier in rats with severe acute pancreatitis. *Med Sci Monit* 2008; 14: BR14-BR19
- 3 Yasuda T, Takeyama Y, Ueda T, Shinzeki M, Kishi S, Sawa H, Nakajima T, Kuroda Y. Protective effect of caspase inhibitor on intestinal integrity in experimental severe acute pancreatitis. *J Surg Res* 2007; 138: 300-307
- 4 Yasuda T, Takeyama Y, Ueda T, Shinzeki M, Sawa H, Nakajima T, Kuroda Y. Breakdown of intestinal mucosa via accelerated apoptosis increases intestinal permeability in experimental severe acute pancreatitis. *J Surg Res* 2006; 135: 18-26
- 5 Rahman SH, Ammori BJ, Holmfield J, Larvin M, McMahon MJ. Intestinal hypoperfusion contributes to gut barrier failure in severe acute pancreatitis. *J*

- 6 *Gastrointest Surg* 2003; 7: 26-35; discussion 35-36
- 7 Kinnala PJ, Kuttilla KT, Grönroos JM, Havia TV, Nevalainen TJ, Niinikoski JH. Splanchnic and pancreatic tissue perfusion in experimental acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 845-849
- 8 Hirota M, Inoue K, Kimura Y, Mizumoto T, Kuwata K, Ohmuraya M, Ishiko T, Beppu T, Ogawa M. Non-occlusive mesenteric ischemia and its associated intestinal gangrene in acute pancreatitis. *Pancreatology* 2003; 3: 316-322
- 9 Takahashi Y, Fukushima J, Fukusato T, Shiga J, Tanaka F, Imamura T, Fukayama M, Inoue T, Shimizu S, Mori S. Prevalence of ischemic enterocolitis in patients with acute pancreatitis. *J Gastroenterol* 2005; 40: 827-832
- 10 Gray KD, Simovic MO, Chapman WC, Blackwell TS, Christman JW, Washington MK, Yull FE, Jaffal N, Jansen ED, Gautman S, Stain SC. Systemic nf-kappaB activation in a transgenic mouse model of acute pancreatitis. *J Surg Res* 2003; 110: 310-314
- 11 顾新华, 李德春, 谭纪伏, 胡惠芳. 核因子- $\kappa$ B活化在重症急性胰腺炎肠道屏障损伤中的作用. *实用临床医学* 2006; 7: 4-7
- 12 刘天军, 刘艳, 刘春婷, 李利明. 急性出血坏死性胰腺炎肠道免疫屏障的改变及其机制的研究. *黑龙江医药科学* 2002; 25: 37
- 13 Qiao SF, Lu TJ, Sun JB, Li F. Alterations of intestinal immune function and regulatory effects of L-arginine in experimental severe acute pancreatitis rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6216-6218
- 14 Samel S, Lanig S, Lux A, Keese M, Gretz N, Nichterlein T, Sturm J, Löhr M, Post S. The gut origin of bacterial pancreatic infection during acute experimental pancreatitis in rats. *Pancreatology* 2002; 2: 449-455
- 15 Schwarz M, Thomsen J, Meyer H, Büchler MW, Beger HG. Frequency and time course of pancreatic and extrapancreatic bacterial infection in experimental acute pancreatitis in rats. *Surgery* 2000; 127: 427-432
- 16 Romond MB, Colavizza M, Mullié C, Kalach N, Kremp O, Mielcarek C, Izard D. Does the intestinal bifidobacterial colonisation affect bacterial translocation? *Anaerobe* 2008; 14: 43-48
- 17 Wang X, Andersson R, Soltesz V, Leveau P, Ihse I. Gut origin sepsis, macrophage function, and oxygen extraction associated with acute pancreatitis in the rat. *World J Surg* 1996; 20: 299-307; discussion 307-308
- 18 Van Felius ID, Akkermans LM, Bosscha K, Verheem A, Harmsen W, Visser MR, Gooszen HG. Interdigestive small bowel motility and duodenal bacterial overgrowth in experimental acute pancreatitis. *Neurogastroenterol Motil* 2003; 15: 267-276
- 19 Seerden TC, De Winter BY, Van Den Bossche RM, Herman AG, Pelckmans PA, De Man JG. Regional differences in gastrointestinal motility disturbances during acute necrotising pancreatitis. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 671-679
- 20 徐敏, 王兴鹏, 袁耀宗, 龚自华, 吴恺, 王冰娴, 许斌, 曾悦, 徐刚, 汪佩文. 急性胰腺炎患者胃肠动力的变化及其机制研究. *中华急诊医学杂志* 2002; 11: 327-329
- 21 Nakajima T, Ueda T, Takeyama Y, Yasuda T, Shinzeki M, Sawa H, Kuroda Y. Protective effects of vascular endothelial growth factor on intestinal

### ■同行评价

本文综述了急性胰腺炎肠功能障碍的发病机制和治疗进展, 有一定的临床指导意义.



- epithelial apoptosis and bacterial translocation in experimental severe acute pancreatitis. *Pancreas* 2007; 34: 410-416
- 21 Shinzaki M, Takeyama Y, Ueda T, Yasuda T, Kishi S, Kuroda Y. Intraperitoneal administration of oxygenated perfluorochemical inhibits bacterial translocation associated with severe acute pancreatitis. *Kobe J Med Sci* 2003; 49: 17-24
- 22 Leveau P, Wang X, Sun Z, Börjesson A, Andersson E, Andersson R. Severity of pancreatitis-associated gut barrier dysfunction is reduced following treatment with the PAF inhibitor lexipafant. *Biochem Pharmacol* 2005; 69: 1325-1331
- 23 Poeze M, Froom AH, Ramsay G, Buurman WA, Greve JW. Decreased organ failure in patients with severe SIRS and septic shock treated with the platelet-activating factor antagonist TCV-309: a prospective, multicenter, double-blind, randomized phase II trial. TCV-309 Septic Shock Study Group. *Shock* 2000; 14: 421-428
- 24 Juvonen PO, Tenhunen JJ, Heino AA, Merasto M, Paajanen HE, Alhava EM, Takala JA. Splanchnic tissue perfusion in acute experimental pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 308-314
- 25 Foitzik T, Kruschewski M, Kroesen AJ, Hotz HG, Eibl G, Buhr HJ. Does glutamine reduce bacterial translocation? A study in two animal models with impaired gut barrier. *Int J Colorectal Dis* 1999; 14: 143-149
- 26 Freise H, Lauer S, Anthonsen S, Hlouschek V, Minin E, Fischer LG, Lerch MM, Van Aken HK, Sielenkämper AW. Thoracic epidural analgesia augments ileal mucosal capillary perfusion and improves survival in severe acute pancreatitis in rats. *Anesthesiology* 2006; 105: 354-359
- 27 van Minnen LP, Timmerman HM, Lutgendorff F, Verheem A, Harmsen W, Konstantinov SR, Smidt H, Visser MR, Rijkers GT, Gooszen HG, Akkermans LM. Modification of intestinal flora with multispecies probiotics reduces bacterial translocation and improves clinical course in a rat model of acute pancreatitis. *Surgery* 2007; 141: 470-480
- 28 Besselink MG, Timmerman HM, Buskens E, Nieuwenhuijs VB, Akkermans LM, Gooszen HG. Probiotic prophylaxis in patients with predicted severe acute pancreatitis (PROPATRIA): design and rationale of a double-blind, placebo-controlled randomised multicenter trial [ISRCTN38327949]. *BMC Surg* 2004; 4: 12
- 29 Oláh A, Belágyi T, Issekutz A, Olgyai G. [Combination of early nasojejunal feeding with modern synbiotic therapy in the treatment of severe acute pancreatitis (prospective, randomized, double-blind study)] *Magy Seb* 2005; 58: 173-178
- 30 Wojtuń S, Gil J, Błaszczak A. [Dietary treatment in acute pancreatitis] *Pol Merkur Lekarski* 2007; 22: 469-473
- 31 Casas M, Mora J, Fort E, Aracil C, Busquets D, Galter S, Jáuregui CE, Ayala E, Cardona D, Gich I, Farré A. [Total enteral nutrition vs. total parenteral nutrition in patients with severe acute pancreatitis] *Rev Esp Enferm Dig* 2007; 99: 264-269
- 32 Petrov MS, Kukosh MV, Emelyanov NV. A randomized controlled trial of enteral versus parenteral feeding in patients with predicted severe acute pancreatitis shows a significant reduction in mortality and in infected pancreatic complications with total enteral nutrition. *Dig Surg* 2006; 23: 336-344; discussion 344-345
- 33 Kaushik N, Pietraszewski M, Holst JJ, O'Keefe SJ. Enteral feeding without pancreatic stimulation. *Pancreas* 2005; 31: 353-359
- 34 孙君军, 戚世芳, 金建光, 解刚强, 刘伟峰, 王伟. 胰区封闭和稀碘伏清洁灌肠治疗重症急性胰腺炎. *中国综合临床* 2006; 22: 163-165
- 35 Yol S, Ozer S, Aksoy F, Vatansev C. Whole gut washout ameliorates the progression of acute experimental pancreatitis. *Am J Surg* 2000; 180: 121-125
- 36 Seerden TC, De Man JG, Holzer P, Van den Bossche RM, Herman AG, Pelckmans PA, De Winter BY. Experimental pancreatitis disturbs gastrointestinal and colonic motility in mice: effect of the prokinetic agent tegaserod. *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19: 856-864
- 37 傅凤霞, 李建军, 杨小军, 魏睦新. 清胰汤、红霉素对急性胰腺炎大鼠肠动力的影响. *江苏医药* 2002; 28: 101-103
- 38 Chen X, Valente JF, Alexander JW. The effect of sennosides on bacterial translocation and survival in a model of acute hemorrhagic pancreatitis. *Pancreas* 1999; 18: 39-46
- 39 Li YY, Sibaev A, Zhou MZ, Zhu GY, Yüce B, Storr M. The Chinese herbal preparation Qing Yi Tang (QYT) improves intestinal myoelectrical activity and increases intestinal transit during acute pancreatitis in rodents. *Phytother Res* 2007; 21: 324-331
- 40 王新宇, 石现, 何磊. 电针对急性胰腺炎患者胃肠动力的影响及其机制研究. *针刺研究* 2007; 32: 199-202

编辑 李军亮 电编 何基才

# IL-23在炎症性肠病中的免疫调节作用

崔轶, 黄志刚, 刘占举

崔轶, 黄志刚, 刘占举, 同济大学附属第十人民医院胃肠内科上海市 200072  
国家自然科学基金资助项目, No. 30770988;  
卫生部科学研究基金资助项目, No. WKJ2008-2-001  
作者贡献分布: 本文综述由崔轶完成, 黄志刚和刘占举审校。  
通讯作者: 刘占举, 教授, 200072, 上海市延长中路301号, 同济大学附属第十人民医院胃肠内科. zhanjuliu@yahoo.com  
电话: 021-66301164 传真: 021-66301051  
收稿日期: 2009-03-30 修回日期: 2009-05-17  
接受日期: 2009-05-18 在线出版日期: 2009-06-08

## Immunoregulatory effects of IL-23 on inflammatory bowel disease

Yi Cui, Zhi-Gang Huang, Zhan-Ju Liu

Yi Cui, Zhi-Gang Huang, Zhan-Ju Liu, Department of Gastroenterology, the Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30770988; and the Scientific Research Foundation of the Ministry of Public Health of China, No. WKJ2008-2-001

Correspondence to: Professor Zhan-Ju Liu, Department of Gastroenterology, the Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, 301 Yanchang Middle Road, Shanghai 200072, China. zhanjuliu@yahoo.com

Received: 2009-03-30 Revised: 2009-05-17

Accepted: 2009-05-18 Published online: 2009-06-08

### Abstract

IL-23 belongs to IL-12 family and is composed of IL-23 P19 and IL-12 P40 subunits. IL-23 functions through a receptor complex consisting of an IL-12Rβ1 and a specific IL-23R chain in T cells, induces activation of Stat1, Stat3 and Stat4, and triggers T cells to produce IL-10 and INF-γ. Additionally, IL-23 induces the differentiation of native CD4<sup>+</sup> T cells into highly pathogenic Th17 cells that produce IL-17, IL-6 and TNF-α, and subsequently causes chronic colitis. Recent studies have demonstrated that the IL-23/IL-17 axis plays a critical role in the pathogenesis of inflammatory bowel disease (IBD) and may represent a target for therapeutic intervention for IBD.

Key Words: Inflammatory bowel disease; Interleukin-23; Interleukin-17; Mucosal immunology; Receptor

Cui Y, Hang ZG, Liu ZJ. Immunoregulatory effects of IL-23 on inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(16): 1649-1654

### 摘要

IL-23属于IL-12家族, 他可由IL-12 P40亚单位和IL-23 P19亚单位通过二硫键形成的异二聚体分子, 通过结合T细胞表面上的受体复合物(IL-12Rβ1和IL-23R构成)激活Stat1、Stat3及Stat4信号传导通路, 诱导IL-10和INF-γ的产生。IL-23还可以诱导初始CD4<sup>+</sup> T细胞分化为具有致病性的Th17细胞, 并生成IL-17、IL-6和TNF-α, 引起慢性结肠炎的发生。研究发现, IL-23/IL-17轴在炎症性肠病的发病机制中可能处于关键地位, 并有望成为新的治疗靶点。

关键词: 炎症性肠病; 白介素-23; 白介素-17; 黏膜免疫; 受体

崔轶, 黄志刚, 刘占举. IL-23在炎症性肠病中的免疫病理作用. *世界华人消化杂志* 2009; 17(16): 1649-1654

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1649.asp>

### 0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)包括克罗恩病(Crohn's disease, CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC), 其病因和发病机制仍不清楚。目前大多学者认为肠壁黏膜免疫调节异常、持续肠道感染、肠壁黏膜屏障缺损、遗传和环境等因素共同参与该疾病的发生发展<sup>[1-3]</sup>, 其中先天性免疫和适应性免疫调节异常在IBD中发挥着重要的作用。而这些免疫系统所分泌的细胞因子在IBD的发生和发展过程中发挥着重要的作用, 其在时间和空间的协调发展控制和加剧了IBD的炎症发展和变化<sup>[4-5]</sup>。IL-23是IL-12分子家族中的促炎性细胞因子, 具有十分复杂的生物学功能, 参与机体控制感染和自身免疫性疾病发生<sup>[6-8]</sup>。本文重点讨论IL-23对IBD的免疫调节作用。

### 1 IL-23生物学作用

根据辅助性T细胞产生的不同细胞因子及其功

### ■背景资料

炎症性肠病包括溃疡性结肠炎和克罗恩病, 近年来发病率有逐年上升的趋势, 根据国内文献报道, 近5年的病例数是20世纪90年代同期的8倍。但是具体的病因还不是十分清楚, 因而临床上仍不能完全根治。大多数学者认为免疫失调是造成本病发生发展的重要因素之一, 而免疫系统分泌的细胞因子又在在本病发挥着至关重要的作用。其中IL-23是近年来研究的热点, 他与多种自身免疫性疾病、肿瘤、炎症都密切相关。本文就其与炎症性肠病的关系作一阐述。

### ■同行评议者

张筱茵, 副教授, 中国人民解放军第四军医大学西京医院消化疾病研究所

### ■相关报道

Cua *et al* 发现在实验性过敏性脑炎(EAE)模型中, 基因敲除小鼠IL-23 P19亚单位对EAE的敏感性较野生型小鼠明显降低, 而基因敲除小鼠IL-12 P35的敏感性明显升高。

能异质性而划分为Th1/Th2细胞, 使细胞免疫学进入了一个新时代<sup>[9]</sup>. IL-12是由一个P35和一个P40亚基构成的异二聚体, 很多研究结果表明, IL-12在促进Th1免疫应答及促进宿主对细胞内病原体的防御发挥关键作用<sup>[6]</sup>. 此外, IL-12在驱动Th1应答的过程中可以促进一些自身免疫性和炎症性疾病的发生<sup>[10]</sup>. 2000年, 美国科学家<sup>[7]</sup>在调查IL-6螺旋形细胞因子家族序列数据库时, 发现了一种新型的蛋白质分子, 由于其相对分子质量在人类和小鼠中分别为18.7 kDa和19.8 kDa, 故命名为P19. 研究发现只有P19和IL-12 P40亚单位协同表达时, 才能促进P19的分泌, 并且无论是使用针对P19或者IL-12 P40的特异性抗体均能使二者发生免疫沉降, 提示体内IL-12 P40和P19可能形成某种复合物发挥作用. 在将该复合物进行SDS凝胶电泳加银染色分析后证实该复合物是由P40和P19通过二硫键形成的异源二聚体, 类似于IL-12的结构(由P40和P35通过二硫键形成的异二聚体), 命名为IL-23. IL-23是由IL-12 P40亚单位和其自身P19亚单位组成的异二聚体. 其受体系统与IL-12R( $\beta$ 1和 $\beta$ 2)共享了IL-12R $\beta$ 1亚单位, 另外其特异性的受体亚单位、即为IL-23R<sup>[11]</sup>.

IL-23的发现使我们必须重新评估IL-12在炎症性疾病中的作用. Cua *et al*<sup>[12]</sup>发现在实验性过敏性脑炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)模型中, 基因敲除小鼠IL-23 P19亚单位对EAE的敏感性较野生型小鼠明显降低, 而基因敲除小鼠IL-12 P35的敏感性明显升高. 对共有亚单位P40基因敲除小鼠分别使用IL-12和IL-23重组蛋白, 只有后者才能重新形成EAE. 以上研究使人们重新认识IL-23而非IL-12是介导这种自身免疫病发病的关键<sup>[12]</sup>. 在此后的一系列研究中发现IL-23与许多疾病组织炎症的发生密切相关, 其中包括类风湿关节炎和肠道黏膜炎症. 此外研究证实IL-23在银屑病患者的皮肤组织内表达明显增高, 在人类银屑病中高表达的IL-23可以增加患者的皮损面积. 小鼠真皮注射IL-23可以诱导皮肤呈银屑病样改变, 同时IL-23还可促使IL-22、IL-17和TNF- $\alpha$ 等炎症因子的表达升高. 这些研究表明IL-23在皮肤的自身免疫性炎症过程中发挥了至关重要的作用<sup>[13]</sup>.

既往对IL-12的抗肿瘤作用也已经有较好的认识, 其抗肿瘤机制涉及固有性免疫和适应性免疫, 其效应细胞包括T、NK和NKT细胞<sup>[14]</sup>. 基因

敲除或抗体介导消除IL-23导致增加细胞毒性T细胞的渗透入组织, 缺乏对化学物质的保护作用从而诱导癌变<sup>[15]</sup>. Lo *et al*<sup>[16]</sup>发现IL-23和IL-12抗肿瘤和抗肿瘤转移的活性明显不同, IL-12能迅速引起肿瘤的消退, 而IL-23是在治疗后的一段时间以后, 即在大部分动物模型中是在IL-23刺激后的2-3 wk后才能起效. 另外经IL-23治疗的小鼠模型在原有肿瘤消退后可以产生强烈的抗肿瘤免疫记忆.

另外, IL-23在多种感染中都发挥着重要的作用. Maclennan *et al*<sup>[17]</sup>在人类对沙门氏菌的免疫反应中, 发现IL-23和IL-12起到了重要的作用, 2005年, Happel *et al*<sup>[18]</sup>发现, 在对肺克雷伯氏菌的免疫反应中, IL-23通过IL-23/IL-17轴的方式起到了重要作用. 另外, 在百日咳杆菌<sup>[19]</sup>及白色念珠菌<sup>[20]</sup>感染后都有重要的防御作用, 特别是在对革兰阳性菌的反应中, IL-23发挥了重要的作用<sup>[18]</sup>. 在结核杆菌感染后, 发现IL-23 P19分子在抗细菌反应的高峰期表达明显升高, 在感染被控制以后, 其表达水平逐渐降低. 以上结果均表明IL-23分子可能是抗结核菌的一种调控因子<sup>[21-22]</sup>. 此外在丙肝病毒感染过程中, IL-23能引起针对丙肝病毒包膜蛋白(envelope protein 2, E2) CTL和Th1型免疫反应比IL-12更为强烈、更为长久<sup>[23]</sup>.

## 2 IL-23的分泌表达

研究发现, 一些病原微生物抗原通过结合树突状细胞和巨噬细胞上的Toll样受体, 诱导产生IL-23, IL-23与表达在激活的免疫记忆型CD4<sup>+</sup> T细胞、CD8<sup>+</sup> T细胞、NK细胞和少部分单核巨噬细胞/树突状细胞上IL-23R结合相互作用<sup>[24-25]</sup>, 激活胞内Jak-Stat信号传导途径(主要包括Stat1、Stat3、Stat4), 并且诱导INF- $\gamma$ 、IL-10和IL-17的产生<sup>[11]</sup>. 但IL-23激活Stat主要是Stat3/Stat4构成的异二聚体, 区别于IL-12的Stat4<sup>[8]</sup>. 在对小鼠的研究中发现IL-12R复合物表达在幼稚T细胞上, 而IL-23R表达活化T细胞上. 幼稚T细胞上有IL-12R $\beta$ 2的表达, 可以促使初始T细胞的活化产生INF- $\gamma$ , 而对IL-23的刺激无反应. 相反, 在记忆性T细胞上, 有大量的IL-23R及极少量IL-12R $\beta$ 2表达<sup>[24]</sup>. 这就证实小鼠中为什么IL-23可以刺激记忆性T细胞活化而IL-12却不行<sup>[7]</sup>. 在人类研究中同样发现了IL-12和IL-23激活T细胞的作用, 不同的是IL-12和IL-23均可以活化记忆性T细胞的增殖和促进的产生<sup>[7]</sup>. 上述资料表明IL-23的一个重要作用是通过促进T细胞向Th1记忆细胞分

化并产生细胞因子支持细胞免疫的。

早期研究发现IL-23和IL-12都可以通过活化的T细胞诱导产生IFN- $\gamma$ , 然而进一步的研究发现IL-23与促炎症细胞CD4<sup>+</sup> T的一个新的亚系Th17密切相关, 他可以促进CD4<sup>+</sup> T细胞分泌高水平的IL-17<sup>[26]</sup>. 而Th17细胞和一些自身免疫性疾病(EAE、胶原诱导的关节炎)有着直接的联系. 这些密切的联系使我们认为在体内IL-23可以直接诱导Th17细胞的分化, 但是研究发现促进Th17细胞分化的是TGF- $\beta$ 、IL-6而不是IL-23, 更进一步的研究显示出一些促炎症因子IL-1和IL-21在Th17细胞分化过程中的作用替代了IL-6的作用. 虽然IL-23不是Th17细胞分化所必需的, 但他的作用是维持和扩大Th17细胞的功能<sup>[27]</sup>, 诱导Th17分泌促炎症细胞因子IL-17、IL-6、TNF和少量的INF- $\gamma$ , 同时IL-23在体外人脐血细胞和小鼠脾细胞还可以诱导CD8<sup>+</sup> T细胞产生IL-17. 这些促炎症因子主要通过特殊转录因子ROR $\gamma$ t和STAT3产生, 另外其他的转录因子例如ROR家族的另外一些成员ROR $\alpha$ , IRF4和芳基羟受体也被证明和这个传导途径相关, 这些炎症因子相互作用, 促进炎症的发生<sup>[26-28]</sup>. Th17细胞系代表血液系统促炎症CD4<sup>+</sup> T细胞一个独特分支, 他们与自身免疫性疾病的发生密切相关. 在小鼠自身免疫性疾病模型研究中发现, 如实验性自身免疫性脑炎和胶原蛋白诱导的关节炎表明, IL-23在诱导自身免疫性疾病中起关键作用, 并且导致Th17细胞在炎症组织中的累积. 在黏膜免疫研究中, IL-23/IL-17轴却发挥重要防御作用. 研究证明肺部胞外细菌感染如肺炎克雷伯氏菌, 其中IL-23<sup>-/-</sup>小鼠和IL-17RA<sup>-/-</sup>小鼠表现出死亡率比野生型老鼠易感性明显增加<sup>[28-29]</sup>. 有人认为, 这种保护反应主要是IL-17能够提高粒细胞的生成和肺组织对中性粒细胞的招募. 另外, IL-23/IL-17轴对其他肺部感染, 包括肺炎支原体<sup>[30]</sup>、结核分枝杆菌<sup>[19]</sup>、百日咳杆菌<sup>[19]</sup>及白色念珠菌<sup>[20]</sup>都有重要的防御作用. 在这种情况下, 保护IL-17可以有效地帮助趋化因子招募Th1效应细胞<sup>[19]</sup>. Th17细胞除了产生IL-17, 同时IL-6、IL-17F、IL-21、IL-22和TNF- $\alpha$ 细胞因子共同组成的大家族. 如果缺乏IL-23, Th17细胞将会减少炎症因子的产生增加一个能够使EAE发生逆转的细胞因子(即IL-10)的分泌. 这些研究结果显示IL-23是Th17在适应内环境中选择性的分泌细胞因子的一个重要因子<sup>[28]</sup>.

### 3 IL-23在IBD中的免疫调节作用

近来研究发现, IBD的发生与病原微生物诱导一些促炎症细胞因子(如IL-12、TNF- $\alpha$ )激活CD4<sup>+</sup> T细胞的反应有关. 动物实验中发现, 通过使用抗IL-12 P40 mAb治疗可有效地控制肠黏膜炎症发展, 改善肠黏膜炎症反应<sup>[31]</sup>. 然而, 随着IL-23的发现, 这种理论开始有了新的认识. IL-23主要是通过微生物抗原或通过CD40分子激活树突状细胞产生的, 应用抗IL-12 P40抗体同时抑制了IL-12和IL-23, 那么在许多炎症疾病(包括IBD)中我们必须重新评估他们的作用. 在T细胞移植诱导的慢性结肠炎模型中选择性的使用IL-23特有的P19亚单位mAb或利用基因敲除P19可以有效地缓解T细胞依赖性结肠炎的发生<sup>[31-32]</sup>, 同时在IL-10<sup>-/-</sup>的小鼠自发性肠炎中也起到了抑制作用<sup>[33]</sup>, 同样在先天性免疫应答中IL-23在诱导肠道炎症的过程中也起到了重要的作用, IL-23在淋巴细胞缺陷的转基因小鼠会因感染*H pylori*而导致盲肠炎和结肠炎的进一步发展, 并通过抗CD40单克隆抗体竞争性的抑制炎症的进展<sup>[34]</sup>, 相反仅针对性的抑制IL-12生物学活性对先天性免疫介导的或T细胞依赖的结肠炎的发展没有影响<sup>[31-32]</sup>. Krajina *et al*<sup>[24]</sup>利用RAG<sup>-/-</sup>小鼠体内植入CD4<sup>+</sup> T细胞后诱导慢性结肠炎, 发现结肠黏膜固有层组织内树突状细胞可表达高水平的IL-23 P19, 提示IL-23在Th1介导的慢性结肠炎中可能起到了重要的促炎症作用. 使用IL-23 P19操纵子建立的转基因小鼠, 发现回肠末端黏膜固有层组织内CD11c<sup>+</sup>树突状细胞表达IL23 P19/P40蛋白质, 且IL-23的表达直接受肠道细菌抗原调节, 提示IL-23很可能参与肠道黏膜慢性炎症的发生. 近期研究在小鼠中应用抗IL-23 P19抗体能够缓解肠道炎症, P40亚单位是IL-23与IL-12共有的, 所以应用IL-12 P40同时可以减少两者的分泌. 另外在IBD, 尤其是CD患者的炎症肠黏膜内IL-23 P19 mRNA水平比正常黏膜组织有较明显增高, 且IL-23 P19 mRNA水平与结肠镜下炎症分级成正相关关系<sup>[35]</sup>. 冯百岁 *et al*<sup>[36]</sup>在人类IBD患者的外周淋巴细胞中发现IL-23受体表达明显增高, 进一步说明IL-23与IBD炎症的发生密切相关. 最近发现在CD患者CD14<sup>+</sup>的巨噬细胞明显增高, 这些巨噬细胞在细菌的刺激下高水平的表达IL-23和TNF- $\alpha$ 并产生IFN- $\gamma$ , 而IFN- $\gamma$ 同时又促进了这些表达高水平的IL-23的炎症巨噬细胞的进一步更加, 这就构成了一个正反馈作用体系, 充分证明了人类肠道炎症和先天性免疫系统的密切相关, 他们可以

#### ■应用要点

IL-23/IL-17轴在炎症性肠病的发病机制中可能处于关键地位, 并有望成为新的治疗靶点.

### ■同行评价

本文围绕IL-23, 详细阐述了近年来IBD免疫方面的研究进展, 论述深入, 条理清晰, 具有较强的学术价值。

通过细菌的刺激加强IL-23的产生<sup>[13]</sup>。

在基因学研究中, 通过广泛的全基因组协会研究大宗的IBD患者和健康志愿者推断IL-23R几种基因多态性基因位点突变导致患者敏感性或抵抗力增加从而导致IBD的发生<sup>[28]</sup>, 但是和IBD的严重性并不相关, 研究发现突变发生在STAT3和IL-17及IL-17F时易导致IBD的发病。尽管许多IL23R不同的易感基因被发现, 但是这些基因在疾病发生中的作用仍不清楚<sup>[37]</sup>。在体外研究中发现, 树突状细胞上的NOD2突变可以减少对Th17管理能力, 同时降低IL-23产生的TLR2和NOD2的激动剂相应减少, 促使IL-23分泌过多, 导致炎症的加剧。显然, 如何确定IL23R的突变对IL-23在肠道的正常免疫保护作用的影响还需要我们进一步的研究<sup>[38]</sup>。

在最近的研究中发现IL-23/IL-17轴在维护正常肠道稳态发挥重要作用, 虽然维持这种稳态的细胞因子的活动还不是十分清楚。例如, 在正常健康小鼠, IL-23表达在末端回肠固有层组织内的树突状细胞<sup>[38-39]</sup>, Th17细胞在肠黏膜固有层中表达明显高于周围淋巴组织<sup>[28]</sup>。在小鼠IBD的研究中, 许多研究证实肠道感染中IL-23通过增加IL-17和一系列的细胞因子IL-1 $\beta$ 、IL-6、IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 诱导肠道炎症的发生<sup>[23]</sup>。另外Liu *et al*<sup>[40]</sup>在研究中发现通过应用抗TNF单克隆抗体可以减少IL-23和IL-17的分泌, 同时肠道炎症明显减轻, 这些研究证实了TNF、IL-23及IL-17在IBD中的重要作用。尽管在IBD中IL-23有明显的致病作用, 但他在肠道预防感染中却发挥着重要的作用。研究发现IL-23<sup>-/-</sup>的小鼠对肠道细菌感染的易感性和致死性明显(如枸橼酸杆菌感染)<sup>[41]</sup>, 但是IL-23缺失的小鼠感染枸橼酸杆菌后发现Th17细胞的反应明显增强, 通过研究已经证实在黏膜感染保护过程中发挥作用的是IL-23而不是IL-17<sup>[41]</sup>。Kobayashi *et al*<sup>[42]</sup>在研究中证实IL-23在IBD患者中促进Th17/IL-17的分化过程中起到了重要的作用。此外, 在许多T细胞依赖的IBD模型中, Th1细胞在黏膜固有层的炎症中占统治地位, 抑制Th1细胞可以使病情得到缓解<sup>[31]</sup>。最终的研究发现IL-23是通过先天性免疫系统导致慢性结肠炎, 但是IL-23介导的肠道炎症不一定涉及Th17细胞<sup>[19,31-33]</sup>。这种IL-23和Th17在肠道免疫病理中的区别对以后的治疗有重要的影响。另有相关的报道表明, CD与Th1细胞因子如IL-12、TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$ 、IL-23密切相关。近来, 在CD患者炎症肠黏膜组织内发现有表

达IL-17的Th17细胞, 这些细胞参与诱导IL-22和IL-23的分泌, 参与CD患者的黏膜免疫病理反应, 而UC与Th2细胞因子如IL-4、IL-5有关, 这些问题还有待进一步证实<sup>[26-28]</sup>。

### 4 结论

近来发现IL-23在慢性肠道炎症小鼠IBD模型和IL-23R的多态性对CD患者的易感性的影响中发挥了至关重要的作用, 使他可能成为今后治疗IBD患者一个重要靶点。IL-23的发现改变了传统IBD观点主要是IL-12介导Th1反应。在肠道炎症中证实选择性表达IL-23通路可能有潜在有利于全身免疫保护的途径, 而不是作为一个全身性免疫抑制。同时IL-23作为一种强有力的细胞免疫刺激因子和调节因子, 仍具有良好的临床应用前景, 由于其诱导IFN- $\gamma$ 的水平低于IL-12, 因而不会出现IL-12临床应用时患者发生的伴有血清中IFN- $\gamma$ 极度增高的严重的细胞毒反应, 更适用于治疗感染性疾病和肿瘤。通过基因敲除IL-23, 不仅抑制肠道慢性炎症途径, 而且还可以促进调节性T细胞(Treg)加强免疫耐受和维持肠道内环境的稳定<sup>[43]</sup>。然而, 我们也不能忽视IL-23和Th17相关的细胞因子对宿主的免疫保护作用 and 肠道黏膜屏障功能, 以及Th17相关的细胞因子协同IL-23介导肠道免疫保护或者肠道黏膜免疫病理发生。

### 5 参考文献

- Gismera CS, Aladrén BS. Inflammatory bowel diseases: a disease (s) of modern times? Is incidence still increasing? *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5491-5498
- Mohammed F. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002; 347: 1982-1984; author reply 1982-1984
- Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; 3: 390-407
- Andoh A, Yagi Y, Shiota M, Nishida A, Tsujikawa T, Fujiyama Y. Mucosal cytokine network in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5154-5161
- Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4280-4288
- 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
- Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, de Waal-Malefyt R, Hannum C, Bazan JF, Kastelein RA. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12.

- Immunity* 2000; 13: 715-725
- 8 Lankford CS, Frucht DM. A unique role for IL-23 in promoting cellular immunity. *J Leukoc Biol* 2003; 73: 49-56
  - 9 Langrish CL, McKenzie BS, Wilson NJ, de Waal Malefyt R, Kastelein RA, Cua DJ. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 2004; 202: 96-105
  - 10 Peluso I, Pallone F, Monteleone G. Interleukin-12 and Th1 immune response in Crohn's disease: pathogenetic relevance and therapeutic implication. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5606-5610
  - 11 de Paus RA, van de Wetering D, van Dissel JT, van de Vosse E. IL-23 and IL-12 responses in activated human T cells retrovirally transduced with IL-23 receptor variants. *Mol Immunol* 2008; 45: 3889-3895
  - 12 Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA, Sedgwick JD. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2003; 421: 744-748
  - 13 Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. *J Immunol* 2005; 175: 5-14
  - 14 Segal JG, Lee NC, Tsung YL, Norton JA, Tsung K. The role of IFN-gamma in rejection of established tumors by IL-12 : source of production and target. *Cancer Res* 2002; 62: 4696-4703
  - 15 Langowski JL, Zhang X, Wu L, Mattson JD, Chen T, Smith K, Basham B, McClanahan T, Kastelein RA, Oft M. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature* 2006; 442: 461-465
  - 16 Lo CH, Lee SC, Wu PY, Pan WY, Su J, Cheng CW, Roffler SR, Chiang BL, Lee CN, Wu CW, Tao MH. Antitumor and antimetastatic activity of IL-23. *J Immunol* 2003; 171: 600-607
  - 17 MacLennan C, Fieschi C, Lammas DA, Picard C, Dorman SE, Sanal O, MacLennan JM, Holland SM, Ottenhoff TH, Casanova JL, Kumararatne DS. Interleukin (IL)-12 and IL-23 are key cytokines for immunity against Salmonella in humans. *J Infect Dis* 2004; 190: 1755-1777
  - 18 Happel KI, Dubin PJ, Zheng M, Ghilardi N, Lockhart C, Quinton LJ, Odden AR, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, Kolls JK. Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against Klebsiella pneumoniae. *J Exp Med* 2005; 202: 761-769
  - 19 Higgins SC, Jarnicki AG, Lavelle EC, Mills KH. TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to Bordetella pertussis: role of IL-17-producing T cells. *J Immunol* 2006; 177: 7980-7989
  - 20 Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice. *J Infect Dis* 2004; 190: 624-631
  - 21 Khader SA, Cooper AM. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine* 2008; 41: 79-83
  - 22 Cooper AM, Khader SA. The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis. *Immunol Rev* 2008; 226: 191-204
  - 23 Kullberg MC, Jankovic D, Feng CG, Hue S, Gorelick PL, McKenzie BS, Cua DJ, Powrie F, Cheever AW, Maloy KJ, Sher A. IL-23 plays a key role in Helicobacter hepaticus-induced T cell-dependent colitis. *J Exp Med* 2006; 203: 2485-2494
  - 24 Krajina T, Leihäuser F, Moller P, Trobonjaca Z, Reimann J. Colonic lamina propria dendritic cells in mice with CD4+ T cell-induced colitis. *Eur J Immunol* 2003; 33: 1073-1083
  - 25 Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J, Pflanz S, Zhang R, Singh KP, Vega F, To W, Wagner J, O'Farrell AM, McClanahan T, Zurawski S, Hannum C, Gorman D, Rennick DM, Kastelein RA, de Waal Malefyt R, Moore KW. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J Immunol* 2002; 168: 5699-5708
  - 26 杨丽, 刘占举. Th17细胞在炎症性肠病发生过程中的免疫病理作用. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 389-394
  - 27 Ivanov S, Bozinovski S, Bossios A, Valadi H, Vlahos R, Malmhäll C, Sjöstrand M, Kolls JK, Anderson GP, Lindén A. Functional relevance of the IL-23-IL-17 axis in lungs in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36: 442-451
  - 28 Maloy KJ. The Interleukin-23 / Interleukin-17 axis in intestinal inflammation. *J Intern Med* 2008; 263: 584-590
  - 29 Wu Q, Martin RJ, Rino JG, Breed R, Torres RM, Chu HW. IL-23-dependent IL-17 production is essential in neutrophil recruitment and activity in mouse lung defense against respiratory Mycoplasma pneumoniae infection. *Microbes Infect* 2007; 9: 78-86
  - 30 Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cillely GE, Shen F, Eaton SM, Gaffen SL, Swain SL, Locksley RM, Haynes L, Randall TD, Cooper AM. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nat Immunol* 2007; 8: 369-377
  - 31 Hue S, Ahern P, Buonocore S, Kullberg MC, Cua DJ, McKenzie BS, Powrie F, Maloy KJ. Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med* 2006; 203: 2473-2483
  - 32 Izcue A, Hue S, Buonocore S, Arancibia-Carcamo CV, Ahern PP, Iwakura Y, Maloy KJ, Powrie F. Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T cell-dependent colitis. *Immunity* 2008; 28: 559-570
  - 33 Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, Kleinschek MA, Owyang A, Mattson J, Blumenschein W, Murphy E, Sathe M, Cua DJ, Kastelein RA, Rennick D. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 2006; 116: 1310-1316
  - 34 Uhlig HH, McKenzie BS, Hue S, Thompson C, Joyce-Shaikh B, Stepankova R, Robinson N, Buonocore S, Tlaskalova-Hogenova H, Cua DJ, Powrie F. Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology. *Immunity* 2006; 25: 309-318
  - 35 Uhlig HH, Powrie F. Dendritic cells and the intestinal bacterial flora: a role for localized mucosal immune responses. *J Clin Invest* 2003; 112: 648-651
  - 36 冯百岁, 罗杰, 刘占举. IL-23受体在炎症性肠病患者外周血淋巴细胞中的表达及意义. *西安交通大学学报(医学版)* 2009; 30: 96-98
  - 37 Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, Sedgwick JD, Cua DJ. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23

- and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2003; 198: 1951-1957
- 38 Becker C, Wirtz S, Blessing M, Pirhonen J, Strand D, Bechthold O, Frick J, Galle PR, Autenrieth I, Neurath MF. Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. *J Clin Invest* 2003; 112: 693-706
- 39 Becker C, Dornhoff H, Neufert C, Fantini MC, Wirtz S, Huebner S, Nikolaev A, Lehr HA, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Galle PR, Karow M, Neurath MF. Cutting edge: IL-23 cross-regulates IL-12 production in T cell-dependent experimental colitis. *J Immunol* 2006; 177: 2760-2764
- 40 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
- 41 Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006; 441: 231-234
- 42 Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kamada N, Chinen H, Saito R, Kitazume MT, Nakazawa A, Sugita A, Koganei K, Isobe K, Hibi T. IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 2008; 57: 1682-1689
- 43 Ahern PP, Izcue A, Maloy KJ, Powrie F. The interleukin-23 axis in intestinal inflammation. *Immunol Rev* 2008; 226: 147-159

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 •

### 世界华人消化杂志计量单位标准

**本刊讯** 本刊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 $37.6 \pm 1.2^\circ\text{C}$ ,  $45.6 \pm 24$ 岁,  $56.4 \pm 0.5$  d.  $3.56 \pm 0.27$  pg/ml应为 $3.56 \pm 0.27$  ng/L,  $131.6 \pm 0.4$  mmol/L,  $t = 28.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$ . BP用kPa(mmHg), RBC数用 $\times 10^{12}/\text{L}$ , WBC数用 $\times 10^9/\text{L}$ , 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 $\mu\text{mol/L}$ 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 $\times$ 6 cm $\times$ 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO<sub>2</sub>结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、维生素B<sub>6</sub>、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B<sub>12</sub>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 $1 \times 10^{-3}$  g与 $5 \times 10^{-7}$  g之类改成1 mg与0.5  $\mu\text{g}$ , hr改成h, 重量 $\gamma$ 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 $\cdot$ 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% CO<sub>2</sub>, 50 mL/L CO<sub>2</sub>; 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 =  $45 \times 10^{-6}$ ; 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. (常务副总编辑: 张海宁 2009-06-08)

# 5-氮-2-脱氧胞苷联合曲古抑菌素A对人胃癌细胞系MGC-803生物学行为的影响

郑向欣, 王建

郑向欣, 王建, 徐州医学院第二附属医院普外科 江苏省徐州市 221000

作者贡献分布: 此课题由郑向欣与王建设计; 研究过程由郑向欣操作完成; 研究所用试剂及分析工具由王建提供; 数据分析由郑向欣完成; 本论文写作由郑向欣与王建完成。

通讯作者: 王建, 221000, 江苏省徐州市煤建路32号, 徐州医学院第二附属医院普外科. Im5651357@sohu.com

电话: 0516-85326638

收稿日期: 2009-03-28 修回日期: 2009-05-08

接受日期: 2009-05-11 在线出版日期: 2009-06-08

## Effects of 5-aza-2-deoxycytidine and trichostatin A on biological behavior in MGC-803 cells

Xiang-Xin Zheng, Jian Wang

Xiang-Xin Zheng, Jian Wang, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Jian Wang, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, 32 Meijian Road, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China. Im5651357@sohu.com

Received: 2009-03-28 Revised: 2009-05-08

Accepted: 2009-05-11 Published online: 2009-06-08

### Abstract

**AIM:** To explore the effects of 5-aza-2-deoxycytidine (5-Aza-CdR) and trichostatin A (TSA) on biological behavior in MGC-803 Cells.

**METHODS:** MGC-803 cells were cultured in RPMI 1640 culture medium containing 100 g/L fetal calf serum. The cells in experiment were at logarithmic phase, and the number of viable cells was 95%-98%. The trial consisted of five groups. (1) Blank control group: there was only culture medium and no cells or drugs; (2) Negative control group: there were cells, culture medium and no drugs; (3) 5-Aza-CdR group: 24 h after inoculation, MGC-803 cells were treated with 10.0 μmol/L 5-Aza-CdR; (4) TSA group: 24 h after inoculation, MGC-803 cells were treated with 300 μg/L TSA; (5) 5-Aza-CdR+TSA group: 24 h after inoculation, MGC-803 cells were treated with 10.0 μmol/L 5-Aza-CdR, and then

treated with 300 μg/L TSA after 24 h. After MGC-803 cells were treated with different concentrations of 5-Aza-CdR and TSA for different cultural time, the expression of Runx3 mRNA in different groups for 72 h was detected by RT-PCR, and the cell proliferation in different groups for 24, 48, 72 h was determined using MTT colorimetry.

**RESULTS:** When MGC-803 cells were treated with 5-Aza-CdR and TSA alone for 72 h, the relative expression of Runx3 mRNA was increased. It was significantly increased in combination group, and compared with 5-Aza-CdR group and TSA group ( $0.883 \pm 0.025$  vs  $0.760 \pm 0.286$ ,  $0.735 \pm 0.018$ , both  $P < 0.05$ ). The cell growth inhibition rate increased with the time prolonging in the same group and there was a positive relationship ( $r = 0.738$ ,  $P < 0.05$ ). The cell growth inhibition rate increased more significantly in combination group compared with 5-Aza-CdR group and TSA group in the same time (24 h: 57.3% vs 40.4%, 39.0%; 48 h: 70.0% vs 56.0%, 51.3%; 72 h: 86.3% vs 68.0%, 65.8%, all  $P < 0.05$ ). There were significant differences between drug group and control group in relative expression of Runx3 mRNA and cell growth inhibition rate ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Compared with 5-Aza-CdR or TSA alone, combination of the two drugs can significantly induce Runx3 mRNA expression and inhibit cell proliferation.

**Key Words:** 5-aza-2-deoxycytidine; Trichostatin A; Gastric cancer; Runx3; Methylation

Zheng XX, Wang J. Effects of 5-aza-2-deoxycytidine and trichostatin A on biological behavior in MGC-803 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(16): 1655-1659

### 摘要

**目的:** 探讨5-氮-2-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)和曲古抑菌素A(TSA)对人胃癌细胞系MGC-803生物学行为的影响。

### 背景资料

胃癌在我国恶性肿瘤的发病率和死亡率中都居于前列,患者由于早期临床症状不典型,就诊时多已到中晚期,增加了手术难度,术后5年生存率较低,甚至失去了手术意义。随着人们对胃癌发生发展过程的精确解析,越来越多的证据表明基因遗传信息的紊乱以及基因转录表达调控的紊乱是其发生的关键因素。因此寻找有效的药物来恢复基因正常表达对胃癌治疗有着重要的意义。

### 同行评议者

邹小明, 教授, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科



## ■ 研究前沿

胃癌基因表达调控中表观遗传水平的甲基化和去乙酰化改变起着非常重要的作用,而且两者在导致基因转录抑制方面具有协同作用。针对这两种机制,联合应用药物对其治疗已成为近年来研究的热点。

**方法:** 人胃癌细胞系MGC-803按常规培养于含100 g/L小牛血清的RPMI 1640培养液中。实验分为5组: (1)空白对照组: 不含细胞的培养液; (2)阴性对照组: 细胞只换液, 不加药物; (3) 5-Aza-CdR组: 细胞接种24 h后, 加入10.0 μmol/L的5-Aza-CdR; (4)TSA组: 细胞接种24 h后, 加入300 μg/L TSA; (5) 5-Aza-CdR+TSA组: 细胞接种24 h后, 加入10.0 μmol/L 5-Aza-CdR, 24 h后再加入300 μg/L TSA。应用RT-PCR检测各组细胞培养72 h后细胞Runx3 mRNA的表达, MTT比色法测定各组细胞分别培养24、48、72 h后细胞增殖。

**结果:** 单独应用5-Aza-CdR和TSA作用于MGC-803细胞72 h后, Runx3 mRNA相对表达量增加, 联合用药组分别与5-Aza-CdR组及TSA组相比, 差异有统计学意义( $0.883 \pm 0.025$  vs  $0.760 \pm 0.286$ ,  $0.735 \pm 0.018$ , 均 $P < 0.05$ )。细胞生长抑制率在同一组别随着药物作用时间的延长而增加, 并且呈正相关( $r = 0.738$ ,  $P < 0.05$ ); 而在同一时间不同组别比较联合用药组细胞生长抑制率较单用药物组明显增加(24 h: 57.3% vs 40.4%, 39.0%; 48 h: 70.0% vs 56.0%, 51.3%; 72 h: 86.3% vs 68.0%, 65.8%, 均 $P < 0.05$ )。细胞Runx3 mRNA的相对表达量及生长抑制率在药物组与对照组间比较, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**结论:** 与单用5-Aza-CdR或TSA相比, 联合应用2种药物更显著的增强Runx3 mRNA的表达, 抑制细胞的增殖。

**关键词:** 5-氮-2-脱氧胞苷; 曲古抑菌素A; 胃癌细胞; Runx3; 甲基化

郑向欣, 王建. 5-氮-2-脱氧胞苷联合曲古抑菌素A对人胃癌细胞系MGC-803生物学行为的影响. 世界华人消化杂志. 2009; 17(16): 1655-1659  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1655.asp>

## 0 引言

Runx3(PEBP2aC/CBFA3/AML2)是新发现的一种抑癌基因, 在胃癌中主要以基因纯合或杂合缺失以及甲基化方式失活, 其中甲基化是表达下调的重要机制<sup>[1]</sup>。为研究抑癌基因Runx3去甲基化后对胃癌细胞生物学行为的影响, 我们应用5-氮-2-脱氧胞苷(5-aza-2-deoxycytidine, 5-Aza-CdR)和曲古抑菌素A(trichostatin A, TSA)对胃癌细胞系MGC-803进行处理, 观察抑癌基因Runx3的转录表达及细胞增殖的改变。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人胃癌细胞系MGC-803为上海亚培生物科技有限公司产品。5-Aza-CdR和TSA购于Sigma公司。含100 g/L小牛血清的RPMI 1640培养液为美国Gibco公司产品。总RNA提取试剂盒(TRIzol法)及AMV第一链cDNA合成试剂盒均购于上海捷瑞生物工程有限公司。MTT试剂盒购于碧云天生物技术研究所。

### 1.2 方法

**1.2.1 试剂配置:** 5-Aza-CdR和TSA以RPMI 1640培养液(含100 g/L小牛血清)和DMSO(0.5%)溶解, 分别配成浓度为 $10^{-3}$  mol/L和 $10^{-4}$  mol/L工作母液, 用微孔滤膜除菌,  $-20^{\circ}\text{C}$ 保存, 使用时用RPMI 1640稀释成工作浓度。

**1.2.2 细胞培养、分组及处理:** 人胃癌细胞系MGC-803按常规培养于含100 g/L小牛血清的RPMI 1640培养液中。实验细胞处于对数生长期, 活细胞数达95%-98%。实验分为5组: (1)空白对照组: 不含细胞的培养液; (2)阴性对照组: 细胞只换液, 不加药物; (3)5-Aza-CdR组: 细胞接种24 h后, 加入10.0 μmol/L的5-Aza-CdR; (4)TSA组: 细胞接种24 h后, 加入300 μg/L TSA; (5)5-Aza-CdR+TSA组: 细胞接种24 h后, 加入10.0 μmol/L 5-Aza-CdR, 24 h后再加入300 μg/L TSA。

**1.2.3 RT-PCR检测药物处理后细胞的Runx3 mRNA的表达:** 接种细胞于培养瓶, 实验分组如前述。培养72 h后收集细胞, 应用TRIzol法提取总RNA, 紫外分光光度仪测纯度和浓度, 以DNase I处理, 去除基因组DNA, 采用AMV法进行反转录cDNA第一链合成。取cDNA进行PCR扩增, 引物序列及PCR产物长度序列如下。Runx3引物序列, 上游: 5'-AGG CAT TGC GCA GCT CAG CGG AGT-3', 下游: 5'-TCT GCT CCG TGC TGC CCT CGC ACT-3', 扩增长度156 bp; 内参照GAPDH引物序列, 上游: 5'-CCA TGT TCG TCA TGG GTG TGA ACC-3', 下游: 5'-GCC AGT AGA GGC AGG GAT GAT GTT-3', 扩增长度307 bp。目的基因Runx3及内参照GAPDH的引物均由Primer5.0软件设计。在50 μL反应体系中, 加入3.0 μL cDNA, 上游及下游引物各1.0 μL, 2 mmol/L dNTPs 1.5 μL, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 5.0 μL, 10×Buffer 5 μL, Taq酶0.5 μL, 94℃预变性4 min后, 进行PCR反应: 94℃, 59℃, 72℃各45 s, 共35个循环, 72℃延伸7 min后终止反应。以GAPDH作为内参照, 将产物进行琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像分析系统测得各组条带的平均灰度值, 重

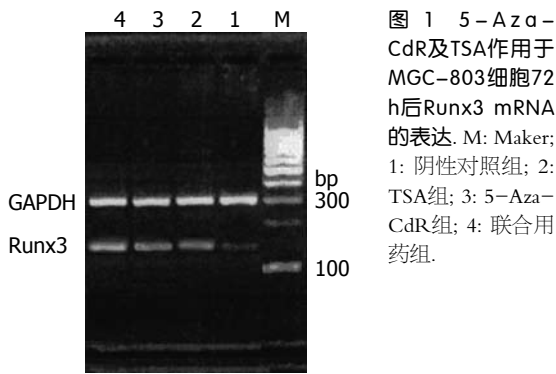


图 1 5-Aza-CdR及TSA作用于MGC-803细胞72 h后Runx3 mRNA的表达。M: Maker; 1: 阴性对照组; 2: TSA组; 3: 5-Aza-CdR组; 4: 联合用药组。

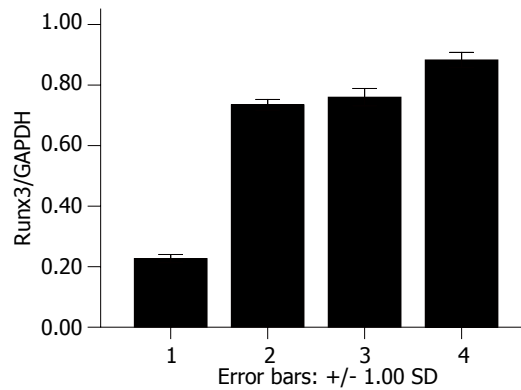


图 2 实验各组细胞Runx3 mRNA的相对量。1: 阴性对照组; 2: TSA组; 3: 5-Aza-CdR组; 4: 联合用药组。

**■ 相关报道**  
目前已有较多文献报道Runx3甲基化与胃癌发生的关系以及5-Aza-CdR与TSA恢复肿瘤抑癌基因表达, 抑制肿瘤细胞生长的作用。

复3次。计算Runx3与GAPDH的灰度比值, 以其比值代表Runx3 mRNA的相对量。

1.2.4 MTT法检测药物作用后细胞增殖: 取70%-80%汇合的细胞, 用2.5 g/L胰蛋白酶消化单层培养细胞MGC-803, 制备成单细胞悬液, 镜下见细胞团小于5%。以每孔 $5 \times 10^3$ 个细胞接种于96孔培养板(每孔200  $\mu$ L), 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO<sub>2</sub>及饱和湿度的培养箱培养24 h后分为用药组及对照组(分组同前), 每孔设3个复孔, 单用药组中分别加入10.0  $\mu$ mol/L 5-Aza-CdR和300  $\mu$ g/L TSA, 联合用药组加入10.0  $\mu$ mol/L 5-Aza-CdR和300 ng/mL TSA, 阴性对照组只加等量培养液, 试剂及培养液每24 h更换1次。每隔24 h取样1次, 连续3 d。每次取样时移去培养液, 每孔加入MTT液(5 g/L)20  $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C培养4 h后弃去上清液, 每孔加入DMSO 150  $\mu$ L, 轻轻振荡10 min, 使结晶物充分溶解, 在570 nm波长酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度值(A)。取平均值计算抑制率: 细胞生长抑制率(%) = (对照组A-实验组A)/(对照组A-空白组A)  $\times$  100%。

**统计学处理** 采用 SPSS13.0统计软件进行分析, 结果用mean  $\pm$  SD表示, 各组间变量比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 5-Aza-CdR及TSA对人胃癌细胞Runx3 mRNA表达的影响 阴性对照组细胞Runx3 mRNA表达很低, 药物处理组细胞Runx3 mRNA重新表达, 10.0  $\mu$ mol/L 5-Aza-CdR, 300  $\mu$ g/L TSA及联合应用2种药物处理细胞72 h后, 细胞Runx3 mRNA的相对表达量分别为 $0.760 \pm 0.286$ 、 $0.735 \pm 0.018$ 、 $0.883 \pm 0.025$ (图1-2)。经单因素方差分析细胞Runx3 mRNA表达在实验各组之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 联合用药组分别与5-Aza-CdR组及TSA组相比, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 而5-Aza-CdR组与TSA组比

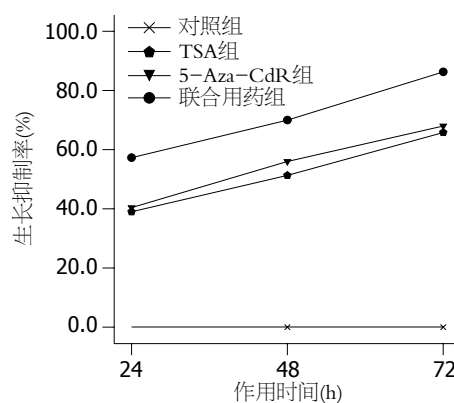


图 3 不同实验组细胞生长抑制率与作用时间的关系。

较, 差异无统计学意义。

2.2 各组细胞的增殖 MTT比色法显示单独应用5-Aza-CdR作用MGC-803细胞24、48、72 h后A值分别为 $0.261 \pm 0.011$ 、 $0.204 \pm 0.009$ 、 $0.163 \pm 0.012$ , 细胞生长抑制率分别为40.4%、56.0%、68.0%; 单独应用TSA作用MGC-803细胞24、48、72 h后A值分别为 $0.267 \pm 0.004$ 、 $0.226 \pm 0.017$ 、 $0.175 \pm 0.009$ , 细胞生长抑制率分别为39.0%、51.3%、65.8%; 而联合应用药物作用MGC-803细胞24、48、72 h后A值分别为 $0.187 \pm 0.011$ 、 $0.139 \pm 0.006$ 、 $0.070 \pm 0.027$ , 细胞生长抑制率分别为57.3%、70.0%、86.3%。经方差分析在同一时间点不同药物组之间的细胞生长抑制率差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 联合用药组分别与单用药组间比较差异也有统计学意义( $P < 0.05$ ), 而单用药组间比较差异无统计学意义; 而细胞生长抑制率在同一组别不同时间之间差异也有统计学意义( $P < 0.05$ ), 在一定范围内随着时间的延长而增加, 呈正相关( $r = 0.738$ ,  $P < 0.05$ )。不同实验组细胞生长抑制率与药物作用时间的关系(图3)。

**■ 创新盘点**  
本文主要以甲基化和去乙酰化作为治疗靶点, 联合应用5-Aza-CdR与TSA逆转抑癌基因Runx3甲基化, 恢复其活性, 发挥抑癌作用。

### ■应用要点

5-Aza-CdR与TSA联合应用能够发挥协同作用,明显逆转基因甲基化,使得沉寂的抑癌基因重新发挥功能,并且具有较低的药物毒性作用,在胃癌治疗上有着很好的前景。

### 3 讨论

表型遗传修饰是基因表达调控的重要形式,包含甲基化和组蛋白去乙酰化<sup>[2]</sup>。这种异常修饰抑制基因转录,使抑癌基因丧失功能。甲基转移酶抑制剂和去乙酰化酶抑制剂能够恢复组蛋白乙酰化,去除异常的甲基化修饰,激活抑癌基因,发挥抑癌作用<sup>[3]</sup>。Runx3为新近克隆的一种候选抑癌基因,位于染色体1p36.1,是Runx家族中最小也是迄今对其研究最少的基因,全长67 kb,含有6个外显子和p1、p2 2个启动子,2个启动子富含GC, p2启动子GC含量达到64%,易发生甲基化<sup>[4]</sup>。该基因在人类多种肿瘤中存在CpG区异常甲基化<sup>[5-8]</sup>,在胃癌发生过程中较为明显<sup>[1]</sup>。当启动过程点甲基化后,转录停止,Runx3失活,可影响到TGF- $\beta$ 的凋亡通路,导致凋亡抑制,胃黏膜细胞的正常生长和凋亡失去平衡,最终发生胃癌<sup>[9]</sup>。

DNA甲基化是一种发生在CpG二核苷酸上对胞嘧啶的共价修饰物,由S-腺苷蛋氨酸提供甲基,在细胞内DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)催化作用下,于DNA复制后形成5-甲基胞嘧啶的反应<sup>[10]</sup>。其中CpG岛甲基化抑制基因表达的机制有二<sup>[11]</sup>:一是甲基化后直接抑制转录因子与模板的结合,但这一抑制作用是有限的,因为有一些转录因子对甲基化并不十分敏感,甚至有许多转录因子的识别位点根本就不在CpG岛内;二是发现一种甲基结合蛋白家族能够特异性地与甲基化位点结合,然后与组蛋白去乙酰化酶和具有染色体变形活性的sin3a, mi-2或ski蛋白或蛋白家族形成大分子复合物,使组蛋白脱乙酰基,染色体结构变得更加紧密,基因不能转录,因此组蛋白去乙酰化亦可导致基因沉默。这为组蛋白去乙酰化酶抑制剂通过抑制组蛋白脱乙酰基,逆转转录抑制引起的基因沉默,提供了广阔的舞台。5-Aza-CdR为一种嘧啶核苷类似物,其可以与DNMT结合形成一种共价复合物,特异性抑制其活性,逆转基因CpG岛甲基化,重新激活由于高甲基化而失活的抑癌基因,恢复抑癌基因的功能,抑制肿瘤细胞的生长,而且甲基化异常所致灭活的基因对DNA甲基化抑制剂非常敏感,易重新活化<sup>[12]</sup>。TSA源自链霉菌代谢产物,最先作为抗真菌药物使用。近来研究表明TSA有组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylases inhibitor, HDACI)的特征,可逆抑制哺乳动物组蛋白去乙酰化酶活性,诱导肿瘤细胞周期阻滞、分化及

凋亡,抑制肿瘤细胞的生长<sup>[13]</sup>。Ou *et al*<sup>[14]</sup>研究表明, TSA可以广泛的诱导特定基因去甲基化并重新表达,并证实组蛋白乙酰化和DNA去甲基化之间通过甲基结合蛋白(methyl-CpG binding proteins, MBDs)实现相互作用。基于DNA去甲基化和组蛋白乙酰化之间存在相互作用,我们可以通过联合应用5-Aza-CdR与TSA,在降低各自药物浓度,减低其不良反应的基础上,使其充分发挥协同作用,从而改善基因启动子区域的甲基化状态,使沉寂的肿瘤抑癌基因重新表达,达到治疗肿瘤的目的。

本研究基于甲基化和组蛋白去乙酰化会导致基因沉默,抑制转录和表达,选择甲基转移酶和去乙酰化酶作为治疗靶点。实验中我们分别应用10.0  $\mu\text{mol/L}$  5-Aza-CdR和300  $\mu\text{g/L}$  TSA作用于MGC-803细胞72 h后,细胞Runx3 mRNA重新表达,其相对量分别为 $0.760 \pm 0.286$ ,  $0.735 \pm 0.018$ ;联合应用10.0  $\mu\text{mol/L}$  5-Aza-CdR和300  $\mu\text{g/L}$  TSA作用于MGC-803细胞72 h后,细胞Runx3 mRNA表达明显增加,其相对量为 $0.883 \pm 0.025$ ,与单用药组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。MTT法显示细胞生长抑制率在同一组别随着药物作用时间的延长而增加,而在同一时间不同组别内联合用药组细胞生长抑制率较单用药物组明显增加,以联合药物作用MGC-803细胞72 h后最高,为86.3%。以上结果说明药物作用于MGC-803细胞后,抑癌基因Runx3重新表达,发挥抑癌作用,从而抑制肿瘤细胞的生长,而且联合用药组效果明显好于单用药物组。依据药物作用机制及本实验结果,我们可以认为联合用药组Runx3 mRNA表达及细胞生长抑制率较单用药物组明显升高是去甲基化和组蛋白乙酰化协同作用的结果;也就是说药物作用后,原来Runx3 CpG区的高甲基化状态被可逆性消除,而且联合用药能发挥协同作用,使得原来被封闭的肿瘤抑癌基因重新表达,发挥抑癌作用,从而抑制肿瘤细胞的生长,达到治疗肿瘤的目的,这与国外学者的研究结果一致<sup>[14]</sup>。

DNA甲基转移酶抑制剂5-Aza-CdR和组蛋白去乙酰化转移酶抑制剂TSA均能使胃癌细胞抑癌基因Runx3重新表达,抑制细胞增殖,并且具有良好的协同作用,二者联合应用可使得胃癌细胞Runx3 mRNA及生长抑制率较单用药物组明显增加。因此我们可以在不影响治疗效果的前提下,联合应用这两种药物,减少各自的药物剂量,从而减少药物不良反应的发生,这为进一

步研究胃癌的治疗提供了新的思路. 目前我们的实验研究只是药物作用于体外细胞, 而对于这2种药物在动物实验甚至临床实验的研究, 还需要我们进一步努力.

#### 4 参考文献

- 1 Waki T, Tamura G, Sato M, Terashima M, Nishizuka S, Motoyama T. Promoter methylation status of DAP-kinase and RUNX3 genes in neoplastic and non-neoplastic gastric epithelia. *Cancer Sci* 2003; 94: 360-364
- 2 Jee CD, Lee HS, Bae SI, Yang HK, Lee YM, Rho MS, Kim WH. Loss of caspase-1 gene expression in human gastric carcinomas and cell lines. *Int J Oncol* 2005; 26: 1265-1271
- 3 Nishigaki M, Aoyagi K, Danjoh I, Fukaya M, Yanagihara K, Sakamoto H, Yoshida T, Sasaki H. Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays. *Cancer Res* 2005; 65: 2115-2124
- 4 Bangsow C, Rubins N, Glusman G, Bernstein Y, Negreanu V, Goldenberg D, Lotem J, Ben-Asher E, Lancet D, Levanon D, Groner Y. The RUNX3 gene--sequence, structure and regulated expression. *Gene* 2001; 279: 221-232
- 5 Guo C, Ding J, Yao L, Sun L, Lin T, Song Y, Sun L, Fan D. Tumor suppressor gene Runx3 sensitizes gastric cancer cells to chemotherapeutic drugs by downregulating Bcl-2, MDR-1 and MRP-1. *Int J Cancer* 2005; 116: 155-160
- 6 Xiao WH, Liu WW. Hemizygous deletion and hypermethylation of RUNX3 gene in hepatocellular

- 7 carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 376-380
- 7 Sato K, Tomizawa Y, Iijima H, Saito R, Ishizuka T, Nakajima T, Mori M. Epigenetic inactivation of the RUNX3 gene in lung cancer. *Oncol Rep* 2006; 15: 129-135
- 8 Ku JL, Kang SB, Shin YK, Kang HC, Hong SH, Kim IJ, Shin JH, Han IO, Park JG. Promoter hypermethylation downregulates RUNX3 gene expression in colorectal cancer cell lines. *Oncogene* 2004; 23: 6736-6742
- 9 Fukamachi H. Runx3 controls growth and differentiation of gastric epithelial cells in mammals. *Dev Growth Differ* 2006; 48: 1-13
- 10 Slack A, Cervoni N, Pinard M, Szyf M. Feedback regulation of DNA methyltransferase gene expression by methylation. *Eur J Biochem* 1999; 264: 191-199
- 11 Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 1998; 19: 187-191
- 12 Jones PA. DNA methylation errors and cancer. *Cancer Res* 1996; 56: 2463-2467
- 13 Donadelli M, Costanzo C, Faggioli L, Scupoli MT, Moore PS, Bassi C, Scarpa A, Palmieri M. Trichostatin A, an inhibitor of histone deacetylases, strongly suppresses growth of pancreatic adenocarcinoma cells. *Mol Carcinog* 2003; 38: 59-69
- 14 Ou JN, Torrisani J, Unterberger A, Provençal N, Shikimi K, Karimi M, Ekström TJ, Szyf M. Histone deacetylase inhibitor Trichostatin A induces global and gene-specific DNA demethylation in human cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 2007; 73: 1297-1307

#### ■同行评价

本文有一定的科学性和创新性, 能够反映当前胃肠病学研究水平.

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 •

### 世界华人消化杂志英文摘要要求

**本刊讯** 本刊英文摘要包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致. 具体格式要求如下: (1)题名文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致; (2)作者 署名一般不超过8人. 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”; (3)单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China; (4)基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801; (5)通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wjcd@wjgnet.com; (6)收稿及修回日期 格式如: Received: Revised: . (常务副总编辑: 张海宁 2009-06-08)

# HBx上调HepG2细胞DNA修复酶hMTH1表达的意义

郭晓榕, 程斌, 郑要初, 王颖, 王凡, 夏秀梅, 黎培员

## ■背景资料

HBx基因如何参与乙肝相关性肝癌发生机制是目前研究的热点,但其作用机制尚未完全阐明,从DNA氧化损伤及其修复这一新的角度进行探讨可能具有重要意义。

郭晓榕, 程斌, 郑要初, 王颖, 王凡, 夏秀梅, 黎培员, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市430030

国家自然科学基金资助项目, No. 30570821

作者贡献分布: 此课题由程斌设计; 研究过程由郭晓榕、郑要初、王颖、王凡、夏秀梅及黎培员操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由程斌提供; 数据分析由郭晓榕与郑要初完成; 本论文写作由郭晓榕与程斌完成。

通讯作者: 程斌, 副教授, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科。

b.cheng@tjh.tjmu.edu.cn

电话: 027-83663612 传真: 027-51310267

收稿日期: 2009-03-18 修回日期: 2009-05-05

接受日期: 2009-05-11 在线出版日期: 2009-06-08

## Significance of HBx gene up-regulated expression of DNA repair enzyme hMTH1 in the HepG2 cells

Xiao-Rong Guo, Bin Cheng, Yao-Chu Zheng, Ying Wang, Fan Wang, Xiu-Mei Xia, Pei-Yuan Li

Xiao-Rong Guo, Bin Cheng, Yao-Chu Zheng, Ying Wang, Fan Wang, Xiu-Mei Xia, Pei-Yuan Li, Department of Gastroenterology and Hepatology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30570821

Correspondence to: Dr. Bin Cheng, Department of Gastroenterology and Hepatology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. b.cheng@tjh.tjmu.edu.cn

Received: 2009-03-18 Revised: 2009-05-05

Accepted: 2009-05-11 Published online: 2009-06-08

## Abstract

**AIM:** To explore the role of oxidative DNA damage repair enzyme hMTH1 in the HBx-induced hepatocellular carcinoma.

**METHODS:** 8-OHdG levels were determined using HPLC/ECD in the HepG2/HBx and in HepG2 and HepG2/pcDNA3.1 of the control cells. Using the  $\beta$ -actin as the interior control, real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was employed to examine the expression of DNA repair enzyme hMTH1 of hydrolyze 8-OHdG.

**RESULTS:** The 8-OHdG level was significantly higher in the HepG2/HBx than in HepG2 and

HepG2/pcDNA3.1 ( $36.5 \pm 6.25$  vs  $8.52 \pm 1.65$ ,  $9.12 \pm 2.69$  fmol 8-OHdG/ $\mu$ g DNA, both  $P < 0.05$ ), and the expression of DNA repair enzyme hMTH1 mRNA was significantly higher than the control cells ( $1.213 \pm 0.100$  vs  $0.087 \pm 0.026$ ,  $0.112 \pm 0.052$  hMTH1/ $\beta$ -actin mRNA $\times 100$ , both  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** HBx gene may increase the level of oxidative DNA-adduct 8-OHdG by promoting the oxidative stress in HepG2 cells, thus reactivity increases the expression of DNA repair enzyme hMTH1.

Key Words: Hepatitis B virus X gene; HepG2 cells; HPLC/ECD; hMTH1

Guo XR, Cheng B, Zheng YC, Wang Y, Wang F, Xia XM, Li PY. Significance of HBx gene up-regulated expression of DNA repair enzyme hMTH1 in the HepG2 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(16): 1660-1664

## 摘要

**目的:** 探讨DNA氧化损伤修复酶hMTH1在HBx致肝细胞癌发生机制中的作用。

**方法:** 应用HPLC/ECD法检测稳定表达HBx的转基因细胞HepG2/HBx及其对照组HepG2与HepG2/pcDNA3.1细胞中的8-OHdG的含量; 并以 $\beta$ -actin为内对照, 应用RT-实时PCR定量检测各组细胞中可水解8-OHdG的DNA修复酶hMTH1的表达。

**结果:** 8-OHdG在HepG2/HBx细胞中的含量(fmol 8-OHdG/ $\mu$ g DNA)显著高于对照组HepG2和HepG2/pcDNA3.1细胞( $36.5 \pm 6.25$  vs  $8.52 \pm 1.65$ ,  $9.12 \pm 2.69$ , 均 $P < 0.05$ )。DNA修复酶hMTH1在HepG2/HBx细胞中的表达较两对照组细胞明显增高( $1.213 \pm 0.100$  vs  $0.087 \pm 0.026$ ,  $0.112 \pm 0.052$  hMTH1/ $\beta$ -actin mRNA $\times 100$ , 均 $P < 0.05$ )。

**结论:** HBx可能通过诱导氧化应激增加HepG2细胞内DNA氧化损伤产物8-OHdG的含量, 从而反应性上调DNA修复酶hMTH1的表达。

## ■同行评议者

郑鹏远, 教授, 郑州大学第二附属医院消化科

**关键词:** 乙型肝炎病毒x基因; HepG2细胞; HPLC/ECD; hMTH1

郭晓榕, 程斌, 郑雯初, 王颖, 王凡, 夏秀梅, 黎培员. HBx上调HepG2细胞中DNA修复酶hMTH1表达的意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(16): 1660-1664  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1660.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒x基因(hepatitis B virus X gene, HBx)可通过复杂的反式激活作用、干扰宿主细胞受损DNA的修复等多种途径参与肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的发生<sup>[1-3]</sup>, 一些体内、外实验研究为HBx参与HCC的发生发展提供了依据<sup>[4-5]</sup>, 但其确切机制尚未阐明. 新近一些研究表明HBx可诱发宿主细胞DNA的氧化损伤<sup>[6]</sup>. 8-羟基鸟嘌呤(7, 8-dihydro-8-oxoguanine, 8-OHdG)是一种主要的具有致突变作用的DNA氧化损伤产物, 他可在细胞DNA复制中引起G:C→T:A的碱基颠换, 与肿瘤的发生发展密切相关<sup>[7]</sup>. DNA修复酶hMTH1可水解游离核苷酸池中8-OHdG, 在清除人类基因组内8-OHdG、维护基因组的稳定性与完整性中起着至关重要的作用. 本研究拟通过检测HBx转基因细胞模型HepG2/HBx中8-OHdG的含量及DNA修复酶hMTH1表达水平, 探讨DNA修复酶hMTH1在乙肝相关性肝癌发生机制中的作用.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 稳定表达HBx的转基因细胞模型HepG2/HBx由本课题组构建<sup>[8]</sup>, DMEM培养基、胎牛血清、G418(Gibco); 逆转录酶和实时PCR试剂(SYBR green PCR master mix)(Toyobo); LightCycler荧光定量PCR仪及毛细管(Roche). 核酸酶P1、8-羟基脱氧鸟苷标准品(8-OHdG)为Sigma公司产品; 扩增hMTH1基因片段上游引物为: 5'-AGCCTCAGCGAGTTCTCCTG-3', 下游引物为: 5'-GATCTGGCCACCTTGTGC-3'; 扩增内对照β-actin基因片段上游引物为: 5'-CGGGAAATCGTGCGTGACAT-3', 下游引物为: 5'-GAACTTGGGGGATGCTCGC-3'. 引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成.

### 1.2 方法

**1.2.1 HPLC/ECD法检测各组细胞中8-OHdG的含量:** 采用AXYGEN试剂盒从HepG2、HepG2/pcDNA3.1和HepG2/HBx培养细胞中抽提基因组DNA并用核酸蛋白定量仪定量, 取等量DNA

加入DNA酶解缓冲液, 混匀后置磁力加热器中95℃热变性10 min, 并加入一种铁离子螯合物-甲磺酸去铁胺(deferoxamine mesylate, DFAM, Sigma公司)用于防止标本处理过程中人为产生的8-OHdG. 离心后加入核酸酶P1和碱性磷酸酶, 混匀置37℃水浴酶解90 min. 酶解产物移至EP管中10000 r/min×15 min高速离心, 取上清液20 μL注入Atlantis d18色谱柱(waters公司)进行检测. 标本8-OHdG含量经转换计算后以fmol 8-OHdG/μg DNA表示, 每组细胞重复3次, 取平均值.

**1.2.2 RT-实时PCR半定量检测DNA修复酶hMTH1的表达:** 应用加100 g/L灭活的胎牛血清(Gibco)的DMEM高糖培养基, 于37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>浓度的培养箱中传代培养HepG2、HepG2/pcDNA3.1和HepG2/HBx细胞, 以β-actin作为内对照. TRIzol一步法提取各组细胞总RNA(严格按照试剂盒说明书操作), 经逆转录生成cDNA, PCR反应体积为20 μL, 其中含引物各0.2 μmol/L, SYBR Green PCR Master Mix 10 μL, 2 μL来自3 μg总RNA的cDNA以及2 μL序列稀释的外标准物分别作为模板. 采用LightCycler实时PCR仪(Roche)扩增测量. 反应条件分别为94℃预变性30 s, 95℃变性3 s, β-actin和hMTH1分别在58℃和62℃退火5 s, 72℃延伸30 s, 均40个循环周期, 定量分析采用LightCycler软件, β-actin和hMTH1测量温度分别为92℃和91℃. 所有测量重复3次, 取其平均值, 结果以目的基因与β-actin基因表达的比值×100表示. PCR扩增片段大小均经Goldview染色的琼脂糖凝胶电泳紫外成像证实.

**统计学处理** 数据采用mean±SD表示. 运用SPSS13.0软件来进行统计学处理, 组间采用方差分析, 以P<0.05为差异有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 各组细胞中8-OHdG含量的比较** HPLC/ECD法检测各组细胞中8-OHdG的含量发现, HepG2、HepG2/pcDNA3.1细胞中的浓度分别为8.52±1.65 fmol 8-OHdG/μg DNA和9.12±2.69 fmol 8-OHdG/μg DNA, 两者无显著性差异(P>0.05). 而在HepG2/HBx细胞中的表达增至36.5±6.25 fmol 8-OHdG/μg DNA, 与前二者相比差异有极显著性(P<0.01, 图1), 提示HBx基因可引起HepG2细胞内8-OHdG的含量增加.

**2.2 DNA修复酶hMTH1在各组细胞中的表达**

### ■ 研发前沿

HBx对肝细胞氧化应激的影响是HBV致HCC发生的重要机制之一, hMTH1是一种重要的DNA氧化损伤修复酶, 可将游离核苷酸池中的8-OHdGTP水解为8-OHdGMP, 但两者之间的关系及其在肝癌发生中的作用尚未见报道.

### ■创新盘点

本研究应用HPLC/ECD法检测发现HBx可通过诱导氧化应激增加HepG2细胞内DNA氧化损伤产物8-OHdG的含量,同时通过RT/实时PCR定量检测发现各组细胞中可水解8-OHdG的DNA修复酶hMTH1的表达升高,进一步丰富了HBx致乙型肝炎相关性肝癌发生机制的研究。

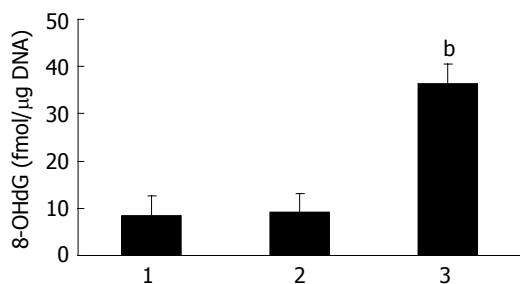


图1 HepG2、HepG2/pcDNA3.1和HepG2/HBx细胞中8-OHdG含量的比较. 1: HepG2; 2: HepG2/pcDNA3.1; 3: HepG2/HBx, <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs HepG2及HepG2/pcDNA3.1组。

DNA修复酶hMTH1 mRNA在HepG2、HepG2/pcDNA3.1细胞中的表达分别为 $0.087 \pm 0.026$  hMTH1/ $\beta$ -actin mRNA  $\times 100$ 和 $0.112 \pm 0.052$  hMTH1/ $\beta$ -actin mRNA  $\times 100$ ,在HepG2/HBx细胞中的表达增至 $1.213 \pm 0.100$  hMTH1/ $\beta$ -actin mRNA  $\times 100$ ,与前二者相比差异有显著性( $P < 0.05$ ,图2)。

### 3 讨论

HBV慢性感染与HCC的发生密切相关<sup>[9-12]</sup>,研究表明乙肝病毒感染后HBV DNA的整合是造成宿主染色体不稳定的重要因素. HBx基因是HBV中最小的阅读框,位于第1374-1838位核苷酸,在HBV中高度保守,其编码的X蛋白具有复杂的生物学功能,可通过反式激活调节宿主细胞基因转录和信号转导通路以及诱导DNA损伤、干扰宿主细胞受损DNA的修复等参与HCC的发生机制<sup>[13-23]</sup>.新近一些研究表明HBx可诱发宿主细胞DNA损伤.当机体抗氧化保护机制不能消除高水平ROS的作用时,便可产生氧化应激,引起细胞内蛋白质、脂肪及DNA的氧化损伤<sup>[6]</sup>,其中8-OHdG是一种发生频率高、致突变能力强的DNA氧化损伤产物<sup>[24-26]</sup>.被氧化的核苷酸池是8-OHdG的主要来源,如不能及时清除便可在DNA复制过程中误配入基因组而发生G:C→T:A的碱基颠换,从而导致机体功能基因的突变,参与癌变发生过程. hMTH1是一种三磷酸酶,具有糖苷酶活性,可将游离核苷酸池中的8-OHdGTP水解为8-OHdGMP,从而阻止8-OHdG错配入DNA双链中,减少或避免DNA点突变的发生<sup>[27-29]</sup>.因此我们通过测定HBx的转基因细胞模型HepG2/HBx中8-OHdG含量和DNA修复酶hMTH1的表达,从DNA修复酶hMTH1这一角度探讨HBx对肝细胞生物学特性的影响及其在肝细胞癌发生的作用。

8-OHdG是一种具有有致突变作用的DNA

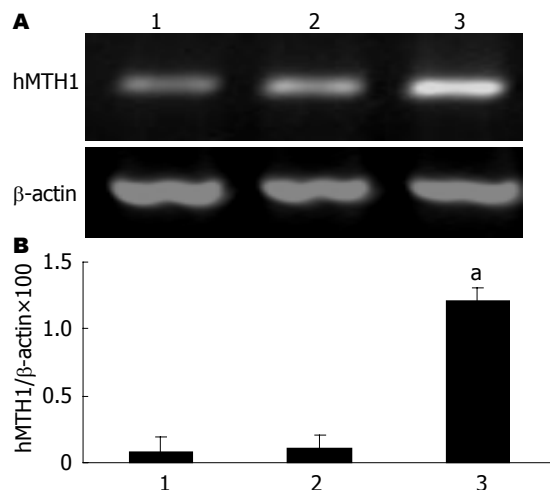


图2 hMTH1在各组细胞中表达水平的比较. 1: HepG2; 2: HepG2/pcDNA3.1; 3: HepG2/HBx, <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs HepG2及HepG2/pcDNA3.1组。

氧化损伤产物,可导致G/C到T/A的碱基颠换,这种G/T碱基颠换的累积可导致基因组的不稳定和肿瘤发生. Kennedy *et al*在肺癌细胞系的研究显示,SV-40转化的非肿瘤性支气管上皮细胞(SV-40 transformed non-tumorigenic human bronchial epithelial cell, BEAS-2B)及肺癌细胞系中8-OHdG的含量明显低于正常支气管上皮细胞<sup>[30]</sup>.相反,在肾癌和结肠癌中的研究均显示肿瘤组织中8-OHdG的含量明显高于癌旁组织<sup>[31]</sup>,这可能与组织特异性有关.晚近在肝癌组织的研究也发现癌组织中8-OHdG含量较癌旁组织明显增高<sup>[6]</sup>,认为可能与肿瘤细胞代谢相对活跃,可持续产生氧化应激有关. Waris *et al*的研究发现HBx可加重细胞氧化应激水平,导致产生大量的活性氧自由基(ROS)<sup>[6]</sup>.本研究采用HPLC/ECD法检测发现HBx转基因细胞HepG2/HBx中8-OHdG含量明显高于对照组HepG2和HepG2/pcDNA3.1细胞( $P < 0.05$ ),而后两者之间差异无显著性,提示HBx基因可引起HepG2细胞内8-OHdG的含量增加.推测HBx可能通过诱导氧化应激,造成细胞内DNA氧化损伤,形成大量具有致突变作用DNA氧化损伤产物如8-OHdG而参与肝细胞的恶性转化和HCC的发生发展。

hMTH1的主要功能是水解清除细胞内游离核苷酸池中的8-OHdG,从而减少或避免8-OHdG被错配入基因组DNA引起碱基颠换,导致基因组的不稳定. Kennedy *et al*发现hMTH1表达在SV-40转化的非肿瘤性支气管上皮细胞和11/12株肺癌细胞系明显高于正常的支气管上皮细胞,这表明癌前细胞和癌细胞

8-OHdG的清除效应与hMTH1的上调表达密切相关<sup>[30]</sup>. Okamoto *et al*在肾癌组织中的研究也显示hMTH1在癌组织中的表达明显高于癌旁组织, 可作为癌组织持续氧化应激存在的证据<sup>[31]</sup>. 晚近在肝癌患者的研究中也发现肝癌组织中hMTH1有过度表达<sup>[32]</sup>. 本研究采用实时定量PCR检测HepG2/HBx及其对照组细胞中DNA修复酶hMTH1的表达水平, 结果发现hMTH1 mRNA在HepG2/HBx细胞中的表达较HepG2细胞及HepG2/pcDNA3.1细胞显著增高( $P < 0.05$ ), 而后两者之间差异无显著性, 提示HBx可能参与上调HepG2细胞DNA修复酶hMTH1的表达. 我们推测hMTH1的高表达可能是由于细胞内8-OHdG大量积累反馈刺激所致, 也就是说hMTH1的表达上调可能是一种反应性的.

一般情况下机体具有一套完善的DNA损伤修复机制, 只有当DNA损伤与修复失衡时才可能出现不可逆的DNA损伤, 造成基因突变的积累以至细胞生物学行为的改变. 本研究初步提示HBx可能通过诱导氧化应激, 造成细胞内DNA氧化损伤, 形成大量具有致突变作用DNA氧化损伤产物如8-OHdG, 后者进而反应性地上调hMTH1的表达, 因而hMTH1也可作为反映氧化应激水平的检测指标之一. 当然, 8-OHdG的清除和修复也并不仅由hMTH1完成, 新近发现DNA修复酶8-羟基鸟嘌呤糖苷酶(hOGG1)和hMYH也在DNA复制的不同环节协同参与修复基因组中的8-OHdG<sup>[27]</sup>, 因此DNA氧化损伤及其相关的DNA修复酶在HBx致肝细胞恶性转化及癌变发生机制的作用值得深入研究.

#### 4 参考文献

- 1 Tanaka Y, Kanai F, Kawakami T, Tateishi K, Ijichi H, Kawabe T, Arakawa Y, Kawakami T, Nishimura T, Shirakata Y, Koike K, Omata M. Interaction of the hepatitis B virus X protein (HBx) with heat shock protein 60 enhances HBx-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 318: 461-469
- 2 Hoare J, Henkler F, Dowling JJ, Errington W, Goldin RD, Fish D, McGarvey MJ. Subcellular localisation of the X protein in HBV infected hepatocytes. *J Med Virol* 2001; 64: 419-426
- 3 Tang H, Oishi N, Kaneko S, Murakami S. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus X protein. *Cancer Sci* 2006; 97: 977-983
- 4 Wang XZ, Jiang XR, Chen XC, Chen ZX, Li D, Lin JY, Tao QM. Seek protein which can interact with hepatitis B virus X protein from human liver cDNA library by yeast two-hybrid system. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 95-98
- 5 Arbuthnot P, Kew M. Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *Int J Exp Pathol* 2001; 82:

- 77-100
- 6 Waris G, Huh KW, Siddiqui A. Mitochondrially associated hepatitis B virus X protein constitutively activates transcription factors STAT-3 and NF-kappa B via oxidative stress. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 7721-7730
- 7 Bruner SD, Norman DP, Verdine GL. Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature* 2000; 403: 859-866
- 8 郭晓榕, 程斌, 郑要初, 林松挺, 黎培员. HBx基因下调P21及其对HepG2细胞增殖与凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2080-2085
- 9 Wei Y, Liu D, Zhou F, Ge Y, Xu J, Yun X, Gu J, Jiang J. Identification of beta-1,4-galactosyltransferase I as a target gene of HBx-induced cell cycle progression of hepatoma cell. *J Hepatol* 2008; 49: 1029-1037
- 10 Lupberger J, Hildt E. Hepatitis B virus-induced oncogenesis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 74-81
- 11 Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004; 350: 1118-1129
- 12 Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, Zou H, Armstrong R, Tamm I, Reed JC. HBxIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO J* 2003; 22: 2729-2740
- 13 Jünger C, Cheng B, Gehrke R, Schmitz V, Nischalke HD, Ramakers J, Schramel P, Schirmacher P, Sauerbruch T, Caselmann WH. Oxidative damage is increased in human liver tissue adjacent to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2004; 39: 1663-1672
- 14 Xu ZH, Zhao MJ, Li TP. p73beta inhibits transcriptional activities of enhancer I and X promoter in hepatitis B virus more efficiently than p73alpha. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 1094-1097
- 15 Su F, Theodosios CN, Schneider RJ. Role of NF-kappaB and myc proteins in apoptosis induced by hepatitis B virus HBx protein. *J Virol* 2001; 75: 215-225
- 16 Ahn JY, Jung EY, Kwun HJ, Lee CW, Sung YC, Jang KL. Dual effects of hepatitis B virus X protein on the regulation of cell-cycle control depending on the status of cellular p53. *J Gen Virol* 2002; 83: 2765-2772
- 17 Arbuthnot P, Capovilla A, Kew M. Putative role of hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JAK/STAT pathways. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 357-368
- 18 Jung JK, Arora P, Pagano JS, Jang KL. Expression of DNA methyltransferase 1 is activated by hepatitis B virus X protein via a regulatory circuit involving the p16INK4a-cyclin D1-CDK 4/6-pRb-E2F1 pathway. *Cancer Res* 2007; 67: 5771-5778
- 19 Lau WM, Ho TH, Hui KM. p16INK4A-silencing augments DNA damage-induced apoptosis in cervical cancer cells. *Oncogene* 2007; 26: 6050-6060
- 20 Chen J, Siddiqui A. Hepatitis B virus X protein stimulates the mitochondrial translocation of Raf-1 via oxidative stress. *J Virol* 2007; 81: 6757-6760
- 21 Gao J, Chen C, Hong L, Wang J, Du Y, Song J, Shao X, Zhang J, Han H, Liu J, Fan D. Expression of Jagged1 and its association with hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 356: 341-347
- 22 Gao J, Song Z, Chen Y, Xia L, Wang J, Fan R, Du R, Zhang F, Hong L, Song J, Zou X, Xu H, Zheng

#### ■应用要点

本文为乙型肝炎相关性肝癌的早期发现和防治提供了新的线索和依据, 深入研究有助于乙型肝炎相关性肝癌的早期发现和预防.



### ■同行评价

本文设计合理, 方法先进, 结论明确, 具有较大的理论价值.

- G, Liu J, Fan D. Deregulated expression of Notch receptors in human hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 2008; 40: 114-121
- 23 Purow BW, Haque RM, Noel MW, Su Q, Burdick MJ, Lee J, Sundaresan T, Pastorino S, Park JK, Mikolaenko I, Maric D, Eberhart CG, Fine HA. Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation. *Cancer Res* 2005; 65: 2353-2363
- 24 Barbone F, Bovenzi M, Cavallieri F, Stanta G. Cigarette smoking and histologic type of lung cancer in men. *Chest* 1997; 112: 1474-1479
- 25 Liu L, Zhang Q, Feng J, Deng L, Zeng N, Yang A, Zhang W. The study of DNA oxidative damage in benzene-exposed workers. *Mutat Res* 1996; 370: 145-150
- 26 Luna L, Rolseth V, Hildrestrand GA, Otterlei M, Dantzer F, Bjørås M, Seeberg E. Dynamic relocalization of hOGG1 during the cell cycle is disrupted in cells harbouring the hOGG1-Cys326 polymorphic variant. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 1813-1824
- 27 Nakabeppu Y. Regulation of intracellular localization of human MTH1, OGG1, and MYH proteins for repair of oxidative DNA damage. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2001; 68: 75-94
- 28 Tsutsui H, Ide T, Shiomi T, Kang D, Hayashidani S, Suematsu N, Wen J, Utsumi H, Hamasaki N, Takeshita A. 8-oxo-dGTPase, which prevents oxidative stress-induced DNA damage, increases in the mitochondria from failing hearts. *Circulation* 2001; 104: 2883-2885
- 29 Nash HM, Bruner SD, Schärer OD, Kawate T, Addona TA, Spooner E, Lane WS, Verdine GL. Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily. *Curr Biol* 1996; 6: 968-980
- 30 Kennedy CH, Cueto R, Belinsky SA, Lechner JF, Pryor WA. Overexpression of hMTH1 mRNA: a molecular marker of oxidative stress in lung cancer cells. *FEBS Lett* 1998; 429: 17-20
- 31 Okamoto K, Toyokuni S, Kim WJ, Ogawa O, Kakehi Y, Arao S, Hiai H, Yoshida O. Overexpression of human mutT homologue gene messenger RNA in renal-cell carcinoma: evidence of persistent oxidative stress in cancer. *Int J Cancer* 1996; 65: 437-441
- 32 程斌, 田德安. DNA修复酶表达与8-羟脱氧鸟核苷酸在肝癌发生中的作用. *中华消化杂志* 2005; 25: 437-439

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》入选北京大学图书馆 2008年版《中文核心期刊要目总览》

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12400余种. 本版还加大了专家评审力度, 5500多位学科专家参加了核心期刊评审工作. 经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目. 《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表, 第66页). (常务副总编辑: 张海宁 2009-06-08)

# 超声内镜对胃癌外科手术及内镜下黏膜可切除性的评价

贾业贵, 邓长生

贾业贵, 邓长生, 武汉大学中南医院消化内科 湖北省武汉市 430071

贾业贵, 江汉大学附属医院消化内科 湖北省武汉市 430015  
作者贡献分布: 此课题由贾业贵与邓长生设计; 研究过程由贾业贵操作完成; 研究所用的器具由贾业贵提供; 数据分析及论文写作由贾业贵完成; 邓长生指导与审核。

通讯作者: 邓长生, 教授, 430071, 湖北省武汉市东湖路169号, 武汉大学中南医院消化内科. dengcs06@yahoo.com.cn  
电话: 027-67813079

收稿日期: 2009-03-18 修回日期: 2009-04-09

接受日期: 2009-04-13 在线出版日期: 2009-06-08

## Evaluation of endoscopic ultrasound in gastric cancer surgery and endoscopic mucosal resectability

Ye-Gui Jia, Chang-Sheng Deng

Ye-Gui Jia, Chang-Sheng Deng, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Ye-Gui Jia, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuhan 430015, Hubei Province, China

Correspondence to: Professor Chang-Sheng Deng, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, 169 Donghu Road, Wuhan 430071, Hubei Province, China. dengcs06@yahoo.com.cn

Received: 2009-03-18 Revised: 2009-04-09

Accepted: 2009-04-13 Published online: 2009-06-08

### Abstract

**AIM:** To determine the diagnostic accuracy of endoscopic ultrasonography (EUS) for preoperative invasion depth of gastric cancer (T staging) and to evaluate the instructive significance of EUS in gastric cancer surgery and resectability of endoscopic mucosa.

**METHODS:** A total of 78 patients with pathologically confirmed gastric cancer were examined by EUS before operation. Furthermore, they underwent TNM staging, and the preoperative examination results were compared with post-operative pathological results.

**RESULTS:** Among the 78 patients, compared with post-operative pathological results, the overall accuracy of stage T of EUS was 69.2%, and the accuracy rates of T1, T2, T3 and T4 were

83.3%, 61.9%, 40.0% and 100%, respectively. Meanwhile, the sensibility to the prediction of operational respectability was up to 80.8%. Five cases with early gastric cancer (EGC) diagnosed by EUS had been confirmed by the operation. However, 1 case with gastric submucosa cancer was diagnosed as muscularis propria (MP) cancer by EUS. Resectability of gastric cancer at stage T4 was only 42.3% (11/26).

**CONCLUSION:** EUS bears a high accuracy rate to determine the invasion depth of gastric cancer. EUS does much favor to endoscopic mucosal resection (EMR) because EGC could be relatively accurately judged by EUS. While gastric cancer patients at stage T4 need to search new examination to confirm NM staging of gastric cancer, avoid surgery and choose a suitable therapeutic method.

**Key Words:** Gastric cancer; Endoscopic ultrasonography; Operation; Endoscopic mucosal resection

Jia YG, Deng CS. Evaluation of endoscopic ultrasound in gastric cancer surgery and endoscopic mucosal resectability. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(16): 1665-1668

### 摘要

**目的:** 阐述EUS对术前胃癌浸润深度(T分期)诊断的准确性, 评价其对胃癌手术或内镜下黏膜可切除性的指导意义。

**方法:** 回顾性分析78例胃癌手术患者临床资料。患者术前均行超声内镜检查, TNM分期。分析比较术前T分期与术后手术及病理结果。

**结果:** 与术后病理结果对比, EUS术前T分期总准确率为69.2%, T1、T2、T3、T4分期的准确率分别为83.3%、61.9%、40.0%和100%, 对手术可切除性预测的敏感性为80.8%(63/78)。其中EUS准确诊断早期胃癌5例, 但1例胃黏膜下层癌, 被诊断为固有肌层癌。T4期胃癌手术切除率仅为42.3%(11/26)。

**结论:** EUS对判断胃癌浸润深度准确率较高, 能较准确诊断早期胃癌, 对指导内镜下黏膜切除

### 背景资料

胃癌术前TNM分期对其治疗手段的选择非常重要, 很多研究提示EUS是胃癌术前分期的重要检测手段, 但关于EUS对指导胃癌治疗临床意义的评价报道较少。

### 同行评议者

周国雄, 主任医师, 南通大学附属医院消化内科

## ■ 研究前沿

目前胃癌根治率高低的的关键在于术前肿瘤TNM分期的准确性。EUS对胃癌外科手术及内镜下黏膜可切除性的临床价值是本文研究的问题。

术有很大帮助。而对T4期胃癌患者,虽然诊断准确性很高,但对指导根治性手术的意义不大。

**关键词:** 胃癌; 超声内镜; 手术; 内镜下黏膜切除治疗

贾业贵, 邓长生. 超声内镜对胃癌外科手术及内镜下黏膜可切除性的评价. 世界华人消化杂志 2009; 17(16): 1665-1668

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1665.asp>

## 0 引言

胃癌是消化系最常见的恶性肿瘤之一,目前主要治疗手段是外科手术及新近开展的内镜下黏膜切除治疗。术前的肿瘤分期(TNM分期)对治疗手段的选择非常重要。超声内镜(endoscopic ultrasonography, EUS)自20世纪80年代初问世以来,在胃肠系肿瘤分期及判断肠壁起源肿瘤的性质方面具有极大优势<sup>[1]</sup>。迄今已广泛应用于包括胃癌在内的消化系恶性肿瘤的分期。本文主要评价EUS对早期胃癌行内镜下黏膜切除及对进展期胃癌行积极手术根治治疗的临床意义。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2004-04/2008-10在江汉大学附属医院住院行手术治疗的胃癌患者78例,其中男43例,女35例,年龄28-80(平均年龄60.2)岁。术前胃镜检查及病检发现:胃窦癌46例,胃体和胃底贲门癌分别为18例和14例。所有患者术前均行EUS检查, TNM分期。日本Pentax FG-36UX线阵型超声内镜,超声扫描探头频率为7.5 MHz和5 MHz,并具有彩色多普勒和M超声功能。

### 1.2 方法

**1.2.1 检查步骤:** EUS前常规内镜检查。检查前内镜前端安装气囊,气囊内注水检查有无破损并排除气泡,采用水囊直接接触法或水囊法加脱气水充盈法。开始扫描病变,一般应首先对原发癌灶进行检查,继而对胃周淋巴结进行全面评价。必要时,可随时更换不同频率的探头以达到最佳分辨效果,并准确分期。

**1.2.2 胃癌的内镜超声分期标准:** EUS下正常胃壁图像与5层组织结构相对应,分别为:第1层高回声和第2层低回声对应于黏膜界面和黏膜肌层;第3层对应于黏膜下层;第4层低回声结构对应于固有肌层;第5层对应于浆膜层和浆膜外层结构。

EUS对胃癌浸润深度的判断,是根据胃壁结构最外层的变化,作为最深部来判定。EUS对胃癌浸润深度的判断,是根据胃壁结构变化的最外层,作为最深部来判定。

## 2 结果

**2.1 EUS术前T分期与术后病理分期比较** 78例胃癌患者, EUS诊断T1期6例, T2-3期46例; T4期26例; 与术后病理相比, EUS准确诊断T1期5例, 还有1例诊断为T2期; T2-3期准确诊断例23例, 另有11例是T2和T3混淆诊断, 12例过度诊断为T4期; 26例T4期胃癌全部诊断准确。EUS下T分期总的准确率为69.2%(54/78)。术后病理所见癌肿大小、浸润深度及破坏层次与术前EUS检查结果大多一致。24例患者术后病理T分期结果与EUS不符, 19例为溃疡型, 2例为隆起型, 3例为平坦型。其中分期不足4例, 病理检查显示癌肿病灶周围存在微小浸润。分期过度的20例, 病理发现病变局部呈炎症水肿。

**2.2 EUS对于手术切除的预测性** 78例手术患者中, 行胃大部切除术33例, 全胃切除术30例, 姑息手术10例, 剖腹探查未能切除癌肿5例, EUS对手术可切除性预测的敏感性为80.8%(63/78)。15例未能行根治性治疗均为T4期胃癌, T4期胃癌的可切除率仅为42.3%(11/26)。早期胃癌6例, 有1例过深判断, EUS对早期胃癌判断的准确率达83.3%(5/6)。

## 3 讨论

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一。外科手术切除加区域淋巴结清扫仍是目前胃癌的首选治疗手段。但超过50%的病例早期症状不明显或不典型, 一经诊断, 常已达局部晚期或侵犯腹膜、包围大血管或远处转移而无法手术; 而癌肿局限者也有接近50%无法根治性切除。因此, 根治手术切除率仍然较低。胃镜检查结合黏膜活检, 是目前胃癌诊断最可靠的诊疗手段。但普通胃镜仅能发现病灶, 判断病灶的大小, 对于病灶的浸润深度却无法判断。而手术根治率高低的的关键在于术前癌肿TNM分期的准确性。虽然目前胃癌术前TNM分期的检测手段有很多, 如EUS、MDCT、MRI等, 但有研究<sup>[2]</sup>认为EUS目前仍是胃癌术前T分期的第一选择。

EUS作为胃癌术前分期的重要手段, Ganpathi *et al*报道发现, 胃癌患者EUS术前T分期总准确率63.0%-88.0%<sup>[3-6]</sup>。本研究78例胃癌手术患者, EUS术前T分期准确率为69.2%(54/78), 与文献报道相近。国外报道和本研究结果都提示EUS对T分期的评价基本准确, 但存在过度或不足现象。与术后病理对照, 本研究中有24例T分期不当, 其中有20例(溃疡型19例, 平坦型1例)

患者被过度分期. 其可能原因, 主要是溃疡表面坏死组织及瘢痕纤维化和结缔组织增生, 周围的炎症误认为肿瘤浸润, 以及浆膜层较薄, 有时很难区分有无侵犯, 本研究中有12例T3期过度诊断为T4期; 而4例(2例为隆起型, 2例为平坦型)分期不足的患者, 可能由于胃壁增厚明显或病变隆起过大而超声波穿透深度有限等所致. 此外, 癌组织的微小浸润灶或局部破坏, 有时不易为低频超声探及, 常为分期不足的重要原因<sup>[7-8]</sup>.

我们强调胃癌术前分期重要性, 关键为了指导后期的治疗. 虽然外科手术是目前的主要治疗手段. 但对早期胃癌可在内镜下行电凝切除或剥离切除术(EMR或EMRP), 尤其适用于年老体弱、并发其他器官疾病的手术禁忌者或拒绝手术的早期胃癌者, 具有创伤小、完全切除率高、并发症发生率低、恢复快、复发率低、患者生活质量高和费用低等优点, 而且, 内镜下切除治疗可以获得与手术同样的效果. 因此, 内镜下切除治疗将逐渐成为早期胃癌的首选治疗方法. 但缺点是不能清除胃外病灶(如淋巴结清扫), 病例选择不当可致部分患者切缘癌残留, 此时需追加手术切除. 因此, 正确选择病例, 当属必要<sup>[9]</sup>.

Kwee *et al*<sup>[10]</sup>回顾性研究发现, EUS判断早期胃癌的准确性平均为87.8%(范围18.2%-100%). 本研究6例早期胃癌中, 我们准确判断5例, 准确率为83.3%. 其中1例凹陷型黏膜下层早期胃癌被过度分期为固有肌层癌, 可能与经验不足及病灶周围炎性水肿有关. 因此, 对于隆起或平坦型早期胃癌, EUS指导下治疗是可靠的. 但Mouri *et al*<sup>[11]</sup>研究认为, 对于黏膜癌, EUS指导下内镜治疗虽可靠, 但对黏膜下层病灶深度超过1 mm的黏膜下层癌, 应外科手术治疗. 他们认为这类黏膜下层早期胃癌大部分是固有肌层癌. 因此, 对于黏膜下层早期胃癌的内镜下治疗, 要密切观察有无切缘癌残留.

欧美和日本学者多项研究认为, 对于进展期胃癌, 即使在胃癌根治术中采用广泛的淋巴结清扫术, 也不能改善患者的生存率, 多数患者最终死于复发转移<sup>[12]</sup>. 因此, 为了避免不必要的手术, 进展期胃癌的术前分期也非常重要.

进展期胃癌的治疗主要是外科手术治疗. 而手术方式的选择主要根据患者术前癌肿TNM分期及术中的手术发现. EUS作为术前癌肿TNM分期的重要检测手段, 对于进展期胃癌的分期准确性非常高. Puli *et al*<sup>[13]</sup>认为EUS对于进展期胃癌诊断的准确性比早期胃癌更高. Lok

*et al*<sup>[14]</sup>研究认为EUS对进展期胃癌的准确性可达到100%. 本研究中, EUS对进展期胃癌的准确性也达到100%. 虽然对于T2、T3期胃癌存在分期混淆的现象, 但都能根除病灶; 而26例T4期胃癌患者术前EUS能准确诊断, 15例(5例未能手术切除, 10例仅能行姑息性手术治疗)未能根除癌肿, 主要原因是癌肿已侵犯周围的肠系膜上动脉血管及胰腺等, 故T4期胃癌的根除率为42.3%(11/26). 因此, 我们认为, 对于术前EUS诊断为T4期胃癌患者, EUS对判断能否行根治性手术治疗的意义不大.

我们体会, EUS在胃癌浸润深度(T分期)中有着其他检查手段所不能替代的独到之处, 对于早期胃癌行内镜下切除治疗有指导意义; 虽然对T4期胃癌T分期的准确性较高, 但对判断其能否手术切除病灶的意义不大, 尚需寻找新的检测手段, 来提高手术根除的可能性.

#### 4 参考文献

- 1 Ingram M, Arregui ME. Endoscopic ultrasonography. *Surg Clin North Am* 2004; 84: 1035-1059, vi
- 2 Kwee RM, Kwee TC. Imaging in local staging of gastric cancer: a systematic review. *J Clin Oncol* 2007; 25: 2107-2116
- 3 Ganpathi IS, So JB, Ho KY. Endoscopic ultrasonography for gastric cancer: does it influence treatment? *Surg Endosc* 2006; 20: 559-562
- 4 Chen CH, Yang CC, Yeh YH. Preoperative staging of gastric cancer by endoscopic ultrasound: the prognostic usefulness of ascites detected by endoscopic ultrasound. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35: 321-327
- 5 Tsendsuren T, Jun SM, Mian XH. Usefulness of endoscopic ultrasonography in preoperative TNM staging of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 43-47
- 6 Polkowski M, Palucki J, Wronska E, Szawlowski A, Nasierowska-Guttmejer A, Butruk E. Endosonography versus helical computed tomography for locoregional staging of gastric cancer. *Endoscopy* 2004; 36: 617-623
- 7 Tseng LJ, Mo LR, Tio TL, Fresner YT, Jao N, Lin RC, Kuo JY, Chang KK, Wang CH, Wey KC. Video-endoscopic ultrasonography in staging gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 897-900
- 8 Park YS, Lee D, Lee DH, Kim NY, Jeong SH, Kim JW, Hwang JH, Lee SH, Kim JS, Jung HC, Song IS. [Assessment of factors affecting the accuracy of endoscopic ultrasonography in T2 stage gastric cancer] *Korean J Gastroenterol* 2008; 52: 86-90
- 9 Kolfenbach S, Malfertheiner P. [Early gastric cancer-diagnosis and therapy] *Praxis (Bern 1994)* 2006; 95: 1037-1041
- 10 Kwee RM, Kwee TC. The accuracy of endoscopic ultrasonography in differentiating mucosal from deeper gastric cancer. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 1801-1809
- 11 Mouri R, Yoshida S, Tanaka S, Oka S, Yoshihara M, Chayama K. Usefulness of endoscopic ultrasonography in determining the depth of

#### ■ 相关报道

Kwee *et al*回顾性研究发现, EUS判断早期胃癌的准确性平均为87.8%. Lok *et al*研究认为EUS对进展期胃癌的准确性可达到100%.

## ■同行评价

本文选题较好,统计正确,结果可靠,具有一定的临床指导价值。

- invasion and indication for endoscopic treatment of early gastric cancer. *J Clin Gastroenterol* 2009; 43: 318-322
- 12 秦叔逵, 龚新雷. 晚期胃癌化疗的现状和新进展. *临床肿瘤学杂志* 2006; 11: 641-652
- 13 Puli SR, Batapati Krishna Reddy J, Bechtold ML, Antillon MR, Ibdah JA. How good is endoscopic ultrasound for TNM staging of gastric cancers? A meta-analysis and systematic review. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4011-4019
- 14 Lok KH, Lee CK, Yiu HL, Lai L, Szeto ML, Leung SK. Current utilization and performance status of endoscopic ultrasound in a community hospital. *J Dig Dis* 2008; 9: 41-47

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 •

## 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	<b>世界华人消化杂志</b>	<b>2353</b>	<b>5</b>	<b>1.37</b>	<b>0.568</b>	<b>15</b>	<b>0.05</b>
G800	胃肠病学	376	33	-0.62	0.372	33	-0.31
G326	胃肠病学和肝病学杂志	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	中华心率失常学杂志	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.

# 胰岛素样生长因子结合蛋白2在非酒精性脂肪肝早期诊断中的价值

童诚, 强晖, 肖明兵, 张艳, 周国雄, 倪润洲

童诚, 强晖, 肖明兵, 张艳, 周国雄, 倪润洲, 南通大学附属医院消化科 江苏省南通市 226001

作者贡献分布: 强晖与童诚对此文所作贡献均等; 此课题由强晖、童诚、张艳、周国雄及倪润洲设计; 研究过程由童诚与肖明兵操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由肖明兵提供; 数据分析由童诚完成; 本论文写作由童诚与强晖完成。

通讯作者: 强晖, 副主任医师, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院消化科。huiqiangnt@163.com

电话: 0513-85051821

收稿日期: 2009-03-09 修回日期: 2009-04-12

接受日期: 2009-04-20 在线出版日期: 2009-06-08

## Value of insulin-like growth factor binding protein 2 in early diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease

Cheng Tong, Hui Qiang, Ming-Bing Xiao, Yan Zhang, Guo-Xiong Zhou, Run-Zhou Ni

Cheng Tong, Hui Qiang, Ming-Bing Xiao, Yan Zhang, Guo-Xiong Zhou, Run-Zhou Ni, Department Of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Hui Qiang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. huiqiangnt@163.com

Received: 2009-03-09 Revised: 2009-04-12

Accepted: 2009-04-20 Published online: 2009-06-08

### Abstract

**AIM:** To study the value of quantitative determination of insulin-like growth factor binding protein 2 in the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD).

**METHODS:** ELISA was used to measure the serous IGFBP2 of patients with NAFLD, chronic hepatitis, and hepatic cirrhosis, primary carcinoma of the liver and healthy adults. The results were statistically analyzed.

**RESULTS:** The serous IGFBP2 was significantly higher in NAFLD group than in other groups ( $6.89 \pm 2.37 \mu\text{g/L}$ ,  $4.86 \pm 1.97 \mu\text{g/L}$  vs  $1.77 \pm 1.56 \mu\text{g/L}$ ,  $1.67 \pm 1.36 \mu\text{g/L}$ ,  $1.76 \pm 1.52 \mu\text{g/L}$ ,  $1.52 \pm 1.43 \mu\text{g/L}$ , all  $P < 0.05$ ). The serum IGFBP2 in mild NAFLD group was significantly higher

than in middle or sever NAFLD groups ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The study suggests that screening test of serous IGFBP2 is a useful marker for recognizing the stage and degree of NAFLD.

**Key Words:** Nonalcoholic fatty liver disease; Insulin-like growth factor binding protein 2; Enzyme-linked immunosobert assay

Tong C, Qiang H, Xiao MB, Zhang Y, Zhou GX, Ni RZ. Value of insulin-like growth factor binding protein 2 in early diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(16): 1669-1671

### 摘要

**目的:** 探讨血清胰岛素样生长因子结合蛋白2(insulin-like growth factor binding protein 2, IGFBP2)定量检测对非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)的诊断价值。

**方法:** 采用ELISA定量检测非酒精性脂肪肝患者与慢性肝炎、肝硬化、原发性肝癌以及健康成人血清中IGFBP2水平, 并进行统计学分析。

**结果:** 轻度和中重度脂肪肝组患者血清中IGFBP2水平显著高于健康成人组、慢性肝炎组、肝硬化与原发性肝癌组水平( $6.89 \pm 2.37 \mu\text{g/L}$ ,  $4.86 \pm 1.97 \mu\text{g/L}$  vs  $1.77 \pm 1.56 \mu\text{g/L}$ ,  $1.67 \pm 1.36 \mu\text{g/L}$ ,  $1.76 \pm 1.52 \mu\text{g/L}$ ,  $1.52 \pm 1.43 \mu\text{g/L}$ , 均 $P < 0.05$ ), 且轻度脂肪肝组显著高于中重度脂肪肝组( $P < 0.05$ )。

**结论:** 监测IGFBP2水平有助于早期诊断非酒精性脂肪肝及了解病变严重程度。

**关键词:** 非酒精性脂肪肝; 胰岛素样生长因子结合蛋白2; 酶联免疫吸附试验

童诚, 强晖, 肖明兵, 张艳, 周国雄, 倪润洲. 胰岛素样生长因子结合蛋白2在非酒精性脂肪肝早期诊断中的价值. *世界华人消化杂志* 2009; 17(16): 1669-1671

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1669.asp>

### 背景资料

随着生活水平的提高, NAFLD的发病率也日益增高, 寻求NAFLD及评价其严重程度, 且简单、实用的诊断手段已经成为世界范围内的研究热点。

### 同行评议者

王炳元, 教授, 中国医科大学附属第一医院消化内科

## ■ 研发前沿

目前NAFLD在炎症、脂质代谢、氧化应激、细胞凋亡等领域已经有了一定的进展。

## 0 引言

近年来随着生活水平的不断改善,非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)发病率呈上升趋势,全球的发病率大约为20%<sup>[1]</sup>. NAFLD已成为导致慢性肝病的重要原因之一,目前认为,其与向心性肥胖、2-型糖尿病/胰岛素抵抗、高甘油三酯血症等密切相关<sup>[2]</sup>. NAFLD是环境与遗传等多种因素共同作用的疾病。

## 1 材料和方法

1.1 材料 入选病例均为南通大学附属医院就诊患者,其中NAFLD组83例、慢性肝炎组23例、肝硬化组22例、肝癌组20例以及健康成人30例,其中NAFLD患者组分为轻度脂肪肝组32例和中、重度脂肪肝组51例.非酒精性脂肪肝诊断及分级根据中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学会2006-02讨论修订的标准<sup>[3]</sup>.

1.2 方法 标注采集,采取静脉血液,分离血清后置于-20℃冰箱待检.血清胰岛素样生长因子结合蛋白2(insulin-like growth factor binding protein 2, IGFBP2)采取ELISA法测定,试剂盒由美国ADL公司提供.肝功能、血脂、血糖由南通大学附属医院检验科检测。

**统计学处理** 结果采用mean±SD表示,采用Stata7.0统计软件,t检验,以 $P<0.05$ 为差异有显著性。

## 2 结果

2.1 轻度脂肪肝、中重度脂肪肝以及健康成人肝功能、血脂和血糖水平 轻度脂肪肝和中重度脂肪肝组血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)以及血糖均显著高于健康成人组( $P<0.05$ ).中重度脂肪肝组ALT、TG及血糖显著高于轻度脂肪肝组( $P<0.05$ ).轻度脂肪肝组AST、TC与中重度脂肪肝组比较无统计学意义(表1).

2.2 脂肪肝与其他肝病血清IGFBP2的差别 轻度脂肪肝和中重度脂肪肝组血清IGFBP2均显著高于慢性肝炎、肝硬化、肝癌组( $P<0.05$ ).慢性肝炎、肝硬化、肝癌及健康成人组间两两比较血清IGFBP2,无统计学意义(表2).

如以IGFBP2 $\geq 3 \mu\text{g/L}$ 诊断脂肪肝,则检测IGFBP2诊断脂肪肝敏感性为77.1%(64/83),特异性为75.8%(72/95),阳性预测值为73.6%(64/87),阴性预测值为79.1%(72/91).定量血清IGFBP2在

区分轻度脂肪肝和中重度脂肪肝时,敏感性为56.25%(18/32)特异性为56.86%(29/51).

## 3 讨论

NAFLD是目前最常见的肝脏疾病,在我国成人NAFLD的患病率约为15.35%<sup>[4]</sup>,国外报道儿童NAFLD的患病率为3%-10%<sup>[5]</sup>. NAFLD临床及病理诊断分型有3型:单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎和脂肪性肝炎相关性肝硬化<sup>[6]</sup>. NAFLD为代谢综合征的一部分,是代谢综合征在肝脏的具体表现. NAFLD临床表现通常缺如或呈亚临床经过,仅一部分患者表现为乏力、消化不良、肝区隐痛和肝脾肿大等非特异性症状及体征.临床常规生化检查如AST、ALT、GGT等诊断NAFLD敏感性及特异性均较低.影像学如B超,CT诊断NAFLD虽然有助于检测脂肪肝,在但早期敏感性较低,只有30%左右<sup>[7]</sup>.肝活检依然是诊断脂肪肝的金标准.目前尚缺乏早期诊断脂肪肝及了解脂肪肝严重程度,且敏感性和特异性均较高的无创性血清学检测指标。

IGFBP是由6种与胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)高亲和力结合蛋白组成的家族,是一种可以与IGF结合的分泌性蛋白,其通过IGF调节细胞的生长、分化、凋亡、黏附和运动,以及运载蛋白的功能<sup>[8-9]</sup>.IGFBP2在外周循环中的量仅次于IGFBP1,在IGFBP家族中位居第二<sup>[10]</sup>,其具体的生物学作用目前依然很少了解.国外报道在肥胖人群血清中IGFBP2表达降低,实验显示在肥胖发生过程中,白色前脂细胞分泌IGFBP2,其通过负向调节IGFs,对肥胖的发生具有保护作用<sup>[11]</sup>.此外在神经系统恶性肿瘤、消化系恶性肿瘤、乳腺癌以及组织胚胎发育等过程中,IGFBP2也发挥重要作用<sup>[12-14]</sup>.但其在脂肪肝中的研究国内外尚未见相关报道.我们前期通过基因芯片技术筛选脂肪肝相关基因,发现IGFBP2在不同致病因素诱导的脂肪肝大鼠动物模型中表达均增加.并且免疫组化结果显示IGFBP2在脂肪变性的肝细胞及胞外基质中均表达增加.IGFBP2可能为脂肪肝发生的保护因素,其主要通过对抗胰岛素抵抗,脂肪的积聚.本实验结果可能提示,在脂肪肝发生早期,脂肪变性的肝细胞分泌IGFBP2代偿性升高,其主要通过抑制IGFs的生物学作用阻碍脂肪肝的进一步发展.如脂肪肝发生的始动因素(向心性肥胖、2-型糖尿病、高甘油三酯血症)不消除,肝细胞在进一步脂肪变性的过程

表 1 轻度脂肪肝组、中重度脂肪肝组和健康成人生化指标比较 (mean ± SD)

分组	n	AST(U/L)	ALT(U/L)	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)	血糖(mmol/L)
健康成人	30	16.78 ± 9.53	15.23 ± 10.62	1.26 ± 0.83	3.34 ± 0.48	4.63 ± 0.72
轻度脂肪肝	32	28.20 ± 11.15 <sup>a</sup>	28.95 ± 13.61 <sup>ad</sup>	2.27 ± 0.91 <sup>ad</sup>	4.20 ± 1.09 <sup>a</sup>	6.14 ± 1.46 <sup>ad</sup>
中重度脂肪肝	51	37.60 ± 12.67 <sup>a</sup>	44.20 ± 16.55 <sup>a</sup>	2.89 ± 1.02 <sup>a</sup>	4.61 ± 2.05 <sup>a</sup>	8.56 ± 2.18 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P<0.05 vs 健康成人组; <sup>d</sup>P<0.01 vs 中重度脂肪肝组.

表 2 脂肪肝与其他肝病血清IGFBP2比较 (mean ± SD)

分组	n	年龄(岁)	IGFBP2(μg/L)
健康成人	30	54.3 ± 13.6	1.77 ± 1.56
轻度脂肪肝	32	56.2 ± 15.8	6.89 ± 2.37 <sup>ad</sup>
中重度脂肪肝	51	51.8 ± 15.4	4.86 ± 1.97 <sup>a</sup>
慢性肝炎	23	53.2 ± 14.8	1.67 ± 1.36
肝硬化	22	57.8 ± 13.2	1.76 ± 1.52
原发性肝癌	20	53.6 ± 15.3	1.52 ± 1.43

<sup>a</sup>P<0.05 vs 健康成人组; <sup>d</sup>P<0.01 vs 中重度脂肪肝组.

中逐步失去分泌IGFBP2的能力, 使IGFBP2分泌量减少, 其抑制IGFs生物学作用的调节能力降低, 使其对抗胰岛素抵抗及脂肪积聚的作用下降, 其具体机制目前尚不清楚, 有待于进一步探讨. 检测血清IGFBP2有助于早期诊断NAFLD, 但在区分脂肪肝轻重度时, 敏感性及特异性均不理想, 有待于进一步扩大样本量及改进试验方法.

#### 4 参考文献

- Patrick L. Nonalcoholic fatty liver disease: relationship to insulin sensitivity and oxidative stress. Treatment approaches using vitamin E, magnesium, and betaine. *Altern Med Rev* 2002; 7: 276-291
- Utzschneider KM, Kahn SE. Review: The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 4753-4761
- 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南. *中华肝病杂志* 2006; 14: 161-162
- 范建高, 朱军, 李建新, 李锐, 戴菲, 宋晓敏, 陈兰, 李峰, 陈世耀. 上海市成人脂肪肝患病率及其危险因素流行病学调查. *中华肝病杂志* 2005; 13: 83-88
- Shneild BL, Gonzalez-perata R, Roberts EA. Controversies in the management of pediatric liver disease: Hepatitis B, C and NAFLD: Summary

- of a single topic conference. *Hepatology* 2006; 44: 1344-1354
- Ramesh S, Sanyal AJ. Evaluation and management of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2005; 42 Suppl: S2-S12
- Mottin CC, Moretto M, Padoin AV, Swarowsky AM, Toneto MG, Glock L, Repetto G. The role of ultrasound in the diagnosis of hepatic steatosis in morbidly obese patients. *Obes Surg* 2004; 14: 635-637
- Honegger B, Galic M, Wittwer F, Brogiolo W, Hafen E, Stocker H. Imp-L2, a putative homolog of vertebrate IGF-binding protein 7, counteracts insulin signaling in *Drosophila* and is essential for starvation resistance. *J Biol* 2008; 7: 10
- Wood AW, Duan C, Bern HA. Insulin-like growth factor signaling in fish. *Int Rev Cytol* 2005; 243: 215-285
- Sanghera DK, Ortega L, Han S, Singh J, Ralhan SK, Wander GS, Mehra NK, Mulvihill JJ, Ferrell RE, Nath SK, Kamboh MI. Impact of nine common type 2 diabetes risk polymorphisms in Asian Indian Sikhs: PPARG2 (Pro12Ala), IGF2BP2, TCF7L2 and FTO variants confer a significant risk. *BMC Med Genet* 2008; 9: 59
- Wheatcroft SB, Kearney MT, Shah AM, Ezzat VA, Miell JR, Mudo M, Williams SC, Cawthorn WP, Medina-Gomez G, Vidal-Puig A, Sethi JK, Crossey PA. IGF-binding protein-2 protects against the development of obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56: 285-294
- Schlueter PJ, Royer T, Farah MH, Laser B, Chan SJ, Steiner DF, Duan C. Gene duplication and functional divergence of the zebrafish insulin-like growth factor 1 receptors. *FASEB J* 2006; 20: 1230-1232
- Schmetzer O, Moldenhauer G, Riesenberger R, Pires JR, Schlag P, Pezzutto A. Quality of recombinant protein determines the amount of autoreactivity detected against the tumor-associated epithelial cell adhesion molecule antigen: low frequency of antibodies against the natural protein. *J Immunol* 2005; 174: 942-952
- Morris JK, George LM, Wu T, Wald NJ. Insulin-like growth factors and cancer: no role in screening. Evidence from the BUPA study and meta-analysis of prospective epidemiological studies. *Br J Cancer* 2006; 95: 112-117

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

#### 同行评价

本文选题尚好, 实用性强, 对临床医师有很好的参考价值.



## 肝纤维化患者血清差异蛋白质的筛选

罗新华, 程明亮, 杨勤, 张权

### ■背景资料

肝纤维化是各种慢性肝病的共同病理基础, 其早期诊断仍是临床一大难题。回顾这一领域的发展, 肝纤维化的诊断从临床诊断到辅助诊断如血液生化、超声、影像学检查, 肝活组织病理检查仍然是目前诊断肝纤维化最可靠的方法。但因取材局限, 有创伤, 不便常规随访及动态观察, 临床应用受到极大限制, 迫切需要寻找简单且易推广、特异性、敏感性高的肝纤维化无创伤性诊断指标。

罗新华, 贵州省人民医院感染科 贵州省贵阳市 550002  
程明亮, 杨勤, 张权, 贵阳医学院附属医院感染科 贵州省贵阳市 550004  
贵州省优秀青年科技人才基金资助项目, No. 2005-0518;  
贵阳医学院研究生创新计划基金资助项目, No. b200705;  
贵州省卫生厅科技基金资助项目, No. 2006038  
作者贡献分布: 罗新华与程明亮对此文所作贡献均等; 此课题由罗新华与程明亮设计; 研究过程由罗新华与杨勤操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由程明亮提供; 数据分析由罗新华与张权完成; 本论文写作由罗新华与程明亮共同完成。  
通讯作者: 程明亮, 550004, 贵州省贵阳市贵医街28号, 贵阳医学院附属医院感染科。chengml@21cn.com  
电话: 0851-6752795 传真: 0851-6752695  
收稿日期: 2009-03-17 修回日期: 2009-04-10  
接受日期: 2009-04-20 在线出版日期: 2009-06-08

### Screening of differential serum proteins in patients with hepatic fibrosis

Xin-Hua Luo, Ming-Liang Cheng, Qin Yang, Quan Zhang

Xin-Hua Luo, Department of Infectious Diseases, Guizhou People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou Province, China  
Ming-Liang Cheng, Qin Yang, Quan Zhang, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Supported by: the Science and Technology Funds for Excellent Young Talents of Guizhou Province, No. 2005-0518; the Innovation Research Funds for Graduate Student of Guiyang Medical College, No. b200705; and the Science and Technology Foundation from Health Department of Guizhou Province, No. 2006038

Correspondence to: Ming-Liang Cheng, Department of Infectious Disease, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. chengml@21cn.com

Received: 2009-03-17 Revised: 2009-04-10

Accepted: 2009-04-20 Published online: 2009-06-08

### Abstract

**AIM:** To compare and analyze the expression difference of proteins between hepatic fibrosis serum and normal human serum and to identify potential serum markers for human hepatic fibrosis.

**METHODS:** Serum samples were collected from 6 healthy subjects and 6 patients with hepatic fibrosis following normal protocols. The serum samples of these two groups were mixed into one respectively of equal volume. Albumin and

IgG removal were carried out and serum total proteins were extracted. 2-DE was used to isolate the total proteins using pH4-7L, 18 cm IPG strip, and SDS-PAGE. Silver nitrate stain was applied afterwards. ImageMaster 2D Platinum Software (Version 5) was employed to analyze the 2-DE results. ELISA was adopted to verify the expression changes of some differential proteins.

**RESULTS:** The 2-DE matching rate was 89.58% between the two groups. From the two groups, 517 differential protein spots were identified, among which 24 with differential expression above three times were singled out and MALDI-TOF-MS analysis was carried out on them. Eight proteins were identified, including transferring, apolipoprotein A-IV, T-cell receptor  $\beta$ , haptoglobin, serum albumin and serum albumin precursor. Up-regulated expression was observed in 3 proteins and down-regulated expression in 5 proteins in the hepatic fibrosis serum group. As compared with that in normal serum, haptoglobin and apolipoprotein A-IV expression were down-regulated in hepatic fibrosis serum, which was consistent with the results of 2-DE.

**CONCLUSION:** Compared with the normal subject group, the serum in the hepatic fibrosis group showed differential expression in protein profile. The proteins of differential expression are expected to be the serum markers for hepatic fibrosis.

**Key Words:** Hepatic fibrosis; Serum; Proteomics

Luo XH, Cheng ML, Yang Q, Zhang Q. Screening of differential serum proteins in patients with hepatic fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(16): 1672-1675

### 摘要

**目的:** 对比分析肝纤维化患者和健康人血清中差异表达的蛋白质, 筛选与肝纤维化发生密切相关的血清蛋白质。

**方法:** 肝纤维化患者和健康人空腹血清标本各6例分别等量混合成2个样本, 去除血清中的白蛋白和IgG。利用双向凝胶电泳(2-DE)分离肝纤维化血清和健康人血清总蛋白质后, 硝酸银染

### ■同行评议者

陈红松, 研究员, 北京大学人民医院肝病研究所

色, 经图像分析筛选差异表达的蛋白点. 应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)鉴定差异表达的蛋白点, 并用ELISA法对其中部分差异蛋白的表达水平进行验证.

**结果:** 筛选出2组间的差异蛋白点共517个, 对其中表达量差异3倍以上的24个蛋白点进行MALDI-TOF-MS分析, 鉴定出包括触珠蛋白、载脂蛋白A-IV、转铁蛋白、T细胞受体 $\beta$ 链、血清白蛋白及血清白蛋白前体等8个蛋白质, 其中3个蛋白质在肝纤维化血清中表达上调, 5个蛋白质在肝纤维化血清中表达下调. 与健康人血清比较, ELISA法检测肝纤维化血清中触珠蛋白、载脂蛋白A-IV表达均下调, 结果与双向凝胶电泳一致.

**结论:** 肝纤维化血清与健康人血清的蛋白质表达谱表现出一定差异, 这些差异表达的血清蛋白质有望成为肝纤维化诊断与判定预后的血清标志物.

**关键词:** 肝纤维化; 血清; 蛋白质组学

罗新华, 程明亮, 杨勤, 张权. 肝纤维化患者血清差异蛋白质的筛选. 世界华人消化杂志 2009; 17(16): 1672-1675  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1672.asp>

## 0 引言

肝纤维化的血清学指标检测由于其无创、易于动态监测疾病发展, 近年日益受到国内外学者的广泛关注并在此领域进行了大量的探索. 但目前肝纤维化的血清相关标志物对肝纤维化诊断的特异性、敏感性、准确性、阳性和阴性预测值尚不尽如人意, 还不能真实反映肝纤维化的实际状况<sup>[1-2]</sup>. 血清蛋白质组学以血清整体蛋白质成分的变化为研究对象, 从而能获得更加标准化的功能相关的蛋白标志物, 其高通量、高效率的特性为肝纤维化研究带来了新的思维方式. 其可以全面、动态地分析患者血清样品中蛋白质种类及数量的改变, 有助于寻找与疾病诊断及预后相关的标志物及药物治疗的靶点<sup>[3]</sup>. 为此, 我们以经肝穿刺活检证实的肝纤维化患者为研究对象, 运用血清蛋白质组学技术对比研究其血清与正常人血清蛋白质组表达的差异, 以期筛选出人肝纤维化敏感特异的血清标志物, 为肝纤维化的无创诊断提供新的思路.

## 1 材料和方法

1.1 材料 6例肝纤维化患者血清来源于2005-10/

2007-06贵州省人民医院感染科经肝穿刺活检证实为肝纤维化3-4级的患者, 肝组织病理诊断符合2000年病毒性肝炎防治方案中肝纤维化的诊断标准. 空腹血清采集于肝穿当日清晨, 排除HCV感染、长期大量饮酒史及全身性疾病. 其中男4例, 女2例, 平均年龄 $41.7 \pm 4.8$ 岁. 6例健康人空腹血清来源于贵阳医学院附属医院体检中心健康志愿者, B超提示肝脏形态正常, 排除HBV、HCV感染及长期大量饮酒史, 其中男4例, 女2例, 平均年龄 $38.8 \pm 5.6$ 岁. 所有样本均符合人体实验伦理学标准, 征得患者知情同意并签署知情同意书. 超纯尿素、硫脲、苯甲磺酰氟、二硫苏糖醇、碘乙酰胺, 固相pH梯度干胶条(美国Bio-Rad公司), 十二烷基硫酸钠、甲叉双丙烯酰胺、 $\alpha$ -氨基-4-羟基肉桂酸、乙腈(美国Sigma公司), 胰蛋白酶(美国Promega公司), Albumin/IgG Removal Kit(德国Merck公司), 人载脂蛋白A-IV ELISA试剂盒(武汉中美科技有限公司)、人触珠蛋白ELISA试剂盒(上海麦莎生物科技有限公司), 硝酸银、三水乙酸钠、戊二醛为国产试剂. Ettan IPG phor II 等电聚焦系统、Ettan DALT 12 垂直电泳系统(美国GE公司), Autoflex MALDI-TOF质谱仪(德国Bruker公司), Multiskan全自动多功能酶标仪(芬兰Labsystem).

### 1.2 方法

1.2.1 样本处理: 空腹全血2 mL提取血清; 血清中加蛋白酶抑制剂0.1 mol/L PMSF, 使其终浓度达到1 mmol/L; 再加入0.5 mol/L EDTA, 使其终浓度达到2 mmol/L;  $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用. 同组血清等量混合后, 按Albumin/IgG Removal Kit说明书操作去除白蛋白和IgG, 上清液进行Bradford法蛋白定量.

1.2.2 双向凝胶电泳: 参照IPGphor等电聚焦系统指南和Görg *et al*<sup>[4]</sup>的方法加以改进. 选用pH4-7 L的18 cm线性IPG干胶条, 上样量150  $\mu\text{g}$ 进行再水化、等电聚焦, 总电压为72 000 V/h. 胶条平衡后, 进行120 g/L SDS-PAGE电泳.

1.2.3 硝酸银染色: 凝胶取出后, 经固定、敏化、硝酸银染色后至蛋白点显示清晰, 中止染色.

1.2.4 图像分析: 透射扫描凝胶获取图像后, 利用图像分析软件对图像蛋白质斑点自动检测, 手工删除、添加斑点, 匹配, 筛选出在两种组织中差异表达的蛋白质.

1.2.5 制备质谱样品及质谱分析: 切取差异蛋白点, 再脱色、还原、烷基化、酶解、样品回收及脱盐处理. 然后在MALDI-TOF质谱仪上分

### ■ 相关报道

White *et al*利用2-DE和LC-MS技术对比研究丙型肝炎肝纤维化患者和正常人血清, 发现7个差异表达的蛋白质, 其中载脂蛋白A-IV在丙型肝炎肝纤维化患者血清中表达下降.

### ■ 创新盘点

本研究运用血清蛋白质组学技术对肝纤维化患者与健康人血清进行检测, 从整体上对两者之间差异表达的蛋白质进行分析, 发现触珠蛋白、载脂蛋白A-IV可能是肝纤维化早期特异且敏感的生物标志物.

### 应用要点

深入研究这些差异表达的蛋白质在肝纤维化发生发展过程中的作用, 将为肝纤维化的无创性诊断提供新的思路。

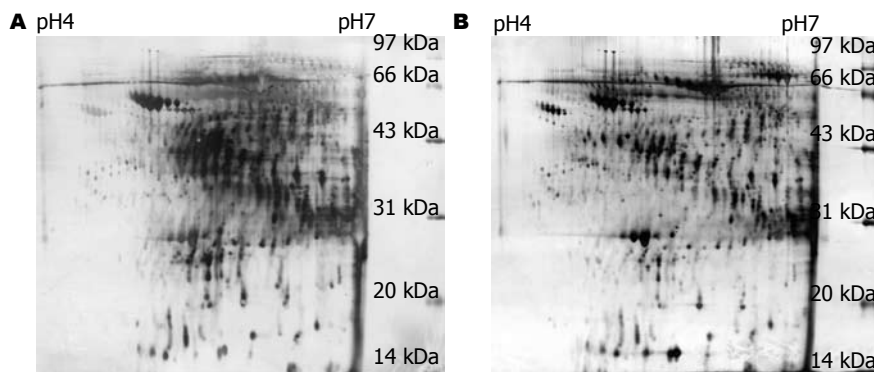


图1 肝纤维化与健康人血清2-DE胶图. A: 肝纤维化血清; B: 健康人血清.

表1 肝纤维化组及健康人血清组中部分差异蛋白点质的谱鉴定结果

编号	肽段匹配率	序列覆盖率(%)	相对分子质量	等电点	蛋白质名称	肝纤维化血清中的表达
173	6/40	25	34356	5.99	T细胞受体β	上调
220	7/21	37	23884	6.59	免疫球蛋白A	上调
300	7/15	34	27670	6.39	白蛋白	下调
319	11/17	26	48641	5.97	白蛋白前体	下调
368	7/22	21	48669	6.67	转铁蛋白	下调
446	12/49	33	45307	5.23	载脂蛋白A-IV	下调
451	11/21	32	38868	6.26	触珠蛋白	下调
499	25/65	46	67988	5.69	肉豆蔻酸白蛋白复合物	上调

表2 血清中触珠蛋白、载脂蛋白A-IV ELISA测定结果 (mean ± SD, n = 6)

分组	触珠蛋白(μg/L)	载脂蛋白A-IV(mg/L)
健康人血清	71.36 ± 34.02	326.47 ± 140.29
肝纤维化血清	49.54 ± 25.16 <sup>b</sup>	198.12 ± 97.84 <sup>b</sup>

<sup>b</sup>P < 0.01 vs 健康人血清组.

析, 激光波长337 nm, 加速电压为20 kV, 以基质峰和胰蛋白酶自动降解离子峰作为内部标准校正, 对肽质量指纹图谱进行校正, 获得蛋白质点的准确肽质量指纹数据.

1.2.6 数据库查询: 应用Mascot搜索引擎, 选用NCBI nr数据库进行查询. 搜索条件设置肽片断质量最大误差控制在 $\pm 1 \times 10^{-4}$ , 酶切断裂位点允许值为1. 结合蛋白质点的等电点、分子量、匹配片段的多少以及氨基酸序列进行蛋白质鉴定.

1.2.7 血清载脂蛋白A-IV、触珠蛋白水平测定: 采用ELISA法进行检测, 操作严格按试剂盒说明书进行.

## 2 结果

2.1 肝纤维化患者及健康人血清2-DE差异分析 6例同组血清样本等量混合后, 同时进行3次双

向凝胶电泳, 分别获得3块分辨率高、重复性好的平行胶. 2组蛋白表达谱类似, 蛋白多集中在pH5.5-6.5间区域. 肝纤维化血清及正常人血清2-DE平均蛋白点数, 分别为 $924 \pm 16$ 个和 $962 \pm 21$ 个(图1), 两种血清的匹配率为89.58%. 筛选出2组间差异蛋白点517个, 其中表达量差异3倍以上的蛋白点共24个, 包括肝纤维化组表达上调的蛋白点12个, 表达下调的蛋白点12个.

2.2 差异蛋白质的MALDI-TOF-MS鉴定结果 对2组血清差异3倍以上的24个蛋白点进行MALDI-TOF-MS分析, 共鉴定出载脂蛋白A-IV、触珠蛋白、转铁蛋白、T细胞受体β、白蛋白、白蛋白前体等8个蛋白质, 其中3个在肝纤维化血清中表达上调, 5个在肝纤维化血清中表达下调(表1).

2.3 ELISA法鉴定差异表达的蛋白质 与健康人血清比较, 肝纤维化血清中触珠蛋白、载脂蛋白A-IV表达下降, 与2-DE结果一致(表2).

## 3 讨论

本研究通过肝纤维化患者与健康人血清2-DE胶图的比较, 寻找出部分差异表达的蛋白, 发现并了解这些蛋白质在肝纤维化患者血清中的变化, 将有助于对肝纤维化早期特异且敏感的生物标志物的筛选.

触珠蛋白作为一种急性期蛋白, 在宿主抗

感染、损伤组织的修复以及内环境稳定的过程中起着重要作用. 此外, 触珠蛋白尚有抗氧化活性、抑制前列腺素合成、抑制细菌、促进血管生成及重要的免疫作用. 触珠蛋白主要在肝脏合成和降解, 当肝实质的广泛受损, 肝脏合成触珠蛋白的功能低下<sup>[5-6]</sup>. 本实验通过2-DE筛查发现, 触珠蛋白在肝纤维化血清中表达降低, 与ELISA结果检测一致. 推测由于在肝纤维化时, 肝实质受损, 肝脏合成触珠蛋白减少所致. 因此, 血清触珠蛋白的减少可作为临床上诊断肝纤维化的一个标志.

载脂蛋白A-IV是20世纪70年代后期发现的一种糖蛋白, 主要在空肠、回肠及下丘脑合成, 具有调节摄食、抗动脉粥样硬化、抗氧化、调节胃动力等作用<sup>[7-8]</sup>. 在硫代乙酰胺诱导的肝纤维化大鼠, 载脂蛋白A-IV在基因水平出现下调<sup>[9]</sup>. 近来一些学者运用蛋白质组学技术研究发现, 载脂蛋白A-IV在丙肝后肝纤维化及实验性肝纤维化血清中表达下降<sup>[10-11]</sup>, 与我们的研究结果一致. 提示载脂蛋白A-IV可能与肝纤维化的发生有关, 对患者血清载脂蛋白A-IV表达水平的监测将有助于对肝纤维化的诊断.

血清转铁蛋白(transferrin)是血清中 $\beta_2$ 球蛋白与铁结合的一种复合体, 主要由肝脏合成. 血清转铁蛋白具有运铁、调节铁的吸收和防止铁的毒性作用, 还能促进肝细胞的再生. 因此, 肝脏发生病变时, 血清转铁蛋白含量会随之产生变化<sup>[12]</sup>. 我们通过双向凝胶电泳实验也发现肝纤维化血清中转铁蛋白表达下降, 这可能由于肝细胞损伤后, 肝脏合成转铁蛋白能力下降所致.

血清白蛋白具有脂肪酸的结合位点, 可以结合脂肪酸<sup>[13]</sup>. 有研究证实酒精性肝病时, 血清中的饱和脂肪酸, 尤其是肉豆蔻酸含量显著增加<sup>[14]</sup>. Eun *et al*运用血清蛋白质组学方法研究韧带骨化, 发现血清中肉豆蔻酸白蛋白复合物表达上调<sup>[15]</sup>. 我们在肝纤维化血清中, 也发现肉豆蔻酸与白蛋白结合的复合物表达上调, 可能是由于肝纤维化时脂肪酸代谢紊乱所致. 因此, 我们可考虑将肉豆蔻酸白蛋白复合物作为肝纤维化患者潜在的血清标志物进行后续研究.

本研究利用蛋白质组学研究技术对肝纤维化患者与正常人血清的差异蛋白进行了初步鉴定, 获得了触珠蛋白和载脂蛋白A-IV等8个差异蛋白质, 进一步评价这些血清差异蛋白作为肝纤维化诊断候选标志物的可靠性, 还需继续扩大样本量、鉴定数据和结合其他方法进行后续

研究, 但本次研究结果为寻找肝纤维化患者早期血清敏感特异标志物提供了可靠依据.

#### 4 参考文献

- 1 Pinzani M, Rombouts K, Colagrande S. Fibrosis in chronic liver diseases: diagnosis and management. *J Hepatol* 2005; 42 Suppl: S22-S36
- 2 Cheng ML, Yang CQ. Hepatic Fibrosis. 1<sup>st</sup> ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2007: 221-229
- 3 Petricoin EF, Rajapaske V, Herman EH, Arekani AM, Ross S, Johann D, Knapp A, Zhang J, Hitt BA, Conrads TP, Veenstra TD, Liotta LA, Sistiare FD. Toxicoproteomics: serum proteomic pattern diagnostics for early detection of drug induced cardiac toxicities and cardioprotection. *Toxicol Pathol* 2004; 32 Suppl 1: 122-130
- 4 Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 2000; 21: 1037-1053
- 5 Langlois MR, Delanghe JR. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem* 1996; 42: 1589-1600
- 6 Carter K, Worwood M. Haptoglobin: a review of the major allele frequencies worldwide and their association with diseases. *Int J Lab Hematol* 2007; 29: 92-110
- 7 Stan S, Delvin E, Lambert M, Seidman E, Levy E. Apo A-IV: an update on regulation and physiologic functions. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1631: 177-187
- 8 Tso P, Liu M. Apolipoprotein A-IV, food intake, and obesity. *Physiol Behav* 2004; 83: 631-643
- 9 Utsunomiya T, Okamoto M, Hashimoto M, Yoshinaga K, Shiraishi T, Tanaka F, Mimori K, Inoue H, Watanabe G, Barnard GF, Mori M. A gene-expression signature can quantify the degree of hepatic fibrosis in the rat. *J Hepatol* 2004; 41: 399-406
- 10 Liu J, Wang JY, Wei LM, Lu Y, Jin H. [Effects of Fuzheng Huayu Decoction on plasma proteome in cirrhosis: preliminary experimental study with rats] *Zhonghua Yixue Zazhi* 2007; 87: 1272-1275
- 11 White IR, Patel K, Symonds WT, Dev A, Griffin P, Tsokanas N, Skehel M, Liu C, Zekry A, Cutler P, Gattu M, Rockey DC, Berrey MM, McHutchison JG. Serum proteomic analysis focused on fibrosis in patients with hepatitis C virus infection. *J Transl Med* 2007; 5: 33
- 12 夏敦年, 周镇先, 武军. 血清前白蛋白与转铁蛋白联合检测在病毒性肝炎诊断中的临床意义. *河北医学* 2006; 12: 1195-1196
- 13 Fujiwara S, Amisaki T. Molecular dynamics study of conformational changes in human serum albumin by binding of fatty acids. *Proteins* 2006; 64: 730-739
- 14 Shiraishi K, Matsuzaki S, Itakura M, Ishida H. Abnormality in membrane fatty acid compositions of cells measured on erythrocyte in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20: 56A-59A
- 15 Eun JP, Ma TZ, Lee WJ, Kim MG, Yoo MJ, Koh EJ, Choi HY, Kwak YG. Comparative analysis of serum proteomes to discover biomarkers for ossification of the posterior longitudinal ligament. *Spine* 2007; 32: 728-734

#### ■同行评价

本文旨在利用差异蛋白组学技术寻找乙型肝炎肝纤维化的血清标志物, 以期发现肝纤维化的无创诊断标志物, 具有一定的科学价值和临床意义, 但是创新性略显不足.

# 原发性胆汁性肝硬化AMA-M<sub>2</sub>阴性患者的临床及病理特点

李祥金, 杨晋辉

## ■背景资料

PBC是一种慢性进行性胆汁淤积性肝脏疾病,以肝内中小胆管非化脓性炎症为特征,中老年女性多见,男女比例约为1:8。本病目前尚无治愈的方法,但早期及时治疗能改善生化指标及肝脏组织学病变,从而延缓病情进展,一旦进入晚期,则肝移植为唯一可行的治疗手段,因此早诊断早治疗至关重要。抗线粒体抗体M<sub>2</sub>亚型(AMA-M<sub>2</sub>)一般认为是其特异性抗体,但仍有部分为阴性患者,增加了诊治难度,通过对阴性患者的研究有利于进一步认识PBC,减少误诊。

## ■同行评议者

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

李祥金, 黄石市第五医院消化内科 湖北省黄石市 435005  
杨晋辉, 昆明医学院第二附属医院肝病中心 云南省昆明市 650101

作者贡献分布: 李祥金与杨晋辉对此文所作贡献均等; 此课题由李祥金与杨晋辉设计; 研究过程由李祥金完成; 数据分析由李祥金完成; 本论文写作由李祥金完成; 文章的审阅由杨晋辉完成。

通讯作者: 李祥金, 副主任医师, 435005, 湖北省黄石市, 黄石市第五医院消化内科。lantian123lxj@126.com

电话: 0714-5330202

收稿日期: 2009-03-23 修回日期: 2009-04-15

接受日期: 2009-04-20 在线出版日期: 2009-06-08

## Clinical and pathological features of primary biliary cirrhotic patients with negative anti-mitochondria antibody M<sub>2</sub> subtype

Xiang-Jin Li, Jin-Hui Yang

Xiang-Jin Li, Department of Gastroenterology, the Fifth Hospital of Huangshi, Huangshi 435005, Hubei Province, China  
Jin-Hui Yang, Center of Liver Diseases, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650101, Yunnan Province, China

Correspondence to: Xiang-Jin Li, Department of Gastroenterology, the Fifth Hospital of Huangshi, Huangshi 435005, Hubei Province, China. lantian123lxj@126.com

Received: 2009-03-23 Revised: 2009-04-15

Accepted: 2009-04-20 Published online: 2009-06-08

## Abstract

**AIM:** To explore the clinical and pathological features of primary biliary cirrhotic (PBC) patients with negative anti-mitochondria antibody M<sub>2</sub> subtype (AMA-M<sub>2</sub>).

**METHODS:** Fifty six PBC cases from the second affiliated hospital of Kunming Medical College between AD 2000 and 2007 were selected. The clinical data (general status, laboratory findings) and pathologic data were reviewed in 22 cases of negative AMA-M<sub>2</sub> antibody. And the clinical data of the negative AMA-M<sub>2</sub> anti-body cases were compared with the positive ones.

**RESULTS:** The general status and laboratory findings (biochemical data, immune function) of AMA-M<sub>2</sub> antibody negative were compared with the positive ones, with no significant difference observed (all  $P > 0.05$ ). Remarkable changes in bile

ducts, especially in small bile ducts were observed in 22 negative AMA-M<sub>2</sub> antibody cases. Those changes were related to staging. Inflammatory cells, mainly lymphocytes were seen around the bile duct. Remarkable infiltrated inflammatory cells, mainly lymphocytes, even lymphoid follicles were observed in the portal area. Liver cells changed mildly and were non-specific. The changes of different stages existed and intermixed in one sample.

**CONCLUSION:** Liver biopsy is useful to confirm to diagnosis of PBC with negative M<sub>2</sub> antibody and an important criteria for staging determination.

**Key Words:** Primary biliary cirrhosis; Anti-mitochondria antibody; Pathology

Li XJ, Yang JH. Clinical and pathological features of primary biliary cirrhotic patients with negative anti-mitochondria antibody M<sub>2</sub> subtype. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(16): 1676-1679

## 摘要

**目的:** 探讨原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)中AMA-M<sub>2</sub>阴性患者的临床及病理特点。

**方法:** 2000-2007年昆明医学院第二附属医院PBC患者56例。分析AMA-M<sub>2</sub>阴性PBC患者临床资料及病理资料,并与AMA-M<sub>2</sub>阳性患者临床资料进行对比。

**结果:** AMA-M<sub>2</sub>抗体阳性与阴性患者间一般资料及血清指标均无显著性差异(均 $P > 0.05$ )。22例AMA-M<sub>2</sub>阴性PBC患者胆管改变明显,以小胆管最具特征性,其表现与所处的分期有关,胆管周围见炎性细胞浸润,以淋巴细胞为主;汇管区细胞浸润现象明显,以淋巴细胞最为重要,甚至形成淋巴滤泡;肝细胞改变相对较轻,缺乏特异性;同一份标本可见不同时期的改变,各期改变可相互混杂。

**结论:** 病理组织学是确诊AMA-M<sub>2</sub>阴性患者的重要检查,同时是分期的重要标准。

**关键词:** 原发性胆汁性肝硬化; 抗线粒体抗体; 病理学

李祥金, 杨晋辉. 原发性胆汁性肝硬化AMA-M<sub>2</sub>阴性患者的临床及病理特点. 世界华人消化杂志 2009; 17(16): 1676-1679  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1676.asp>

## 0 引言

原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)是一种慢性进行性胆汁淤积性肝脏疾病, 以中老年女性多见, 一般认为与自身免疫有关<sup>[1]</sup>, 但具体病因及发病机制仍不清楚. 抗线粒体抗体M<sub>2</sub>型(anti-mitochondrial antibody M<sub>2</sub> subtype, AMA-M<sub>2</sub>)是PBC的特异性抗体, 阳性率高, 但仍有部分患者该抗体阴性, 极易误诊. 本研究旨在通过分析探讨PBC中AMA-M<sub>2</sub>阴性患者的临床及病理资料, 总结其发病规律, 提高临床诊疗水平.

## 1 材料和方法

1.1 材料 选自昆明医学院第二附属医院2000-2007年所有PBC患者, 均符合美国肝病学会(AASLD)2000年版PBC诊断指导建议<sup>[2]</sup>: (1)碱性磷酸酶(ALP)等反映胆汁淤积的生化指标升高; (2)影像学检查示胆管正常; (3)血清抗线粒体抗体(AMA)或AMA-M<sub>2</sub>阳性. (4)如果血清AMA/AMA-M<sub>2</sub>阴性, 病理检查符合PBC改变. 其中AMA-M<sub>2</sub>阴性患者符合(1)(2)(4)条, 患者共22例, 平均53.55±15.15岁, 其中女18例, 平均52.78±14.91岁, 男4例. 对照组为AMA-M<sub>2</sub>阳性患者34例, 年龄56.56±11.16岁, 其中女27例, 男7例. 病例组黄疸14例(63.64%)、疲乏12例(54.55%)、纳差11例(50%)等. 对照组黄疸21例(61.76%)、疲乏17例(50.00%)、纳差13例(38.24%).

### 1.2 方法

1.2.1 血清指标检测: 所有病例均采集清晨空腹肘静脉血, 分离血清待检. ALP、 $\gamma$ -谷氨酰转氨酶(GGT)、总胆汁酸(TBA)、总胆红素(TBIL)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)等均采用日立7170A型全自动生化分析仪检测.

自身免疫性肝病谱采用免疫印迹技术测定: AMA-M<sub>2</sub>、酸性磷酸化蛋白(SP100)、抗肝/肾微粒体抗体1型(LKM1)、抗核心蛋白抗体(gp210)、抗肝细胞质抗原1型(LC1)、抗可溶性肝抗原(SLA); 抗核抗体(ANA)及抗双链DNA(DSDNA)采用间接免疫荧光法检测; IgG、IgA、IgM、C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>采用速率散射比浊法.

1.2.2 影像学检查: 所有对象均行影像学检查(B

超、CT、MRI或MRCP)显示胆管.

1.2.3 肝组织病理学检查: 在B超引导下采用活检枪快速穿刺法取肝组织, 标本长1.2-1.5 cm, 镜下至少包括6个汇管区. 100 g/L中性甲醛溶液固定, 送昆明医学院病理教研室经石蜡包埋, 制成厚度为5  $\mu$ m的切片, 常规HE染色、网状纤维染色等处理后, 采用同一标准阅片.

**统计学处理** 计数资料以例数或百分比进行描述, 计量资料中正态分布资料以mean±SD表示, 偏态分布资料以中位数表示. 组间比较: 计量资料采用独立样本均数的 $t$ 检验或Wilcoxon秩和检验, 计数资料采用 $\chi^2$ 检验. 应用SPSS13.0统计软件包进行统计分析,  $\alpha = 0.05$ .

## 2 结果

2.1 血清生化指标 2组患者间, 血清生化指标无统计学差异(表1).

2.2 自身免疫性肝病谱抗体及其他抗体阳性者 病例组ANA: 9例(40.91%), gp210: 2例(9.09%), Sp100: 1例(2.94%), LKM: 2例(9.09%), LC1: 1例(4.55%), DSDNA: 1例(4.55%), SLA: 0例. 其中有2例患者存在M<sub>2</sub>抗体阳性-阴性变动现象.

2.3 免疫功能 2组患者间, 血清免疫球蛋白及补体比较无统计学差异(表2).

2.4 影像学检查 患者均示胆管正常.

2.5 肝组织学检查 22例患者行肝穿刺活体组织学检查, 均见特征性表现. 其中 I 期1例(4.5%), II 期4例(18.2%), III 期4例(18.2%), IV 期13例(59.1%). 可见: 小叶间胆管改变100%(减少、消失、增生、变性坏死等), 界板胆管改变71.0%(减少或消失、变性坏死、增生等), 汇管区细胞浸润现象100%(所有均见淋巴细胞, 甚至形成淋巴滤泡, 其他见浆细胞、中性粒细胞等), 胆管周围亦见细胞浸润(淋巴细胞为主), 肝细胞改变轻微(水肿为主, 尚见点灶状坏死、嗜酸性改变、脂肪变性等).

## 3 讨论

PBC是一种慢性进行性胆汁淤积性肝脏疾病, 以肝内中小胆管非化脓性炎症为特征, 中老年女性多见, 男女比例约为1:8<sup>[3]</sup>. 本病目前尚无治愈的方法, 但早期及时治疗能改善生化指标及肝脏组织学病变, 从而延缓病情进展, 一旦进入晚期, 则肝移植为唯一可行的治疗手段, 因此早诊断早治疗至关重要<sup>[4]</sup>. 但因本病早期临床表现不典型及临床重视程度不够、诊断水平等原因,

### ■ 研发前沿

原发性胆汁性肝硬化(PBC)是一种慢性进行性胆汁淤积性肝脏疾病, 以中老年女性多见, 一般认为与自身免疫有关, 但具体病因及发病机制仍不清楚.

### ■相关报道

大多数学者认为,符合诊断标准的AMA或M<sub>2</sub>抗体阳性者,可确诊为PBC。但对AMA或AMA-M<sub>2</sub>阴性者,目前仍未有统一意见。

表 1 患者血清生化指标比较

检测指标	对照组	病例组	t值	P值
ALT (U/L) <sup>1</sup>	97	59	-0.746	0.455
AST (U/L) <sup>1</sup>	135	84	-1.244	0.213
ALP (U/L)	256.32 ± 122.69	220.88 ± 165.44	0.817	0.419
GGT (U/L)	255.16 ± 194.64	259.00 ± 271.19	-0.055	0.957
TBA(μmol/L) <sup>1</sup>	36.30	39.7	-0.367	0.713
TBIL (μmol/L) <sup>1</sup>	48.80	30.10	-0.794	0.427

<sup>1</sup>: 偏态分布资料,中位数表示,应用Wilcoxon秩和检验。

误诊率仍高居不下,浪费了大量医疗资源<sup>[5]</sup>。一般认为PBC与自身免疫有关<sup>[1]</sup>,病因可能涉及遗传<sup>[6]</sup>、感染<sup>[7]</sup>及环境<sup>[8]</sup>等因素,但具体病因及发病机制尚未明确。

PBC的一个重要特征是一些血清抗体阳性:AMA是PBC的标志性抗体,共分为M1-M9 9个亚型,其中M<sub>2</sub>为PBC特异性抗体。AMA-M<sub>2</sub>在PBC发病中的可能有重要作用:(1)阳性率高达95%<sup>[9]</sup>,甚至有报道阳性率可为95%-100%;(2)AMA-M<sub>2</sub>在无症状的体检者中可出现,多年后大多数发展为PBC患者;(3)已有实验<sup>[10]</sup>证实M<sub>2</sub>抗原可诱导建立小鼠PBC模型,其生化与病理特征和人类相似,进一步证实了AMA-M<sub>2</sub>在PBC发病中的重要作用。ANA是自身免疫性疾病的一类重要抗体,是AMA阴性患者的一项重要标志<sup>[11]</sup>。ANA有多种亚型:核膜型、着丝点型、颗粒型、均质型及核点型等。其中核膜型(nuclear envelope, NE)和多核点型(multiple nuclear dots, MND)被认为是PBC特异性抗体。核膜型主要包括抗gp210等,特异性高,与疾病的活动度和严重性相关<sup>[12]</sup>。多核点型主要包括SP100,目前认为<sup>[11]</sup>抗-SP100是PBC特异性自身抗体。本次研究中3例AMA-M<sub>2</sub>阴性而gp210(2例)或SP100(1例)阳性患者均经病理学确诊,支持二者是PBC特异性抗体的观点,是AMA-M<sub>2</sub>阴性者较好的补充指标。其他自身免疫性肝病抗体如LKM1, LC1临床意义均与AIH相关,PBC中阳性率低,对PBC诊断意义不大。

大多数学者认为,符合诊断标准的AMA或M<sub>2</sub>抗体阳性者,可确诊为PBC。但对AMA或AMA-M<sub>2</sub>阴性者,目前仍未有统一意见。有些作者<sup>[13]</sup>认为属另外一种疾病,即自身免疫性胆管炎(autoimmune cholangitis, AIC);但有人认为属于AMA阴性的PBC,是一个亚型。本研究中患者

表 2 患者血清免疫球蛋白及补体 (g/L)

检测指标	对照组	病例组	t值	P值
IgG	18.68 ± 4.98	14.59 ± 3.11	1.269	0.253
IgA	3.89 ± 1.63	3.61 ± 1.82	1.031	0.351
IgM	5.57 ± 3.74	2.57 ± 2.13	1.034	0.302
C <sub>3</sub>	1.11 ± 0.16	0.84 ± 0.31	0.732	0.465
C <sub>4</sub>	0.20 ± 0.05	0.16 ± 0.06	1.098	0.310

AMA-M<sub>2</sub>阴性者占一定比例,为39.29%(22/56)。通过比较AMA-M<sub>2</sub>阳性组和阴性组发现:二者性别、年龄、生化资料、免疫功能等方面均无差别,与文献相符<sup>[14-15]</sup>;另外,与Masuda *et al*<sup>[16]</sup>报道相似,有2例患者存在AMA-M<sub>2</sub>阳性-阴性变动现象,具体原因有待进一步研究。根据以上2点,所以我们认为AMA-M<sub>2</sub>阴性者仍属于PBC,至于与阳性者是否有不同的发病机制有待进一步研究。

AMA-M<sub>2</sub>阳性或阴性患者,肝组织病理仍是诊断的金标准。PBC组织病理主要表现为中小胆管的非化脓性肉芽肿性炎症,一般分4期<sup>[17]</sup>: I期:破坏性胆管炎期; II期:胆管增生期; III期:瘢痕期; IV:肝硬化期。研究中发现,AMA-M<sub>2</sub>抗体阴性与阳性患者肝脏病理改变均有以下特点:(1)胆管改变明显,以小胆管最具特征性(100%),其表现与所处的分期有关;界板胆管亦有类似改变,但无特异性;胆管周围见炎性细胞浸润,以淋巴细胞为主。(2)汇管区细胞浸润现象明显,以淋巴细胞最为重要(100%),甚至形成淋巴滤泡;其他尚可见浆细胞、中性粒细胞等。(3)肝细胞改变相对较轻,缺乏特异性。(4)同一份标本中常可见不同时期的改变,各期改变可相互混杂,如III、IV期标本中,可见胆管破坏、胆管增生等I、II期表现。所以对AMA-M<sub>2</sub>抗体阴性者,病理学检查十分重要。主要意义为:对AMA-M<sub>2</sub>阴性患者有确诊意义;对病程进行分期,从而指导进一步治疗。因而我们临床医生一定要重视病理学检查的作用,尤其对不明原因的肝损伤患者,尽量完善组织学检查。

本研究通过分析22例PBC中AMA-M<sub>2</sub>阴性患者的临床及病理特点得出:AMA-M<sub>2</sub>阴性的PBC患者占一定比例,仍以中老年女性为主;血清指标对AMA-M<sub>2</sub>阴性的患者仍有诊断价值,尤其是ANA;存在AMA-M<sub>2</sub>阳性-阴性变动现象;M<sub>2</sub>抗体阳性与阴性患者临床上无显著差别,二者属于同一种疾病;病理组织学是确诊AMA-M<sub>2</sub>阴性患者的重要检查,同时是分期的重要标准。

## 4 参考文献

- 1 叶维法, 钟振义. 临床肝胆病学. 天津: 天津科学技术出版社, 1998: 813
- 2 Heathcote EJ. Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Diseases practice guidelines. *Hepatology* 2000; 31: 1005-1013
- 3 Sakauchi F, Mori M, Zeniya M, Toda G. A cross-sectional study of primary biliary cirrhosis in Japan: utilization of clinical data when patients applied to receive public financial aid. *J Epidemiol* 2005; 15: 24-28
- 4 Pares A, Rodes J. Natural history of primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis* 2003; 7: 779-794
- 5 姚光弼. 重视原发性胆汁性肝硬化的临床研究. 中华肝病杂志 2002; 10: 325-326
- 6 Invernizzi P, Battezzati PM, Crosignani A, Perego F, Poli F, Morabito A, De Arias AE, Scalapogna M, Zuin M, Podda M. Peculiar HLA polymorphisms in Italian patients with primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2003; 38: 401-406
- 7 Padgett KA, Selmi C, Kenny TP, Leung PS, Balkwill DL, Ansari AA, Coppel RL, Gershwin ME. Phylogenetic and immunological definition of four lipoylated proteins from *Novosphingobium aromaticivorans*, implications for primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 2005; 24: 209-219
- 8 Howel D, Fischbacher CM, Bhopal RS, Gray J, Metcalf JV, James OF. An exploratory population-based case-control study of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2000; 31: 1055-1060
- 9 Neuberger J, Thomson R. PBC and AMA--what is the connection? *Hepatology* 1999; 29: 271-276
- 10 姜小华, 仲人前, 方晓云, 安峰, 胡寅, 汪修平, 孔宪涛. 抗线粒体抗体M2抗原诱导小鼠原发性胆汁性肝硬化模型的建立. 中华肝病杂志 2006; 14: 202-204
- 11 Muratori P, Muratori L, Ferrari R, Cassani F, Bianchi G, Lenzi M, Rodrigo L, Linares A, Fuentes D, Bianchi FB. Characterization and clinical impact of antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 431-437
- 12 Invernizzi P, Podda M, Battezzati PM, Crosignani A, Zuin M, Hitchman E, Maggioni M, Meroni PL, Penner E, Wesierska-Gadek J. Autoantibodies against nuclear pore complexes are associated with more active and severe liver disease in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2001; 34: 366-372
- 13 Czaja AJ, Carpenter HA, Santrach PJ, Moore SB. Autoimmune cholangitis within the spectrum of autoimmune liver disease. *Hepatology* 2000; 31: 1231-1238
- 14 张福奎, 贾继东, 钱林学, 王宇, 崔焱, 欧晓娟, 尹珊珊, 马红, 王宝恩. 抗线粒体抗体阴性原发性胆汁性肝硬化的临床特征. 肝脏 2002; 7: 150-152
- 15 Muratori P, Muratori L, Gershwin ME, Czaja AJ, Pappas G, MacCariello S, Granito A, Cassani F, Loria P, Lenzi M, Bianchi FB. 'True' antimitochondrial antibody-negative primary biliary cirrhosis, low sensitivity of the routine assays, or both? *Clin Exp Immunol* 2004; 135: 154-158
- 16 Masuda J, Omagari K, Matsuo I, Kinoshita H, Sakimura K, Hazama H, Ohba K, Isomoto H, Murase K, Murata I, Kohno S. Changes in titers of antimitochondrial and antinuclear antibodies during the course of primary biliary cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 239-243
- 17 Ludwig J. The pathology of primary biliary cirrhosis and autoimmune cholangitis. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2000; 14: 601-613

## ■同行评价

本研究选题尚可, 对临床医师有较好的参考价值。

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 •

## 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 2009-06-08)



# Belghiti悬挂法在解剖性半肝切除术中的应用

朱新华, 仇毓东, 吴亚夫, 周建新, 江春平, 丁义涛

## ■背景资料

Belghiti *et al* 在 2001 年首先开展的肝脏悬吊法(liver hanging maneuver), 能减少肝脏翻转, 可在未游离肝脏的情况下实现肝脏离断, 结合阻断待切除肝叶的流入道和流出道血管的解剖性半肝切除术能避免保留侧肝脏的缺血再灌注损伤。

朱新华, 仇毓东, 吴亚夫, 周建新, 江春平, 丁义涛, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科 江苏省南京市 210008

作者贡献分布: 此课题由仇毓东与丁义涛设计; 研究过程由朱新华、仇毓东、吴亚夫、周建新及江春平操作完成; 丁义涛全程指导本研究开展; 数据分析由朱新华完成; 本论文写作由朱新华与仇毓东完成。

通讯作者: 仇毓东, 主任医师, 210008, 江苏省南京市, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科. yudongqiu510@hotmail.com  
电话: 025-83304616 传真: 025-83317016  
收稿日期: 2009-02-15 修回日期: 2009-04-29  
接受日期: 2009-05-05 在线出版日期: 2009-06-08

## Belghiti's liver hanging maneuver in anatomic semi-hepatectomy

Xin-Hua Zhu, Yu-Dong Qiu, Ya-Fu Wu, Jian-Xin Zhou, Chun-Ping Jiang, Yi-Tao Ding

Xin-Hua Zhu, Yu-Dong Qiu, Ya-Fu Wu, Jian-Xin Zhou, Chun-Ping Jiang, Yi-Tao Ding, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Dr. Yu-Dong Qiu, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China. yudongqiu510@hotmail.com  
Received: 2009-02-15 Revised: 2009-04-29  
Accepted: 2009-05-05 Published online: 2009-06-08

## Abstract

**AIM:** To explore the feasibility of the use of Belghiti's liver hanging maneuver in anatomic semi-hepatectomy.

**METHODS:** Clinical data of 28 patients undergoing semi-hepatectomy by Belghiti's liver hanging maneuver between March 2005 and December 2008 in our department were compared with those without liver hanging maneuver. The amount of intraoperative bleeding and blood transfusion, liver function recovering and postoperative complications were compared between the two groups.

**RESULTS:** No operative death was found in this study, and the amounts of intraoperative bleeding and transfusion were decreased significantly in the liver hanging maneuver group (426.36 ± 312.79 mL vs 526.58 ± 251.32 mL; 508.13

± 128.26 mL vs 735.13 ± 216.79 mL, both  $P < 0.05$ ). There was no significant difference in the liver function test, postoperative complications and length of hospital-stay between the two groups.

**CONCLUSION:** Liver hanging maneuver is feasible in terms of anatomy and technique. With liver hanging maneuver, semi-hepatectomy may be safer and the intraoperative blood loss is reduced. It also makes the anterior approach for semi-hepatectomy safer and easier.

**Key Words:** Belghiti liver hanging maneuver; Semi-hepatectomy; Retrohepatic tunnel; Inferior vena cava

Zhu XH, Qiu YD, Wu YF, Zhou JX, Jiang CP, Ding YT. Belghiti's liver hanging maneuver in anatomic semi-hepatectomy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(16): 1680-1683

## 摘要

**目的:** 探讨Belghiti悬挂法在解剖性半肝切除术中的应用价值。

**方法:** Belghiti肝脏悬挂法成功行半肝切除术患者28例, 并与未采用Belghiti肝脏悬挂法完成的解剖性半肝切除术患者22例比较, 分析评价患者术中相关指标和术后并发症。

**结果:** 2组患者均无手术死亡, Belghiti悬挂组的术中失血量和输血量均较对照组显著减少 (426.36 ± 312.79 mL vs 526.58 ± 251.32 mL; 508.13 ± 128.26 mL vs 735.13 ± 216.79 mL, 均  $P < 0.05$ )。2组的术后肝功能、并发症发生率、住院时间无显著差异。

**结论:** Belghiti悬挂法可进一步提高半肝切除的安全性, 减少出血, 并且可在先不游离肝脏的情况下完成半肝切除, 更符合肿瘤外科的基本原则。

**关键词:** Belghiti悬挂法; 半肝切除; 肝后隧道; 下腔静脉

朱新华, 仇毓东, 吴亚夫, 周建新, 江春平, 丁义涛. Belghiti悬挂法在解剖性半肝切除术中的应用. *世界华人消化杂志* 2009;

## ■同行评议者

宋振顺, 教授, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科; 吴泰璞, 教授, 山东省立医院肝胆外科

17(16): 1680-1683

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1680.asp>

## 0 引言

Belghiti *et al*<sup>[1]</sup>在2001年首先报道将肝脏悬挂法(liver hanging maneuver)应用于肝切除,其手术关键是切肝前在肝后下腔静脉前壁与肝组织之间引过一悬吊带,提起悬吊带即可使切肝平面离开肝后下腔静脉,这样就可以在未游离肝脏的情况下通过前方入路进行右半肝切除术,在完全离断肝实质之后在肝外结扎肝右静脉,最后游离肝周韧带完成右半肝切除。我科在双阻断(阻断待切除肝叶的流入及流出道)解剖性肝切除的基础上<sup>[2]</sup>,运用Belghiti悬挂法成功完成半肝切除术28例,并将其与我科前期未采用Belghiti悬挂法完成的解剖性半肝切除术病例进行回顾性对比分析,现将结果报道如下。

## 1 材料和方法

1.1 材料 回顾性分析2005-03/2008-12在南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科完成的50例半肝切除患者的临床资料。采用Belghiti悬挂法的前入路半肝切除28例,其中男22例,女6例,中位年龄47.8岁,包括肝细胞癌21例,胆管细胞癌2例,肝门部胆管癌4例,巨大血管瘤1例。常规解剖性半肝切除22例,其中男17例,女5例,中位年龄47.1岁,包括肝细胞癌18例,胆管细胞癌1例,肝门部胆管癌2例,左半肝广泛性肝内胆管结石1例。所有患者术前均行CT检查测定残余肝体积并且进行肝脏血管三维重建,明确门静脉、肝中静脉等重要血管有无解剖变异。

### 1.2 方法

1.2.1 具体操作: 2组患者均首先解剖第一肝门,根据肝切除的范围,结扎、切断需切除肝叶的肝动脉、门静脉分支。仔细分离第二肝门,显露肝右静脉、肝中静脉和肝左静脉之间的肝上静脉间切迹。

Belghiti悬挂组向左上牵拉肝蒂,显露肝下下腔静脉,切开肝下下腔静脉和肝尾状叶之间的后腹膜,并沿肝后下腔静脉和尾状叶间隙向上分离,如果遇到尾叶静脉予以离断结扎。然后再用长止血钳紧贴尾状叶的后方,在下腔静脉前方并沿其中线,在术中B超的引导下小心向头侧肝上静脉陷窝方向分离推进,到达肝上静脉陷窝形成肝后隧道后,用止血钳牵引血管阻断带穿过此隧道,至此肝后绕肝带放置完毕。术中

由第一助手提拉绕肝带并保持一定的张力,使肝脏离开肝后下腔静脉,在绕肝带的指引下沿着肝正中裂,用血管钳钳夹切面肝组织,暴露管道,分别用电灼、结扎、缝扎等方法来处理不同粗细的断面所遇管道。胆管常规在切肝时与Glissonian鞘一起结扎、切断,不预先在肝门处游离。直至下腔静脉前方后切除半肝,最后游离肝周韧带,移走标本。对半肝切除和(或)合并胆囊切除病例,通过胆囊管或左肝管断端插管注入美蓝溶液来检测肝断面是否有胆漏。肝断面不予缝合,热盐水纱布垫敷3-5 min后,小针线8字或U字形缝合大的出血点及胆漏,小的渗血处可用电刀或氩气凝血器处理。于创面处放置腹腔引流。

对照组患者先游离肝脏,显露病侧肝脏。在未放置绕肝提拉带的情况下采用常规解剖性肝切除方法<sup>[2]</sup>行半肝切除。具体切肝方法同Belghiti悬挂组。

1.2.2 术中相关指标的比较和术后处理: 比较Belghiti悬挂组和对照组肝切除术中出血量、输血量、输血率和术后肝功能、并发症发生率、平均住院日。术后常规监测生命指征,吸氧。采用保肝、制酸、抗生素预防感染,以及营养支持等治疗。

**统计学处理** 所有统计资料结果输入Excel表格,计量资料用mean±SD表示,分类变量资料用率表示;计量资料分析采用 $t$ 检验、Cochran近似 $\chi^2$ 检验或Wilcoxon秩和检验,定性资料分析采用卡方检验或Fisher精确概率检验,以双侧 $\alpha = 0.05$ 为检验水准,全部统计分析采用SAS8.0软件实现。

## 2 结果

2.1 患者手术资料 Belghiti悬挂组左半肝切除4例,左半肝联合尾状叶切除3例,右半肝切除20例,右半肝联合尾状叶切除1例;对照组左半肝切除4例,左半肝联合尾状叶切除2例,右半肝切除16例。经统计学处理,2组患者年龄、性别、病程等无统计学差异。

2.2 术中相关指标 Belghiti悬挂组均成功安放绕肝带,未发生肝静脉、下腔静脉和肝短静脉损伤导致的大出血。操作耗时18-29(平均24) min。2组患者均无术中死亡,术中未发生不可控制的大出血。Belghiti悬挂组患者术中失血量和输血量均较对照组显著减少(均 $P < 0.05$ ),2组手术时间相比较无显著差异(表1)。

### ■ 相关报道

研究表明,手术失血量的多少与术后并发症的发生率相关。术中失血少,术后并发症明显减少,而同时因为减少术中输血则可以防止因抑制自身免疫系统而导致的术后肿瘤复发。因此减少术中出血,尽量做到不输血是肝胆肿瘤肝切除术的关键。

### ■应用要点

Belghiti悬挂结合双阻断法可进一步提高解剖性半肝切除的安全性,减少出血,并且可以在先不游离肝脏的情况下完成半肝切除,更符合肿瘤外科的基本原则,具有广阔的临床应用前景。

表 1 Belghiti悬挂组和对照组肝切除手术中相关指标比较

分组	n	手术时间(h)	失血量(mL)	输血量(mL)
Belghiti悬挂组	28	4.65 ± 2.37	426.36 ± 312.79 <sup>a</sup>	508.13 ± 128.26 <sup>a</sup>
对照组	22	4.92 ± 1.67	526.58 ± 251.32	735.13 ± 216.79

<sup>a</sup>P<0.05 vs 对照组。

表 2 Belghiti悬挂组和对照组肝切除术后3 d肝功能指标比较

分组	n	ALT(IU/L)	TBIL(μmol/L)	ALB(g/L)	CHE(μmol/L)
Belghiti悬挂组	28	271.13 ± 161.15	14.69 ± 11.19	35.16 ± 5.78	2.32 ± 1.64
对照组	22	291.43 ± 175.31	15.08 ± 11.64	34.61 ± 6.13	2.12 ± 1.89

2.3 肝功能指标及并发症 2组患者谷丙转氨酶(ALT)、总胆红素(TBIL)、白蛋白(ALB)和胆碱酯酶(CHE)比较均无显著差异(表2)。全组无手术死亡患者。Belghiti悬挂组肝切除术后并发症发生率为50.0%(14/28),对照组肝切除术后并发症发生率为54.5%(12/22),均为轻微并发症。2组比较无统计学差异,并发症经保守治疗后均痊愈出院。Belghiti悬挂组和对照组总住院时间分别为24.6 ± 4.9 d和25.4 ± 5.2 d,术后平均住院时间分别为15.0 ± 6.4 d和14.5 ± 6.2 d,2组比较无显著差异。

### 3 讨论

随着肝正中裂劈开、肝外游离等肝脏外科技术的进步,半肝切除目前已成为一种常规手术。但国内肝胆疾病患者大多合并肝硬化,肝功能代偿能力较差,在这种情况下,肝脏游离过程中的肝脏翻转和肝十二指肠韧带阻断造成的肝脏缺血再灌注损伤增加了术后肝功能衰竭的危险。Belghiti *et al*在2001年首先开展的肝脏悬吊法<sup>[1]</sup>,能减少肝脏翻转,可在未游离肝脏的情况下实现肝脏离断,结合阻断待切除肝叶的流入道和流出道血管的解剖性半肝切除能避免保留侧肝脏的缺血再灌注损伤。

Belghiti悬吊技术的可行性和安全性在于相关的解剖学研究结果,包括:(1)肝左、肝中静脉共干与右肝静脉之间平均距离为1.4 cm;(2)实际分离肝后下腔静脉前间隙的长度约5-6 cm;(3)肝短静脉主要分布于肝后下腔静脉的下1/2区域,且半数以上的标本呈左右二组分布于IVC左右二前侧壁,肝后IVC正前壁略偏右区域是一相对少血管区域<sup>[3]</sup>;(4)在下腔静脉右侧壁常可见到较粗大的右下肝静脉(inferior right hepatic vein,

IRHV),这是分离过程中的一个重要解剖标志,通常需将其平面以下的小静脉予以结扎离断<sup>[4-6]</sup>。

我们成功应用Belghiti悬挂法完成28例半肝切除后体会到该方法具有下列重要意义:(1)Belghiti悬挂法可以将肝脏从中线提起,与肝后下腔静脉分开,充分显露肝断面深部的管道,从而避免断肝时肝后下腔静脉损伤所致的难以控制的大出血和空气栓塞。(2)肝中静脉主干能够得到更好的显露,可以紧贴肝中静脉主干安全地完成半肝切除,不仅避免了肝中静脉主干的损伤,而且保证了半肝切除的彻底性。(3)在绕肝带的指示下,不仅能使肝中裂的劈开更加规则,而且能保证断肝能在最薄、最小的界面进行。(4)提拉绕肝带时不仅对肝断面的肝窦有压迫止血作用,对第一肝门也有部分挤压,因此用该法进行半肝切除可减少出血。

研究表明,手术失血量的多少与术后并发症的发生率相关<sup>[7-9]</sup>。术中失血少,术后并发症明显减少,而同时因为减少术中输血则可以防止因抑制自身免疫系统而导致的术后肿瘤复发。因此减少术中出血,尽量做到不输血是肝胆肿瘤肝切除术的关键<sup>[10-11]</sup>。本组资料中,Belghiti悬挂组的平均失血量为426.36 mL,对照组的平均失血量为526.58 mL,两者有显著性差异( $P<0.05$ );Belghiti悬挂组有16例术中输血,输血率57.14%,对照组有12例术中输血,输血率为54.54%,两者无显著性差异( $P>0.05$ )。但Belghiti悬挂组的平均输血量508.13 mL,而对照组为735.13 mL,两者之间比较有显著性差异( $P<0.05$ )。

与Belghiti悬挂直接相关的常见并发症是在建立肝后隧道过程中损伤肝静脉、下腔静脉和肝短静脉引起的大出血。在本组的28例患者中

虽未出现,但在每次手术中都应防止出现这一危险并发症.我们体会到其预防要点为:肝短静脉主要分布在肝后下腔静脉左右前壁上,故在分离肝后下腔静脉隧道时要在肝后下腔静脉前壁正中分离,以免损伤肝短静脉,造成难以控制的大出血.防止肝静脉损伤的关键是仔细分离第二肝门,尽量清楚显露肝右静脉、肝中静脉和肝左静脉之间的肝上静脉间切迹,便于指引放置肝后绕肝带.术前行肝静脉和下腔静脉CT三维重建,结合术中B超检查能明确肿瘤有无侵犯下腔静脉壁,对于防止下腔静脉损伤具有重要意义.在初期开展该技术时,我们推荐在肝脏游离后行肝后悬吊操作,这样可以在保证安全的前提下,体会该技术的优势.待技术成熟后再于不游离肝脏的情况下放置悬吊带.这对于应用该项技术尚无丰富经验的操作者具有参考价值.

为防止半肝切除术后发生肝功能衰竭等严重并发症,本组患者术前均行ICG清除试验评价肝功能储备,并且结合CT三维重建,测定残余肝体积,作为行解剖性半肝切除的重要筛选指标.同时采用术中B超检测重要血管位置来确定断肝平面,保证残余半肝血供不受明显损害.本组患者中,Belghiti悬挂组肝切除术后并发症发生率为50.0%(14/28),对照组肝切除术后并发症发生率为54.5%(12/22),两者无统计学意义( $P>0.05$ ).并且其并发症以胸腔积液,膈下积液和腹水等轻微并发症为主,2例肝断面少量胆漏的患者经通畅引流约1 wk后均治愈,未发生腹腔大出血、肝功能衰竭等严重并发症. Belghiti悬挂组与对照组比较,住院时间、术后恢复时间均相当,住院总费用也没有明显的增加,因此从时间和经济2方面来比较,2组也无明显差异.因此,Belghiti悬挂法并未增加患者风险和负担,对于患者而言是可以接受的.

总之,Belghiti悬挂结合双阻断法在技术上是安全可行的,该方法可进一步提高解剖性半肝切除的安全性,减少出血,并且可以在先不游离肝脏的情况下完成半肝切除,更符合肿瘤外科的基本原则.

#### 4 参考文献

- 1 Belghiti J, Guevara OA, Noun R, Saldinger PF, Kianmanesh R. Liver hanging maneuver: a safe approach to right hepatectomy without liver mobilization. *J Am Coll Surg* 2001; 193: 109-111
- 2 朱新华, 仇毓东, 丁义涛, 吴亚夫, 周建新, 孙喜太, 徐庆祥. 解剖性肝切除术治疗原发性肝癌的安全性及疗效探讨. *中华消化外科杂志* 2007; 6: 373-376
- 3 Meng WC, Shao CX, Mak KL, Lau PY, Yeung YP, Yip AW. Anatomical justification of Belghiti's 'liver hanging manoeuvre' in right hepatectomy with anterior approach. *ANZ J Surg* 2003; 73: 407-409
- 4 Delattre JF, Avisse C, Flament JB. Anatomic basis of hepatic surgery. *Surg Clin North Am* 2000; 80: 345-362
- 5 Ettorre GM, Vennarecci G, Boschetto A, Douard R, Santoro E. Feasibility of hanging maneuvers in orthotopic liver transplantation with inferior vena cava preservation and in liver surgery. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2004; 11: 155-158
- 6 Akgul E, Inal M, Binokay F, Celiktas M, Aikimbaev K, Soyupak S. The prevalence and variations of inferior right hepatic veins on contrast-enhanced helical CT scanning. *Eur J Radiol* 2004; 52: 73-77
- 7 Benzoni E, Molaro R, Cedolini C, Favero A, Cojutti A, Lorenzin D, Intini S, Adani GL, Baccarani U, Bresadola F, Uzzacu A. Liver resection for HCC: analysis of causes and risk factors linked to postoperative complications. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 186-189
- 8 Benzoni E, Lorenzin D, Favero A, Adani G, Baccarani U, Molaro R, Zompicchiatti A, Saccomano E, Avellini C, Bresadola F, Uzzau A. Liver resection for hepatocellular carcinoma: a multivariate analysis of factors associated with improved prognosis. The role of clinical, pathological and surgical related factors. *Tumori* 2007; 93: 264-268
- 9 Capussotti L, Muratore A, Amisano M, Polastri R, Bouzari H, Massucco P. Liver resection for hepatocellular carcinoma on cirrhosis: analysis of mortality, morbidity and survival--a European single center experience. *Eur J Surg Oncol* 2005; 31: 986-993
- 10 Ercolani G, Grazi GL, Ravaioli M, Del Gaudio M, Gardini A, Cescon M, Varotti G, Cetta F, Cavallari A. Liver resection for hepatocellular carcinoma on cirrhosis: univariate and multivariate analysis of risk factors for intrahepatic recurrence. *Ann Surg* 2003; 237: 536-543
- 11 Eguchi S, Ijtsma AJ, Slooff MJ, Porte RJ, de Jong KP, Peeters PM, Gouw AS, Kanematsu T. Outcome and pattern of recurrence after curative resection for hepatocellular carcinoma in patients with a normal liver compared to patients with a diseased liver. *Hepatogastroenterology* 2006; 53: 592-596

#### ■同行评价

本文条理清晰,分析合理,有自己的见解,研究有较好的临床意义.

编辑 李军亮 电编 何基才

# 内镜联合早期肠内营养治疗急性重症胆源性胰腺炎31例

周文策, 张辉, 李汛, 李玉民, 张磊, 孟文勃, 朱晓亮

## ■背景资料

急性重症胆源性胰腺炎是临床上常见的危急重症, 发病凶险, 病死率高, 临床上治疗十分棘手, 缺乏有效、经济、安全、规范的治疗方案, 肠内营养在治疗急性胰腺炎中的价值已经达成共识, 内镜治疗是近年新的治疗此类疾病的有效方法, 创伤小, 恢复快, 不能耐受手术者亦可使用内镜治疗。

周文策, 张辉, 李汛, 李玉民, 张磊, 孟文勃, 朱晓亮, 兰州大学第一临床医学院 甘肃省兰州市 730000

作者贡献分布: 本课题由周文策和李玉民设计; 研究过程由周文策、张辉、张磊及孟文勃完成; 研究所用实验试剂、仪器、分析工具由周文策提供; 数据分析由李汛、孟文勃及朱晓亮完成; 论文写作由周文策、李汛、李玉民及张辉完成。

通讯作者: 周文策, 副教授, 730000, 甘肃省兰州市, 兰州大学第一医院. zhouwc129@163.com

电话: 0931-8625200-6919

收稿日期: 2009-03-26 修回日期: 2009-04-29

接受日期: 2009-05-05 在线出版日期: 2009-06-08

## Combination of endoscopy and enteric nutrition in treatment of acute severe biliary pancreatitis: an analysis of 31 cases

Wen-Ce Zhou, Hui Zhang, Xun Li, Yu-Min Li, Lei Zhang, Wen-Bo Meng, Xiao-Liang Zhu

Wen-Ce Zhou, Hui Zhang, Xun Li, Yu-Min Li, Lei Zhang, Wen-Bo Meng, Xiao-Liang Zhu, the First Clinical Medicine College of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Correspondence to: Wen-Ce Zhou, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. zhouwc129@163.com

Received: 2009-03-26 Revised: 2009-04-29

Accepted: 2009-05-05 Published online: 2009-06-08

## Abstract

**AIM:** To evaluate the therapeutic efficacy of endoscopy and enteric nutrition (EN) in acute severe biliary pancreatitis at early stage.

**METHODS:** The clinical data of patients, who were admitted in our department from January 2005 to July 2008, were collected and the diagnoses were acute severe biliary pancreatitis (ASBP). Those patients were randomly divided into two groups (E-group and R-group): E-group's treatment protocols were ERCP + EST + ERBD and Enteral Nutritional on early stage; R-group's treatment protocol was orthodox treatment and Total Parenteral Nutrition (TPN) + EN. We compared the dates of two groups in subjective symptoms, signs, chemical examinations, endotoxin of plasma, TNF- $\alpha$ , computed tomography grades, cost of hospitalization, length of hospital

stay. All of dates showed that E group had an advantage in comparison with R group.

**RESULTS:** All patients involved completed our therapy, and received the EN at early stage. Endoscopy and enteric nutrition significantly improved subjective symptoms, clinical signs, laboratory examinations, TNF- $\alpha$ , endotoxin, significantly reduced hospital fees, length of hospital stay.

**CONCLUSION:** Endoscopy and enteric nutrition at early stage is of effectiveness, safe and economic protocol in acute severe biliary pancreatitis.

**Key Words:** Endoscope; Enteral nutrition; Acute severe biliary pancreatitis; Combination therapy

Zhou WC, Zhang H, Li X, Li YM, Zhang L, Meng WB, Zhu XL. Combination of endoscopy and enteric nutrition in treatment of acute severe biliary pancreatitis: an analysis of 31 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(16): 1684-1688

## 摘要

**目的:** 观察内镜联合早期肠内营养治疗急性重症胆源性胰腺炎的临床效果。

**方法:** 对我院2005-2008年收治的急性重症胆源性胰腺炎患者31例行内镜ERCP+EST+ERBD, 同时放置肠内营养管行早期肠内营养, 并与36例常规治疗联合肠内外营养的患者进行比较。分别对患者术后主观症状、临床检查、化验检查、TNF- $\alpha$ 、血清内毒素含量、CT结果、患者总住院费用及住院时间的指标进行比较。

**结果:** 入选患者可顺利完成内镜治疗, 对早期肠内营养能较好的耐受。内镜联合早期肠内营养方案对患者主观症状的改善、临床指征的改善、实验室检查、TNF- $\alpha$ 、内毒素血症、CT结果、患者住院费用、住院时间方面整体优于传统治疗联合肠内外营养组。

**结论:** 内镜联合早期肠内营养治疗急性重症胆源性胰腺炎是安全、有效、经济的治疗方案。

## ■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

**关键词:** 内镜; 肠内营养; 重症胆源性胰腺炎; 联合治疗

周文策, 张辉, 李汛, 李玉民, 张磊, 孟文勃, 朱晓亮. 内镜联合早期肠内营养治疗急性重症胆源性胰腺炎31例. 世界华人消化杂志 2009; 17(16): 1684-1688  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1684.asp

## 0 引言

急性重症胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是临床常见病多发病, 病死率高、治疗花费巨大、住院时间长. 在国内近60%的SAP患者均由胆系疾病所致. 内镜下治疗对胆源性胰腺炎具有重要的临床价值; 重症胰腺炎处于高分解代谢状态, 极易发生营养不良或内环境严重紊乱<sup>[1]</sup>. 因而急性重症胆源性胰腺炎(acute severe biliary pancreatitis, ASBP)的治疗一直是临床上研究的热点问题. 肠内营养(enteral nutritinal, EN)具有并发症少、安全性高、提高机体免疫功能的作用<sup>[2]</sup>. 我院2005-01/2008-07对ASBP患者31例行内镜下逆行胰胆管造影(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)+内镜乳头括约肌切开术(endoscopic sphincterotomy, EST)+内镜胆管塑料支架引流术(endoscopic retrograde biliary drainage, ERBD)联合EN, 观察该方案在患者主观症状、临床指征、实验室检查、CT评分、患者住院费用、住院时间方面的疗效, 并与传统治疗联合肠内外营养组及内镜治疗联合早期EN组比较, 结果如下.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选择我院2005-01/2008-07收治的ASBP患者67例, 男29例, 女38例, 平均年龄 $47.5 \pm 12.9$ 岁. ASBP诊断标准依据中华医学会外科学会胰腺学组2007年制订的方案<sup>[3]</sup>, 所有患者APACHE II积分8-21(平均11.5)分; CT检查发现有胰腺坏死, BalthazarCT分级均属II级.

### 1.2 方法

**1.2.1 分组:** 按照患者是否愿意接受内镜治疗分组为: 内镜联合EN组31例, 男12例, 女19例, 平均年龄 $52.7 \pm 15.4$ 岁; 常规治疗联合肠内外营养组36例, 男16例, 女20例, 平均年龄 $58.3 \pm 13.3$ 岁.

**1.2.2 治疗:** 所有患者入院后均按胰腺炎传统治疗(抗生素、生长抑素、补液、抑酸、胃肠减压、腹腔穿刺引流术等). E组: 治疗方案为ERCP+EST+ERBD联合早期EN, 即在发病72 h以内行早期内镜干预, 同时内镜下放置鼻肠营

养管, 开始EN, 先从水疗法开始, 逐渐过渡至EN乳剂, 热量按 $167 \text{ kJ}/(\text{d}\cdot\text{kg})$ ; R组: 传统治疗+肠内外营养; 以全胃肠外营养(total parenteral nutrition, TPN)治疗逐渐过渡至肠内营养, 先从水疗法开始, 逐渐过渡至肠内营养乳剂, 热量按 $167 \text{ kJ}/(\text{d}\cdot\text{kg})$ .

**1.2.3 指标检测:** 2组患者分别于入院时、第6、12、20天观察以下指标: (1)主观症状(腹痛、腹胀、腹泻、后背部胀痛、发热、恶心、呕吐); (2)指征(上腹部压痛、反跳痛、生命指征、血氧饱和度); (3)化验检查(血尿淀粉酶、血清胆红素、白细胞、血小板、血清钙离子); (4)CT检查结果(住院期间复查CT至少3次); (5)各个时点血清中炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-10, 内毒素含量的测定、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>细胞比值; (6)并发症(胰腺周围脓肿、胰腺周围假性囊肿、腹腔内出血、消化系出血、消化系痿、一个或多个器官功能衰竭); (7)住院时间和费用. 取患者静脉血5 mL, 离心后取血清置于-70℃保存待检. 日立全自动生化分析仪测定血淀粉酶、尿淀粉酶、TBIL、WBC、PLT、钙; 内毒素检测采用鲎试验基质偶氮显色法, 试剂购自上海医药化学研究所. 细胞因子(TNF- $\alpha$ 、IL-10)的检测采用ELISA法, 试剂购自美国Sigma公司. 所有操作均按试剂盒说明书进行. CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>测定采用流式细胞仪检测.

**统计学处理** 采用SPSS13.0统计软件进行统计分析, 数据按照 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 两样本间的比较用 $t$ 检验.

## 2 结果

**2.1 入院时两组临床症状比较** 所有患者入院时均有不同程度的腹痛、腹胀、后背部胀痛、恶心、呕吐; E组70.97%患者体温升高(22/31); R组72.22%患者体温升高(26/36); 两组所有患者均有不同程度的上腹部压痛、反跳痛、肠鸣音减弱, E组22.6%患者生命指证出现异常(7/31); R组27.8%患者存在生命指证异常(10/36); 组间比较无显著的统计学意义.

**2.2 实验室检查** 血清中常规指标结果: 数据表明治疗组血尿淀粉酶在实验组中明显低于常规治疗组, 治疗后第6天开始明显下降, 实验组下降较常规治疗组下降显著; 胆红素在第12天开始明显下降, 实验组下降幅度较常规治疗组明显; 实验组治疗20 d后血尿淀粉酶、胆红素、白细胞、血小板等数据较常规治疗组明显好转( $P < 0.01$ , 表1).

## ■ 研发前沿

急性重症胆源性胰腺炎的治疗目前在临床上缺乏有效、经济、安全的治疗方案, 部分学者倾向于保守治疗, 部分学者倾向于外科手术干预, 处于争论阶段.

## ■ 相关报道

Kalfarentzos *et al* 认为: SAP患者的肠道被长期旷置, 黏膜免疫屏障功能即可能被削弱, 进而诱发肠道细菌和毒素移位, 导致全身感染和脓毒症. 接受EN的急性胰腺炎患者, 在败血症、MODS和重症监护时间方面均有普遍改善, CT评分、APACHE II评分明显下降, 血浆内毒素水平亦明显下降.

### ■创新盘点

本研究首次将内镜联合早期肠内治疗方案作为治疗急性重症胆源性胰腺炎的基本治疗方案。连续4年的治疗经验及数据表明内镜联合早期肠内营养是治疗急性重症胆源性胰腺炎目前最有效、最经济、安全的治疗方案,值得临床上推广。

表 1 血清中常规指标检查结果 (mean ± SD)

		血清AMY(U/L)	尿AMY(U/L)	TBil(umol/L)	WBC( $\times 10^9$ )	PLT( $\times 10^9$ )	钙(mmol/L)
入院时	E组	4362 ± 2043	5766 ± 3379	80.3 ± 40.1	13.5 ± 6.8	145 ± 80.1	1.07 ± 0.66
	R组	3998 ± 1344	5124 ± 2765	110.5 ± 59.0	14.7 ± 8.6	177 ± 98.1	1.24 ± 0.47
第6天	E组	2790 ± 1155	2473 ± 1795	55.1 ± 31.1	12.7 ± 7.1	170 ± 100.1	1.22 ± 0.73
	R组	4362 ± 2043 <sup>a</sup>	5766 ± 3379 <sup>a</sup>	77.5 ± 40.7	15.2 ± 8.4	151 ± 24.1	1.04 ± 0.44
	t值	5.48	7.05				
第12天	E组	1885 ± 952	2107 ± 1379	53.7 ± 55.6	13.7 ± 7.9	150 ± 77.4	1.57 ± 0.88
	R组	3867 ± 2321 <sup>a</sup>	4766 ± 2379	80.9 ± 34.5 <sup>a</sup>	14.7 ± 6.5	122 ± 40.1	1.20 ± 0.51 <sup>a</sup>
	t值	6.47	7.92	4.66			2.98
第20天	E组	762 ± 252	810 ± 369	46.5 ± 21.7	8.5 ± 3.7	178 ± 70.1	1.87 ± 0.78
	R组	1386 ± 263 <sup>a</sup>	3399 ± 582 <sup>a</sup>	69.7 ± 22.9 <sup>a</sup>	18.5 ± 8.2 <sup>a</sup>	104 ± 60.1	1.61 ± 0.41
	t值	14.02	30.75	6.02	9.17		

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs E组.

**2.3 CT检查** 入院后查CT提示胰腺周围明显渗出,胰腺体积增大,胰腺周围脂肪囊液增多,存在胰腺坏死,E组67.7%的患者(21/31)在行早期内镜治疗后同一时点在第2次复查CT时胰腺周围渗出较R组明显减少,能显著影响胆源性重症胰腺炎的病程进展,48.3%的患者(15/31)减轻效果在第3次复查CT时更为明显。

**2.4 并发症** E组有2、1、1名患者分别发生呼吸衰竭、急性肾功能衰竭和胰腺周围脓肿形成,发生率为12.9%;R组有6名患者分别发生呼吸衰竭转ICU治疗,急性肾功能衰竭4例,其中1例死亡。不良事件的发生率30.6%,显著高于E组。

**2.5 住院时间和费用** E组平均住院花费(人民币)为(5 ± 1.76)万元;R组平均住院花费为(8 ± 4.12)万元;E组平均住院时间为21 ± 6 d;R组平均住院时间34 ± 10 d;在ICU住院时间为:E组3 ± 2.2 d,R组6 ± 3.5 d。住院时间及住院费用E组显著好于R组。

**2.6 血清中内毒素、IL-10/TNF- $\alpha$ , CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>细胞数** 内镜治疗+早期EN治疗ASBP是安全有效的,在减轻内毒素血症方面有重要意义,以治疗后第6天比较明显,同时能够较传统治疗+肠内营养组显著降低TNF- $\alpha$ /IL-10的比值,以治疗后第12天较为明显。但对于免疫功能的影响不显著(图1,表2)。

### 3 讨论

ASBP早期及时内镜下治疗行胆道减压,手术时间短,对患者机体内环境影响较小。内镜治疗ASBP,ERCP治疗组的并发症发生率、住院天数及住院费用均明显低于非ERCP治疗组

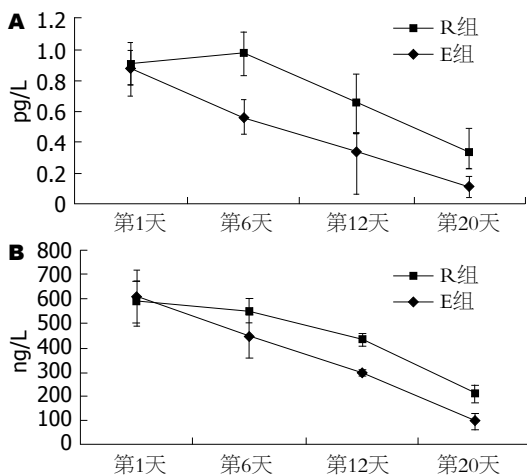
( $P < 0.05$ ),而2组轻症之间的上述指标差异无显著意义<sup>[4-5]</sup>。内镜下治疗避免了手术导致的并发症,降低了手术风险<sup>[6]</sup>。另有研究表明,对非胆源性SAP给予ENBD,也获得比单纯药物治疗更好的疗效。分析其原因,与直接降低胰管内高压有关,这些患者虽部分有胰管梗阻性病变,但绝大多数患者十二指肠乳头有明显充血水肿及开口不畅<sup>[7-8]</sup>。虽然在炎症消退后能够重新恢复通畅,但所需时间显然比EST+ENBD长,理论有必要内镜干预。

肠道不仅是消化吸收器官,其黏膜组织还是十分重要的免疫学屏障,直接的经肠道营养对于维护黏膜免疫屏障的完整性和功能具有重要的意义<sup>[17-19]</sup>。如果SAP患者的肠道被长旷置,黏膜免疫屏障功能即可能被削弱,进而诱发肠道细菌和毒素移位,导致全身感染和脓毒血症。接受EN的急性胰腺炎患者,在败血症、多器官功能衰竭综合征(multiorgan dysfunction syndrome, MODS)和重症监护时间方面均有普遍改善,CT评分、APACHE II评分明显下降,血浆内毒素水平亦明显下降<sup>[21-22]</sup>。EN可刺激细胞内溶酶体向细胞表面移动,减少细胞胰酶的释放,减轻炎症反应,对SAP有直接治疗作用<sup>[23]</sup>。临床研究证实,SAP患者入院后48 h内进行EN,安全和有效。虽然多数患者在开始肠内营养早期出现不同程度的腹胀,部分患者还出现腹泻、呕吐并伴有腹部隐痛,但经对症处理均可控制,随着支持时间的延长和营养素的调整,症状均逐渐消失。EN相对低廉的费用和较短的住院时间也具有明显优势。

ASBP的临床治疗,内镜治疗联合早期EN具

表 2 血清中内毒素、IL-10、TNF- $\alpha$ 及CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>细胞数检测结果 (mean  $\pm$  SD)

		入院时	第6天	第12天	第20天
内毒素 (ng/L)	E组	0.87 $\pm$ 0.17	0.56 $\pm$ 0.11	0.34 $\pm$ 0.28	0.11 $\pm$ 0.07
	R组	0.90 $\pm$ 0.20	0.97 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	0.65 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	0.33 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>
	t值	0.9375	18.64	7.56	10.48
CD细胞 (CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> )	E组	1.35 $\pm$ 0.09	1.51 $\pm$ 0.05	1.66 $\pm$ 0.07	1.98 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
	R组	1.44 $\pm$ 0.07	1.41 $\pm$ 0.06	1.61 $\pm$ 0.05	1.69 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
	t值	6.47	10.52	4.54	21.01
TNF- $\alpha$ (ng/L)	E组	604 $\pm$ 112	443 $\pm$ 89	297 $\pm$ 13.3	97 $\pm$ 32
	R组	589 $\pm$ 87	550 $\pm$ 49	432 $\pm$ 25.0	210 $\pm$ 37
	t值	0.86	8.62	39.02	18.89
IL-10	E组	161.6 $\pm$ 24.7	180.4 $\pm$ 35.5	124 $\pm$ 27.3	144 $\pm$ 40
	R组	155.1 $\pm$ 31.1	143.2 $\pm$ 56.3	127 $\pm$ 42.1 <sup>a</sup>	116.3 $\pm$ 18 <sup>a</sup>
	t值	1.42	4.57	0.48	5.16

<sup>a</sup>P<0.05 vs E组.图 1 入院后E组血清内TNF- $\alpha$ 和内毒素的变化规律. A: 内毒素; B: TNF- $\alpha$ .

有良好的应用前景. 早期的内镜治疗不仅可以明显减轻胆道的压力, 解除胆道梗阻, 通畅引流, 并且具有创伤小, 费用低, 手术时间短, 患者恢复快等优点<sup>[24]</sup>. 联合早期EN治疗, 减轻内毒素血症, 减少细菌移位, 保护肠黏膜屏障, 降低腹腔内并发症的发生具有十分重要的意义. 在放置ENBD/ERBD的同时可留置导丝, 在导丝引导下放置鼻肠营养管, 既经济又快速, 位置确切可靠. 本研究中接受E组治疗患者多能很好耐受静脉复合麻醉下内镜治疗, 尽管部分患者在EN开始时有腹胀、腹痛等不适, 但主观感觉、指征、血清淀粉酶、内毒素水平、TNF- $\alpha$ 水平均显著优于R组, 表明早期内镜治疗联合早期EN可减轻肠源性内毒素血症, 明显改善患者症状指征, 明显降低患者住院费用及住院时间, 是目前治疗急性重症胆

源性胰腺炎有效、经济的治疗方案.

#### 4 参考文献

- 1 吴阶平, 裘法祖. 黄家驷外科学. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 120-122
- 2 Imrie CW, Carter CR, McKay CJ. Enteral and parenteral nutrition in acute pancreatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; 16: 391-397
- 3 中华医学会外科学分会胰腺外科学组. 重症急性胰腺炎诊治指南. *中华外科杂志* 2007; 45: 727-729
- 4 Neuhaus H. Therapeutic pancreatic endoscopy. *Endoscopy* 2004; 36: 8-16
- 5 周鸣清, 李能平, 陆仁达. 急性胆源性胰腺炎的十二指肠镜治疗. *中华普通外科杂志* 2000; 15:
- 6 缪林, 范志宁, 季国忠, 文卫, 刘政, 黄光明, 蒋国斌, 吴萍. 急性胆源性胰腺炎早期内镜治疗52例. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2006-2008
- 7 王自法, 潘承恩, 刘绍浩. 重症急性胰腺炎发病机理研究进展. *中华普通外科杂志* 1999; 14: 144-146
- 8 胡兵, 陈平, 唐承薇. 内镜联合药物治疗急性重症胰腺炎153例临床分析. *中国实用内科杂志* 2007; 27: 441-443
- 9 Nitsche R, Folsch UR. Role of ERCP and endoscopic sphincterotomy in acute pancreatitis. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 1999; 13: 331-343
- 10 González-Huezo MS, Jeréz-González L, Bobadilla-Díaz J, Robles-Díaz G, Uscanga L. [Endoscopic cholangiography in mild acute biliary pancreatitis: when and for whom?] *Rev Gastroenterol Mex* 2002; 67: 87-92
- 11 Hagenmüller F, Keuchel M. [Acute pancreatitis. Early elective endoscopic intervention] *Chirurg* 2000; 71: 265-268
- 12 覃华, 程继华, 侯伟, 李荣香, 赵秋, 刘南植. 经内镜治疗急性胆源性胰腺炎临床疗效/费用分析. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2517-2519
- 13 Acosta JM, Rossi R, Galli OM, Pellegrini CA, Skinner DB. Early surgery for acute gallstone pancreatitis: evaluation of a systematic approach. *Surgery* 1978; 83: 367-370
- 14 张圣道, 韩天权, 汤耀卿. 重症急性胰腺炎临床新技术. 北京: 人民军医出版社, 2002: 68-69
- 15 施伟斌, 王雪峰, 张文杰, 董平. 经内镜治疗急性胆

#### ■应用要点

本文证明内镜联合早期肠内营养治疗重症胆源性胰腺炎是安全、有效的, 即使在发病72 h内进行治疗也是可行的, 但应充分认识到胰腺炎治疗的个体化差异, 循序渐进的治疗最为合理.



### ■同行评价

本文设计严谨, 结果客观, 讨论充分, 对临床医师有很高的指导价值。

- 源性胰腺炎80例临床报告. 中国内镜杂志 2006; 12: 692-694
- 16 周文策, 李玉民, 李汛, 曹农, 朱有全, 孟文勃, 张磊, 陈昊. 内镜治疗急性胆源性胰腺炎的临床价值. 腹部外科 2005; 18: 209-210
- 17 Bengmark S. Gut microenvironment and immune function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1999; 2: 83-85
- 18 Brandtzaeg P, Halstensen TS, Kett K, Krajci P, Kvale D, Rognum TO, Scott H, Sollid LM. Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 1989; 97: 1562-1584
- 19 McClave SA, Greene LM, Snider HL, Makk LJ, Cheadle WG, Owens NA, Dukes LG, Goldsmith LJ. Comparison of the safety of early enteral vs parenteral nutrition in mild acute pancreatitis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1997; 21: 14-20
- 20 Meier RF, Beglinger C. Nutrition in pancreatic diseases. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 507-529
- 21 Abou-Assi S, Craig K, O'Keefe SJ. Hypocaloric jejunal feeding is better than total parenteral nutrition in acute pancreatitis: results of a randomized comparative study. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2255-2262
- 22 Kalfarentzos F, Kehagias J, Mead N, Kokkinis K, Gogos CA. Enteral nutrition is superior to parenteral nutrition in severe acute pancreatitis: results of a randomized prospective trial. *Br J Surg* 1997; 84: 1665-1669
- 23 McClave SA, Snider H, Owens N, Sexton LK. Clinical nutrition in pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 2035-2044
- 24 周文策, 李玉民, 李汛, 孟文勃, 张磊, 陈昊. 十二指肠镜、腹腔镜和胆道镜联合治疗胆道结石. 中国内镜杂志 2006; 12: 570-571

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 •

## 2009年广东省中西医结合、中医脾胃消化病学术会议暨国家级继续教育项目消化病进展研讨班征文通知

本刊讯 由广东省中西医结合学会脾胃消化病专业委员会, 广东省中医药学会消化病专业委员会主办的2009年脾胃消化病学术会议暨国家级继续教育项目消化病进展研讨班将于2009-09-25/27在广东省广州市召开, 现将会议征文有关事项通知如下:

#### 1 征稿内容

中西医结合、中医治疗消化系统疾病的基础理论研究、临床经验总结、诊治的新进展, 名老中医、西医和中西医结合专家个人诊治特色总结。

#### 2 征稿要求

论文资料务必真实可靠, 书写规范, 简明扼要, 每篇以3000字以内为宜, 并附800字左右的摘要1份; 来稿请用电脑打印, 用word软件编入, 并附软盘, 或发送电子邮件, 文稿中请注明作者姓名、单位、通讯地址、邮政编码及联系电话. 截稿日期: 2009-07-30

#### 3 交流方式

专题报告、论文宣读与讨论答疑相结合. 入选论文并参会者给予记 I 类学分6分, 另外将择优编入《现代消化及介入诊疗》杂志. 参加继续教育研讨班者另给予国家级一类学分12分。

#### 4 投稿地址

(1)E-mail: zhangwdcn@163.com; (2)全文、摘要并附软盘寄至广东省广州市广州大道北1838号南方医院消化编辑部罗永华同志(邮编: 510105); 并注明脾胃消化病学术会议投稿. 无论文者也欢迎参会或报名参加研讨班。

#### 5 联系方式

姚永莉, 510105, 广东省广州市广州大道北1838号, 南方医院消化内科, 电话: 13189096556

## 肠型白塞氏病临床病理特征分析3例

张淑坤, 王建国, 周世英, 张梦岚, 吴彩虹

张淑坤, 王建国, 周世英, 张梦岚, 吴彩虹, 青海省人民医院  
病理科 青海省西宁市 810007

作者贡献分布: 此课题由张淑坤与王建国设计; 研究过程由周世英、张梦岚及吴彩虹完成; 本论文写作由张淑坤、王建国、周世英、张梦岚及吴彩虹完成。

通讯作者: 张淑坤, 主治医师, 810007, 青海省西宁市, 青海省人民医院病理科. zhangshukun0475@yahoo.com.cn

电话: 0971-8066214

收稿日期: 2009-03-02 修回日期: 2009-04-11

接受日期: 2009-04-13 在线出版日期: 2009-06-08

### Clinicopathological features of intestinal Behcet's disease: an analysis of 3 cases

Shu-Kun Zhang, Jian-Guo Wang, Shi-Ying Zhou, Meng-Lan Zhang, Cai-Hong Wu

Shu-Kun Zhang, Jian-Guo Wang, Shi-Ying Zhou, Meng-Lan Zhang, Cai-Hong Wu, Department of Pathology, Qinghai Province People's Hospital, Xining 810007, Qinghai Province, China

Correspondence to: Shu-Kun Zhang, Department of Pathology, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810007, China. zhangshukun0475@yahoo.com.cn

Received: 2009-03-02 Revised: 2009-04-11

Accepted: 2009-04-13 Published online: 2009-06-08

### Abstract

**AIM:** To explore the clinical and pathological features, and differential diagnosis of intestinal Behcet's disease (BD).

**METHODS:** Three cases of intestinal BD were collected in the study. Their clinical and histological findings were examined. The patients met the diagnostic criteria proposed by the international study group of BD. The patients had gastrointestinal symptoms and were accompanied by several main BD features.

**RESULTS:** The intestinal ulcers of BD mostly occurred in the contralateral of mesenteric, round and deep. Histologically, vascular and mucosa around intestinal ulcer were infiltrated by the lymphocytes. Lymphoproliferation was observed, and mainly manifested as vasculitis. Glucocorticoid and immunosuppressant were the dominant prescriptions. The prognosis of intestinal BD remained unsatisfactory.

**CONCLUSION:** Early diagnosis of intestinal BD depends on comprehensive analysis of patients' history and clinical symptoms. There is lack of specific treatment for Intestinal BD. General surgery is unnecessary with the exception of severe complications.

**Key Words:** Intestinal Behcet's disease; Clinical features; Pathological features

Zhang SK, Wang JG, Zhou SY, Zhang ML, Wu CH. Clinicopathological features of intestinal Behcet's disease: an analysis of 3 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(16): 1689-1692

### 摘要

**目的:** 探讨肠型白塞氏病的临床特点、病理学特征及鉴别诊断要点。

**方法:** 收集肠型白塞氏病确诊患者3例, 进行临床资料复习和组织病理学检查。患者均以消化系症状入院, 同时患者伴有白塞氏病的主要临床症状。

**结果:** 患者溃疡病变多发生于肠系膜附着的对侧, 溃疡呈圆形, 较深; 镜下见肠黏膜组织溃疡形成, 周围黏膜下淋巴组织增生显著, 主要表现以静脉为主的血管炎症。治疗上, 糖皮质激素及免疫抑制剂是基础用药, 其预后不令人满意。

**结论:** 肠型白塞氏病早期诊断有赖于对病史及临床症状的综合分析。肠型白塞氏病无特异性治疗方法, 除非合并严重并发症, 一般不主张手术治疗。

**关键词:** 肠型白塞氏病; 临床特点; 病理特点

张淑坤, 王建国, 周世英, 张梦岚, 吴彩虹. 肠型白塞氏病临床病理特征分析3例. *世界华人消化杂志* 2009; 17(16): 1689-1692  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1689.asp>

### 0 引言

白塞氏病(Behcet's disease)是一种原因不明的多系统损害性疾病, 该病以血管炎为病理基础, 具

### ■背景资料

白塞氏是一种原因不明的多系统损害性疾病, 合并肠道溃疡者又称为肠白塞氏病, 为白塞氏病的特殊类型。近年本病报道呈上升趋势, 为提高病理及临床医师对本病的认识, 减少漏诊、误诊率, 本文探讨其临床特点、病理学特征及鉴别诊断要点。

### ■同行评议者

张晓岚, 教授, 河北医科大学第二医院消化内科

### ■应用要点

肠型白塞氏病无特异性治疗方法,柳氮磺吡啶及免疫抑制剂仍是目前治疗该病的首选药物.除合并严重并发症,一般不主张手术治疗.

有一定的遗传因素,病情呈反复发作、缓解交替过程.白塞氏病以同时或先后发生的口腔黏膜溃疡以及眼、生殖器、皮肤病理损害为主要临床特征<sup>[1]</sup>,也可以累及其他器官.白塞氏病合并肠道溃疡者又称为肠型白塞氏病,为白塞氏病的特殊类型.为提高病理及临床医师对本病的认识,减少漏诊、误诊率,本文探讨其临床特点、病理学特征及鉴别诊断要点.

## 1 材料和方法

1.1 材料 收集青海省人民医院和青海省湟源县人民医院2007-2008年确诊肠型白塞氏病3例.本组患者均为男性,年龄26-38(平均年龄33)岁,病程0.5-8年.本组病例均符合1990年白塞氏病国际研讨会提出的诊断标准<sup>[2]</sup>.

1.2 方法 3例患者手术切除标本均经100 g/L中性甲醛溶液固定,肉眼进行病变大体观察,对病变部位取材.标本经过脱水后石蜡包埋,经常规切片、HE染色,进行普通光镜下观察.

## 2 结果

2.1 临床表现 3名患者均以消化系症状收治入院,主要症状是右下腹痛,其中1例以右下腹肠痿就诊.3名患者在入院后进行问诊和查体时均发现口腔黏膜、阴囊皮肤溃疡病变及皮肤结节性红斑.部分患者针刺实验阳性、下肢关节疼痛和低热.具体情况见表1.

2.2 肉眼观察 黏膜溃疡病变均发生在回盲部及其附近,均为多发溃疡,其中1例为双溃疡.溃疡多发生于肠系膜附着的对侧.双溃疡患者在回盲部见一5.0 cm×4.0 cm巨大深溃疡,黏膜坏死,质地较硬,距离大溃疡25 cm回肠处见一1.0 cm×0.8 cm较小而浅溃疡.另外2例患者在回盲部、回肠和升结肠上见多个小溃疡,溃疡底部呈椭圆形或不规则形相对孤立,互不融合,溃疡深而小,黏膜向溃疡集中,溃疡的周边隆起.溃疡呈圆形,较深,相对独立是肠型白塞氏病的特点,但是单凭溃疡的形态与肠道其他炎性溃疡难以区分.

2.3 光镜观察 手术前纤维肠镜活组织病理检查均提示黏膜组织非特异性的急、慢性炎症,黏膜下肉芽组织形成及淋巴组织增生.病变部位血管增多,管壁增厚,伴血管炎表现.

手术标本镜下可见溃疡处肠黏膜糜烂、坏死,周围黏膜下淋巴组织增生显著(图1A),造成周围黏膜组织隆起,黏膜固有层和黏膜下组织内淋巴组织增生,但未见到典型的肉芽肿性病

变.坏死黏膜下可以有肉芽组织形成,长期病变可以发生纤维结缔组织增生伴透明变性(图1B).血管病变以静脉为主,动脉相对较少受累.主要以黏膜下较深层组织的血管,特别是静脉周围淋巴细胞、单核细胞浸润为主(图1C).溃疡越深,血管病变越明显,但长期病变血管炎性病反而减轻.在一些肠黏膜微小溃疡或糜烂处,黏膜下血管可以发生较严重的炎症病变,而且血管壁增厚,血管内皮严重肿胀.而无溃疡的肠黏膜,多见不到明显血管炎性变化.

2.4 治疗与随访 本组病例中有2例分别随访3 mo和1.5年后显示柳氮磺吡啶和免疫抑制剂治疗有效缓解症状,病情稳定,对溃疡愈合效果良好;另外1例随访4 mo则表现为激素和免疫抑制剂治疗无效,而且出现了其他器官损害(表1).

## 3 讨论

1937年Behcet描述了一种以复发性口腔溃疡、生殖器溃疡、眼炎为特征的综合征,并命名为白塞氏病.1958年Behcet通过对白塞氏病患者消化系的系统观察和研究,提出肠型白塞氏病.肠型白塞氏病常表现为一种血管炎,局部损害为穿凿样溃疡,可孤立存在或多发,病变常发生于回盲部,可出现肠出血,穿孔或感染性休克.肠型白塞氏病临床少见,近年有关胃肠型白塞氏病的报道逐渐增多.该病临床表现复杂多样,缺乏特异性.研究发现,腹痛是其最常见的症状,也有以消化系出血、穿孔和肛周脓肿为首发表现者<sup>[3-5]</sup>.白塞病的发病机制不明,有报道显示白塞氏病与人白细胞抗原-B5阳性有关<sup>[6]</sup>,不排除感染、免疫及遗传因素参与.

肠型白塞氏病患者中出现消化系统症状者所占比例、好发年龄和男女比例报道不一致.主要症状为右下腹痛、腹部包块、腹部胀满、暖气、呕吐、腹泻、便血等.严重者表现为肠出血、肠麻痹、肠穿孔、瘘管形成等.本组病例中有2例是因右下腹痛、腹部包块收住入院,另外1例因右下腹肠痿入院.本组病例都曾因右下腹痛被诊断为慢性阑尾炎并行阑尾切除手术,其中2例在手术中发现回盲部溃疡而部分切除回盲部,但是由于基层医院诊疗水平有限而未正确诊断.3例患者除消化系症状外均有白塞氏病的其他主要表现,如反复口腔溃疡、生殖器溃疡、皮肤结节性红斑及反复发热等,距离胃肠道症状出现的时间不等,本组第3例患者在儿童时期就有反复发作的口腔溃疡.这些白塞氏

表 1 3例肠型白塞氏病病例临床资料

病例	性别	年龄	消化系统症状	其他主要表现	随访
1	男	34	右下腹痛	口腔黏膜和阴囊皮肤溃疡, 背部皮肤结节性红斑, 下肢关节疼痛, 针刺实验阳性	随访4 mo, 治疗效果不佳, 出现关节疼痛症状
2	男	36	右下腹肠瘘	口腔黏膜和阴囊皮肤溃疡, 皮肤结节性红斑, 针刺实验阳性	随访3 mo, 治疗效果满意
3	男	26	右下腹痛	低热, 口腔黏膜和阴茎皮肤溃疡, 皮肤结节性红斑	随访1.5年, 治疗效果满意

#### 同行评价

本文作者收集3例肠型白塞氏病, 主要对肉眼观察的大体形态和光镜下的表现进行描述, 并对治疗进行了跟踪, 诊治规范, 对提高该疾病的临床认识有一定帮助。

病的症状中口腔黏膜溃疡及外阴部溃疡最为常见。纤维肠镜和手术标本可见回盲部有边缘清楚的圆形或近似圆形的多个溃疡。手术后病理医师结合病理表现, 经仔细询问病史, 发现本组患者均有白塞氏病的其他主要表现, 诊断肠型白塞氏病。

肠型白塞氏病以回肠和结肠病变最常发生, 特别是在回肠远端和回盲部, 少数病变也可累及升结肠。病变主要表现为黏膜溃疡, 典型溃疡多位于回盲部, 溃疡呈圆形, 深而呈穿凿状, 周围黏膜略隆起。回肠溃疡多较回盲部溃疡小而浅, 常多发, 黏膜向溃疡集中。溃疡部位和大体形态具有一定特点, 但是单凭溃疡的形态与回盲部单纯溃疡难以区分。

组织学表现为黏膜非特异性炎症及血管炎。以往研究认为这种黏膜和血管病变与克罗恩病、溃疡性结肠炎的病理改变基本上无太大差异。通过对本组病例的观察发现, 血管病变以静脉为主, 动脉相对较少受累。长期病变处黏膜下血管炎一般不明显, 主要以淋巴组织增生和肉芽组织修复为主; 在一些微小溃疡或糜烂肠黏膜的黏膜下血管可以见到大、小血管的炎症病变; 而无肠黏膜病变处黏膜下血管多无炎性改变。

肠型白塞氏病与其他炎性肠病造成的溃疡鉴别诊断困难, 早期诊断有赖于对病史及临床症状的综合分析。肠型白塞氏病易误诊为阑尾炎或溃疡性结肠炎、克隆氏病等炎症性肠病。对炎性肠病应重视病史的追问和详细的全身查体, 包括进行专科会诊。另外, 对回盲部圆形、较深溃疡的患者和病理提示肠黏膜慢性炎症伴血管炎的患者应考虑该病, 对于并发口腔、外阴溃疡的患者更应高度怀疑肠型白塞氏病, 仔细查体避免误诊。

肠型白塞氏病无特异性治疗方法, 柳氮磺吡啶及免疫抑制剂仍是目前治疗该病的首选药物。除合并严重并发症, 一般不主张手术治疗。本病目前尚无公认的有效根治办法。多种药物均有

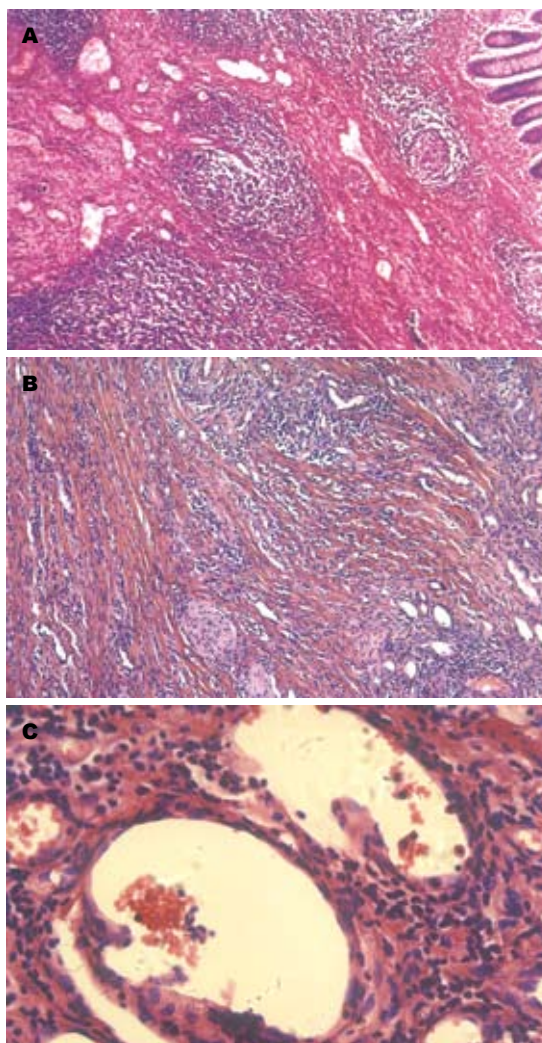


图 1 溃疡组织镜下观。A: 溃疡组织周围黏膜下淋巴组织增生, 血管扩张; B: 溃疡组织内纤维组织增生, 间质炎细胞浸润; C: 溃疡组织深层静脉周围淋巴细胞、单核细胞浸润。

效, 但停药后大多易复发。治疗的目的在于控制现有症状, 防治重要脏器损害, 减缓疾病进展。

#### 4 参考文献

- 1 Kalkamani VG, Vaiopoulos G, Kaklamanis PG. Behcet's disease. *Semin Arthritis Rheum* 1998; 27: 197-217
- 2 International Study Group for Behcet's Disease. Criteria for diagnosis of Behcet's disease. *Lancet*

- 1990; 335: 1078-1080
- 3 Fujita H, Kiriya M, Kawamura T, Li T, Takegawa S, Dohba S, Kojima Y, Adachi H, Morimoto H, Kobayashi A, Watanabe K. Massive hemorrhage in a patient with intestinal Behcet' disease: report of a case. *Surg Today* 2002; 32: 378-382
- 4 Turan M, Sen M, Koyuncu A, Aydin C, Arici S. Sigmoid colon perforation as an unusual complication of Behcet's syndrome: report of a case. *Surg Today* 2003; 33: 383-386
- 5 Haller C, Guenot C, Odman M, Bruttin JM, Rosso R. [Recurrent anal abscess and cecal perforation as a first presentation of Behcet's disease] *Gastroenterol Clin Biol* 2003; 27: 940-943
- 6 Yazici H, Yurdakul S, Hamuryudan V. Behcet's disease. *Curr Opin Rheumatol* 1999; 11: 53-57

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 •

## 第九届全国消化系恶性病变介入诊疗研讨会暨内镜 / 介入新技术论坛征文通知

**本刊讯** 为满足临床一线医师对消化系病变介入新技术研究、探讨和交流的欲望, 进一步提升国内消化系疾病尤其是消化系恶性病变介入诊治的技术水平, 上海同仁医院联合河南省人民医院以及河南省新乡医学院第一附属医院, 定于2009-11-06/11在河南省新乡市主办第九届全国消化系恶性病变介入诊疗研讨会暨内镜/介入新技术论坛. 本次会议由河南省抗癌协会、河南省消化内镜学会、河南省医学会介入治疗专业分会具体承办, 《中华放射学杂志》、《中华消化内镜学杂志》、《世界胃肠病学杂志》、《介入放射学杂志》、《微创医学杂志》以及《医学信息内外科学杂志》共同参与协办. 会议将着重介绍消化系病变内镜治疗、介入放射学治疗、肿瘤内外科治疗的新理论、新技术和新方法, 为各相关交叉学科之间的相互交流和研讨搭建一个平台. 本次会议拟安排相关学科的著名专家围绕食管、胆管、胃肠道等消化系管腔内支架治疗应用技术和发生的问题以及消化系病变、门静脉高压、胆道结石等疾病的消化内镜、介入放射、内外科治疗新进展等热点课题进行精彩演讲及深入研讨. 会议还将邀请美国、德国和韩国专家介绍相关领域的技术进展并安排内容丰富的手术演示. 参会者将授予国家级一类继续医学教育学分10分.

### 1 征文内容

(1)消化系恶性病变内镜治疗、介入放射治疗、外科治疗、肿瘤化学治疗、生物治疗及免疫治疗等; (2)消化系良性病变, 如: 门静脉高压、胆管结石、消化系出血等的内镜及介入新技术应用; (3)消化系疾病诊治前沿交叉学科与消化介入诊治新技术相关的论著、文献综述、临床经验、个案报告等各类稿件.

### 2 投稿要求

(1)专题讲座由组委会约稿, 也可自荐, 需全文; (2)论著需1000字以内的标准论文摘要, 包括目的、方法、结果与结论四要素. 经验交流、短篇报道等全文限1000字以内; (3)所有稿件内容应科学、创新、实用、数据准确, 书写规范, 稿件应是未发表过的论文. 优秀论文将安排在国家级杂志上发表. (4)所有稿件一律要求电脑打印(Word格式), 邮寄者需附软盘, 特别鼓励用E-mail投稿(以附件Word格式); (5)截稿日期: 2009-09-31.

### 3 联系方式

杨瑞民, 453100, 河南省卫辉市健康路88号, 新乡医学院第一附属医院介入科. y-rmin@163.com, 电传: 0373-4402942, 手机: 13903805978

梁宝松, 450003, 河南省郑州市纬五路7号, 河南省人民医院内镜科. lbaosong@hotmail.com, 电话: 0371-65063502

# 10日序贯疗法治疗幽门螺杆菌感染39例

胡水清, 张玫

胡水清, 张玫, 首都医科大学宣武医院消化科 北京市 100053  
作者贡献分布: 此课题由胡水清设计; 研究过程胡水清操作完成并负责统计分析解释数据及论文撰写; 张玫对此研究提供指导及行政、技术支持, 对文章的知识性内容作批评性审阅。  
通讯作者: 胡水清, 主治医师, 100053, 北京市宣武区长椿街45号, 首都医科大学宣武医院消化科, wangrongxin@sina.com  
收稿日期: 2009-03-11 修回日期: 2009-04-10  
接受日期: 2009-04-13 在线出版日期: 2009-06-08

## A 10-day sequential therapy for *Helicobacter pylori*-infected patients: an analysis of 39 cases

Shui-Qing Hu, Mei Zhang

Shui-Qing Hu, Mei Zhang, Department of Gastroenterology, Xuanwu Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100053, China  
Correspondence to: Shui-qing Hu, Department of Gastroenterology, Xuanwu Hospital, Xuanwu Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100053, China. wangrongxin@sina.com  
Received: 2009-03-11 Revised: 2009-04-10  
Accepted: 2009-04-13 Published online: 2009-06-08

### Abstract

**AIM:** To determine whether the sequential therapy is better than the standard triple-drug therapy in treatment of *H pylori* infection for adults with chronic gastritis and peptic ulcer.

**METHODS:** Seventy-nine patients with *H pylori* positive were randomly divided two groups. Thirty nine patients received a 10-day sequential therapy [esomeprazole (20 mg, twice daily) plus amoxicillin (1000 mg, twice daily) for the first 5 days, followed by esomeprazole (20 mg), clarithromycin (500 mg) and tinidazole (500 mg) twice daily for the remaining 5 days]. Forty patients received a 7-day triple therapy [esomeprazole (20 mg), clarithromycin (500 mg) and amoxicillin 1000 mg, twice daily]. *H pylori* eradication was checked four weeks after treatment using <sup>13</sup>C-urea breath test.

**RESULTS:** The eradication rate of the 10-day sequential therapy was 94.87%, and merely 77.50% for the control group. The difference between the two groups was significant ( $\chi^2 = 4.97, P <$

0.05). There was no difference in incidence of side effects between the two groups ( $\chi^2 = 0.05, P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The 10-day sequential therapy achieves a higher eradication rate than the standard triple therapy for the first time in adults. It is an effective, safe and economical option for patients and possesses great potential.

**Key Words:** Sequential therapy; *Helicobacter pylori*; Triple therapy; Eradication rate

Hu SQ, Zhang M. A 10-day sequential therapy for *Helicobacter pylori*-infected patients: an analysis of 39 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(16): 1693-1695

### 摘要

**目的:** 比较埃索美拉唑、阿莫西林、克拉霉素、替硝唑组成的10日序贯疗法与标准三联疗法根除幽门螺杆菌(*H pylori*)的疗效。

**方法:** 将我院经胃镜检查确诊为慢性胃炎和消化性溃疡且*H pylori*阳性的患者79例随机分为2组, 治疗组(39例)方案: 前5 d, 埃索美拉唑20 mg+阿莫西林1000 mg, 每日2次; 后5 d, 埃索美拉唑20 mg+克拉霉素500 mg+替硝唑500 mg, 每日2次。对照组(40例)标准三联疗法: 埃索美拉唑20 mg+克拉霉素500 mg+阿莫西林1000 mg, 每日2次, 疗程7 d。所有患者停药4 wk后复查<sup>13</sup>C呼气试验, 判断*H pylori*根除率。

**结果:** 治疗组*H pylori*根除率为94.87%, 对照组77.50%, 2组比较差异具有统计学意义( $\chi^2 = 4.97, P < 0.05$ ), 且序贯疗法并未增加患者的经济负担。2种方案不良方应的发生率无明显差异( $\chi^2 = 0.05, P > 0.05$ )。

**结论:** 10日序贯疗法治疗*H pylori*感染明显优于7日标准三联疗法, 是一种安全、经济、有效的方案选择。

**关键词:** 序贯疗法; 幽门螺杆菌; 三联疗法; 根除率

胡水清, 张玫. 10日序贯疗法治疗幽门螺杆菌感染39例. 世界华

### 背景资料

幽门螺杆菌(*H pylori*)感染与胃炎、消化性溃疡、胃癌和胃黏膜相关淋巴瘤的发病密切相关, 应予以根除。然而由于甲硝唑和克拉霉素耐药的流行, 7日标准三联疗法获得的*H pylori*根除率明显下降, 因此, 寻找一个新的治疗方案迫在眉睫。目前发现10日序贯疗法根除*H pylori*取得较好效果。

### 同行评议者

白爱平, 副教授, 南昌大学第一附属医院消化内科; 刘改芳, 主任医师, 河北医科大学第三医院消化内科

### ■研究前沿

序贯疗法在国外,主要是在意大利研究较多,在成人及儿童根治 *H pylori* 方面均取得非常好的效果.目前在意大利10日序贯疗法被给予了标准7日三联疗法同等地位,作为了一线治疗方案.

人消化杂志 2009; 17(16): 1693-1695  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1693.asp

## 0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)感染是胃炎和其他相关性疾病(胃溃疡、十二指肠溃疡、胃癌和胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤)的主要病因<sup>[1]</sup>. *H pylori*根除的经典一线方案为标准三联疗法,包括质子泵抑制剂/铋剂、阿莫西林/咪唑类药物和克拉霉素.然而由于甲硝唑和克拉霉素耐药的流行,7日标准三联疗法获得的*H pylori*根除率明显下降,导致根治失败<sup>[2-3]</sup>.因此,寻找一个高效、无不良反应的方案迫在眉睫.最近,我们采用一种新的治疗方案-10日序贯疗法根除*H pylori*,取得较好效果,现报道如下.

## 1 材料和方法

1.1 材料 2008-01/2009-01,以上腹痛、反酸、烧心等为主要症状并行胃镜检查的我院门诊患者79例,胃镜下快速尿素酶检测及病理标本Giemasa染色法均为*H pylori*(+),并符合以下条件:(1)4 wk内未使用质子泵抑制剂(PPI)、H<sub>2</sub>受体拮抗剂、铋剂及抗生素;(2)无相关药物过敏史;(3)无消化系大出血和幽门梗阻、穿孔等并发症;(4)无消化系手术史;(5)无严重心、肺、肝、肾功能不全;(6)非哺乳期妇女及孕妇;(7)排除癌性溃疡.所有患者均为第1次根除*H pylori*治疗.埃索美拉唑由无锡阿斯利康公司生产,阿莫西林由联邦制药厂有限公司生产,克拉霉素由雅培制药有限公司生产,替硝唑由丽珠集团丽珠制药厂生产.

1.2 方法 患者按照随机数字表随机分成2组.治疗组:前5 d埃索美拉唑20 mg,阿莫西林1000 mg, po;后5 d埃索美拉唑20 mg,克拉霉素500 mg,替硝唑500 mg,以上药物均为每天2次, po.对照组:埃索美拉唑胶囊20 mg,阿莫西林1000 mg,克拉霉素500 mg,每天2次, po,共7 d.

所有患者停药4 wk后复查<sup>13</sup>C呼气试验,其DOB值(delta over baseline)小于2.5%为阴性,判断为根除治疗成功;阳性为根除治疗失败.并记录患者的药物不良反应.

**统计学处理** 采用SPSS13.0软件进行统计分析,2组间的比较采用 $\chi^2$ 检验、*t*检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义.

## 2 结果

2.1 一般资料 治疗组39例,男22例,女17例,年龄

表1 2组患者不良反应发生情况(n)

分组	腹泻	腹痛	恶心	呕吐	头痛	口苦	合计
治疗组	2	1	1	1	1	1	7
对照组	2	1	1	1	1	2	8

23-69(平均46.72±6.23)岁,消化性溃疡19例,慢性胃炎20例;对照组40例,男21例,女19例,年龄25-71(平均46.81±7.13)岁,消化性溃疡18例,慢性胃炎22例.2组患者在年龄上比较无显著性差异( $\chi^2 = 0.12, P > 0.05$ ).此外在性别及疾病分类上差异亦无显著性( $\chi^2 = 0.08, P > 0.05$ ).

2.2 根除率的比较 治疗组39例,37例成功根除,根除率94.87%;对照组40例,31例根除,根除率77.50%,两组比较差异具有统计学意义( $\chi^2 = 4.97, P < 0.05$ ).

2.3 药物的不良反应 治疗组有7例出现不良反应,对照组有8例出现不良反应,2组的不良反应发生率分别为17.95%和20.00%,比较无统计学差异( $\chi^2 = 0.05, P > 0.05$ ).主要为腹泻,腹痛,口苦,头痛,恶心及呕吐等,不良反应均较轻微,未影响治疗(表1).

2.4 治疗方案费用比较 10日序贯疗法的费用为492.00元,7日标准三联疗法的费用为493.36元,并没有增加患者的经济负担.

## 3 讨论

*H pylori*感染呈全球性分布,感染率多数在50%左右,发达地区偏低.我国是世界上*H pylori*感染率较高的国家.1994年世界卫生组织正式将其列为第1类致癌因子并明确为胃癌的危险因素<sup>[4-5]</sup>.2003年桐城会议<sup>[4]</sup>及2007年庐山会议<sup>[6]</sup>均明确列出了必须根除*H pylori*的情况,即消化性溃疡、早期胃癌术后、胃黏膜相关淋巴组织(gastric mucosa-associated lymphoid tissue, MALT)淋巴瘤.因此,*H pylori*感染的治疗一直是大家所关注的热点.2003年我国*H pylori*共识意见<sup>[4-5]</sup>推荐的根除*H pylori*治疗方案中,一线方案为质子泵抑制剂加2种抗生素或铋剂加2种抗生素,疗程7 d,特别是质子泵抑制剂加阿莫西林和克拉霉素方案,在一段时间内因其*H pylori*根除率高、不良反应少、依从性好等特点而作为首选方案.但近年来随着*H pylori*不断产生的耐药问题,PPI+克拉霉素+阿莫西林治疗方案*H pylori*的根除率明显下降<sup>[2-3]</sup>.同时,研究还发现*H pylori*的根除率在复治者比初治者明显下

### ■应用要点

本研究结果亦显示,10日序贯疗法优于标准的三联7日疗法,10日序贯疗法对于根除*H pylori*感染无疑是一个很好的选择,可进一步开展多中心、大样本的临床研究来进一步证实其高效性和安全性.

降, 同样的治疗方案, 随着时间推移, *H pylori* 的根除率逐步降低, 所以对 *H pylori* 的根除治疗应力争在第1次治疗取得成功<sup>[7]</sup>.

因此选择根除率高的治疗方案, 避免耐药菌株已引起国内外学者的广泛关注. 据意大利学者 Vaira *et al*<sup>[8]</sup> 对300例患者的随机双盲研究显示, 10日序贯疗法 *H pylori* 根除率(89%)明显高于传统三联疗法(77%). Zullo *et al*<sup>[9]</sup> 的研究也证实了这一点. Francavilla *et al*<sup>[10]</sup> 报道对于儿童 *H pylori* 的根除治疗, 10日序贯疗法的根除率(97.3%)亦高于标准的三联疗法(75.7%). 本研究中10日序贯疗法 *H pylori* 根除率为94.87%, 明显高于7日三联疗法(77.50%), 而且并未增加患者的经济负担, 未出现严重的不良反应, 提示该方案可能为目前抗 *H pylori* 治疗的一种较为安全、经济、有效的方案.

为何序贯疗法可以得到更高的 *H pylori* 根除率, 其确切机制尚不清楚. 可能的原因有: 细菌能够产生克拉霉素的流出通道, 将药物快速转运出细胞外, 阻止克拉霉素与核糖体的结合. 而阿莫西林作用于细菌的细胞壁, 第1阶段的阿莫西林治疗能通过破坏细胞壁而阻止克拉霉素流出通道的形成, 故可能提高了第2阶段克拉霉素的治疗. 因此, 前半个疗程的阿莫西林能够预防随后应用克拉霉素的耐药. 另外高的 *H pylori* 根除率也有可能是应用了替硝唑, 替硝唑与甲硝唑相似, 但具有更长的作用时间. 此外, 是否疗程延长对于疗效的增加起着一定的作用尚有争议, 在此需要更多的试验进一步探索.

根据最新意大利 *H pylori* 指南, 10日序贯疗法被给予了标准7日三联疗法同等地位, 作为了一线治疗方案. 本研究结果亦显示, 10日序贯疗

法优于标准的三联7日疗法, 10日序贯疗法对于根除 *H pylori* 感染无疑是一个很好的选择, 但目前在我国尚待多中心、大样本的临床研究来进一步证实其高效性和安全性.

#### 4 参考文献

- 1 Shallcross TM, Rathbone BJ, Wyatt JL, Heatley RV. Helicobacter pylori associated chronic gastritis and peptic ulceration in patients taking non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Aliment Pharmacol Ther* 1990; 4: 515-522
- 2 潘秀珍, 彭孝纬, 彭如洁. 幽门螺杆菌对抗生素耐药研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 806-813
- 3 Mégraud F. H pylori antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut* 2004; 53: 1374-1384
- 4 张万岱, 萧树东, 胡伏莲, 林三仁, 胡品津, 刘文忠, 王继德, 徐智民. 幽门螺杆菌共识意见(2003·安徽桐城). *中华消化杂志* 2004; 24: 126-127
- 5 张万岱, 萧树东, 胡伏莲, 林三仁, 胡品津, 刘文忠, 王继德, 徐智民, 成虹. 对幽门螺杆菌若干问题共识意见. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2457-2458
- 6 成虹, 胡伏莲. 第三次全国幽门螺杆菌共识会在江西庐山召开—Hp共识会议纪要, 2007.08.10~12, 江西庐山. *中国医药导刊* 2007; 9: 440-441
- 7 田雨, 王蔚虹, 胡伏莲. 中国幽门螺杆菌感染治疗共识意见. *中国医药导刊* 2007; 9: 104-105
- 8 Vaira D, Zullo A, Vakil N, Gatta L, Ricci C, Perna F, Hassan C, Bernabucci V, Tampieri A, Morini S. Sequential therapy versus standard triple-drug therapy for Helicobacter pylori eradication: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2007; 146: 556-563
- 9 Zullo A, Gatta L, De Francesco V, Hassan C, Ricci C, Bernabucci V, Cavina M, Ierardi E, Morini S, Vaira D. High rate of Helicobacter pylori eradication with sequential therapy in elderly patients with peptic ulcer: a prospective controlled study. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21: 1419-1424
- 10 Francavilla R, Lionetti E, Castellaneta SP, Magistà AM, Boscarelli G, Piscitelli D, Amoroso A, Di Leo A, Miniello VL, Francavilla A, Cavallo L, Ierardi E. Improved efficacy of 10-Day sequential treatment for Helicobacter pylori eradication in children: a randomized trial. *Gastroenterology* 2005; 129: 1414-1419

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 •

### 世界华人消化杂志投稿方式

**本刊讯** 本刊只接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail, 印刷版. 在线投稿网址: <http://wcjd.wjgnet.com>/在线提交未成功, 请通过 [submission@wjgnet.com](mailto:submission@wjgnet.com), 电话: 010-8538 1892, 传真: 010-8538-1893 寻求帮助. 投稿须知下载网址 <<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>> 审稿过程平均时间需要14 d. 来稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审. 接受后的稿件作者需缴纳稿件处理费及发表费, 文章发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬). (常务副总编辑: 张海宁 2009-06-08)

**■ 同行评价**  
本研究选题新颖, 实用性较强, 对临床医师有较好的参考价值.



## 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!

白爱平 副教授

南昌大学第一附属医院消化内科

陈红松 研究员

北京大学人民医院肝病研究所

陈其奎 教授

中山大学附属第二医院消化内科

陈耀凯 副教授

中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所

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

高润平 教授

吉林大学第一医院肝病科

高泽立 主任医师

上海交通大学医学院附属第九人民医院周浦分院消化科

黄志勇 副教授

华中科技大学同济医院普外科

季加孚 教授

北京大学临床肿瘤学院北京肿瘤医院外科

金瑞 教授

首都医科大学附属北京佑安医院消化科

李定国 教授

上海交通大学医学院附属新华医院消化内科

刘改芳 主任医师

河北医科大学第三医院消化内科

刘海林 主任医师

上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科

刘杞 教授

重庆医科大学病毒性肝炎研究所

刘占举 教授

同济大学附属第十人民医院胃肠内科

潘秀珍 教授

福建省立医院消化内科

沈琳 主任医师

北京大学临床肿瘤医院消化内科

宋振顺 教授

中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科

王炳元 教授

中国医科大学附属第一医院消化内科

王健生 教授

西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

吴泰璜 教授

山东省立医院肝胆外科

徐列明 教授

上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝二科

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

张晓岚 教授

河北医科大学第二医院消化内科

张筱茵 副教授

中国人民解放军第四军医大学西京医院消化疾病研究所

张绪清 副教授

中国人民解放军第三军医大学附属西南医院全军感染病研究所

张宗明 教授

清华大学第一附属医院消化医学中心

郑鹏远 教授

郑州大学第二附属医院消化科

周国雄 主任医师

南通大学附属医院消化内科

邹小明 教授

哈尔滨医科大学附属第二医院普外二科