

# 贲门失弛缓症的治疗进展

李柯蓓, 施瑞华

李柯蓓, 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, 主要从事食管疾病的基础与临床研究, 擅长食管良恶性狭窄扩张、支架治疗。  
作者贡献分布: 本文综述由李柯蓓完成, 施瑞华审校。  
通讯作者: 施瑞华, 教授, 主任医师, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 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: 2009-06-30 修回日期: 2009-08-11  
接受日期: 2009-08-17 在线出版日期: 2009-08-18

## Advances in the treatment of achalasia

Ke-Bei Li, Rui-Hua Shi

Ke-Bei Li, Rui-Hua Shi, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China  
Correspondence to: Professor Rui-Hua Shi, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital with Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. ruihuashi@126.com  
Received: 2009-06-30 Revised: 2009-08-11  
Accepted: 2009-08-17 Published online: 2009-08-18

## Abstract

Achalasia is a rare motor disorder of the oesophagus. As its etiology and pathogenesis are still unclear, the treatment nowadays is focused on relief of symptoms. At present, treatment options for achalasia include pharmacotherapy, endoscopic botulinum toxin injection, endoscopic dilation, endoscopic microwave therapy and surgery therapy. In this article, we will review the recent advances in the treatment of achalasia.

Key Words: Achalasia; Treatment; Oesophagus

Li KB, Shi RH. Advances in the treatment of achalasia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(23): 2333-2337

## 摘要

贲门失弛缓症是一种少见的食管运动障碍性疾病, 其病因及发病机制至今仍未确定。目前本症的治疗多以缓解症状为主, 主要的治疗方法包括: 药物治疗、内镜下治疗及外科手术治疗。本文就近年来贲门失弛缓症的治疗

进展作一综述。

关键词: 贲门失弛缓症; 治疗; 食管

李柯蓓, 施瑞华. 贲门失弛缓症的治疗进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(23): 2333-2337  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2333.asp>

## 0 引言

贲门失弛缓症(achalasia)最早在1672年由 William *et al*报道<sup>[1]</sup>, 是一种少见的原发性食管运动障碍性疾病, 发病率约为0.5/10万-1/10万, 发病没有明显的年龄界限, 常见于20-50岁。该病以食管体部正常蠕动消失及吞咽时下食管括约肌(lower esophageal sphincter, LES)松弛不良为特征, 临床上主要表现为吞咽困难、胸骨后疼痛、食物反流、误吸等, 严重者可出现消瘦。食管钡餐检查可见食管下段呈对称漏斗状狭窄, 边缘光滑呈鸟嘴样改变, 钡剂在贲门部通过困难, 食管体部呈不同程度的扩张。内镜检查可见大量的食管滞留食物, 食管腔扩大, 贲门口狭窄。由于该病的病因及发病机制至今仍未明确, 目前本症的治疗多以缓解症状为主, 主要的治疗方法包括: 药物治疗、内镜下治疗及外科手术治疗。本文就贲门失弛缓症治疗进展作一综述。

## 1 药物治疗

口服药物包括钙离子拮抗剂、硝酸酯类药物、抗胆碱能药物等, 其中最常用的是钙离子拮抗剂和硝酸酯类药物。前者主要通过选择性阻滞Ca<sup>2+</sup>经细胞膜上的电压依赖性Ca<sup>2+</sup>通道进入细胞内, 减少胞质Ca<sup>2+</sup>浓度, 进而产生负性肌力作用, 引起LES的松弛。后者通过活化鸟苷酸环化酶, 增加平滑肌环鸟苷酸cGMP的生成, 鸟苷酸和硝酸相互作用活化的蛋白激酶改变了平滑肌的磷酸化进程, 结果肌球蛋白的轻链去磷酸化, 抑制了平滑肌的正常收缩, 使LES松弛, 达到治疗贲门失弛缓症的目的。虽然口服药物在理论上能够显著降低LES压力, 使LES松弛, 但是调查表明

## ■背景资料

贲门失弛缓症(achalasia)是一种少见的原发性食管运动障碍性疾病, 发病率约为0.5/10万-1/10万。该病以食管体部正常蠕动消失及吞咽时下食管括约肌(LES)松弛不良为特征。根据典型的临床症状及食管钡餐、测压、内镜镜检查等可明确诊断。由于该病的病因及发病机制至今仍未明确, 目前该病的治疗多以缓解症状为主。

## ■同行评议者

丁士刚, 主任医师, 北京大学第三医院消化科

## ■研发前沿

贲门失弛缓症治疗方法很多,主要包括:药物治疗、内镜下治疗及外科手术治疗。目前国内外研究热点是对各种治疗方式的疗效特别是其远期疗效研究。

其治疗贲门失弛缓症在临床上应用的疗效甚小,只有个别的患者能得到初期改善<sup>[2]</sup>;另一方面,这些药物引起的不良反应众多,如低血压、头痛、下肢水肿等。因此现口服药物治疗贲门失弛缓症只应用于早期轻度的贲门失弛缓症患者或者拒绝其他治疗方法的患者<sup>[3]</sup>。

## 2 内镜治疗

**2.1 内镜下肉毒杆菌毒素注射治疗** 肉毒杆菌毒素(botulinum neurotoxin, BoTx)是由肉毒梭状芽孢杆菌产生的一种外毒素,根据抗原的不同分为A至G 7个亚型<sup>[4-6]</sup>。其作用机制是阻止神经末梢乙酰胆碱的释放,从而使肌肉松弛。内镜下BoTx注射治疗从1995年开始应用于临床,凭着其操作简便,安全有效,创伤及不良反应小,越来越得到广泛运用。关于BoTx注射剂量、方法和间隔的时间,人们进行了大量研究,认为每次注射本品100 U,分别于贲门上0.5 cm, 3、6、9、12点位4个点,每点注射本品20 U,同时应用内镜反转法于贲门下向上将剩余的20 U分2点注射至贲门部,并于1 mo后重复注射<sup>[7]</sup>,此方案比其他方案的疗效更好。国内学者王旭霞 *et al*<sup>[8]</sup>研究认为BoTx注射治疗贲门失弛缓症操作简单,安全可靠,患者有较好的耐受性,痛苦小,不良反应少,治疗费用低,近期疗效肯定,适应证广,即使扩张或手术治疗失败的患者,经内镜注射BoTx仍然有效。国外随访研究显示虽然注射BoTx能降低LES压力,改善食管排空,但是其效用维持时间较短,症状缓解有效率1 mo后约为80%-90%,6 mo后降至60%-70%,1年后有效率仅为53%-54%<sup>[4-6]</sup>。患者需每隔6-12 mo需重复注射。故目前内镜下BoTx注射治疗优先应用于无法外科手术或球囊扩张治疗,经外科手术或球囊扩张治疗后复发,或者正准备外科手术的术前贲门失弛缓患者。

**2.2 内镜下扩张治疗** 扩张治疗的历史可以追溯到1674年William *et al*用鲸骨做的“扩张器”,其原理是通过外力强行过度扩张,将LES肌纤维延伸拉长,造成部分平滑肌松弛或断裂而失去张力,从而降低食管下端括约肌静息压(lower esophageal sphincter pressure, LESP),改善食管下端括约肌松弛力,达到治疗目的。内镜下扩张治疗主要包括内镜下探条扩张、气囊扩张、特制金属支架置入治疗。

**2.2.1 内镜下探条扩张治疗:**受扩张器直径限制,食管下段括约肌不能充分扩张,疗效不持久,因

此,已很少用于贲门失弛缓症的治疗。目前,此方法多用于手术后吻合口良性狭窄的扩张<sup>[9]</sup>与气囊扩张前的预扩张。

**2.2.2 内镜下气囊扩张治疗:**他是治疗贲门失弛缓症的一线疗法,强行用外力扩张失弛缓的括约肌,使其部分肌纤维断裂,疗效确切,有效率可达60%-85%<sup>[10]</sup>。目前最常用的有经内镜通道气囊(TTC气囊)、穿过内镜气囊(TTS气囊)及经过导线气囊(OTW气囊)3种。该技术的优点为微创,无X线辐射,操作简单,单次扩张费用低,近期疗效确切,不需手术易被多数医患接受,同时内镜直视下可随时观察扩张过程中食管贲门黏膜有无撕裂及出血,必要时可施行内镜下止血处理,减少了扩张相关性并发症的发生<sup>[11]</sup>。气囊扩张的关键是扩张器直径的选择(成人选用直径35 mm,儿童及有Heller肌切开术者选用30 mm)与正确的操作方法(气囊正好位于痉挛的LES部位,压力100-150 kPa,持续3-5 min,放气2-3 min,再次充气,共2-3次),其疗效国外报道为60%-85%,国内达到95%以上。但疤痕体质的患者相对禁忌<sup>[12]</sup>。气囊扩张疗法近期疗效确切,对其远期疗效,Eckardt *et al*<sup>[13]</sup>研究发现年龄是影响扩张治疗远期效果的一个因素,小于40岁的患者对单次扩张的应答较差,随访5年其有效率仅有16%,而大于40岁的患者5年有效率可达58%。其原因可能为:青年患者贲门括约肌的弹性更好,组织修复能力也比老年患者更强。该疗法常见并发症有食管局部黏膜的擦伤、撕裂、渗血,胸痛,食管血肿及吸入性肺炎等,严重时可发生上消化道大出血、穿孔。食管穿孔发生率约为1%-3%,并且和内镜医师技术熟练度有关。内镜医师通过熟练技术,谨慎操作可以预防上述严重并发症的发生。一旦发生穿孔等严重并发症必须早期诊断,早期处理。

**2.2.3 内镜下特制金属支架置入治疗:**该方法通过放置支架,扩张食管贲门狭窄段,使食物能够顺利通过,并造成贲门肌层慢性撕裂,从而达到治疗目的。其机制是放置到位的特制记忆合金支架,随患者体温逐步上升到36℃,在此过程中支架逐步扩张,整个支架扩张达预定直径时,需12-24 h;由于支架是缓慢扩张至预定直径,所以食管贲门区肌撕裂较为规则,疗效较好<sup>[14]</sup>。支架置入治疗可分为永久性和暂时性2种。De Palma *et al*<sup>[15]</sup>最早使用可扩张金属内支架,对贲门失弛缓症进行治疗,国内程英升 *et al*<sup>[16]</sup>最早应用永久性贲门支架成形术治疗患者,该手段短期疗

## ■相关报道

国内外对各种治疗方式的临床随访研究相关报道表明,内镜下球囊扩张、腔镜手术治疗已成为贲门失弛缓症的一线疗法。

效好, 但后期会发生严重频繁的胃食管反流和肉芽组织增生导致食管狭窄等, 因此, 永久性金属支架扩张不适合贲门失弛缓症. 暂时性贲门支架是由永久性支架改良而成. 特制可回收防反流食管支架是近年研制的一种新型支架. Z形双被膜支架无金属骨架的裸露, 不易与食管组织粘连, 便于回收, 另外支架末端安置有防反流瓣膜, 能防止治疗期间的胃食管反流症状. 可见, 利用特制可回收防反流食管支架治疗贲门失弛缓症具有很强的探讨价值<sup>[17]</sup>. 郑荣浩 *et al*<sup>[18]</sup>用可回收全覆膜抗反流食管支架治疗24例贲门失弛缓症, 随访观察3-36 mo, 结果所有患者支架置入一次成功, 16.67%患者治疗期间发生支架移位, 治疗后随访期间患者吞咽困难都明显缓解, 未出现严重不良反应和并发症. 可见可回收抗反流支架治疗贲门失弛缓症具有操作简便、并发症少、回收方便、疗效好的优点, 但治疗价格高, 且目前支架在体内最佳放置时间及其长期疗效相关研究较少, 其远期疗效有待进一步观察.

**2.3 内镜下微波治疗** 该方法利用微波的作用破坏部分LES, 使之松弛达到治疗目的. 操作时选齿状线近端1.5-2.0 cm为治疗区, 选取3、6、9和12点位为治疗点. 切开食管下括约肌的长度与深度不可过量. Lantis *et al*<sup>[19]</sup>采用内镜下微波治疗25例贲门失弛缓症患者, 总有效率达100%, 一次治愈率为88%. 由于微波治疗同时具有凝固止血作用, 所以术中及术后均未发生出血. 理论上微波治疗存在穿孔的并发症, 但由于微波治疗贲门失弛缓症临床应用例数较少, 目前尚未见严重并发症的报道, 且其确切疗效尚有待研究.

### 3 外科手术治疗

贲门失弛缓症的外科手术治疗经历了一个世纪的漫长过程, 1913年Heller首先应用食管贲门部黏膜外肌层切开手术治疗贲门失弛缓症, 之后Heller手术成为外科手术治疗贲门失弛缓症的基本术式. 国外研究表明外科手术治疗贲门失弛缓症有效率达80%-90%<sup>[20]</sup>. Heller手术要点是暴露病段食管, 根据狭窄长度, 沿食管纵轴垂直切开食管末端肌层, 切开总长度约6-8 cm, 并在黏膜外剥离被切开的肌层, 使达到食管周径的1/2<sup>[21]</sup>. 但传统开放式Heller手术需开胸或者开腹, 创伤大, 大多患者不易接受, 且传统Heller手术后并发胃食管反流情况严重, 随着近年来腔镜技术的发展, 腔镜下Heller术已逐渐取代传统的开放式Heller术. 胸腔镜或腹腔镜下Heller

术, 特别是联合抗反流措施创伤小恢复快, 手术操作简便, 术后病死率低, 并发症少, 住院时间短, 短期疗效较传统Heller术更好<sup>[22]</sup>, 且腹腔镜下Heller术疗效较胸腔镜下Heller术更好(术后症状完全缓解率77% vs 70%, 术后并发胃食管反流发生率10% vs 60%)<sup>[23]</sup>. 近期国外荟萃分析<sup>[24]</sup>表明腹腔镜下Heller术联合抗反流措施是当前治疗贲门失弛缓症的最佳疗法. 腔镜下Heller术短期有效率可达90%-94%<sup>[25-27]</sup>, 对其长期疗效, Ortiz *et al*<sup>[28]</sup>随访149例Heller肌切开加胃底折叠术术后贲门失弛缓患者15年, 症状缓解有效率达75%. Costantini *et al*<sup>[29]</sup>对71例接受腔镜Heller术治疗的贲门失弛缓患者进行了6年的随访观察, 13例患者术后复发, 其中50%患者在1年内复发, 复发的主要原因是肌切开特别是胃端肌层切开不完全. Csendes *et al*<sup>[30]</sup>对67例接受腹腔镜下Heller术联合抗反流措施的贲门失弛缓患者进行术后平均23年的随访观察发现其长期疗效随时间延长逐步降低, 其原因可能为术后并发酸反流疾病、Barrett's食管. 腔镜下Heller术不仅适用于初诊患者, 对曾接受BoTx注射治疗或球囊扩张治疗的患者同样有效. Portale *et al*<sup>[31]</sup>研究曾接受BoTx或球囊扩张治疗的贲门失弛缓患者腹腔镜Heller术的远期疗效, 曾接受球囊扩张治疗组5年后有效率94%, 而曾接受BoTx注射治疗组5年有效率为75%. 可见, BoTx注射治疗增大了外科医师的手术难度, 对其术后的远期疗效也有负面影响. 外科手术治疗贲门失弛缓症的最常见并发症为术后胃食管反流, 在原有Heller肌切开术基础上联合胃底折叠抗反流措施可有效地降低其发生率, 并且对其本身的疗效无影响<sup>[24]</sup>.

### 4 不同方法的联合治疗

Mikaeli *et al*<sup>[32]</sup>比较了联合应用球囊扩张与BoTx注射对于贲门失弛缓症的疗效, 发现联合治疗组的成功率高, 且远期复发率低. 汤志锋 *et al*<sup>[33]</sup>采用小气囊扩张联合BTA注射治疗贲门失弛缓症, 取得了较好的效果, 38例患者联合治疗后临床症状缓解显著, LES较治疗前降低约58.84%, LES松弛率由治疗前30.5%升高到60.9%, 表明小气囊扩张联合BTA注射既无严重损坏贲门括约肌的功能, 亦无导致胃食管反流的潜在危险, 同时又达到了治疗贲门失弛缓症的目的. 何俊堂 *et al*<sup>[34]</sup>用微波切开结合临时性记忆合金内支架置入术治疗该病取得了良好的效果. Zaninotto *et al*<sup>[35]</sup>

### ■创新盘点

本文反映了目前贲门失弛缓症治疗领域的进展, 引入了近年来国内外最新的研究报道, 全面体现了贲门失弛缓症各种治疗方法的疗效、安全性、并发症、费用问题.



### ■应用要点

本文从各种治疗方法近远期疗效、安全性、并发症等方面进行概述,并将他们相互比较,能较好地引导医患选择最合适的治疗方案,具有重要的临床意义。

报道经腹腔镜Heller肌切开术的5年成功率在90%,而联合球囊扩张术成功率则提升到98%。

### 5 各种治疗疗法的优缺点比较及最佳选择

口服药物多作用轻微,作用时间短暂,仅应用于早期轻度的贲门失弛缓症患者或者拒绝其他治疗方法的患者。内镜下BoTx注射操作简便,并发症少,近期疗效肯定,但远期容易复发,需重复注射,目前优先应用于无法外科手术或球囊扩张治疗,经外科手术或球囊扩张治疗后复发的贲门失弛缓症患者。内镜下气囊扩张是性价比最高的贲门失弛缓症一线疗法,其操作简便,疗效优于内镜下BoTx注射,费用相对外科手术低,但存在食管穿孔的风险。近年来腔镜技术的发展使得腔镜下Heller肌切开术成为最有效的贲门失弛缓症治疗措施,减少了传统开放式Heller术的手术风险,国外荟萃分析更表明腹腔镜下Heller术联合抗反流措施是当前治疗贲门失弛缓症的最佳选择,与各种内镜治疗疗法相比其疗效更持久有效,与其他外科手术疗法相比术后症状复发率相似或更低。因此,我们认为在不考虑患者经济基础的情况下,其为首选治疗方法。其他如内镜下探条扩张、内镜下微波治疗临床应用病例较少,另外,内镜下食管支架置入治疗近年来也被逐渐广泛应用,其操作简便、并发症少、回收方便、费用介于气囊扩张和外科手术治疗之间,近期疗效优,其中远期疗效具有很强的探讨价值。不同治疗方法的联合可能起到协同治疗效果,但是对其疗效和联合治疗可能存在的风险需作进一步的评估。

### 6 结论

贲门失弛缓症的治疗方法很多,主要包括口服药物治疗、内镜治疗、外科手术治疗3大类。其中腹腔镜下Heller术联合抗反流措施是目前最持久有效的贲门失弛缓症治疗方式,但费用高,若不考虑经济情况,其为首选治疗方法。内镜下球囊扩张是性价比最高的贲门失弛缓症一线疗法,但有食管穿孔的风险。内镜下食管支架置入治疗疗效优,并发症轻微,其具体价值需更多的临床研究进一步评估。

### 7 参考文献

- Williams VA, Peters JH. Achalasia of the esophagus: a surgical disease. *J Am Coll Surg* 2009; 208: 151-162
- Lake JM, Wong RK. Review article: the management of achalasia - a comparison of different treatment modalities. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24: 909-918
- Leyden JE, Moss AC, MacMathuna P. Endoscopic

- pneumatic dilation versus botulinum toxin injection in the management of primary achalasia. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; CD005046
- Hoogerwerf WA, Pasricha PJ. Botulinum toxin for spastic gastrointestinal disorders. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 1999; 13: 131-143
- Vittal H, Pasricha PF. Botulinum toxin for gastrointestinal disorders: therapy and mechanisms. *Neurotox Res* 2006; 9: 149-159
- Friedenberg F, Gollamudi S, Parkman HP. The use of botulinum toxin for the treatment of gastrointestinal motility disorders. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 165-175
- Martínek J, Spicák J. A modified method of botulinum toxin injection in patients with achalasia: a pilot trial. *Endoscopy* 2003; 35: 841-844
- 王旭霞, 王景杰, 赵曙光, 杨琦, 姜惠玲. 内镜下注射肉毒毒素治疗贲门失弛缓症的临床研究. *临床消化病杂志* 2006; 18: 56-57
- Werre A, Mulder C, van Heteren C, Bilgen ES. Dilation of benign strictures following low anterior resection using Savary-Gilliard bougies. *Endoscopy* 2000; 32: 385-388
- 何泽锋, 王建军, 汪文东, 杨光海, 詹曦, 马千里, 石思恩. 贲门失弛缓症治疗方式的探讨. *中华消化内镜杂志* 2006; 23: 333-336
- Katsinelos P, Kountouras J, Paroutoglou G, Beltsis A, Zavos C, Papaziogas B, Mimidis K. Long-term results of pneumatic dilation for achalasia: a 15 years' experience. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5701-5705
- 姜惠卿, 刘丽. 贲门失弛缓症的内镜治疗进展. *中国消化内镜* 2008; 2: 15-19
- Eckardt VF, Gockel I, Bernhard G. Pneumatic dilation for achalasia: late results of a prospective follow up investigation. *Gut* 2004; 53: 629-633
- 程英升, 李明华, 杨仁杰, 陈维雄, 陈尼维, 尚克中, 庄奇新. 贲门失弛缓症的四种介入治疗成形术的选择和中远期疗效比较. *介入放射学杂志* 2006; 15: 413-417
- De Palma GD, Iovino P, Masone S, Persico M, Persico G. Self-expanding metal stents for endoscopic treatment of esophageal achalasia unresponsive to conventional treatments. Long-term results in eight patients. *Endoscopy* 2001; 33: 1027-1030
- 程英升, 尚克中, 庄奇新, 李明华, 许建荣, 杨世坝. 食管良性狭窄介入治疗方法和再狭窄原因. *世界华人消化杂志* 1998; 6: 791-794
- 孔庆印, 姜开通, 曾宪忠. 可回收防反流食管支架治疗贲门失弛缓症21例临床观察. *中国内镜杂志* 2007; 13: 940-945
- 郑荣浩, 金珍成, 陈伟训, 蔡萌芽. 可回收防反流食管支架治疗贲门失弛缓症临床疗效观察. *中国内镜杂志* 2008; 14: 1229-1232
- Lantis JC 2nd, Carr KL, Grabowy R, Connolly RJ, Schwartzberg SD. Microwave applications in clinical medicine. *Surg Endosc* 1998; 12: 170-176
- Ferguson MK. Achalasia: current evaluation and therapy. *Ann Thorac Surg* 1991; 52: 336-342
- Richter JE. Modern management of achalasia. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2005; 8: 275-283
- Ancona E, Anselmino M, Zaninotto G, Costantini M, Rossi M, Bonavina L, Boccu C, Buin F, Peracchia A. Esophageal achalasia: laparoscopic versus conventional open Heller-Dor operation. *Am J Surg* 1995; 170: 265-270
- Patti MG, Arcerito M, De Pinto M, Feo CV, Tong J, Gantert W, Way LW. Comparison of thoracoscopic and laparoscopic Heller myotomy for achalasia. *J*



- Gastrointest Surg* 1998; 2: 561-566
- 24 Campos GM, Vittinghoff E, Rabl C, Takata M, Gadenstätter M, Lin F, Ciovica R. Endoscopic and surgical treatments for achalasia: a systematic review and meta-analysis. *Ann Surg* 2009; 249: 45-57
- 25 Patti MG, Molena D, Fisichella PM, Whang K, Yamada H, Perretta S, Way LW. Laparoscopic Heller myotomy and Dor fundoplication for achalasia: analysis of successes and failures. *Arch Surg* 2001; 136: 870-877
- 26 Sharp KW, Khaitan L, Scholz S, Holzman MD, Richards WO. 100 consecutive minimally invasive Heller myotomies: lessons learned. *Ann Surg* 2002; 235: 631-638; discussion 638-639
- 27 Zaninotto G, Costantini M, Molena D, Portale G, Costantino M, Nicoletti L, Ancona E. Minimally invasive surgery for esophageal achalasia. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2001; 11: 351-359
- 28 Ortiz A, de Haro LF, Parrilla P, Lage A, Perez D, Munitiz V, Ruiz D, Molina J. Very long-term objective evaluation of heller myotomy plus posterior partial fundoplication in patients with achalasia of the cardia. *Ann Surg* 2008; 247: 258-264
- 29 Costantini M, Zaninotto G, Guirrola E, Rizzetto C, Portale G, Ruol A, Nicoletti L, Ancona E. The laparoscopic Heller-Dor operation remains an effective treatment for esophageal achalasia at a minimum 6-year follow-up. *Surg Endosc* 2005; 19: 345-351
- 30 Csendes A, Braghetto I, Burdiles P, Korn O, Csendes P, Henríquez A. Very late results of esophagomyotomy for patients with achalasia: clinical, endoscopic, histologic, manometric, and acid reflux studies in 67 patients for a mean follow-up of 190 months. *Ann Surg* 2006; 243: 196-203
- 31 Portale G, Costantini M, Rizzetto C, Guirrola E, Ceolin M, Salvador R, Ancona E, Zaninotto G. Long-term outcome of laparoscopic Heller-Dor surgery for esophageal achalasia: possible detrimental role of previous endoscopic treatment. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 1332-1339
- 32 Mikaeli J, Bishehsari F, Montazeri G, Mahdavinia M, Yaghoobi M, Darvish-Moghadam S, Farrokhi F, Shirani S, Estakhri A, Malekzadeh R. Injection of botulinum toxin before pneumatic dilatation in achalasia treatment: a randomized-controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24: 983-989
- 33 汤志锋, 赵琪. 小气囊扩张术联合肉毒碱局部注射治疗贲门失弛缓症. *中国内镜杂志* 2006; 12: 76-81
- 34 何俊堂, 李政文, 吕黄勇, 尧登华, 侯文峰. 内镜下微波切开结合记忆合金支架置入术治疗贲门失弛缓症13例. *西南国防医药* 2006; 16: 508-509
- 35 Zaninotto G, Annese V, Costantini M, Del Genio A, Costantino M, Epifani M, Gatto G, D'onofrio V, Benini L, Contini S, Molena D, Battaglia G, Tardio B, Andriulli A, Ancona E. Randomized controlled trial of botulinum toxin versus laparoscopic heller myotomy for esophageal achalasia. *Ann Surg* 2004; 239: 364-370

■同行评价  
本文逻辑性、条理性较好,基本反映了贲门失弛缓治疗领域的进展,所引文献较新,具有一定的学术价值和临床意义。

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 2009-08-18)

# HBV S基因的反义锁核酸对乙型肝炎转基因小鼠HBV复制和表达的影响

邓益斌, 农乐根, 王燕菲

## ■背景资料

反义核酸技术, 包括反义RNA、反义DNA和核酶技术。其通过导入的外源DNA或RNA短序列, 特异性地进行结合、封闭或调节其功能及产物表达, 从而达到治疗目的。但由于未经修饰的外源核苷酸短序列, 在细胞内容易被核酸酶降解, 所以反义核酸技术的研究与应用一直未能取得很大进展。近年来, 锁核酸(LNA)的出现给反义核酸技术带来了新的希望与机遇。

邓益斌, 农乐根, 广西右江民族医学院附属医院医学检验中心 广西壮族自治区百色市 533000

王燕菲, 广东省广州医学院生物化学与分子生物学教研室 广东省广州市 510182

邓益斌, 讲师, 2009年广东省广州医学院硕士, 主要从事基因诊断与基因治疗研究。

广州市科技攻关基金资助项目, No. 2002Z3-E4081

作者贡献分布: 该实验由邓益斌与王燕菲设计; 实验过程由邓益斌操作完成; 实验研究所需经费由王燕菲提供; 数据分析由邓益斌完成; 论文写作由邓益斌完成, 王燕菲与农乐根审核。

通讯作者: 王燕菲, 教授, 510182, 广东省广州市东风西路195号, 广州医学院生物化学与分子生物学教研室。

yanfeiw@hotmail.com

电话: 020-81340212

收稿日期: 2009-05-16 修回日期: 2009-06-22

接受日期: 2009-06-29 在线出版日期: 2009-08-18

## HBV S gene-specific antisense locked nucleic acid significantly inhibits HBV replication and expression in HBV transgenic mice

Yi-Bin Deng, Le-Gen Nong, Yan-Fei Wang

Yi-Bin Deng, Le-Gen Nong, Center for Medical Laboratory Science, the Affiliated Hospital of Youjiang Medical College for Nationalities, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Yan-Fei Wang, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, Guangdong Province, China

Supported by: the Key Science and Technology Foundation of Guangzhou Municipality, No. 2002Z3-E4081

Correspondence to: Professor Yan-Fei Wang, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangzhou Medical College, 195 Dongfeng Western Road, Guangzhou 510182, Guangdong Province, China. yanfeiw@hotmail.com

Received: 2009-05-16 Revised: 2009-06-22

Accepted: 2009-06-29 Published online: 2009-08-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the inhibitory effects of hepatitis B virus (HBV) S gene-specific antisense locked nucleic acid (LNA) on HBV replication and expression.

**METHODS:** Thirty HBV transgenic mice were randomly divided into five groups ( $n = 6$ ): glucose (5% GLU solution) control group, empty liposome control group, LNA

group, S-ASODN-liposome group and LNA-liposome group. Antisense LNA was injected into mice via the tail vein. Serum HBsAg was quantified by ELISA. Serum HBV DNA was quantified by PCR. The expression of HBsAg in the liver was detected by immunohistochemistry. Serum ALB, ALT, BUN, CR, ApoA1 and ApoB were measured using an automatic biochemical analyzer. The effects of antisense LNA on mouse organs were investigated by HE staining of mouse liver and kidney sections.

**RESULTS:** On days 1, 3, 7 and 14 after LNA injection, serum HBsAg levels in the LNA-liposome group were reduced by 41.7%, 52.8%, 57.8% and 30.5%, respectively, while serum HBV DNA expression levels were decreased by 18.5%, 36.1%, 52.9% and 32.7%, respectively. These values were significantly higher than those in the control groups (all  $P < 0.05$ ). No significant differences were noted in serum ALB, ALT, BUN, CR, ApoA1 and ApoB between the experiment group and the control groups (all  $P > 0.05$ ). The expression level of HBsAg in the liver in the LNA-liposome group was significantly lower than those in the control groups. No significant histological abnormalities were found in the liver in all groups.

**CONCLUSION:** HBV S gene-specific antisense LNA can significantly inhibit the replication and expression of HBV.

**Key Words:** Cationic liposomes; Antisense locked nucleic acid; Hepatitis B virus; Mouse; Transgene; Gene therapy

Deng YB, Nong LG, Wang YF. HBV S gene-specific antisense locked nucleic acid significantly inhibits HBV replication and expression in HBV transgenic mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(23): 2338-2345

## 摘要

**目的:** 探讨乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,

## ■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

HBV)S基因的反义锁核酸(LNA)对乙型肝炎转基因小鼠HBV复制和表达的影响。

**方法:** 将30只HBV转基因小鼠随机分为5组, 每组6只。第1组为5% GLU液对照组, 第2组为空脂质体对照组, 第3组为单LNA组, 第4组为S-ASODN脂质体组, 第5组LNA脂质体组。反义LNA经尾静脉注入小鼠体内, 采用ELISA法检测血清HBsAg; PCR定量检测血清HBV DNA含量; 免疫组织化学法检测肝细胞HBsAg的表达; 自动生化分析仪检测ALB、ALT、BUN、CR、ApoA1、ApoB等指标; 小鼠肝脏、肾脏做常规病理切片HE染色, 观察反义LNA对小鼠脏器的影响。

**结果:** 注射反义LNA 1 d、3 d、7 d、14 d后, LNA-脂质体组对血清HBsAg的表达抑制率分别为41.7%、52.8%、57.8%及30.5%。对HBV DNA的抑制率分别为18.5%、36.1%、52.9%和32.7%, 与对照组比较均有显著性差异( $P < 0.05$ ); 全自动生化分析仪检测血清中ALB、ALT、BUN、CR、ApoA1、ApoB等指标, 各组结果与对照组比较均无显著性差异( $P > 0.05$ ); 小鼠肝细胞HBsAg的表达显著低于对照组。HE染色显示小鼠肝肾功能及组织学未见异常。

**结论:** HBV S基因反义LNA对乙型肝炎病毒转基因鼠HBV复制和表达有显著抑制作用。

**关键词:** 脂质体; 反义锁核酸; 乙型肝炎病毒; 小鼠; 转基因; 基因治疗

邓益斌, 农乐根, 王燕菲. HBV S基因的反义锁核酸对乙型肝炎转基因小鼠HBV复制和表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(23): 2338-2345  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2338.asp>

## 0 引言

慢性乙型肝炎是乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染引起的一种死亡率较高的慢性传染性传染病, 易发展为肝硬化、肝癌, 已成为全球性健康问题, 全球约有3.5亿慢性乙型肝炎患者, 而我国的慢性乙肝患者约占37.14%(约1.3亿)<sup>[1-5]</sup>。目前临床治疗药物主要是干扰素<sup>[6-9]</sup>和拉米夫啶<sup>[10-12]</sup>, 干扰素远期疗效不理想, 而拉米夫啶长期使用易引起基因变异, 导致耐药。因此, 探索对HBV感染者有效的抗病毒药物(方法)在我国意义尤显重大。反义寡聚脱氧核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide, ASODN)是应用较为广泛

的一种基因治疗新技术(即反义DNA技术), 其抗HBV感染的机制是通过反义DNA与细胞内特定的mRNA互补结合形成杂交双链分子, 从而在分子水平上阻断HBV基因的表达<sup>[13-15]</sup>。反义锁核酸(locked nucleic acid, LNA)是建立在反义DNA基础上的更新的一种基因疗法, 具有更强的核酸分子杂交能力和抗核酸酶降解能力<sup>[16-24]</sup>, 国外已开始用于抗人类免疫缺陷病毒(human immune deficiency virus, HIV)<sup>[25]</sup>和丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)<sup>[26]</sup>等RNA病毒的基因治疗研究, 而用于抗HBV感染方面的治疗研究尚未见有报道。我们前阶段进行的体外研究表明, 反义LNA抗HBV基因复制和表达的能力比硫代修饰的ASODN强<sup>[27]</sup>。因此, 我们设计合成互补于HBV mRNA S基因翻译起始区的反义LNA, 利用阳离子脂质体的组织靶向性, 经尾静脉将反义LNA导入肝细胞内, 进一步观察反义LNA在HBV转基因鼠体内的抗病毒效果。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** HBV转基因小鼠30只(平均体质量25 g), 雌雄各半, 血清乙肝表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)(+), HBV DNA(+), 购自中国人民解放军广州军区空军医院; Lipofectamine™2000购自Invitrogen公司; 乙型肝炎表面抗原(HBsAg)检测试剂盒为深圳丽珠生物技术有限公司产品; HBV DNA定量检测试剂盒为广州中山达安基因股份有限公司产品; 鼠抗-HBs第一抗体为武汉博士德公司产品; PV-6002二步法免疫组织化学检测试剂盒为北京中杉金桥生物技术有限公司产品; ALB、ALT、BUN、肌酐(CR)、载脂蛋白A1(ApoA1)、载脂蛋白B(ApoB)检测试剂盒为上海荣盛生物技术有限公司产品; 酶标仪(德国); Real Time PCR仪(美国); 日立7150型全自动生化分析仪(日本)。

### 1.2 方法

**1.2.1 质量控制:** (1)样品质控: 尾静脉注射和眶静脉采血后, 做好消毒, 避免感染; 采血及血清分离过程中, 避免溶血, 影响血液指标的检测结果。(2)试剂质控: 所使用的试剂盒均有国准字号, 并在有效期内使用; 各试剂的空白吸光度值在不同温度下(4、25、37℃)下的变异系数CV%均小于5%; 各试剂所配制而成的工作液, 1 wk内的空白吸光度值的日间、日内变异系数CV%均小于5%; 认为所用的试剂盒的稳定性较好, 符合质

### ■ 研发前沿

反基因技术, 即三螺旋构象寡核苷酸技术(TFO)是目前研究的热点。亟待解决的问题是找到一种满意的肝靶向性核酸药物载体, 以及缺乏特异性抗HBV药物。



### ■相关报道

有文献报道以半乳糖多聚赖氨酸(Gal-PLL)作为核酸药物的肝靶向载体,能够将核酸药物导入肝细胞内,但转染效率不高。

表 1 各组血清HBsAg A值的比较 ( $n = 6$ , mean  $\pm$  SD)

分组	注射前	注射后			
		1 d	3 d	7 d	14 d
5% GLU液对照组	1.04 $\pm$ 0.20	0.95 $\pm$ 0.19	1.05 $\pm$ 0.18	1.07 $\pm$ 0.16	1.18 $\pm$ 0.18
空脂质体对照组	1.08 $\pm$ 0.24	0.98 $\pm$ 0.25	1.04 $\pm$ 0.29	1.08 $\pm$ 0.28	1.10 $\pm$ 0.22
单纯LNA组	0.93 $\pm$ 0.11	0.91 $\pm$ 0.16	1.01 $\pm$ 0.14	1.02 $\pm$ 0.19	1.13 $\pm$ 0.11
S-ASODN脂质体组	1.08 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.86 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	0.74 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	0.68 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.82 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>
LNA脂质体组	1.09 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.63 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	0.52 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	0.41 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	0.76 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组。

量控制要求。(3)仪器质控:酶标仪、生化自动分析仪、PCR仪均定期维护,各项性能指标均符合实验要求;每个项目检测前,均用定值质控血清做高、中、低值质控,且均在控。

1.2.2 反义LNA的合成与修饰:合成互补于HBV(ayw亚型)mRNA S基因翻译起始区157-167 nt的S片段(5'-TaCcTctTgTa-3',其中大写字母代表LNA,小写字母代表DNA)。由美国Genelink公司合成修饰并纯化。

1.2.3 脂质体包裹LNA的制备:脂质体与5% GLU液按2:3比例混匀后,迅速加入等体积的LNA(200 mg/L)溶液,充分混匀,室温下静置1 h后应用,即为脂质体-LNA混合物。

1.2.4 转基因鼠的处理:将30只HBV转基因小鼠随机分为5组,每组6只。第1组为5% GLU液对照组,第2组为空脂质体对照组,第3组为单纯LNA组,第4组为S-ASODN脂质体组,第5组为LNA脂质体组。分别在1, 3, 5 d经尾静脉给每只小鼠注射相应的脂质体-LNA(或S-ASODN)混合物300  $\mu$ L,空白对照注射等量5% GLU液(或空脂质体)。于注射前,注射后第1, 3, 7, 14天经眶静脉采血,5000 r/min离心5 min,吸上层血清于编好号的无菌EP管中,贮存于-20 $^{\circ}$ C备检,并于注射后第14天处死小鼠,取肝、肾脏40 g/L甲醛固定。

1.2.5 血清HBsAg的检测:利用酶联免疫吸附技术(ELISA)检测,具体方法见试剂盒说明书,HBsAg浓度以A值表示。

1.2.6 HBV DNA的检测:采用荧光定量聚合酶链反应(PCR)法检测。在PCR反应管中加入反应液和样本DNA共25  $\mu$ L,各反应管放入荧光定量PCR仪,扩增条件:37 $^{\circ}$ C保温2 min,94 $^{\circ}$ C预变性3 min,94 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 40 s,共40个循环。由计算机软件自动分析所收集的荧光信号并计算出定量结果,采用计算对数平均值的方法计算HBV

DNA平均拷贝数。

1.2.7 肝、肾功能检测:ALB为溴甲酚绿法;ALT为IFCC速率法;BUN为脲酶连续监测法;CR为苦味酸法。以上指标均由自动生化分析仪检测。

1.2.8 血清载脂蛋白A、B检测:ApoA1、ApoB均为免疫比浊法,由自动生化分析仪检测。

1.2.9 肝组织HBsAg检测:肝组织常规石蜡包埋、切片,采用二步法免疫组织化学法检测,并进行DAB染色,苏木素复染,鼠抗-HBs以1:100稀释,具体方法见说明书。电子显微镜观察肝组织中HBsAg的着色情况,以判断LNA的抑制作用。

1.2.10 肝、肾脏组织病理检测:小鼠的肝脏、肾脏经石蜡包埋、切片后,经苏木素、伊红染色,电子显微镜下观察小鼠各脏器细胞、组织结构有无改变,以判断脂质体对小鼠脏器细胞的损伤作用。

**统计学处理** 所有结果用mean  $\pm$  SD表示,应用SPSS12.0统计软件处理数据,采用单因素方差分析方法比较各组间差异, $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义。抑制率(%) = (用药前N-用药后N)/用药前N  $\times$  100%。

## 2 结果

2.1 LNA-脂质体对HBsAg的抑制作用 注射后第1、3、7、14天,S-ASODN脂质体组对HBsAg的抑制率分别为20.3%、31.5%、37.1%和24.1%;LNA-脂质体组的抑制率分别为41.7%、52.8%、57.8%和30.5%。这2组与对照组比较均有显著性差异( $P < 0.05$ )。表明LNA在动物体内对HBsAg的抑制作用随用药时间而增强,且有一个峰值。同时也表明LNA比S-ASODN的抑制作用要强(表1)。

2.2 LNA-脂质体对HBV DNA的抑制作用 通过定量PCR检测血清HBV DNA,发现LNA对HBV DNA有较明显的抑制作用。LNA脂质体

表 2 各组血清HBV DNA检测结果比较 (n = 6, mean ± SD, 拷贝数log10数值)

分组	注射前	注射后			
		1 d	3 d	7 d	14 d
5% GLU液对照组	5.49 ± 0.17	5.29 ± 0.27	5.40 ± 0.17	5.38 ± 0.19	5.28 ± 0.15
空脂质体对照组	5.44 ± 0.18	5.38 ± 0.32	5.42 ± 0.34	5.51 ± 0.37	5.46 ± 0.32
单纯LNA组	5.48 ± 0.31	5.29 ± 0.26	5.33 ± 0.16	5.68 ± 0.17	5.56 ± 0.21
S-ASODN脂质体组	5.42 ± 0.32 <sup>a</sup>	4.95 ± 0.18 <sup>a</sup>	4.82 ± 0.13 <sup>a</sup>	4.07 ± 0.15 <sup>a</sup>	4.29 ± 0.17 <sup>a</sup>
LNA脂质体组	5.51 ± 0.24 <sup>a</sup>	4.49 ± 0.37 <sup>a</sup>	3.52 ± 0.33 <sup>a</sup>	2.59 ± 0.23 <sup>a</sup>	3.70 ± 0.25 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P<0.05 vs 对照组.

■创新盘点

锁核酸(LNA)是一种新兴环状核苷酸衍生物,具有分子杂交能力强、抗核酸酶降解能力高等特性,本研究首次将其应用于抗HBV感染的治疗研究.

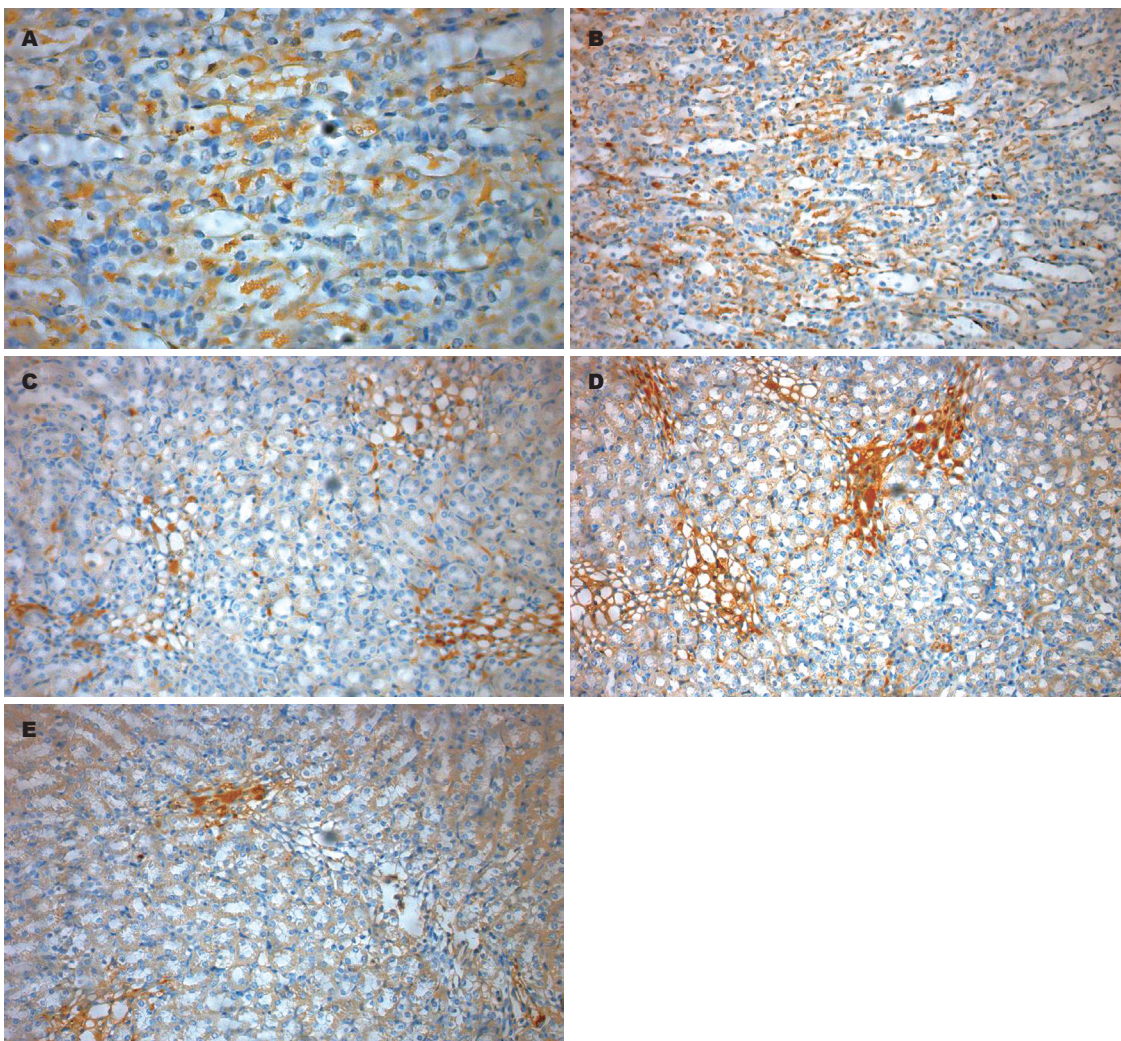


图 1 各组肝脏切片免疫组织化学染色HBsAg分布(DAB). A: 5% GLU液对照组; B: 空脂质体对照组; C: 单纯LNA组; D: S-ASODN脂质体组; E: LNA脂质体组.

组的DNA抑制率分别为18.5%、36.1%、52.9%和32.7%; S-ASODN脂质体组分别为8.5%、12.6%、26.5%、20.8%; 与对照组比较均有显著性差异(P<0.05, 表2).

2.3 免疫组织化学检测肝组织HBsAg的表达 电子显微镜观察免疫组织化学检测结果, 发现肝

组织切片中的HBsAg阳性细胞数明显减少, 表明LNA可以有效抑制肝细胞中HBsAg的表达(图1).

2.4 血清生化指标检测结果 全自动生化分析仪检测血清中ALB、ALT、BUN、CR、ApoA1、ApoB等指标, 各组结果与对照组比较均无显著性差异(P>0.05), 表明LNA及LNA-脂质体混合



### ■应用要点

本实验首次利用反义LNA在转基因鼠体内抑制HBV基因表达,为今后反义核酸药物研发提供理论与实验参考。

表 3 各组血清生化检测结果比较 ( $n = 6$ , mean  $\pm$  SD)

分组	ALB(mg/L)	ALT(U/L)	BUN(mmol/L)	CR( $\mu$ mol/L)	ApoA1(g/L)	ApoB(g/L)
5% GLU液对照组	21.8 $\pm$ 1.58	24.7 $\pm$ 2.16	6.7 $\pm$ 0.83	34.9 $\pm$ 2.93	55.4 $\pm$ 4.31	16.8 $\pm$ 2.35
单纯LNA组	20.8 $\pm$ 1.97	23.7 $\pm$ 1.97	6.3 $\pm$ 0.68	35.2 $\pm$ 4.01	48.8 $\pm$ 3.09	14.6 $\pm$ 3.15
LNA脂质体组	22.1 $\pm$ 2.77	27.3 $\pm$ 1.98	6.2 $\pm$ 0.57	38.4 $\pm$ 5.08	47.8 $\pm$ 6.01	15.6 $\pm$ 2.87

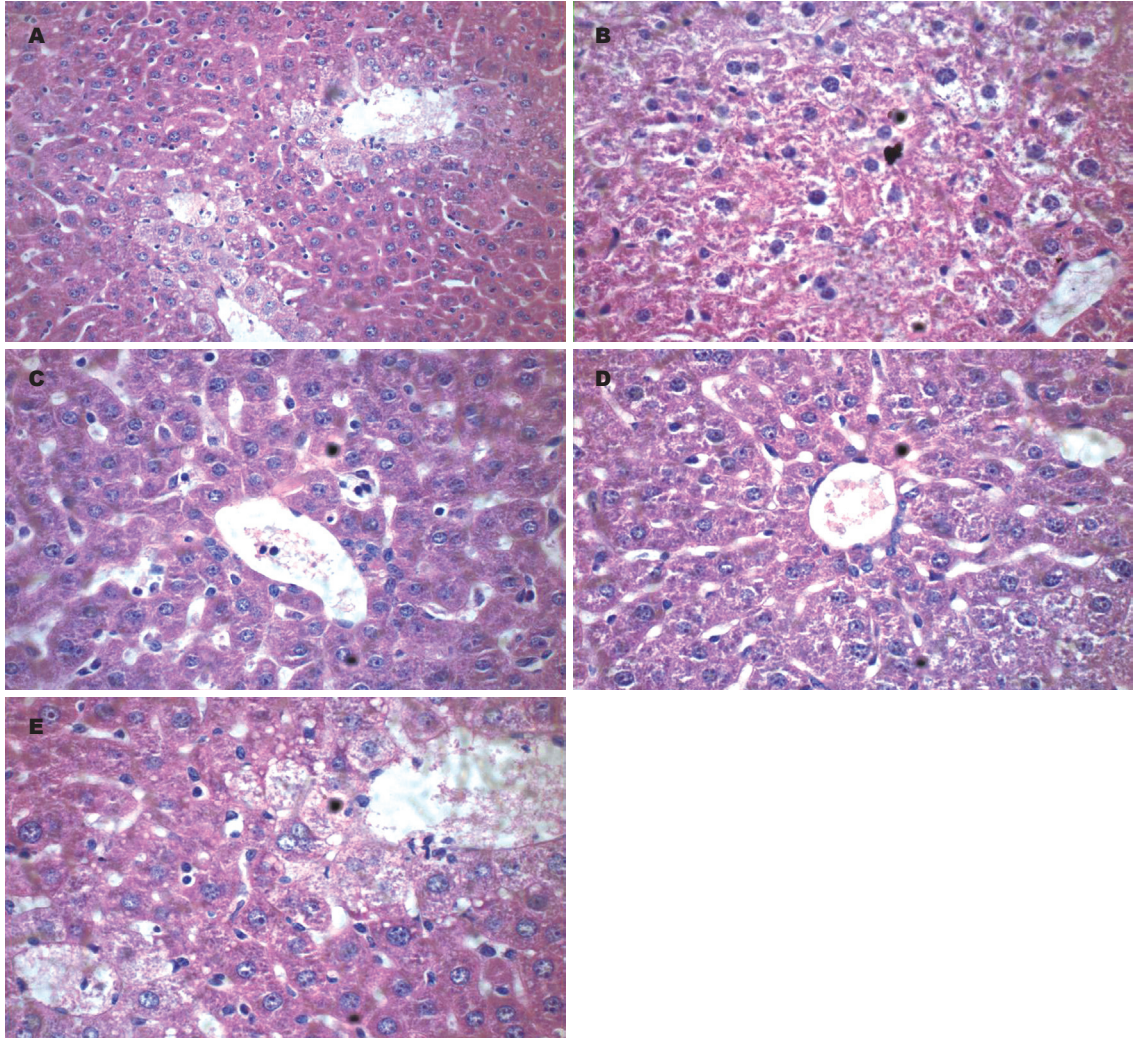


图 2 各组肝脏切片细胞形态学检测结果(HE  $\times$  100)。A: 5% GLU液对照组; B: 空脂质体对照组; C: 单纯LNA组; D: S-ASODN脂质体组; E: LNA脂质体组。

物对小鼠的肝、肾功能均无损伤作用(表3)。

2.5 肝、肾脏组织病理切片HE染色结果 电子显微镜观察小鼠肝、肾脏组织切片HE染色情况,各组小鼠脏器组织结构无明显差异,说明LNA对小鼠肝、肾脏组织无明显的不良反应(图2-3)。

### 3 讨论

反义核酸技术是一种按碱基互补配对原则特异性阻断目的基因表达的新型基因疗法。自20世纪90年代初, Goodarz *et al*首次报道利用反

义核酸技术抗HBV的实验研究以来,反义技术抗病毒研究已取得了很大的进展。但由于以往的反义寡核苷酸易被降解、杂交结合能力不强以及对机体存在不良反应等因素,抗HBV感染的基因治疗一直未取得满意的效果。1994年, Rodriguez *et al*首次发现LNA, 它是一种特殊的带环状结构的核苷酸衍生物, 因其核糖的2'-O与4'-C通过缩水作用而形成氧亚甲基桥, 形似锁状故得名。LNA作为一种新型反义核苷酸, 具有传统寡核苷酸无可比拟的优点: 与



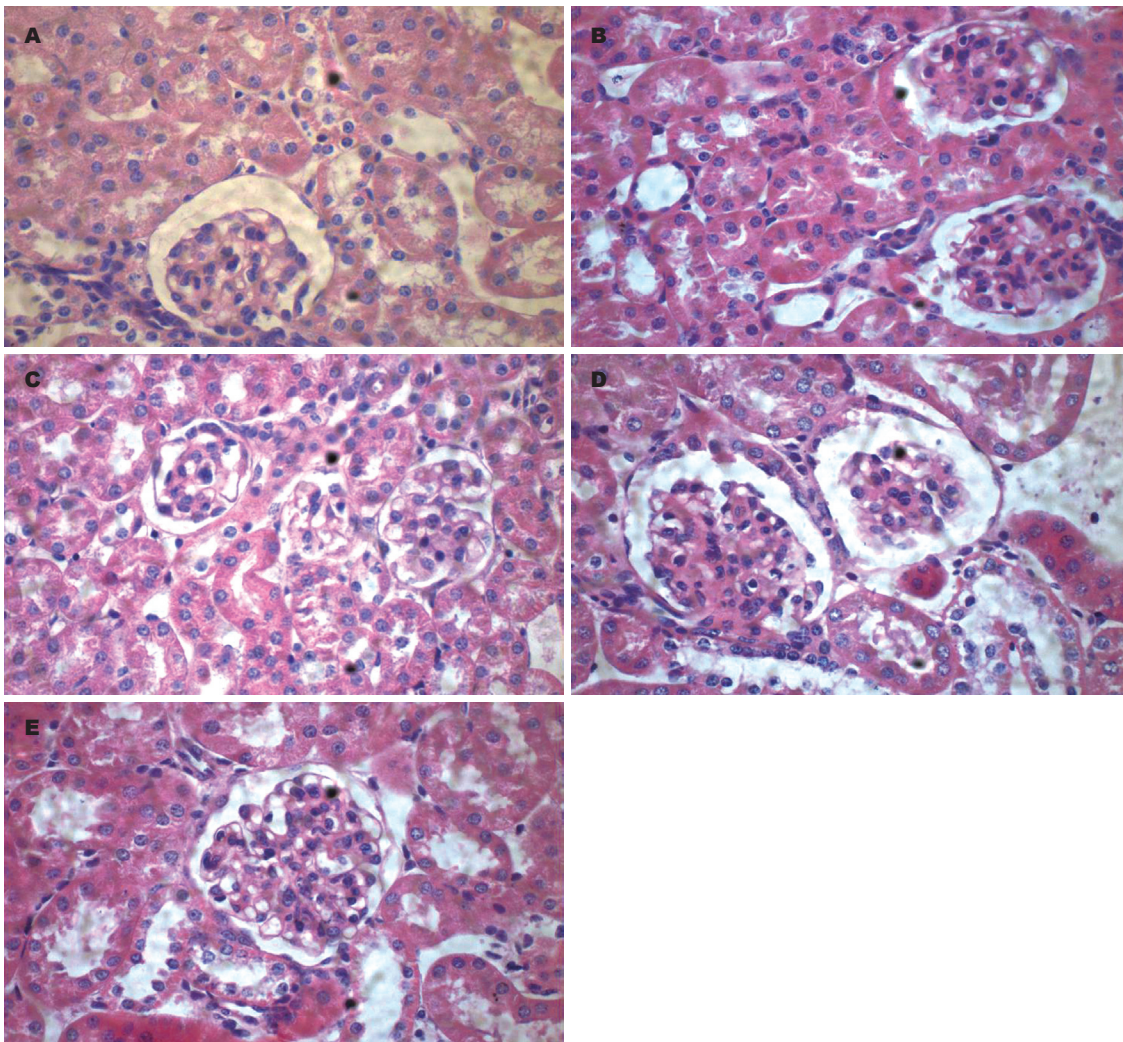


图3 各组肾脏切片细胞形态学检测结果(HE × 100)。A: 5% GLU液对照组; B: 空脂质体对照组; C: 单纯LNA组; D: S-ASODN脂质体组; E: LNA脂质体组。

#### 同行评价

本研究选题较好, 设计合理, 结果可信, 对于乙型肝炎的抗病毒治疗具有重要的价值。

DNA/RNA分子杂交能力强; 抗核酸酶降解能力强; 脂溶性好; 毒性低等<sup>[16-24]</sup>。国外开始用于抗HIV<sup>[25]</sup>和HCV<sup>[26]</sup>等RNA病毒的基因治疗研究, 而用于抗HBV感染方面的治疗研究尚未见有报道。

HBV基因组为3.2 kb左右的双链DNA, 至少有4个开放读码框(ORF)<sup>[28-30]</sup>: S、C、P、X, 其中, S是一个重要的开放读码框, 包括Pre-S1、Pre-S2和S 3个基因区。S基因区的编码产物是HBsAg的主要成分, 不仅参与完整Dane颗粒的装配, 而且还与HBV颗粒的成熟与释放有密切关系。本研究针对S基因翻译起始区设计合成了反义锁核酸序列, 由阳离子脂质体介导, 经尾静脉给药, 通过检测血液及肝组织细胞中HBV的抗原标志物和HBV DNA水平来判断他的抑制效果。但是否有疗效的前提是反义LNA能否被导入肝细胞内, 与HBV的S基因翻译起始区互补结合, 达到封闭病毒基因表达的目的。有文献报

道<sup>[31-32]</sup>以半乳糖多聚赖氨酸(Gal-PLL)作为核酸药物的肝靶向载体, 能够将核酸药物导入肝细胞内, 但转染效率不高。本实验利用脂质体作为反义LNA的转染载体, 通过其带正电荷的阳离子脂质与带负电荷的LNA序列静电作用形成缀合物, 并利用脂质体的亲脂性进入肝细胞, LNA序列慢慢释放出来, 与细胞内的HBV S基因翻译起始区互补结合, 发挥抗病毒的作用。结果表明, 由阳离子脂质体介导的反义LNA, 经尾静脉注射后, 能有效进入肝细胞内, 发挥抗HBV复制和表达的作用。其抗病毒作用呈“非典型”时间效应, 表现为先升高后下降的“峰值”现象, 且高抑制率维持时间达14 d以上, 比国内学者报道<sup>[31]</sup>的反义寡核苷酸抑制作用维持时间要长, 这将为反义LNA用于临床抗HBV治疗提供参考。肝组织免疫组织化学染色结果也显示, 细胞膜上的HBsAg表达明显减少。由于HBV DNA聚合酶缺乏校对作用, 在复制过程中易产生变异株而导

致对药物治疗敏感降低或耐药现象,因此,尚需要研究多基因位点的抗HBV药物或疗法<sup>[34]</sup>。

此外,通过检测血清中的ALB、ALT、BUN、CR、ApoA1、ApoB等血液学指标,同时做肝肾脏病理组织切片HE染色,观察脏器的组织细胞形态学改变,评估LNA脂质体混合物的不良反应。结果表明,反义LNA对肝肾脏组织无明显的毒性损伤作用。

总之,LNA作为一种极具反义药物潜力的新型核酸衍生物,有望成为乙型肝炎治疗的安全高效的分子药物。目前,由于国内尚未开展LNA的合成与鉴定,加上其合成成本相对较高等因素限制了临床试验的研究,但随着对LNA研究的不断深入及合成成本的下降,其必将为基因研究各领域带来广阔的应用前景。

#### 4 参考文献

- Alter MJ. Epidemiology of hepatitis B in Europe and worldwide. *J Hepatol* 2003; 39 Suppl 1: S64-S69
- Fleming J. Current treatments for hepatitis. *J Infect Nurs* 2002; 25: 379-382
- elSaadany S, Tepper M, Mao Y, Semenciw R, Giulivi A. An epidemiologic study of hepatocellular carcinoma in Canada. *Can J Public Health* 2002; 93: 443-446
- Hassan MM, Hwang LY, Hatten CJ, Swaim M, Li D, Abbruzzese JL, Beasley P, Patt YZ. Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus. *Hepatology* 2002; 36: 1206-1213
- Kannangai R, Molmenti E, Arrazola L, Klein A, Choti M, Thomas DL, Torbenson M. Occult hepatitis B viral DNA in liver carcinomas from a region with a low prevalence of chronic hepatitis B infection. *J Viral Hepat* 2004; 11: 297-301
- Hino O, Kajino K, Umeda T, Arakawa Y. Understanding the hypercarcinogenic state in chronic hepatitis: a clue to the prevention of human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2002; 37: 883-887
- Buti M, Esteban R. Drugs in development for hepatitis B. *Drugs* 2005; 65: 1451-1460
- Wai CT, Chu CJ, Hussain M, Lok AS. HBV genotype B is associated with better response to interferon therapy in HBeAg(+) chronic hepatitis than genotype C. *Hepatology* 2002; 36: 1425-1430
- Manns MP. Current state of interferon therapy in the treatment of chronic hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2002; 22 Suppl 1: 7-13
- Liaw YF. Therapy of chronic hepatitis B: current challenges and opportunities. *J Viral Hepat* 2002; 9: 393-399
- Wolters LM, Hansen BE, Niesters HG, de Man RA. Viral dynamics in chronic hepatitis B patients treated with lamivudine, lamivudine-famciclovir or lamivudine-ganciclovir. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 1007-1011
- Song JW, Zhang G, Lin JG, Tang WX, Lin JS. [Clinical study of lamivudine and interferon combinate administration to inhibit hepatitis B virus replication] *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2004; 12: 593-596
- Patil SD, Rhodes DG, Burgess DJ. DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review. *AAPS J* 2005; 7: E61-E77
- Gruegelsiepe H, Brandt O, Hartmann RK. Antisense inhibition of RNase P: mechanistic aspects and application to live bacteria. *J Biol Chem* 2006; 281: 30613-30620
- Wo JE, Wu XL, Zhou LF, Yao HP, Chen LW, Dennin RH. Effective inhibition of expression of hepatitis B virus genes by DNazymes. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3504-3507
- Wengel J, Petersen M, Frieden M, Koch T. Chemistry of locked nucleic acids(LNA): Design, synthesis, and bio-physical properties. *Lett Pept Sci* 2003; 10: 237-253
- Inohara H, Obika S, Imanishi T. 2',4'-BNA derivatives bearing an unnatural nucleobase: synthesis and application to triplex-forming oligonucleotides. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* 2004; (48): 63-64
- Braasch DA, Liu Y, Corey DR. Antisense inhibition of gene expression in cells by oligonucleotides incorporating locked nucleic acids: effect of mRNA target sequence and chimera design. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 5160-5167
- Rapozzi V, Cogoi S, Xodo LE. Antisense locked nucleic acids efficiently suppress BCR/ABL and induce cell growth decline and apoptosis in leukemic cells. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 1683-1692
- Swayze EE, Siwkowski AM, Wancewicz EV, Migawa MT, Wyrzykiewicz TK, Hung G, Monia BP, Bennett CF. Antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid improve potency but cause significant hepatotoxicity in animals. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 687-700
- Elmén J, Thonberg H, Ljungberg K, Frieden M, Westergaard M, Xu Y, Wahren B, Liang Z, Ørum H, Koch T, Wahlestedt C. Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 439-447
- Castoldi M, Schmidt S, Benes V, Noerholm M, Kulozik AE, Hentze MW, Muckenthaler MU. A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA). *RNA* 2006; 12: 913-920
- Vester B, Hansen LH, Lundberg LB, Babu BR, Sørensen MD, Wengel J, Douthwaite S. Locked nucleoside analogues expand the potential of DNazymes to cleave structured RNA targets. *BMC Mol Biol* 2006; 7: 19
- Braasch DA, Corey DR. Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. *Chem Biol* 2001; 8: 1-7
- Arzumanov A, Walsh AP, Rajwanshi VK, Kumar R, Wengel J, Gait MJ. Inhibition of HIV-1 Tat-dependent trans activation by steric block chimeric 2'-O-methyl/LNA oligoribonucleotides. *Biochemistry* 2001; 40: 14645-14654
- Nulf CJ, Corey D. Intracellular inhibition of hepatitis C virus (HCV) internal ribosomal entry site (IRES)-dependent translation by peptide nucleic acids (PNAs) and locked nucleic acids (LNAs). *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 3792-3798
- 唐盈, 王燕菲. 针对HBVS基因的反义锁核酸抗乙肝病毒表达的初探. *江西医药* 2006; 41: 205-208
- Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology.



- Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 51-68
- 29 Funk A, Mhamdi M, Will H, Sirma H. Avian hepatitis B viruses: molecular and cellular biology, phylogenesis, and host tropism. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 91-103
- 30 Madden CR, Finegold MJ, Slagle BL. Hepatitis B virus X protein acts as a tumor promoter in development of diethylnitrosamine-induced preneoplastic lesions. *J Virol* 2001; 75: 3851-3858
- 31 陈枫, 郑素军, 钟森, 邓存良, 王明勇, 张建军, 廖国伟. 乙型肝炎病毒转基因小鼠体内肝靶向反义RNA抗病毒疗效研究. *四川医学* 2002; 23: 833-835
- 32 钟森, 郑素军, 陈枫, 张建军, 邓存良, 温守明, 王升启. 靶向反义硫代寡脱氧核苷酸抗病毒疗效的实验研究. *中华肝脏病杂志* 2002; 10: 78-82
- 33 曹英林, 刘素侠, 张利宁, 马春红, 丁培芳, 孙汶生, 丁红转. 针对HBV X基因区三个关键位点的反义寡核苷酸体内抑瘤研究. *山东大学学报(医学版)* 2002; 40: 338-340
- 34 张政, 席宏丽, 公维波, 李文刚, 于敏, 曾争, 徐小元. 逆转录病毒介导双靶区反义RNA在转基因小鼠肝细胞中的表达及对HBV DNA复制的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2551-2555

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》性质、刊登内容及目标

**本刊讯** 《世界华人消化杂志(国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology*)》, 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的496位胃肠病学和肝病专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

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

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

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医中药学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究者提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。(常务副总编辑: 张海宁 2009-08-18)



## 脂联素在小鼠急性肝损伤中的表达及作用

尹洪竹, 邸海灵, 曹治宸, 刘英辉, 刘芳

### ■背景资料

目前研究证实脂联素有一定的抗炎作用。那么, 对病毒性肝炎脂联素是否也能起到抗炎作用? 刀豆蛋白A诱导的肝炎病理生理特点与人急性肝炎相似, 故本文观察了脂联素在ConA诱导的急性肝炎的表达及对炎症的作用, 旨在为病毒性肝炎的治疗提供新途径。

尹洪竹, 刘英辉, 刘芳, 河北医科大学第三医院感染科 河北省石家庄市 050051

邸海灵, 河北医科大学第三医院感控科 河北省石家庄市 050051

曹治宸, 河北医科大学第三医院中西医结合肝病科 河北省石家庄市 050051

尹洪竹, 博士, 副教授, 副主任医师, 主要从事病毒性肝炎及感染性疾病的基础与临床研究。

**作者贡献分布:** 尹洪竹对此文贡献最大, 邸海灵与曹治宸对此文所作贡献均等; 此课题由尹洪竹与曹治宸设计; 研究过程由尹洪竹、邸海灵及刘英辉操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹治宸提供; 数据分析由尹洪竹与邸海灵完成; 本论文写作由尹洪竹、曹治宸及刘芳完成。

**通讯作者:** 尹洪竹, 博士, 副教授, 副主任医师, 050051, 河北省石家庄市自强路139号, 河北医科大学第三医院感染科。

yinhongzh@126.com

电话: 0311-88602050

收稿日期: 2009-04-22 修回日期: 2009-07-12

接受日期: 2009-07-20 在线出版日期: 2009-08-18

### Expression and role of adiponectin in murine acute liver injury

Hong-Zhu Yin, Hai-Ling Di, Zhi-Chen Cao,  
Ying-Hui Liu, Fang Liu

Hong-Zhu Yin, Ying-Hui Liu, Fang Liu, Department of Infectious Diseases, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China

Hai-Ling Di, Department of Infection Control, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, 050051, Hebei Province, China

Zhi-Chen Cao, Department of Integrated Chinese and Western Medicine on Liver Diseases, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China

Correspondence to: Professor Hong-Zhu Yin, Department of Infectious Diseases, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China. yinhongzh@126.com

Received: 2009-04-22 Revised: 2009-07-12

Accepted: 2009-07-20 Published online: 2009-08-18

### Abstract

**AIM:** To investigate the expression and role of adiponectin in murine acute liver injury.

**METHODS:** Healthy male BALB/c mice were randomly divided into three groups: concanavalin A (ConA) treatment group ( $n = 8$ ; intravenously injected with ConA at 30 mg/kg), adiponectin treatment group ( $n = 5$ ; intraperitoneally injected with adiponectin at 3 mg/kg at 12 and 3

hours before ConA injection) and normal control group ( $n = 8$ ; intravenously injected with normal saline at 10 mL/kg). Mice were sacrificed eight hours after ConA treatment to detect serum adiponectin and ALT levels, observe hepatic pathological changes and determine the expression of adiponectin mRNA and protein in the liver.

**RESULTS:** Though no significant difference was observed in serum adiponectin levels between the adiponectin treatment group and the normal control group, serum adiponectin levels in these two groups were significantly higher than that in the ConA treatment group ( $15.4 \pm 3.0$  mg/L and  $16.5 \pm 2.8$  mg/L vs  $11.8 \pm 2.1$  mg/L, respectively;  $P < 0.05$  or  $0.01$ ). The expression intensity of adiponectin protein in the liver in the adiponectin treatment group was higher than that in the normal control group ( $5.39\% \pm 1.72\%$  vs  $1.82\% \pm 0.36\%$ ,  $P < 0.05$ ) but lower than that in the ConA treatment group ( $10.63\% \pm 4.35\%$ ,  $P < 0.05$ ). The expression levels of adiponectin mRNA in the liver in the adiponectin treatment group and the ConA treatment group were significantly higher than that in the normal control group ( $0.46 \pm 0.17$  and  $0.51 \pm 0.21$  vs  $0.23 \pm 0.05$ , respectively;  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The serum ALT level and the degree of hepatitis in the adiponectin treatment group were higher than those in the normal control group ( $192.50 \pm 45.87$  U/L vs  $44.71 \pm 21.29$  U/L and  $21.5 \pm 9.2$  vs  $8.4 \pm 4.3$ , respectively; both  $P < 0.05$ ), but lower than those in the ConA treatment group ( $616.00 \pm 171.50$  U/L and  $48.5 \pm 8.6$ , respectively; both  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** The expression of adiponectin mRNA and protein in the liver is upregulated in ConA-mediated acute liver injury though serum adiponectin level is lowered. Adiponectin may have antiinflammatory effects in ConA-induced acute liver injury.

**Key Words:** Adiponectin; Concanavalin A; Acute liver injury

Yin HZ, Di HL, Cao ZC, Liu YH, Liu F. Expression and role of adiponectin in murine acute liver injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(23): 2346-2351

### ■同行评议者

戴朝六, 教授, 中国医科大学第二临床学院(盛京医院)肝胆外科

## 摘要

**目的:** 观察脂联素在小鼠急性肝损伤的表达及作用.

**方法:** 健康♂BALB/c小鼠随机分为3组. 刀豆蛋白A(concanavalin A, ConA)组8只: ConA 30 mg/kg 尾静脉注射. 脂联素组5只: 在静脉注射ConA前12 h和2 h, 分别应用脂联素3 mg/kg腹腔内注射. 对照组8只: 尾静脉注射生理盐水10 mL/kg. 注射ConA 8 h后处死小鼠, 检测脂联素及ALT血清水平、肝组织病理变化、肝组织脂联素蛋白及mRNA的表达.

**结果:** 脂联素血清水平在脂联素组与对照组无差异, 2组均高于ConA组( $15.4 \pm 3.0$  mg/L,  $16.5 \pm 2.8$  mg/L vs  $11.8 \pm 2.1$  mg/L,  $P < 0.05$ 或 $0.01$ ); 肝组织脂联素蛋白表达在脂联素组强于对照组( $5.39\% \pm 1.72\%$  vs  $1.82\% \pm 0.36\%$ ,  $P < 0.05$ ), 弱于ConA组( $10.63 \pm 4.35\%$ ,  $P < 0.05$ ); 肝组织脂联素mRNA表达在脂联素组和ConA组均强于对照组( $0.46 \pm 0.17$ ,  $0.51 \pm 0.21$  vs  $0.23 \pm 0.05$ ,  $P < 0.05$ 或 $0.01$ ); 血清ALT水平及肝组织炎症程度脂联素组高于对照组( $192.50 \pm 45.87$  U/L vs  $44.71 \pm 21.29$  U/L;  $21.5 \pm 9.2$  vs  $8.4 \pm 4.3$ , 均 $P < 0.05$ ), 低于ConA组( $616.00 \pm 171.50$  U/L,  $48.5 \pm 8.6$ , 均 $P < 0.05$ ).

**结论:** 在ConA诱导的急性肝损伤中, 肝组织脂联素蛋白及其mRNA的表达增强, 但血清脂联素水平降低. 脂联素对急性肝损伤小鼠起着抗炎作用.

**关键词:** 脂联素; 刀豆蛋白A; 急性肝损伤

尹洪竹, 邱海灵, 曹治宸, 刘英辉, 刘芳. 脂联素在小鼠急性肝损伤中的表达及作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(23): 2346-2351

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2346.asp>

## 0 引言

脂联素是由脂肪细胞产生和表达的脂肪因子. 多年来人们一直认为白色脂肪组织是脂联素产生的唯一场所. 然而近年来研究显示, 在正常生理情况下, 骨骼肌、肾脏、输卵管、卵巢、垂体、脾均可检测出脂联素蛋白<sup>[1-5]</sup>, 肝脏也可表达脂联素, 且在许多疾病情况下, 脂联素的表达可发生变化. 如: 非酒精性脂肪性肝病患者脂联素及其mRNA的表达显著低于单纯性脂肪肝患者<sup>[6]</sup>及健康对照者<sup>[7]</sup>; 小鼠注射CCl<sub>4</sub>后, 肝组织脂联素的表达增加<sup>[8]</sup>. 那么在刀豆蛋白A(concanavalin A, ConA)诱导的急性肝损伤中,

脂联素的表达是增强还是减弱, 脂联素在急性肝损伤中起什么作用, 本实验对此进行了观察.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康♂BALB/c小鼠21只, 周龄4 wk, 体质量 $20 \pm 3$  g, 购自河北医科大学动物实验中心(清洁级, 实验动物使用许可证号: SCXK(冀)2003-1-003); 血清脂联素检测试剂盒由上海森雄科技实业有限公司提供; 小鼠脂联素mAb购于英国Abcam公司.

### 1.2 方法

**1.2.1 分组及给药:** 小鼠用标准饲料喂养1 wk后, 随机分为3组. ConA组( $n = 8$ ): 尾静脉注射ConA 30 mg/kg. 对照组( $n = 8$ ): 尾静脉注射生理盐水10 mL/kg. 脂联素组( $n = 5$ ): 在静脉注射ConA前12 h和2 h, 分别应用脂联素3 mg/kg腹腔内注射(其余2组同时给予相当剂量的生理盐水腹腔内注射). 实验动物在注射ConA前12 h开始禁食.

**1.2.2 取材及指标检测:** 注射ConA 8 h后股动脉放血处死小鼠, 留取血清及肝组织. 血清脂联素的检测采用酶联免疫吸附试验法; 肝组织脂联素检测采用免疫组织化学法; 脂联素mRNA采用逆转录-聚合酶链反应检测, 脂联素引物序列依据文献设计, 由上海生物工程公司合成: 上游: 5'-GTCAGTGGATCTGACGACACCAA-3', 下游: 5'-ATGCCTGCCATCCA ACCTG-3', 扩增产物为171 bp; ALT的检测采用速率法. 病理学检查采用常规HE染色, 观察肝组织病理变化(肝组织炎症和细胞病变的程度). 用病理指标评定肝损伤程度. 病理指数的确定<sup>[9]</sup>: 在高倍镜下每次取20个视野, 每一视野分3等份; “0”记整个视野无组织炎症及肝细胞病变; “1”记发生上述病变 $< 1/3$ 视野; “2”记发生上述病变 $1/3-2/3$ 视野; “3”记发生上述病变 $> 2/3$ 视野; 20个视野得分相加即为肝细胞的病理指数PI值.

**统计学处理** 使用SPSS12.0统计软件处理实验数据, 所有数据以mean $\pm$ SD表示, 样本均数比较采用秩和检验,  $P < 0.05$ 认为有显著性差异.

## 2 结果

**2.1 肝脏的普通病理变化** 光镜下, 对照组小鼠肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列, 汇管区无炎症细胞浸润. ConA组可见肝内大量T淋巴细胞浸润, 在汇管区尤为明显, 肝窦内红细胞淤积, 中央静脉周围肝细胞水肿明显, 可见点、灶状坏死区. 脂联素组肝组织炎症细胞浸润明显减

## ■ 创新盘点

本文不仅观察了脂联素对ConA诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用, 而且还观察了脂联素在急性肝损伤小鼠肝脏及血清中的表达变化, 并阐述其原因.



### ■应用要点

本研究表明脂联素对刀豆蛋白A(ConA)所致急性肝损伤的干预作用,具有一定的临床应用价值及理论指导意义,有很好的社会效益和经济前景。

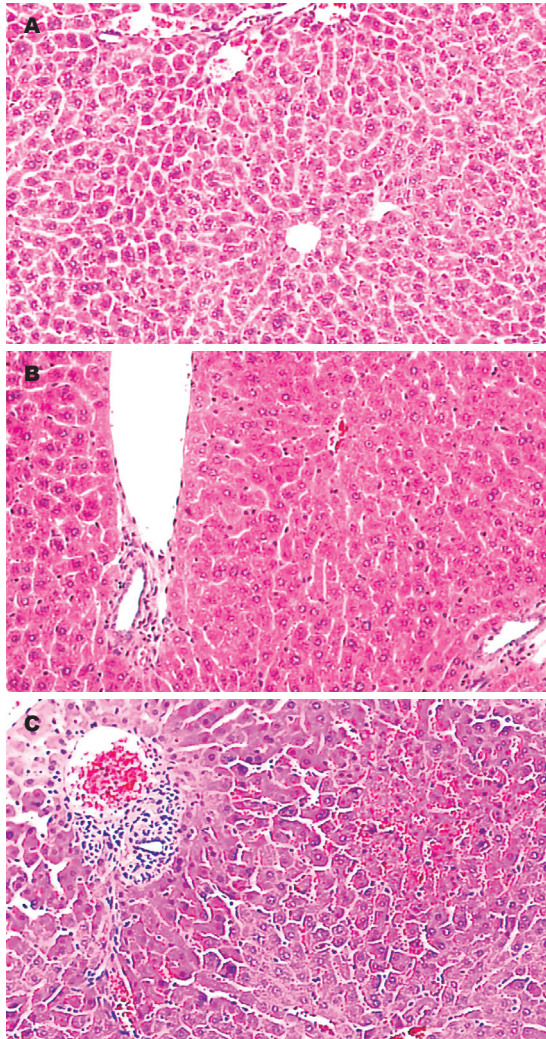


图1 各组小鼠肝组织病理(HE染色×100)。A: 对照组; B: 脂联素组; C: ConA组。

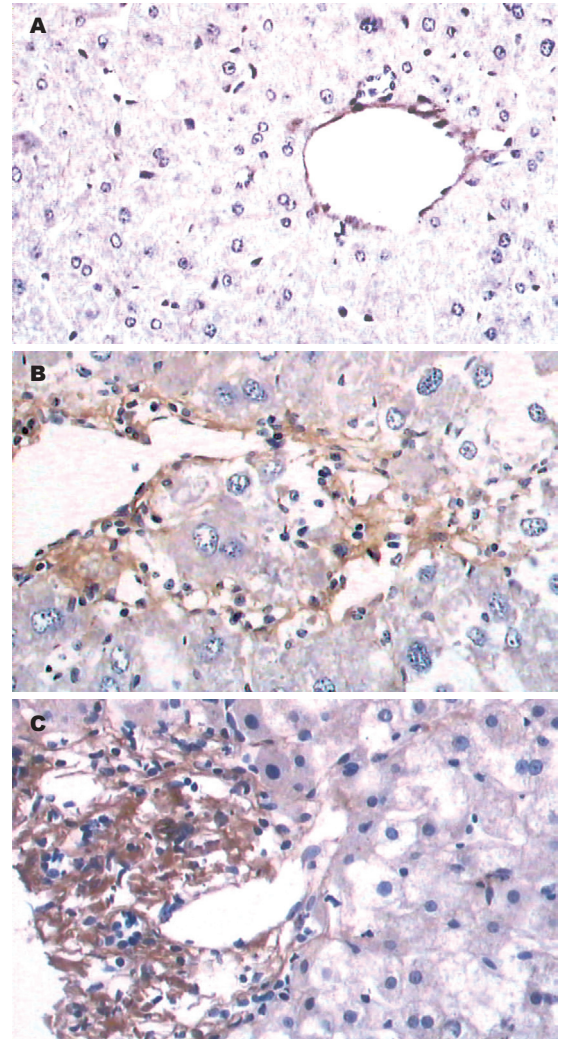


图2 脂联素蛋白在小鼠肝脏的表达。A: 对照组(×100); B: 脂联素组(×200); C: ConA组(×200)。

表1 各组小鼠肝脏病理指数和血清ALT水平(mean ± SD)

分组	n	PI	ALT(U/L)
对照组	8	8.4 ± 4.3	44.71 ± 21.29
脂联素组	5	21.5 ± 9.2 <sup>a</sup>	192.50 ± 45.87 <sup>a</sup>
ConA组	8	48.5 ± 8.6 <sup>bc</sup>	616.00 ± 171.50 <sup>bc</sup>

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 对照组; <sup>c</sup>P<0.05 vs 脂联素组。

轻,无明显淤血,可见肝细胞轻度水肿(图1)。各组病理变化用病理指数评定(表1)。

2.2 各组小鼠血清ALT检测结果 对照组、脂联素组、ConA组ALT水平逐渐升高,统计学分析显示,脂联素组血清ALT水平高于对照组,ConA组ALT水平高于脂联素组和对照组(表1)。

2.3 血清脂联素的检测结果 对照组、脂联素组、ConA组血清脂联素水平逐渐下降,统计学分析显示,脂联素组与对照组比较无差异,2组均高于ConA组(表2)。

2.4 肝组织脂联素蛋白的表达 对照组小鼠肝组织脂联素蛋白表达阳性,主要表达在中央静脉内皮细胞。ConA组和脂联素组肝组织脂联素蛋白表达增强,主要表达于炎症细胞浸润区、门脉血管和部分肝窦内皮(图2)。以平均面密度表示蛋白表达量见表2。

2.5 肝组织脂联素mRNA的表达 对照组小鼠肝组织即可检测到少量脂联素mRNA表达,脂联素组和ConA组表达增强(图3)。凝胶图像系统分析结果见表2。

### 3 讨论

本实验结果显示,小鼠尾静脉注射ConA,可引起肝脏炎症细胞浸润、肝窦淤血、肝细胞水肿及灶状坏死,为典型肝炎病变。如在ConA攻击前用脂联素干预,可减轻ConA诱导的肝脏炎症细胞浸润,减少肝窦淤血,证明脂联素具有减轻ConA所致的小鼠急性肝损伤的作



表 2 脂联素的血清水平及其蛋白和RNA在肝脏中的表达 (mean ± SD)

分组	n	血清脂联素(mg/L)	脂联素蛋白(%)	脂联素mRNA(%)
对照组	8	16.5 ± 2.8	1.82 ± 0.36	0.23 ± 0.05
脂联素组	5	15.4 ± 3.0	5.39 ± 1.72 <sup>a</sup>	0.46 ± 0.17 <sup>a</sup>
ConA组	8	11.8 ± 2.1 <sup>bc</sup>	10.63 ± 4.35 <sup>bd</sup>	0.51 ± 0.21 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 对照组; <sup>c</sup>P<0.05, <sup>d</sup>P<0.01 vs 脂联素组.

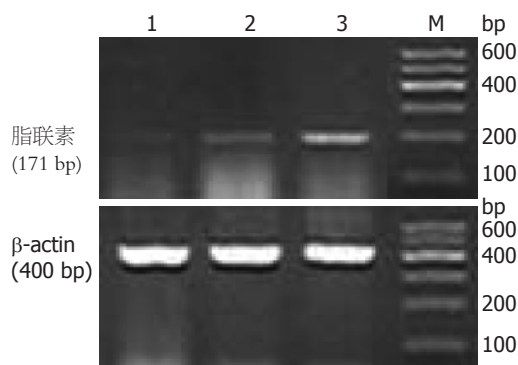


图 3 脂联素mRNA在小鼠肝脏中的表达. M: Marker; 1: 对照组; 2: 脂联素; 3: ConA组.

用. 其机制与脂联素促进巨噬细胞产生抗炎细胞因子白介素-10(interleukin-10, IL-10)、负向调节NK细胞的活性有关<sup>[10-12]</sup>. 最近研究还显示<sup>[13]</sup>: 脂联素对于肝再生也起着重要作用.

脂联素主要由脂肪组织表达和分泌, 但在适当的刺激下也可表达在脂肪细胞以外的其他细胞. 本实验显示, 正常小鼠肝组织即可有脂联素蛋白的表达, 在ConA诱导的急性肝损伤可增强脂联素蛋白在肝脏的表达, 这与Wolf *et al*报道一致<sup>[14]</sup>. 那么, 脂联素增强表达的机制是什么? Delaigle *et al*<sup>[15]</sup>应用脂多糖注射小鼠, 发现脂联素在骨骼肌的表达增强, 用炎症因子肿瘤细胞坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、干扰素- $\gamma$ (interferon  $\gamma$ , INF- $\gamma$ )、IL-6、IL-1干预体外培养的骨骼肌细胞, 发现TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$ 联合干预组脂联素水平明显升高, 且应用一氧化氮合成抑制剂则减少脂联素表达. 在ConA诱导的肝损伤中, 上述炎症因子和NO含量均增加<sup>[16]</sup>, 推测在ConA诱导的急性炎症情况下, 肝组织脂联素表达增强与炎症细胞因子和NO的增高有关. 用IL-6孵育人肝癌HepG2细胞可观察到脂联素的诱导表达支持这一观点. 本文结果还显示: 脂联素在炎症细胞浸润区表达增强. 体外研究显示<sup>[14]</sup>, 正常肝组织来源的巨噬细胞即可表达脂联素mRNA. 在ConA刺激下, 肝组织淋巴细胞浸润增多, 尤其在汇管区, 推测淋巴细胞表达脂联素增强, 脂联素

通过与其受体结合而发挥生物学作用.

炎症情况下肝组织脂联素增强表达具有什么生理意义呢? 脂联素在多种细胞系均是TNF- $\alpha$ 产生的对抗剂<sup>[17-19]</sup>, 并可减轻TNF- $\alpha$ 诱导的原代肝细胞死亡<sup>[20]</sup>. Maeda *et al*<sup>[21]</sup>报道脂联素缺乏小鼠脂肪组织显示高水平TNF- $\alpha$  mRNA和血浆浓度, 但如果将脂联素基因高效表达载体导入小鼠体内或补充外源性脂联素, 均可降低TNF- $\alpha$ 血清水平<sup>[22-23]</sup>. 而且本文结果显示, 注射外源脂联素, 可降低ConA诱导的小鼠ALT水平. 因此, 在肝组织急性炎症情况下脂联素的增强表达可能是对抗促炎因子TNF- $\alpha$ 而形成的负反馈弧以抗衡肝脏炎症. 研究还显示<sup>[24-25]</sup>, 脂联素诱导人白细胞抗炎细胞因子IL-10和IL-1RA的产生, 抑制促炎因子IL-8的产生, 这些资料均提示脂联素有抑制炎症反应的作用.

尽管在急性炎症条件下, 肝组织和骨骼肌脂联素的表达增加, 但本研究结果显示, 注射ConA后小鼠血清脂联素水平是下降的. 考虑其原因与脂肪组织脂联素表达下降有关. TNF- $\alpha$ 是ConA诱导肝损害的首要介质, TNF- $\alpha$ 可在转录水平抑制3T3-L1脂肪细胞脂联素的表达并减少原代人脂肪细胞脂联素蛋白的表达和分泌<sup>[24]</sup>; Saijo *et al*<sup>[25]</sup>研究也发现, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IFN- $\gamma$ 以剂量和时间依赖的方式抑制人脂肪细胞总脂联素的分泌; IL-6、IL-18也可抑制培养的3T3-L1脂肪细胞脂联素mRNA和蛋白的表达<sup>[26-27]</sup>. 应用可溶性TNF- $\alpha$ 受体可使循环脂联素水平升高, 并减轻ConA诱导的肝损伤(ALT水平下降), 升高脂肪组织脂联素mRNA表达<sup>[28]</sup>. 说明促炎细胞因子抑制脂肪细胞脂联素的分泌和表达. 另外, NO也抑制3T3-L1脂肪细胞脂联素的表达<sup>[29-31]</sup>. 注射ConA抑制脂肪组织生成脂联素而导致循环脂联素水平的下降, 表明脂肪组织脂联素的分泌对循环脂联素的定量起着决定性的作用. 但ConA诱导肝损害不排除在肌肉或肝脏的局部以与脂肪组织相反的方式对脂联素水平进行调节.

#### 同行评价

本研究探讨了急性肝损伤时肝组织脂联素表达及其意义, 并分析了肝组织脂联素表达与血清脂联素水平之间产生剪刀差的原因, 内容有一定的科学性、创新性和可读性, 一定程度上反映了我国胃肠病学基础研究的水平.

总之, ConA诱导的小鼠急性肝损伤时, 肝组织脂联素表达增加, 而循环脂联素水平降低, 补充外源性脂联素可明显降低血清ALT水平, 对肝损伤呈现一种保护作用。

#### 4 参考文献

- Punyadeera C, Zorenc AH, Koopman R, McAinch AJ, Smit E, Manders R, Keizer HA, Cameron-Smith D, van Loon LJ. The effects of exercise and adipose tissue lipolysis on plasma adiponectin concentration and adiponectin receptor expression in human skeletal muscle. *Eur J Endocrinol* 2005; 152: 427-436
- Rovin BH, Song H, Hebert LA, Nadasdy T, Nadasdy G, Birmingham DJ, Yung Yu C, Nagaraja HN. Plasma, urine, and renal expression of adiponectin in human systemic lupus erythematosus. *Kidney Int* 2005; 68: 1825-1833
- Archanco M, Gómez-Ambrosi J, Tena-Sempere M, Frühbeck G, Burrell MA. Expression of leptin and adiponectin in the rat oviduct. *J Histochem Cytochem* 2007; 55: 1027-1037
- Chabrolle C, Tosca L, Dupont J. Regulation of adiponectin and its receptors in rat ovary by human chorionic gonadotrophin treatment and potential involvement of adiponectin in granulosa cell steroidogenesis. *Reproduction* 2007; 133: 719-731
- Maddineni S, Metzger S, Ocón O, Hendricks G 3rd, Ramachandran R. Adiponectin gene is expressed in multiple tissues in the chicken: food deprivation influences adiponectin messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 2005; 146: 4250-4256
- Kaser S, Moschen A, Cayon A, Kaser A, Crespo J, Pons-Romero F, Ebenbichler CF, Patsch JR, Tilg H. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2005; 54: 117-121
- Pagano C, Soardo G, Esposito W, Fallo F, Basan L, Donnini D, Federspil G, Sechi LA, Vettor R. Plasma adiponectin is decreased in nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Endocrinol* 2005; 152: 113-118
- Yoda-Murakami M, Taniguchi M, Takahashi K, Kawamata S, Saito K, Choi-Miura NH, Tomita M. Change in expression of GBP28/adiponectin in carbon tetrachloride-administrated mouse liver. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285: 372-377
- 陈姬秀, 韩絮琳, 秦一中. 刀豆素A诱导小鼠急性肝损害模型的形态改变及Fas和FasL的表达. *中华肝脏病杂志* 2000; 18: 121-123
- Huang H, Park PH, McMullen MR, Nagy LE. Mechanisms for the anti-inflammatory effects of adiponectin in macrophages. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23 Suppl 1: S50-S53
- Park PH, McMullen MR, Huang H, Thakur V, Nagy LE. Short-term treatment of RAW264.7 macrophages with adiponectin increases tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) expression via ERK1/2 activation and Egr-1 expression: role of TNF-alpha in adiponectin-stimulated interleukin-10 production. *J Biol Chem* 2007; 282: 21695-21703
- Kim KY, Kim JK, Han SH, Lim JS, Kim KI, Cho DH, Lee MS, Lee JH, Yoon DY, Yoon SR, Chung JW, Choi I, Kim E, Yang Y. Adiponectin is a negative regulator of NK cell cytotoxicity. *J Immunol* 2006; 176: 5958-5964
- Ezaki H, Yoshida Y, Saji Y, Takemura T, Fukushima J, Matsumoto H, Kamada Y, Wada A, Igura T, Kihara S, Funahashi T, Shimomura I, Tamura S, Kiso S, Hayashi N. Delayed liver regeneration after partial hepatectomy in adiponectin knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 378: 68-72
- Wolf AM, Wolf D, Avila MA, Moschen AR, Berasain C, Enrich B, Rumpold H, Tilg H. Up-regulation of the anti-inflammatory adipokine adiponectin in acute liver failure in mice. *J Hepatol* 2006; 44: 537-543
- Delaigle AM, Jonas JC, Bauche IB, Cornu O, Brichard SM. Induction of adiponectin in skeletal muscle by inflammatory cytokines: in vivo and in vitro studies. *Endocrinology* 2004; 145: 5589-5597
- 马雪莲, 李跃华, 高建新. 刀豆蛋白A诱导的肝损伤中核因子- $\kappa$ B对诱导型一氧化氮合酶表达的调控及其意义. *山东大学学报* 2005; 43: 98-102
- Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H, Yasuda T, Noguchi H, Seike M, Yoshimatsu H. Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice. *Hepatology* 2004; 40: 177-184
- Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Tenner AJ, Tomiyama Y, Matsuzawa Y. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood* 2000; 96: 1723-1732
- Park PH, Huang H, McMullen MR, Mandal P, Sun L, Nagy LE. Suppression of lipopolysaccharide-stimulated tumor necrosis factor-alpha production by adiponectin is mediated by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem* 2008; 283: 26850-26858
- Sennello JA, Fayad R, Morris AM, Eckel RH, Asilmaz E, Montez J, Friedman JM, Dinarello CA, Fantuzzi G. Regulation of T cell-mediated hepatic inflammation by adiponectin and leptin. *Endocrinology* 2005; 146: 2157-2164
- Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa Y. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 2002; 8: 731-737
- 王会中, 林虎, 高德禄, 詹林盛, 王全立. 脂联素对刀豆球蛋白A诱导小鼠免疫性肝损伤的保护作用. *中华肝脏病杂志* 2007; 15: 209-211
- Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 2003; 112: 91-100
- Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Enrich B, Tilg H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 323: 630-635
- Saijo S, Nagata K, Nakano Y, Tobe T, Kobayashi Y. Inhibition by adiponectin of IL-8 production by human macrophages upon coculturing with late apoptotic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 334: 1180-1183
- Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A, Richelsen B. Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285: E527-E533
- Simons PJ, van den Pangaart PS, Aerts JM, Boon L. Pro-inflammatory delipidizing cytokines reduce



- adiponectin secretion from human adipocytes without affecting adiponectin oligomerization. *J Endocrinol* 2007; 192: 289-299
- 28 Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, Klein J, Paschke R. Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 301: 1045-1050
- 29 Chandrasekar B, Patel DN, Mummidu S, Kim JW, Clark RA, Valente AJ. Interleukin-18 suppresses adiponectin expression in 3T3-L1 adipocytes via a novel signal transduction pathway involving ERK1/2-dependent NFATc4 phosphorylation. *J Biol Chem* 2008; 283: 4200-4209
- 30 Morris AM, Sennello JA, Fayad RA, Eckel RH, Dinarello CA, Fantuzzi G. T cell-mediated hepatic inflammation modulates adiponectin levels in mice: role of tumor necrosis factor alpha. *Metabolism* 2006; 55: 555-559
- 31 Nozaki M, Fukuhara A, Segawa K, Okuno Y, Abe M, Hosogai N, Matsuda M, Komuro R, Shimomura I. Nitric oxide dysregulates adipocytokine expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 364: 33-39

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》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 kDa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+、-、 $\pm$ 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mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm $\times$ 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、 $\text{CO}_2$ 结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B<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%  $\text{CO}_2$ , 50 mL/L  $\text{CO}_2$ ; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm =  $45 \times 10^{-6}$ ; 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 2009-08-18)

## 褪黑素对大鼠急性坏死性胰腺炎的干预作用及机制

钟卫一, 唐国都, 梁志海, 黄文福, 梁金仙, 王珺平

### ■背景资料

急性坏死性胰腺炎的发病与氧化应激密切相关。氧化应激时产生大量氧化物(主要是氧自由基)造成胰腺腺细胞的损伤, 这是急性坏死性胰腺炎发病的重要机制之一。硫氧还蛋白和褪黑素都有抗氧化作用, 褪黑素干预对Trx-1表达造成何种影响, 至今尚无两者相互作用的研究报道。

钟卫一, 唐国都, 梁志海, 黄文福, 梁金仙, 王珺平, 广西医科大学第一附属医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530021  
钟卫一, 广西民族医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530001  
钟卫一, 副主任医师, 主要从事消化内科临床工作。

广西自然科学基金资助项目(桂科学), No. 0728107  
作者贡献分布: 此课题由唐国都、梁志海及钟卫一设计; 研究过程由钟卫一、黄文福、梁金仙及王珺平操作完成; 本论文写作由钟卫一、黄文福、梁金仙及王珺平完成。

通讯作者: 唐国都, 530021, 广西壮族自治区南宁市双拥路6号, 广西医科大学第一附属医院消化内科。tguodu02@yahoo.com.cn  
电话: 0771-5356501

收稿日期: 2009-05-30 修回日期: 2009-07-22  
接受日期: 2009-07-27 在线出版日期: 2009-08-18

### Mechanisms underlying the effects of melatonin intervention on acute necrotizing pancreatitis in rats

Wei-Yi Zhong, Guo-Du Tang, Zhi-Hai Liang, Wen-Fu Huang, Jin-Xian Liang, Jun-Ping Wang

Wei-Yi Zhong, Guo-Du Tang, Zhi-Hai Liang, Wen-Fu Huang, Jin-Xian Liang, Jun-Ping Wang, Department of Digestive Diseases, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Wei-Yi Zhong, Department of Digestive Diseases, Guangxi Minzu Hospital, Nanning 530001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Guangxi, Gui Ke Zi, No. 0728107

Correspondence to: Guo-Du Tang, Department of Digestive Diseases, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, 6 Shuangyong Road, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. tguodu02@yahoo.com.cn

Received: 2009-05-30 Revised: 2009-07-22

Accepted: 2009-07-27 Published online: 2009-08-18

### Abstract

**AIM:** To investigate the relationship between the protective effects of melatonin pre-intervention for the pancreas and lungs and the expression of thioredoxin-1 (Trx-1) in rats with acute necrotizing pancreatitis (ANP).

**METHODS:** Seventy-two male Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups: normal control group, ANP group and melatonin treatment group. The ANP model rats were induced by giving rats three intraperitoneal injections of 6% L-arginine at a dose of 25 mL/kg

body weight at an interval of 1 h. In the normal control group, normal rats were intraperitoneally injected with normal saline. Rats in the ANP group were intraperitoneally injected with normal saline one half hour before and after ANP induction, while rats in the melatonin treatment group were intraperitoneally injected with a single dose of 0.25% melatonin (20 mL/kg body weight) one half hour prior to ANP induction. Rats were sacrificed at 6, 12 and 24 h after the last L-arginine injection, respectively. The pancreas, lungs and blood samples were quickly taken. The pathological changes in the pancreas and lungs were observed and scored. The serum contents of Trx-1, IL-6, glutathione (GSH), total superoxide dismutase (T-SOD) and malondialdehyde (MDA) were measured.

**RESULTS:** Pathological analysis proved that L-arginine administration induced ANP successfully. Compared to the ANP group, pathological changes in the pancreas and lungs in the melatonin treatment group were significantly alleviated. Compared to the normal control group, serum Trx-1 contents in the ANP group were significantly decreased at 6- and 12-h time points but significantly increased at 24-h time point, exhibiting an initial decrease followed by a gradual increase. Serum Trx-1 contents in the melatonin treatment group at 6- and 12-h time points were significantly higher than those in the ANP group. Compared to the normal control group, serum IL-6 and MDA levels in the ANP group were significantly elevated, whereas serum T-SOD and GSH levels were significantly decreased. In contrast, serum IL-6 and MDA levels in the melatonin treatment group were significantly decreased while serum T-SOD and GSH levels were significantly increased when compared with the ANP group.

**CONCLUSION:** ANP can induce the expression of Trx-1. Melatonin pre-intervention is able to further promote the expression of Trx-1, increase serum Trx-1, SOD, and GSH levels and decrease serum IL-6 and MDA levels, thereby reducing pancreatic and pulmonary injury and exerting a protective effect for the pancreas and lungs in ANP rats.

### ■同行评议者

姜慧卿, 教授, 河北医科大学第二医院消化科



Key Words: Melatonin; Acute necrotizing pancreatitis; Thioredoxin 1

Zhong WY, Tang GD, Liang ZH, Huang WF, Liang JX, Wang JP. Mechanisms underlying the effects of melatonin intervention on acute necrotizing pancreatitis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(23): 2352-2356

## 摘要

**目的:** 观察褪黑素前干预对急性坏死性胰腺炎(ANP)大鼠的胰腺和肺组织的保护作用与硫氧还蛋白-1(Trx-1)表达的关系。

**方法:** 72只♂SD大鼠随机分成ANP模型组(A组)、褪黑素前干预组(M组)、对照组(C组)。A组的大鼠腹腔注射6%左旋精氨酸(25 mL/kg 体重), 每次间隔1 h, 共3次, 诱发ANP, 且在诱发ANP前、后0.5 h腹腔注射生理盐水(20 mL/kg 体重)各1次; M组的大鼠诱发ANP的方法同A组, 但在诱发ANP前0.5 h腹腔注射0.25%褪黑素(20 mL/kg 体重)1次, 替代生理盐水; C组的大鼠腹腔注射相当于A组各次注射用量的等容积生理盐水。每组术后6 h、12 h及24 h时点分批处置大鼠。抽血测定Trx-1、白介素-6(IL-6)、谷胱甘肽(GSH)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、丙二醛(MDA)的含量; 取胰腺和肺组织做病理学检查。

**结果:** 大鼠胰腺组织的病理变化和病理学评分证实左旋精氨酸导致A组的ANP。与A组比较, M组胰腺和肺组织的病理损伤显著减轻。与C组比较, A组的大鼠血清的Trx-1的量在6 h、12 h时点显著降低, 24 h时点显著升高, 呈现出先降低后升高的趋势; 与A组比较, M组的大鼠血清的Trx-1的量在6 h、12 h时点显著增高, 他们表达的峰值前移。与C组比较, A组的大鼠血清的IL-6、MDA水平显著增高, 血清的T-SOD活力、GSH的含量显著降低; 与A组比较, M组的大鼠血清的IL-6、MDA水平显著降低, 血清的T-SOD活力、GSH的含量显著增高。

**结论:** ANP可诱导Trx-1的表达; 而褪黑素前干预可进一步促进Trx-1的表达, 提高T-SOD活力和GSH水平, 降低IL-6、MDA水平, 故能显著减轻大鼠胰腺和肺组织的病理损伤, 发挥其对胰腺和肺组织的保护作用。

**关键词:** 褪黑素; 急性坏死性胰腺炎; 硫氧还蛋白-1

钟卫一, 唐国都, 梁志海, 黄文福, 梁金仙, 王珺平. 褪黑素对大鼠急性坏死性胰腺炎的干预作用及机制. *世界华人消化杂志*

2009; 17(23): 2352-2356

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2352.asp>

## 0 引言

急性坏死性胰腺炎(acute necrotizing pancreatitis, ANP)是一种病死率较高的疾病。研究揭示氧化应激、炎性细胞浸润在该疾病发生发展过程中发挥重要作用。褪黑素是非酶类抗氧化物质, 是已知最强的自由基清除剂。硫氧还蛋白是一种氧化还原蛋白, 具有抗氧化和抗炎作用。本文通过建立大鼠ANP动物模型, 并给予外源性褪黑素前干预, 旨在观察褪黑素前干预对ANP胰腺和肺组织的保护作用及对硫氧还蛋白1(thioredoxin 1, Trx-1)表达的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康♂SD大鼠72只, 清洁级, 体质量200-250 g, 由广西医科大学实验动物中心提供; 左旋精氨酸和褪黑素购于Sigma公司; 大鼠Trx-1 ELISA试剂盒由Adlitteram诊断实验室提供; 大鼠白介素6(interleukin-6, IL-6)ELISA试剂盒购于晶美生物公司; 谷胱甘肽(glutathione, GSH)、SOD、MDA试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

### 1.2 方法

**1.2.1 造模及分组:** 所有大鼠造模前禁食12 h, 自由饮水。SD大鼠随机分成ANP组(A组)、褪黑素前干预组(M组)和对照组(C组), 每组各24只。A组的大鼠腹腔注射6%左旋精氨酸(25 mL/kg 体重), 每次间隔1 h, 共3次, 诱发ANP, 且在诱发ANP前、后半小时内腹腔注射生理盐水(20 mL/kg 体重)各1次; M组的大鼠诱发ANP的方法同A组, 但在诱发ANP前半小时腹腔注射0.25%褪黑素(20 mL/kg 体重)1次, 替代生理盐水; C组的大鼠腹腔注射等容积生理盐水作为对照。术后6 h、12 h及24 h每组每时点分别处死8只大鼠, 留取动脉血、胰腺和肺组织标本待测。

**1.2.2 胰腺和肺组织病理学检查:** 胰腺和肺组织常规固定、石蜡包埋、切片及HE染色。光镜下观察大鼠胰腺和肺组织病理改变。胰腺组织病理学评分参考Kusske *et al*<sup>[1]</sup>胰腺损伤的评分标准, 肺组织病理学评分参考Liu *et al*<sup>[2]</sup>肺损伤的评分标准。

**1.2.3 Trx-1、IL-6的测定:** 按ELISA试剂盒说明书操作检测。

**1.2.4 GSH、总超氧化物歧化酶(total superoxide**

## ■ 研究前沿

褪黑素是松果体分泌的主要激素, 具有多种生理功能。近年来, 研究的重点向其抗氧化作用倾斜。目前认为其抗氧化作用的机制主要包括两方面: 一方面, 他能以电子供体的形式直接中和大量的自由基、活性氧和一氧化氮; 另一方面, 通过激活若干抗氧化酶类的活性, 起间接的抗氧化作用。



### ■相关报道

Ohashi *et al*检测重症急性胰腺炎和轻型急性胰腺炎患者血清Trx-1的水平,结果提示前者高于后者,他们认为Trx-1是评价重症急性胰腺炎的严重性与氧化应激的一个可靠指标.他们还发现转基因小鼠由于高表达Trx-1,在诱导急性胰腺炎时氧化应激反应显著减轻.

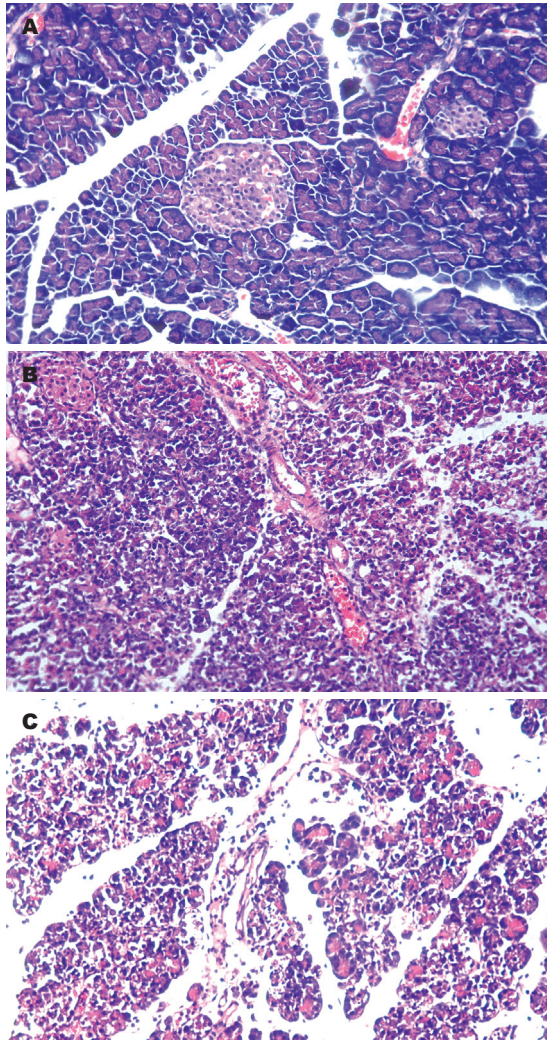


图1 3组大鼠24 h时点胰腺组织镜下观(HE染色 $\times 200$ ). A: C组; B: A组; C: M组.

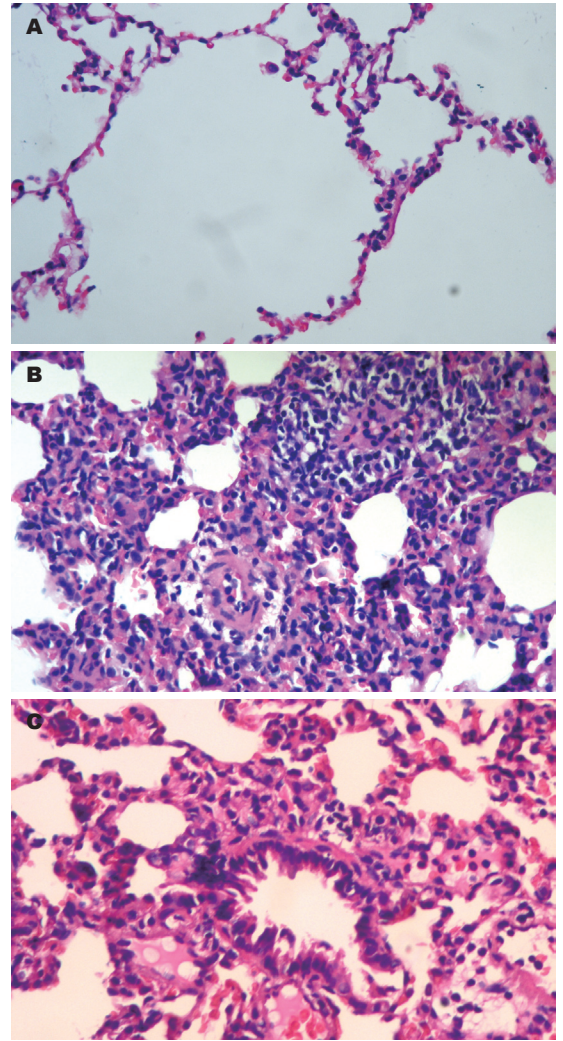


图2 3组大鼠24 h时点肺组织镜下观(HE染色 $\times 200$ ). A: C组; B: A组; C: M组.

dismutase, T-SOD)、MDA的测定:按测试盒的操作说明书进行.

**统计学处理** 应用SPSS13.0统计分析软件处理,各组计量资料以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,行单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 胰腺组织病理变化** C组的大鼠胰腺肉眼观无变化;镜下见胰腺腺泡结构完整,腺小叶清晰,偶见水肿或少量的炎性细胞浸润. A组胰腺外观灰白或暗紫色,腹腔内有淡黄色或血性腹水,可见部分腹腔脏器粘连、脂肪皂化;镜下见胰腺腺泡水肿,炎性细胞浸润,组织坏死出血,腺小叶结构消失,偶见灶性或大片凝固性坏死;病理变化并随时间延长而加重. M组的病变较A组显著减轻(图1,表1).

**2.2 肺组织病理学变化** C组的大鼠镜下见肺组织结构完整,偶见水肿或少量的炎性细胞浸润.

A组的大鼠镜下可见肺间质和肺泡水肿,炎性细胞浸润,间质增宽,毛细血管淤血,间质和肺泡出血水肿,甚至灶性或片状肺不张,病理变化随时间延长而加重. M组的病变较A组显著减轻(图2,表1).

**2.3 血清Trx-1、IL-6的水平** 与C组比较, A组的大鼠血清的Trx-1含量在6、12 h时值显著降低, 24 h时值显著升高,呈现出前低后高的趋势;与A组比较, M组血清的Trx-1含量在6、12 h时显著增高, 24 h时显著降低,量的峰值前移. 与C组比较, A组的各时点和M组的6、12 h时大鼠血清的IL-6含量显著增高;与A组比较, M组在6、12 h时血清的IL-6含量显著降低(表2).

**2.4 血清GSH、T-SOD、MDA的水平** 与C组比较, A组的大鼠血清的T-SOD活力、GSH的含量显著降低, MDA的水平显著增高; M组的大鼠血清的T-SOD活力、GSH的含量无显著差异,但MDA的水平12、24 h时点显著增高. 与A组比较,



表 1 各组胰腺和肺组织病理评分值 ( $n = 8$ , mean  $\pm$  SD)

组织	分组	6 h	12 h	24 h
胰腺	C组	0.14 $\pm$ 0.37	0.14 $\pm$ 0.37	0.33 $\pm$ 0.51
	A组	4.50 $\pm$ 1.19 <sup>a</sup>	5.75 $\pm$ 1.49 <sup>a</sup>	8.43 $\pm$ 1.39 <sup>a</sup>
	M组	1.72 $\pm$ 0.75 <sup>ac</sup>	2.37 $\pm$ 1.18 <sup>ac</sup>	6.57 $\pm$ 0.65 <sup>ac</sup>
肺	C组	0.52 $\pm$ 0.35	0.52 $\pm$ 0.35	1.00 $\pm$ 0.46
	A组	4.00 $\pm$ 1.52 <sup>a</sup>	7.00 $\pm$ 2.98 <sup>a</sup>	9.52 $\pm$ 2.80 <sup>a</sup>
	M组	2.52 $\pm$ 1.03 <sup>ac</sup>	4.00 $\pm$ 1.07 <sup>ac</sup>	7.52 $\pm$ 3.76 <sup>ac</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs C组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs A组.

表 2 血清Trx-1、IL-6的含量变化 ( $n = 8$ , mean  $\pm$  SD)

观察项目	分组	6 h	12 h	24 h
Trx-1 (pg/L)	C组	14.289 $\pm$ 3.645	15.285 $\pm$ 5.178	16.622 $\pm$ 4.607
	A组	7.118 $\pm$ 2.275 <sup>a</sup>	9.611 $\pm$ 4.976 <sup>a</sup>	24.277 $\pm$ 6.646 <sup>a</sup>
	M组	13.566 $\pm$ 3.393 <sup>c</sup>	20.268 $\pm$ 6.868 <sup>ac</sup>	17.672 $\pm$ 7.407 <sup>c</sup>
IL-6 (pg/L)	C组	82.83 $\pm$ 30.70	88.46 $\pm$ 20.36	75.98 $\pm$ 27.68
	A组	233.25 $\pm$ 49.45 <sup>a</sup>	200.72 $\pm$ 45.50 <sup>a</sup>	122.64 $\pm$ 45.98 <sup>a</sup>
	M组	126.00 $\pm$ 40.56 <sup>ac</sup>	160.14 $\pm$ 45.33 <sup>ac</sup>	94.02 $\pm$ 24.20

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs C组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs A组.

表 3 各组血清GSH、T-SOD、MDA的含量变化 ( $n = 8$ , mean  $\pm$  SD)

观察项目	分组	6 h	12 h	24 h
GSH (mg/L)	C组	2.998 $\pm$ 0.741	3.157 $\pm$ 0.732	3.497 $\pm$ 0.913
	A组	1.341 $\pm$ 0.592 <sup>a</sup>	1.869 $\pm$ 0.657 <sup>a</sup>	1.980 $\pm$ 0.657 <sup>a</sup>
	M组	2.964 $\pm$ 0.791 <sup>c</sup>	3.362 $\pm$ 0.908 <sup>c</sup>	3.024 $\pm$ 0.423 <sup>c</sup>
T-SOD (U/L)	C组	136.21 $\pm$ 26.85	141.00 $\pm$ 28.66	131.75 $\pm$ 24.27
	A组	85.93 $\pm$ 42.74 <sup>a</sup>	97.48 $\pm$ 43.48 <sup>a</sup>	94.12 $\pm$ 31.27 <sup>a</sup>
	M组	165.50 $\pm$ 37.18 <sup>c</sup>	155.75 $\pm$ 44.10 <sup>c</sup>	130.75 $\pm$ 36.21 <sup>c</sup>
MDA ( $\mu$ mol/L)	C组	1.681 $\pm$ 0.261	1.846 $\pm$ 0.597	1.865 $\pm$ 0.566
	A组	2.308 $\pm$ 0.522 <sup>a</sup>	3.989 $\pm$ 1.078 <sup>a</sup>	4.959 $\pm$ 1.141 <sup>a</sup>
	M组	1.959 $\pm$ 0.700	2.564 $\pm$ 0.954 <sup>ac</sup>	3.455 $\pm$ 0.949 <sup>ac</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs C组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs A组.

M组的大鼠血清表达的T-SOD活力、GSH的含量显著增高, 而MDA的含量在12、24 h时点显著降低(表3).

### 3 讨论

研究表明急性胰腺炎的加重与氧化应激相关<sup>[3]</sup>. 在急性胰腺炎早期阶段, 炎性细胞和腺泡细胞就产生大量的活性氧, 在细胞膜, 活性氧使多价不饱和脂肪酸过氧化导致膜的破坏和MDA(脂质过氧化反应的产物)生成<sup>[4]</sup>; 在细胞内, 活性氧破坏细胞结构导致胰酶的胞内运输紊乱和胰酶

的过早激活而损伤腺泡细胞; 大量活性氧和破碎细胞泄漏的活化胰酶损伤毛细血管内皮, 毛细血管渗透性增加促成组织水肿<sup>[5]</sup>. 活性氧还可诱导I $\kappa$ B- $\alpha$ 磷酸化, 激活核因子- $\kappa$ B(nuclear factor, NF- $\kappa$ B), 调节基因表达的炎症介质(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6和IL-8等), 扩增的炎症介质使局部的胰腺炎症扩展为全身炎症反应, 可进一步导致多器官功能障碍<sup>[6]</sup>.

褪黑素是松果体分泌的主要激素, 具有多种生物学功能, 近年来, 研究的重点向其抗氧化作用倾斜, 越来越多的研究表明他能保护细胞

### 应用要点

本研究在大鼠ANP模型上首次探讨褪黑素干预对Trx-1表达的影响, 发现褪黑素干预可提高Trx-1的表达水平.

### ■同行评价

本研究选题尚可,设计合理,结果可信,具有一定的学术价值。

核DNA、膜脂质、胞质蛋白等生物大分子免受氧化损伤<sup>[7]</sup>,能有效地清除多种自由基和过氧化氢<sup>[8]</sup>。实验表明褪黑素能减轻多种物质诱导的多种组织的氧化应激反应。如,他能减轻内毒素血症诱导的幼鼠肠的氧化应激及细胞凋亡<sup>[9]</sup>;弱氧化砷诱导的细胞氧化应激造成的肝肾损害<sup>[10]</sup>;抵抗 $\gamma$ 射线照射引起的鼠的氧化应激和组织损伤<sup>[11]</sup>。在雨蛙素诱导的大鼠ANP模型,褪黑素能降低胰腺及肝脏组织的MDA的含量,提高过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶的含量,从而减轻胰腺及肝脏组织的病理损伤<sup>[12]</sup>。褪黑素前干预ANP能显著的减轻胰腺组织的脂质过氧化反应、减少髓过氧化酶及IL-6的含量<sup>[13]</sup>。

Trx-1作为一种内生的抗氧化剂,在组织的超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶被耗尽后可能发挥关键性作用<sup>[14]</sup>。Trx-1在胞质通过直接清除活性氧发挥抗氧化作用,在胞核通过抑制I $\kappa$ B- $\alpha$ 的磷酸化,遏制NF- $\kappa$ B的活化,减少致炎细胞因子的表达,发挥间接抗炎、抗氧化作用<sup>[14]</sup>。给予外源性Trx-1可清除细胞外的活性氧,还能穿透细胞膜,进入胞质清除细胞内活性氧<sup>[15]</sup>。在雨蛙素诱导急性胰腺炎动物模型,Trx-1的高表达可减轻急性胰腺炎氧化应激反应,同时减轻TNF、IL-1等促炎细胞因子的激活,从而减轻实验动物胰腺、肺、肝的损伤,降低实验动物的死亡率<sup>[16]</sup>。

本研究显示,在左旋精氨酸诱导的非转基因大鼠的ANP模型,血清Trx-1的含量呈现随时间延长先降低后升高的趋势,在24 h时达峰值,表明ANP可诱导Trx-1的表达,体现了机体的自我保护机制。而褪黑素前干预可显著地提高血清Trx-1含量、T-SOD活力和GSH水平,降低IL-6、MDA水平,且能显著减轻大鼠胰腺和肺组织的病理损伤,这表明褪黑素通过激活抗氧化酶类的活性,减少炎症介质的产生,从而减轻全身炎症反应,发挥对胰腺和肺等组织的保护作用。

### 4 参考文献

- 1 Kusske AM, Rongione AJ, Ashley SW, McFadden DW, Reber HA. Interleukin-10 prevents death in lethal necrotizing pancreatitis in mice. *Surgery* 1996; 120: 284-288; discussion 289
- 2 Liu D, Zeng BX, Shang Y. Decreased expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in endotoxin-induced acute lung injury. *Physiol Res* 2006; 55: 291-299
- 3 Gómez-Cambronero LG, Sabater L, Pereda J, Cassinello N, Camps B, Viña J, Sastre J. Role of cytokines and oxidative stress in the pathophysiology of acute pancreatitis: therapeutical

- implications. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2002; 1: 393-403
- 4 Dabrowski A, Gabryelewicz A, Wereszczyńska-Siemiatkowska U, Chyczewski L. Oxygen-derived free radicals in cerulein-induced acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1988; 23: 1245-1249
- 5 Dabrowski A, Konturek SJ, Konturek JW, Gabryelewicz A. Role of oxidative stress in the pathogenesis of caerulein-induced acute pancreatitis. *Eur J Pharmacol* 1999; 377: 1-11
- 6 Wulczyn FG, Krappmann D, Scheiderei C. The NF-kappa B/Rel and I kappa B gene families: mediators of immune response and inflammation. *J Mol Med* 1996; 74: 749-769
- 7 Reiter RJ, Tan DX, Allegra M. Melatonin: reducing molecular pathology and dysfunction due to free radicals and associated reactants. *Neuro Endocrinol Lett* 2002; 23 Suppl 1: 3-8
- 8 Poeggeler B, Saarela S, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC, Barlow-Walden LR. Melatonin-a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 738: 419-420
- 9 Ozdemir D, Uysal N, Tugyan K, Gonenc S, Acikgoz O, Aksu I, Ozkan H. The effect of melatonin on endotoxemia-induced intestinal apoptosis and oxidative stress in infant rats. *Intensive Care Med* 2007; 33: 511-516
- 10 Pal S, Chatterjee AK. Possible beneficial effects of melatonin supplementation on arsenic-induced oxidative stress in Wistar rats. *Drug Chem Toxicol* 2006; 29: 423-433
- 11 El-Missiry MA, Fayed TA, El-Sawy MR, El-Sayed AA. Ameliorative effect of melatonin against gamma-irradiation-induced oxidative stress and tissue injury. *Ecotoxicol Environ Saf* 2007; 66: 278-286
- 12 Eşrefoğlu M, Gül M, Ates B, Batçioğlu K, Selimoğlu MA. Antioxidative effect of melatonin, ascorbic acid and N-acetylcysteine on caerulein-induced pancreatitis and associated liver injury in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 259-264
- 13 Szabolcs A, Reiter RJ, Letoha T, Hegyi P, Papai G, Varga I, Jarmay K, Kaszaki J, Sari R, Rakonczay Z Jr, Lonovics J, Takacs T. Effect of melatonin on the severity of L-arginine-induced experimental acute pancreatitis in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 251-258
- 14 Hirota K, Murata M, Sachi Y, Nakamura H, Takeuchi J, Mori K, Yodoi J. Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB. *J Biol Chem* 1999; 274: 27891-27897
- 15 Kondo N, Ishii Y, Kwon YW, Tanito M, Horita H, Nishinaka Y, Nakamura H, Yodoi J. Redox-sensing release of human thioredoxin from T lymphocytes with negative feedback loops. *J Immunol* 2004; 172: 442-448
- 16 Ohashi S, Nishio A, Nakamura H, Kido M, Ueno S, Uza N, Inoue S, Kitamura H, Kiriya K, Asada M, Tamaki H, Matsuura M, Kawasaki K, Fukui T, Watanabe N, Nakase H, Yodoi J, Okazaki K, Chiba T. Protective roles of redox-active protein thioredoxin-1 for severe acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G772-G781



# 苯丙素甙逆转大肠癌耐药与凋亡的关系

马强, 张方信, 吕志诚, 陈嘉屿, 康生朝

马强, 张方信, 吕志诚, 陈嘉屿, 康生朝, 中国人民解放军兰州军区总医院消化科 甘肃省兰州市 730030

马强, 博士后, 主治医师, 主要从事大肠癌临床及基础研究。  
作者贡献分布: 此课题由马强设计; 研究过程由吕志诚与张方信完成; 研究用新试剂及分析工具由康生朝提供; 数据分析由马强与陈嘉屿完成; 本论文写作由马强完成。

通讯作者: 马强, 博士后, 主治医师, 730030, 甘肃省兰州市, 中国人民解放军兰州军区总医院消化科. maqiang.45@163.com  
电话: 0931-8994274

收稿日期: 2009-05-23 修回日期: 2009-07-15

接受日期: 2009-07-27 在线出版日期: 2009-08-18

## Phenylpropanoid glycoside reverse multidrug resistance of colon carcinoma LoVo/Adr cells through induction of apoptosis

Qiang Ma, Fang-Xin Zhang, Zhi-Cheng Lv, Jia-Yu Chen, Sheng-Zhao Kang

Qiang Ma, Fang-Xin Zhang, Zhi-Cheng Lv, Jia-Yu Chen, Sheng-Zhao Kang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Lanzhou Military Area Command of Chinese PLA, Lanzhou 730030, Gansu Province, China

Correspondence to: Doctor Qiang Ma, Department of Gastroenterology, General Hospital of Lanzhou Military Area Command of Chinese PLA, Lanzhou 730030, Gansu Province, China. maqiang.45@163.com

Received: 2009-05-23 Revised: 2009-07-15

Accepted: 2009-07-27 Published online: 2009-08-18

### Abstract

**AIM:** To investigate the relationship between the reversing effect of phenylpropanoid glycoside (PPG) on multidrug resistance of colon carcinoma LoVo/Adr cells and apoptosis.

**METHODS:** LoVo/Adr cells were divided into three groups: non-treatment (negative control) group, PPG treatment group (treated with 40 mg/L PPG) and verapamil treatment (positive control) group (treated with 5 mg/L VP). The effects of PPG on multidrug resistance of LoVo/Adr cells were examined by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay. The effects of PPG on cell apoptosis were detected by flow cytometry. The effects of PPG on the activity of Caspase-3 were evaluated by determining pNA release rate.

**RESULTS:** PPG could decrease the half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of adriamycin in LoVo cells and reverse their resistance to adriamycin. The reversal index was 9.93. PPG could significantly induce the apoptosis of LoVo cells when compared with the non-treatment group ( $P < 0.01$ ). The rate of pNA release in the PPG treatment group was significantly higher than that in the non-treatment group ( $31.75 \pm 4.34$  pmol/min vs  $18.45 \pm 2.39$  pmol/min,  $P < 0.01$ ). Caspase-3 inhibitor Z-VAD-FMK could significantly inhibit PPG-induced pNA release ( $17.69 \pm 2.68$  pmol/min vs  $31.75 \pm 4.34$  pmol/min,  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** PPG reverse multidrug resistance of LoVo/Adr cells perhaps through induction of Caspase 3-dependent apoptosis.

**Key Words:** Phenylpropanoid glycoside; Multidrug resistance; Reverse; Apoptosis

Ma Q, Zhang FX, Lv ZC, Chen JY, Kang SZ. Phenylpropanoid glycoside reverse multidrug resistance of colon carcinoma LoVo/Adr cells through induction of apoptosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(23): 2357-2361

### 摘要

**目的:** 探讨苯丙素甙化合物逆转大肠癌耐药与凋亡的关系。

**方法:** 实验分3组: LoVo/Adr细胞组(空白对照组); LoVo/Adr细胞+PPG 40 mg/L组(实验组); LoVo/Adr细胞+VP 5 mg/L(阳性对照组)。采用MTT法检测苯丙素甙对LoVo/Adr细胞的耐药性; 流式细胞仪分析苯丙素甙对大肠癌耐药LoVo细胞的凋亡的作用; 通过检测pNA量观察苯丙素甙对LoVo/Adr细胞Caspase-3的活性。

**结果:** 苯丙素甙可降低阿霉素对LoVo/Adr细胞的IC<sub>50</sub>值, 具有逆转作用, 其逆转倍数为9.93; 他还可引起LoVo/Adr细胞凋亡, 与对照组相比, 具有显著性差异( $P < 0.01$ )。经苯丙素甙作用后, LoVo/Adr细胞pNA释放量明显增加( $31.75 \pm 4.34$  pmol/min vs  $18.45 \pm 2.39$  pmol/min,  $P < 0.01$ ), 而同时加入Caspase-3抑制剂Z-VAD-FMK, pNA释放量明显低于实验组( $17.69$

### ■背景资料

苯丙素甙是从我国西北植物马先蒿中提取的化合物, 苯丙素甙类化合物在肿瘤中可抑制端粒酶活性, 诱导细胞凋亡。鉴于凋亡与耐药关系密切, 强烈暗示苯丙素甙可能具有逆转多药耐药(MDR)的作用。

### ■同行评议者

蔡开琳, 副教授, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普通外科; 钱睿哲, 教授, 复旦大学上海医学院生理与病理生理学系血管分子生物学实验室; 王小众, 教授, 福建医科大学附属协和医院消化内科

## ■研发前沿

化疗是大肠癌治疗的主要手段之一,而MDR产生则是化疗中最大的难点,天然药物具有低毒、资源丰富、作用靶点多等特点,提示开发中药耐药逆转剂有较好的前景。

$\pm 2.68 \text{ pmol/min}$  vs  $31.75 \pm 4.34 \text{ pmol/min}$ ,  $P < 0.01$ 。

**结论:** 苯丙素甙对耐药LoVo/Adr细胞具有逆转耐药作用,通过Caspase-3途径诱导凋亡可能为其逆转耐药的机制之一。

**关键词:** 苯丙素甙; 多药耐药; 逆转; 凋亡

马强, 张方信, 吕志诚, 陈嘉屿, 康生朝. 苯丙素甙逆转大肠癌耐药与凋亡的关系. 世界华人消化杂志 2009; 17(23): 2357-2361 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2357.asp>

## 0 引言

凋亡(apoptosis)是在基因控制和酶促反应下按一定程序进行的细胞自主死亡,是机体维持自身稳定的一种基本生理机制<sup>[1-3]</sup>。近年国外有学者认为,凋亡通路受阻,也是导致肿瘤细胞产生多药耐药(multidrug resistance, MDR)的一个原因<sup>[4-10]</sup>。诱导肿瘤细胞凋亡,尤其是诱导耐药细胞株的凋亡有望成为逆转MDR的有效途径。苯丙素甙(phenylpropanoid glycoside, PPG)是从我国西北植物马先蒿中提取的化合物,体外的抗癌活性已得到证实<sup>[11-13]</sup>。文献[7]报道PPG类化合物在肿瘤中可抑制端粒酶活性,诱导细胞凋亡。鉴于凋亡与耐药关系密切,强烈暗示PPG可能具有逆转MDR的作用,以本课题组诱导的耐药株LoVo/Adr细胞株具有P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)高表达,谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-S-transferase, GST)活性高等生物学特性,能在阿霉素1.0 mg/L培养基中生长,不仅对阿霉素耐药,而且对环磷酰胺、丝裂霉素和长春新碱有不同程度的交叉耐药,对5-FU无耐药性<sup>[14-16]</sup>,以此细胞株为研究基础,就PPG引起的凋亡与耐药的方面进行探讨。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 耐药株LoVo/Adr细胞由本实验室传代保存; LoVo/Adr细胞株由本课题组采用阿霉素浓度递增法,诱导大肠癌LoVo细胞株(引自美国ATCC),历经8 mo、传代55次连续培养,成功构建。马先蒿甙A(Pedicularioside A)由红纹马先蒿(pedicularis striata Pall)提取所得,由兰州大学有机化学实验室贾忠建教授分离鉴定并惠赠。分子式为:  $\text{C}_{36}\text{H}_{48}\text{O}_{19}$ , RPMI 1640为Gibco公司产品; 小牛血清为杭州四季青生物制品研究所产品; Z-VAD-FMK、Caspase-3活性检测试剂盒: 碧云天生物技术研究所; Cell Lysis Buffer: Biovision; 维拉帕

米(verapamil, VP)、阿霉素(Adriamycin, ADR)、噻唑蓝(methyl terazolium, MTT): Sigma公司产品; AnnexinV/FIFC Kit: 美国BD Biosciences; P1和RNase: 美国BD Biosciences; 二氧化碳电热温孵箱: 日本太阳株式会社; 低温离心机: Dupont公司; 超净工作台: 上海阳光实验仪器有限公司; FACS-420型流式细胞仪: 美国Coulter公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 LoVo/Adr细胞的培养:** LoVo/Adr细胞接种于含100 g/L小牛血清的RPMI 1640培养液,在培养体系中加入终浓度为1.0 mg/L的ADR以维持耐药。LoVo/Adr细胞在不含ADR的RPMI 1640培养基中培养2 wk后备用。

**1.2.2 PPG对LoVo/Adr细胞耐药性的影响:** 空白对照组: LoVo/Adr细胞; 实验组: LoVo/Adr细胞+PPG 40 mg/L组; 阳性对照组: LoVo/Adr细胞+VP 5 mg/L。采用MTT法检测PPG对LoVo/Adr细胞耐药性的影响。取对数生长期的LoVo/Adr细胞,用RPMI 1640培养基制备成单细胞悬液,分别接种到96孔板(每孔200  $\mu\text{L}$ , 约 $1 \times 10^5$ ), 37 $^{\circ}\text{C}$ , 50 mL/L  $\text{CO}_2$ 培养箱中培养24 h后,各组再加入ADR终浓度为0.02-5.12 mg/L的9个浓度梯度,同时加入相应浓度的PPG、VP, 每孔10  $\mu\text{L}$ , 加入各组药物(设3个复孔), 再培养24 h后,每孔加入2 mg/L MTT 20  $\mu\text{L}$ 继续培养4 h,弃上清液,加入二甲亚砜每孔150  $\mu\text{L}$ ,将平板置于微孔板振荡器上充分振荡5 min,使结晶物溶解。酶标仪测每孔的吸光度(A)值。计算存活率(存活率 = 实验孔A值/对照孔A值 $\times 100\%$ )。以药物浓度为横轴,存活率为纵轴绘制浓度效应曲线,确定半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>), 逆转倍数(fold reversal, FR) = 逆转前IC<sub>50</sub>值/逆转后IC<sub>50</sub>值。

**1.2.3 PPG诱导LoVo/Adr细胞凋亡实验:** 细胞分组同前。将LoVo/Adr细胞消化、吹匀后分别种入6孔板中,加入含100 mL/L FBS的RPMI 1640培养液1 mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ , 50 mL/L  $\text{CO}_2$ 孵箱中孵育24 h,按预设终浓度加入PPG及VP, 37 $^{\circ}\text{C}$ , 50 mL/L  $\text{CO}_2$ 孵箱中孵育24 h,加入2.5 g/L胰酶消化,重悬细胞。4 $^{\circ}\text{C}$ 离心, 800 r/min, 5 min, 弃上清。4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的PBS洗细胞2次,冰浴上用预先稀释的结合缓冲液(1份结合缓冲液+4份去离子水)重新悬浮细胞,调节其浓度为 $5 \times 10^9$  /L。冰浴上取100  $\mu\text{L}$ 的细胞悬液于5 mL流式管中,加入5  $\mu\text{L}$  AnnexinV/FIFC和10  $\mu\text{L}$ 碘化丙锭溶液(20 mg/L)。混匀后于室温避光孵育15 min。在反应管中加入400  $\mu\text{L}$  BPS, 上流式细胞仪分析。流式细胞仪激

## ■相关报道

国内学者证实川芎嗪、大黄素、榄香烯乳剂、浙贝母碱均可在体内外不同程度逆转肿瘤MDR。



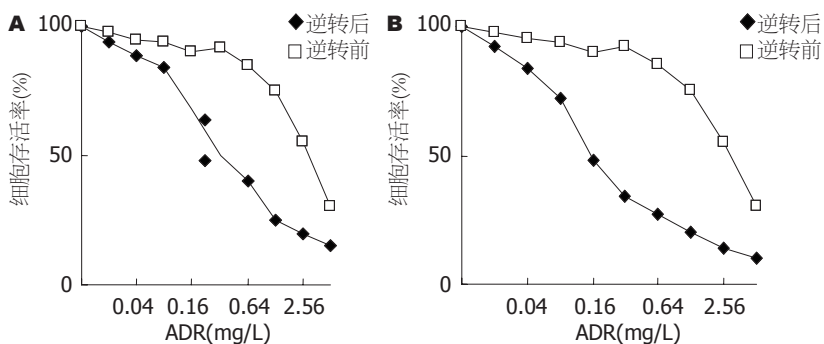


图 1 不同药物作用下LoVo/Adr细胞生长抑制曲线. A: 实验组; B: 阳性对照组.

**创新盘点**  
本研究表明: PPG对耐药LoVo/Adr细胞具有逆转耐药作用, 通过Caspases-3途径诱导凋亡可能为其逆转耐药的机制之一.

表 1 各组药物的逆转倍数 (n = 3)

药物(mg/L)	IC <sub>50</sub> (mg/L)	逆转倍数
空白对照组	3.08	
实验组	0.31	9.93
阳性对照组	0.18	17.11

发光波长488 nm, 用波长为515 nm的通带滤器检测FITC荧光, 另一波长大于560 nm的滤器检测PI. 实验重复3次. 结果判断: 凋亡细胞对所有用于细胞活性鉴定的染料(如PI)有抗染性, 坏死细胞则不能. 细胞膜有损伤的细胞的DNA可被PI着染产生红色荧光, 而细胞膜保持完好的细胞则不会有红色荧光产生. 因此, 在细胞凋亡的早期PI不会着染而没有红色荧光信号, 正常活细胞与此相似. 在双变量流式细胞仪的散点图上, 左下象限显示活细胞, 为(FITC-/PI-); 右上象限是非活细胞, 即坏死细胞, 为(FITC/PI); 而右下象限为凋亡细胞, 显现(FITC/PI-).

1.2.4 PPG对LoVo/Adr细胞Caspase-3活性的影响: 分组: 空白对照组: LoVo/Adr细胞; 实验组1: LoVo/Adr细胞+PPG 40 mg/L组; 实验组2: LoVo/Adr细胞+PPG 40 mg/L+Z-VAD-FMK 50 mg/L. 将LoVo/Adr细胞消化、吹匀后分别转入75 cm<sup>2</sup>培养皿中, 每瓶细胞数应相等, 约1×10<sup>7</sup>, 培养液量为5 mL. 按预设终浓度分别加入PPG、Z-VAD-FMK, 37℃、50 mL/LCO<sub>2</sub>孵箱中孵育24 h. 2.5 g/L胰酶消化细胞, 收集入15 mL离心管中, 4℃离心. 细胞置于冰浴中, 冷PBS液洗2遍, 离心, 弃上清. 每管加入Cell Lysis Buffer, 调整细胞浓度为1×10<sup>11</sup>/L. 反复冻融以裂解细胞(置于液氮中迅速冷冻, 室温下溶化), 于冰中孵育15 min. 4℃离心, 1500 r/min, 20 min, 收集上清液于Ep管中. 立即测定Caspase-3的酶活性. Caspase-3的酶活性测定严格按照说明书进行. Caspase-3酶活力单位的定义: 一个酶活力单位定义为当底物饱和时, 在37℃, 每分钟剪切1 pmol Ac-DEVD-p-硝基苯胺(pNA)产生1 pmol pNA的

Caspase-3的酶量.

统计学处理 结果以mean±SD表示, 所测数据用SPSS统计软件进行方差分析和t检验, 以P<0.05为有统计学意义.

## 2 结果

2.1 PPG对LoVo/Adr细胞耐药性的影响 当耐药细胞株分别加入PPG和VP后, 均不同程度降低了ADR对LoVo/Adr细胞的IC<sub>50</sub>值, 说明PPG具有逆转MDR的特性, PPG、VP的逆转倍数分别为9.93、17.11. 与VP相比, PPG逆转倍数明显弱于VP(图1, 表1).

2.2 PPG诱导LoVo/Adr细胞凋亡 培养体系中加入PPG、VP后继续培养24 h, PPG对LoVo/Adr细胞的影响, 更多是引起凋亡, 而坏死作用较弱, VP无此作用(图2, 表2).

2.3 PPG对LoVo/Adr细胞Caspase-3活性的影响 与LoVo/Adr细胞对照组相比, 经PPG 40 mg/L作用后, 该组pNA释放量由18.45±2.39 pmol/min明显增加至31.75±4.34 pmol/min(P<0.01), 而同时加入Caspase-3抑制剂Z-VAD-FMK, pNA释放量为17.69±2.68 pmol/min, 明显低于PPG 40 mg/L组(P<0.01), 与对照组比较无差别, 从而说明PPG通过Caspase-3途径促进了LoVo/Adr细胞凋亡.

## 3 讨论

从某种意义上讲, 90%以上死于肿瘤的患者, 都与肿瘤原发或获得性抗药性有关. 据体内、外研究, 产生肿瘤抗药性可能是多种机制共同作用的结果. 其中凋亡相关基因发生突变, 他既可以加速肿瘤的进展, 又能使治疗反应减弱, 降低疗效, 这种耐药机制不同于传统的MDR机制<sup>[17-19]</sup>. 参与凋亡过程调控的基因表达失控, 例如激活细胞凋亡基因的丢失或抑制细胞凋亡基因的过度表达, 都可导致肿瘤细胞对广谱抗肿瘤药物的细胞毒性作用产生耐药性. 有趣的是, 众多报道<sup>[20-25]</sup>都显示MDR的存在几乎都伴有抗凋亡的现象.

**应用要点**  
本研究为苯丙素甙改善肿瘤化疗, 提供了实验支持和理论依据, 为进一步深入研究奠定基础.

### ■ 名词解释

多药耐药(MDR):指肿瘤细胞接触一种药物后,不但对该药产生抗药性,而且对其他结构和作用机制不同的药物也产生抗药性。

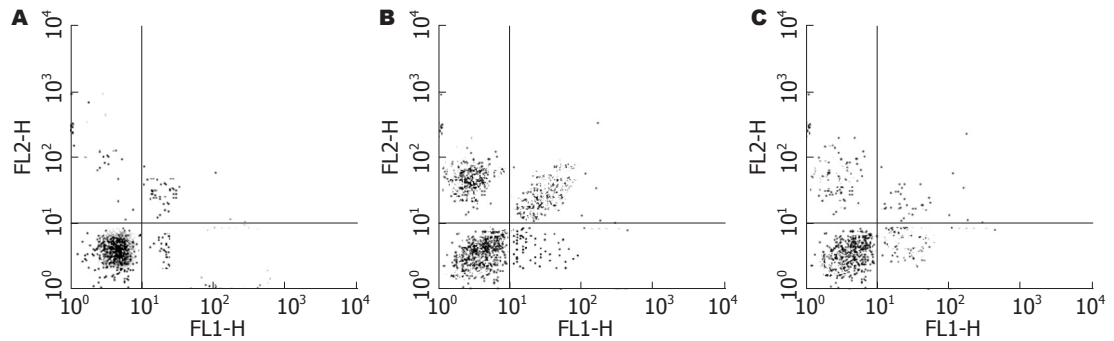


图 2 LoVo/Adr细胞流式散点图. A: 空白对照组; B: 实验组; C: 阳性对照组.

表 2 PPG致LoVo/Adr细胞凋亡及坏死的比较 ( $n = 3$ , mean  $\pm$  SD, %)

	凋亡	坏死
空白对照组	1.67 $\pm$ 0.21	1.58 $\pm$ 0.23
实验组	16.34 $\pm$ 0.58 <sup>b</sup>	7.45 $\pm$ 0.45 <sup>b</sup>
阳性对照组	1.78 $\pm$ 0.25	1.84 $\pm$ 0.27

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组.

细胞凋亡<sup>[4-5]</sup>即程序化细胞死亡(programmed cell death),作为细胞死亡的方式之一,是通过系列死亡信号分子活化而导致的主动性死亡过程.其发生机制与细胞内信号转导系统所引起的基因调控有关,肿瘤细胞由于癌基因的激活和抑癌基因的失活,使分化受阻,细胞进入增殖周期,而不出现正常情况下的程序化死亡.马先蒿在我国西北称“土人参”,用于治疗虚弱、衰竭、盗汗、遗精、衰老等症,具有活血、健脾胃、安神益气等功效.PPG为从中分离的天然产物,近年来的研究发现<sup>[25-29]</sup>,这类化合物有抗病毒、抗血小板凝聚、抗氧化作用,抑制肿瘤生长的特性,PPG类化合物在肿瘤中可抑制端粒酶活性,诱导细胞凋亡.我们的实验不仅证实PPG对LoVo/Adr细胞具有致凋亡作用,而且证实了PPG可降低ADR对LoVo/Adr细胞的IC<sub>50</sub>值,具有逆转耐药的特性,其逆转倍数为9.93,提示PPG可能是通过促凋亡途径逆转耐药性的.PPG是通过什么途径诱导凋亡的呢?

目前认为化疗药物可以通过以下5种途径介导细胞凋亡<sup>[1,30-31]</sup>:(1)依赖p53介导;(2)Bcl-2介导;(3)依赖Fas/FasL途径;(4)神经酰胺介导;(5)经Caspase-3蛋白介导.在本实验中,我们通过测定Caspase-3作用于其底物后的产物pNA的含量来分析Caspase-3活性的变化.结果显示,LoVo/Adr细胞经PPG作用后,Caspase-3活性显著增加,而同时加入Caspase-3活性抑制剂后,Caspase-3活性又明显下降,表明PPG通过Caspase途径促进了LoVo/

Adr细胞的凋亡.国外学者<sup>[32-35]</sup>通过对P-gp与细胞凋亡的关系进行深入研究,提出P-gp除传统的药泵功能外,他还对Caspase依赖的途径具有保护作用.可能的机制为:(1)ATP是激活Caspase-3的重要成分,P-gp通过改变细胞内ATP水平影响细胞凋亡;(2)能使细胞内碱化,能够诱导一种新的Na<sup>+</sup>和Cl<sup>-</sup>依赖跨膜H<sup>+</sup>转运,导致细胞内pH增加,这样使得Caspase处于失活状态,从而起到保护作用.本实验LoVo/Adr细胞中存在P-gp耐药途径<sup>[8]</sup>,我们推测PPG可能抑制了P-gp磷酸化程度,减弱了对Caspase依赖的途径具的保护作用,激活了Caspase-3活性,从而促进LoVo/Adr细胞的凋亡,逆转了耐药.以上推测需今后研究进一步证实.

总之,本研究表明:PPG对耐药LoVo/Adr细胞具有逆转耐药作用,通过Caspase-3途径诱导凋亡可能为其逆转耐药的机制之一.

## 4 参考文献

- Shannan B, Seifert M, Leskov K, Willis J, Boothman D, Tilgen W, Reichrath J. Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer. *Cell Death Differ* 2006; 13: 12-19
- Mandal D, Mazumder A, Das P, Kundu M, Basu J. Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *J Biol Chem* 2005; 280: 39460-39467
- Wang W, Ho WC, Dicker DT, MacKinnon C, Winkler JD, Marmorstein R, El-Deiry WS. Acridine derivatives activate p53 and induce tumor cell death through Bax. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 893-898
- Silva KL, Vasconcelos DV, Castro ED, Vasconcelos Fda C, Bigni R, Maia RC. Bisphosphonates induce apoptosis in CLL cells independently of MDR phenotype. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; 62: 165-171
- Sun W, Wang W, Kim J, Keng P, Yang S, Zhang H, Liu C, Okunieff P, Zhang L. Anti-cancer effect of resveratrol is associated with induction of apoptosis via a mitochondrial pathway alignment. *Adv Exp Med Biol* 2008; 614: 179-186
- Yajima T, Ochiai H, Uchiyama T, Takano N, Shibahara T, Azuma T. Resistance to cytotoxic



- chemotherapy-induced apoptosis in side population cells of human oral squamous cell carcinoma cell line Ho-1-N-1. *Int J Oncol* 2009; 35: 273-280
- 7 Jiang Z, Chen BA, Xia GH, Wu Q, Zhang Y, Hong TY, Zhang W, Cheng J, Gao F, Liu LJ, Li XM, Wang XM. The reversal effect of magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles loaded with cisplatin on SKOV3/DDP ovarian carcinoma cells. *Int J Nanomedicine* 2009; 4: 107-114
- 8 Nardinocchi L, Puca R, Sacchi A, D'Orazi G. Inhibition of HIF-1 $\alpha$  activity by homeodomain-interacting protein kinase-2 correlates with sensitization of chemoresistant cells to undergo apoptosis. *Mol Cancer* 2009; 8: 1
- 9 Wrzal PK, Bettaieb A, Averill-Bates DA. Molecular mechanisms of apoptosis activation by heat shock in multidrug-resistant Chinese hamster cells. *Radiat Res* 2008; 170: 498-511
- 10 Mashima T, Seimiya H, Chen Z, Kataoka S, Tsuruo T. Apoptosis resistance in tumor cells. *Cytotechnology* 1998; 27: 293-308
- 11 Kuo YH, Hsu YW, Liaw CC, Lee JK, Huang HC, Kuo LM. Cytotoxic phenylpropanoid glycosides from the stems of Smilax china. *J Nat Prod* 2005; 68: 1475-1478
- 12 Morikawa T, Sun B, Matsuda H, Wu LJ, Harima S, Yoshikawa M. Bioactive constituents from Chinese natural medicines. XIV. New glycosides of beta-carboline-type alkaloid, neolignan, and phenylpropanoid from *Stellaria dichotoma* L. var. *lanceolata* and their antiallergic activities. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2004; 52: 1194-1199
- 13 Díaz AM, Abad MJ, Fernández L, Silván AM, De Santos J, Bermejo P. Phenylpropanoid glycosides from *Scrophularia scorodonia*: in vitro anti-inflammatory activity. *Life Sci* 2004; 74: 2515-2526
- 14 马强, 张振书, 王群英, 钟世顺, 李恕军, 赖卓胜. 结肠癌细胞多药耐药模型LoVo/Adr的建立及其耐药相关基因的表达. *中华消化杂志* 2002; 22: 412-415
- 15 马强, 张振书, 张亚历, 赖卓胜. 人结肠癌LoVo/Adr细胞耐药性与细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度的关系. *癌症* 2002; 21: 846-849
- 16 马强, 张振书, 孙爱民, 王群英. 大肠癌耐药LoVo/Adr细胞PKC亚型与MDR的关系. *第四军医大学学报* 2004; 25: 240-242
- 17 Lage H. An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 3145-3167
- 18 Li X, Hong L, Zhao Y, Jin H, Fan R, Du R, Xia L, Luo G, Fan D. A new apoptosis inhibitor, CIAPIN1 (cytokine-induced apoptosis inhibitor 1), mediates multidrug resistance in leukemia cells by regulating MDR-1, Bcl-2, and Bax. *Biochem Cell Biol* 2007; 85: 741-750
- 19 Duarte N, Varga A, Cherepnev G, Radics R, Molnár J, Ferreira MJ. Apoptosis induction and modulation of P-glycoprotein mediated multidrug resistance by new macrocyclic lathyrane-type diterpenoids. *Bioorg Med Chem* 2007; 15: 546-554
- 20 de Groot DJ, van der Deen M, Le TK, Regeling A, de Jong S, de Vries EG. Indomethacin induces apoptosis via a MRP1-dependent mechanism in doxorubicin-resistant small-cell lung cancer cells overexpressing MRP1. *Br J Cancer* 2007; 97: 1077-1083
- 21 Hammond CL, Marchan R, Krance SM, Ballatori N. Glutathione export during apoptosis requires functional multidrug resistance-associated proteins. *J Biol Chem* 2007; 282: 14337-14347
- 22 Ceruti S, Mazzola A, Abbracchio MP. Resistance of human astrocytoma cells to apoptosis induced by mitochondria-damaging agents: possible implications for anticancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 314: 825-837
- 23 Sagol O, Yavuzsen T, Oztop I, Ulukus C, Yilmaz U, Alakavuklar M, Karademir S, Obuz F, Astarcoğlu H, Astarcoğlu I. The effect of apoptotic activity, survivin, Ki-67, and P-glycoprotein expression on prognosis in pancreatic carcinoma. *Pancreas* 2005; 30: 343-348
- 24 Suárez L, Vidriales MB, Moreno MJ, López A, García-Laraña J, Pérez-López C, Tormo M, Lavilla E, López-Berges MC, de Santiago M, San Miguel JF, Orfao A; PETHEMA Cooperative Group. Differences in anti-apoptotic and multidrug resistance phenotypes in elderly and young acute myeloid leukemia patients are related to the maturation of blast cells. *Haematologica* 2005; 90: 54-59
- 25 Allen JW, Eldadah BA, Huang X, Knobloch SM, Faden AI. Multiple caspases are involved in beta-amyloid-induced neuronal apoptosis. *J Neurosci Res* 2001; 65: 45-53
- 26 Yu S, Liu M, Gu X, Ding F. Neuroprotective effects of salidroside in the PC12 cell model exposed to hypoglycemia and serum limitation. *Cell Mol Neurobiol* 2008; 28: 1067-1078
- 27 Kostyuk V, Potapovich A, Suhan T, De Luca C, Pressi G, Dal Toso R, Korkina L. Plant polyphenols against UV-C-induced cellular death. *Planta Med* 2008; 74: 509-514
- 28 Shi Y, Wang W, Huang C, Jia Z, Yao S, Zheng R. Fast repair of oxidative DNA damage by phenylpropanoid glycosides and their analogues. *Mutagenesis* 2008; 23: 19-26
- 29 Thuan ND, Ha do T, Thuong PT, Na MK, Lee JP, Lee JH, Seo HW, Min BS, Kim JC, Bae K. A phenylpropanoid glycoside with antioxidant activity from *Picria tel-ferae*. *Arch Pharm Res* 2007; 30: 1062-1066
- 30 刁波, 唐瑛, 文晔, 王晓昆. 丁酸钠诱导COLO205结肠癌细胞凋亡及其对caspase-3的调控. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1558-1560
- 31 倪志, 鲍纉夕, 刘南植, 赵秋, 覃华, 杨彦, 邱艺坚, 王婷婷. 结肠癌Lovo细胞RUNX3基因的表达与其增殖及凋亡的关系. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 711-715
- 32 Angelini A, Iezzi M, Di Febbo C, Di Ilio C, Cuccurullo F, Porreca E. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in human sarcoma MES-SA/Dx-5 cells by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Oncol Rep* 2008; 20: 731-735
- 33 Xue C, Haber M, Flemming C, Marshall GM, Lock RB, MacKenzie KL, Gurova KV, Norris MD, Gudkov AV. p53 determines multidrug sensitivity of childhood neuroblastoma. *Cancer Res* 2007; 67: 10351-10360
- 34 Engi H, Vasas A, Rédei D, Molnár J, Hohmann J. New MDR modulators and apoptosis inducers from *Euphorbia* species. *Anticancer Res* 2007; 27: 3451-3458
- 35 Inoue M, Sakuma Z, Ogihara Y, Saracoglu I. Induction of apoptotic cell death in HL-60 cells by acteoside, a phenylpropanoid glycoside. *Biol Pharm Bull* 1998; 21: 81-83

#### 同行评价

本研究设计合理, 结果分析可靠, 具有一定的学术价值。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

# 氩氦冷冻对SD大鼠皮下移植瘤细胞凋亡及T细胞免疫的影响

刘建刚, 管洪在, 葛成林, 张积仁

## ■背景资料

氩氦刀是一种新型的通过超低温冷冻治疗肿瘤的微创手术操作系统, 关于其对机体免疫功能的影响研究较少, 对其上调机体免疫功能的机制尚未阐明。

刘建刚, 张积仁, 南方医科大学珠江医院肿瘤中心 广东省广州市 510282  
管洪在, 青岛大学医学院血液学教研室 山东省青岛市 266021  
葛成林, 潍坊市肿瘤医院介入治疗科 山东省潍坊市 261041  
刘建刚, 南方医科大学在读博士, 主要从事肿瘤的靶向治疗研究。  
作者贡献分布: 刘建刚作主要贡献, 其他作者贡献均等; 课题由张积仁与刘建刚设计; 刘建刚、管洪在及葛成林共同操作完成实验; 数据统计与文献检索由刘建刚完成; 论文撰写由刘建刚完成; 张积仁进行指导。  
通讯作者: 张积仁, 主任医师, 教授, 510282, 广东省广州市, 南方医科大学珠江医院肿瘤中心. xiaogang2007@sina.com  
收稿日期: 2009-06-06 修回日期: 2009-07-27  
接受日期: 2009-08-03 在线出版日期: 2009-08-18

## Effect of argon-helium cryoablation on cell apoptosis and T-cell immunity in rats subcutaneously implanted with breast cancer cells

Jian-Gang Liu, Hong-Zai Guan, Cheng-Lin Ge, Ji-Ren Zhang

Jian-Gang Liu, Ji-Ren Zhang, Oncology Center, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

Hong-Zai Guan, Department of Hematology, Qingdao University Medical College, Qingdao 266021, Shandong Province, China

Cheng-Lin Ge, Interventional Therapy Center, Weifang Cancer Hospital, Weifang 261041, Shandong Province, China

Correspondence to: Ji-Ren Zhang, Oncology Center, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China. xiaogang2007@sina.com

Received: 2009-06-06 Revised: 2009-07-27

Accepted: 2009-08-03 Published online: 2009-08-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the effects of argon-helium (Ar-He) cryoablation on cell apoptosis and T-cell immunity in rats subcutaneously implanted with breast cancer cells.

**METHODS:** Forty-five healthy male Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups: normal control group, cancer control group and cryoablation group. A xenograft rat model of breast cancer was established by subcutaneous injection of breast cancer cells (W-256)

into Sprague-Dawley rats. After argon-helium cryoablation, cell necrosis was observed under light microscopy, cell apoptosis in peripheral cryoablation zone was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP in situ nick end labeling (TUNEL), and the proliferation of cytotoxic T lymphocytes was investigated using mixed lymphocyte reaction assay.

**RESULTS:** In central cryoablation zone, necrosis dominated in cell death. In peripheral cryoablation zone, cell apoptosis was definitely observed by morphological examination under light microscopy or TUNEL staining. The apoptosis reached the peak at 12 h after cryoablation, with an apoptosis rate of  $(68.28 \pm 7.85)\%$ . Cryoablation could effectively activate the proliferation of cytotoxic T lymphocytes. The proliferation rate of cytotoxic T lymphocytes in the cryoablation group was significantly higher than that in the cancer control group ( $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Argon-helium cryoablation can effectively cause cell death either through inducing necrosis or apoptosis. Cryoablation may induce cell apoptosis in peripheral cryoablation zone. Besides, cryosurgery can effectively activate tumor antigen-specific T lymphocytes and improve T cell-mediated immunity.

**Key Words:** Ar-He cryoablation; T-cell immunity; Apoptosis; Implanted breast cancer

Liu JG, Guan HZ, Ge CL, Zhang JR. Effect of argon-helium cryoablation on cell apoptosis and T-cell immunity in rats subcutaneously implanted with breast cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(23): 2362-2366

## 摘要

**目的:** 研究氩氦刀冷冻消融对SD大鼠皮下移植瘤细胞凋亡及T细胞免疫的影响, 评价氩氦刀冷冻治疗对大鼠免疫功能的影响。

**方法:** 将45只大鼠随机分成3组: 正常对照组, 荷瘤对照组, 冷冻治疗组, 每组15只。建立SD

## ■同行评议者

王家, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院肝外综合治疗一科



大鼠皮下移植瘤动物模型. 冷冻治疗组: 消融冷冻治疗3-5 min, 复温时间30 s. 荷瘤对照组: 将氩氦刀置入肿瘤3 min, 而不予冷冻治疗. 正常对照组: 正常饲养. 分别于冷冻后3, 12, 24 h和3, 7 d时处死动物, 取材. 光学显微镜观察冷冻坏死消融规律; 末端标记法(TUNEL)原位检测周边冷冻损伤区带细胞凋亡和检测特异性细胞毒性T淋巴细胞的增殖.

**结果:** 在冷冻中心区, 细胞死亡以坏死为主, 在周边冷冻损伤区, 光镜形态学检查及TUNEL染色可观察到明确的细胞凋亡, 术后12 h凋亡达高峰, 凋亡率为 $68.28\% \pm 7.85\%$ . 氩氦刀治疗后显著刺激特异性T淋巴细胞增殖, 与对照组比较具有显著性差异( $P < 0.01$ ).

**结论:** 氩氦刀通过坏死和凋亡两种途径达到有效的消融, 并且可有效激活小鼠肿瘤抗原特异性的T细胞, 氩氦冷冻有效地诱发和增强机体的抗肿瘤免疫效应.

**关键词:** 氩氦冷冻消融; T细胞免疫; 凋亡; 种植性乳腺癌

刘建刚, 管洪在, 葛成林, 张积仁. 氩氦冷冻对SD大鼠皮下移植瘤细胞凋亡及T细胞免疫的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(23): 2362-2366  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2362.asp>

## 0 引言

氩氦刀冷冻治疗是目前治疗恶性肿瘤的有效方法之一, 因具有安全、有效、微创、不良反应小等特点, 已成为一种令人关注的肿瘤微创治疗技术. 目前已经应用于前列腺癌、肺癌、肝癌等多种实体瘤的治疗<sup>[1-2]</sup>. 肿瘤的发生、发展、转移是与机体免疫功能密切相关的过程, 目前的资料显示对氩氦冷冻对机体免疫功能的影响的研究较少. 我们通过实验观察氩氦刀冷冻消融治疗对SD大鼠皮下移植瘤组织坏死和细胞凋亡的影响以及检测特异性细胞毒性T淋巴细胞的增殖, 以进一步探讨氩氦刀冷冻消融治疗肿瘤的免疫效应, 为临床应用提供理论依据.

## 1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠45只, ♂, 月龄2-3 mo, 体质量 $200 \pm 10$  g, 华中科技大学同济医学院实验动物中心提供. 胸腺嘧啶核苷, 丝裂霉素C,  $^3\text{H-TdR}$ , TUNEL原位免疫组织化学试剂盒,  $\beta$ 液闪计数器为美国Beckman公司产品. 氩氦靶向冷冻治疗系统-氩氦刀为美国Endocare公司生产.

## 1.2 方法

1.2.1 分组及造模: 将45只大鼠随机分成3组: 荷瘤对照组(A组), 冷冻治疗组(B组), 正常对照组(C组), 每组15只. 另取2只大鼠作为种鼠, 建立腹水模型. 待腹水生成后乙醚麻醉待接种大鼠, 取右后腿外侧新洁尔灭配消毒皮下注射腹水, 用1 mL注射器抽取腹水, 每个注射点用0.4 mL, 含肿瘤细胞数约 $4 \times 10^7$ 个. 接种30只大鼠, 隔天测量肿瘤大小, 得出体积平均值. 2 wk后, 游标卡尺测量肿瘤体积平均为 $3.5 \text{ cm}^3$ . 同时将15只大鼠皮下接种生理盐水作为对照组.

1.2.2 处理大鼠: 10%水合氯醛腹腔麻醉(0.25 mL/100 g)后分别予以处理. 冷冻治疗组: 将荷瘤大鼠肿瘤处被毛剪除, 置于金属托盘内, 将肿瘤处酒精消毒, 直视下将消融针插入肿瘤组织内, 冷冻时间3-5 min, 复温时间30 s. 荷瘤对照组: 将氩氦刀置入肿瘤3 min, 而不予冷冻治疗. 正常对照组: 正常饲养.

1.2.3 取材: 分别于冷冻后3, 12, 24 h和3, 7 d时处死动物, 取材. 每组各时间点各处死小鼠3只, 完整剥离肿瘤组织.

1.2.4 细胞毒性T淋巴细胞(Tc)的增殖反应: 大鼠处死后取脾脏, 制备单细胞悬液, 制备尼龙毛柱.  $1 \times 10^8$ 细胞重悬于2 mL RPMI 1640培养基中, 细胞悬液过尼龙毛柱, 获取T淋巴细胞. 苔盼蓝染色检测活细胞比例. 调节T淋巴细胞为 $5 \times 10^9/\text{L}$ . 将分离的肿瘤坏死组织制作成匀浆, 用RPMI 1640培养基10000、1000、100、10、1倍稀释后加入96孔板中, 使T淋巴细胞与抗原混合, 静置培养3 d. 混合培养结束前, 加入稀释的 $^3\text{H-TdR}$ , 每孔实际放射比活度为 $1 \mu\text{Ci}$ , 培养12 h后PBS液冲洗培养孔收集细胞, 滤纸点样, 10%三氯乙酸、无水乙醇洗涤、固定. 滤纸片 $60^\circ\text{C}$ 烘干后放入盛有闪烁记数液的计数瓶中, Beckman液闪记数仪测CPM值. 以空白T细胞孔及空白DMEM培养基孔分别对照检测. 每组实验重复3次.

**统计学处理** 所有数据均采用应用SPSS12.0统计软件进行分析. 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义.

## 2 结果

2.1 肿瘤坏死组织病理变化 氩氦刀冷冻消融治疗SD大鼠皮下移植瘤, 冷冻后病灶局部可见3个比较明显的分区(图1A): 冷冻区中心(围绕氩氦刀探头插入处)细胞完全坏死崩解, 核碎裂, 呈凝固性坏死; 坏死区域周边出现明显的损伤区带,

## ■ 研发前沿

氩氦冷冻增强TCL细胞的杀伤功能的机制尚不清楚, 涉及肿瘤抗原的刺激以及相关细胞因子的共同作用, 其中冻融肿瘤抗原的刺激可能起了决定性作用.

## ■ 相关报道

目前对于氩氦刀的研究多数集中于其局部消融时间、范围和效果等领域, 对于其对免疫功能的影响的研究未能深入. 李泳群 *et al*<sup>[3]</sup>研究肺癌细胞体外冷冻消融后的冻融组织能够上调IL-2的表达和活化单个核细胞的杀伤活性.

■创新盘点

该研究以氩氦刀冷冻消融SD大鼠皮下移植瘤,观察其对细胞凋亡及T细胞免疫的影响.得出氩氦冷冻可有效激活小鼠肿瘤抗原特异性的T细胞,有效地诱发和增强机体的抗肿瘤免疫效应结论.

表 1 TUNEL凋亡细胞阳性率 (%)

分组	3 h	12 h	24 h	3 d	7 d
荷瘤对照组	8.34 ± 3.78	10.43 ± 4.12	9.52 ± 2.37	11.02 ± 3.90	10.73 ± 3.07
冷冻治疗组	43.12 ± 5.67 <sup>a</sup>	68.28 ± 7.85 <sup>a</sup>	60.71 ± 6.22 <sup>a</sup>	52.33 ± 4.54 <sup>a</sup>	38.25 ± 6.34 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P<0.05 vs 荷瘤对照组.

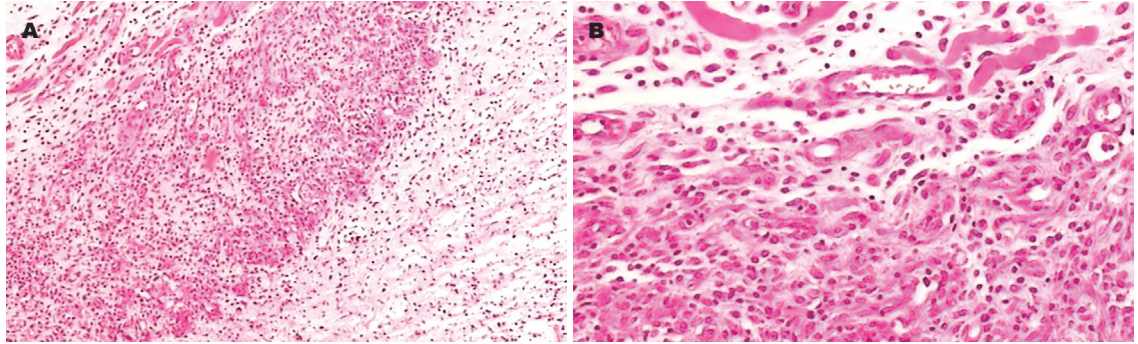


图 1 冷冻治疗后冰球边缘组织病理变化. A: 病灶局部(HE × 40); B: 病灶局部(HE × 100).

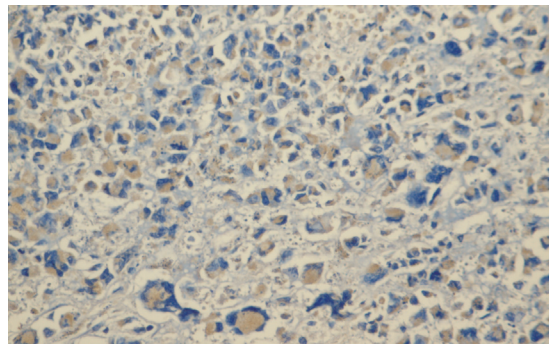


图 2 冷冻术后TUNEL染色检测细胞凋亡(x400).

其中仍可见部分癌细胞,但细胞皱缩,核浓集,染色质固缩,呈典型的凋亡细胞特征.局部血管充血、栓塞、渗出(图1B);外围则是未受损的肿瘤细胞,形态正常.

2.2 细胞凋亡 对SD大鼠皮下移植瘤实施局部冷冻后, TUNEL染色结果显示, 凋亡细胞主要集中在冰球周围损伤区带, 细胞出现了凋亡特有的形态学变化: 表现为细胞核着棕黄色, 核固缩, 染色质浓缩, 部分细胞已经破碎溶解(图2), 荷瘤对照组肿瘤组织中少量凋亡细胞散在分布. 与荷瘤对照组相比, 冷冻组各时间点凋亡细胞阳性率均显著增高(P<0.05, 表1). 冷冻组凋亡细胞于术后3 h即开始增多, 术后12 h凋亡达高峰68.28%±7.85%.

2.3 冷冻术后特异性T淋巴细胞增殖 以正常对照组小鼠为对照, 荷瘤对照组小鼠接种肿瘤后, 肿瘤相关抗原浓度较高时可诱发特异性T淋巴细

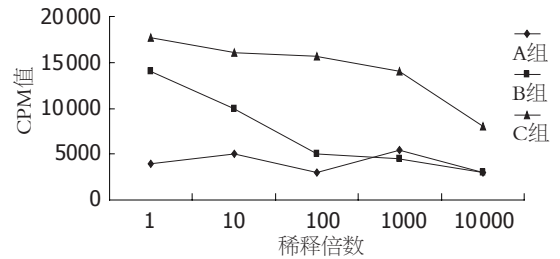


图 3 冷冻术后肿瘤相关抗原诱导特异性T淋巴细胞增殖.

胞增殖; 冷冻组荷瘤小鼠经氩氦刀冻融瘤体后, 在肿瘤相关抗原稀释10 000倍时, 还可以诱发抗原特异性的T淋巴细胞增殖反应, 较荷瘤对照组更强(图3).

3 讨论

氩氦靶向肿瘤治疗技术是FDA于1998年批准, 欧盟CE认证的一项代表21世纪科学技术发展水平的肿瘤微创外科治疗系统(endocare cryocare TM surgical system), 简称氩氦刀. 由于操作安全、禁忌证少、出血少、组织反应轻、不良反应少等优点, 目前氩氦刀在肿瘤的治疗中得到越来越广泛的应用. 是继射频, 微波, 激光, 超声波聚集, γ-射线, 中子射线之后又一新的肿瘤局部消融治疗手段<sup>[1]</sup>. 治疗时, 氩氦刀冷冻冰球中心的温度可达-125℃左右, 可致细胞完全坏死消融. 但随着距探头中心距离的增加, 温度逐渐回升<sup>[3]</sup>, 冰球周围癌细胞并未坏死, 而表现为一个冷冻损伤区带. 研究氩氦刀对该区域组织细胞



的影响, 对于手术靶区设计及解决术后残留问题, 具有重要的临床意义。

本实验的研究结果显示, 皮下移植瘤经氩氦刀冷冻消融后, 在冷冻中心区域, 肿瘤组织消融比较完全, 细胞完全坏死崩解, 核碎裂, 呈凝固性坏死。在坏死区域周边出现明显的损伤区带, 其中仍可见部分癌细胞, 但细胞皱缩, 染色质固缩, 呈典型的凋亡细胞特征。并且在冷冻后相当长的时间内, 冷冻损伤区带细胞仍存在较高的凋亡率。这与国外实验结果一致<sup>[4-14]</sup>。提示可能由于坏死和低氧血症等共同诱导的继发炎症反应, 构成了冷冻后的延迟效应, 也可以诱导细胞凋亡, 其凋亡机制可能亦参与了冷冻所致的细胞损伤。国内亦有研究<sup>[15]</sup>表明在冷冻后冰球周边损伤区带组织可观察到caspase-3剪切, 这提示我们在氩氦冷冻消融治疗后, 有必要联合放、化疗等治疗手段, 以进一步促进冷冻周边损伤区带细胞凋亡, 进而提高冷冻治疗的效果。

氩氦刀治疗是利用超低温快速冷冻、解冻过程, 破坏细胞膜, 引起局部肿瘤细胞破坏, 反复冻融可以使肿瘤抗原持续缓慢释放入血, 理论上可以有效诱发肿瘤特异性免疫反应<sup>[16-19]</sup>。Tc淋巴细胞激活是抗肿瘤免疫的效应阶段。Tc亚群在体内以非活化的前体细胞(pTc)形式存在, 在经过抗原激活及辅助性T细胞(CD4<sup>+</sup>, Th)协同作用下分化发育为效应Tc细胞后通过双信号途径发挥细胞毒性, 起到杀灭肿瘤细胞的作用。细胞毒T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)细胞的杀瘤活性明显升高机制可能有二: 一方面是冻融细胞内抗原释放被CTL识别, 刺激CTL特异性的杀瘤活性有关; 另一方面, 以往的实验表明冻融的肿瘤细胞能诱导单个核细胞高表达IL-12, IL-12可以有效激活NK细胞活性, 促使CD4<sup>+</sup> T细胞向Th1亚群分化, 并刺激CTL成熟, 上调CTL的活性<sup>[20-27]</sup>。本研究证明氩氦冷冻具有对肿瘤相关抗原特异性细胞毒性T细胞的激活、增殖作用, 氩氦刀治疗后肿瘤相关抗原的持续释放, 可有效诱发、增强机体的抗肿瘤免疫, 如果和CIK过继免疫治疗、树突状疫苗等免疫治疗方法联合应用, 将会在中晚期肿瘤的临床治疗方面开辟新的局面, 缓解患者痛苦, 提高生活质量, 减少肿瘤复发。

#### 4 参考文献

- 1 张积仁. Cryocare氩氦靶向肿瘤治疗技术. 生物医学工程研究 2005; 24: 128-132
- 2 于天骅, 王洪武, 周一欣, 刘静, 冯华松, 陆海英. Endocare型氩氦冷刀冻结与复温性能的实验研究. 航

- 天医学与医学工程 2003; 16: 60-63
- 3 Schacht V, Becker K, Szeimies RM, Abels C. Apoptosis and leucocyte-endothelium interactions contribute to the delayed effects of cryotherapy on tumours in vivo. *Arch Dermatol Res* 2002; 294: 341-348
- 4 Yaren A, Oztop I, Kargi A, Ulukus C, Onen A, Sanli A, Binicier O, Yilmaz U, Alakavuklar M. Bax, bcl-2 and c-kit expression in non-small-cell lung cancer and their effects on prognosis. *Int J Clin Pract* 2006; 60: 675-682
- 5 Jungraithmayr W, Burger D, Olschewski M, Eggstein S. Cryoablation of malignant liver tumors: results of a single center study. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 554-560
- 6 Mazur P, Seki S, Pinn IL, Kleinhans FW, Edashige K. Extra- and intracellular ice formation in mouse oocytes. *Cryobiology* 2005; 51: 29-53
- 7 Schneider U, Mazur P. Relative influence of unfrozen fraction and salt concentration on the survival of slowly frozen eight-cell mouse embryos. *Cryobiology* 1987; 24: 17-41
- 8 Zawlodzka S, Takamatsu H. Osmotic injury of PC-3 cells by hypertonic NaCl solutions at temperatures above 0 degrees C. *Cryobiology* 2005; 50: 58-70
- 9 Shapiro L, Dinarello CA. Hyperosmotic stress as a stimulant for proinflammatory cytokine production. *Exp Cell Res* 1997; 231: 354-362
- 10 den Brok MH, Suttmuller RP, Nierkens S, Bennink EJ, Toonen LW, Figdor CG, Ruers TJ, Adema GJ. Synergy between in situ cryoablation and TLR9 stimulation results in a highly effective in vivo dendritic cell vaccine. *Cancer Res* 2006; 66: 7285-7292
- 11 Redondo P, del Olmo J, López-Díaz de Cerio A, Inoges S, Marquina M, Melero I, Bendandi M. Imiquimod enhances the systemic immunity attained by local cryosurgery destruction of melanoma lesions. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 1673-1680
- 12 Sabel MS, Nehs MA, Su G, Lowler KP, Ferrara JL, Chang AE. Immunologic response to cryoablation of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 90: 97-104
- 13 Osada S, Imai H, Tomita H, Tokuyama Y, Okumura N, Matsushashi N, Sakashita F, Nonaka K. Serum cytokine levels in response to hepatic cryoablation. *J Surg Oncol* 2007; 95: 491-498
- 14 温居一, 段蕴铀, 邹日坤, 冯华松, 聂舟山. 氩氦刀对T739小鼠LA795皮下移植瘤坏死及细胞凋亡的影响. 第四军医大学学报 2007; 28: 1742-1745
- 15 骆益宙, 顾小强, 钱建新, 武清, 王杰军. 氩氦刀治疗前列腺癌对特异性细胞免疫功能的影响. 生物医学工程研究 2007; 26: 295-296
- 16 彭秋平, 汪森明, 张积仁, 赵燕. 肝癌氩氦刀冷冻免疫的实验与临床研究. 医学研究生报 2003; 16: 145-146
- 17 王志明, 任正刚, 王天浩, 王征, 叶彤, 陈军, 叶胜龙, 汤钊猷. 氩氦冷冻对兔肝肿瘤转移的影响. 复旦学报(医学版) 2006; 33: 827-829
- 18 den Brok MH, Suttmuller RP, Nierkens S, Bennink EJ, Frielink C, Toonen LW, Boerman OC, Figdor CG, Ruers TJ, Adema GJ. Efficient loading of dendritic cells following cryo and radiofrequency ablation in combination with immune modulation induces anti-tumour immunity. *Br J Cancer* 2006; 95: 896-905
- 19 李泳群, 冯华松, 黄友章, 段蕴铀. 氩氦冻融的肺癌细胞对人外周血单个核细胞免疫功能的影响. 中国肿瘤

#### ■应用要点

氩氦冷冻治疗后肿瘤相关抗原的持续释放, 可有效诱发、增强机体的抗肿瘤免疫, 如果和CIK过继免疫治疗、树突状疫苗等免疫治疗方法联合应用, 使冷冻治疗由单纯的局部治疗上升为全身治疗, 可能为肿瘤治疗提供了一条新的有效途径。

### ■同行评价

本研究实用性强, 具有较好的参考价值。

- 2007; 16: 895-897
- 20 骆益宙, 钱建新, 顾小强, 于观贞, 王战, 武清, 王杰军. 氩氦刀治疗恶性黑色素瘤对小鼠T细胞免疫的影响. 华南国防医学杂志 2008; 22: 7-8
- 21 杜英, 陈绍倩, 黄玉敏, 董子明. 人脐血树突状细胞分泌外来体的特性及其增强CTL杀伤活性的研究. 细胞与分子免疫学杂志 2006; 22: 33-37
- 22 Büssing A, Stumpf C, Tröger W, Schietzel M. Course of mitogen-stimulated T lymphocytes in cancer patients treated with Viscum album extracts. *Anticancer Res* 2007; 27: 2903-2910
- 23 Udagawa M, Kudo-Saito C, Hasegawa G, Yano K, Yamamoto A, Yaguchi M, Toda M, Azuma I, Iwai T, Kawakami Y. Enhancement of immunologic tumor regression by intratumoral administration of dendritic cells in combination with cryoablative tumor pretreatment and Bacillus Calmette-Guerin cell wall skeleton stimulation. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 7465-7475
- 24 李泳群, 冯华松, 黄友章, 段蕴铀. 氩氦刀冻融的肺癌细胞联合IL-2刺激人外周血单个核细胞免疫功能. 生物医学工程研究 2005; 22: 119-121
- 25 Urano M, Tanaka C, Sugiyama Y, Miya K, Saji S. Antitumor effects of residual tumor after cryoablation: the combined effect of residual tumor and a protein-bound polysaccharide on multiple liver metastases in a murine model. *Cryobiology* 2003; 46: 238-245
- 26 李德忠, 宋华志, 易峰涛, 周小煦. 氩氦刀冷冻兔肝后局部组织变化及超微病理研究. 华南国防医学杂志 2006; 20: 4-6
- 27 宋华志, 李德忠, 周小煦, 易峰涛. 氩氦刀冷冻后肝细胞中线粒体变化的电镜观察. 华南国防医学杂志 2007; 21: 27-28

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》正文要求

**本刊讯** 本刊正文标题层次为 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 以下逐条陈述: (1)引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系. (2)材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可. (3)结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论. (4)讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾. 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: … . 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  ( $P > 0.05$  不注). 如同一表中另有一套 $P$ 值, 则<sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$ ; 第3套为<sup>e</sup> $P < 0.05$ , <sup>f</sup> $P < 0.01$ .  $P$ 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P < 0.01$ ,  $t = 4.56$  vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$ 表达. 黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小 $7.5\text{ cm} \times 4.5\text{ cm}$ , 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴. (5)致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐. (常务副总编辑: 张海宁 2009-08-18)



# 食管癌高发区1259例食管癌患者临床病理与遗传易感性

李秀敏, 赵志敏, 常廷民, 张渊智, 周福有, 王建坡, 王立东, 常扶保, 郭涛, 孔国强, 张连群, 侯晓华

李秀敏, 侯晓华, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化科 湖北省武汉市 430022

李秀敏, 赵志敏, 常廷民, 新乡医学院 河南省新乡市 453003  
张渊智, 郑州市第一人民医院消化科 河南省郑州市 450004  
周福有, 王建坡, 安阳市肿瘤医院 河南省安阳市 455000  
王立东, 郭涛, 孔国强, 张连群, 河南省食管癌重点开放实验室 河南省郑州市 450052

常扶保, 林州市中心医院 河南省林州市 456550

李秀敏, 华中科技大学同济医学院协和医院在读博士, 教授, 主要从事消化系统肿瘤发病机制研究。

**作者贡献分布:** 此课题由李秀敏设计并组织实施完成; 赵志敏与常廷民参与主要资料的收集和整理; 数据分析由张渊智完成; 周福有、王建坡及常扶保协助收集临床资料; 郭涛、孔国强与张连群参与初期部分资料的收集, 侯晓华与王立东对本课题进行了全程指导; 本论文写作由李秀敏完成。

**通讯作者:** 侯晓华, 教授, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化科。houxh@public.wh.hb.cn  
电话: 027-85726381

收稿日期: 2009-06-29 修回日期: 2009-07-22

接受日期: 2009-07-27 在线出版日期: 2009-08-18

## Clinicopathological features and hereditary susceptibility of patients with esophageal cancer in a high incidence area in China: an analysis of 1259 cases

Xiu-Min Li, Zhi-Min Zhao, Ting-Min Chang,  
Yuan-Zhi Zhang, Fu-You Zhou, Jian-Po Wang,  
Li-Dong Wang, Fu-Bao Chang, Tao Guo,  
Guo-Qiang Kong, Lian-Qun Zhang, Xiao-Hua Hou

Xiu-Min Li, Xiao-Hua Hou, Department of Gastroenterology, Wuhan Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Xiu-Min Li, Zhi-Min Zhao, Ting-Min Chang, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China

Yuan-Zhi Zhang, Department of Gastroenterology, the First People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450004, Henan Province, China

Fu-You Zhou, Jian-Po Wang, Anyang Tumor Hospital, Anyang 455000, Henan Province, China

Li-Dong Wang, Tao Guo, Guo-Qiang Kong, Lian-Qun Zhang, Henan Key Laboratory for Esophageal Cancer Research, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Fu-Bao Chang, Linzhou Central Hospital, Linzhou 456550, Henan Province, China

Correspondence to: Xiao-Hua Hou, Department of Gastroenterology, Wuhan Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. houxh@public.wh.hb.cn

Received: 2009-06-29 Revised: 2009-07-22

Accepted: 2009-07-27 Published online: 2009-08-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the pathological features and hereditary susceptibility of 1259 patients with esophageal cancer in a high incidence area around Taihang mountain in China.

**METHODS:** A total of 1259 esophageal cancer patients who came from Linzhou and the surrounding area and were hospitalized at Linzhou Central Hospital and Anyang Tumor Hospital were investigated retrospectively. All patients were endoscopically and histologically diagnosed as esophageal cancer at first hospitalization. The family history of malignant tumors, age at diagnosis, tumor site, clinicopathological type, histological type, differentiation degree and TNM stage were investigated retrospectively.

**RESULTS:** The age at diagnosis in these patients obeyed the normal distribution. The mean age at diagnosis was  $59.82 \pm 8.17$  years. Of all esophageal cancer patients included, 32.0% (403/1259) had two or more family members with esophageal cancer or gastric cardiac cancer, 38.6% (486/1259) had two or more family members with malignant tumors, 3.9% (49/1259) had two parents with esophageal cancer, gastric cardiac cancer or gastric cancer; 8.01% (102/1259) had at least three relatives with esophageal cancer or other malignant tumors in two successive generations, 6.0% (76/1259) had at least three relatives with esophageal cancer in two successive generations. The middle part of the esophagus was most frequently affected, followed by the upper and lower parts of the esophagus. Tumor site was significantly correlated with the age at diagnosis ( $P < 0.001$ ). Esophageal cancer at the middle and upper esophagus often occurred in the groups of patients having an age at diagnosis  $\leq 40$ , 50-60 and 60-70 years. The majority of patients suffered from middle- or late-stage esophageal cancer, especially those whose parents or spouse had malignant tumors ( $P < 0.05$ ). Esophageal squamous cell carcinoma was diagnosed in 96% (1202/1250) of patients.

**CONCLUSION:** Hereditary susceptibility to malignant tumors (mainly esophageal cancer) is

## ■背景资料

我国恶性肿瘤的发病率和死亡率呈明显上升趋势, 已成为城乡居民的首要死因, 而消化系恶性肿瘤发病率则最高, 约占所有恶性肿瘤的60%-70%。近年来我国食管癌的发病率和死亡率虽有所下降, 但仍居恶性肿瘤的第4位。林州市及其周边地区为世界上食管癌发病率与死亡率最高的地区。

## ■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; 施瑞华, 教授, 南京医科大学第一附属医院消化科

## ■ 研究前沿

太行山区尤其是林州市及其周边地区食管癌为世界上食管癌发病率最高的地区,经过40余年的综合防治,该地区食管癌的发生率明显下降,但仍远远高于国内其他地区。

currently the main cause for high incidence of esophageal cancer in Linzhou and the surrounding area. The middle part of the esophagus is most frequently affected, followed by the upper part of the esophagus. Tumor site is significantly correlated with the age at diagnosis in esophageal cancer patients.

**Key Words:** Esophageal cancer; Hereditary susceptibility; Pathology; Clinical

Li XM, Zhao ZM, Chang TM, Zhang YZ, Zhou FY, Wang JP, Wang LD, Chang FB, Guo T, Kong GQ, Zhang LQ, Hou XH. Clinicopathological features and hereditary susceptibility of patients with esophageal cancer in a high incidence area in China: an analysis of 1259 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(23): 2367-2373

## 摘要

**目的:** 探讨太行山区林州市及其周边食管癌高发区食管癌患者近年来临床病理特点的变化及遗传易感性。

**方法:** 2006-10/2008-12于安阳市肿瘤医院和林州市中心医院住院治疗的食管癌患者1259例,来自林州市及其周边食管癌高发地区,诊断年龄为33-84岁,所有患者均为首次住院和首次经内镜检查诊断并经组织学检查确诊病例。回顾分析食管癌患者的肿瘤家族史、食管癌诊断年龄、肿瘤发生部位、临床病理类型、组织学类型及分化程度、TNM分期等内容。

**结果:** 食管癌患者的诊断年龄服从正态分布,平均诊断年龄为 $59.82 \pm 8.17$ 岁;家族中具有2个或2个以上食管癌或贲门癌的患者占32.0%(403/1259);家族中具有2个或2个以上成员患(包括患者本人)恶性肿瘤的患者占38.6%(486/1259),父母均患食管癌或贲门癌、胃癌者占3.9%(49/1259),家族中累及2代且至少有3个成员患食管癌或其他恶性肿瘤的患者占8.01%(102/1259),家族中累及2代且至少有3个成员(包括患者本人)患食管癌患者占6.0%(76/1259);食管癌最常发生的部位是中段,其次为上段、下段,发生部位与患者的诊断年龄密切相关( $P < 0.001$ ), $\leq 40$ 岁、-60岁和-70岁等组的患者以中段与上段多见;中晚期食管癌患者多见,爱人或父母未患恶性肿瘤的患者中晚期较多( $P < 0.05$ );鳞癌占96.2%(1202/1250)。

**结论:** 恶性肿瘤尤其是食管癌遗传易感性可能是目前林州市及其周边食管癌高发区食管癌高发的主要原因;食管癌最常发生的部位是食管中段,其次为上段;食管癌的发生部位

与患者的发病年龄密切相关。

**关键词:** 食管癌; 遗传易感性; 病理学; 临床

李秀敏, 赵志敏, 常廷民, 张渊智, 周福有, 王建坡, 王立东, 常扶保, 郭涛, 孔国强, 张连群, 侯晓华. 食管癌高发区1259例食管癌患者临床病理与遗传易感性. *世界华人消化杂志* 2009; 17(23): 2367-2373

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2367.asp>

## 0 引言

流行病学调查显示,我国恶性肿瘤的发病率和死亡率呈明显上升趋势,已成为我国城乡居民的首要死因,而消化系统恶性肿瘤发病率则最高,约占所有恶性肿瘤的60%-70%<sup>[1]</sup>。近年来我国食管癌的发病率和死亡率虽有所下降,但仍居我国恶性肿瘤的第4位<sup>[1]</sup>。本研究通过回顾性调查林州市及其周边食管癌高发地区1259例食管癌患者,分析食管癌的临床病理特征、遗传易感性及其相关性,为进一步制定食管癌综合防治措施提供理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2006-10/2008-12于安阳市肿瘤医院和林州市中心医院住院治疗的食管癌患者1259例。患者来自于林州市及其周边食管癌高发地区,其中男765例,女494例;男女比为1.55:1,诊断年龄为33-84岁,所有患者均为首次住院和首次经内镜检查诊断并经组织学检查确诊病例。

### 1.2 方法

**1.2.1 调查内容:** 包括患者来源地域(城镇、乡村)、检查时间、年龄(确诊年龄)、性别、主诉、临床表现、症状持续时间、确诊方式与确诊时间、个人史、家族史、肿瘤发生部位、临床病理类型、组织学类型及分化程度、TNM分期等内容。

**1.2.2 临床病理分型标准:** 根据临床、X线及内镜下表现,将食管癌分为早期食管癌和中晚期食管癌。早期食管癌分为隐伏型、糜烂型、斑块型和乳头型;中晚期食管癌分为髓质型、覃伞型、溃疡型、缩窄型和腔内型<sup>[2]</sup>。

**1.2.3 组织学类型:** 分为鳞癌、腺癌、腺鳞癌、未分化癌(包括大细胞癌、小细胞癌、类癌)和其他类型(包括肉瘤、淋巴瘤、癌肉瘤、恶性黑色素瘤等);根据分化程度分为高分化、中分化、低分化及未分化等4种<sup>[2]</sup>。

**1.2.4 恶性肿瘤遗传易感性的定义:** 如患者家族内有2个或更多个一级和/或二级亲属(包括患者

本人)患食管癌, 则定义为具有食管癌遗传易感性; 如患者家族内除患者外, 至少有1个或更多个一级和/或二级亲属(包括患者本人)患恶性肿瘤(包括食管癌), 则定义为具有恶性肿瘤遗传易感性。

1.2.5 年龄分组: 根据患者诊断食管癌时的年龄, 将食管癌患者分为 $\leq 40$ 岁、 $-50$ 岁、 $-60$ 岁、 $-70$ 岁、 $-80$ 岁、 $\geq 81$ 岁6组。

**统计学处理** 采用SPSS14.0统计软件包对资料进行描述性分析, 相关性检验采用 $\chi^2$ 检验, 显著性水准为 $\alpha = 0.05$ ; 计量资料的正态性检验采用动差法, 显著性水准 $\alpha = 0.20$ , 分布曲线的偏度与峰度均为 $P > 0.05$ 时可认为资料服从正态分布。

## 2 结果

2.1 诊断年龄分布 1259例食管癌患者的食管癌诊断年龄呈正态分布曲线(偏度系数与峰度系数检验时均为 $P > 0.05$ )(图1), 食管癌患者的平均诊断年龄为 $59.82 \pm 8.17$ 岁, 中位诊断年龄为59.63岁, 年龄范围为33-84岁。 $\leq 40$ 岁、 $-50$ 岁、 $-60$ 岁、 $-70$ 岁、 $-80$ 岁、 $> 80$ 岁年龄组的食管癌患者分布占0.9%(11/1259)、11.4%(143/1259)、43.3%(545/1259)、34.2%(431/1259)、10.2%(128/1259)、0.1%(1/1259)。男性患者平均诊断年龄 $59.26 \pm 8.37$ 岁, 女性患者平均诊断年龄 $60.21 \pm 7.86$ 岁, 男性患者食管癌的诊断年龄较女性患者早( $t = -1.77, P = 0.077$ )。

2.2 食管癌患者的恶性肿瘤家族史 1259例食管癌患者中, 家族中具有2个或2个以上(包括患者本人)食管癌或贲门癌的患者占32.0%(403/1259); 家族中具有2个或2个以上成员患(包括患者本人)恶性肿瘤的患者占38.6%(486/1259), 患者家属所发生的恶性肿瘤为食管癌、贲门癌、胃癌、结直肠癌、子宫内膜癌、肺癌、咽喉癌、肝癌、脑部恶性肿瘤、肾癌、淋巴瘤、扁桃腺癌、皮肤癌、恶性淋巴瘤、乳腺癌、骨恶性肿瘤等多个部位。患者夫妻或父母均患恶性肿瘤的患者占4.2%(53/1259), 并且均为食管癌或贲门癌、胃癌; 其中父母均患食管癌或贲门癌、胃癌者占3.9%(49/1259)。家族中累及2代且至少有3个成员(包括患者本人)患食管癌或其他恶性肿瘤的患者占8.01%(102/1259), 其他恶性肿瘤多数为胃癌和贲门癌; 家族中累及2代且至少有3个成员(包括患者本人)患食管癌患者占6.0%(76/1259)。

2.3 恶性肿瘤家族史与食管癌诊断年龄的相关

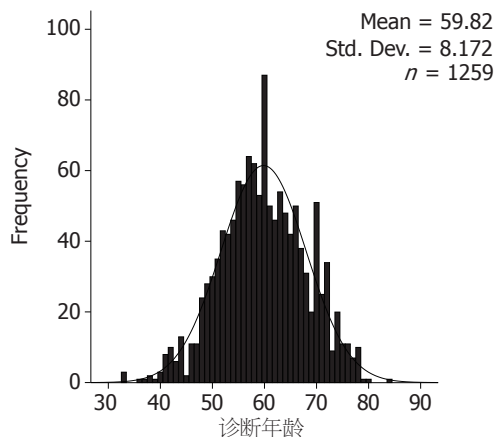


图1 食管癌患者诊断年龄的分布。

### ■ 相关报道

肖邦生 *et al* 对林州市1172例食管癌患者的调查显示30%的患者具有食管癌遗传易感性。

性 1259例食管癌患者, 具有恶性肿瘤家族史的食管癌患者平均诊断年龄为 $59.47 \pm 8.01$ 岁, 无恶性肿瘤家族史的食管癌患者平均诊断年龄为 $60.03 \pm 8.27$ 岁, 两者的差异无统计学意义( $t = 1.201, P = 0.230$ ); 具有食管贲门癌家族史的食管癌患者平均诊断年龄为 $59.48 \pm 8.16$ 岁, 其他食管癌患者平均诊断年龄为 $59.97 \pm 8.18$ 岁, 两者的差异无统计学意义( $t = 0.989, P = 0.323$ ); 家族中累及2代且至少有3个成员(包括患者本人)患食管癌或其他恶性肿瘤的患者平均诊断年龄为 $60.98 \pm 7.68$ 岁, 其他食管癌患者平均诊断年龄为 $59.71 \pm 8.21$ 岁, 两者的差异无统计学意义( $t = -1.502, P = 0.133$ ); 家族中累及2代且至少有3个成员(包括患者本人)患食管癌的患者平均诊断年龄为 $62.05 \pm 7.85$ 岁, 其他食管癌患者平均诊断年龄为 $59.67 \pm 8.17$ 岁, 两者的差异无统计学意义( $t = -1.502, P = 0.133$ ); 患者夫妻或父母均患恶性肿瘤的食管癌患者平均诊断年龄为 $60.98 \pm 7.85$ 岁, 其他食管癌患者平均诊断年龄为 $59.78 \pm 8.19$ 岁, 两者的差异无统计学意义( $t = -1.049, P = 0.294$ )。

2.4 食管癌患者的肿瘤发生部位情况及与诊断年龄、恶性肿瘤家族史的相关性 1259例食管癌患者中, 肿瘤发生部位明确的患者共有970例, 不同年龄组的食管癌患者肿瘤发生部位情况如表1所示, 肿瘤的发生部位与患者的诊断年龄密切相关( $P < 0.001$ ),  $\leq 40$ 岁、 $-60$ 岁和 $-70$ 岁等组的患者以中段与上段多见, 而 $-50$ 岁组和 $-80$ 岁组则以中段和下段常见。食管癌的发生部位, 与患者是否具有恶性肿瘤家族史、是否具有食管癌贲门癌家族史、家族中是否累及2代且至少有3个成员(包括患者本人)患食管癌或其他恶性肿瘤、与家族中是否累及2代且至少有3个成员(包括患者本人)



### ■创新盘点

本研究回顾性调查林州市及其周边食管癌高发地区1259例食管癌患者,分析食管癌的临床病理特征、遗传易感性及其相关性。

表 1 不同年龄组的食管癌患者肿瘤发生部位  $n(\%)$

年龄(岁)	上段	中段	下段	上中段	中下段	双源癌	合计
≤40	4(40.0)	4(40.0)	1(10.0)	0(0.0)	1(10.0)	0(0.0)	10(100.0)
-50	13(11.6)	82(73.2)	17(15.2)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	112(100.0)
-60	90(21.1)	265(62.1)	59(13.8)	6(1.4)	2(0.5)	5(1.2)	427(100.0)
-70	49(15.2)	230(71.2)	41(12.7)	1(0.3)	2(0.6)	0(0.0)	323(100.0)
-80	8(8.2)	69(70.4)	19(19.4)	0(0.0)	1(1.0)	1(1.0)	98(100.0)
>80	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)

$\chi^2 = 92.05, P < 0.001$ .

表 2 不同年龄组的食管癌患者大体病理类型  $n(\%)$

年龄(岁)	隐伏型	糜烂型	斑块型	乳头型	髓质型	蕈伞型	溃疡型	缩窄型	腔内型	合计
≤40	0(0.0)	2(18.2)	1(9.1)	0(0.0)	6(54.5)	0(0.0)	1(9.1)	1(9.1)	0(0.0)	11(100.0)
-50	0(0.0)	8(5.5)	0(0.0)	0(0.0)	83(56.8)	1(0.7)	49(33.6)	5(3.4)	0(0.0)	146(100.0)
-60	9(1.7)	34(6.4)	14(2.6)	2(0.4)	256(47.9)	42(7.9)	149(27.9)	22(4.1)	7(1.3)	535(100.0)
-70	1(0.2)	28(6.8)	14(3.4)	1(0.2)	206(49.8)	22(5.3)	121(29.2)	14(3.4)	7(1.7)	414(100.0)
-80	1(0.7)	9(6.4)	1(0.7)	0(0.0)	80(56.7)	7(5.0)	37(26.2)	3(2.1)	3(2.1)	141(100.0)
>80	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)

$\chi^2 = 6.95, P < 0.139$ .

患食管癌、患者爱人或父母是否均患恶性肿瘤等因素均无明显的相关性(均 $P > 0.05$ )。

2.5 食管癌患者的大体病理类型及与诊断年龄、恶性肿瘤家族史的相关性 1259例食管癌患者中,1218例具有明确的大体病理类型(表2),其中早期食管癌患者占10.3%(125/1218),中晚期食管癌患者占89.7%(1093/1218)。食管癌患者为早期或中晚期与患者的诊断年龄没有明显的相关性( $P > 0.05$ );与患者是否具有恶性肿瘤家族史、是否具有食管癌贲门癌家族史、家族中是否累及2代且至少有3个成员(包括患者本人)患食管癌或其他恶性肿瘤、与家族中是否累及2代且至少有3个成员(包括患者本人)患食管癌等均无明显的相关性(均 $P > 0.05$ );但与患者爱人或父母是否均患恶性肿瘤具有明显的相关性( $\chi^2 = 4.46, P = 0.035$ ),爱人或父母未患恶性肿瘤的患者中晚期较多。

2.6 食管癌患者的病理组织学类型及与诊断年龄、恶性肿瘤家族史的相关性 1259例食管癌患者中,1250例具有明确的病理组织学类型(表3),患者的诊断年龄与组织学类型无明显的相关性( $P > 0.05$ )。食管癌患者的病理组织学类型与患者是否具有恶性肿瘤家族史、是否具有食管癌贲门癌家族史、家族中是否累及2代且至少有3

个成员(包括患者本人)患食管癌或其他恶性肿瘤、与家族中是否累及2代且至少有3个成员(包括患者本人)患食管癌、患者爱人或父母是否均患恶性肿瘤等均无明显的相关性(均 $P > 0.05$ )。

2.7 食管癌患者的肿瘤分化程度及与诊断年龄、恶性肿瘤家族史的相关性 1259例食管癌患者中,1227例患者具有明确的病理组织分化程度(表4),诊断年龄与食管癌患者的肿瘤分化程度无明显的相关性( $P > 0.05$ )。食管癌患者的肿瘤分化程度与患者是否具有恶性肿瘤家族史、是否具有食管癌贲门癌家族史、家族中是否累及2代且至少有3个成员(包括患者本人)患食管癌或其他恶性肿瘤、与家族中是否累及2代且至少有3个成员(包括患者本人)患食管癌、患者爱人或父母是否均患恶性肿瘤等均无明显的相关性(均 $P > 0.05$ )。

2.8 不同年龄组的食管癌患者TNM分期情况及与诊断年龄、恶性肿瘤家族史的相关性 1259例食管癌患者中,有明确TNM分期者1234例。各年龄组食管癌患者的TNM分期情况如表5所示,II期-IV期的患者约占93%(1156/1243)。食管癌患者的TNM分期与患者的诊断年龄没有明显的相关性( $P > 0.05$ )。食管癌患者的TNM分期与患者是否具有恶性肿瘤家族史( $\chi^2 = 6.76, P = 0.149$ )、

表 3 不同年龄组的食管癌患者组织学类型  $n(\%)$ 

年龄(岁)	鳞癌	腺癌	腺鳞癌	未分化癌	其他类型	合计
≤40	11(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	11(100.0)
-50	136(95.1)	4(2.8)	0(0.0)	3(2.1)	0(0.0)	143(100.0)
-60	524(96.7)	8(1.5)	2(0.4)	8(1.5)	0(0.0)	542(100.0)
-70	409(95.6)	10(2.3)	2(0.5)	6(1.4)	1(0.2)	428(100.0)
-80	122(96.8)	4(3.2)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	126(100.0)
>80	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)

$\chi^2 = 8.11, P < 0.946.$

表 4 不同年龄组的食管癌患者肿瘤分化程度  $n(\%)$ 

年龄(岁)	高分化	中分化	低分化	未分化	合计
≤40	2(0.2)	4(0.4)	4(0.4)	0(0.0)	10(100.0)
-50	11(8.0)	87(63.5)	39(28.5)	0(0.0)	137(100.0)
-60	35(6.5)	343(64.0)	155(28.9)	3(0.6)	536(100.0)
-70	32(7.6)	255(60.7)	132(31.4)	1(0.2)	420(100.0)
-80	11(8.9)	74(59.7)	39(31.5)	0(0.0)	124(100.0)
>80	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)

$\chi^2 = 7.43, P < 0.828.$

表 5 不同年龄组的食管癌患者TNM分期  $n(\%)$ 

年龄(岁)	0期	I期	II a期	II b期	III期	IV期	合计
≤40	0(0.0)	1(9.1)	5(45.5)	1(9.1)	4(36.4)	0(0.0)	11(100.0)
-50	0(0.0)	4(2.8)	58(41.1)	18(12.8)	56(39.7)	6(4.3)	141(100.0)
-60	0(0.0)	41(7.7)	221(41.5)	58(10.9)	204(38.3)	8(1.5)	532(100.0)
-70	0(0.0)	26(6.1)	164(38.5)	43(10.1)	187(43.9)	6(1.4)	426(100.0)
-80	0(0.0)	6(4.8)	49(39.5)	19(15.3)	49(39.5)	1(0.8)	124(100.0)
>80	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)

$\chi^2 = 14.3, P < 0.58.$

是否具有食管癌贲门癌家族史( $\chi^2 = 9.34, P = 0.053$ )、家族中是否累及2代且至少有3个成员(包括患者本人)患食管癌或其他恶性肿瘤( $\chi^2 = 8.78, P = 0.067$ )、与家族中是否累及2代且至少有3个成员(包括患者本人)患食管癌( $\chi^2 = 3.22, P = 0.522$ )等均无明显的相关性; 但与患者爱人或父母是否均患恶性肿瘤具有明显的相关性( $\chi^2 = 13.34, P = 0.010$ ), 爱人或父母均患恶性肿瘤的患者早、中期食管癌常见。

### 3 讨论

我国林州市及其周边地区为世界上食管癌发病率和死亡率最高的地区。自1972年在林州市及

其周边地区开始进行防霉、去胺、改变不良饮食习惯、改造有害生活环境、改良饮食营养卫生等综合性预防措施以来, 食管癌的发病率和死亡率均明显降低, 2002年调查显示食管癌的发病率(56.57/10万)较1972年(162.7/10万)下降了106.13/10万<sup>[3]</sup>, 但仍为目前太行山一带主要的恶性肿瘤。由于目前采用的综合预防措施, 仅能降低由环境因素导致的散发性食管癌的发病率, 无法降低由于遗传因素所致食管癌的发病率。本研究通过调查林州市及其周边食管癌高发区的1259例初次就诊并手术治疗的食管癌患者, 探讨近年来食管癌高发区食管癌患者临床病理特点的变化及肿瘤遗传易感性对高发区食管癌

### ■应用要点

本研究分析了近年来林州市及其周边食管癌高发区食管癌患者的临床病理特点变化及恶性肿瘤尤其是食管癌的遗传易感性, 为进一步研究该地区食管癌的发病机制和制定防治措施提供了初步的线索。



### ■同行评价

本研究资料详实, 讨论重点突出, 对于了解食管癌的高发原因、指导治疗(尤其是当地)具有重要的临床意义及实用性。

发病的影响。

本组1259例食管癌患者的诊断年龄服从正态分布, 平均诊断年龄为59.82岁, 中位诊断年龄为59.63岁, 大多数患者的诊断年龄为50-70岁, 而50岁以下和70岁以上的患者则较少。男性患者的诊断年龄(平均59.26岁)虽较女性患者(60.21岁)早, 但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。提示该地区食管癌患者可能来自于同一个总体, 发病年龄具有一定的规律, 大部分患者在50-70岁发病。一般认为食管癌最常发生在食管中段, 其次为下段, 而上段则较少。本组患者食管癌最常发生的部位是食管中段, 但其次为上段, 而下段则较少, 并且食管癌的发生部位与患者的诊断年龄密切相关,  $\leq 40$ 岁、 $-60$ 岁和 $-70$ 岁等组的患者以中段与上段多见, 而 $-50$ 岁组和 $-80$ 岁组则以中段和下段常见。该地区食管癌好发部位的分布明显不同于国内其他地区的研究。与该地区早期的研究相比较, 中段食管癌的构成比没有明显的变化, 而上段食管癌的构成比明显升高, 而下段食管癌所占的比例则明显下降<sup>[4]</sup>。原因可能与影响该地区食管癌发病的环境因素作用降低, 遗传因素的影响增强有关。进一步增加样本含量, 将有助于阐明这一问题。

食管癌患者的大体病理类型, 髓质型占50.2%(611/1218), 其次为溃疡型(28.6%), 早期食管癌仅占10.3%(125/1218)。96.0%(1202/1250)的食管癌患者病理组织学类型为鳞癌, 其次为腺癌(2.1%)。在癌组织的分化程度方面, 大部分患者为中分化(占62.2%), 其次为低分化(30.1%)和高分化(7.4%), 肿瘤的恶性程度普遍较高。在TNM分期方面, 中期食管癌(II a和II b)患者占51.5%(636/1234), 其中II a期患者占40.3%(497/1243); 晚期(III和IV期)患者42.1%(520/1234), 而早期(0期和I期)患者则较少。与国内对同一地区1975-1998年的研究资料相比较<sup>[5]</sup>, 本组资料中, 中、晚期食管癌所占的比例虽然较前降低, 但仍处于较高的水平。太行山一带的食管癌高发区, 自1972年开展综合防治措施以来, 食管癌的发病率和死亡率明显降低, 人民的健康意识和早诊、早治意识均明显提高, 但中晚期食管癌所占的比例并没有同步降低, 仍占相当高的比例, 可能与我国的医疗卫生政策有关, 随着我国基本医疗保障制度的进一步推进和城乡居民就医费用负担的减轻, 将有助于降低该地区中晚期食管癌所占的比例, 进一步降低食管癌的死亡率。

遗传易感性是指由于遗传因素的影响或由于某种遗传缺陷、使其后代的生理代谢具有容易发生某些疾病的特性。在临床上, 食管癌的遗传易感性是指在家族内有2个或更多个一级和/或二级亲属(包括患者本人)患食管癌, 而恶性肿瘤的遗传易感性则指家族内有2个或更多个一级和/或二级亲属(包括患者本人)患恶性肿瘤。本组1259例食管癌患者中, 32.0%(403/1259)的患者家族中具有2个或2个以上(包括患者本人)食管癌或贲门癌患者, 38.6%(486/1259)的患者家族中具有2个或2个以上(包括患者本人)恶性肿瘤患者, 家族中累及2代且至少有3个(包括患者本人)患食管癌或其他恶性肿瘤的患者占8.01%(102/1259), 家族中累及2代且至少有3个(包括患者本人)患食管癌患者占6.0%(76/1259)。患者家属最常发生的恶性肿瘤是食管癌、贲门癌、胃癌, 肝癌、子宫内膜癌、肺癌、乳腺癌等亦非常常见。肖郑生 *et al*<sup>[4]</sup>对林州市1172例食管癌患者的调查显示30%的患者具有食管癌遗传易感性。本组具有家族史的食管癌患者所占的比例高于王立东 *et al*<sup>[5]</sup>的报道, 可能是我国在林州市及周边食管癌高发地区长期进行食管癌综合防治措施, 导致散发性食管癌发病率进一步降低, 且与具有遗传易感性的食管癌患者所占比例相对增高有关。

大量研究显示, 我国太行山区一带的食管癌高发地区食管癌的发病是环境因素与遗传因素相互作用的结果<sup>[5-13]</sup>。该地区自1972年实行综合性预防措施和积极宣传教育提高该地区群众疾病预防意识以来, 食管癌的患者数明显减少, 有效地降低了环境因素对该地区食管癌高发的影响, 使该地区食管癌的发病率下降了106.13/10万。随着环境因素对该地区食管癌发病影响的大大降低, 遗传因素对食管癌发病的影响愈来愈突出。对于环境因素所导致的散发性食管癌, 患者的发病风险随年龄的增大而增大, 食管癌的发病年龄分布呈偏态分布, 但本组患者食管癌的诊断年龄分布服从正态分布, 提示环境因素对该地区食管癌高发的影响愈来愈小, 而遗传因素是目前该地区食管癌高发的主要原因。本组患者中具有食管癌或恶性肿瘤家族史者所占比例高达38.6%, 提示该地区人群普遍具有恶性肿瘤尤其是食管癌遗传易感性。在历史上广东南澳岛来自河南、山西的移民在经数百年后仍然保持很高的恶性肿瘤发病率, 该地区食管癌、贲门癌的发病率和恶性肿瘤谱,

与太行山一带的食管癌高发区基本类似<sup>[4]</sup>。本研究结果和国内其他学者的研究提示, 太行山一带食管癌高发区的人群普遍具有恶性肿瘤尤其是食管癌遗传易感性, 导致该地区夫妻或父母均患恶性肿瘤常见, 从而使后代保存更高的恶性肿瘤发病率。本组研究结果显示, 食管癌患者的肿瘤发生部位、大体病理类型、组织学类型、分化程度、TNM分期等与患者的诊断年龄、食管癌贲门癌家族史、家族中是否累及2代且至少有3个(包括患者本人)患食管癌或其他恶性肿瘤、与家族中是否累及2代且至少有3个(包括患者本人)患食管癌等均无明显的相关性, 食管癌患者的恶性肿瘤家族史与患者的食管癌诊断年龄间亦没有明显的相关性; 但食管癌患者为早期或中晚期、TNM分期情况等则与患者爱人或父母是否均患恶性肿瘤密切相关, 爱人或父母均患恶性肿瘤者早、中期所占比例较高。由于本组爱人或父母均患恶性肿瘤的患者中, 父母均患恶性肿瘤者占92.5%(49/53), 这部分患者早、中期较多, 可能与该部分患者由于父母均患恶性肿瘤, 疾病预防意识较高有关; 同时亦提示遗传因素不仅与该地区人群恶性肿瘤高发有关, 而且与恶性肿瘤患者的预后亦有关。今后针对该地区人群恶性肿瘤易感性的遗传学研究, 将有助于进一步降低太行山区一带食管癌的发病率和死亡率。

#### 4 参考文献

- 1 杨玲, 李连弟, 陈育德, Parkin DM. 中国2000年及2005年恶性肿瘤发病死亡的估计与预测. 中国卫生统计 2005; 22: 218-221, 231
- 2 王吉耀. 内科学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 407-412
- 3 杨文献. 我国林县食管癌高发区病因学预防研究成效显著. 中华肿瘤杂志 2006; 28: 640
- 4 肖郑生, 张立新, 杨海军, 郝俊杰, 张三申. 食管癌3954例切除标本临床病理分析. 中国肿瘤临床与康复 2002; 9: 60-61
- 5 王立东, 樊慧, 焦新英, 宋昕, 杜娟娟, 李吉林, 张广平, 常志伟, 范宗民. 河南食管癌高发区95对单卵双胞胎疾病谱和2323例食管癌患者家族史调查. 中华肿瘤防治杂志 2006; 13: 1521-1524
- 6 温登瑰, 王士杰. 食管癌高发区上消化道癌整体高发对病因及预防的启示. 中国肿瘤临床 2008; 35: 1150-1153
- 7 杨文献, 陆士新, 刘桂亭, 黎钧耀, 杨中枢, 程同吉, 连广庭, 甄应中, 徐友梅, 王瑞林, 裘宋良, 张云汉, 董子明, 杨观瑞, 杨胜利, 陆维权, 胡东生, 李文杰, 吕全军, 王留兴, 赵立群, 连士勇, 刘志才, 李变云, 常贵生, 王占伟, 崔自由. 中国林州市食管癌高发区人群病因学预防效果观察. 中国肿瘤 2008; 17: 548-552
- 8 梁冰, 贺新伟. 食管癌高发区AGT Exon5与食管癌高易感性关系分析. 中国实用医药 2007; 2: 26-27
- 9 Cai YC, So CK, Nie AY, Song Y, Yang GY, Wang LD, Zhao X, Kinzy TG, Yang CS. Characterization of genetic alteration patterns in human esophageal squamous cell carcinoma using selected microsatellite markers spanning multiple loci. *Int J Oncol* 2007; 30: 1059-1067
- 10 常志伟, 王立东, 王宁博, 王苒, 江亚南, 杜芳, 齐义军, 郭涛, 孙哲, 李吉林, 常扶保, 常志军, 郭海云, 未庆丽, 范宗民, 高珊珊, 何欣, 郭花芹. 家族史阳性和阴性食管癌患者癌组织中FHIT和BRCA2及MLH1的表达变化. 中华肿瘤防治杂志 2006; 13: 1371-1374
- 11 张立玮, 都超群, 牛巍巍, 于卫芳, 艾军, 申玉霞, 王顺平, 王士杰. IL-8基因多态性与高发区食管癌发病风险的关联研究. 中国肿瘤临床 2008; 35: 591-595
- 12 陈志峰, 侯浚, 张健慧, 郭翠兰, 李绍森, 白文龙, 靳国梁, 王玉霞, 孟凡书, 高峰. 高发区食管贲门癌前病变患病与食管癌家族遗传分析. 肿瘤防治研究 2004; 31: 176-177
- 13 何保昌, 段广才, 蔡琳. 高危型HPV感染和p53基因多态性与食管癌关系的研究. 海峡预防医学杂志 2007; 13: 8-10
- 14 苏敏, 刘敏, 田东萍, 李晓昀, 杨合麟, 黄梅花, 阎慧芳, 邹昌洪. 广东南澳岛恶性肿瘤发病及居民饮食习惯的现况调查. 环境与职业医学 2005; 22: 312-316

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》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)采用了被引量、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 2009-08-18)

# Cyclin B1、CDK1在食管鳞癌组织中的表达及临床意义

赵春玲, 陈丽梅, 高志芹, 杜长青, 潘智芳, 于文静

## ■背景资料

肿瘤是细胞周期调控异常所致的疾病。Cyclin B1与CDK1是在有丝分裂G<sub>2</sub>/M期转变中起关键作用的细胞周期蛋白和周期蛋白依赖性蛋白激酶, 近来发现在多种实体瘤中有过表达现象。

赵春玲, 陈丽梅, 高志芹, 杜长青, 潘智芳, 于文静, 潍坊医学院细胞生物学教研室 山东省潍坊市 261053

赵春玲, 博士, 主要从事分子肿瘤学的研究。

**作者贡献分布:** 此课题由赵春玲与高志芹设计; 研究过程由赵春玲、陈丽梅、高志芹及杜长青操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由陈丽梅提供; 数据分析由杜长青、潘智芳及于文静完成; 本论文写作由赵春玲完成。

**通讯作者:** 赵春玲, 讲师, 261053, 山东省潍坊市, 潍坊医学院细胞生物学教研室。zhaochunlingbj@163.com

电话: 0536-8462054

收稿日期: 2009-05-01 修回日期: 2009-07-16

接受日期: 2009-07-20 在线出版日期: 2009-08-18

## Clinical significance of cyclin B1 and cyclin-dependent kinase 1 expression in human esophageal squamous cell carcinoma

Chun-Ling Zhao, Li-Mei Chen, Zhi-Qin Gao, Chang-Qing Du, Zhi-Fang Pan, Wen-Jing Yu

Chun-Ling Zhao, Li-Mei Chen, Zhi-Qin Gao, Chang-Qing Du, Zhi-Fang Pan, Wen-Jing Yu, Department of Cell Biology, Weifang Medical University, Weifang 261053, Shandong Province, China

Correspondence to: Chun-Ling Zhao, Department of Cell Biology, Weifang Medical University, Weifang 261053, Shandong Province, China. zhaochunlingbj@163.com

Received: 2009-05-01 Revised: 2009-07-16

Accepted: 2009-07-20 Published online: 2009-08-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of cyclin B1 and cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) proteins in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and analyze its clinicopathological significance.

**METHODS:** A total of 52 ESCC specimens were used in the study. Matched normal esophageal mucosal tissues were used as controls. Of all ESCC specimens, 8 had grade I disease, 20 had grade II disease, 24 had grade III disease; 20 had lymph node metastasis, 32 had no lymph node metastasis; 16 had carcinoma in situ, 36 had invasive carcinoma. The expression of cyclin B1 and CDK1 was detected by streptavidin-peroxidase (SP) immunohistochemical method. The correlation of cyclin B1 and CDK1 expression with the clinical features of ESCC was then analyzed.

## ■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二科; 张军, 教授, 西安交通大学医学院第二附属医院消化内科

**RESULTS:** The expression levels of cyclin B1 and CDK1 were significantly higher in ESCC tissues than in adjacent normal esophageal mucosal tissues (71.2% vs 2.0% and 65.4% vs 3.9%, respectively; both  $P < 0.05$ ). The overexpression of cyclin B1 and CDK1 in ESCC tissues had no correlation with patient gender and age, but had significant correlations with histological grade, depth of invasion and lymph node metastasis (all  $P < 0.05$ ). The overexpression of cyclin B1 in ESCC tissues was positively correlated with that of CDK1 ( $r = 0.697$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Overexpression of cyclin B1 and CDK1 proteins can promote the development and progression of ESCC. There is a positive correlation between the expression of cyclin B1 and CDK1 in ESCC. Detection of cyclin B1 and CDK1 expression is useful for evaluation of the biological behavior of ESCC.

**Key Words:** Esophageal squamous cell carcinoma; Cyclin B1; Cyclin-dependent kinase 1; Immunohistochemistry

Zhao CL, Chen LM, Gao ZQ, Du CQ, Pan ZF, Yu WJ. Clinical significance of cyclin B1 and cyclin-dependent kinase 1 expression in human esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(23): 2374-2378

## 摘要

**目的:** 探讨食管鳞癌组织中细胞周期蛋白 Cyclin B1和细胞周期蛋白依赖性激酶CDK1表达及其临床病理学意义。

**方法:** 应用免疫组织化学SP法对52例食管鳞癌(组织学 I 级8例, II级20例, III级24例; 有淋巴结转移20例, 无淋巴结转移32例; 原位癌16例, 侵袭性癌36例包括浸润至黏膜下层、肌层、全层)及其配对的癌旁正常组织进行 Cyclin B1、CDK1的检测, 分析其阳性表达与食管鳞癌患者临床病理因素的关系。

**结果:** 食管鳞癌组织中Cyclin B1、CDK1的阳性表达高于癌旁正常食管黏膜组织, 2组差异都有统计学意义(71.2% vs 2.0%, 65.4%



vs 3.9%, 均 $P<0.05$ ). 食管鳞癌组织中Cyclin B1、CDK1的表达都与性别、年龄无关;与组织学分级、浸润深度及淋巴结转移有关(均 $P<0.05$ ). Cyclin B1阳性表达强度与CDK1的阳性表达强度之间呈正相关( $r=0.697, P<0.05$ ).

**结论:** Cyclin B1、CDK1的高表达会促进食管鳞癌的发生与发展. 而且食管鳞癌中Cyclin B1与CDK1的表达密切相关, 可作为食管鳞癌生物学行为预测的参考指标.

**关键词:** 食管鳞癌; Cyclin B1; 细胞周期蛋白依赖性激酶; 免疫组织化学

赵春玲, 陈丽梅, 高志芹, 杜长青, 潘智芳, 于文静. Cyclin B1、CDK1在食管鳞癌组织中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(23): 2374-2378  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2374.asp>

## 0 引言

食管癌是世界上10种常见的恶性肿瘤之一, 发病率与死亡率都非常高, 其发病机制尚不明. 食管癌按其组织类型的不同主要分为: 鳞状细胞癌和腺癌. 在我国鳞状细胞癌占90%以上<sup>[1]</sup>. 研究表明, 肿瘤是一类渐进性细胞周期调控机制破坏所致的疾病<sup>[2]</sup>. 而细胞周期的顺利进行和完成又依赖于一系列正负调节因子的相互作用, 主要有细胞周期蛋白(cyclins)、细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs)和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白(cyclin-dependent kinases inhibitors, CDKIs). 在有丝分裂G<sub>2</sub>/M期转变中起关键作用的是Cyclin B1与CDK1, CDK1也称为细胞分裂周期蛋白2(cell division cycle 2, Cdc2)<sup>[3-4]</sup>. 近年的研究发现Cyclin B1与CDK1在多种实体瘤中有过表达现象, 而且与恶性肿瘤的增殖、分化、转移和复发等密切相关<sup>[5-9]</sup>. 已有研究人员分别在食管癌组织中应用免疫组织化学方法单独检测了Cyclin B1和CDK1的表达<sup>[10-11]</sup>, 而二者在食管癌中的联合检测国内外未见文献报道. 因此, 我们采用免疫组织化学方法检测食管鳞癌组织及相应的癌旁正常食管黏膜组织中Cyclin B1、CDK1蛋白的表达, 并分析其与食管鳞癌临床病理特征的关系, 为研究细胞周期调控蛋白在食管鳞癌发生、发展中的作用提供实验依据.

## 1 材料和方法

1.1 材料 收集潍坊医学院附属医院2004-2006年经手术证实的食管鳞癌及配对癌旁正常食管黏

膜组织52例, 所有患者术前均未经放化疗. 其中男28例, 女24例, 年龄30-75(平均54.6±7.5)岁. 全部标本均在离体30 min内分别于癌灶、癌旁5 cm以内迅速取材, 组织经40 g/L多聚甲醛液固定, 常规石蜡包埋, 连续切片, 切片厚度3-5 μm, 分别用于HE和免疫组织化学染色. 标本的组织学分级: I级8例, II级20例, III级24例; 肿瘤浸润深度: 原位癌16例, 侵袭性癌(浸润至黏膜下层、肌层、全层)36例; 发生淋巴结转移的20例, 无淋巴结转移的32例. 鼠抗人单克隆抗体Cyclin B1和CDK1、SP免疫组织化学试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司.

## 1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色: 采用SP法, 操作严格按照说明书进行. 石蜡切片常规脱蜡和水化后, 浸于EDTA液(pH9.5), 高压修复组织抗原20 min. PBS洗涤; 封闭内源性过氧化物酶; PBS洗涤; 非免疫性动物血清孵育10 min; Cyclin B1、CDK1抗体孵育60 min(工作浓度1:100); 生物素标记的第二抗体孵育10 min; PBS洗涤; 链霉素标记的亲合素-过氧化物酶孵育10 min; PBS洗涤; DAB显色; 蒸馏水冲洗; 苏木素复染; 梯度乙醇脱水; 二甲苯透明; 中性树胶封片. 以PBS液代替一抗作为阴性对照. 用已知阳性切片作阳性对照.

1.2.2 结果判断标准: 光镜下每张切片在食管组织中随机选取高倍视野计数500个细胞, 以出现棕黄色颗粒作为阳性细胞, 根据同样物镜下阳性细胞数不同可以分为以下5个等级: <5%为0分; 5%-25%为1分; 25%-50%为2分; 50%-75%为3分; 75%-100%为4分. 依据染色强度进行半定量判定, 分数标准是: 无色为0分; 淡黄色, 即弱阳性为1分; 棕黄色, 即中等染色强度为2分; 棕褐色, 即强阳性为3分. 免疫反应的得分为阳性细胞的百分率得分与免疫染色的强度得分的乘积<sup>[12]</sup>. 0-2分为阴性结果, 3-6分为阳性结果.

**统计学处理** 应用SPSS10.0统计学软件, 采用 $\chi^2$ 检验和Spearman相关性分析. 检验水准为0.05.

## 2 结果

2.1 Cyclin B1、CDK1在食管鳞癌组织和癌旁正常食管组织中的染色定位 在食管鳞癌组织中, Cyclin B1和CDK1多数分布在上皮细胞的细胞质中, 呈棕褐色, 少数在细胞质和细胞核中同时表达. 二者在正常食管黏膜组织中没有表达或弱表达(图1-2).

## ■ 研发前沿

细胞周期调控异常与肿瘤关系的研究一直是肿瘤学的热点. 有关Cyclin B1和CDK1在食管癌中的联合检测国内外未见报道.

### ■ 创新盘点

本文首次采用免疫组织化学SP法联合检测Cyclin B1和CDK1在食管鳞癌组织及相应的癌旁正常食管黏膜组织中的表达,并分析其与食管鳞癌临床病理特征的关系,为研究细胞周期调控蛋白在食管鳞癌发生、发展中的作用提供依据。

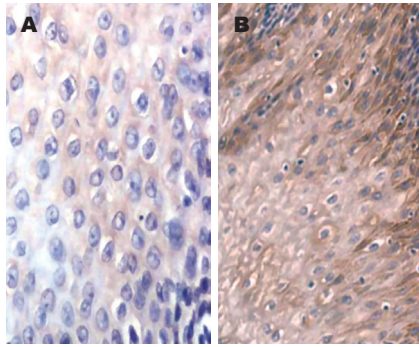


图1 食管黏膜组织中Cyclin B1蛋白的表达(SP×400)。A: 正常食管黏膜组织; B: 食管鳞癌组织。

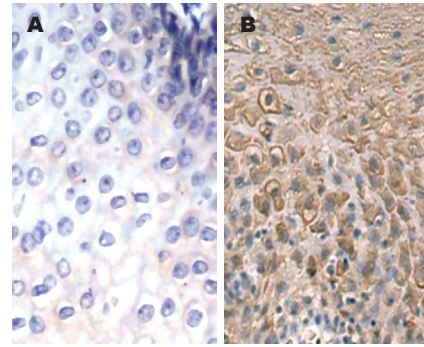


图2 食管黏膜组织中CDK1蛋白的表达(SP×400)。A: 正常食管黏膜组织; B: 食管鳞癌组织。

2.2 Cyclin B1、CDK1在食管鳞癌组织和癌旁正常食管组织中的表达 将免疫组织化学的染色结果进行统计学分析发现(表1), Cyclin B1、CDK1在食管鳞癌组织中表达的阳性率分别为71.2%、65.4%,在正常食管黏膜组织中表达的阳性率分别为2.0%、3.9%,两组差异都有统计学意义( $P<0.05$ ),即同正常食管黏膜组织相比, Cyclin B1、CDK1在食管鳞癌组织中都呈高表达。

2.3 Cyclin B1、CDK1在食管鳞癌组织中的表达与临床病理特征的关系 经统计学分析, Cyclin B1、CDK1蛋白的高表达与患者的性别、年龄无关,中分化(II级)的食管鳞癌组织中Cyclin B1、CDK1蛋白表达的阳性率明显高于高分化(I级)食管鳞癌组织中的表达( $P<0.05$ );而低分化(III级)的食管鳞癌组织中Cyclin B1、CDK1蛋白表达的阳性率明显高于中分化(II级)食管鳞癌组织中的表达( $P<0.05$ )。在侵袭性的食管鳞癌组织中Cyclin B1、CDK1蛋白表达的阳性率明显高于原位癌中的表达( $P<0.05$ )。伴有淋巴结转移的食管鳞癌组织中Cyclin B1、CDK1蛋白表达的阳性率明显高于没有发生淋巴结转移的食管鳞癌组织中的表达( $P<0.05$ ,表2)。

2.4 食管癌中Cyclin B1与CDK1表达之间的关系 食管癌中CDK1阳性33例中, Cyclin B1阳性31例, CDK1阴性19例中, Cyclin B1阴性11例。经Spearman等级相关检验显示, Cyclin B1与CDK1在食管癌中呈显著正相关( $r = 0.697, P<0.05$ )。

### 3 讨论

肿瘤是一类细胞周期调控异常引起细胞过度增殖所致的疾病。而细胞周期得以运行的核心机制是在一系列周期蛋白Cyclins时相性起伏的调控下,相应的CDKs依次激活,驱动细胞通过G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub>期,达到M期,细胞一分为二,实现忠实于亲代的细胞复制。Cyclin B1和CDK1是细胞

表1 Cyclin B1、CDK1蛋白在食管黏膜组织中的表达( $n = 52$ )

组织	Cyclin B1			CDK1		
	(-)	(+)	<i>P</i>	(-)	(+)	<i>P</i>
正常食管黏膜	51	1		50	2	
食管鳞癌组织	15	37	<0.05	18	34	<0.05

周期G<sub>2</sub>/M转换阶段最重要的Cyclin和CDK分子。Cyclin B1与CDK1结合所形成的复合物-有丝分裂促进因子(mitosis promoting factor, MPF)促进了G<sub>2</sub>/M期的进展和有丝分裂的完成。

近几年的研究表明, Cyclin B1在许多人类恶性肿瘤中呈过表达,如肺癌、口腔癌、食管癌、胃癌、结肠癌、前列腺癌、结节性非霍奇金淋巴瘤等。一些研究人员认为, Cyclin B1的过表达与肿瘤的恶性行为有关,可作为肿瘤恶性潜能的指征,是鳞状细胞癌患者有意义的预后指标如食管癌、肺癌、舌癌<sup>[10,11-14]</sup>。Yoshida *et al*<sup>[15]</sup>在对非小细胞肺癌的研究中发现, Cyclin B1的过表达与非小细胞肺癌分化级别和血管侵袭有关, Cyclin B1的过表达,恶性潜力增加,是非小细胞肺癌患者的有意义的预后指标。Kushner *et al*<sup>[16]</sup>报道了头颈部鳞状细胞癌患者中有Cyclin B1过表达的比无Cyclin B1过表达的有更高的临床分期。Cyclin B1过表达与喉部鳞状细胞癌发生的部位、大小、分期及预后相关,故Cyclin B1很可能与喉部鳞癌的恶性生物学行为有关<sup>[17]</sup>。

我们应用免疫组织化学的方法检测了Cyclin B1在食管鳞癌及其配对的癌旁正常食管组织表达情况。Cyclin B1多分布在食管鳞癌上皮细胞的细胞质中,呈棕褐色,少数在细胞质和细胞核中同时表达。在正常食管组织中没有表达或着色较弱。统计学分析发现,食管鳞癌中Cyclin B1表达阳性率明显高于癌旁正常食管黏膜组织,差异显著( $P<0.05$ ),有统计学意义。这与

表 2 Cyclin B1、CDK1蛋白表达与食管鳞癌临床病理特征的关系

参数	n	Cyclin B1			CDK1		
		(-)	(+)	阳性率(%)	(-)	(+)	阳性率(%)
性别							
男	28	7	21	75.0	9	19	67.9
女	24	8	16	66.7	9	15	62.5
年龄(岁)							
≤60	30	11	19	63.3	12	18	60.0
>60	22	12	18	81.8	6	16	72.7
组织学分级							
I级	8	5	3	37.5	6	2	25.0
II级	20	8	12	60.0 <sup>a</sup>	8	12	60.0 <sup>a</sup>
III级	24	2	22	91.7 <sup>a</sup>	4	20	83.3 <sup>a</sup>
浸润深度							
原位癌	16	7	9	56.3	8	8	50.0
侵袭性癌	36	8	28	77.8 <sup>a</sup>	10	26	72.2 <sup>a</sup>
淋巴结转移							
无	32	12	20	62.5	14	18	56.0
有	20	3	17	85.0 <sup>a</sup>	4	16	80.0 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P<0.05.

Takeo *et al*的报道是一致的<sup>[10]</sup>。我们的研究还发现, Cyclin B1的表达与食管鳞癌组织的分化程度密切相关, 分化程度愈低, Cyclin B1的表达阳性率越高; 而且Cyclin B1的表达的越高, 食管鳞癌的浸润深度越明显, 淋巴结转移的发生率也越高。这表明Cyclin B1的高表达预示食管鳞癌有较高的侵袭性且预后不良。因此, 检测Cyclin B1表达对判定食管鳞癌的预后有一定的价值。

CDK1作为细胞周期G<sub>2</sub>/M转换阶段的重要激酶, 在许多肿瘤中也普遍存在着高表达, 与多种肿瘤的恶性表型有相关性<sup>[18-19]</sup>。Hansel *et al*<sup>[20]</sup>的研究表明, CDK1能够作为食管腺癌和癌前病变的诊断标志物, 并能预测肿瘤进展情况。我们的研究发现, CDK1的高表达与患者的性别、年龄无关, 但与食管鳞癌的分化程度、侵袭性和淋巴结的转移密切相关(P<0.05)。Nozoe *et al*<sup>[11]</sup>则发现CDK1的高表达参与了食管鳞癌的分化。这与我们的研究结果是相一致的。但有关CDK1的高表达与食管鳞癌的侵袭性和淋巴结的转移的相关性研究未见报道。

尽管人们普遍认为食管癌的发生是一个多因素、多阶段、多步骤的渐进过程<sup>[21]</sup>, 但其确切机制还不清楚。分子生物学的研究表明, 一些基因的异常如p53突变、p16和/或p15表达的缺失、Rb蛋白的表达降低、Cyclin D1基因扩增、c-Myc和环氧合酶2(cyclooxygenase 2, COX-2)

高表达等都能导致食管癌的发生<sup>[22]</sup>。我们的研究发现, Cyclin B1、CDK1在食管鳞癌组织中的高表达呈正相关, 这提示Cyclin B1、CDK1的联合高表达可能协同促进了食管鳞癌的发生发展。因为CDK1单独存在时不表现激酶活性, 只有与细胞周期蛋白Cyclin B1结合成复合物MPF, 才表现出激酶活性, 启动有丝分裂, 越过细胞周期限制点, 不能发生正常的细胞周期阻滞以及细胞的生理性凋亡、衰老、或分化, 从而导致细胞失控性的增殖。两者协同促进食管鳞癌的发生发展的分子机制还需要做进一步的研究。

总之, 我们的研究表明, Cyclin B1、CDK1在食管鳞癌组织中高表达且呈正相关, 两者还与食管鳞癌的分化程度、侵袭性和淋巴结的转移密切相关。Cyclin B1、CDK1可能协同促进了食管鳞癌的发生发展。联合检测Cyclin B1和CDK1的表达, 可作为食管鳞癌诊断和评估预后的有潜在价值的标志物。Cyclin B1和CDK1也可能成为食管鳞癌治疗的分子靶点。

#### 4 参考文献

- 1 Dawsey SM, Lewin KJ, Wang GQ, Liu FS, Nieberg RK, Yu Y, Li JY, Blot WJ, Li B, Taylor PR. Squamous esophageal histology and subsequent risk of squamous cell carcinoma of the esophagus. A prospective follow-up study from Linxian, China. *Cancer* 1994; 74: 1686-1692
- 2 Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles

#### ■应用要点

Cyclin B1与CDK1的联合检测为食管鳞癌的诊断、预后提供参考价值, 而且二者有可能成为食管鳞癌双靶点治疗的关键位点。



### ■同行评价

本研究设计合理, 统计结果分析可靠, 为研究细胞周期调控蛋白在食管鳞癌发生、发展中的作用提供实验依据.

- 3 revisited. *Cancer Res* 2000; 60: 3689-3695
- 4 Ohi R, Gould KL. Regulating the onset of mitosis. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 267-273
- 5 Norbury C, Nurse P. Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem* 1992; 61: 441-470
- 6 Kim DH. Prognostic implications of cyclin B1, p34cdc2, p27(Kip1) and p53 expression in gastric cancer. *Yonsei Med J* 2007; 48: 694-700
- 7 Chen H, Huang Q, Dong J, Zhai DZ, Wang AD, Lan Q. Overexpression of CDC2/CyclinB1 in gliomas, and CDC2 depletion inhibits proliferation of human glioma cells in vitro and in vivo. *BMC Cancer* 2008; 8: 29
- 8 Nakamura N, Yamamoto H, Yao T, Oda Y, Nishiyama K, Imamura M, Yamada T, Nawata H, Tsuneyoshi M. Prognostic significance of expressions of cell-cycle regulatory proteins in gastrointestinal stromal tumor and the relevance of the risk grade. *Hum Pathol* 2005; 36: 828-837
- 9 Ito Y, Yoshida H, Nakano K, Takamura Y, Kobayashi K, Yokozawa T, Matsuzuka F, Matsuura N, Kuma K, Miyauchi A. Expression of G2-M modulators in thyroid neoplasms: correlation of cyclin A, B1 and cdc2 with differentiation. *Pathol Res Pract* 2002; 198: 397-402
- 10 Jin YH, Park CK. Expression of cyclin B1 and cdc2 in nodal non-Hodgkin's lymphoma and its prognostic implications. *J Korean Med Sci* 2002; 17: 322-327
- 11 Takeno S, Noguchi T, Kikuchi R, Uchida Y, Yokoyama S, Müller W. Prognostic value of cyclin B1 in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2002; 94: 2874-2881
- 12 Nozoe T, Takahashi I, Baba H, Maehara Y. Relationship between intracellular localization of p34cdc2 protein and differentiation of esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; 131: 179-183
- 13 Hao XP, Pretlow TG, Rao JS, Pretlow TP. Beta-catenin expression is altered in human colonic aberrant crypt foci. *Cancer Res* 2001; 61: 8085-8088
- 14 Hassan KA, El-Naggar AK, Soria JC, Liu D, Hong WK, Mao L. Clinical significance of cyclin B1 protein expression in squamous cell carcinoma of the tongue. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2458-2462
- 15 Soria JC, Jang SJ, Khuri FR, Hassan K, Liu D, Hong WK, Mao L. Overexpression of cyclin B1 in early-stage non-small cell lung cancer and its clinical implication. *Cancer Res* 2000; 60: 4000-4004
- 16 Yoshida T, Tanaka S, Mogi A, Shitara Y, Kuwano H. The clinical significance of Cyclin B1 and Wee1 expression in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2004; 15: 252-256
- 17 Kushner J, Bradley G, Young B, Jordan RC. Aberrant expression of cyclin A and cyclin B1 proteins in oral carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1999; 28: 77-81
- 18 Dong Y, Sui L, Watanabe Y, Sugimoto K, Tokuda M. Clinical relevance of cyclin B1 overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 2002; 177: 13-19
- 19 Kaczmarek P, Tosik D, Majewska E, Baj Z. Quantitative analysis of cyclin E and protein p34 cdc2 expression in superficial bladder cancer. *Pol J Pathol* 2006; 57: 41-44
- 20 Ito Y, Takeda T, Sakon M, Monden M, Tsujimoto M, Matsuura N. Expression and prognostic role of cyclin-dependent kinase 1 (cdc2) in hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2000; 59: 68-74
- 21 Hansel DE, Dhara S, Huang RC, Ashfaq R, Deasel M, Shimada Y, Bernstein HS, Harmon J, Brock M, Forastiere A, Washington MK, Maitra A, Montgomery E. CDC2/CDK1 expression in esophageal adenocarcinoma and precursor lesions serves as a diagnostic and cancer progression marker and potential novel drug target. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 390-399
- 22 Mandard AM, Hainaut P, Hollstein M. Genetic steps in the development of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Mutat Res* 2000; 462: 335-342
- 23 Stoner GD, Gupta A. Etiology and chemoprevention of esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1737-1746

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》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 2009-08-18)

# 大容量血液滤过对重症急性胰腺炎的治疗作用

郑建臣, 程斌, 郑要初, 郭晓榕

郑建臣, 程斌, 郑要初, 郭晓榕, 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  
郑建臣, 河南科技大学第一附属医院急诊科 河南省洛阳市 471003

郑建臣, 华中科技大学同济医学院附属同济医院在职硕士, 副主任医师, 主要从事急诊医学及消化内科学的临床研究。

**作者贡献分布:** 此课题由程斌与郑建臣设计; 研究过程由郑建臣、程斌、郑要初及郭晓榕完成; 数据分析由郑建臣与郑要初完成; 本论文写作由郑建臣与程斌完成。

**通讯作者:** 程斌, 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: 027-83646605

收稿日期: 2009-05-29 修回日期: 2009-07-14

接受日期: 2009-07-20 在线出版日期: 2009-08-18

## Efficacy of high-volume hemofiltration in the treatment of severe acute pancreatitis

Jian-Chen Jia, Bin Cheng, Yao-Chu Zheng, Xiao-Rong Guo

Jian-Chen Jia, Bin Cheng, Yao-Chu Zheng, Xiao-Rong Guo, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Jian-Chen Jia, Department of Emergency Medicine, the First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan Province, China

Correspondence to: Doctor Bin Cheng, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang Road, Wuhan 430030, Hubei Province, China. b.cheng@tjh.tjmu.edu.cn

Received: 2009-05-29 Revised: 2009-07-14

Accepted: 2009-07-20 Published online: 2009-08-18

### Abstract

**AIM:** To evaluate the efficacy of high-volume hemofiltration (HVHF) in the treatment of severe acute pancreatitis (SAP) and explore new methods for treatment of SAP.

**METHODS:** A retrospective controlled study was performed. Forty-five SAP patients treated at our hospital were divided into two groups: control group ( $n = 24$ ) and HVHF group ( $n = 21$ ). All patients were diagnosed according to the draft criteria for diagnosis and treatment of acute pancreatitis in China. No bile duct obstruction was found by CT scan. Patients in the two groups were subjected to tests for serum

and urine amylase, WBC, CRP and hepatic and renal function. The vital signs and abdominal symptoms and signs were recorded. The complications and mortality were analyzed.

**RESULTS:** After three and seven days of therapy, the APACHE (acute physiology and chronic health evaluation) II scores in the HVHF group were significantly lower than those in the control group ( $6.6 \pm 1.5$  vs  $9.9 \pm 2.5$  and  $3.4 \pm 1.1$  vs  $6.4 \pm 2.0$ , respectively; both  $P < 0.05$ ). Compared to the control group, the serum and urine amylase, WBC, CRP and hepatic and renal function were improved significantly, the mortality and complication rates were significantly reduced ( $14.3\%$  vs  $37.5\%$  and  $4.8\%$  vs  $20.8\%$ , respectively; both  $P < 0.05$ ), and the durations of abdominal pain relief ( $71 \pm 34$  h vs  $51 \pm 16$  h,  $P < 0.05$ ) and abdominal tenderness relief ( $102 \pm 34$  h vs  $71 \pm 16$  h,  $P < 0.05$ ) as well as the average duration of hospital stay were significantly shortened in the HVHF group ( $P < 0.05$ ). No significant difference was found in the cost of hospitalization between the two groups.

**CONCLUSION:** HVHF can rapidly reduce abdominal symptoms and signs, improve organ function and prognosis and reduce mortality in SAP patients perhaps through attenuation of the systemic inflammatory response syndrome in the early stage of the disease.

**Key Words:** Severe acute pancreatitis; Systemic inflammatory response syndrome; High-volume hemofiltration

Jia JC, Cheng B, Zheng YC, Guo XR. Efficacy of high-volume hemofiltration in the treatment of severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(23): 2379-2384

### 摘要

**目的:** 观察大容量血液滤过(HVHF)治疗重症急性胰腺炎(SAP)的临床疗效, 评价其在SAP治疗中的作用, 探索治疗SAP的新方法。

**方法:** 采用回顾性对照临床研究, 将我院2004-12/2008-12因SAP住院治疗的45例

### 背景资料

重症急性胰腺炎(SAP)是临床常见的急危重症之一, 全身炎症反应综合征(SIRS)是其导致多器官功能障碍综合征(MODS)的主要机制, 如何阻止SIRS的发生和发展是成功救治SAP的关键。

### 同行评议者

张志坚, 教授, 中国人民解放军南京军区福州总医院消化内科

## ■ 研究前沿

大容量血液滤过(HVHF)可滤过清除SAP时过多释放的细胞因子和炎性介质,阻止SIRS向MODS发展,是目前正在探索的治疗SAP的新方法。

分为2组:对照组24例, HVHF组21例。所有患者均符合2004年中国急性胰腺炎诊治指南(草案)中SAP的诊断标准,发病后48 h内入院,经CT证实均无明确胆道梗阻。自动生化检测仪检测2组SAP患者治疗前后血清淀粉酶及肾功能、常规检测血常规、CRP等,记录生命征、腹部症状并统计并发症及死亡率。

**结果:**与对照组相比, HVHF组患者的APACHE II评分明显降低,治疗第3天与第7天HVHF组显著低于对照组( $6.6 \pm 1.5$  vs  $9.9 \pm 2.5$ ,  $3.4 \pm 1.1$  vs  $6.4 \pm 2.0$ , 均 $P < 0.05$ );局部症状与体征缓解时间明显缩短, HVHF组腹痛缓解时间较对照组明显缩短( $51 \pm 16$  h vs  $71 \pm 34$  h,  $P < 0.05$ );腹部压痛缓解时间与对照组相比也显著缩短( $71 \pm 16$  h vs  $102 \pm 34$  h,  $P < 0.05$ );血尿淀粉酶指标、WBC、CRP及肾功能生化指标明显好转;并发症发生率和死亡率均降低( $14.3\%$  vs  $37.5\%$ ,  $4.8\%$  vs  $20.8\%$ , 均 $P < 0.05$ );平均住院时间显著缩短( $P < 0.05$ );住院费用无明显增加。

**结论:** HVHF能迅速减轻SAP患者腹部症状与体征,改善器官功能,显著改善预后,其机制可能通过阻断SAP早期全身炎症反应综合征。

**关键词:**重症急性胰腺炎;全身炎症反应综合征;大容量血液滤过

郑建臣, 程斌, 郑要初, 郭晓榕. 大容量血液滤过对重症急性胰腺炎的治疗作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(23): 2379-2384  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2379.asp>

## 0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是临床常见的急危重症之一,在疾病早期大量炎性介质、毒素释放入血后引起的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)是多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的主要发病基础,病死率可高达20%-30%<sup>[2]</sup>。SAP早期(起病后1-2 wk内)主要死于由炎症介质和细胞因子释放所致的多器官功能衰竭,晚期主要死于局部或全身性感染。SAP发生后,组织缺血、损伤、坏死、内毒素血症等造成循环中肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )及白介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )水平升高,进而刺激IL-6、IL-8等细胞因子产生,导致第1次高细胞因子血症,产生SIRS,继而引起休克、内环境失衡、细胞凋亡和器官功能衰竭,这是造成SAP早

期死亡的主要原因。因此,预防和阻断SIRS的发生和发展是治疗SAP的关键环节。对防止和控制MODS的发生和发展至关重要<sup>[5]</sup>。目前SAP治疗策略已由“首选手术治疗”转换至“非手术治疗为首选”的综合治疗方案<sup>[4]</sup>。大容量血液滤过(high volume hemofiltration, HVHF)可通过一定孔径的滤膜选择性清除血清中小于滤膜孔径的分子, SAP时大量释放的细胞因子均可通过HVHF滤过,近年来一些临床研究显示应用HVHF治疗SAP可减轻症状、缩短病程、减低病死率及缩短住院时间<sup>[6]</sup>。但HVHF在SAP中的临床应用仍处于探索中,本研究拟通过对HVHF与传统方法治疗SAP患者的对照研究,进一步评价HVHF在SAP治疗中的作用与价值。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选择我院2004-12/2008-12因SAP住院治疗的患者45例,其中男27例,女18例,平均年龄 $43.4 \pm 23(20-59)$ 岁。患者分为2组:对照组24例,其中男14例,女10例,平均年龄 $42(21-58)$ 岁; HVHF组21例,其中男13例,女8例,平均年龄 $45(20-59)$ 岁。2组患者临床资料均无明显差异。所有患者的诊断均符合中国急性胰腺炎诊治指南(草案)中SAP的诊断标准<sup>[7]</sup>,发病后48 h内入院,无明确胆道梗阻,对照组APACHE II评分 $12.8 \pm 2.5$ , Ranson评分 $3.83 \pm 0.8$ ; HVHF组APACHE II评分 $12.9 \pm 2.3$ , Ranson评分 $3.77 \pm 0.7$ ; Balthazar CT分级为D或E者。

### 1.2 方法

**1.2.1 治疗:**采用回顾性对照临床研究。对照组于入院后给予禁食、胃肠减压、生长抑素静脉微量泵持续注入、抑制胃酸、补充有效血容量及营养支持和抗生素等治疗。HVHF组在上述治疗基础上给予床边HVHF治疗。

**1.2.2 HVHF方法:**起病48 h内使用日本IQ血液滤过机行HVHF治疗。采取右侧锁骨下静脉或右侧股静脉留置双腔导管,建立体外循环;采用大容量连续性静脉-静脉血液滤过模式,血流量为200-300 mL/min。滤器和管道在透析前用肝素生理盐水(4000 U/L)按设定的程序预充20 min。置换液输入速度为3.0-4.0 L/h,以后稀释方式输入,根据血气分析及血生化检查结果调整置换液中电解质含量和碳酸氢钠用量。超滤量根据患者容量负荷情况进行调整,每日超滤量在500-3500 mL不等。持续时间 $\geq 6$  h/d,治疗时间3-7 d,平均5 d。HVHF停止指标:腹部症状、体征消失、心



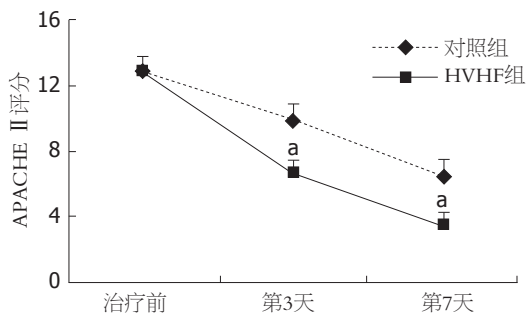


图1 2组患者治疗后APACHE II评分变化. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组.

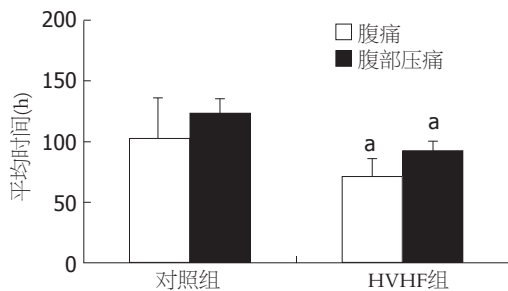


图2 2组患者腹痛和腹部压痛缓解时间比较. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组.

**创新盘点**

本研究通过对45例分别行和未行HVHF治疗的SAP患者的回顾性对照临床观察, 从APACHE II评分、临床症状改善情况、并发症与死亡率以及平均住院时间等全面评价HVHF治疗SAP的临床疗效.

表1 2组患者体温、呼吸、心率和SaO<sub>2</sub>恢复正常所占比率 (%)

分组	第3天				第7天			
	体温	呼吸	心率	SaO <sub>2</sub>	体温	呼吸	心率	SaO <sub>2</sub>
对照组	12.5	16.7	16.7	20.8	62.5	62.5	62.5	62.5
HVHF组	61.9 <sup>a</sup>	66.7 <sup>a</sup>	66.7 <sup>a</sup>	76.2 <sup>a</sup>	85.7	95.2 <sup>a</sup>	90.5 <sup>a</sup>	95.2 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组.

率下降至每分100次以下、呼吸频率每分25次以下、肾功能恢复.

1.2.3 监测内容: 每日观察患者的体温、心率、呼吸频率、血压和SaO<sub>2</sub>, 体温低于37℃、呼吸频率25次/分以下、心率100次/分以下和SaO<sub>2</sub> 90%以上为正常; 腹痛、腹部指征; 血液滤过前、治疗第3天、第7天检测血常规、血尿淀粉酶、电解质、肝肾功能、C反应蛋白(C-reactive protein, CRP); 必要时复查B超、CT检查. 记录患者的生命征变化, 观察并发症、死亡等. 总结手术率、死亡率、平均住院时间和住院费用.

统计学处理 采用SPSS10.0统计软件; 结果以mean±SD表示, 2组间差异比较采用t检验,  $P < 0.05$ 为差异有显著性, 计数资料采用 $\chi^2$ 检验.

**2 结果**

2.1 2组患者治疗后APACHE II评分比较 治疗前HVHF组和对照组患者间APACHE II评分无显著差异, 治疗第3天HVHF组APACHE II评分较对照组显著下降(6.6±1.5 vs 9.9±2.5,  $P < 0.05$ ). 治疗第7天HVHF组APACHE II评分显著低于对照组(3.4±1.1 vs 6.4±2.0,  $P < 0.05$ , 图1).

2.2 2组患者治疗后局部症状与体征变化 HVHF组腹痛缓解时间较对照组明显缩短(51±16 h vs 71±34 h,  $P < 0.05$ ); 腹部压痛缓解时间与对照组相比也显著缩短(71±16 h vs 102±34 h,  $P < 0.05$ , 图2).

2.3 体温、呼吸、心率和SaO<sub>2</sub>恢复正常所占比

率 2组患者治疗前体温、呼吸、心率和SaO<sub>2</sub>差异均无显著性. 治疗第3天和第7天, HVHF组与对照组体温、呼吸、心率和SaO<sub>2</sub>恢复正常所占比率明显增加, 差异有显著性(表1).

2.4 2组患者治疗后血清淀粉酶的动态变化 HVHF组与对照组治疗前血清淀粉酶水平无显著差异( $P > 0.05$ ). 治疗第3天和7天HVHF组血清淀粉酶较对照组显著下降( $P < 0.05$ , 图3A).

2.5 2组患者治疗后白细胞及CRP动态变化 治疗前对照组和HVHF组间白细胞水平无显著差异, 治疗第3天HVHF组白细胞数较对照组降低, 但差异无显著性, 第7天HVHF组较对照组则显著降低( $P < 0.05$ , 图3B); CRP在HVHF组治疗第3天有所下降(152.8±46.8 mg/L vs 187.6±34.8 mg/L), 但差异无显著性, 至第7天则显著下降(32±18 mg/L vs 187.6±34.8 mg/L,  $P < 0.05$ ).

2.6 2组患者治疗后肾功能的动态变化 治疗前对照组和HVHF组肾功能BUN、Cr相比差异无显著性. 治疗第3天、第7天HVHF组BUN、Cr较对照组均明显降低( $P < 0.05$ , 表2).

2.7 2组患者局部并发症发生率、手术率、死亡率、住院费用比较 HVHF组与对照组相比, 其局部并发症发生率、手术率和死亡率明显降低( $P < 0.05$ , 表3), 平均住院时间显著缩短( $P < 0.05$ ), 平均住院费用与对照组比较无统计学差异( $P > 0.05$ , 表3).

2.8 HVHF组不良反应 血液滤过中出现一过性低血压5例, 调整超滤速度后恢复; 皮肤、黏膜出

## ■应用要点

HVHF可能通过阻断SAP早期SIRS迅速减轻患者临床症状与体征,改善器官功能及预后,可作为临床治疗SAP的手段之一。

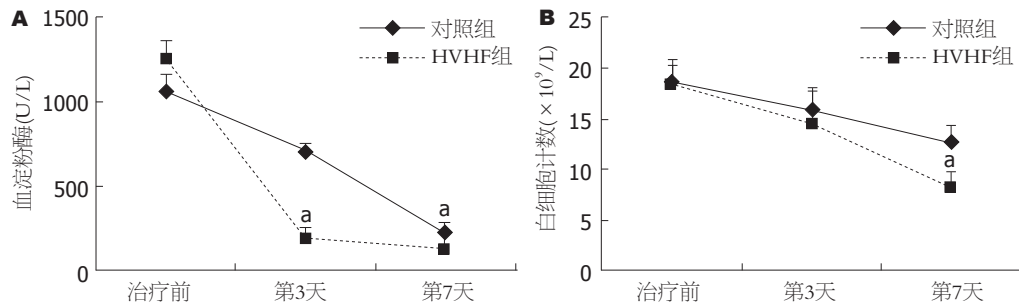


图3 2组患者治疗后血清淀粉酶及白细胞水平的变化。<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组。

表2 2组患者肾功能生化指标的动态变化 (mean  $\pm$  SD)

分组	n	肾功能BUN (mmol/L)			Cr ( $\mu$ mol/L)		
		治疗前	第3天	第7天	治疗前	第3天	第7天
对照组	24	12.7 $\pm$ 3.5	11.5 $\pm$ 2.7	8.4 $\pm$ 1.1	275 $\pm$ 56	198 $\pm$ 45	179 $\pm$ 60
HVHF组	21	13.6 $\pm$ 3.5	6.5 $\pm$ 2.9 <sup>a</sup>	4.4 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	266 $\pm$ 45	89 $\pm$ 26 <sup>a</sup>	81 $\pm$ 16 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组。

表3 2组患者并发症发生率、手术率、死亡率和住院费用比较

分组	n	并发症发生率(%)	手术率(%)	死亡率(%)	平均住院时间(d)	平均住院费(万元)
对照组	24	37.5	33.3	20.8	29 $\pm$ 7	2.61 $\pm$ 0.86
HVHF组	21	14.3 <sup>a</sup>	9.5 <sup>a</sup>	4.8 <sup>a</sup>	18 $\pm$ 6	2.84 $\pm$ 0.27

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组。

血5例,其中合并上消化道出血3例,减少或停用肝素,并给予抑酸治疗后缓解。

### 3 讨论

SAP是一种临床常见的急腹症,起病急、进展快,死亡率高。随着对胰腺炎发病机制认识的深入和各种综合治疗技术的进步,SAP的死亡率已有所下降,但依然高达20%-30%<sup>[8]</sup>,出现一个器官功能不全时死亡率36%,而多脏器功能不全者的平均死亡率高达47%<sup>[9]</sup>。因此,寻找有效的治疗方法,阻断疾病恶化,改善预后成为当前研究的热点。近年来,随着对SAP发病机制认识的深入,其治疗策略也由首选手术治疗转为首选非手术的综合治疗<sup>[10]</sup>。目前大量研究认为SAP是胰腺自身消化启动的严重SIRS,炎症细胞被激活并大量释放细胞因子,由此产生的细胞因子级联反应是SAP病情加重的重要原因<sup>[11]</sup>。在并发严重细菌感染、内毒素血症加剧时,已处于激发状态的免疫内皮细胞系统会发生更加剧烈的反应,引发瀑布样效应<sup>[12]</sup>,导致炎症失控,出现系统

性SIRS,继而导致MODS,MODS是导致SAP死亡的主要原因。因此,炎症介质在SAP的发展过程中具有极其重要的作用。提高SAP抢救成功率的关键是及早采取预防措施,终止其发展,防止MODS的发生,而HVHF则可在在这方面发挥重要作用。

2004年,Honore *et al*<sup>[13]</sup>提出,<35 mL/(kg·h)为极低容量血液滤过,35-50 mL/(kg·h)为低容量血液滤过,>50 mL/(kg·h)为HVHF。Ratanarat *et al*<sup>[14]</sup>报道,HVHF可以改善患者血流动力学状态,并减少血管活性药物的用量。1992年Grootendorst *et al*<sup>[15]</sup>用HVHF治疗感染性休克的模型猪,发现以6 L/h的速率进行超滤后,动物的动脉压、心排出量和左、右心室舒张功能有改善;将脓毒血症动物的超滤液注入健康猪体内,能复制与内毒素败血症相似的血流动力学的改变,表明HVHF能以对流方式清除血清中的水溶性炎症介质。2000年,谢红浪 *et al*<sup>[16]</sup>报告应用HVHF治疗SAP 16例,患者血流动力学状态稳定,发热、心动过速、呼吸急促等征状明显缓解。我

们采用HVHF治疗21例中, 第1次滤过后, 呼吸、心率、 $\text{SaO}_2$ 恶化被控制, 第3天后有14例恢复正常, 第7天后有19例恢复正常, 与对照组比较3天恢复正常率有显著差异. 主要与HVHF可清除大量炎性因子<sup>[17]</sup>, 减轻肺部局部炎症反应, 降低肺毛细血管内皮细胞及肺泡上皮细胞的通透性, 缓解肺水肿, 改善心肺功能有关<sup>[18]</sup>. 因此HVHF可使SAP患者APACHE II评分显著降低.

CRP是一种五聚体蛋白, 相对分子质量120 kDa, 由肝脏合成. 可促进炎性细胞因子的产生, 具有增强炎症反应的作用. 故CRP水平实际上反应了体内各种诱因(创伤、感染、坏死等)导致炎症反应的严重程度, 是诊断、治疗和监测炎症反应敏感和可靠的指标之一. CRP也是判定胰腺炎严重程度的重要参数之一<sup>[19]</sup>. HVHF治疗后, CRP水平开始下降不明显, 但7天后明显下降, 接近正常. 其浓度降低可能与其他炎性细胞因子(IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 等)的清除、炎症反应减轻有关. 治疗第3天下降不明显, 可能与CRP峰值出现时间有关.

文献报道<sup>[20]</sup>, 在SAP的死亡病例中, 50.9%-76.3%在发病2 wk内死于多器官功能衰竭, 33.3%-49.1%在发病2 wk后死于并发感染. 尽管在过去数十年内重症监护与治疗有长足进步, 但SAP的病死率并未明显降低<sup>[21]</sup>. 我们治疗21例中, 血液滤过后, 呼吸、心率、 $\text{SaO}_2$ 、肝肾功能明显改善. 2例因腹腔包裹脓肿行手术治疗, 仅1例死于腹腔感染、肺部感染、休克, 较文献报道传统的治疗方法有明显降低. 因此, 早期阻断炎症介质的级联式反应和预防后期因肠道细菌移位引发的感染, 成为疾病早期以非手术疗法降低病死率的关键. 血液滤过能帮助SAP患者较为平稳地渡过急性期, 提高抢救成功率, 降低中转手术率, 缩短住院时间, 可作为SAP早期行之有效且安全的重要治疗措施<sup>[22]</sup>.

21例中平均住院天数较对照组明显缩短, 但总费用无明显增加, 如果能自配滤液, 将大大降低成本, 减少费用. 对于HVHF时机, 目前国内外较一致的观点认为: 只要SAP诊断成立, 又无严重低血压, 重度出血倾向等禁忌证, 宜早期应用<sup>[23]</sup>, 越早越好. 我们认为SAP诊断成立, 符合SIRS标准, 争取在48 h内施行, 以遏止炎症反应, 改善病情, 纠正防止脏器的功能障碍, 提高抢救成功率, 减少并发症. 我们21例患者中, 1例入院后6 h开始, 连续3次后各种指标完全正常, 入院16 d痊愈.

HVHF组21例中, 有5例血滤早期出现低血压, 主要因超滤过快引起, 调整超滤速度后很快恢复; 有5例血滤后皮肤黏膜瘀斑、穿刺部位渗血, 减少肝素用量, 局部压迫后缓解. 其中有3例胃管引流出血, 改无肝素滤过, 并针对消化系出血治疗, 出血逐渐缓解.

HVHF用于SAP的治疗被认为是近年来危重病医学治疗中最重要的进展之一. 本组通过2组病例对比观察, 显示了HVHF在SAP治疗中的应用前景. HVHF能迅速减轻腹部症状, 所有患者在血滤后短时间内腹痛、腹胀减轻, 全腹压痛减轻; 能阻断全身炎症反应, 体温下降、心率、呼吸次数降低、动脉血氧分压增高; 减轻炎症反应, WBC恢复正常时间明显缩短、CRP降低; 显著改善预后、改善器官功能、降低死亡率; 显著缩短病程, 总住院费用无明显增加; 无严重不良反应. 所以HVHF是治疗SAP的一种安全有效的重要治疗措施, 值得推广.

#### 4 参考文献

- 1 陈灏珠. 实用内科学. 第12版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 1963-1970
- 2 Imrie CW. Acute pancreatitis: overview. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997; 9: 103-105
- 3 王春友. 重症急性胰腺炎手术时机选择的个体化问题. *中华普通外科杂志* 2003; 18: 325-326
- 4 黎介寿. 连续性血液净化治疗重症急性胰腺炎的一项有效措施. *肾脏病与透析移植杂志* 2004; 13: 452-453
- 5 李兆申. 急性胰腺炎的内科治疗. *中国实用内科杂志* 2004; 24: 710-711
- 6 巫协宇. 重症急性胰腺炎的规范化治疗和策略. *中华消化杂志* 2001; 21: 300-302
- 7 中华医学会消化病学会胰腺疾病学组. 中国急性胰腺炎诊治指南草案. *中华消化杂志* 2004; 24: 190-192
- 8 Bank S, Singh P, Pooran N, Stark B. Evaluation of factors that have reduced mortality from acute pancreatitis over the past 20 years. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35: 50-60
- 9 Banks PA, Freeman ML. Practice guidelines in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2379-2400
- 10 Swaroop VS, Chari ST, Clain JE. Severe acute pancreatitis. *JAMA* 2004; 291: 2865-2868
- 11 Osman MO, Gesser B, Mortensen JT, Matsushima K, Jensen SL, Larsen CG. Profiles of pro-inflammatory cytokines in the serum of rabbits after experimentally induced acute pancreatitis. *Cytokine* 2002; 17: 53-59
- 12 de Beaux AC, Goldie AS, Ross JA, Carter DC, Fearon KC. Serum concentrations of inflammatory mediators related to organ failure in patients with acute pancreatitis. *Br J Surg* 1996; 83: 349-353
- 13 Honore PM, Joannes-Boyau O. High volume hemofiltration (HVHF) in sepsis: a comprehensive review of rationale, clinical applicability, potential indications and recommendations for future research. *Int J Artif Organs* 2004; 27: 1077-1082
- 14 Ratanarat R, Brendolan A, Piccinni P, Dan M, Salvatori G, Ricci Z, Ronco C. Pulse high-volume haemofiltration for treatment of severe sepsis:

#### ■同行评价

本研究选题较好, 病例数较多, 有一定的参考价值.



- effects on hemodynamics and survival. *Crit Care* 2005; 9: R294-R302
- 15 Grootendorst AF, van Bommel EF, van der Hoven B, van Leengoed LA, van Osta AL. High volume hemofiltration improves right ventricular function in endotoxin-induced shock in the pig. *Intensive Care Med* 1992; 18: 235-240
- 16 谢红浪, 季大玺, 龚德华, 汪义军, 黎磊石. 连续性肾脏替代治疗对外周血细胞因子的影响. *肾脏病与透析肾移植杂志* 1999; 8: 217-219
- 17 Cole L, Bellomo R, Davenport P, Tipping P, Ronco C. Cytokine removal during continuous renal replacement therapy: an ex vivo comparison of convection and diffusion. *Int J Artif Organs* 2004; 27: 388-397
- 18 Ronco C, Brendolan A, Dan M, Piccinni P, Bellomo R, De Nitti C, Inguaggiato P, Tetta C. Adsorption in sepsis. *Kidney Int Suppl* 2000; 76: S148-S155
- 19 Mantke R, Pross M, Kunz D, Ebert M, Kahl S, Peters B, Malfertheiner P, Lippert H, Schulz HU. Soluble thrombomodulin plasma levels are an early indication of a lethal course in human acute pancreatitis. *Surgery* 2002; 131: 424-432
- 20 Carnovale A, Rabitti PG, Manes G, Esposito P, Pacelli L, Uomo G. Mortality in acute pancreatitis: is it an early or a late event? *JOP* 2005; 6: 438-444
- 21 Whitcomb DC. Clinical practice. Acute pancreatitis. *N Engl J Med* 2006; 354: 2142-2150
- 22 王彬, 卢清龙, 马增香, 孟舰. 血液净化联合中药治疗重症急性胰腺炎的疗效观察. *疑难病杂志* 2008; 8: 463-465
- 23 刘琼, 黄纪坚, 周发春. CVVH治疗重症急性胰腺炎的临床研究. *重庆医科大学学报* 2005; 30: 722-724

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 •

## 汤姆森 - 路透公布 2008 年 WJG 影响因子 2.081

本刊讯 据汤姆森-路透科技信息集团2009-06-19发布《期刊引证报告》(*Journal Citation Reports*)的统计结果:*World Journal of Gastroenterology(WJG)*的总被引次数(TC): 10 822; 影响因子(IF): 2.081; 即年指数: 0.274; 论文数量: 1112; 半衰期: 3.1; 特征因子(EF): 0.05006. 特征因子这个指标是今年期刊引证报告里新加的一个指标. 与影响因子不同的是, 这个指标不仅考察了引文的数量, 而且考虑了施引期刊的影响力, 即: 某期刊如果越多地被高影响力的期刊引用, 则该期刊的影响力也越高. 正如Google考虑超链接的来源, 特征因子也充分考虑引文的来源, 并在计算中赋予不同施引期刊的引文以不同的权重. 特征因子分值的计算基于过去5年中期刊发表的论文在期刊引证报告统计当年的被引用情况. 与影响因子比较, 期刊特征因子分值的优点主要有: (1)特征因子考虑了期刊论文发表后5年的引用时段, 而影响因子只统计了2年的引文时段, 后者不能客观地反映期刊论文的引用高峰年份; (2)特征因子对期刊引证的统计包括自然科学和社会科学, 更为全面、完整; (3)特征因子的计算扣除了期刊的自引; (4)特征因子的计算基于随机的引文链接, 通过特征因子分值可以较为合理地测度科研人员用于阅读不同期刊的时间. 在55种国际胃肠病学和肝病学期刊中, *WJG*的EF, TC和IF分别名列第6, 9, 32位. (*WJG*编辑部主任: 程剑侠 2009-08-18)

# β-Catenin蛋白在散发性结直肠癌中的异常表达和基因突变

覃业军, 周晓燕, 施达仁

覃业军, 山东大学附属省立医院病理科 山东省济南市 250021

周晓燕, 施达仁, 复旦大学附属肿瘤医院病理科 上海市 200032

覃业军, 副主任医师, 主要从事消化系统肿瘤研究.

**作者贡献分布:** 此课题由覃业军设计; 研究过程由覃业军与周晓燕操作完成; 施达仁负责指导与协调工作; 数据分析由覃业军完成; 本论文写作由覃业军与周晓燕完成.

**通讯作者:** 覃业军, 副主任医师, 250021, 山东省济南市经五路 324号, 山东大学附属省立医院病理科. qinyejun@163.com

电话: 0531-85186430

收稿日期: 2009-05-25 修回日期: 2009-07-29

接受日期: 2009-08-03 在线出版日期: 2009-08-18

## Aberrant expression and mutation of β-catenin in sporadic colorectal cancer

Ye-Jun Qin, Xiao-Yan Zhou, Da-Ren Shi

Ye-Jun Qin, Department of Pathology, Shandong Provincial Hospital, Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China

Xiao-Yan Zhou, Da-Ren Shi, Department of Pathology, Fudan University Shanghai Cancer Center, Shanghai 200032, China

Correspondence to: Ye-Jun Qin, Department of Pathology, Shandong Provincial Hospital, Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China. qinyejun@163.com

Received: 2009-05-25 Revised: 2009-07-29

Accepted: 2009-08-03 Published online: 2009-08-18

### Abstract

**AIM:** To observe the aberrant expression and mutation of β-catenin in sporadic colorectal cancer (SCRC) and explore their correlation with clinicopathological features.

**METHODS:** Ninety SCRC samples and 22 sporadic colorectal adenoma samples were used in this study. The aberrant expression of β-catenin was detected by immunohistochemistry. PCR amplification and direct DNA sequencing were used to identify β-catenin gene mutations.

**RESULTS:** In normal colorectal mucosa, β-catenin was distributed on the plasma membrane, without aberrant cytoplasmic and nuclear accumulation. The aberrant cytoplasmic and nuclear expression rates of β-catenin in SCRC were higher than those in sporadic colorectal

adenomas (88.9% vs 59.1% and 41.1% vs 18.2%, respectively,  $P < 0.05$ ), respectively. The aberrant cytoplasmic expression of β-catenin was significantly correlated with tumor growth pattern and differentiation ( $P < 0.05$ ). The aberrant nuclear expression rate of β-catenin in ulcerative lesions was higher than that in protruding lesions (50.0% vs 26.5%,  $P < 0.05$ ). Aberrant nuclear expression of β-catenin was frequently observed in the invasive front of SCRC. β-catenin gene mutation was identified in one out of 90 SCRC samples, but was not identified in all sporadic colorectal adenoma samples.

**CONCLUSION:** Aberrant cytoplasmic and nuclear expression of β-catenin may play an important role in the development and progression of SCRC. β-catenin mutation may not be the primary cause of aberrant β-catenin expression in SCRC.

**Key Words:** Sporadic colorectal cancer; β-catenin; Gene mutation; Immunohistochemistry

Qin YJ, Zhou XY, Shi DR. Aberrant expression and mutation of β-catenin in sporadic colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(23): 2385-2390

### 摘要

**目的:** 观察β-Catenin蛋白在散发性结直肠癌(SCRC)中胞质胞核异常表达特征和基因突变发生率, 并探讨其与临床病理的相关性.

**方法:** 用免疫组织化学EnVision二步法检测90例SCRC与22例散发性结直肠腺瘤标本的β-Catenin蛋白在胞质胞核中的异常表达. 以PCR扩增和直接测序检测上述标本中β-Catenin基因突变.

**结果:** 正常结直肠黏膜中β-Catenin蛋白表达定位于细胞膜上, 未见胞质胞核中的异常表达. SCRC中β-Catenin蛋白在胞质与胞核的异常表达率显著高于散发性腺瘤中的异常表达率(88.9% vs 59.1%, 41.1% vs 18.2%,  $P < 0.05$ ). SCRC的β-Catenin异常胞质表达率与肿瘤生长方式, 分化程度相关( $P < 0.05$ ); 胞核异常表

### ■背景资料

现认为Wnt信号通路的激活在结直肠癌的发生发展中起着重要作用. β-Catenin蛋白是Wnt信号通路的关键蛋白, 关于其在胞质胞核内的异常表达情况及其机制的研究是当今肿瘤研究中的一个热点.

### ■同行评议者

施瑞华, 教授, 南京医科大学第一附属医院消化科

## ■ 研究前沿

目前,关于结直肠癌中 $\beta$ -Catenin蛋白的胞质胞核异常表达及其与临床病理参数的关系报道不一,而国内外关于结直肠癌中 $\beta$ -Catenin基因突变率的报道较少,且结果相差较大。因此,针对结直肠癌中 $\beta$ -Catenin从蛋白到基因水平的大样本研究是急需的。

达率在溃疡型生长高于在隆起型生长(50.0% vs 26.5%,  $P < 0.05$ )。胞核异常表达往往出现在肿瘤的浸润前沿。90例SCRC中仅发现1例 $\beta$ -Catenin基因突变;22例散发性结直肠腺瘤中未检测出突变。

**结论:**  $\beta$ -Catenin蛋白胞质胞核异常表达可能在SCRC的发生发展中起重要作用。在SCRC中 $\beta$ -Catenin基因突变可能不是 $\beta$ -Catenin蛋白异常表达的主要原因。

**关键词:** 散发性结直肠癌;  $\beta$ -Catenin; 免疫组织化学; 基因突变

覃业军, 周晓燕, 施达仁.  $\beta$ -Catenin蛋白在散发性结直肠癌中的异常表达和基因突变. 世界华人消化杂志 2009; 17(23): 2385-2390

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2385.asp>

## 0 引言

$\beta$ -Catenin是一个多功能蛋白,一方面通过与钙黏蛋白结合介导同型细胞间相互黏附;另一方面作为重要的信号转导分子参与Wnt通路的信号转导。在正常分化的上皮细胞,胞质内游离的 $\beta$ -Catenin蛋白与多蛋白复合物(由APC、Axin和GSK3 $\beta$ 形成)结合,因其氨基端保守的丝氨酸/苏氨酸残基被GSK3 $\beta$ 磷酸化而被蛋白酶降解;异常情况下,如APC、Axin和GSK3 $\beta$ 基因突变或 $\beta$ -Catenin基因自身突变使得 $\beta$ -Catenin蛋白不能被磷酸化而变得稳定,导致其胞质内聚集,然后移位到核内与Tcf/Lef结合激活靶基因的转录而引起肿瘤的发生<sup>[1-2]</sup>。虽然在结直肠癌的发生中Wnt信号通路起着重要的作用,而且 $\beta$ -Catenin蛋白作为该通路的关键分子备受关注,但是关于结直肠癌中 $\beta$ -Catenin蛋白的胞质胞核异常表达及其与临床病理参数的关系各家报道不一<sup>[3-6]</sup>。至于结直肠癌中 $\beta$ -Catenin基因突变,文献报道在遗传性非息肉病性结直肠癌(hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC)中突变高达43%<sup>[7]</sup>;而散发性结直肠癌(sporadic colorectal cancer, SCRC)中的 $\beta$ -Catenin基因突变,国外报道突变率约0%-1%<sup>[8-9]</sup>,国内有报道突变率高达28%<sup>[10]</sup>,是否存在种族差异尚需进一步研究。本实验采用免疫组织化学方法检测SCRC中 $\beta$ -Catenin蛋白的异常表达状况并分析其与临床病理参数的关系;以PCR扩增和直接测序方法检测SCRC中 $\beta$ -Catenin基因第3外显子的突变并分析其在SCRC发生发展中的作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 连续收集了复旦大学附属肿瘤医院2004-07/10手术切除的结直肠癌新鲜标本90例,其中男47例,女43例,年龄33-82(平均58)岁。标本取材后立即置入液氮保存备用。同时取材做石蜡包埋以获病理诊断结果。正常标本25例取自癌肿旁至少大于10 cm处的黏膜,分别作液氮冷冻和石蜡包埋。散发腺瘤标本为2004年石蜡包埋标本22例,男13例,女9例,年龄45-80(平均63)岁。腺瘤直径0.5-4.0(平均2.1) cm。所有病例均无遗传性结直肠肿瘤病史。 $\beta$ -Catenin单克隆抗体购自Zymed公司,EnVision试剂盒购自Dako公司。本研究获得了复旦大学附属肿瘤医院伦理委员会的批准,同时标本采集得到了病人的知情同意。

## 1.2 方法

**1.2.1 免疫组织化学法检测 $\beta$ -Catenin蛋白的表达:** 用EnVision二步法, DAB显色。以0.01 mol/L的柠檬酸(pH6.0)为抗原修复液,通过煮沸进行抗原修复。以TBS缓冲液代替一抗作阴性对照。结果判定参考文献<sup>[11]</sup>,  $\beta$ -Catenin胞质阳性细胞>30%,胞核阳性细胞>1%,分别记为胞质及胞核异常表达。

**1.2.2 DNA提取:** 新鲜标本切取20  $\mu$ m冰冻切片20片,用300  $\mu$ L裂解液(20 mmol/L Tris-Cl pH 8.0, 20 mmol/L EDTA, 20 g/L SDS)消化裂解后,以酚/氯仿抽提DNA。石蜡标本切取15  $\mu$ m切片30张,经二甲苯脱蜡后按上述方法提取DNA。用紫外分光光度计(Beckman公司DU640型)测量DNA浓度。

**1.2.3 PCR扩增和目的片段测序:** 用PCR扩增 $\beta$ -Catenin第3外显子,该部位是突变热点区和磷酸化调节位点区。所用引物参考文献<sup>[12]</sup>,引物序列如下,上游引物5'-GCTGATTTGATGGAGTTGGA-3,下游引物5'-GCTACTTGTTCTTGAGTGAA-3,目的片段226 bp。退火温度55 $^{\circ}$ C,PCR扩增35个循环。目的产物送上海基康生物公司纯化后,在Applied Biosystem 3700 DNA测序仪上测序。测序引物同上,双向测序。发现突变时重复一次测序。

**统计学处理** 采用SPSS11.5软件进行 $\chi^2$ 检验或精确概率检验, $P < 0.05$ 有显著性意义。

## 2 结果

**2.1  $\beta$ -Catenin蛋白的胞质和胞核异常表达** 正常结直肠黏膜 $\beta$ -Catenin蛋白表达呈清晰的棕黄色染色,阳性表达全部定位于细胞膜上,未见胞质



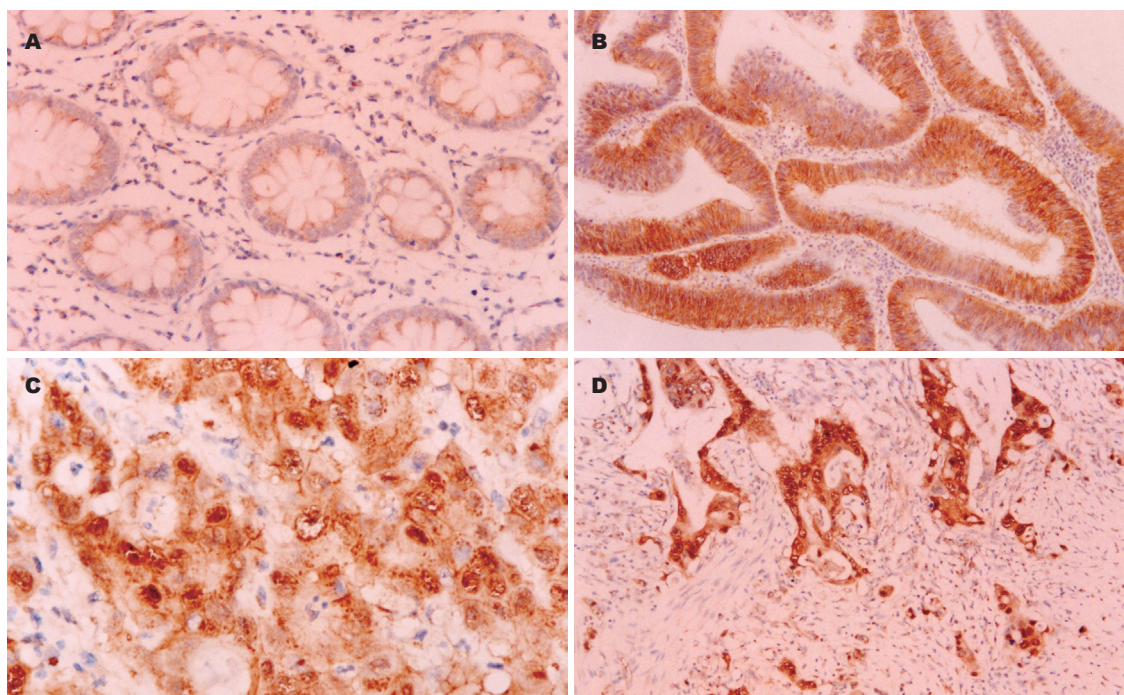


图 1 正常结直肠黏膜及肿瘤组织 $\beta$ -Catenin的表达(EnVision法). A: 正常结直肠黏膜组织,  $\beta$ -Catenin表达呈清晰的棕黄色染色, 阳性表达全部定位于细胞膜上, 未见胞质胞核的异常表达( $\times 200$ ); B: 散发性结直肠腺瘤组织,  $\beta$ -Catenin呈胞质异常表达( $\times 100$ ); C: 散发性结直肠癌,  $\beta$ -Catenin呈胞质胞核异常表达( $\times 400$ ); D: 散发性结直肠癌,  $\beta$ -Catenin在肿瘤浸润前沿呈胞核异常表达( $\times 100$ ).

**■创新盘点**  
 本课题以较大的样本量专门研究了散发性结直肠癌中 $\beta$ -Catenin蛋白的胞质胞核异常表达, 发现其与肿瘤的生长方式及分化程度相关. 同时用直接测序方法检测 $\beta$ -Catenin基因, 发现其突变率在散发性结直肠癌约1%, 突变率很低, 这表明 $\beta$ -Catenin基因突变不是引起 $\beta$ -Catenin蛋白胞质胞核异常表达的主要机制.

表 1  $\beta$ -catenin在散发性腺瘤和腺癌中的异常表达  $n(\%)$

分组	$n$	胞质阳性	胞核阳性
正常黏膜	25	0(0.0)	0(0.0)
腺瘤	22	13(59.1)	4(18.2)
腺癌	90	80(88.9) <sup>b</sup>	37(41.1) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 腺瘤.

胞核中的异常表达(图1A). 散发性结直肠腺瘤和腺癌组织出现胞质和胞核的异常表达, 膜表达有不同程度的降低, 胞核异常表达者均显示胞质异常表达(图1B-D). 在SCRC中 $\beta$ -Catenin的胞质和胞核表达率(分别为88.9%和41.1%)显著高于散发性结直肠腺瘤(分别为59.1%和18.2%)( $P < 0.05$ , 表1). SCRC的 $\beta$ -Catenin异常胞质表达与肿瘤生长方式, 分化程度相关( $P < 0.05$ ), 但与生长部位、浸润深度及淋巴结转移等临床病理参数无关(表2). 核表达多为灶性分布, 主要在肿瘤浸润前沿呈阳性表达. SCRC的 $\beta$ -Catenin核表达率在浸润型和溃疡型生长高于在隆起型生长(50.0% vs 26.5%,  $P < 0.05$ ), 与生长部位、分化程度、浸润深度及淋巴结转移等临床病理参数无关.

2.2  $\beta$ -Catenin基因突变 90例SCRC标本中仅有1例在第3外显子发生点突变(图2), 呈杂合性突变,

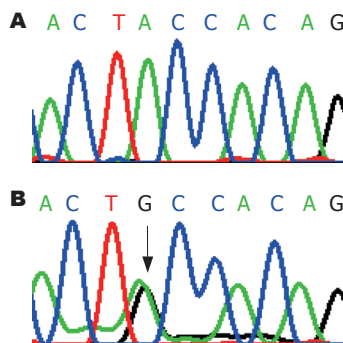


图 2  $\beta$ -Catenin 基因测序图. A: 正常序列; B: 突变序列; 箭头所指为突变位点, 41密码子ACC $\rightarrow$ GCC, 即苏氨酸变成丙氨酸.

为41密码子ACC $\rightarrow$ GCC, 即苏氨酸变成丙氨酸, 突变率约1%. 22例散发性腺瘤未发现第3外显子突变. 该例 $\beta$ -Catenin第3外显子突变患者为男性, 81岁. 癌肿在升结肠, 中低分化, 浸透肠壁全层,  $\beta$ -Catenin在胞质和核内异常表达.

### 3 讨论

$\beta$ -Catenin蛋白是Wnt通路中的关键分子, 被认为在消化系肿瘤的发生中起重要作用<sup>[13]</sup>. 本研究发现SCRC中 $\beta$ -Catenin胞质及核内异常表达率为88.9%和41.1%, 显著高于散发性腺瘤中胞质及核内异常表达率(59.1%和18.2%), 而在正常结直肠黏膜上皮细胞中未见 $\beta$ -Catenin异常表达, 这表明 $\beta$ -Catenin的异常表达与结直肠肿瘤的发生发展密切相关<sup>[14]</sup>. 对Wnt通路中关键成

### ■应用要点

本文证实了散发性结直肠癌中β-Catenin蛋白的胞质胞核异常表达情况及其与肿瘤的生长方式和分化程度关系,并明确β-Catenin基因突变在引起β-Catenin蛋白胞质胞核异常表达机制中所占的地位.这为进一步探索Wnt信号通路中主要分子在散发性结直肠癌发生发展中的作用机制奠定了基础.

表 2 β-Catenin阳性表达与散发性结直肠癌临床病理参数的关系 n(%)

	n	胞质	P值	胞核	P值
部位					
右半结肠	14	11(78.6)		4(28.6)	
左半结肠	14	13(92.9)		7(50.0)	
直肠	62	56(90.3)	0.576	26(41.9)	0.501
生长方式					
隆起型	34	27(79.4)		9(26.5)	
溃疡及浸润型	56	53(94.6)	0.038	28(50.0)	0.028
分化程度					
高分化	11	11(100.0)		4(36.4)	
中分化	58	54(93.1)		26(44.8)	
低分化	21	15(71.4)	0.018	7(33.3)	0.619
浸润深度					
深肌层以内	27	25(92.6)		12(44.4)	
全层	63	55(87.3)	0.717	25(39.7)	0.674
淋巴结转移					
有	52	45(86.5)		20(38.5)	
无	38	35(92.1)	0.509	17(44.7)	0.550

分异常改变的认识是研究结直肠癌新的治疗靶点的基础<sup>[15]</sup>,已有实验用姜黄素(curcumin)抑制β-Catenin的功能而下调靶基因的表达<sup>[16]</sup>.

β-Catenin蛋白胞质异常表达率从42%到100%不等<sup>[4-5,17]</sup>,但与临床病理参数关系的分析报道较少.本研究显示β-Catenin蛋白胞质异常表达仅与肿瘤生长方式、分化程度有关,即溃疡型和浸润型生长、高中分化腺癌的胞质异常表达率分别高于隆起型生长、低分化腺癌,差异有显著性意义.不同的生长方式可能涉及不同的分子机制.β-Catenin蛋白胞质异常表达与SCRC的分化程度有关,这与文献中的报道相似<sup>[3-4,18]</sup>.但本研究中β-Catenin胞质异常表达率在低分化SCRC中是低下的,其发生机制尚不清楚,可能与蛋白合成障碍有关.

胞质内异常表达的β-Catenin蛋白易位到胞核后才能激活靶基因的转录,因此多数作者更加注重胞核β-Catenin异常表达的研究.β-Catenin蛋白的核表达率从12.8%到98%不等<sup>[4-6]</sup>,与临床病理变量的关系的报道不尽一致.有报道β-Catenin蛋白核异常表达与SCRC的分级分期及淋巴结转移无关<sup>[4-5]</sup>;有报道核异常表达与黏膜内癌的发展有关<sup>[19]</sup>;有报道弥漫性核表达是生存期短的独立预测指标<sup>[20]</sup>;也有报道核高表达与淋巴结转移及预后差有关<sup>[6]</sup>,认为β-Catenin的核表达可作为SCRC的预后指标.研究结果的差异可能与实验方法不同、结果判断标准不一致和肿瘤的异质性等因素有关.本研究发现

β-Catenin核表达率为41.1%,只与SCRC生长方式相关,即β-Catenin核表达率在浸润型和溃疡型生长(50.0%)显著高于在隆起型生长(26.5%).这与Chiang *et al*<sup>[21]</sup>的报道一致,他们认为这2种类型可能存在不同的分子机制,隆起型生长与Ras基因突变导致细胞过度增殖有关,而溃疡型则与β-Catenin胞核异常表达引起靶基因MMP-7的过度表达导致组织酶性溶解密切相关.我们还发现β-Catenin往往在肿瘤的浸润前沿呈现核表达,与Brabletz *et al*的观察结果一致<sup>[22]</sup>.他们认为细胞核β-Catenin聚集可能获得一种适应环境的能力,保持差分化而参与肿瘤的侵袭和转移过程.MMP-7和uPA参与基质蛋白的溶解,与肿瘤的侵袭行为相关.文献报道MMP-7和uPA在浸润前沿表达增高<sup>[23-24]</sup>,受β-Catenin的正调节,提示β-Catenin核表达在结直肠癌发展中有重要的作用.

关于β-Catenin异常表达的机制,现认为与APC突变或β-Catenin点突变导致β-Catenin失降解有关<sup>[1]</sup>.然而,荷兰最近的大样本研究显示APC基因突变在SCRC为72%(479/665),而其截短突变率仅37%<sup>[25]</sup>,并不是很高.因而推测β-Catenin基因突变可能起重要作用.文献报道在HNPCC中β-Catenin基因突变率达43%<sup>[7]</sup>,认为β-Catenin基因突变在HNPCC发生中有重要的作用.但针对SCRC的β-Catenin基因突变研究,有报道未发现β-Catenin基因突变<sup>[8,26]</sup>,或突变率很低(<1%)<sup>[9,27-28]</sup>.国内有报道β-Catenin基因突变率高达28%<sup>[10]</sup>,与国外的报道不同.本研究显示在SCRC中β-Catenin突变率约1%,与国外的报道相似.本实验中的1例突变发生在β-Catenin基因第3外显子的41密码子,为ACC→GCC,即苏氨酸变为丙氨酸.该突变位点是结直肠癌β-Catenin第3外显子常见的突变热点和磷酸化调节位点<sup>[29]</sup>.实验表明在人SCRC中β-Catenin突变很少见,国内外突变率相符,未显示种族差异.国内文献报道β-Catenin的突变率较高<sup>[10]</sup>,究其原因可能与研究的样本有关,因为他们未明确将SCRC和HNPCC分开研究,而在HNPCC有较高的β-Catenin突变率<sup>[7,30]</sup>.另外, Samowitz *et al*发现β-Catenin的突变在小腺瘤中更常见,而在浸润性腺瘤中并不常,认为β-Catenin突变在结直肠癌的发生中是一个早期事件,伴突变的小腺瘤似乎不可能进展为大腺瘤和浸润性腺瘤<sup>[28]</sup>.本研究在散发性腺瘤中未发现突变(0/22),可能与腺瘤直径较大或者全为外生型肿瘤有关<sup>[31]</sup>.



总之, 在SCRC中 $\beta$ -Catenin有较高的胞质胞核异常表达率, 与肿瘤的发生发展密切相关。但 $\beta$ -Catenin基因突变在SCRC及散发性结直肠腺瘤中是一个罕见事件, 推测在SCRC中 $\beta$ -Catenin突变不是 $\beta$ -Catenin胞质胞核异常表达的主要原因, 且在SCRC的发生发展中不起主要作用。

#### 4 参考文献

- 1 Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 2000; 103: 311-320
- 2 Brabletz T, Jung A, Kirchner T. Beta-catenin and the morphogenesis of colorectal cancer. *Virchows Arch* 2002; 441: 1-11
- 3 黄琼, 朱益民, 邢晓明, 来茂德.  $\beta$ -Catenin在结直肠肿瘤中的异常表达及其意义. *浙江大学学报(医学版)* 2004; 33: 121-124
- 4 Maruyama K, Ochiai A, Akimoto S, Nakamura S, Baba S, Moriya Y, Hirohashi S. Cytoplasmic beta-catenin accumulation as a predictor of hematogenous metastasis in human colorectal cancer. *Oncology* 2000; 59: 302-309
- 5 Chung GG, Provost E, Kielhorn EP, Charette LA, Smith BL, Rimm DL. Tissue microarray analysis of beta-catenin in colorectal cancer shows nuclear phospho-beta-catenin is associated with a better prognosis. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 4013-4020
- 6 Wong SC, Lo ES, Lee KC, Chan JK, Hsiao WL. Prognostic and diagnostic significance of beta-catenin nuclear immunostaining in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1401-1408
- 7 Miyaki M, Iijima T, Kimura J, Yasuno M, Mori T, Hayashi Y, Koike M, Shitara N, Iwama T, Kuroki T. Frequent mutation of beta-catenin and APC genes in primary colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 4506-4509
- 8 Garinis GA, Spanakis NE, Menounos PG, Manolis EN, Peros G. Transcriptional impairment of beta-catenin/E-cadherin complex is not associated with beta-catenin mutations in colorectal carcinomas. *Br J Cancer* 2003; 88: 206-209
- 9 Luchtenborg M, Weijenberg MP, Wark PA, Saritas AM, Roemen GM, van Muijen GN, de Bruine AP, van den Brandt PA, de Goeij AF. Mutations in APC, CTNNB1 and K-ras genes and expression of hMLH1 in sporadic colorectal carcinomas from the Netherlands Cohort Study. *BMC Cancer* 2005; 5: 160
- 10 王东旭, 苏铃, 房殿春, 李伟, 王建华, 闫晓初. 大肠腺瘤及癌组织中 $\beta$ -Catenin、APC及CD44V6异常改变的意义. *中华腹部疾病杂志* 2003; 3: 781-784
- 11 Aust DE, Terdiman JP, Willenbacher RF, Chew K, Ferrell L, Florendo C, Molinaro-Clark A, Baretton GB, Löhns U, Waldman FM. Altered distribution of beta-catenin, and its binding proteins E-cadherin and APC, in ulcerative colitis-related colorectal cancers. *Mod Pathol* 2001; 14: 29-39
- 12 Garcia-Rostan G, Tallini G, Herrero A, D'Aquila TG, Carcangiu ML, Rimm DL. Frequent mutation and nuclear localization of beta-catenin in anaplastic thyroid carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59: 1811-1815
- 13 薛彦萍, 史成章. 以 $\beta$ -Catenin为中心的Wnt信号通路在消化道肿瘤发生中的作用. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2858-2861
- 14 向德兵, 吴晓华, 李增鹏, 刘友生.  $\beta$ -Catenin, cyclin

- D1和c-myc在大肠癌组织中的表达. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 305-308
- 15 李琳娜, 袁守军. Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路与大肠癌的始发和防治策略. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 201-206
- 16 Jaiswal AS, Marlow BP, Gupta N, Narayan S. Beta-catenin-mediated transactivation and cell-cell adhesion pathways are important in curcumin (diferuylmethane)-induced growth arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene* 2002; 21: 8414-8427
- 17 Iwamoto M, Ahnen DJ, Franklin WA, Maltzman TH. Expression of beta-catenin and full-length APC protein in normal and neoplastic colonic tissues. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1935-1940
- 18 刘宁, 姜海行, 黄振宁, 覃山羽, 李信. SFRP2和 $\beta$ -catenin在大肠癌中的表达及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3963-3969
- 19 Kobayashi M, Honma T, Matsuda Y, Suzuki Y, Narisawa R, Ajioka Y, Asakura H. Nuclear translocation of beta-catenin in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2000; 82: 1689-1693
- 20 Hugh TJ, Dillon SA, Taylor BA, Pignatelli M, Poston GJ, Kinsella AR. Cadherin-catenin expression in primary colorectal cancer: a survival analysis. *Br J Cancer* 1999; 80: 1046-1051
- 21 Chiang JM, Chou YH, Chen TC, Ng KF, Lin JL. Nuclear beta-catenin expression is closely related to ulcerative growth of colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 2002; 86: 1124-1129
- 22 Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 10356-10361
- 23 Ougolkov AV, Yamashita K, Mai M, Minamoto T. Oncogenic beta-catenin and MMP-7 (matrilysin) cosegregate in late-stage clinical colon cancer. *Gastroenterology* 2002; 122: 60-71
- 24 Hiendlmeyer E, Regus S, Wassermann S, Hlubek F, Hayn A, Dimmler A, Koch C, Knoll C, van Beest M, Reuning U, Brabletz T, Kirchner T, Jung A. Beta-catenin up-regulates the expression of the urokinase plasminogen activator in human colorectal tumors. *Cancer Res* 2004; 64: 1209-1214
- 25 Luchtenborg M, Weijenberg MP, Roemen GM, de Bruine AP, van den Brandt PA, Lentjes MH, Brink M, van Engeland M, Goldbohm RA, de Goeij AF. APC mutations in sporadic colorectal carcinomas from The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis* 2004; 25: 1219-1226
- 26 Nilbert M, Rambech E. Beta-catenin activation through mutation is rare in rectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; 128: 43-45
- 27 Kitaeva MN, Grogan L, Williams JP, Dimond E, Nakahara K, Hausner P, DeNobile JW, Soballe PW, Kirsch IR. Mutations in beta-catenin are uncommon in colorectal cancer occurring in occasional replication error-positive tumors. *Cancer Res* 1997; 57: 4478-4481
- 28 Samowitz WS, Powers MD, Spirio LN, Nollet F, van Roy F, Slattery ML. Beta-catenin mutations are more frequent in small colorectal adenomas than in larger adenomas and invasive carcinomas. *Cancer Res* 1999; 59: 1442-1444
- 29 Provost E, Yamamoto Y, Lizardi I, Stern J, D'Aquila TG, Gaynor RB, Rimm DL. Functional correlates of mutations in beta-catenin exon 3 phosphorylation

**同行评价**  
本研究设计合理, 有一定的创新性, 所用分子生物学方法合理正确, 学术价值较好。



- sites. *J Biol Chem* 2003; 278: 31781-31789
- 30 Johnson V, Volikos E, Halford SE, Eftekhari Sadat ET, Papat S, Talbot I, Truninger K, Martin J, Jass J, Houlston R, Atkin W, Tomlinson IP, Silver AR. Exon 3 beta-catenin mutations are specifically associated with colorectal carcinomas in hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. *Gut* 2005; 54: 264-267
- 31 Mikami M, Nosho K, Yamamoto H, Takahashi T, Maehata T, Taniguchi H, Adachi Y, Imamura A, Fujita M, Hosokawa M, Itoh F, Imai K, Shinomura Y. Mutational analysis of beta-catenin and the RAS-RAF signalling pathway in early flat-type colorectal tumours. *Eur J Cancer* 2006; 42: 3065-3072

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 •

## 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.

# Barrett's食管的诊断进展

卢秀珊, 王成文

卢秀珊, 汕头大学医学院 广东省汕头市 515031  
卢秀珊, 王成文, 北京大学深圳医院消化内科 广东省深圳市 518036  
作者贡献分布: 本文由卢秀珊综述; 王成文审核。  
通讯作者: 王成文, 主任医师, 518036, 广东省深圳市福田区莲花路1120号, 北京大学深圳医院消化内科。  
chengwen\_@tom.com  
电话: 0755-83923333-3806  
收稿日期: 2009-06-08 修回日期: 2009-07-22  
接受日期: 2009-07-27 在线出版日期: 2009-08-18

## Advances in the diagnosis of Barrett's esophagus

Xiu-Shan Lu, Cheng-Wen Wang

Xiu-Shan Lu, Medical College of Shantou University, Shantou 515031, Guangdong Province, China  
Xiu-Shan Lu, Cheng-Wen Wang, Department of Gastroenterology, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, Guangdong Province, China  
Correspondence to: Cheng-Wen Wang, Department of Gastroenterology, Peking University Shenzhen Hospital, 1120 Lianhua Road, Futian District, Shenzhen 518036, Guangdong Province, China. chengwen\_@tom.com  
Received: 2009-06-08 Revised: 2009-07-22  
Accepted: 2009-07-27 Published online: 2009-08-18

### Abstract

Barrett's esophagus is a metaplastic change in esophageal lining, characterized by the replacement of normal squamous epithelium with columnar epithelium. Barrett's esophagus is associated with a high risk of esophageal adenocarcinoma. As the incidence of esophageal adenocarcinoma has risen dramatically in developed countries, the research on Barrett's esophagus is attracting increasing attention. In this article, we will review the recent advances in the diagnosis of Barrett's esophagus.

Key Words: Barrett's esophagus; Diagnosis; Endoscopy; Chromoendoscopy; Esophageal capsule endoscopy; Narrow-band imaging; Autofluorescence imaging; Confocal laser endoscopy; Optical coherence tomography

Lu XS, Wang CW. Advances in the diagnosis of Barrett's esophagus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(23): 2391-2395

### 摘要

Barrett's食管(Barrett's esophagus, BE)是指食管内膜发生化生, 鳞状上皮被柱状上皮取代, 他是食管腺癌最重要的危险因素。随着食管腺癌在西方国家的发病率迅速升高, BE日益受关注。过去几年里, BE领域取得显著的进步, 本文主要针对其诊断标准、内镜诊断及新的内镜成像技术等方面作一综述。

关键词: Barrett's食管; 诊断; 内镜; 色素内镜; 食管胶囊内镜; 窄频带成像; 自体荧光成像; 共聚焦激光内镜; 光学相干断层摄影技术

卢秀珊, 王成文. Barrett's食管的诊断进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(23): 2391-2395  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2391.asp>

### 0 引言

Barrett's食管(Barrett's esophagus, BE)是食管腺癌的癌前病变, 其癌变的危险性较一般人群高出30-125倍。近20年来, 食管腺癌的发病率增长迅速, 据调查<sup>[1]</sup>, 1975-2001年美国食管腺癌的发病率上升接近6倍, 超过了黑色素瘤、前列腺癌和乳腺癌, 其中大部分由BE发展而来。BE在西方白种人中发病率较高, 其中欧洲约1%-4%, 美国约5%-12%, 虽然黑人及亚洲人中相对少见, 但近年来的报道有所增加, 其中2项大型的前瞻性研究显示, 日本人的总体发病率在0.9%-1.2%<sup>[2]</sup>。BE和食管腺癌的发病率不断升高, 如何尽早诊断和发现早期癌变是目前面临的巨大挑战。

### 1 BE的诊断标准

1950年英国心胸外科医生Norman Barrett首先提出BE, 并以他的名字命名(又称Barrett病), 其后的近60年里, BE的定义一直是大家争论的焦点, 近年来使用最普遍的是, 胃食管连接部的鳞状上皮被柱状上皮取代, 并经内镜多处活检证实肠化(以杯状细胞为标志)的存在以确诊, 但现在部分国家, 如日本、英国等, 其指南已不要求必须活检证实肠化才可诊断为BE<sup>[3-4]</sup>。

### ■背景资料

BE是食管腺癌的癌前病变, 其癌变的危险性较一般人群高出30-125倍。在我国BE发病率不如西方白种人高, 但近年来报道的病例数越来越多。目前BE诊断标准的分歧主要是是否需要伴有肠化, 其诊断手段主要是靠内镜结合组织病理, 而新的内镜成像技术不断涌现为提高BE的诊断率开拓了广阔的前景。

### ■同行评议者

吕宾, 教授, 浙江中医学附属第一医院(浙江省中医院、浙江省东方医院)消化科

### ■研发前沿

近年来出现大量新的内镜成像技术,如窄频带成像、自体荧光成像、共聚焦激光显微内镜技术、光学相干断层摄影技术等,初步研究显示他们不仅有助于提高BE的诊断率,而且对肠化、不典型增生及早期癌的敏感性、特异性高,有可能在不久的将来会应用于临床。

### ■相关报道

Shaheen *et al* 详细陈述了BE的临床表现、流行病学、形成的危险因素、发病和恶化的机制、不典型增生的内镜检测以及治疗等新进展,并且探讨未来的研究方向。Sharma *et al* 通过收集29位患者的电子内镜录像,让不同国际小组的内镜医师根据布拉格C&M标准进行识别和分类,结果显示出较好的可重复性,此分类系统弥补了传统的内镜诊断和分类方法的可重复性差、病理组织学意义相关性差等缺点。

目前,国际上主要存在2种观点:一种是主张只有活检发现杯状细胞才诊断BE,因为定义BE的目的是对这种食管腺癌危险因子建立一种标准的识别方法,以便于诊断、治疗和研究,而伴有肠化的癌变风险最高, Cameron *et al*<sup>[5]</sup> 研究胃食管连接部的小腺癌,发现86%的腺癌伴有肠化,再者严格定义BE可减少因过度诊断而增加患者经济与心理负担。另一种观点则不主张限定只有活检发现杯状细胞才诊断BE。其依据是:(1)即使没有发现杯状细胞,仍然很容易辨认柱状上皮的特点并显示出肠化的生理机能,如表达DAS-1, CDX-2, 肠黏蛋白3(mucin-3, MUC-3)等<sup>[6-8]</sup>, 这些肠转录因子、肠MUC基因等在肠化、高度不典型增生的BE及BE相关腺癌组织中呈现显著高表达;(2)即使没有发现杯状细胞,食管柱状上皮也可能发展为腺癌, Kelty *et al*<sup>[9]</sup> 随访712例BE患者8-20年,发展为腺癌的为4.1%,其中伴有肠化的为4.5%,未发现肠化的为3.6%,两者的癌变风险几乎相同。事实上既无对照证据,也无基础研究表明BE进展为肿瘤与杯状细胞有关;(3)杯状细胞呈灶性分布,其检出率与活检的次数和部位、BE的长度、样本误差等有关,如Janes *et al*<sup>[10]</sup> 在首次内镜检查发现可疑短节段BE(short-segment Barrett's esophagus, SSBE)但病理未发现肠化的患者中,再次行内镜活检有23.2%患者新发现肠化。Oberge *et al*<sup>[11]</sup> 研究发现,1-2 cm长度短节段BE肠化的检出率是30.5%,而6 cm以上的长节段BE(long-segment Barrett's esophagus, LSBE)检出率接近90%;另Reid *et al*<sup>[12]</sup> 的研究也表明间隔2 cm行活检可导致超过50%的癌症漏诊率。为了统一标准,2006-2008年来自不同国家的多位专家经反复讨论和投票,制定了胃食管反流病的最新全球定义-蒙特利尔定义和分类<sup>[13]</sup>,其中引入了一个新概念:内镜疑似食管化生(endoscopic suspected esophageal metaplasia, ESEM),当ESEM活检发现柱状上皮时,应诊断为BE,并具体说明是否存在肠型化生,同时明确了有肠上皮化生的长节段BE是食管腺癌的重要危险因素。这将有助于不同国家的临床医师讨论同一种疾病,使不同研究间的患者具有可比性。

## 2 BE的内镜诊断

目前国际上认可的最常用、最可靠的手段仍是传统的内镜结合病理组织学检查。

### 2.1 BE的内镜下识别 BE的内镜下特征是齿状

线水平不再与胃食管连接部(gastro-esophageal junction, GEJ)一致,从而导致食管远端出现内镜下所见的橘红色黏膜,呈全周型、舌型或岛状。可见准确判断齿状线和GEJ的位置非常重要。通常,齿状线是比较容易识别的,因为2种上皮颜色不同,正常的鳞状上皮呈粉红色,而柱状上皮为橘红色。在BE中,橘红色的柱状上皮凸出于管状食管。但GEJ的解剖位置却不那么容易识别,得到最多认可的是GEJ位于纵行胃皱襞近端的边缘。另外还有以食管下端栅状血管网为标志的,日本专家认为,发生BE时,尽管柱状上皮代替了鳞状上皮,但其下方的血管网仍为栅状,以栅状血管的末端为GEJ<sup>[3]</sup>。但区别真正的栅状血管和其他GEJ以下的黏膜下血管纹理有时是很困难的,而且不是所有患者都可以在内镜下清楚地看到栅状血管。其他还有管状食管末段和囊样胃腔的交界部位、食管末端收缩处等,但这些方法没有第一种的重复性好。总体来说GEJ的识别只有中度可重复性。

2.2 BE的分类 传统的BE根据累及黏膜的长度分为长节段和短节段BE。另外有研究发现20%内镜阴性的胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)患者在齿状线处活检发现有肠化<sup>[14]</sup>,而10%-17%既无反流症状,也无内镜可疑BE表现的患者活检也存在肠化<sup>[15]</sup>。这些患者的齿状线较直,且没有移位,但病理证实有肠化,有学者称之为超短节段BE,目前对这部分病灶了解较少,其病因、发病机制等尚不清楚,但其不典型增生发生率似乎较少<sup>[16]</sup>。有学者认为BE的长度可能与患癌风险有关,如Gopal *et al*<sup>[17]</sup> 通过多个中心共309名BE患者的研究发现SSBE不典型增生发生率为9%,LSBE达23%,而且长度每增加1 cm,不典型增生的风险增加14%。但也有学者认为SSBE及LSBE两者患食管腺癌的风险没有显著的区别, Rudolph *et al*<sup>[18]</sup> 研究发现,长度增加5 cm,癌变风险只增加1.7倍,两者无明显线性关系。所以目前仍缺乏充分有效的证据说明两者的关系,这种单纯按长度的分类方法尚无明确的病理组织学意义。因此, Sharma *et al*<sup>[19]</sup> 提出了BE布拉格C或M分类系统,该系统包括对BE累及全管周的长度(C)和累及的最大长度(M)进行评估(图1),累及食管远端全周的长度为2 cm以C-2表示,累及最大长度为5 cm则以M-5表示,则布拉格分类为C2M5节段。其C和M的可信度分别是0.95及0.94,对于≥1 cm的BE内镜下识别的总体可信度达0.72,在目前的诊断技术水平已显示



出较好的可重复性. 遗憾的是, 这一分类系统不适用于邻近的岛状及<1 cm的超短节段BE.

2.3 内镜下可疑区域的活检 准确地活检取材对监测随访其癌变潜能是有重要意义的. 如何取活检, 不同地区也各有差异, 现国际上普遍采用四象限方法, 即在GEJ及齿状线之间每隔1-2 cm行活检. 但肠化和不典型增生均呈灶性分布, 间隔2 cm活检很容易出现漏诊, 一项最近的回顾性研究<sup>[20]</sup>中296个患者行内镜检查, 其中125例为BE, 取8处活检的杯状细胞检出率为68%, 而取4处分析的仅为35%, 因此对疑有异型增生或癌变的有必要间隔1 cm取更多活检. 该法要求取材组织多, 而食管下段黏膜下血管丰富, 活检时出血多, 会加大操作难度而且有并发大出血的危险, 有人提出活检前在BE黏膜表面喷洒稀释的肾上腺素, 有止血效果, 可提高活检时的可见度<sup>[21]</sup>. 鉴于四象限活检存在耗时长、费用大、操作难度高等不足, 我国一般行靶向活检, 即根据检查者的经验在可疑柱状上皮的区域取活检. 但有研究提示系统的四象限活检中不典型增生及早期癌的检出率比非系统活检高<sup>[22]</sup>.

### 3 BE诊断的新技术

近年来BE的诊断出现大量新技术, 并且很多的技术报道对诊断BE、不典型增生和早期癌有高度敏感性及特异性.

3.1 色素内镜技术 严格来说, 色素内镜是一种老的技术, 常用的染色剂有1.5%-4% Lugol碘液、1%-2%亚甲蓝或靛卡红、1.5%乙酸等. 其中亚甲蓝可以被杯状细胞吸收使肠化区被染成蓝色, 所以被认为最有希望提高肠化及不典型增生的检出率<sup>[23-24]</sup>, 但近年也有大量的前瞻性对照研究发现其相对于四象限活检并没有明显优势<sup>[25-26]</sup>. 目前染色剂被结合放大内镜一起使用, 对照结果显示有助于检测肠化和不典型增生, 如Réaud *et al*<sup>[27]</sup>和Guelrud *et al*<sup>[28]</sup>分别研究发现其检测肠化敏感性达95.5%以上, 而特异性有所争议, 他们的实验结果分别是42.9%和88.7%, 但样本量少, 尚不清楚临床应用中的重复性如何.

3.2 食管胶囊内镜 胶囊内镜自2001年通过FDA认证以来, 其临床应用日益广泛, 但目前仍主要用于小肠疾病, 如小肠出血、肿瘤、CD、遗传性息肉综合征、乳糜泻等, 其敏感性和特异性基本可接受, 临床应用于食管疾病仍是一项新技术, 他最大的缺点是不能活检, 如果BE就是食管柱状上皮化生, 那他有潜力为我们提供一种

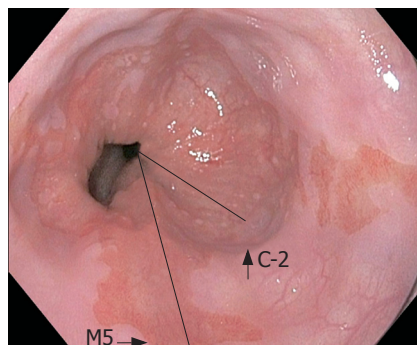


图1 BE的布拉格C或M分类系统.

非侵入性检查手段. 在早期对少数患者的研究中发现其具有高敏感性, 但是随后的大样本研究证明实际上敏感性并不高<sup>[29-30]</sup>, 其中一项90名患者的前瞻性研究发现食管胶囊内镜诊断BE的敏感性及特异性分别只有67%和84%<sup>[29]</sup>. 而且价格昂贵, 仍存技术问题, 例如记录中断、传输失败等, 以及临床应用的问题, 如胶囊滞留等.

3.3 窄频带成像 窄频带成像(narrow-band imaging, NBI)的原理是将传统电子内镜中的3个宽谱滤光片换成了特殊优化的窄谱滤光片, 使电子内镜的红/绿/蓝光源的波谱范围相对变窄, 波长相对变短, 而且3种光源的构成比例中以蓝光为主, 蓝光的波长短, 其他组织吸收少, 却能被血红蛋白选择性地吸收, 所以能更清楚地显示黏膜浅表血管, 使血管系统与周围组织的对比性明显增强, 在一定程度上具有染色内镜相似的效果, 而且操作灵活、方便, 与传统内镜之间可随意切换, 对病变部位可重复观察, 与高分辨内镜联合应用可更好地观察黏膜. 与普通内镜相比, NBI对齿状线、GEJ、栏栅状血管等结构显示更加清晰, 而肠化也有特征性的脑回样黏膜、常青藤或DNA样毛细血管, 高度不典型增生和早期癌则往往黏膜结构不规则, 血管增多、扩张<sup>[31]</sup>. Sharma *et al*<sup>[32]</sup>对NBI的研究, 在51名BE患者中发现7名患者有高度不典型增生, 敏感度达100%, 特异性达98.7%; Singh *et al*<sup>[33]</sup>通过前瞻对照研究得出, NBI结合放大内镜诊断BE的敏感性达88.9%, 特异性达94.8%. 在我国, NBI已开始投入临床使用, 但目前尚未有国际上统一的NBI下黏膜及血管形态结构的分类标准.

3.4 自体荧光成像 人体组织内含有能发射荧光的物质, 如胶原、核黄素等, 自体荧光成像的原理就是通过向组织发出一定波长的激光, 激发并探测组织的自身荧光光谱及成像, 从而获得组织内部物理和化学的特性, 由此可鉴别

### ■创新盘点

本文从BE的诊断标准、内镜诊断、分类和活检方法等方面逐一阐述, 给出近年来国外诊断方面较新的观点, 有助于指导临床; 另外详细介绍了几种新的内镜成像技术的原理及近年这些技术在诊断BE、肠化和不典型增生的最新研究成果.

## ■名词解释

1 内镜疑似食管化生(ESEM):专家建议内镜检查发现异常,提示Barrett's食管,但确诊尚待组织学证实的用ESEM表示,从而将内镜下诊断食管柱状上皮化生与病理证实有食管柱状上皮化生两者用不同的名称区分。

2 自体荧光成像:人体组织内自身含有能发射荧光的物质,通过向组织发出一定波长的激光,激发并探测组织的自身荧光光谱及成像,从而获得组织内部物理和化学特性,而同一组织的不同部位,其生化成分与结构基本相同,由此可鉴别不同的组织。

3 光学相干断层摄影技术:利用近红外低相干光照射到待测组织,依据光的相干性产生干涉,测量光反射所经过的距离而成像,收集的信号经处理后可得到组织断面的二维或三维图像。

不同的组织,正常组织在荧光图像上显示为蓝色, BE为绿色,大多数癌组织为暗红色,这些特点有利于诊断BE中的不典型增生和早期癌<sup>[34]</sup>。但是由于食管炎症及新生上皮也表现为红色,所以导致假阳性率太高,一项20例BE患者的自体荧光成像研究<sup>[35]</sup>发现不典型增生区域的敏感度为100%,但是有40%假阳性率。

3.5 共聚焦激光显微内镜技术 共聚焦激光显微内镜技术(laser confocal microscopy, CLE)是将一个小型的共聚焦激光显微镜安装于传统的电子内镜头端,其成像原理是由激光器发出激光束,激发组织中人造的荧光物质使之产生不同方向的荧光,利用光产生干涉图像并将其数字化,从而构成检测区域的三维图像。由于杯状细胞和癌细胞在CLE下均有显著特点,所以可用于识别肠化和早期癌。我国有人对CLE进行了初步的研究<sup>[36]</sup>,以10%的荧光素钠静注作对比剂后检查21名BE患者,其敏感度为95%,特异度为90%。然而Pohl *et al*对38位BE患者研究发现CLE检测BE中不典型增生的敏感性只有75%,特异性为88.8%-91.0%<sup>[37]</sup>。由于荧光素钠不能进入细胞核,胞核不显示,所以CLE的缺点是不易区分低度和高度不典型增生。

3.6 光学相干断层摄影技术 光学相干断层摄影技术(optical coherence tomography, OCT)的原理是利用近红外低相干光照射到待测组织,依据光的相干性产生干涉来测量光反射所经过的距离而成像,收集的信号经处理后可得到组织断面的二维或三维图像,是一种快速、实时的活体组织深层显微结构的非侵入性成像方法,虽然OCT跟超声内镜非常类似,但其分辨率极高,几乎与光学显微镜相当。自1991年研发出来, OCT用于眼球、心脏病及早期癌等许多研究领域,并且部分已经应用于临床,而胃肠道检查的应用仍处于研究阶段。Wang *et al*<sup>[38]</sup>对98份食管远端的离体组织进行研究,发现高速成像的傅立叶域OCT技术对BE的诊断具有高度敏感性、特异性及准确性,而且检测不典型增生的敏感性、特异性分别达92%和80%。其缺点在于所能探及的组织深度浅,仅1-2 mm,且每次成像范围小,不利于大范围的检查。

## 4 结论

随着对BE的逐步深入研究,其诊断标准几经修改,最佳可操作的标准应明了、重复性好,而且与食管腺癌的风险相关,至于新定义和分类系

统是否符合以上标准,还有待临床验证。目前经内镜活检的组织病理评估不典型增生和癌症风险仍得不到满意的效果,新的内镜成像技术的初步研究显示其对肠化、不典型增生的敏感性及其特异性高,有较好的临床应用前景。

## 5 参考文献

- Pohl H, Welch HG. The role of overdiagnosis and reclassification in the marked increase of esophageal adenocarcinoma incidence. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 142-146
- Hongo M. Review article: Barrett's oesophagus and carcinoma in Japan. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 8: 50-54
- 小森真人, 後藤英子. Barrett上皮的发生机制. *日本医学介绍* 2002; 23: 5-6
- Playford RJ. New British Society of Gastroenterology (BSG) guidelines for the diagnosis and management of Barrett's oesophagus. *Gut* 2006; 55: 442
- Cameron AJ, Souto EO, Smyrk TC. Small adenocarcinomas of the esophagogastric junction: association with intestinal metaplasia and dysplasia. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1375-1380
- Odze RD. Unraveling the mystery of the gastroesophageal junction: a pathologist's perspective. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1853-1867
- Phillips RW, Frierson HF Jr, Moskaluk CA. Cdx2 as a marker of epithelial intestinal differentiation in the esophagus. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 1442-1447
- Glickman JN, Shahsafaie A, Odze RD. Mucin core peptide expression can help differentiate Barrett's esophagus from intestinal metaplasia of the stomach. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 1357-1365
- Kelty CJ, Gough MD, Van Wyk Q, Stephenson TJ, Ackroyd R. Barrett's oesophagus: intestinal metaplasia is not essential for cancer risk. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 1271-1274
- Jones TF, Sharma P, Daaboul B, Cherian R, Mayo M, Topalovski M, Weston AP. Yield of intestinal metaplasia in patients with suspected short-segment Barrett's esophagus (SSBE) on repeat endoscopy. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 2108-2111
- Oberg S, Johansson J, Wenner J, Johnsson F, Zilling T, von Holstein CS, Nilsson J, Walther B. Endoscopic surveillance of columnar-lined esophagus: frequency of intestinal metaplasia detection and impact of antireflux surgery. *Ann Surg* 2001; 234: 619-626
- Reid BJ, Blount PL, Feng Z, Levine DS. Optimizing endoscopic biopsy detection of early cancers in Barrett's high-grade dysplasia. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 3089-3096
- Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P, Dent J, Jones R. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1900-1920; quiz 1943
- Spechler SJ, Zeroogian JM, Antonioli DA, Wang HH, Goyal RK. Prevalence of metaplasia at the gastro-oesophageal junction. *Lancet* 1994; 344: 1533-1536
- Wallner B, Sylvan A, Stenling R, Janunger KG. The Z-line appearance and prevalence of intestinal metaplasia among patients without symptoms or

- endoscopic signs indicating gastroesophageal reflux. *Surg Endosc* 2001; 15: 886-889
- 16 Morales TG, Camargo E, Bhattacharyya A, Sampliner RE. Long-term follow-up of intestinal metaplasia of the gastric cardia. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1677-1680
  - 17 Gopal DV, Lieberman DA, Magaret N, Fennerty MB, Sampliner RE, Garewal HS, Falk GW, Faigel DO. Risk factors for dysplasia in patients with Barrett's esophagus (BE): results from a multicenter consortium. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 1537-1541
  - 18 Rudolph RE, Vaughan TL, Storer BE, Haggitt RC, Rabinovitch PS, Levine DS, Reid BJ. Effect of segment length on risk for neoplastic progression in patients with Barrett esophagus. *Ann Intern Med* 2000; 132: 612-620
  - 19 Sharma P, Dent J, Armstrong D, Bergman JJ, Gossner L, Hoshihara Y, Jankowski JA, Junghard O, Lundell L, Tytgat GN, Vieth M. The development and validation of an endoscopic grading system for Barrett's esophagus: the Prague C & M criteria. *Gastroenterology* 2006; 131: 1392-1399
  - 20 Harrison R, Perry I, Haddadin W, McDonald S, Bryan R, Abrams K, Sampliner R, Talley NJ, Moayyedi P, Jankowski JA. Detection of intestinal metaplasia in Barrett's esophagus: an observational comparator study suggests the need for a minimum of eight biopsies. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1154-1161
  - 21 Pohl J, Nguyen-Tat M, Manner H, Pech O, van Weyenberg SJ, Ell C. "Dry biopsies" with spraying of dilute epinephrine optimize biopsy mapping of long segment Barrett's esophagus. *Endoscopy* 2008; 40: 883-887
  - 22 Abela JE, Going JJ, Mackenzie JF, McKernan M, O'Mahoney S, Stuart RC. Systematic four-quadrant biopsy detects Barrett's dysplasia in more patients than nonsystematic biopsy. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 850-855
  - 23 Ormeci N, Savas B, Coban S, Palabiyikoğlu M, Ensari A, Kuzu I, Kursun N. The usefulness of chromoendoscopy with methylene blue in Barrett's metaplasia and early esophageal carcinoma. *Surg Endosc* 2008; 22: 693-700
  - 24 Gossner L, Pech O, May A, Vieth M, Stolte M, Ell C. Comparison of methylene blue-directed biopsies and four-quadrant biopsies in the detection of high-grade intraepithelial neoplasia and early cancer in Barrett's oesophagus. *Dig Liver Dis* 2006; 38: 724-729
  - 25 Lim CH, Rotimi O, Dexter SP, Axon AT. Randomized crossover study that used methylene blue or random 4-quadrant biopsy for the diagnosis of dysplasia in Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc* 2006; 64: 195-199
  - 26 Horwhat JD, Maydonovitch CL, Ramos F, Colina R, Gaertner E, Lee H, Wong RK. A randomized comparison of methylene blue-directed biopsy versus conventional four-quadrant biopsy for the detection of intestinal metaplasia and dysplasia in patients with long-segment Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 546-554
  - 27 Reaud S, Croue A, Boyer J. Diagnostic accuracy of magnifying chromoendoscopy with detection of intestinal metaplasia and dysplasia using acetic acid in Barrett's esophagus. *Gastroenterol Clin Biol* 2006; 30: 217-223
  - 28 Guelrud M, Herrera I, Essenfled H, Castro J. Enhanced magnification endoscopy: a new technique to identify specialized intestinal metaplasia in Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc* 2001; 53: 559-565
  - 29 Lin OS, Schembre DB, Mergener K, Spaulding W, Lomah N, Ayub K, Brandabur JJ, Bredfeldt J, Drennan F, Gluck M, Jiranek GC, McCormick SE, Patterson D, Kozarek RA. Blinded comparison of esophageal capsule endoscopy versus conventional endoscopy for a diagnosis of Barrett's esophagus in patients with chronic gastroesophageal reflux. *Gastrointest Endosc* 2007; 65: 577-583
  - 30 Ramirez FC, Akins R, Shaukat M. Screening of Barrett's esophagus with string-capsule endoscopy: a prospective blinded study of 100 consecutive patients using histology as the criterion standard. *Gastrointest Endosc* 2008; 68: 25-31
  - 31 Goda K, Tajiri H, Ikegami M, Urashima M, Nakayoshi T, Kaise M. Usefulness of magnifying endoscopy with narrow band imaging for the detection of specialized intestinal metaplasia in columnar-lined esophagus and Barrett's adenocarcinoma. *Gastrointest Endosc* 2007; 65: 36-46
  - 32 Sharma P, Bansal A, Mathur S, Wani S, Cherian R, McGregor D, Higbee A, Hall S, Weston A. The utility of a novel narrow band imaging endoscopy system in patients with Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc* 2006; 64: 167-175
  - 33 Singh R, Karageorgiou H, Owen V, Garsed K, Fortun PJ, Fogden E, Subramaniam V, Shonde A, Kaye P, Hawkey CJ, Ragunath K. Comparison of high-resolution magnification narrow-band imaging and white-light endoscopy in the prediction of histology in Barrett's oesophagus. *Scand J Gastroenterol* 2009; 44: 85-92
  - 34 Kara MA, DaCosta RS, Streutker CJ, Marcon NE, Bergman JJ, Wilson BC. Characterization of tissue autofluorescence in Barrett's esophagus by confocal fluorescence microscopy. *Dis Esophagus* 2007; 20: 141-150
  - 35 Kara MA, Peters FP, Fockens P, ten Kate FJ, Bergman JJ. Endoscopic video-autofluorescence imaging followed by narrow band imaging for detecting early neoplasia in Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc* 2006; 64: 176-185
  - 36 刘红, 李延青, 赵幼安, 于涛, 叶为民, 郭玉婷, 张建娜, 刘富国. 共聚焦内镜诊断Barrett食管的初步研究. *中华消化杂志* 2007; 27: 83-86
  - 37 Pohl H, Rösch T, Vieth M, Koch M, Becker V, Anders M, Khalifa AC, Meining A. Miniprobe confocal laser microscopy for the detection of invisible neoplasia in patients with Barrett's oesophagus. *Gut* 2008; 57: 1648-1653
  - 38 Wang TD, Triadafilopoulos G, Crawford JM, Dixon LR, Bhandari T, Sahbaie P, Friedland S, Soetikno R, Contag CH. Detection of endogenous biomolecules in Barrett's esophagus by Fourier transform infrared spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 15864-15869

#### ■同行评价

本文内容较全面, 文献资料较新, 综述层次清楚, 可读性较强, 具有临床参考价值。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕



# Fox L在TGF-β/Smad通路中对肝星状细胞活化的影响

熊飞, 李昌平

## ■背景资料

肝纤维化是一个可逆的瘢痕修复过程,是所有肝病末期并发症的基础,逆转纤维化的研究将对肝病的治疗产生革命性的影响,而在肝纤维化中肝星状细胞的激活是整个的肝纤维化的核心事件,而其激活主要依赖于TGF-β/Smad通路。

熊飞, 李昌平, 四川省泸州医学院附属医院消化内科 四川省泸州市 646000

作者贡献分布: 论文的文献检索分析及撰写由熊飞完成, 选题与审校由李昌平完成。

通讯作者: 李昌平, 教授, 646000, 四川省泸州市太平路25号, 泸州医学院附属医院消化内科. lichangping1965@sina.com  
电话: 0830-3165003 传真: 0830-2392753

收稿日期: 2009-04-06 修回日期: 2009-07-17

接受日期: 2009-07-27 在线出版日期: 2009-08-18

## Role of forkhead L2 in transforming growth factor-beta /Smad signaling pathway-mediated activation of hepatic stellate cells

Fei Xiong, Chang-Ping Li

Fei Xiong, Chang-Ping Li, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Correspondence to: Professor Chang-Ping Li, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, 25 Taiping Street, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. lichangping1965@sina.com

Received: 2009-04-06 Revised: 2009-07-20

Accepted: 2009-07-27 Published online: 2009-08-18

## Abstract

Hepatic fibrosis is characterized by an abnormal hepatic deposition of extracellular matrix (especially collagen). As hepatic fibrosis progresses, cirrhosis will develop. Hepatic stellate cells are the major source of the extracellular matrix (ECM). The activation of hepatic stellate cells is the central event in the development of hepatic fibrosis. The transforming growth factor-beta (TGF-β)/Smad signaling pathway plays an important role in regulating the synthesis of ECM in stellate cells. Recent studies found that forkhead L2 (Fox L2), belonging to the forkhead family, was able to act as a molecular chaperone for Smad complex. Thus, it may enhance the stability between Smad complex and target genes.

Key Words: Fox L2; TGF-β/Smad signaling pathway; Hepatic stellate cell; Helix-turn-helix

Xiong F, Li CP. Role of forkhead L2 in transforming growth factor-beta /Smad signaling pathway-mediated

activation of hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(23): 2396-2399

## 摘要

肝纤维化是肝脏内弥漫性细胞外基质(特别是胶原)过度沉积的结果,如果肝纤维化进行性发展,常演变为肝硬化。而肝星状细胞的激活则是肝纤维化的核心事件,是细胞外基质分泌的主要细胞,其中的TGF-β/Smad通路是肝星状细胞内主要的信号传导通路之一,在细胞外基质的合成中起着重要作用。由于在该信号通路下游Smad复合物只能与靶基因形成松散连接,所以必然存在着相应的协同蛋白质使整个复合物紧密连接,而最近研究发现,Fox L转录因子中的Fox L2可能与整个Smad复合物形成了分子伴侣关系,他有可能加强了Smad复合物与靶基因的结合的稳定性。

关键词: Fox L2; TGF-β/Smad通路; 肝星状细胞; 螺旋-转角-螺旋

熊飞, 李昌平. Fox L在TGF-β/Smad通路中对肝星状细胞活化的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17(23): 2396-2399

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2396.asp>

## 0 引言

肝星状细胞在肝纤维化的形成过程中据核心地位<sup>[1-2]</sup>,他的激活,增殖并合成分泌细胞外基质(extracellular matrix, ECM)等多种物质,使ECM合成和降解失衡,在肝脏内过度沉积,使肝脏结构发生改变,导致肝纤维化的发生<sup>[3-4]</sup>。转化生长TGF-β/Smad(transforming growth factor-beta/Smad, TGF-β/Smad)通路则是肝星状细胞内的主要信号通路,在胶原等ECM的合成与分泌中起着重要作用<sup>[5]</sup>,他的下游信号通路包括了一组被称为Smad的双功能分子家族,在纤维化发生的许多肝星状细胞的下游信号通路中,其细胞内和细胞外信号都集中于Smad,从而进一步微调和增强TGF-β的作用<sup>[6-7]</sup>,但Smad复合物与靶基因结合是松散结合<sup>[8]</sup>,必然存在相应的协同蛋白质使其紧密连接,而Fox L中的Fox L2可能扮演

## ■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

了这一角色<sup>[9]</sup>, 本文将对这一问题进行综述.

## 1 Fox L基因及其相关蛋白质

Fox基因能编码一类被命名为forkhead box的转录因子, 这类转录因子都含有一个非常保守的110个氨基酸的DNA结合区域, 被称作forkhead box. 该功能域又被形象的称为winged helix, 通常由3个 $\alpha$ -螺旋构成, 中间用2个多聚肽环进行连接, 为经典的螺旋-转角-螺旋结构<sup>[10]</sup>, 类似于噬菌体的DNA阻抑结构<sup>[11]</sup>. 从酵母菌到人类的真核生物中都能发现forkhead box转录因子, 他们在细胞的多种生物学效应中, 如代谢, 生长, 癌症的发生, 以及衰老中都扮演着极为重要的角色, 根据保守的forkhead box结构域的不同, 这类蛋白质被分成了17个亚家族(A-Q)<sup>[12]</sup>. 其中的Fox L被分为了Fox L1和Fox L2, 2种转录因子在forkhead box上的微小差别导致他们在功能上的差异<sup>[13]</sup>. Fox L1又名Fkh6, 其基因定位于16q24, 长度是3.189 kb, 他编码的蛋白质拥有345个氨基酸, 位于细胞核中, 通常定位于肠道中间叶细胞<sup>[14]</sup>. 但最近研究发现, 肝脏受损后均会刺激干细胞转化为肝细胞和胆管扁平细胞, 干细胞的位移和其子细胞会高度表达Fox L1转录因子, 他很有可能是肝干细胞的一种全新标志物, 由于干细胞是通过旁分泌对邻近的肝星状细胞和成纤维细胞产生影响, 所以实际上他有可能参与肝纤维化的形成过程, 但是研究中也发现, 在肝星状细胞和成纤维细胞中没有发现Fox L1的高度表达, 这有可能暗示其高表达的干细胞来源于肠道, 同时也说明Fox L1可能并不参与肝星状细胞的活化<sup>[15]</sup>. Fox L2定位于3q23, 长度为2.736 kb, 其蛋白质产物含有376个氨基酸, 研究表明其是睑裂狭小、倒转型内眦赘皮和上睑下垂综合征(blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome, BPES)的致病基因, 但在卵巢早衰患者中也可检测到Fox L2基因突变, 所以他可能是卵巢发育中的一种早期调控因子. 该转录因子可以与Smad3的MH2区结合, 能够协同激活素, 进行正性调控<sup>[9]</sup>.

## 2 TGF- $\beta$ /Smad通路

受体耦联丝氨酸/苏氨酸激酶(serine/threonine kinase, STK)信号传导主要指TGF- $\beta$ /Smad通路, 该通路特点是其受体具有STK活性, 通路由TGF- $\beta$ 及其受体, 以及受体底物Smad蛋白家族信号分子等组成<sup>[16]</sup>.

TGF- $\beta$ 是一种分泌性的多肽信号分子, 广泛存在于从线虫到哺乳动物中. 由至少40种细胞因子组成, 可进一步划分为亚家族, 包括: TGF- $\beta$ 亚族, 如TGF- $\beta$ 1-6; 激活素亚家族, 如activinA和activinB; 抑制素亚族, 如inhibinA和inhibinB; 骨形态形成蛋白亚族(bone morphogenetic protein, BMPs), 如BMP2和BMP4; 米勒抑制物(mullerian inhibitory substance, MIS). TGF- $\beta$ 结合的受体依据结构和功能不同被分为3型: TGF- $\beta$ R I, TGF- $\beta$ R II及TGF- $\beta$ R III<sup>[17-18]</sup>. 通常情况下, TGF- $\beta$ R I和TGF- $\beta$ R II均为单次跨膜的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶受体, 胞质区含有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结构域, 具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性; 而TGF- $\beta$ R III通常不具备激酶活性, 不直接参与信号传导, 主要调节TGF- $\beta$ 与受体的结合<sup>[19,22]</sup>. TGF- $\beta$ R I和TGF- $\beta$ R II在结构上有相似之处, 但TGF- $\beta$ R II的相对分子质量较大, 约为75 kDa, 这使得他的内外区结构较长<sup>[21]</sup>, 不过他们最显著的区别是TGF- $\beta$ R I的胞质区蛋白激酶结构的N端, 存在一个含丝氨酸和甘氨酸的结构域, 被称为GS结构域. 该结构域有多个磷酸化位点, 其中主要识别点是一段保守的Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly序列<sup>[21]</sup>.

受体底物Smads蛋白质家族是一类连接受体到基因序列的信号分子, 目前发现了至少9种, 根据其结构和功能的不同分为3类: (1)受体调节型Smad, 包括Smad1, 2, 3, 5, 8, 这一类蛋白质家族多在特定的TGF- $\beta$ 超家族成员的信号通路中起作用; (2)共同介质型, Smad4, 能够和R-Smad形成二聚体, 参与所有的TGF- $\beta$ 信号传导. (3)抑制型Smad, 主要是Smad7, 6, 是一类可以发挥负性调控机制的信号分子<sup>[23-24]</sup>.

R-Smad的基本结构, 由3部分组成: MH1、连接区及MH2区. MH1区主要与靶基因结合; MH2区则主要与Smad和受体结合, 以及参与形成Smad多聚体; 而连接区相对多变, 富含脯氨酸, 他将MH1区和MH2区连接到一起, 有多个磷酸化位点, 能够通过磷酸化抑制Smad的转录, 为其负调控区<sup>[25,31]</sup>.

虽然TGF- $\beta$ /Smad通路含有不同种类的细胞因子, 但是各条通路的传导途径基本一致, 下面将对该通路过程进行简要的概述. 以TGF- $\beta$ 因子为例, TGF- $\beta$ 通常以无活性的形式分泌, 通过TGF- $\beta$ 激活酶激活, 首先与细胞表面的已经自我磷酸化的TGF- $\beta$ R II形成二聚体, 然后TGF- $\beta$ R I识别此二聚体, 并与之结合形成由

### ■研发前沿

目前肝纤维化的细胞学及分子水平的发生机制是研究热点, 对肝星状细胞的活化也是研究的重点之一. 由于在肝星状细胞TGF- $\beta$ /Smad信号通路下游, Smad复合物与靶基因的连接是松散连接, 所以近些年的研究发现Fox L中的Fox L2可能促进Smad复合物与靶基因连接的稳定性.

### ■创新盘点

本文主要从分子水平阐述在肝星状细胞TGF- $\beta$ /Smad信号通路下游, Fox L2如何利用其自身的螺旋-转角-螺旋结构促进Smad复合物与靶基因连接的稳定性.

### ■名词解释

螺旋-转角-螺旋 (helix-turn-helix): 为蛋白质的二级结构, 其基本特征为两端均是数个 $\alpha$ -螺旋, 中间用 $\beta$ -转角连接, 常常作为用蛋白质与靶基因的连接结构。

TGF- $\beta$ R I, TGF- $\beta$ R II, TGF- $\beta$ 组成的受体异聚体复合物, 此时TGF- $\beta$ R I 中的GS区得以磷酸化, 激活STK, 使得TGF- $\beta$ R I 的空间结构改变更有利于激活, 然后R-Smad在膜偶联相关蛋白-Smad受体激活相关蛋白(smads anchor for receptor activation, SARAs)的介导下, 连接到上述受体异聚体复合物, 并同时被磷酸化, 磷酸化的R-Smad和Smad4结合, 形成复合物, 将信号转位到细胞核中. 该复合物通过Smad4与Smad3的MH1区的发夹样结构与靶基因发生松散的连接, 而后在局部的环境影响下, MH2区的转录激活序列与靶基因形成紧密的结合, 最终实现整个信号传导<sup>[26-28,30]</sup>.

### 3 Fox L2对肝星状细胞的潜在影响

在整个肝纤维化的进程中, 位于Disse腔中的肝星状细胞在肝纤维化的过程中起着关键作用. 肝星状细胞是ECM的主要来源, 他的活化需要2个时相, 即启动阶段和持续阶段<sup>[30]</sup>. 其活化则是通过了TGF- $\beta$ /Smad通路进行的, 通过TGF- $\beta$ 作用于该信号通路, 使Smad复合物与靶基因的结合, 开始转录的过程. 最近研究中发现Fox L2与Smad3的复合物有可能共同作为一种转录调控元件, 同时调控卵泡素的合成, 由于在该研究中Fox L2与Smad3结成了分子伴侣关系, 这极有可能暗示在肝星状细胞的活化中, 需要借助Smad3信号分子的TGF- $\beta$ 也许同样需要Fox L2的参与<sup>[9]</sup>. 所以推测Fox L2在肝星状细胞的TGF- $\beta$ /Smad通路中可能有2方面的作用.

3.1 加强R-Smad复合物与靶基因结合的稳定性在TGF- $\beta$ /Smad通路的下游, R-Smad/Co-Smad的复合物通过MH1区与DNA上的Smad蛋白结合元件(smad binding element, SBP)发生松散结合, 由于该结构通常是位于包括 I 型胶原纤维, PAI- I 等的启动子中, 实际而言, 他通过SBP识别了启动子, 诱导了RNA聚合酶 II 与启动子的结合, 从而开始整个转录的过程, 但是如果只是松散的连接, 那么R-Smad/Co-Smad的复合物将随时可能从DNA的大沟上滑脱, 将无法有效启动整个转录过程, 最后使肝星状细胞活化处于停滞状态<sup>[32]</sup>, 而根据Blout *et al*的研究发现<sup>[9]</sup>, Fox L2是通过与Smad3结合共同发挥效应, 由于在肝星状细胞的活化中, TGF- $\beta$ 发挥效应也借助与Smads信号传导, 那么很可能Fox L2将会促使Smad3/Smad4的复合物与靶基因最终紧密连接, 从而诱导RNA聚合酶 II 与靶基因启动子的连接,

开启整个转录过程<sup>[9]</sup>. 而从Fox这一类蛋白质家族来看, 他们通常有一个螺旋-转角-螺旋结构, 从结构决定蛋白质的功能来说, 他本身就像一个大钳子, 能够牢固的钳持在DNA的大沟中<sup>[10]</sup>, Fox L2实际上有可能通过此结构加强了Smad复合物与靶基因的连接. Fox家族中的FoxO1连接到DBE1 DNA的X线晶体衍射结构, 虽然在一级结构上与Fox L2有所差别, 但都拥有类似的螺旋-转角-螺旋结构, 从该结构可以看到2个 $\alpha$ -螺旋分别与DNA链的磷酸骨架和氨基酸侧链通过氢键连接, 正好形成一个夹角, 从而使FoxO1能够与靶基因牢固结合, 而从中也可以推测出拥有同样螺旋-转角-螺旋结构的Fox L2也有可能是通过类似方式与靶基因结合<sup>[33]</sup>.

3.2 稳定DNA链的作用 在TGF- $\beta$ /Smad通路中, 需要使染色质松弛, 即染色体重塑的过程<sup>[34]</sup>. 这个过程中可能会使组蛋白与DNA的相互作用减弱, 但是假设组蛋白在转录中不在与靶基因连接, 那么必然需要有类似结构的蛋白质能够起到暂时保持DNA链的空间稳定作用, 使转录能够正常进行. 由于组蛋白中也存在与Fox L2相似的螺旋-转角-螺旋结构, 所以Fox L2的连接也有可能起到暂时稳定DNA链的作用.

### 4 结论

逆转整个肝纤维化, 在控制原发病的基础上, 其基本的核心思想就是如何控制肝星状细胞的活化, TGF- $\beta$ /Smad通路则是激活肝星状细胞主要信号通路之一, 如果能够通过相应实验证实Fox L2在整个通路中所起到的作用, 将对未来研究抗肝纤维化的药物及其作用靶点, 提供有益的信息.

### 5 参考文献

- Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 76-99
- Sato M, Suzuki S, Senoo H. Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct Funct* 2003; 28: 105-112
- Wells RG. Cellular sources of extracellular matrix in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 759-768, viii
- Tsukada S, Parsons CJ, Rippe RA. Mechanisms of liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2006; 364: 33-60
- Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d793-d807
- Tsukada S, Westwick JK, Ikejima K, Sato N, Rippe RA. SMAD and p38 MAPK signaling pathways independently regulate alpha1(I) collagen gene expression in unstimulated and transforming growth factor-beta-stimulated hepatic stellate cells.



- J Biol Chem* 2005; 280: 10055-10064
- 7 Bonacchi A, Romagnani P, Romanelli RG, Efsen E, Annunziato F, Lasagni L, Francalanci M, Serio M, Laffi G, Pinzani M, Gentilini P, Marra F. Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes. *J Biol Chem* 2001; 276: 9945-9954
  - 8 Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 2003; 425: 577-584
  - 9 Blount AL, Schmidt K, Justice NJ, Vale WW, Fischer WH, Bilezikjian LM. FoxL2 and Smad3 coordinately regulate follistatin gene transcription. *J Biol Chem* 2009; 284: 7631-7645
  - 10 Hansen IA, Sieglaff DH, Munro JB, Shiao SH, Cruz J, Lee IW, Heraty JM, Raikhel AS. Forkhead transcription factors regulate mosquito reproduction. *Insect Biochem Mol Biol* 2007; 37: 985-997
  - 11 Pabo CO, Lewis M. The operator-binding domain of lambda repressor: structure and DNA recognition. *Nature* 1982; 298: 443-447
  - 12 Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev* 2000; 14: 142-146
  - 13 Katoh M, Katoh M. Human FOX gene family (Review). *Int J Oncol* 2004; 25: 1495-1500
  - 14 Kaestner KH, Silberg DG, Traber PG, Schütz G. The mesenchymal winged helix transcription factor Fkh6 is required for the control of gastrointestinal proliferation and differentiation. *Genes Dev* 1997; 11: 1583-1595
  - 15 Sackett SD, Li Z, Hurtt R, Gao Y, Wells RG, Brondell K, Kaestner KH, Greenbaum LE. Foxl1 is a marker of bipotential hepatic progenitor cells in mice. *Hepatology* 2009; 49: 920-929
  - 16 ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 265-273
  - 17 Jayaraman L, Massagué J. Distinct oligomeric states of SMAD proteins in the transforming growth factor-beta pathway. *J Biol Chem* 2000; 275: 40710-40717
  - 18 Penheiter SG, Mitchell H, Garamszegi N, Edens M, Doré JJ Jr, Leof EB. Internalization-dependent and -independent requirements for transforming growth factor beta receptor signaling via the Smad pathway. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 4750-4759
  - 19 Luwor RB, Kaye AH, Zhu HJ. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) and brain tumours. *J Clin Neurosci* 2008; 15: 845-855
  - 20 Lenferink AE, Magoon J, Pepin MC, Guimond A, O'Connor-McCourt MD. Expression of TGF-beta type II receptor antisense RNA impairs TGF-beta signaling in vitro and promotes mammary gland differentiation in vivo. *Int J Cancer* 2003; 107: 919-928
  - 21 Luo K, Lodish HF. Positive and negative regulation of type II TGF-beta receptor signal transduction by autophosphorylation on multiple serine residues. *EMBO J* 1997; 16: 1970-1981
  - 22 Doi H, Shibata MA, Kiyokane K, Otsuki Y. Downregulation of TGFbeta isoforms and their receptors contributes to keratinocyte hyperproliferation in psoriasis vulgaris. *J Dermatol Sci* 2003; 33: 7-16
  - 23 Massagué J. TGFbeta signaling: receptors, transducers, and Mad proteins. *Cell* 1996; 85: 947-950
  - 24 Massagué J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 753-791
  - 25 Nicolás FJ, Hill CS. Attenuation of the TGF-beta-Smad signaling pathway in pancreatic tumor cells confers resistance to TGF-beta-induced growth arrest. *Oncogene* 2003; 22: 3698-3711
  - 26 Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K. Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells* 2002; 7: 1191-1204
  - 27 Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 2002; 296: 1646-1647
  - 28 Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Ten Dijke P. Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem* 2000; 267: 6954-6967
  - 29 Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004; 1: 98-105
  - 30 Itoh S, ten Dijke P. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 2007; 19: 176-184
  - 31 Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* 2001; 114: 4359-4369
  - 32 Lönn P, Morén A, Raja E, Dahl M, Moustakas A. Regulating the stability of TGFbeta receptors and Smads. *Cell Res* 2009; 19: 21-35
  - 33 Brent MM, Anand R, Marmorstein R. Structural basis for DNA recognition by FoxO1 and its regulation by posttranslational modification. *Structure* 2008; 16: 1407-1416
  - 34 Aalfs JD, Kingston RE. What does 'chromatin remodeling' mean? *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 548-555

#### ■同行评价

本综述对肝纤维化逆转的一些作用机制的研究提供了重要的实验基础,值得进一步研究。

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》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 2009-08-18)

# 缺血再灌注损伤与急性胰腺炎

吴林, 帕尔哈提

## ■背景资料

AP是临床常见的内外科急腹症之一, 尤其是SAP, 其病因复杂, 死亡率高, 并发症多, 预后不良. 但其发病机制还不完全清楚.

吴林, 帕尔哈提, 新疆医科大学第一附属医院急诊外科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

作者贡献分布: 本文由吴林综述, 帕尔哈提审校.

通讯作者: 帕尔哈提, 主任医师, 教授, 830054, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市, 新疆医科大学一附院急诊外科.

wulin50781016@yahoo.cn

电话: 0991-4366095

收稿日期: 2009-05-21 修回日期: 2009-07-09

接受日期: 2009-07-13 在线出版日期: 2009-08-18

## Ischemia-reperfusion injury and acute pancreatitis

Lin Wu, Paerhati

Lin Wu, Paerhati, Department of Emergency Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China  
Correspondence to: Paerhati, Department of Emergency Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. wulin50781016@yahoo.cn

Received: 2009-05-21 Revised: 2009-07-09

Accepted: 2009-07-13 Published online: 2009-08-18

## Abstract

Though the pathogenesis of acute pancreatitis is still not entirely clear, animal experiments and clinical studies suggest that ischemia-reperfusion injury plays an important role in the development of acute pancreatitis. The combined action of microcirculatory disturbance, increased free radical production, intracellular calcium overload, inflammatory mediators, leukocyte-platelet interaction, intestinal endotoxemia and other factors leads to pancreatic ischemia-reperfusion injury. Thus, ischemia-reperfusion injury is fundamental to the pathogenesis of acute pancreatitis. In this article, we will review the mechanisms behind the development of pancreatic ischemia-reperfusion injury in acute pancreatitis.

Key Words: Acute pancreatitis; Ischemia-reperfusion; Pathogenesis

Wu L, Paerhati. Ischemia-reperfusion injury and acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(23): 2400-2404

## 摘要

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)的发病机制

尚不明确, 通过动物实验及临床研究发现, 缺血再灌注损伤在其发病机制中具有重要作用. 微循环障碍、自由基生成增多、细胞内钙超载, 炎性介质、白细胞及血小板的作用、肠源性内毒素血症等因素综合作用导致胰腺缺血再灌注损伤, 这可能是AP发病环节中的共同通路. 本文就胰腺缺血再灌注损伤的发生机制作一综述.

关键词: 急性胰腺炎; 缺血再灌注; 发病机制

吴林, 帕尔哈提. 缺血再灌注损伤与急性胰腺炎. *世界华人消化杂志* 2009; 17(23): 2400-2404

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2400.asp>

## 0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是一种起病急、变化快、病情复杂的疾病, 其发病机制至今仍不清楚. 传统胰酶消化学说已不能较全面解释AP的发病机制. 近年来, 胰腺微循环障碍、自由基、炎症介质、缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, I/R), 肠源性内毒素血症等在AP发病机制中的作用越来越受到重视<sup>[1]</sup>. 尤其I/R, 人们已认识到它是AP发病机制中共同且重要的通路, 很多动物实验和临床研究已证实I/R可以导致AP<sup>[2]</sup>. 现就I/R在AP发病过程中的作用及发病机制综述如下.

## 1 I/R在AP发病过程中的作用

部分患者或动物缺血后再灌注, 不仅没使器官功能恢复, 反而使缺血所致的组织和代谢障碍及结构破坏进一步加重, 这种现象或病理过程称为I/R. 人们在很多动物实验及临床研究已证实AP普遍存在I/R. 尤其是从单纯水肿性胰腺炎向急性重症胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)的演变过程中, I/R起到了重要作用. Menger *et al*<sup>[3]</sup>研究阻断大鼠部分胰腺供血动脉60 min后行120 min灌注, 测定血清淀粉酶及脂肪酶, 证实缺血灌注后会增强血清脂肪酶的活性. 组织形态学分析显示, 胰腺组织组织中中性粒细胞浸润, 白细胞黏附边集, 功能性毛细

## ■同行评议者

房林, 副教授, 同济大学附属上海市第十人民医院普外科; 沈薇, 教授, 重庆医科大学附属第二医院消化内科

血管密度减低, 间质水肿, 出血坏死, 再灌注诱导了急性炎症反应. Obermaier *et al*<sup>[4]</sup>行大鼠胰腺动脉2 h缺血阻断及2 h灌注也得出了类似的结果. 常华 *et al*<sup>[5]</sup>研究显示牛磺胆酸钠诱导的大鼠AP模型, 随着时间的延长, 胰腺由1、3 h的充血、水肿病变逐渐演变为6 h的出血、坏死病变; 而胰腺行I/R后, 术后1 h胰腺即出现出血、坏死病变, 表明I/R加重了胰腺损伤. Von Dobschuetz *et al*<sup>[6]</sup>利用无创正交偏振光普成像技术观察到缺血再灌注后胰腺功能毛细血管密度减少, 加重了胰腺炎性改变. Woeste *et al*<sup>[7]</sup>在临床上观察到I/R是胰腺移植后AP最主要的原因. 胰腺缺血再灌注后, 细胞内水肿, 细胞膜通透性增加, 离子通道电荷改变, 动物实验及临床研究均显示I/R在AP发病原因及发病机制中占有重要地位, 如不能得到改善或终止, 就会进一步导致全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)或多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS).

## 2 胰腺I/R的发生机制

**2.1 微循环障碍** 胰腺腺叶的动脉是一种终末动脉且没有吻合支和分支结构, 这种解剖结构决定胰腺组织本身对缺血非常敏感. 大量临床资料观察到AP初期患者就存在大量体液丢失, 低血容量, 微循环障碍, 甚至休克等. Kusterer *et al*<sup>[8]</sup>用活体内荧光显微镜观察到用牛磺胆酸钠诱导的AP早期就有明显的动脉收缩现象, 胰腺缺血. 血管收缩可能与血管毒性物质的直接刺激、儿茶酚胺、氧自由基、胰酶等多种因素有关. 花嵘 *et al*<sup>[9]</sup>研究大鼠缺血再灌注胰腺炎模型提示I/R组大鼠胰腺微血管口径, 毛细血管通透性, 及微循环血流状态较对照组有明显差别. 胰腺微循环紊乱是AP发生发展中的重要特征, 缺血及再灌注后胰腺表现为血管运动失调, 血流速度减慢, 微血管通透性增高, 毛细血管后小静脉内白细胞聚集和附壁, 营养性毛细血管灌注进行性减少, 再灌注损伤及其相应病变<sup>[10-11]</sup>, 微循环障碍是AP始发和加重因子<sup>[12]</sup>. 贯穿于AP发展的整个过程. 组织细胞缺氧伴随缺血出现, 线粒体是细胞的能量中心, 胰腺缺血时氧供减少, 细胞有氧代谢受到抑制, 当组织氧供严重受损时, 细胞以无氧代谢取代有氧代谢, ATP合成急剧下降, 细胞膜上 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ 泵失活, 细胞膜通透性增加, 细胞内 $\text{Na}^+$ 升高,  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ 交换增强, 使细胞内钙超载, 引起细胞损伤, 再灌注后释放的自由基导致

线粒体膜发生脂质过氧化, 线粒体利用氧及合成ATP的能力进一步受损, 同时无氧代谢产生的酸性产物大量蓄积, 导致细胞内酶活性改变及维持跨膜离子梯度的能量缺乏, 组织缺血时间超过一定临界值后, 损伤将不可逆转, 组织出现坏死, AP向SAP发展.

**2.2 自由基生成增多** 自由基主要包括活性氧(氧自由基, 羟基自由基, 过氧化氢等), 活性氮及其他氧自由基与多不饱和脂肪酸作用后生成的中间代谢产物烷自由基等. 自由基生成增多或体内代谢能力降低时, 可导致氧化应激损伤, 甚至细胞坏死. AP病程中胰腺缺血及再灌注时, 组织内超氧化物歧化酶及过氧化氢酶活性减弱, 氧化型黄嘌呤氧化酶作用于次黄嘌呤, 生成大量的氧化剂, 可与各种细胞成分发生反应, 导致细胞功能障碍及结构破坏. 再灌注时形成的大量羟自由基引起生物膜多价不饱和脂肪酸裂解, 形成脂性自由基和脂质过氧化, 导致膜结构破坏通透性增加, 细胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 内流, 离子泵失灵和细胞内信号传导障碍, 以及线粒体功能受损, ATP生成减少, 最终使细胞内钙超载, 成为细胞致死原因, 导致胰腺局限性坏死. 自由基可进一步激活中性粒细胞释放氧化剂和多种蛋白酶, 加重胰腺损伤. 同时, 内皮细胞产生的NO明显减少, 导致NO依赖的血管舒张作用减弱, 并促进白细胞与内皮细胞黏附, 从而加重缺血缺氧性损伤<sup>[13]</sup>.

**2.3 细胞内钙超载** 缺血后再灌注时迅速纠正缺血组织的酸中毒, 反而会加重缺血再灌注损伤, 其机制是相继通过 $\text{H}^+$ - $\text{Na}^+$ 交换和 $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ 交换导致细胞内钙超载而损伤细胞. 缺血时ATP生成减少, 钠泵失活, 导致细胞内 $\text{Na}^+$ 升高和酸中毒, 再灌注时pH恢复, 细胞内外pH梯度差激活 $\text{H}^+$ - $\text{Na}^+$ , 使细胞内 $\text{Na}^+$ 进一步增多, 激活 $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ 交换蛋白, 使细胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 大量内流, 导致细胞内钙超载; 细胞膜通透性增高,  $\text{Ca}^{2+}$ 可顺着化学梯度大量内流; 再灌注时产生的大量自由基, 可使线粒体氧化磷酸化障碍, ATP生成减少, 使质膜和肌浆网膜钙泵失活, 胞质内钙排出障碍缺血时内源性儿茶酚胺释放增加, 激活G蛋白-磷脂酶C(phospholipase C, PLC)介导的细胞传导通路, 进而催化细胞膜表面的磷脂酰肌醇二磷酸(phosphatidylinositol bisphosphate, PIP<sub>2</sub>)生成三磷酸肌醇(inositol trisphosphate, IP<sub>3</sub>)和甘油二酯(diacylglycerol, DG). IP<sub>3</sub>可使肌浆网释放 $\text{Ca}^{2+}$ 至细胞质, DG激活蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)刺激 $\text{H}^+$ - $\text{Na}^+$ 交换及 $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ 引起细胞内钙

### ■ 研发前沿

研究认为AP的发病机制中, 除了传统的胰酶自身消化学说, I/R也是其发病过程中共同且重要的通路, 尤其在胰腺移植后AP发生机制中, I/R是最重要的因素.

### ■ 相关报道

有研究表明阻断胰腺供血动脉一定时间后再行灌注, 会增强血清脂肪酶的活性, 胰腺组织中中性粒细胞浸润, 白细胞黏附边集, 功能性毛细血管密度减低, 间质水肿, 出血坏死, 再灌注诱导了胰腺急性炎症反应.



### ■创新盘点

微循环障碍, 自由基作用, 炎性介质增多, 细胞内钙超载, I/R, 肠源性内毒素血症等因素相互作用, 形成一个复杂的网络, 而I/R可能是其反应途径中的一个共同通路。

超载. 细胞内Ca<sup>2+</sup>轻度升高引起淀粉酶水平增高, 细胞内Ca<sup>2+</sup>过度升高、钙超载形成和正常钙信号破坏则导致胰酶分泌阻滞, 大量酶原颗粒积聚, Ca<sup>2+</sup>与酶原颗粒结合并相互融合形成浓缩空泡, 自噬溶酶体吞噬浓缩空泡形成自噬空泡, 酶原被溶酶体水解酶激活成为有活性的胰酶. 此外, Ca<sup>2+</sup>与胰蛋白酶原活性灶(trypsinogen activity, TAP)结合, 解除了TAP对胰蛋白酶原自身催化活性的抑制作用, 使胰蛋白酶原的自身激活增强. 最终自噬空泡膜破裂, 胰酶进入细胞质引起腺泡细胞自身消化, 导致AP发生. 腺泡细胞钙超载还作用于或影响其他AP发病环节, 促使轻症AP向SAP发展. 在急性水肿性胰腺炎向急性坏死性胰腺炎转变的实验过程中可发现, 细胞内Ca<sup>2+</sup>的升高与血清淀粉酶水平和活性以及胰腺组织病理学改变程度呈正相关<sup>[14]</sup>.

**2.4 炎性介质的作用** 实验和临床研究表明在AP时同时伴有某些炎性介质升高, 并且其升高的幅度与AP的严重程度密切相关, 应用炎性介质拮抗剂可降低胰腺炎的严重程度及病死率. 因此认为轻度AP之所以进展为SAP是由于异常激活的胰酶在造成胰腺损伤的同时, 激活了胰腺内的炎症细胞释放炎性介质, 再灌注时炎性介质使大量炎症细胞趋化聚集, 加重胰腺炎性反应. 这些炎性介质进入血液循环又激活机体其他的炎症细胞释放大量的炎性介质形成瀑布级联反应. 正是由于这些炎性介质促成了SIRS和MODS<sup>[15]</sup>. Leindler *et al*<sup>[16]</sup>研究大鼠用60 g/L牛磺胆酸经胰管灌注诱导AP, 并临时结扎脾下级动脉15 min后再灌注, 6 h和24 h后测血清淀粉酶, 白介素-6(interleukin 6, IL-6), 肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF), 一氧化氮合酶(induced nitric oxide synthase, INOS), 期间这些指标均明显升高, 再灌注组在6 h的测定指标明显高于其他组, 与胰腺组织病理改变成正相关趋势. 已发现TNF- $\alpha$ 的基因表达受核因子- $\kappa$ B(nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B)的调控, TNF- $\alpha$ 不仅能够促进IL-1、IL-6、血栓素A2(thromboxane A2, TXA2)等炎性介质的释放, 还可与细胞间黏附分子-1(among cells adhesion molecular 1, ACAM-1)和E-选择素等共同作用诱导中性粒细胞活化, 释放大量的氧自由基并造成胰腺及胰腺外组织器官微循环障碍, 以及诱导胰腺细胞凋亡<sup>[17]</sup>. Furuichi *et al*<sup>[18]</sup>研究发现IL-1促进了炎症趋化因子的表达和中性粒细胞的浸润, 加重了

胰腺的炎症反应. 此外, NO与内皮素(endothelin, ET)、前列环素(prostacyclin, PGI2)和血栓素-A(thromboxane A, TXA2)失衡在胰腺缺血坏死改变中也具有重要作用<sup>[19]</sup>.

**2.5 白细胞及血小板的作用** Kusterer *et al*<sup>[8]</sup>采用牛磺胆酸钠诱导大鼠AP模型, 研究微循环变化, 结果发现胰腺小叶间动脉收缩伴有毛细血管内红细胞流速减慢, 胰腺小叶间静脉壁上黏附的白细胞形成斑块, 阻塞部分管腔. 黏附白细胞激活后, 释放炎性介质亦可导致毛细管通透性增高及组织损伤. 有实验报道, 白三烯拮抗剂可以降低白细胞的黏附和游走, 这说明白三烯与胰腺I/R以及白细胞介导的组织损伤有关<sup>[20-21]</sup>. 白三烯同时又是中性粒细胞的化学激活剂, 能促进白细胞活化. 所以, 缺血再灌注引起花生四烯酸的释放及代谢, 产生化学趋化物(如白三烯), 可能是白细胞发生黏附的主要原因. Uhlmann *et al*研究发现AP时由于缺血缺氧, 自由基及各种炎性介质可以激活血小板活化因子(platelet activating factor, PAF), 引起血小板活化, 促使血小板黏附聚集, 血栓形成; 活化的血小板与内皮细胞相互作用, 上调黏附分子-整合素, 改变内皮细胞内骨架蛋白, 引起毛细血管通透性增加, 使血浆大量渗出, 血液黏滞度增加, 血流速度减慢, 参与缺血-再灌注损伤, 最终导致胰腺缺血缺氧及坏死<sup>[21-24]</sup>.

**2.6 肠源性内毒素血症** AP时性胰腺炎时由于禁食, 肠蠕动减弱, 消化液的丢失, 血循环低灌注使机体处于应激状态, 激活肾素-血管紧张素-醛固酮系统和激肽-缓激肽系统, 造成血流重新分布, 胃肠道血流量减少, 加之肠黏膜绒毛由血管终末支供血, 导致肠黏膜缺氧. 同时机体所释放的细胞因子及炎性介质, 一方面直接激活炎症细胞, 造成大量白细胞和血小板黏附于微血管内皮, 减少了组织灌注, 再灌注时又释放氧自由基, 增加血管通透性, 造成组织水肿, 加重氧弥散障碍和体液丢失, 使肠黏膜微循环状况进一步恶化<sup>[25-26]</sup>. Flint *et al*<sup>[27]</sup>研究在AP模型大鼠肠黏膜定植带标志物的大肠杆菌, 在肠系膜淋巴结及胰腺腺泡和肝脏Kupffer细胞内分离到同种细菌, 说明AP时存在明确的肠菌移位和内毒素血症. 肠黏膜屏障功能的减弱或消失, 造成内毒素和细菌移位. 使胰腺毛细血管内皮受损, 通透性增加, 激活凝血及纤溶系统, 炎性介质释放, 促进I/R, 加重胰腺炎性病理改变及全身炎症反应.

### ■应用要点

I/R在急性胰腺炎发病机制中起着重要作用, 早期预防和改善胰腺的I/R, 可以减轻胰腺细胞的损伤和坏死, 同时对进一步研究AP的发生机制有一定提示作用。

2.7 细胞凋亡及坏死 常华 *et al*<sup>[5]</sup> 实验观察到大鼠胰腺缺血再灌注后腺泡细胞凋亡及坏死明显增加且高峰时间提前. McHugh *et al*<sup>[28]</sup> 发现缺血再灌注对胰腺的细胞凋亡和坏死及预后有深远影响. 缺血再灌注后胰腺腺泡内形成钙超载, 氧自由基释放, 诱导线粒体通透转换孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)开放, 这种转变引起线粒体解偶联, 离子稳态丧失, 导致细胞死亡. 再灌注产生的活性氧(reactive oxygen species, ROS)引起细胞色素C和凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)释放, 激活一系列酶促反应, 启动内在的非受体依赖性的死亡级联反应; 另外, 来源于中性粒细胞, 内皮细胞的ROS, 引起丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPKs)激活, 在细胞核内形成NF- $\kappa$ B, 促进TNF- $\alpha$ 的翻译和合成, TNF- $\alpha$ 释放后启动外来受体依赖性死亡级联反应<sup>[29]</sup>, 两种途径共同作用引起大量的腺泡细胞凋亡和坏死.

### 3 讨论

AP是临床常见的内外科急腹症之一, 20%-30%进展为病程长, 胰腺坏死及器官衰竭为特点的SAP, 其病因复杂, 死亡率高, 并发症多, 预后不良. 但其发病机制还不完全清楚, 微循环障碍, 自由基作用, 炎性介质增多, 细胞内钙超载, I/R, 肠源性内毒素血症等因素相互作用, 形成一个复杂的网络, 导致级联反应及恶性循环, 最终导致胰腺的坏死, SIRS或MODS等严重全身并发症. 而I/R可能是其反应途径中的一个共同通路. 基于I/R在其发病机制中的重要作用, 预防和改善胰腺的I/R, 可以减轻胰腺细胞的损伤和坏死, 阻止SIRS及MODS的发展. 实验和临床工作中发现, 在AP早期就给予低温低钠低钙灌注的液体复苏, 抗氧化、清除自由基, 改善能量代谢, 控制炎症反应, 减轻钙超载、调节血管张力, 保护肠黏膜屏障, 以及防止白细胞黏附、抗血小板凝聚、改善血流状态等综合治疗措施, 能够明显减轻缺血再灌注的损伤程度, 改善AP的预后. 这方面的研究这几年也出现了很多新点和热点. Woeste *et al*<sup>[7]</sup> 研究发现奥曲肽能抑制胰酶的分泌和自身消化, 降低胰腺的毛细血管通透性, 减轻胰腺I/R. Warzecha *et al*<sup>[30]</sup> 给予胰腺缺血预处理可以增加抗炎介质IL-10, 改善胰腺血流, 有利于耐受更长时间I/R. Cosen-Binker *et al*<sup>[31]</sup> 发现松弛肽(relaxin)是一种通过NO途径的糖皮质激素受体激动剂, 能够保护胰腺微循环, 降低血

清淀粉酶和脂肪酶, 减少胰腺细胞凋亡, 氢化可的松也有类似作用<sup>[32]</sup>. Ceranowicz *et al*<sup>[33]</sup> 研究发现瘦素(Leptin)可以抑制缺血灌注后炎性介质IL-1的作用. Muñoz-Casares *et al*<sup>[34]</sup> 研究发现褪黑激素(Melatonin)可以减轻胰腺缺血灌注后的氧化应激, 保护胰腺组织. von Dobschuetz *et al*<sup>[35]</sup> 用钴原卟啉治疗通过血红素氧合酶-1的活性, 可以增加胰腺功能性毛细血管密度, 降低白细胞和内皮细胞之间的相互作用. 吕新生 *et al*<sup>[36-37]</sup> 研究发现在AP早期就给予低分子量肝素治疗, 对防止再灌注损伤及减轻胰腺坏死具有明显作用. Christophi *et al*<sup>[38]</sup> 认为高压氧舱治疗可以改善SAP的预后. 总之, 针对I/R的治疗是治疗AP的重要措施之一.

### 4 参考文献

- 1 Kaska M, Pospíšilová B, Slízová D. Pathomorphological changes in microcirculation of pancreas during experimental acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 1570-1574
- 2 Sakorafas GH, Tsiotou AG. Etiology and pathogenesis of acute pancreatitis: current concepts. *J Clin Gastroenterol* 2000; 30: 343-356
- 3 Menger MD, Bonkhoff H, Vollmar B. Ischemia-reperfusion-induced pancreatic microvascular injury. An intravital fluorescence microscopic study in rats. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 823-830
- 4 Obermaier R, Drognitz O, Benz S, Hopt UT, Pisarski P. Pancreatic ischemia/reperfusion injury: impact of different preservation temperatures. *Pancreas* 2008; 37: 328-332
- 5 常华, 严际慎, 王平瑜, 刘群才. 缺血再灌注损伤对大鼠急性胰腺炎细胞凋亡的影响. *中国普外基础与临床杂志* 2005; 12: 150-152
- 6 von Dobschuetz E, Biberthaler P, Mussack T, Langer S, Messmer K, Hoffmann T. Noninvasive in vivo assessment of the pancreatic microcirculation: orthogonal polarization spectral imaging. *Pancreas* 2003; 26: 139-143
- 7 Woeste G, Wullstein C, Meyer S, Usadel KH, Hopt UT, Bechstein WO, von Dobschuetz E. Octreotide attenuates impaired microcirculation in postischemic pancreatitis when administered before induction of ischemia. *Transplantation* 2008; 86: 961-967
- 8 Kusterer K, Poschmann T, Friedemann A, Enghofer M, Zandler S, Usadel KH. Arterial constriction, ischemia-reperfusion, and leukocyte adherence in acute pancreatitis. *Am J Physiol* 1993; 265: G165-G171
- 9 花嵘, 李玺, 龙建军, 董红燕, 李德本, 刘军权. 大鼠胰腺缺血再灌注损伤微循环改变的实验. *中国临床康复* 2005; 9: 152-154
- 10 Benz S, Obermaier R, Wiessner R, Breitenbuch PV, Burska D, Weber H, Schnabel R, Mayer J, Pfeffer F, Nizze H, Hopt UT. Effect of nitric oxide in ischemia/reperfusion of the pancreas. *J Surg Res* 2002; 106: 46-53
- 11 Foitzik T, Eibl G, Hotz B, Hotz H, Kahrau S, Kasten C, Schneider P, Buhr HJ. Persistent multiple organ microcirculatory disorders in severe acute

### ■名词解释

缺血再灌注损伤: 人类或动物的组织器官缺血后再灌注, 不仅未使组织器官功能恢复, 反而使缺血所致的组织和代谢障碍及结构破坏进一步加重, 这种现象或病理过程称为缺血再灌注损伤, 又称“二次打击”。

### ■同行评价

本文选题较新,对认识胰腺炎的发病机制具有指导意义。

- pancreatitis: experimental findings and clinical implications. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 130-138
- 12 Halonen KI, Pettilä V, Leppäniemi AK, Kempainen EA, Puolakainen PA, Haapiainen RK. Multiple organ dysfunction associated with severe acute pancreatitis. *Crit Care Med* 2002; 30: 1274-1279
  - 13 宋少伟, 刘永峰. 腺苷A2受体激动剂对大鼠胰腺缺血再灌注损伤时氧自由和细胞凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3099-3102
  - 14 Gnaiger E, Kuznetsov AV, Rieger G, Amberger A, Fuchs A, Stadlmann S, Eberl T, Margreiter R. Mitochondrial defects by intracellular calcium overload versus endothelial cold ischemia/reperfusion injury. *Transpl Int* 2000; 13 Suppl 1: S555-S557
  - 15 Kingsnorth A. Role of cytokines and their inhibitors in acute pancreatitis. *Gut* 1997; 40: 1-4
  - 16 Leindler L, Morschl E, László F, Mándi Y, Takács T, Jármay K, Farkas G. Importance of cytokines, nitric oxide, and apoptosis in the pathological process of necrotizing pancreatitis in rats. *Pancreas* 2004; 29: 157-161
  - 17 吴宝强, 秦锡虎, 江勇. NF- $\kappa$ B在急性胰腺炎发病机制中的作用. *苏州大学学报* 2005; 25: 457-462
  - 18 Furuichi K, Wada T, Iwata Y, Kokubo S, Hara A, Yamahana J, Sugaya T, Iwakura Y, Matsushima K, Asano M, Yokoyama H, Kaneko S. Interleukin-1-dependent sequential chemokine expression and inflammatory cell infiltration in ischemia-reperfusion injury. *Crit Care Med* 2006; 34: 2447-2455
  - 19 任晓葆, 何振平, 段恒春. 急性出血坏死性胰腺炎大鼠血浆内皮素和一氧化氮变化及其意义. *中国危重病急救医学* 1998; 10: 369-370
  - 20 Folch E, Closa D, Prats N, Gelpí E, Roselló-Catafau J. Leukotriene generation and neutrophil infiltration after experimental acute pancreatitis. *Inflammation* 1998; 22: 83-93
  - 21 张成, 栾正刚, 葛春林, 郭仁宣. 磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B信号转导通路在重症急性胰腺炎中性粒细胞活化中的作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1987-1991
  - 22 Uhlmann D, Lauer H, Serr F, Witzigmann H. Pathophysiological role of platelets and platelet system in acute pancreatitis. *Microvasc Res* 2008; 76: 114-123
  - 23 Uhlmann D, Lauer H, Serr F, Ludwig S, Tannapfel A, Fiedler M, Hauss J, Witzigmann H. Pathophysiological role of platelets in acute experimental pancreatitis: influence of endothelin A receptor blockade. *Cell Tissue Res* 2007; 327: 485-492
  - 24 吴云, 陈纪伟. 血小板激活因子对急性胰腺炎血液流变学影响的实验研究. *中华肝胆外科杂志* 2006; 12: 133-134
  - 25 Zhang XP, Zhang J, Song QL, Chen HQ. Mechanism of acute pancreatitis complicated with injury of intestinal mucosa barrier. *J Zhejiang Univ Sci B* 2007; 8: 888-895
  - 26 党胜春, 张建新, 毛正发, 瞿建国, 王旭青, 朱蓓. 血清 IL-2、IL-10及肠黏膜Fas在重症急性胰腺炎大鼠中的动态变化. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3697-3702
  - 27 Flint RS, Phillips AR, Power SE, Dunbar PR, Brown C, Delahunt B, Cooper GJ, Windsor JA. Acute pancreatitis severity is exacerbated by intestinal ischemia-reperfusion conditioned mesenteric lymph. *Surgery* 2008; 143: 404-413
  - 28 McHugh P, Turina M. Apoptosis and necrosis: a review for surgeons. *Surg Infect (Larchmt)* 2006; 7: 53-68
  - 29 Scarabelli TM, Stephanou A, Pasini E, Comini L, Raddino R, Knight RA, Latchman DS. Different signaling pathways induce apoptosis in endothelial cells and cardiac myocytes during ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* 2002; 90: 745-748
  - 30 Warzecha Z, Dembiński A, Ceranowicz P, Dembiński M, Cieszkowski J, Kuśniercz-Cabala B, Naskalski JW, Jaworek J, Konturek SJ, Pawlik WW, Tomaszewska R. Influence of ischemic preconditioning on blood coagulation, fibrinolytic activity and pancreatic repair in the course of caerulein-induced acute pancreatitis in rats. *J Physiol Pharmacol* 2007; 58: 303-319
  - 31 Cosen-Binker LI, Binker MG, Cosen R, Negri G, Tiscornia O. Relaxin prevents the development of severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1558-1568
  - 32 Cosen-Binker LI, Binker MG, Cosen R, Negri G, Tiscornia O. Influence of hydrocortisone, prednisolone, and NO association on the evolution of acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 915-925
  - 33 Ceranowicz P, Warzecha Z, Dembiński A, Stachura J, Dembiński M, Latosiewicz D, Knafel A, Konturek SJ, Pawlik WW. [Protective and therapeutic effect of leptin in acute pancreatitis evoked by ischemia/reperfusion] *Folia Med Cracov* 2003; 44: 93-108
  - 34 Muñoz-Casares FC, Padillo FJ, Briceño J, Collado JA, Muñoz-Castañeda JR, Ortega R, Cruz A, Túnez I, Montilla P, Pera C, Muntané J. Melatonin reduces apoptosis and necrosis induced by ischemia/reperfusion injury of the pancreas. *J Pineal Res* 2006; 40: 195-203
  - 35 von Dobschuetz E, Schmidt R, Scholtes M, Thomusch O, Schwer CI, Geiger KK, Hopt UT, Pannen BH. Protective role of heme oxygenase-1 in pancreatic microcirculatory dysfunction after ischemia/reperfusion in rats. *Pancreas* 2008; 36: 377-384
  - 36 吕新生, 丘氟, 李介秋, 范钦桥, 周日光, 艾宇航, 张开诚, 李宜雄. 低分子量肝素治疗重症急性胰腺炎的多中心前瞻性临床研究. *中华普通外科杂志* 2006; 21: 500-503
  - 37 Ceranowicz P, Dembinski A, Warzecha Z, Dembinski M, Cieszkowski J, Rembisz K, Konturek SJ, Kusniercz-Cabala B, Tomaszewska R, Pawlik WW. Protective and therapeutic effect of heparin in acute pancreatitis. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59 Suppl 4: 103-125
  - 38 Christophi C, Millar I, Nikfarjam M, Muralidharan V, Malcontenti-Wilson C. Hyperbaric oxygen therapy for severe acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 2042-2046

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕



# 游离脂肪酸对肝脏氧化应激及胰岛素抵抗的影响

卢雁, 韩萍, 赵晟, 张咏言, 何冰, 张微

卢雁, 韩萍, 赵晟, 张咏言, 何冰, 张微, 中国医科大学附属盛京医院内分泌科 辽宁省沈阳市 110004

辽宁省教育委员会基金资助项目, No. 20060999

作者贡献分布: 此实验由韩萍完成设计; 研究过程由卢雁操作完成; 数据整理、统计分析由赵晟、张咏言、何冰、卢雁及张微完成; 本论文写作由卢雁完成; 韩萍指导实验并修改文章。

通讯作者: 韩萍, 教授, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院内分泌科. hanping85@hotmail.com  
电话: 024-83955273

收稿日期: 2009-05-16 修回日期: 2009-06-22

接受日期: 2009-06-29 在线出版日期: 2009-08-18

## Effects of free fatty acid elevation on hepatic insulin resistance and hepatic oxidative stress

Yan Lu, Ping Han, Sheng Zhao, Yong-Yan Zhang, Bing He, Wei Zhang

Yan Lu, Ping Han, Sheng Zhao, Yong-Yan Zhang, Bing He, Wei Zhang, Department of Endocrinology, Shengjing Hospital, Affiliated to China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Supported by: the Foundation of Liaoning Educational Committee, No. 20060999

Correspondence to: Ping Han, Department of Endocrinology, Shengjing Hospital, Affiliated to China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. hanping85@hotmail.com

Received: 2009-05-16 Revised: 2009-06-22

Accepted: 2009-06-29 Published online: 2009-08-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the effects of long-term elevation of free fatty acids (FFA) on hepatic insulin resistance and hepatic oxidative stress.

**METHODS:** A total of 32 Wistar rats were divided into two groups and given an intravenous infusion of intralipid plus heparin (IH) and saline (SAL), respectively. Two hours before the end of the infusion, a hyperinsulinemic-euglycemic clamp was performed to examine the ability of FFA to induce hepatic insulin resistance. After the clamp, liver tissue samples were taken to determine the protein carbonyl content by DNPH (2,4-dinitrophenylhydrazine) colorimetry and the content of protein kinase C- $\delta$  by Western blot.

**RESULTS:** Compared to SAL infusion, IH infu-

sion resulted in an increase in plasma FFA level by 4.3 folds ( $P < 0.001$ ), hepatic protein carbonyl content by 3.2 folds, and the membrane/cytosol ratio of PKC- $\delta$  by 4.0 folds ( $P < 0.001$ ).

**CONCLUSION:** Long-term elevation of FFA induces elevation of hepatic protein carbonyl content, PKC- $\delta$  translocation and insulin resistance, suggesting that PKC- $\delta$  plays an important role in FFA-induced hepatic insulin resistance.

**Key Words:** Free fatty acids; Insulin resistance; Glucose infusion rate; Protein carbonyl content; Protein kinase C- $\delta$

Lu Y, Han P, Zhao S, Zhang YY, He B, Zhang W. Effects of free fatty acid elevation on hepatic insulin resistance and hepatic oxidative stress. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(23): 2405-2408

## 摘要

**目的:** 研究游离脂肪酸(FFA)慢性升高对肝脏胰岛素抵抗的影响, 探讨氧化应激在其中的作用。

**方法:** 给Wistar大鼠分别静脉输注脂肪乳加肝素(IH组)和单纯输注生理盐水(SAL组)48 h, 在输注的最后2 h, 清醒状态下行高胰岛素-正血糖钳夹试验, 观察延时输注脂肪乳导致的高FFA对葡萄糖利用率(葡萄糖输注率, GIR)的影响, 并取肝组织测定羰基蛋白、肝细胞膜和胞质PKC- $\delta$ 的含量。

**结果:** 在高胰岛素-正血糖钳夹状态, IH输注组与SAL组比较, 血清FFA增加4.3倍( $P < 0.001$ ), 羰基蛋白增加3.2倍, GIR下降58.6%(均 $P < 0.001$ ); 48 h的IH输注使肝细胞膜的PKC- $\delta$ /胞质PKC- $\delta$ 比值增加4.0倍( $P < 0.001$ )。

**结论:** FFA慢性升高导致了肝脏GIR下降, 葡萄糖的利用障碍, 肝脏的PKC- $\delta$ 向细胞膜转位增加, 说明在慢性高FFA导致的肝脏胰岛素抵抗中, 氧化应激反应起了重要的作用。

**关键词:** 游离脂肪酸; 胰岛素抵抗; 葡萄糖输注率; 羰基蛋白; 蛋白激酶C- $\delta$

## ■背景资料

糖尿病已经成为世界上继肿瘤、心脑血管病之后第3位严重危害人类健康的慢性疾病。我国已成为糖尿病发病的“重灾区”, 目前国内有糖尿病患者近5000万, 是全球糖尿病第2大国。深入了解糖尿病发病机制, 对其进行防治, 意义重大。

## ■同行评议者

洪天配, 教授, 北京大学第三医院内分泌科

## ■ 研发前沿

胰岛素抵抗和胰岛β细胞功能缺陷为2型糖尿病发病的基本病理生理机制。近年来炎症反应及氧化应激在导致胰岛素抵抗和胰岛β细胞功能缺陷方面的作用成为研究热点。

卢雁, 韩萍, 赵晨, 张咏言, 何冰, 张微. 游离脂肪酸对肝脏氧化应激及胰岛素抵抗的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(23): 2405-2408

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2405.asp>

## 0 引言

肝脏胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)在2型糖尿病的发生、发展过程中占重要地位。大量研究显示, 游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)与IR互为因果, 互相促进。Karlsson *et al*研究发现高脂饮食后, 使葡萄糖转运子-4(glucose transporter-4, GluT-4)向质膜转运受阻, 影响外周葡萄糖利用, 导致胰岛素抵抗<sup>[1-2]</sup>; 另外FFA还可影响脂肪细胞分泌的细胞因子如肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )等的表达, 抑制外周组织摄取葡萄糖, 使肝糖产生增加导致IR<sup>[3-4]</sup>。韩萍 *et al*<sup>[5-6]</sup>为小鼠输注脂肪乳7 h, 发现短时间输注脂肪乳造成FFA升高, 已经导致了IR。然而, 对于延时输注多不饱和脂肪酸, FFA慢性升高对胰岛素作用和葡萄糖调节影响的研究还很少, 因此本研究旨在研究48 h FFA持续升高对活体胰岛素作用的影响及脂毒性导致IR的发病机制。

## 1 材料和方法

1.1 材料 健康Wistar大鼠,  $\delta$ , 体质量250-300 g, 在中国医科大学附属盛京医院动物室喂养。接受12 h光照/黑暗周期, 随意进基础饲料及饮水。德国Neker公司BIOSEN 5030快速生化血糖检测仪测定血糖; 胰岛素放免试剂盒购自解放军总院科技开发中心; FFA试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 南京凯基生物科技发展有限公司提供肝细胞膜蛋白和胞质蛋白提取试剂盒; PKC- $\delta$ 特异性pAb购自Santa Cruz Biotechnology, INC。

### 1.2 方法

1.2.1 造模: 大鼠适应实验室环境3-5 d后, 用100 g/L水合氯醛腹腔麻醉, 聚乙烯导管2根, 每根一端接有一段3 cm长的硅胶管(内径0.05 cm)分别置入右颈内静脉至右心房水平用于输液和左颈动脉至主动脉弓水平用于采血, 导管均经皮下从颈背部引出, 然后将导管内充入600 g/L聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和肝素(1000 kU/L), 保持导管通畅。大鼠术后恢复3-4 d进行实验。

1.2.2 分组及给药: 大鼠隔夜禁食12 h, 以随机数字表法分为2组, 每组16只。A组(IH组)脂肪乳(200 g/L)+肝素(20 kU/L)5.5  $\mu$ L/min, 肝素为脂蛋白脂酶的刺激物, 他能使脂肪酸从脂肪乳中释放出来; B组(SAL组)生理盐水5  $\mu$ L/min。每组

再随机分为基础状态亚组和高胰岛素-正血糖钳夹亚组, 各8只。均输注相应液体48 h, 其中后12 h禁食。在钳夹亚组, 经颈静脉导管给大鼠输注IH或SAL 48 h, 但在输液的最后2 h行钳夹试验, 以5 mU/(kg·min)速度输注胰岛素同时输注11.1 mmol/L葡萄糖, 每5 min测血糖1次, 以调整输液速度将血糖浓度维持在5 mmol/L左右; 基础状态亚组仅输注IH或SAL 48 h, 不行钳夹试验。

1.2.3 采血: 所有实验组在输注液体的最后30 min, 每10 min采血1次测葡萄糖、胰岛素、FFA。整个实验每只大鼠基础状态组采血量约3.7 mL, 钳夹试验组约4.5 mL。分离血清备检, 然后将红细胞用肝素盐水按1:1稀释后回输, 保证红细胞压积维持在正常范围。

1.2.4 指标检测: 葡萄糖氧化酶法测定血糖; 放射免疫法测定胰岛素; 比色法测定血清FFA; DNPH比色法测定肝脏羰基蛋白含量<sup>[7-8]</sup>; Western blot方法检测肝细胞膜和细胞质的蛋白激酶C- $\delta$ (protein kinase C- $\delta$ , PKC- $\delta$ )表达, PKC- $\delta$ 特异性pAb, 浓度为1:1000, 胶片显影, 用激光扫描仪测定免疫印迹法获得的条带密度。

**统计学处理** 所有数值用mean $\pm$ SD表示, 对于基础亚组和钳夹亚组的重复数据采用 $t$ 检验比较两组差别, 多组资料间比较采用单向方差分析, 应用SPSS12.0软件进行的数据统计,  $P<0.05$ 表示有统计学意义。

## 2 结果

2.1 2组血清葡萄糖、FFA及胰岛素水平 基础状态IH组的FFA、胰岛素较SAL组增加了1.83倍和1.40倍, 葡萄糖水平升高了0.85 mmol/L; 钳夹状态下IH组较SAL组的血清FFA增高4.3倍( $P<0.001$ ), 2组血糖均稳定在5.1 mmol/L左右(表1)。

2.2 2组葡萄糖输注率(glucose infusion rate, GIR) IH亚组的GIR为3.65 $\pm$ 0.41 mg/(kg·min), SAL亚组的GIR为9.3 $\pm$ 1.09 mg/(kg·min), 明显高于IH组( $P<0.001$ , 图1), 2组高胰岛素-正血糖钳夹试验各时间点的GIR见图2。

2.3 2组羰基蛋白含量 测定每毫克肝脏蛋白中羰基含量, IH组为7.56 $\pm$ 0.82 nmol, SAL组为2.36 $\pm$ 0.54 nmol( $P<0.001$ ), 升高了3.2倍(图1)。

2.4 细胞膜与细胞质PKC- $\delta$ 值 SAL组和IH组大鼠肝细胞膜与细胞质PKC- $\delta$ 值分别为55.12 $\pm$ 2.37, 49.37 $\pm$ 1.96; 99.48 $\pm$ 4.52, 21.64 $\pm$ 0.83; 盐水组与脂肪乳组肝细胞膜PKC- $\delta$ /胞质PKC- $\delta$ 比

## ■ 相关报道

Delarue *et al*发现血浆游离脂肪酸的升高, 使脂质异位沉积, 造成肌肉、肝脏、脂肪的胰岛素抵抗, 现在普遍认为脂质代谢紊乱和血浆游离脂肪酸水平的长期提高是2型糖尿病发展中最先出现的事件和中心环节。

表 1 两组血清葡萄糖、FFA及胰岛素比较 (mean ± SD, n = 8)

分组	葡萄糖(mmol/L)	胰岛素(pmol/L)	FFA(mmol/L)
基础状态			
SAL组	5.08 ± 0.17	19.26 ± 2.37	28.29 ± 1.78
IH组	5.93 ± 0.44 <sup>a</sup>	26.95 ± 2.88 <sup>b</sup>	51.63 ± 2.05 <sup>b</sup>
钳夹状态			
SAL组	5.02 ± 0.22	56.80 ± 3.28	21.71 ± 1.31
IH组	5.10 ± 0.12	77.80 ± 4.93 <sup>b</sup>	43.44 ± 2.37 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 同一状态SAL组.

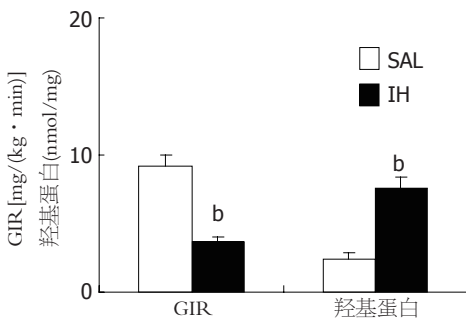


图 1 SAL和IH组稳态GIR和羧基蛋白的比较. <sup>b</sup>P<0.001.

值分别为1.12, 4.60(P<0.001, 图3).

### 3 讨论

肥胖患者, 尤其是腹型肥胖, 存在着脂肪分解活跃, 脂肪细胞的FFA释放入血增多, 导致高FFA血症<sup>[9]</sup>, 甘油三酯转运障碍, 过多的FFA可通过多种途径导致IR的发生. 肝脏是调节血糖的重要器官, 脂肪在肝细胞沉积, 肝脏对脂肪酸的β-氧化能力下降, 极低密度脂蛋白合成分泌减少, 以及高FFA使胞质内长链脂肪酸辅酶A(lithocholic acid-coenzyme A, LCA-CoA)水平升高, 升高的LCA-CoA使丙二酰CoA对肉毒碱脂酰转移酶-1(carnitine palmitoyltransferase-1, CPT-1)的抑制作用减弱, 肝内FFA的氧化作用增强, 糖异生酶活性升高, 引起肝糖异生和肝糖输出增加<sup>[10]</sup>. 高脂饮食制作的IR动物模型, 由于在长期高脂喂养过程中大鼠代偿性增加胃肠激素如抑胃肽<sup>[11]</sup>等因素, 难以保证实验动物的血脂浓度, 影响高脂所致的胰岛素抵抗模型的稳定性. 本实验模型是直接静脉输注脂肪乳, 导致内源性FFA升高, 同时保证稳定的FFA浓度, 比较直接的观察FFA对胰岛素作用的影响. 既往的研究证明FFA对葡萄糖的抑制作用呈现时间<sup>[12]</sup>和浓度<sup>[13]</sup>依赖性, 7 h输注脂肪乳造成急性脂毒

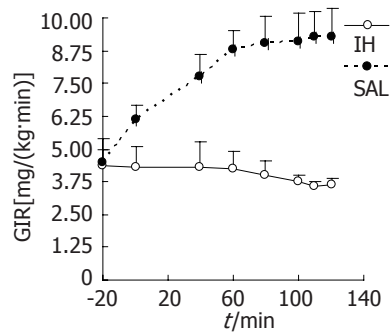


图 2 2组高胰岛素-正血糖钳夹试验各时间点GIR的比较.

**■创新盘点**  
此研究直接静脉输注脂肪乳48 h, 导致内源性FFA慢性升高, 同时保证稳定的游离脂肪酸浓度, 比较直接的观察FFA对胰岛素作用的影响; 另外发现慢性脂毒性诱发了氧化应激, 肝脏的胰岛素抵抗与PKC-δ转位有关.

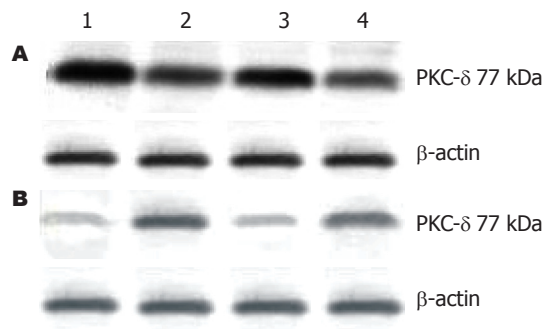


图 3 2组细胞膜与细胞质PKC-δ蛋白表达. A: 细胞膜; B: 细胞质; 1、3: IH组; 2、4: SAL组.

性, 而48 h输注脂肪乳则更好的模拟了长期内源性、慢性脂毒性对IR的影响.

本实验研究结果表明, 48 h输注脂肪乳显著地增加了FFA水平, 同时循环胰岛素水平也升高, 说明FFA增加了内源胰岛素的分泌, 钳夹状态的血清FFA水平低于其基础状态水平, 可能是由于高浓度胰岛素输注抑制了FFA从脂肪组织中释放, 并增加了FFA脂化的缘故. 两组钳夹亚组的血清葡萄糖维持在相对恒定水平, 说明高胰岛素-正血糖试验成功, IH组的GIR低于SAL组, 说明48 h输注脂肪乳造成了IR. 而且其降低程度要高于我们以往7 h输注脂肪乳的动物模型<sup>[5]</sup>, 说明长时间的高FFA血症可导致更严重的胰岛素抵抗.

本实验结果发现肝脏羧基蛋白含量在IH输注组显著高于SAL输注组, 而羧基蛋白的增高是氧化应激增强的标志<sup>[14]</sup>, 因此证明高FFA导致了肝脏组织的氧化应激增强. 许多研究显示FFA可以激活尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH), 从而产生大量活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)导致IR<sup>[15]</sup>, 而PKC同工酶的激活又反过来促发了FFA诱导的IR. PKC-δ的激活表现为从胞质到胞膜的转位<sup>[16]</sup>, 激活的PKC-δ可以使胰岛素受体和胰岛素受体底物-1(insulin receptor substrate 1, IRS-1)进行Ser/Thr磷酸化,

**■应用要点**  
本研究提示48 h输注脂肪乳诱发了氧化应激, 造成的肝脏胰岛素抵抗与PKC-δ转位有关, 因此推测采取降低PKC-δ水平的治疗手段, 可用于防治FFA造成的氧化损伤及胰岛素抵抗.



### ■名词解释

胰岛素抵抗: 体内周围组织对胰岛素的敏感性降低, 组织对胰岛素不敏感, 肝脏、肌肉、脂肪对胰岛素促进葡萄糖摄取的作用发生了抵抗。

使胰岛素受体和IRS-1的酪氨酸磷酸化降低, 导致葡萄糖摄取或糖原合成下降, 使胰岛素作用障碍, 而致胰岛素抵抗<sup>[17]</sup>。本实验结果显示48 h的脂肪乳输注诱发了PKC- $\delta$ 从肝脏细胞质到细胞膜的转位, 说明慢性脂毒性诱发了氧化应激, 肝脏IR与PKC- $\delta$ 转位有关。

总之, 本实验证实: 48 h输注脂肪乳造成的慢性FFA升高, 可引起IR, PKC- $\delta$ 的激活与肝脏胰岛素抵抗相关。推测采取降低PKC- $\delta$ 水平的治疗手段, 可用于防治FFA造成的氧化损伤及IR<sup>[12]</sup>。

### 4 参考文献

- Karlsson HK, Chibalin AV, Koistinen HA, Yang J, Koumanov F, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR, Holman GD. Kinetics of GLUT4 trafficking in rat and human skeletal muscle. *Diabetes* 2009; 58: 847-854
- Agati JM, Yeagley D, Quinn PG. Assessment of the roles of mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase B, and protein kinase C in insulin inhibition of cAMP-induced phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription. *J Biol Chem* 1998; 273: 18751-18759
- Rashid S, Watanabe T, Sakaue T, Lewis GF. Mechanisms of HDL lowering in insulin resistant, hypertriglyceridemic states: the combined effect of HDL triglyceride enrichment and elevated hepatic lipase activity. *Clin Biochem* 2003; 36: 421-429
- 张亚文, 丁德民. 游离脂肪酸与胰岛素抵抗. 天津医科大学学报 2004; 10: 144-146
- 韩萍, 张咏言, 卢雁, 何冰, 张微, 夏菲. 不同种类游离脂肪酸对大鼠胰岛素抵抗的影响. 中华内分泌代谢杂志 2007; 23: 16-19
- Park E, Wong V, Guan X, Oprescu AI, Giacca A. Salicylate prevents hepatic insulin resistance caused by short-term elevation of free fatty acids in vivo. *J Endocrinol* 2007; 195: 323-331
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltil S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990; 186: 464-478
- 段丽菊, 刘英帅, 朱燕, 杨旭. DNPH比色法: 一种简单的蛋白质羰基含量测定方法. 毒理学杂志 2005; 19:

- 320-322
- Yoshii H, Lam TK, Gupta N, Goh T, Haber CA, Uchino H, Kim TT, Chong VZ, Shah K, Fantus IG, Mari A, Kawamori R, Giacca A. Effects of portal free fatty acid elevation on insulin clearance and hepatic glucose flux. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 290: E1089-E1097
- Lam TK, Yoshii H, Haber CA, Bogdanovic E, Lam L, Fantus IG, Giacca A. Free fatty acid-induced hepatic insulin resistance: a potential role for protein kinase C-delta. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283: E682-E691
- Getty-Kaushik L, Song DH, Boylan MO, Corkey BE, Wolfe MM. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide modulates adipocyte lipolysis and reesterification. *Obesity (Silver Spring)* 2006; 14: 1124-1131
- Maffei C, Manfredi R, Trombetta M, Sordelli S, Storti M, Benuzzi T, Bonadonna RC. Insulin sensitivity is correlated with subcutaneous but not visceral body fat in overweight and obese prepubertal children. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 2122-2128
- Qin S, Li L, Yang GY, Li RZ, Li K, Qi XY, Li SB, Chen WW, Liu H, Tang Y, Boden G. [Effects of visfatin gene overexpression on insulin sensitivity in the insulin-resistant rats induced by high-fat diet] *Zhonghua Yixue Zazhi* 2008; 88: 365-368
- Wang Q, Zhao X, He S, Liu Y, An M, Ji J. Differential Proteomics Analysis of Specific Carbonylated Proteins in the Temporal Cortex of Aged Rats: The Deterioration of Antioxidant System. *Neurochem Res* 2009 Jun 28 [Epub ahead of print]
- Lamb RE, Goldstein BJ. Modulating an oxidative-inflammatory cascade: potential new treatment strategy for improving glucose metabolism, insulin resistance, and vascular function. *Int J Clin Pract* 2008; 62: 1087-1095
- Tapia JA, García-Marin LJ, Jensen RT. Cholecystokinin-stimulated protein kinase C-delta kinase activation, tyrosine phosphorylation, and translocation are mediated by Src tyrosine kinases in pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 35220-35230
- Greene MW, Morrice N, Garofalo RS, Roth RA. Modulation of human insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by protein kinase Cdelta. *Biochem J* 2004; 378: 105-116

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

### • 消息 •

## 中国科技期刊引证报告(核心版)发布《世界华人消化杂志》 2007年影响因子0.568

本刊讯 2007年《世界华人消化杂志》的总被引频次为2353, 位居全部1723种中国科技论文统计源期刊的第86位, 内科医学类28中期刊的第5位。2007年《世界华人消化杂志》的影响因子为0.568, 内科医学类28中期刊的第15位。即年指标0.082, 他引率0.69, 引用刊数372种, 扩散因子15.81, 学科影响指标0.54。(编辑: 程剑侠 2009-08-18)

## Bcl-2、Bax蛋白表达在非酒精性脂肪性肝病中的作用

赵和平, 解燕茹

赵和平, 解燕茹, 山西医科大学第一医院综合科 山西省太原市 030001

作者贡献分布: 此课题由赵和平与解燕茹设计; 研究过程由解燕茹操作完成; 本论文写作、数据分析由解燕茹与赵和平完成。

通讯作者: 赵和平, 教授, 030001, 山西省太原市, 山西医科大学第一医院综合科, zhpyx168@126.com

电话: 0351-4639468

收稿日期: 2009-05-11 修回日期: 2009-07-28

接受日期: 2009-08-03 在线出版日期: 2009-08-18

### Expression of Bcl-2 and Bax in hepatocytes in nonalcoholic fatty liver disease

He-Ping Zhao, Yan-Ru Xie

He-Ping Zhao, Yan-Ru Xie, General Department, the First Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Correspondence to: Professor He-Ping Zhao, General Department, the First Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. zhpyx168@126.com

Received: 2009-05-11 Revised: 2009-07-28

Accepted: 2009-08-03 Published online: 2009-08-18

### Abstract

**AIM:** To investigate the role of apoptosis-regulated proteins Bcl-2 and Bax in the progression of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats.

**METHODS:** An experimental rat model of NAFLD was established by feeding rats a fat-rich diet (NAFLD group). Control animals were fed a standard diet (control group). Hepatic steatosis, inflammation and fibrosis were graded by routine HE staining of liver sections. The expression levels of Bcl-2 and Bax proteins in the liver were determined by Western blot.

**RESULTS:** The NAFLD model rats exhibited mild steatosis at week 4, simple fatty liver at week 8, and severe steatohepatitis with fibrosis at week 12. Western blot analysis showed that hepatic expression of Bax protein in the NAFLD group was more pronounced from week 4, and continued to rise at weeks 8 and 12 when compared with the control group ( $0.61 \pm 0.03$ ,  $0.78 \pm 0.03$  and  $1.02 \pm 0.03$  vs  $0.51 \pm 0.03$ , respectively; all  $P < 0.01$ ), while the expression of Bcl-2 de-

creased with the progression of fatty liver ( $0.39 \pm 0.01$ ,  $0.28 \pm 0.01$  and  $0.15 \pm 0.01$  vs  $0.52 \pm 0.01$ , respectively; all  $P < 0.01$ ). Bcl-2/Bax ratio in the NAFLD group decreased in a time-dependent manner, particularly prominent at week 12.

**CONCLUSION:** NAFLD may cause increased hepatic expression of Bax but decreased expression of Bcl-2, and the decrease in Bcl-2/Bax ratio may accelerate hepatocyte apoptosis.

**Key Words:** Nonalcoholic fatty liver disease; Apoptosis; Bcl-2; Bax

Zhao HP, Xie YR. Expression of Bcl-2 and Bax in hepatocytes in nonalcoholic fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(23): 2409-2412

### 摘要

**目的:** 探讨凋亡调控蛋白Bcl-2、Bax表达在大鼠非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)中的作用。

**方法:** 采用高脂饮食建立大鼠NAFLD模型, 以正常饮食设立对照组。HE染色观察肝脏脂肪变、炎症活动和纤维化程度, 采用Western blot检测Bcl-2、Bax在肝脏组织中的表达。

**结果:** 实验组大鼠4 wk可见轻度脂肪变, 8 wk呈单纯性脂肪肝改变, 至12 wk肝小叶内肝细胞弥漫性脂肪变, 伴大量炎性细胞浸润, 个别出现肝纤维化。Western blot结果显示, 实验组大鼠4、8、12 wk肝组织Bax蛋白表达显著高于对照组( $0.61 \pm 0.03$ ,  $0.78 \pm 0.03$ ,  $1.02 \pm 0.03$  vs  $0.51 \pm 0.03$ , 均 $P < 0.01$ ), Bcl-2蛋白随着造模时间的延长, 表达逐渐下降( $0.39 \pm 0.01$ ,  $0.28 \pm 0.01$ ,  $0.15 \pm 0.01$  vs  $0.52 \pm 0.01$ , 均 $P < 0.01$ ), Bcl-2、Bax两者比率逐渐降低, 尤以12 wk降低明显。

**结论:** 在NAFLD发生过程中, 细胞凋亡调节蛋白Bax表达上调, Bcl-2表达减少, 二者表达的相对比例发生异常。这可能是NAFLD中肝细胞发生凋亡的重要原因之一。

**关键词:** 非酒精性脂肪性肝病; 细胞凋亡; Bcl-2; Bax

### 背景资料

目前在非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的发病机制中, Day *et al* 提出的“二次打击”学说得到普遍公认, 然而随着对凋亡的研究, 不断有证据表明在NAFLD中, 肝细胞凋亡起着重要作用, 亦可能是NAFLD发生及进展的关键因素。

### 同行评议者

黄恒青, 主任医师, 福建省第二人民医院消化内科

## ■研发前沿

肝细胞凋亡及相关调节因素在NAFLD发病及其进展中的作用是目前NAFLD研究的热点之一。

赵和平, 解燕茹. Bcl-2、Bax蛋白表达在非酒精性脂肪性肝病中的作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(23): 2409-2412  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2409.asp

## 0 引言

目前在非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)的发病机制中, Day *et al*<sup>[1]</sup>提出的“二次打击”学说得到普遍公认. 然而近年来随着对凋亡的研究, 不断有证据表明在NAFLD中, 肝细胞凋亡可能是单纯非酒精性脂肪肝发展为非酒精性脂肪性肝炎“二次打击”理论的关键步骤, 也是该过程的重要标志<sup>[2]</sup>, 与炎症程度和纤维化进展相关. 细胞凋亡受多种凋亡基因调控, 其中Bcl-2家族成员在细胞凋亡的基因调控过程中起着至关重要的作用<sup>[3]</sup>, 尤其这一家族的两个代表性成员Bcl-2和Bax, 分别是凋亡抑制和促进因子, 两者的比率Bcl-2/Bax是调控细胞死亡的“可变电阻器”<sup>[4]</sup>. 本研究以高脂饮食构建非酒精性脂肪肝大鼠模型, 以探讨Bcl-2、Bax蛋白表达与NAFLD进展的关系.

## 1 材料和方法

1.1 材料 健康♂清洁级Wistar大鼠40只, 体质量180-220 g, 购自河北医科大学. 鼠抗人Bcl-2、Bax、 $\beta$ -actin mAb以及辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠多克隆抗体购于Santa Cruz公司.

### 1.2 方法

1.2.1 造模与采集标本: 正常喂养1 wk后, 按体质量层次随机分为正常对照组(10只)、实验组(30只). 正常组以普通饲料喂养, 实验组以85%普通饲料+13%猪油+2%胆固醇<sup>[5]</sup>喂养, 胆固醇购自成都科龙化工试剂厂. 实验动物自由进食和饮水, 于实验第4、8、12周末分别处死10只模型组大鼠, 正常组在实验第12周末处死, 留取血清和肝组织标本. 部分肝组织经40 g/L甲醛固定, 备做病理切片, 其余肝组织-70℃冰箱冻存, 以备蛋白提取.

1.2.2 血清标本的检测和肝组织病理观察: 将采集的全血用低温离心机迅速分离血清, 以全自动生化分析仪(Olympus Au1000)测定血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG). 光镜下观察肝组织学变化, 参照《非酒精性脂肪性肝病诊疗指南》<sup>[6]</sup>及2001年《病毒性肝炎防治方案》<sup>[7]</sup>, 肝脂肪变分为4度(F0-4), 炎症活动度分为3级(G0-3), 肝纤维化分为4期(S0-4).

1.2.3 检测Bcl-2、Bax蛋白表达和激活水平: 从深低温冰箱中取出冻存的肝组织经RIPA液裂解后, 15 000 g离心10 min, 弃沉淀, 收集上清液用Bradford法测定总蛋白含量. 加样蛋白含量100  $\mu$ g经10% SDS-PAGE电泳分离, 4℃条件下经3-4 h将蛋白电转移至硝酸纤维素膜, 置膜于含50 g/L脱脂奶粉中(TBST缓冲液稀释)封闭1 h, 分别加入特异性鼠抗人Bcl-2、Bax mAb(1:500稀释)、鼠抗人 $\beta$ -actin mAb以及辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠多克隆抗体(1:5000稀释)进行免疫反应, 以增强化学发光显色系统显色, 超敏胶片曝光, 以 $\beta$ -actin为内参照.

统计学处理 采用SPSS13.0软件进行分析, 计量资料用mean $\pm$ SD表示, 采用方差分析和LSD-*t*检验,  $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

2.1 大鼠血清中ALT、AST、TC、TG水平和肝组织学病理 正常组大鼠血清ALT、AST、TC、TG均无异常, 肝组织学表现为肝小叶结构完整, 肝细胞呈多边形围绕中央静脉呈放射状分布, 大小一致. 与正常对照组相比, 模型组大鼠第4周起血清转氨酶(ALT、AST)血脂(TC、TG)开始增加( $P<0.05$ ), 肝组织显示散在肝细胞轻度脂肪变, 个别细胞内可见大泡性脂肪滴, 但肝小叶形态完整, 汇管区界限清楚, 无明显炎性细胞浸润, 无纤维化(F0, G0-1, S0); 随着造模时间的延长, 至实验第8、12周大鼠血清中转氨酶、血脂含量较正常对照组明显升高( $P<0.05$ 或0.01, 表1). 实验组8 wk大鼠肝组织病理均呈现单纯性脂肪肝, 肝脂肪变以大泡性为主, 肝腺泡3区病变最重, 肝小叶结构紊乱(F2, G2, S1); 至12 wk大鼠肝脏均见肝小叶内肝细胞弥漫性脂肪变, 大泡性与小泡性均存在, 大部分肝细胞肿胀, 胞质疏松呈气球样改变, 同时小叶内见局灶性肝细胞坏死, 有明显淋巴细胞浸润, 伴纤维化(F3-4, G3, S2)(图1).

2.2 Bcl-2、Bax蛋白表达 正常对照组大鼠肝组织均表达一定量的Bcl-2(0.52 $\pm$ 0.01)、Bax(0.51 $\pm$ 0.03)蛋白, 且二者比值(1.03 $\pm$ 0.06)保持平衡, 随着造模时间的延长, 实验组大鼠Bcl-2蛋白表达量较正常组逐渐减少(分别为0.39 $\pm$ 0.01, 0.28 $\pm$ 0.01, 0.15 $\pm$ 0.01,  $P<0.01$ ), Bax蛋白表达逐渐增多(分别为0.61 $\pm$ 0.03, 0.78 $\pm$ 0.03, 1.02 $\pm$ 0.03,  $P<0.01$ ), Bcl-2/Bax逐渐下降分别为(0.64 $\pm$ 0.03, 0.36 $\pm$ 0.02, 0.14 $\pm$ 0.01),

## ■创新盘点

目前Bcl-2家族在肿瘤领域研究较多, 其中2个代表性成员Bcl-2、Bax作为肿瘤临床预后标志物已得到肯定, 然而其在肿瘤以外领域, 尤其在NAFLD中研究不多.



表 1 各组大鼠血清标本转氨酶、血脂变化 (mean ± SD)

分组	ALT(U/L)	AST(U/L)	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)
正常对照组	42 ± 8	132 ± 23	1.88 ± 0.11	0.61 ± 0.07
实验组				
4 wk	56 ± 8 <sup>a</sup>	162 ± 26 <sup>a</sup>	2.24 ± 0.28 <sup>a</sup>	0.65 ± 0.06 <sup>a</sup>
8 wk	89 ± 43 <sup>a</sup>	200 ± 47 <sup>a</sup>	2.83 ± 0.51 <sup>a</sup>	0.76 ± 0.07 <sup>a</sup>
12 wk	101 ± 17 <sup>b</sup>	232 ± 23 <sup>b</sup>	3.60 ± 0.57 <sup>b</sup>	0.87 ± 0.06 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常组.

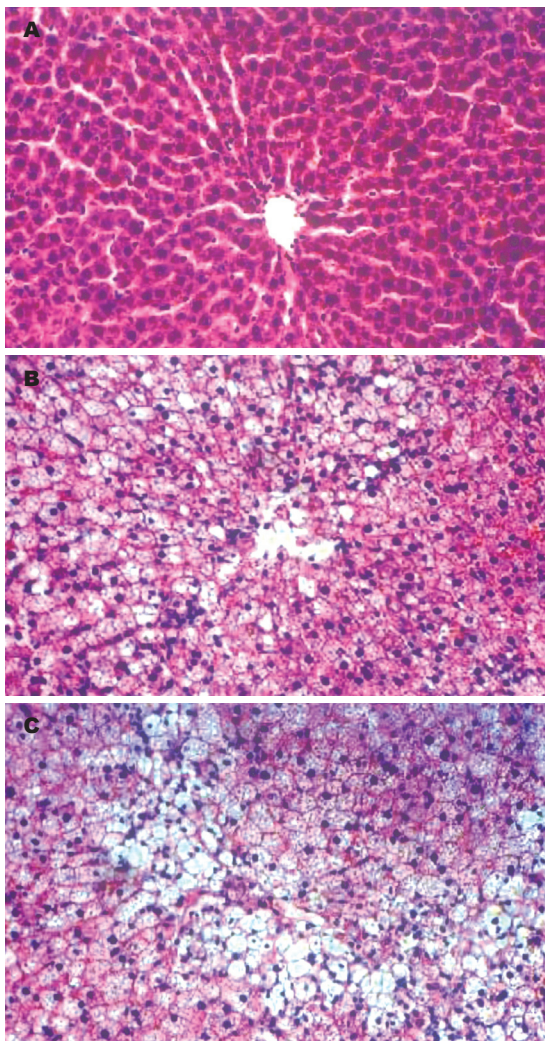


图 1 各组大鼠肝脏组织病理学改变(HE × 300). A: 正常对照组; B: 实验组8 wk; C: 实验组12 wk.

尤以12 wk降低明显( $P < 0.01$ , 图2).

### 3 讨论

NAFLD已成为临床普遍关注的热点, 其所导致的肝组织损伤机制仍未明确. 近年来不断有研究发现: 肝细胞凋亡是连接肝损伤与炎症、纤维化的纽带, 与NAFLD的发生进展密切相关. 本实验采用高脂饮食成功诱导NAFLD大鼠模型,

### ■应用要点

本文通过研究细胞凋亡调控蛋白Bcl-2、Bax表达与NAFLD进展的关系, 以期对其发病机制有新的认识, 为进一步探讨抗凋亡治疗对延缓NAFLD发生及进展的作用奠定理论基础.

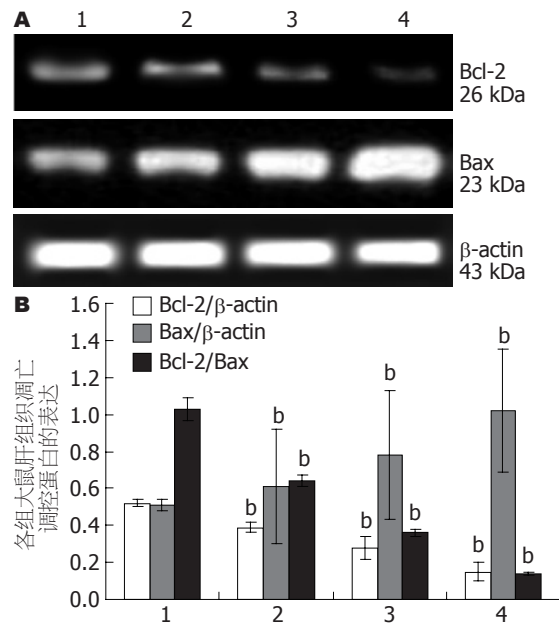


图 2 各组大鼠肝组织Bcl-2、Bax蛋白表达. 1: 正常组; 2: 模型组4 wk; 3: 模型组8 wk; 4: 模型组12 wk; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常组.

表现为血清ALT、AST、TC、TG升高, 肝组织学上有肝细胞脂肪变、坏死、炎症细胞浸润或伴有肝纤维化, 且随着造模时间的延长肝损伤呈进行性加重.

细胞凋亡是指为维持内环境稳定, 由基因控制的机体正常细胞在受到生理和病理性刺激后出现的一种自发的死亡过程, 其中存在Fas/Fas-L介导的死亡受体通路<sup>[8-9]</sup>和Bcl-2家族调节的线粒体通路<sup>[10]</sup>. 近年来研究表明, Bcl-2家族成员的构成比例是上述两种凋亡通路的核心机制之一, 尤其这一家族的2个代表性成员Bax和Bcl-2, 是目前公认的哺乳动物细胞凋亡过程中的正、负调控剂. 正常情况Bax位于胞质, 在凋亡信号诱导下, 胞质内的Bax接到死亡信息其构象发生改变, 由胞质移位并插入到线粒体膜中, 并在此形成微孔结构的低聚物Bax-Bax同源二聚体, 开启线粒体通透性转换

### 同行评价

本研究方法合理, 结论科学, 具有一定的学术价值.

孔引起线粒体跨膜电位下降和细胞色素C的释放, 细胞色素C与凋亡蛋白活化因子-1(apoptosis protein-activating factor-1, Apaf-1)、dATP及caspase-9前体结合形成凋亡小体而发生凋亡<sup>[11-13]</sup>. 凋亡的肝细胞可招致炎症细胞聚集, 库普弗细胞吞噬凋亡小体而活化, 释放大量细胞因子, 如肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ 、白介素-1(interleukin-1, IL-1)和转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )等, 进一步激活肝星状细胞促进肝纤维化发生. 而Bcl-2存在于线粒体外膜, 其表达可竞争性地与Bax蛋白结合, 形成比Bax-Bax同源二聚体更稳定的Bax-Bcl-2异源二聚体, 从而“中和”Bax-Bax诱导凋亡的作用, 终止NAFLD中肝细胞凋亡的发生. Oltvai *et al*<sup>[14]</sup>认为, 决定细胞命运的关键因素是抑制与促进二者间的比率, Bcl-2、Bax分别是凋亡抑制和促进因子, 其比值与细胞凋亡的发生直接相关, 当Bax蛋白占优势时细胞凋亡, 反之, Bcl-2蛋白占优势时则细胞存活<sup>[15]</sup>. 因此有学者将Bcl-2和Bax的比值称作“凋亡开关”<sup>[16]</sup>.

本实验通过Western Blot方法动态检测肝组织中Bax与Bcl-2蛋白表达, 发现Bax、Bcl-2作为线粒体凋亡途径的重要调节蛋白, 在正常对照组大鼠肝组织中两者均表达, 且二者比值保持平衡, 而实验组NAFLD大鼠肝组织中Bax的表达较正常组增加, 并随着脂肪性变程度加重表达逐渐增多, Bcl-2的表达则随着造模时间的延长逐渐减少, Bcl-2/Bax二者比值逐渐下降, 由此可推测Bcl-2、Bax比例失调可能是NAFLD中肝细胞损伤发生凋亡的重要原因之一<sup>[3]</sup>, 提示上调Bcl-2蛋白的表达, 下调Bax蛋白, 增加Bcl-2/Bax二者的比值可能对阻止NAFLD的发生与进展具有重要意义.

### 4 参考文献

- Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845
- Wieckowska A, Zein NN, Yerian LM, Lopez AR, McCullough AJ, Feldstein AE. In vivo assessment

- of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2006; 44: 27-33
- Tsukahara S, Yamamoto S, Tin-Tin-Win-Shwe, Ahmed S, Kunugita N, Arashidani K, Fujimaki H. Inhalation of low-level formaldehyde increases the Bcl-2/Bax expression ratio in the hippocampus of immunologically sensitized mice. *Neuroimmunomodulation* 2006; 13: 63-68
- Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE, Oltvai ZN. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* 1993; 4: 327-332
- 戴林, 邓彬, 白成, 于洪波, 李爱萍. 吡格列酮对大鼠非酒精性脂肪性肝炎干预的实验研究. *胃肠病学和肝病学杂志* 2004; 13: 482-484
- 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断标准. *中华肝脏病杂志* 2003; 11: 72
- 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. *中华内科杂志* 2001; 40: 62-68
- Harper N, Hughes M, MacFarlane M, Cohen GM. Fas-associated death domain protein and caspase-8 are not recruited to the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex during tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2003; 278: 25534-25541
- Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci* 2002; 65: 166-176
- Baskin-Bey ES, Gores GJ. Death by association: BH3 domain-only proteins and liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G987-90
- Debatin KM. Chronic lymphocytic leukemia: keeping cell death at bay. *Cell* 2007; 129: 853-855
- Wong CK, Chen Z, So KL, Li D, Li P. Polycomb group protein RING1B is a direct substrate of Caspases-3 and -9. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773: 844-852
- Bao Q, Lu W, Rabinowitz JD, Shi Y. Calcium blocks formation of apoptosome by preventing nucleotide exchange in Apaf-1. *Mol Cell* 2007; 25: 181-192
- Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609-619
- Rogério F, Jordão H Jr, Vieira AS, Maria CC, Santos de Rezende AC, Pereira GA, Langone F. Bax and Bcl-2 expression and TUNEL labeling in lumbar enlargement of neonatal rats after sciatic axotomy and melatonin treatment. *Brain Res* 2006; 1112: 80-90
- Higuchi M, Aggarwal BB, Yeh ET. Activation of CPP32-like protease in tumor necrosis factor-induced apoptosis is dependent on mitochondrial function. *J Clin Invest* 1997; 99: 1751-1758

编辑 李军亮 电编 何基才

# 吲哚乙酸联合辣根过氧化物酶对人SACC-2细胞的抑制作用

吕继连, 高宁, 李方, 何巍, 尚君兰

吕继连, 高宁, 李方, 何巍, 尚君兰, 郑州大学第一附属医院  
口腔颌面外科 河南省郑州市 450052

**作者贡献分布:** 吕继连与何巍对此文所作贡献均等; 此课题由吕继连、高宁及何巍设计; 研究过程由吕继连操作完成; 研究经费及分析工具由何巍提供; 数据分析由高宁、李方及尚君兰完成; 本论文写作由吕继连、高宁及尚君兰完成。

**通讯作者:** 尚君兰, 副主任医师, 450052, 河南省郑州市建设东路1号, 郑州大学第一附属医院口腔颌面外科。

nanyangzhang1@sina.com

电话: 0371-66862252

收稿日期: 2009-06-09 修回日期: 2009-07-30

接受日期: 2009-08-03 在线出版日期: 2009-08-18

## Combined use of indole-3-acetic acid and horseradish peroxidase inhibits the growth of human adenoid cystic carcinoma SACC-2 cells

Ji-Lian Lv, Ning Gao, Fang Li, Wei He, Jun-Lan Shang

Ji-Lian Lv, Ning Gao, Fang Li, Wei He, Jun-Lan Shang, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Jun-Lan Shang, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 1 Jianshe Eastern Road, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. nanyangzhang1@sina.com  
Received: 2009-06-09 Revised: 2009-07-30  
Accepted: 2009-08-03 Published online: 2009-08-18

### Abstract

**AIM:** To investigate the effects of combined use of indole-3-acetic (IAA) and horseradish peroxidase (HRP) on the growth of human adenoid cystic carcinoma SACC-2 cells *in vitro*.

**METHODS:** After HRP (1.2 mg/L) and IAA at different concentrations (20, 40, 60, 80 and 100  $\mu\text{mol/L}$ ) were co-incubated with SACC-2 cells for 48 h, the changes in cell morphology were observed under light microscopy, the growth inhibition rate was measured by the CCK-8 assay, and the expression level of caspase-3 mRNA was determined by semiquantitative RT-PCR.

**RESULTS:** Compared with negative control cells, cells incubated with IAA/HRP underwent

shrinkage, became small and round, and showed significant vacuole formation. The growth inhibition rates achieved in cells incubated with HRP (1.2 mg/L) and IAA at 40, 60, 80 and 100  $\mu\text{mol/L}$  were significantly higher than that in control cells (31.8%, 38.71%, 60.57% and 80.18% *vs* 0%, respectively; all  $P < 0.05$ ). Combined use of HRP (1.2 mg/L) and IAA at 60 and 100  $\mu\text{mol/L}$  could significantly upregulate the expression of caspase-3 mRNA when compared to control cells ( $0.835 \pm 0.019$  and  $1.667 \pm 0.022$  *vs*  $0.242 \pm 0.025$ , respectively; both  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Combined use of IAA and HRP is able to significantly inhibit the growth of SACC-2 cells *in vitro* perhaps through upregulation of caspase-3 mRNA expression to induce cell apoptosis.

**Key Words:** Indole-3-acetic acid; Horseradish peroxidase; SACC-2 cells; Growth inhibition; CCK-8

Lv JL, Gao N, Li F, He W, Shang JL. Combined use of indole-3-acetic acid and horseradish peroxidase inhibits the growth of human adenoid cystic carcinoma SACC-2 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(23): 2413-2416

### 摘要

**目的:** 探讨吲哚乙酸(IAA)与辣根过氧化物酶(HRP)在体外共同作用对人涎腺腺样囊性癌细胞SACC-2生长抑制的影响。

**方法:** 用不同浓度的IAA/HRP(IAA 20、40、60、80、100  $\mu\text{mol/L}$ +HRP 1.2 mg/L)与SACC-2细胞共同培养48 h后, 光镜下观察癌细胞的生长; CCK-8法测定细胞生长抑制率; 半定量RT-PCR技术检测caspase-3 mRNA水平。

**结果:** 与阴性对照组比较, 48 h后 SACC-2细胞皱缩, 变小变圆, 空泡明显; 40、60、80、100  $\mu\text{mol/L}$  IAA组的细胞生长抑制率明显增高(31.8%, 38.71%, 60.57%, 80.18%, 均 $P < 0.05$ ); 半定量RT-PCR结果显示, 60、100  $\mu\text{mol/L}$  IAA与1.2 mg/L HRP联合作用可上调caspase-3 mRNA水平( $0.835 \pm 0.019$ ,  $1.667 \pm 0.022$  *vs*

### ■背景资料

涎腺腺样囊性癌是最常见的口腔颌面部恶性肿瘤之一, 严重的威胁了患者的健康。近年来的研究证实, 吲哚乙酸(IAA)被辣根过氧化物酶(HRP)氧化后会产生细胞毒性, 可作为一种新的肿瘤治疗药物。通过对其作用机制的探讨, 有望寻找到治疗涎腺腺样囊性癌分子靶点。

### ■同行评议者

王文跃, 主任医师, 中日友好医院普通外科



## ■研发前沿

目前公认的治疗涎腺腺样囊性癌的方法是以手术为主、辅以化疗、放疗、免疫治疗以及其他支持治疗的综合方案。但术后复发和转移是患者死亡的重要原因。因此,筛选出涎腺腺样囊性癌治疗的靶向药物,减轻患者的痛苦是目前研究的热点及重点。

0.242±0.025, 均 $P<0.01$ ).

**结论:** IAA/HRP对人涎腺腺样囊性癌细胞SACC-2生长有明显的抑制作用,可通过激活caspase-3 mRNA的表达,诱导凋亡。

**关键词:** 吲哚乙酸; 辣根过氧化物酶; SACC-2细胞; 生长抑制; CCK-8法

吕继连, 高宁, 李方, 何巍, 尚君兰. 吲哚乙酸联合辣根过氧化物酶对人SACC-2细胞的抑制作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(23): 2413-2416

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2413.asp>

## 0 引言

涎腺腺样囊性癌是口腔颌面部常见的恶性肿瘤,手术是其主要的治疗方法,但其高侵袭及转移的生物学特性,使患者5年生存率不足50%,10年生存率不足20%<sup>[1]</sup>,因此寻找新的治疗方法和有效抗癌药物势在必行。吲哚乙酸(indole-3-acetic, IAA)是一种植物生长激素,主要调节植物细胞的分化、生长和分裂增殖<sup>[2]</sup>。辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)是一种亚铁血红素酶,能氧化包括IAA在内的一系列底物<sup>[3-4]</sup>。近年来研究表明,IAA的作用浓度取值不同,但HRP的浓度一定,IAA/HRP共同作用时具有抑制肿瘤细胞生长,并可诱导凋亡等作用,而当IAA和HRP以二者联合作用时的相同浓度单独作用时,则不会产生任何毒性效应<sup>[5]</sup>。鉴于不同细胞对其敏感性存在差异,本研究选择人涎腺腺样囊性癌细胞系SACC-2进行体外实验,观察其对SACC-2细胞的生长抑制效果,旨在探索腺样囊性癌新的治疗方法。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人腺样囊性癌细胞系SACC-2(华西口腔医学院惠赠); Cell counting kit-8(日本同仁研究所); IAA, HRP与琼脂糖(美国Sigma公司); RPMI 1640(美国Gibco公司); 胎牛血清(杭州四季青公司); 二甲基亚砷(上海化学试剂厂); TRIzol(上海晶天生物科技有限公司)。酶标仪(美国Thermo), 超净工作台(苏州净化), PCR仪(德国Biometra), 凝胶成像系统(Synoptics Ltd), 消毒柜(日本Tomy公司), 显微镜(中国Nikon)。RT-PCR引物序列由北京博尚生物工程有限公司合成。扩增产物大小: 人caspase-3 173 bp, 正向引物5-GAGGCCGACTTCTTGTATGC-3, 反向引物: 5-AATTCTGTTGCCACTTTGG-3; 人 $\beta$ -actin 409

bp, 正向引物5-ACCAACTGGGACGACATGGA GAAAATC-3, 反向引物5-GTAGCCGCGCTCGG TGAGGATCTTCAT-3。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养:** 人涎腺腺样囊性癌细胞SACC-2培养于含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养基中,置37℃、50 mL/L的CO<sub>2</sub>培养箱中。待细胞生长状态处于对数生长期进行传代,当细胞达到足够量时开始实验。

**1.2.2 光镜观察IAA/HRP对SACC-2细胞形态影响:** 取对数生长期的SACC-2细胞,用胰酶消化成单细胞悬液,计数,以细胞密度为 $5 \times 10^7$ 个/L, 2 mL/孔接种于6孔培养板中,贴壁24 h后弃去原培养液,分别加入对照组(完全培养基)和实验组(IAA 20、40、60、80、100  $\mu$ mol/L+HRP 1.2 mg/L)的培养基,于48 h在光镜下观察实验组和对照组肿瘤细胞的形态变化,并摄片记录。

**1.2.3 CCK-8法测IAA/HRP对SACC-2细胞增殖的影响:** 取对数生长期的SACC-2细胞,接种于96孔平底细胞培养板中,每孔细胞接种的终浓度为 $2 \times 10^7$ 个/L,每孔100  $\mu$ L。4-6 h细胞贴壁后,加入不同浓度的IAA和HRP,使不同组的IAA终浓度分别为20、40、60、80、100  $\mu$ mol/L, HRP的终浓度均为1.2 mg/L,并设加等浓度细胞和培养基的对照孔,只加培养基的调零孔,每组设5个复孔,置37℃、50 mL/L的CO<sub>2</sub>培养箱中培养48 h后加10  $\mu$ L CCK-8溶液,充分震荡后,置37℃、50 mL/L的CO<sub>2</sub>培养箱中孵育1 h,置450 nm波长酶标仪中测定A<sub>450</sub>值,生长抑制率IR(%) = (1-实验组A<sub>450</sub>/对照组A<sub>450</sub>) $\times$ 100%。

**1.2.4 RT-PCR检测凋亡相关基因caspase-3 mRNA表达:** (1)总RNA提取与保存: TRIzol一步法提取总RNA,具体步骤参照TRIzol说明书,30  $\mu$ L DEPT(1%)水溶液置于液氮中贮存, RNA纯度为1.7-1.9,浓度为0.83-3.35 g/L。(2)逆转录合成cDNA: 根据逆转录试剂盒操作步骤合成cDNA。(3)PCR扩增反应体系: 反应体系为50  $\mu$ L。PCR反应参数: 95℃预变性5 min, 94℃变性50 s, 58℃退火30 s, 72℃延伸60 s, 29个循环; 72℃ 10 min, 然后于-20℃保存。(4)PCR产物电泳: 取10  $\mu$ L左右PCR产物在10 g/L琼脂糖凝胶中电泳,紫外灯下观察扩增产物,凝胶成像分析系统扫描扩增带,以 $\beta$ -actin为内参照,与目的基因PCR产物条带灰度Volume之比作为反映目的基因mRNA水平的相对指标。

**统计学处理** 实验数据以mean $\pm$ SD表示,采

## ■相关报道

Kim *et al*报道在一定的浓度范围内,激活的吲哚乙酸对人黑色素瘤G361细胞生长有较强的抑制作用, Liao *et al*认为IAA/HRP的杀伤作用可能主要发生在细胞增殖期。

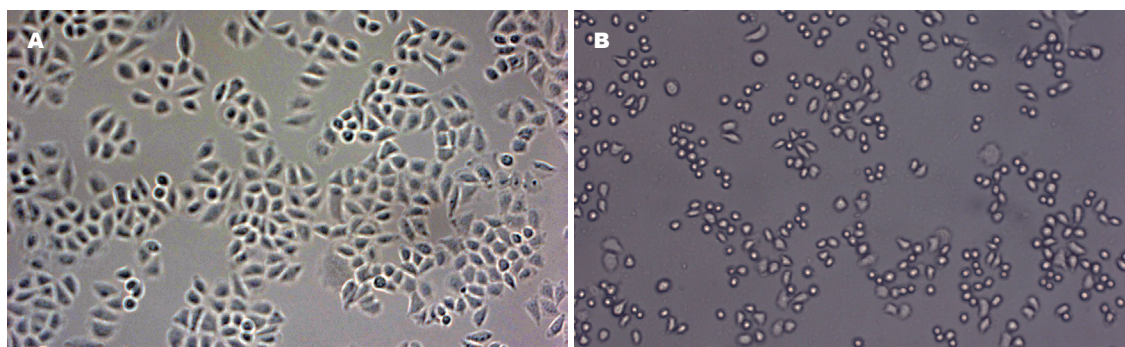


图 1 48 h后SACC-2细胞形态学( $\times 200$ ). A: 对照组; B: IAA 100  $\mu\text{mol/L}$ +HRP 1.2 mg/L实验组.

### ■创新盘点

该实验选用IAA和HRP共同作用于涎腺腺样囊性癌细胞, 观察其对细胞的抑制作用.

表 1 IAA/HRP对SACC-2细胞增殖的影响 (mean  $\pm$  SD)

分组	A值	IR(%)
IAA ( $\mu\text{mol/L}$ )		
20	0.404 $\pm$ 0.021	13.37
40	0.364 $\pm$ 0.025 <sup>a</sup>	31.80
60	0.349 $\pm$ 0.019 <sup>a</sup>	38.71
80	0.302 $\pm$ 0.023 <sup>a</sup>	60.57
100	0.259 $\pm$ 0.028 <sup>a</sup>	80.18
对照组	0.433 $\pm$ 0.032	0
凋零组	0.216 $\pm$ 0.026	-

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组.

用统计软件SPSS14.0进行单因素方差分析, 组间两两比较用LSD检验.

## 2 结果

**2.1 细胞形态学的观察** 对照组细胞呈梭形, 核浆比例大, 核大深染, 可见较多的核分裂相, 细胞异型性明显, 大小与形态不一(图1A). 实验组20  $\mu\text{mol/L}$  IAA+1.2 mg/L HRP处理48 h后, 细胞数量有所减少, 形态变化不明显; 100  $\mu\text{mol/L}$  IAA组可见大部分细胞皱缩, 变小变圆, 胞内出现空泡, 核浆比减小, 核浆难分清(图1B).

**2.2 CCK-8法检测结果** 与对照组相比, 除20  $\mu\text{mol/L}$ 组无统计学意义外, 40  $\mu\text{mol/L}$ 浓度以上的IAA与HRP结合均可抑制SACC-2细胞的增殖, 随着浓度的增加, 细胞增殖能力下降, 其生长抑制率分别为31.8%、38.71%、60.57%及80.18%(表1), 与对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ ). 结果说明IAA/HRP可抑制SACC-2细胞生长, 且其抑制作用呈较明显的时间-剂量依赖性.

**2.3 半定量RT-PCR检测caspase-3 mRNA表达的结果**  $A_{260}/A_{280}$ 为1.8-2.0, 说明所提取的RNA纯度较好. 不同浓度IAA作用SACC-2 48 h后, 细

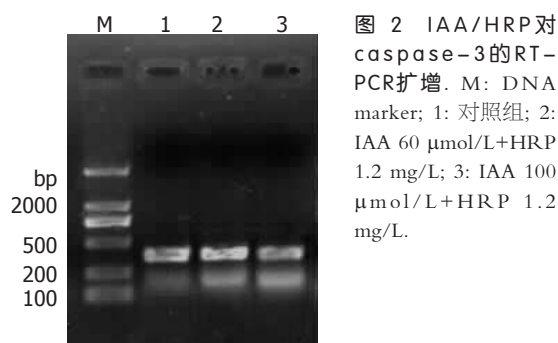


图 2 IAA/HRP对caspase-3的RT-PCR扩增. M: DNA marker; 1: 对照组; 2: IAA 60  $\mu\text{mol/L}$ +HRP 1.2 mg/L; 3: IAA 100  $\mu\text{mol/L}$ +HRP 1.2 mg/L.

胞caspase-3基因半定量分析结果显示(图2): 各浓度的IAA处理组及对照组细胞都有等量的 $\beta$ -actin扩增, 而caspase-3扩增结果却不同, 对照组的表达量非常低, 只有 $0.242 \pm 0.025$ ; 随着IAA浓度的增高, caspase-3表达量依次上升, 60  $\mu\text{mol/L}$ 及100  $\mu\text{mol/L}$ 组表达量分别为 $0.835 \pm 0.019$ ,  $1.667 \pm 0.022$ , 两组间比较差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ). IAA/HRP能有效上调SACC-2 caspase-3 mRNA的表达, 诱导凋亡.

## 3 讨论

IAA作为一种植物激素, 被HRP氧化后会产生包括活性氧自由基(ROS), 如 $\text{H}_2\text{O}_2$ 在内的自由基. 自由基会导致脂质过氧化, 引起细胞膜结构改变, 导致细胞内损伤和凋亡<sup>[6-7]</sup>. 体外实验表明吲哚乙酸联合辣根过氧化物酶对多种肿瘤细胞有抑制或杀伤作用<sup>[8-9]</sup>, 对Bxpc\_3、K562、G361、LSCC细胞有明显的抑制作用, 并能诱导分化和凋亡, 且对正常细胞的损伤甚微<sup>[10]</sup>. 本实验发现, 40  $\mu\text{mol/L}$ 以上的吲哚乙酸联合辣根过氧化物酶即可对SACC-2细胞造成抑制( $P < 0.05$ ), 并且随着浓度和时间的增加存在量效和时效关系. 光镜下可见细胞形态发生明显改变, 细胞皱缩, 变小变圆, 空泡明显, 部分细胞脱落悬浮于培养液中.

恶性肿瘤的发生是多因素、多基因相互作用, 且在多阶段发挥作用的极为复杂的生物学

### ■应用要点

本研究表明IAA联合HRP对涎腺腺样囊性癌细胞有抑制作用, 其主要效应机制是启动细胞凋亡, 为其进一步开发应用奠定了基础.



### ■名词解释

活性氧(ROS): 自由基的一种, 其可以通过引起细胞脂质过氧化、DNA损伤、降低Bcl-2活性以及激活凋亡相关基因而诱导凋亡过程。

过程. 高度增殖和无限分化是恶性肿瘤的重要生物学特性之一, 也是临床患者复发和转移的主要原因. 因此, 对肿瘤生长抑制的研究已经成为肿瘤治疗学研究的主要内容. 涎腺腺样囊性癌是口腔颌面部常见的恶性肿瘤, 其高侵袭及转移的生物学特性多年来一直困扰着临床治疗工作, 寻找新的高效低毒的抗癌药仍是目前研究的热点. 细胞持续分裂和不断增殖是肿瘤区别于正常细胞的一个重要特征, 因此观察对肿瘤细胞的增殖活性的抑制作用是筛选抗癌药的基本指标. CCK-8是测定单个细胞增殖能力及检测细胞存活和生长的有效方法, 其原理类似于MTT, 由于MTT法形成的甲臜物是非水溶性的, 需要加有机溶剂溶解, 这不仅增加了工作量, 也给实验带来了一定的误差. CCK-8法较MTT反应灵敏、快捷, 重复性好<sup>[11]</sup>. 本研究显示, 除20 μmol/L IAA组外, 其余各组与对照组相比, 差异均有统计学意义( $P<0.05$ ), 且随着药物浓度的增加, 其生长抑制率明显增高. 这与其他的研究报道IAA作用最适浓度为50 μmol/L或100 μmol/L的结论基本一致<sup>[12-13]</sup>.

细胞凋亡(apoptosis)是一种由遗传决定的细胞自杀程序活化所致的生理性细胞死亡, 在细胞发育和内环境稳定中起着重要的生物学作用<sup>[14]</sup>. caspases家族属于天冬氨酸特异的半胱氨酸蛋白酶, 是凋亡的执行者. 本研究又对在凋亡执行阶段起中心作用的caspase-3 mRNA进行了检测. 统计数据表明, caspase-3 mRNA在48 h时表达较高; 同一时间点, 不同浓度的IAA/HRP实验组caspase-3 mRNA表达存在显著性差异( $P<0.01$ ). 这与国内外研究报道caspase-3在口腔正常黏膜、癌前病变及口腔癌表达基本相符<sup>[15-16]</sup>. 这说明IAA/HRP作用后SACC-2细胞增殖能力下降, 其中caspase-3 mRNA表达增高, 从而启动细胞凋亡.

综合以上结果分析表明, 植物激素中的IAA联合HRP与其他抗癌药物一样, 对SACC-2细胞有抑制作用, 并且随浓度的增加其抑制作用明显增强. 其主要效应机制是启动细胞凋亡, 这为进一步研究IAA联合HRP对口腔癌治疗作用奠定了实验基础.

### ■同行评价

本文实验设计合理, 结果详实可靠, 结论有一定的说服力.

## 4 参考文献

- 1 Esmaeli B, Ahmadi MA, Youssef A, Diba R, Amato M, Myers JN, Kies M, El-Naggar A. Outcomes

- in patients with adenoid cystic carcinoma of the lacrimal gland. *Ophthal Plast Reconstr Surg* 2004; 20: 22-26
- 2 Goldsmith MH. Cellular signaling: new insights into the action of the plant growth hormone auxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 11442-11445
- 3 Kim DS, Jeon SE, Park KC. Oxidation of indole-3-acetic acid by horseradish peroxidase induces apoptosis in G361 human melanoma cells. *Cell Signal* 2004; 16: 81-88
- 4 Veitch NC. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* 2004; 65: 249-259
- 5 Greco O, Rossiter S, Kanthou C, Folkes LK, Wardman P, Tozer GM, Dachs GU. Horseradish peroxidase-mediated gene therapy: choice of prodrugs in oxic and anoxic tumor conditions. *Mol Cancer Ther* 2001; 1: 151-160
- 6 Kim DS, Jeon SE, Jeong YM, Kim SY, Kwon SB, Park KC. Hydrogen peroxide is a mediator of indole-3-acetic acid/horseradish peroxidase-induced apoptosis. *FEBS Lett* 2006; 580: 1439-1446
- 7 Yang L, Song TS, Huang C, Liu LY, Luo Y, Ni L, Si LS. [Mechanism of apoptosis induced by indole-3-acetic acids combined with horseradish peroxidase in leukemia cell line K562] *Zhongguo Shiyuan Xueyexue Zazhi* 2005; 13: 769-773
- 8 Wardman P. Indole-3-acetic acids and horseradish peroxidase: a new prodrug/enzyme combination for targeted cancer therapy. *Curr Pharm Des* 2002; 8: 1363-1374
- 9 Kim SY, Kim MK, Kwon SB, Na JI, Park KC, Kim DS. Tumor apoptosis by indole-3-acetic acid/light in B16F10 melanoma-implanted nude mice. *Arch Dermatol Res* 2009; 301: 319-322
- 10 Liao Z, Huang C, Zhou F, Xiong J, Bao J, Zhang H, Sun W, Xie C, Zhou Y. Radiation enhances suicide gene therapy in radioresistant laryngeal squamous cell carcinoma via activation of a tumor-specific promoter. *Cancer Lett* 2009; 283: 20-28
- 11 熊建文, 肖化, 张镇西. MTT法和CCK-8法检测细胞活性之测试条件比较. *激光生物学报* 2007; 16: 559-562
- 12 Huang C, Liu LY, Song TS, Ni L, Yang L, Hu XY, Hu JS, Song LP, Luo Y, Si LS. Apoptosis of pancreatic cancer BXP-3 cells induced by indole-3-acetic acid in combination with horseradish peroxidase. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4519-4523
- 13 Folkes LK, Greco O, Dachs GU, Stratford MR, Wardman P. 5-Fluoroindole-3-acetic acid: a prodrug activated by a peroxidase with potential for use in targeted cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 2002; 63: 265-272
- 14 Wang H, Yang X, Zhang Z, Xu H. Both calcium and ROS as common signals mediate Na(2)SeO(3)-induced apoptosis in SW480 human colonic carcinoma cells. *J Inorg Biochem* 2003; 97: 221-230
- 15 Abdel-Latif AM, Abuel-Ela HA, El-Shourbagy SH. Increased caspase-3 and altered expression of apoptosis-associated proteins, Bcl-2 and Bax in lichen planus. *Clin Exp Dermatol* 2009; 34: 390-395
- 16 Lee J, Lee HJ, Park JD, Lee SK, Lee SI, Lim HD, Lee YM, Yun YG, Jeon BH, Ree IS, Jun CD, Lee SK, Kim EC. Anti-cancer activity of highly purified sulfur in immortalized and malignant human oral keratinocytes. *Toxicol In Vitro* 2008; 22: 87-95

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕



## 青年人原发性胆汁反流性胃炎病理特征分析40例

陈维顺, 罗虹雨, 朱宜人, 钟燎原, 周红兵, 张选均

陈维顺, 罗虹雨, 朱宜人, 钟燎原, 周红兵, 张选均, 湖南省株洲市一医院(中南大学株洲临床学院)消化内科 湖南省株洲市 412000

作者贡献分布: 课题设计由陈维顺与罗虹雨完成; 研究过程由罗虹雨、朱宜人、钟燎原及周红兵完成; 数据分析及论文撰写由陈维顺完成, 张选均进行指导。

通讯作者: 陈维顺, 主任医师, 412000, 湖南省株洲市, 湖南省株洲市一医院(中南大学株洲临床学院)消化内科。

chen8242123@sina.com

电话: 0731-28203211

收稿日期: 2009-05-22 修回日期: 2009-07-22

接受日期: 2009-07-27 在线出版日期: 2009-08-18

### Pathological features of primary bile reflux gastritis in adolescents: an analysis of 40 cases

Wei-Shun Chen, Hong-Yu Luo, Yi-Ren Zhu, Liao-Yuan Zhong, Hong-Bing Zhou, Xuan-Jun Zhang

Wei-Shun Chen, Hong-Yu Luo, Yi-Ren Zhu, Liao-Yuan Zhong, Hong-Bing Zhou, Xuan-Jun Zhang, Department of Gastroenterology, Zhu Zhou No. 1 Hospital (Clinical College, Central South University of Zhuzhou), Zhuzhou 412000, Hunan Province, China

Correspondence to: Wei-Shun Chen, Department of Gastroenterology, Zhu Zhou No. 1 Hospital, Zhuzhou 412000, Hunan Province, China. chen8242123@sina.com

Received: 2009-05-22 Revised: 2009-07-22

Accepted: 2009-07-27 Published online: 2009-08-18

### Abstract

**AIM:** To analyze the pathological features of primary bile reflux gastritis (BRG) in adolescents.

**METHODS:** Forty adolescents clinically diagnosed with primary BRG by endoscopy and 24-hour gastric pH and bile monitoring were included in the study. Thirty healthy adolescent volunteers were enrolled as controls. Gastric antrum and corpus mucosa biopsy specimens were taken and subjected to routine HE staining and modified Giemsa staining to conduct pathological examination.

**RESULTS:** Lymphocyte infiltration was mild in BRG adolescents, and grade 2 or less lymphocyte infiltration was noted in 87.5% of patients. Neutrophil infiltration was often concurrent with

*Helicobacter pylori* (*H pylori*) infection. Lengthening of gastric pits, trichangiectasia, interstitial edema, mucosal atrophy, intestinal metaplasia and *H pylori* infection were observed in 22.5%, 40.0%, 40.0%, 12.5%, 20.0% and 22.5% of patients, respectively. Except intestinal metaplasia and *H pylori* infection, the prevalences of other pathological alterations were significantly different between healthy adolescents and BRG adolescents ( $P < 0.05$ ). Additionally, these pathological alterations were more severe in the antrum than in the corpus.

**CONCLUSION:** Primary BRG in adolescents shows some features of chemical gastritis and has a tendency to evolve towards mucosal atrophy and intestinal metaplasia.

**Key Words:** Primary bile reflux gastritis; Adolescents; Pathology; Endoscopy; pH Monitoring

Chen WS, Luo HY, Zhu YR, Zhong LY, Zhou HB, Zhang XJ. Pathological features of primary bile reflux gastritis in adolescents: an analysis of 40 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(23): 2417-2420

### 摘要

**目的:** 探讨青年人原发性胆汁反流性胃炎(bile reflux gastritis, BRG)的病理特征。

**方法:** 选择40例青年人原发性BRG为观察组, 均经临床、内镜及胃内24 h胆汁监测确诊; 取同期30例健康青年志愿者为对照组。分别取胃窦和胃体活检标本进行HE染色和改良Giemsa染色, 进行组织病理分析。

**结果:** 观察组淋巴细胞浸润较轻, 0-2级占87.5%, 有中性粒细胞浸润者多伴*H pylori*感染, 胃小凹延长者占22.5%、毛细血管扩张和间质水肿均为40.0%(肠化生12.5%, 黏膜萎缩20.0%), *H pylori*感染者22.5%(除肠化生及*H pylori*感染外), 其他黏膜病变与对照组比较有显著性差异( $P < 0.05$ ), 而且胃窦病变重于胃体。

**结论:** 青年人原发性BRG具有化学性胃炎的部分特征, 而且有向黏膜萎缩与肠化生转变

### 背景资料

继发于胃、十二指肠及胆道手术后的胆汁反流性胃炎的病理特征已有大量研究, 但非手术胃发生的原发性胆汁反流性胃炎因其临床症状不典型、反流时间不确切、反流物性质(胆汁、肠液或胰液)不明确、反流程度无法估计, 因此对胃黏膜的病理损害也未得到有效评估, 特别是青年人发生原发性BRG后其病理学有何特征目前尚研究不多。

### 同行评议者

陈海龙, 教授, 大连医科大学附属第一医院院办; 唐世刚, 教授, 大连大学附属中山医院消化内科

## ■研发前沿

本文以健康青年人为对照组,重点阐述了青年人BRG的病理特点,与以往描述的化学性胃炎表现进行了比较,对可能发生的不良结局如胃黏膜萎缩、肠腺化生及不典型增生等进行了评估。

的趋势。

**关键词:** 原发性胆汁反流性胃炎; 青年人; 病理; 内镜; pH监测

陈维顺, 罗虹雨, 朱宜人, 钟燎原, 周红兵, 张选均. 青年人原发性胆汁反流性胃炎病理特征分析40例. 世界华人消化杂志 2009; 17(23): 2417-2420

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2417.asp>

## 0 引言

胆汁反流性胃炎(bile reflux gastritis, BRG)常被认为是一种化学性炎症,继发于胃、十二指肠及胆系手术后的BRG常具有胃黏膜肠化、萎缩、不典型增生甚至癌变等病理改变<sup>[1-2]</sup>,严重影响患者生活质量及预后.部分文献及我们的研究发现<sup>[3-6]</sup>,非手术所致的原发性BRG在儿童和青年人中也常有发生,但青年人原发性BRG是否具有继发性BRG的相同病理改变目前尚不清楚.本文选择经临床、内镜及胃内24 h胆汁监测确诊的40例青年人原发性BRG进行组织病理分析,并对其相关因素进行探讨,旨在发现其有意义的组织病理特征。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 观察组为2007-03/2008-12因上腹部症状入我院的青年患者40例,男16例,女24例,年龄18-35(平均25.1±5.7)岁.对照组为同期健康青年志愿者30例,其中男11例,女19例,年龄23.2±4.1岁,均为我院临床实习的本科大学生,检查前均经过我院科研伦理委员会批准,签署知情同意书.2组对象均进行胃镜、胃内pH及胆汁反流检测.凡有上腹症状、胃镜诊断为原发性胆汁反流性胃炎及胃内胆汁反流检测有胆汁反流者诊断为胆汁反流性胃炎.2组患者均无肝胆胰器质性疾病、胃肠及胆道手术史。

### 1.2 方法

**1.2.1 胃镜检查:**凡具有以下特征者诊断为原发性BRG<sup>[7]</sup>:(1)胃黏膜尤其是胃窦部黏膜有水肿、充血或脆性增加;(2)胃镜插至胃内静止1 min后仍可见含有胆汁的十二指肠液呈泡沫状或水流状从幽门口反流入胃;(3)胃黏液糊有黄色或绿色胆汁染色;(4)胃黏膜有胆汁染色;(5)无胃肠道手术史,无消化性溃疡、胃息肉、胃癌等疾病.胃镜尚需详细记录胃炎部位、有无胃黏膜糜烂、反流性食管炎等。

**1.2.2 胃内pH及胆汁反流检测:**应用Synectics

Digitrapper便携式pH监测仪和Synectics Bilitec 2000胆汁监测仪(Medtronic Functional Diagnostics A/S公司)进行测定:监测结束后将数据输入计算机,以专用软件进行分析,分析参数为pH>4的时间百分比,胆红素吸光值(A)>0.14的时间百分比等.以A>0.14判定为胆汁反流阳性。

**1.2.3 胃黏膜病理检查:**胃镜检查时,距幽门2-3 cm胃窦取活检3块(1块进行快速尿素酶试验)、胃体大小弯取活检2块,2组组织混合编号,经病理医师盲法分析,组织分别进行HE染色和改良Giemsa染色,按中国慢性胃炎共识意见(2006,上海)和新悉尼指导原则进行观察和评分<sup>[8-9]</sup>:慢性炎症、活动性、肠化、萎缩等形态学特征,对其严重程度进行4级评分(0、1、2、3代表无、轻、中、重),同时观察是否存在胃小凹延长、毛细血管扩张、间质水肿、黏膜肌增厚等BRG常见病理特征。

**统计学处理** 应用SPSS11.0统计软件进行统计分析,计数资料分别统计其百分率、2组比较采用 $\chi^2$ 检验。

## 2 结果

2组病检结果显示观察组淋巴细胞浸润、黏膜萎缩重于对照组、胃小凹延长、毛细血管扩张、间质水肿也较对照组明显,统计学有显著性差异(均 $P<0.05$ ,表1-2).肠腺化生虽观察组高于对照组,但未显示统计学意义( $P=0.345$ ).*H pylori*感染两组无显著性差异( $P=0.573$ ).

## 3 讨论

BRG是否具有特殊的病理学形态改变一直成为人们关心的问题.在继发性BRG诊断中,除胃黏膜萎缩、肠化生及不典型增生等常见改变外,以伴胃小凹增生为特征的化学性胃炎而胃黏膜炎性反应不明显为重要诊断标准<sup>[1-2]</sup>,但在原发性BRG中该组织学特征尚未得到证实<sup>[10]</sup>,生理机能活跃、组织代谢旺盛,特别是胃肠道运动、分泌、消化、吸收功能活跃的青年人发生原发性BRG后其病理学有何特点目前少见文献报道。

本文以健康青年人为对照组,经比较发现青年人原发性BRG具有以下一些特征:(1)炎症反应:炎症反应程度常以炎性细胞浸润多少为标准,淋巴细胞代表慢性炎症、中性粒细胞代表炎症活动度,本组青年人BRG除7例患者无炎性细胞浸润外,均有不同程度的炎性改变,其

## ■相关报道

BRG的病理诊断缺乏共识的诊断标准,在继发性BRG诊断中,除胃黏膜萎缩、肠化生及不典型增生等常见改变外,以伴胃小凹增生为特征的化学性胃炎而胃黏膜炎性反应不明显为重要诊断依据,但在原发性BRG中该组织学特征尚未得到证实。

表 1 2组患者形态学特征

分组	n	淋巴细胞浸润				粒细胞浸润				黏膜萎缩				肠腺化生				不典型增生			
		0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
观察组	40	7	21	7	5	31	8	1	0	32	8	0	0	36	5	0	0	40	0	0	0
对照组	30	14	8	7	1	24	6	0	0	29	1	0	0	29	1	0	0	30	0	0	0
P值		0.022				0.683				0.040				0.345							

表 2 2组患者病理特征

分组	n	胃小凹	黏膜肌	毛细血管	间质	<i>H pylori</i>
		延长	增厚	扩张	水肿	
观察组	40	9	5	16	16	9
对照组	30	1	3	5	3	7
P值		0.023	0.520	0.031	0.005	0.573

炎性浸润显著重于对照组( $P = 0.022$ ), 但炎症程度多较轻, 以1、2级浸润为主, 符合化学性炎症炎性浸润不明显的特征, 2组中性粒细胞浸润比较无差异, 但结合*H pylori*分析, 2组粒细胞浸润者多存在*H pylori*感染, 提示炎症的活动性与*H pylori*相关, 而非胆汁反流所致的炎性反应。(2)化学性炎症反应的特征: 胃小凹延长、黏膜肌增厚、毛细血管扩张、间质水肿被认为是胆汁化学性胃炎的特征性改变<sup>[11]</sup>, 而其他的慢性胃炎则少有上述改变, 本组除黏膜肌增厚2组无差别外, 其他3项均BRG组与对照组有显著性差别, 其发生率分别为胃小凹延长22.5%、毛细血管扩张和间质水肿均为40.0%, 提示化学性胃炎的确存在以上病理改变, 但其程度不一, 因此, 尚不能将以上改变作为BRG的诊断标准来看待, 而且其机制目前也尚不很清楚, 有研究认为胆汁酸能刺激肥大细胞释放组胺, 使黏膜血管扩张、毛细血管通透性增加, 从而导致胃黏膜充血、水肿、糜烂甚至溃疡。除此外, 研究还发现, 胆汁酸还可促进细胞产生白三烯、氧自由基等炎性介质引起胃黏膜损害<sup>[12]</sup>。(3)炎症反应的不良结局: 慢性胃炎均可发生黏膜萎缩、肠化生、不典型增生及癌变等不良结局。其发生可能与致炎因子的性质、作用时间、胃黏膜状态等有关, 本组为青年人, 胃黏膜代谢旺盛、机能活跃, 发生此类不良结局应该较少, 但在部分BRG患者仍可看到有此方面的进展迹象, 如BRG组有8例(20.0%)患者有轻度的黏膜萎缩、5例(12.5%)有肠化生, 提示胆汁反流可促进病变胃黏膜向不良结局发展, 在反流的过程中, 胃黏膜局部微环境变成类似于肠道

环境, 为适应十二指肠液(胆汁、胰液、肠液)的浸染, 部分腺体萎缩消失、部分胃干细胞向肠细胞分化, 逐步演变为肠化生黏膜, 因此, 阻止胆汁反流、恢复胃腔的正常环境, 是防止BRG发生不良结局的关键。本组未检出不典型增生, 可能与反流病程较短有关。(4)*H pylori*感染: 本对照组与观察组的*H pylori*感染率均不高, 分别为23.3%(7/30)和22.5%(9/40), 与文献基本一致<sup>[13-14]</sup>, *H pylori*感染率低于慢性胃炎及消化性溃疡患者, 前者可能为健康青年人, *H pylori*感染率较低, 后者则认为是胆汁反流破坏了胃黏膜的酸性环境不利于*H pylori*生长, 或胆汁直接杀灭*H pylori*所致<sup>[13,15]</sup>。但本组*H pylori*感染者其炎症反应程度均重于单纯BRG, 特别是活动性胃炎主要见于*H pylori*感染者, 提示*H pylori*感染性胃炎与BRG确是两种不同性质的胃炎。有研究认为伴*H pylori*感染的BRG其胃黏膜炎性程度更为严重, 认为两者有协同致病作用<sup>[16]</sup>, 我们与对照组*H pylori*感染者比较, 见2组的炎症反应基本相似, 未观察到BRG组更为严重的现象。(5)胃窦与胃体病理比较: 胆汁反流可引起全胃黏膜的炎性改变, 但本组胃窦病变重于胃体, 其中8例黏膜萎缩中3例胃窦胃体同时发生萎缩, 5例仅胃窦萎缩、9例胃小凹延长者6例发生在胃窦, 4例肠化中3例发生在胃窦, 胃窦病变重于胃体可能与远端胃和十二指肠反流物接触时间更多, 或胃窦腺体更易遭受反流物的损害有关。

总之, 青年人原发性BRG具有化学性胃炎的部分特征, 而且有向黏膜萎缩和肠化转变的趋势。

#### 4 参考文献

- 胡学建, 董来华, 葛建荣, 张黎, 陈龙根. 原发性胆汁反流性胃炎的临床病理分析. 中国内镜杂志 2006; 23: 215-217
- Fein M, Maroske J, Fuchs KH. Importance of duodenogastric reflux in gastro-oesophageal reflux disease. *Br J Surg* 2006; 93: 1475-1482
- Hermans D, Sokal EM, Collard JM, Romagnoli R, Buts JP. Primary duodenogastric reflux in children and adolescents. *Eur J Pediatr* 2003; 162: 598-602
- 陈维顺, 罗虹雨, 朱宜人, 钟燎原, 周红兵, 张选均. 青年人生理性十二指肠胃反流的相关因素. 世界华人消

#### ■创新盘点

本文观察了胃肠道功能活跃的青年人原发性BRG的病理学改变, 对BRG的病理特征进行了详细分析, 提出了青年人原发性BRG具有化学性胃炎部分特征, 而且有向黏膜萎缩和肠化转变趋势的观点。



### ■同行评价

本研究选题准确, 得出了比较可信的结论, 对临床诊断和治疗具有实际应用意义。

- 化杂志 2008; 16: 3451-3453
- 5 陈维顺, 罗虹雨, 朱宜人, 钟燎原, 周红兵, 张选均. 青年人原发性胆汁反流性胃炎的临床特征分析. 中国医学工程 2008; 16: 302-304
- 6 卢华君, 黄开宇, 赵忠艳, 徐彰, 施灵敏, 黄爱芬. 胆汁反流性胃炎患儿病理组织学特点及幽门螺杆菌感染情况. 实用儿科临床杂志 2008; 23: 510-512
- 7 Stein HJ, Smyrk TC, DeMeester TR, Rouse J, Hinder RA. Clinical value of endoscopy and histology in the diagnosis of duodenogastric reflux disease. *Surgery* 1992; 112: 796-803; discussion 803-804
- 8 中华医学会消化病学分会. 中国慢性胃炎共识意见 (2006年, 上海). 现代消化及介入诊疗 2007; 12: 55-61
- 9 Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 1161-1181
- 10 Mason RJ, DeMeester TR. Importance of duodenogastric reflux in the surgical outpatient practice. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 48-53
- 11 Dixon MF, O'Connor HJ, Axon AT, King RF, Johnston D. Reflux gastritis: distinct histopathological entity? *J Clin Pathol* 1986; 39: 524-530
- 12 罗和生, 陈敏. 胆汁反流与急性胃黏膜病变. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1489-1492
- 13 陈胜良, 莫剑忠, 曹芝君, 陈晓宇, 萧树东. 胆汁返流对慢性胃炎胃黏膜病变的影响. 上海第二医科大学学报 2005; 25: 167-170
- 14 陈宏颖, 林国伟, 尹彤, 刘湘云. 胆汁反流性胃炎的病理分析. 中国内镜杂志 2003; 9: 56-57, 59
- 15 Vere CC, Cazacu S, Comănescu V, Mogoantă L, Rogoveanu I, Ciurea T. Endoscopic and histological features in bile reflux gastritis. *Rom J Morphol Embryol* 2005; 46: 269-274
- 16 张万岱, 曾锦章. 胆汁反流性胃炎的病因病机和诊治进展. 现代消化介入诊疗 2004; 9: 31-34

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》修回稿须知

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

#### 1 修回稿信件

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

#### 2 稿件修改

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

#### 3 版权

本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期); 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须经得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录。(常务副总编辑: 张海宁 2009-08-18)

# HBV相关性肾炎与HBV基因变异的相关性

李霜青, 安惠霞, 赵玉先, 姜国涛

李霜青, 安惠霞, 赵玉先, 哈尔滨医科大学附属第二医院肾内科 黑龙江省哈尔滨市 150086  
姜国涛, 天津市第五中心医院肾内科 天津市 300450  
黑龙江省自然科学基金资助项目, No. 080620  
作者贡献分布: 李霜青、安惠霞及赵玉先对此文所作贡献均等; 安惠霞是通讯作者, 此课题由安惠霞指导设计; 研究过程由李霜青与赵玉先操作完成; 姜国涛参与部分实验研究包含提供患者等, 所用新试剂与分析工具由安惠霞提供; 数据分析由李霜青完成; 本论文写作由李霜青、安惠霞及赵玉先完成。  
通讯作者: 安惠霞, 教授, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二医院肾内科. an\_huixia@sina.com  
电话: 0451-86605256  
收稿日期: 2009-05-21 修回日期: 2009-07-05  
接受日期: 2009-07-20 在线出版日期: 2009-08-18

## Correlation of different hepatitis B virus gene mutations with the development of hepatitis B virus-associated glomerulonephritis

Shuang-Qing Li, Hui-Xia An, Yu-Xian Zhao,  
Guo-Tao Jiang

Shuang-Qing Li, Hui-Xia An, Yu-Xian Zhao, Department of Nephrology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China  
Guo-Tao Jiang, Department of Nephrology, the 5<sup>th</sup> Central Hospital, Tianjin 300450, China  
Supported by: the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province, No. 080620  
Correspondence to: Professor Hui-Xia An, Department of Nephrology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. an\_huixia@sina.com  
Received: 2009-05-21 Revised: 2009-07-05  
Accepted: 2009-07-20 Published online: 2009-08-18

### Abstract

**AIM:** To investigate the correlation of different hepatitis B virus gene mutations with the development of hepatitis B virus-associated glomerulonephritis (HBV-GN).

**METHODS:** Nineteen HBV-GN patients and 22 chronic hepatitis B (CHB) patients were included in the study. Gene mutations in the core gene coding region and core promoter/precore region of HBV were detected by complete genome sequencing.

**RESULTS:** In the core promoter/precore region,

the prevalences of the nt 1727 and nt 1773 mutations were significantly higher in HBV-GN patients than in CHB patients (100% vs 50.0% and 47.4% vs 13.6%, respectively; both  $P < 0.05$ ). No significant differences were noted in the prevalences of the nt 1762/1764 mutations between the two groups of patients ( $P > 0.05$ ). In the core gene coding region, the prevalence of the nt 2011 mutation was significantly lower in HBV-GN patients than in CHB patients (10.5% vs 40.9%,  $P < 0.05$ ). No significant differences were noted in the prevalences of the nt 2005, nt 2201, nt 2245 and nt 2290 mutations between the two groups of patients ( $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Some hepatitis B virus gene mutations may be correlated with the development of HBV-GN.

**Key Words:** Hepatitis B virus; Glomerulonephritis; Gene mutation

Li SQ, An HX, Zhao YX, Jiang GT. Correlation of different hepatitis B virus gene mutations with the development of hepatitis B virus-associated glomerulonephritis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(23): 2421-2425

### 摘要

**目的:** 探讨乙型肝炎病毒相关性肾炎(HBV-GN)易感性与HBV基因变异的关系。

**方法:** 选取HBV-GN患者19例为试验组, 慢性HBV感染者22例为对照组, 应用基因测序技术检测HBV血清C基因区、CP区基因位点的变异。

**结果:** CP区中nt1727和nt1773位点试验组的变异率显著高于对照组(100% vs 50.0%, 47.4% vs 13.6%, 均 $P < 0.05$ )。nt1762/1764联合变异率在2组中的差别无统计学意义( $P > 0.05$ )。C基因区中nt2011变异率试验组显著低于对照组(10.5% vs 40.9%,  $P < 0.05$ )。nt2005、nt2201、nt2245和nt2290变异率在2组中的差别无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**结论:** HBV-GN易感性可能与HBV的基因变异有关。

### 背景资料

乙型肝炎病毒(HBV)感染在我国很常见, 据WHO统计, 乙型肝炎患者及携带者约占人群的15%。HBV感染可引起多种肝外病变, 乙型肝炎病毒相关性肾炎(HBV-GN)是常见的肝外病变之一。

### 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

## ■ 研究前沿

HBV是一种高度变异的病毒,由于病毒变异往往引起抗原性和致病性的改变,所以认为HBV感染在临床上出现的不同疾病与病毒变异有关。

**关键词:** 乙型肝炎病毒; 肾炎; 基因变异

李霜青, 安惠霞, 赵玉先, 姜国涛. HBV相关性肾炎与HBV基因变异的相关性. 世界华人消化杂志 2009; 17(23): 2421-2425  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2421.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染在我国很常见,据WHO统计,乙型肝炎患者及携带者约占人群的15%。HBV感染可引起多种肝外病变,乙型肝炎病毒相关性肾炎(hepatitis B virus-associated glomerulonephritis, HBV-GN)是常见的肝外病变之一。自从1971年 Combes *et al*<sup>[1]</sup>首次报道1例乙型肝炎病毒相关性膜性肾病以来,引起各国学者们的重视与研究。HBV是一种高度变异的病毒,由于病毒变异往往引起抗原性和致病性的改变,所以认为HBV感染在临床上出现的不同疾病与病毒变异有关。目前大量的临床资料报道了HBV基因突变对肝脏疾病的临床表现、疾病发生发展及预后起着决定性的影响<sup>[2]</sup>。但是对HBV基因变异与HBV-GN易感性的相关性研究国内外报道较少。本实验是应用基因测序技术检测HBV C区、C基因启动子(c gene promoter, CP)区基因变异,旨在探讨HBV-GN易感性与HBV基因突变之间的关系,以期寻找导致HBV-GN的HBV基因突变易感位点。从病毒学方面进一步探讨该病的病因及发病机制。

## 1 材料和方法

1.1 材料 收集2006-10/2007-10我院门诊和住院患者41例,HBV-GN患者19例,为实验组,其中男16例,女3例,年龄12-54(平均年龄33.63±5.42)岁。诊断符合1989-10北京HBV-GN专题座谈会上的诊断标准<sup>[3]</sup>。慢性乙型肝炎患者22例,为对照组,其中男16例,女6例,年龄18-57(平均年龄30.43±4.78)岁。诊断符合第10次全国病毒性肝炎及肝病学术会议讨论修订的诊断标准,均为无血缘关系的黑龙江地区汉族人,经血清学检测排除甲、丙、丁、戊型肝炎病毒混合感染。

### 1.2 方法

1.2.1 实验室检查:乙型肝炎五项、肝功能、肾功能测定、尿常规、肾活检、HBV DNA定量。

1.2.2 HBV DNA基因变异位点的检测: (1)病毒基因组DNA提取:血清标本100 μL用蛋白酶K和裂解缓冲液消化,酚法提取。(2)PCR引物:根据GenBank数据库中HBV的全基因组序列,利用Primer Premier 5.0软件设计引物,上游引物

序列及位置nt1652-1671(5'-ACATAAGAGGACTCTTGAC-3', 20 bp), 下游引物序列及位置nt2439-2459(5'-ACTAACATTGAGATTCCCGAG-3', 21 bp), 扩增807 bp产物,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。(3)PCR: 50 μL反应体积中含10×反应缓冲液50 μL, MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L) 30 μL, 4 dNTP(2.5 mmol/L) 4 μL, 2种引物(10 μmol/L)各2.5 μL, Taq DNA多聚酶(5 U/mL)0.25 μL, 加水至40 μL。反应条件: 94℃预变性3 min, 继而94℃ 0.5 min、55℃ 0.5 min、72℃ 1 min, 共30个循环, 最后72℃延伸5 min。(4)DNA 序列测定:用PCR产物纯化试剂盒纯化PCR产物; 纯化产物由invitrogen公司测序。

**统计学处理** 计数资料采用 $\chi^2$ 检验, 计量资料采用 $t$ 检验, 所有统计分析均以SPSS13.0软件处理。

## 2 结果

2.1 HBV-GN与乙型肝炎HBV CP和C基因区的变异率 CP区变异在HBV-GN组的总检出率为100%(19/19), 乙型肝炎组为68.2%(15/22), HBV-GN组变异的检出率高于乙型肝炎组( $\chi^2 = 5.216, P < 0.05$ )。C区变异在HBV-GN组的总检出率为94.7%(18/19), 乙型肝炎组为90.9%(20/22), HBV-GN组C区变异的检出率与乙型肝炎组差别无统计学意义( $\chi^2 = 0.000, P > 0.05$ )。

2.2 HBV-GN与乙型肝炎HBV CP区变异的关系 HBVnt1727处A→G变异在HBV-GN组总检出率高达100%(19/19), 乙型肝炎为50.0%(11/22), HBV-GN组变异的检出率显著高于乙型肝炎组( $\chi^2 = 7.714, P < 0.01$ )。nt1773处C→A变异在HBV-GN组的总检出率为47.4%(9/19), 乙型肝炎为13.6%(3/22), HBV-GN组变异的检出率高于乙型肝炎组( $\chi^2 = 5.604, P < 0.05$ )。HBV nt1762T/1764A联合变异HBV-GN组总检出率26.3%(5/19), 乙型肝炎为36.4%(8/22), HBV-GN组和乙型肝炎组nt1762/nt1764联合变异的检出率相比无显著差异( $\chi^2 = 0.475, P > 0.05$ , 表1)。

2.3 HBV-GN与乙型肝炎HBV C基因区变异的关系 (1)nt2011处变异在HBV-GN组总检出率为10.5%(2/19), 乙型肝炎组为40.9%(9/22), 乙型肝炎组变异的检出率显著高于HBV-GN组( $P < 0.05$ )。(2)nt2201变异率在HBV-GN组和乙型肝炎组的差别无统计学意义(84.2% vs 68.2%)。其中, 变异位点T→C在HBV-GN组有16例, 乙型肝炎组有11例, 差别有统计学意义(84.2% vs



表1 HBV-GN组及乙型肝炎组患者HBV CP区变异位点的比较  $n(\%)$ 

分组	$n$	1727变异 A→G	1762/1764联合 变异AG→TA	1773变异 C→A
HBV-GN组	19	19(100.0)	5(26.3)	9(47.4)
乙型肝炎组	22	11(50.0)	8(36.4)	3(13.6)
$\chi^2$ 值		12.983	0.475	5.604
$P$ 值		<0.01	>0.05	<0.05

50.0%)。 (3)nt2290变异率在HBV-GN组和乙型肝炎组的差别无统计学意义(89.5% vs 77.3%)。其中, 变异位点C→T在HBV-GN组有16例, 乙型肝炎组有11例, 差别有统计学意义(84.2% vs 50.0%)。 (4)nt2005、nt2245变异率在HBV-GN组和乙型肝炎组的差别无统计学意义(68.4% vs 50.0%、78.9% vs 81.8%, 均 $P>0.05$ , 表2-3)。

2.4 HBV-GN肾组织的免疫组织化学特点 所收集病例中, 肾活检病理结果比较以HBsAg与HBeAg沉积最为多见, 检出率分别为47.4%、52.6%。其次为HBcAg沉积, 检出率为31.6%。

2.5 HBV-GN与乙型肝炎患者血HBV DNA定量和生化指标的比较 HBV DNA在HBV-GN组高于乙型肝炎组( $P<0.05$ ), 但肝功的改变在2组中的差别无统计学意义(表4)。

### 3 讨论

HBV是一种高变异的病毒, 其突变率高达 $10^{10}$ - $10^{11}$ 点突变/d, 比其他DNA病毒高出10倍以上。病毒侵入机体后, 在机体内受自然压力、人体免疫力和药物治疗的影响, 常出现病毒变异。发生变异的病毒可引起病毒复制水平的改变, 从而导致其抗原性和致病性改变, 所以认为HBV感染在临床上出现的不同疾病谱与病毒变异有关。随着HBV变异研究的不断深入, 变异所引起的生物学意义也不断被人们所认识。此外, HBV常见的变异位点: 基本核心启动子(basal core promoter, BCP)、前C区和核心区基因的变异。故本实验研究HBV-GN与HBV C区、CP区基因突变的相关性。

CP位于HBV基因组nt1643-1849, 即位于X开放读码框的3'末端和前C/C开放读码框的5'末端重叠区, CP调控HBV的复制, 控制前CmRNA和CmRNA(前基因组RNA)的转录, 前者为合成HBeAg的模板, 后者为合成HBcAg、多聚酶及逆转录的模板。CP的变异使CmRNA转录明显减少, 前基因组mRNA转录增加, 导致HBeAg

合成减少, 肝细胞内HBcAg、DNA聚合酶及HBV DNA的复制增加<sup>[4-5]</sup>。不少学者进行了体外实验, 发现CP区变异后, HBV前基因组RNA转录效率提高2-3倍, 病毒包装效率提高10倍之多。已有研究表明: HBV基因变异与HBV感染的结局有密切关系。Kaneko *et al*<sup>[6]</sup>分析7例重肝患者HBV基因序列, 结果有5例HBV CP区发生突变, 说明CP区基因突变可导致HBV DNA的复制增加。本实验的结果显示, 在CP区中, HBV-GN组的总变异检出率为100%(19/19), 乙型肝炎组为68.2%(15/22), HBV-GN组总变异的检出率高于乙型肝炎组( $P<0.05$ )。nt1727 A→G( $P<0.01$ )和nt1773 C→A变异率HBV-GN组高于乙型肝炎组( $P<0.05$ )。其中, nt1727在HBV-GN组全部发生突变, 由AAG→AGG, 显著高于乙型肝炎组( $P<0.01$ )。提示了具有nt1727、nt1773基因突变者患HBV-GN的危险性大。结果提示HBV-GN的发病与nt1727、nt1773基因突变相关。HBV-GN与突变后的CP致HBV DNA复制增加关系需进一步进行研究。

C区位于HBV基因组nt1814-2456, 长约638 bp, C基因区可转录形成315 kb mRNA, 和前基因组mRNA。后者大部分翻译、合成HBcAg(含183个氨基酸残基), 小部分被包装成核心颗粒, 充作反转录的模板。其编码的产物HBcAg带有T、B细胞识别的表位。C基因产物的中、前段发生聚积变异多见。这种聚积变异, 反映了B细胞、T细胞及其亚群识别和结合的表位可能有差异, 同时也反映了C蛋白所受免疫攻击的程度。在对乙型肝炎的临床研究中发现, C基因区多位点突变, 可使转录, 合成的HBcAg发生变异, 影响细胞毒T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)的识别, 助长了HBV免疫逃避, 不利于病毒的清除, 导致HBV持续感染<sup>[7]</sup>。Ehata *et al*<sup>[8]</sup>报告对30例HBV慢性感染者进行血清学HBV DNA检测, 20例慢性肝炎患者中有15例HBV C基因序列在84-101位的编码区发生变异(该区为TCL识别位点序列区), 这15例均为慢活肝和肝硬化。说明C区的基因突变可导致导致HBV持续感染。本实验中, C基因区中, HBV-GN组C区总变异的检出率与乙型肝炎组差别无统计学意义。nt2201 T→C和nt2290 C→T变异率HBV-GN组高于乙型肝炎组(84.2% vs 50.0%), 差别有统计学意义, 而变异位点nt2011在HBV-GN组则显著低于乙型肝炎组( $P<0.05$ ), 这提示具有nt2201 T→C和nt2290 C→T的患者患HBV-GN的危险性大, HBV变异位点

### ■创新盘点

本实验应用基因测序技术检测HBV C区、C基因启动子(CP)区基因变异, 旨在探讨HBV-GN易感性与HBV基因突变之间的关系, 以期寻找导致HBV-GN的HBV基因突变易感位点。从病毒学方面进一步探讨该病的病因及发病机制。

### 同行评价

本研究新颖性尚可,对临床医师有一定的参考价值.

表 2 HBV-GN组及乙型肝炎组患者HBV C区变异比较  $n(\%)$

分组	$n$	2005变异	2011变异	2201变异	2245变异	2290变异
HBV-GN组	19	13(68.4)	2(10.5)	16(84.2)	15(78.9)	17(89.5)
乙型肝炎组	22	11(50.0)	9(40.9)	15(68.2)	18(81.8)	17(77.3)
$\chi^2$ 值		1.425	4.794	0.684	0.000	0.383
$P$ 值		>0.05	<0.05	>0.05	>0.05	>0.05

表 3 乙型肝炎肾炎组及乙型肝炎组患者HBV C区变异位点的比较  $n(\%)$

分组	$n$	2005变异T→A	2011变异G→C	2201变异T→C	2245变异C→T	2290变异C→T
HBV-GN组	19	12(63.2)	2(10.5)	16(84.2)	15(78.9)	16(84.2)
乙型肝炎组	22	9(40.9)	4(18.2)	11(50.0)	14(63.6)	11(50.0)
$\chi^2$ 值		2.020	0.062	5.306	1.154	5.306
$P$ 值		>0.05	>0.05	<0.05	>0.05	<0.05

表 4 HBV-GN组及乙型肝炎组患者生化指标的比较 (mean  $\pm$  SD)

分组	ALT(U/L)	AST(U/L)	HBV DNA定量(copies/mL)
HBV-GN组	78 $\pm$ 19.2	49 $\pm$ 14.0	4.28 $\pm$ 0.98 $\times 10^4$
乙型肝炎组	80 $\pm$ 18.4	50 $\pm$ 12.3	2.97 $\pm$ 0.68 $\times 10^4$
$t$ 值	0.340	0.244	4.62 $\times 10^2$
$P$ 值	>0.05	>0.05	<0.05

nt2201 T→C和 nt2290 C→T与HBV-GN的发病可能有相关性.

王朝晖 *et al*<sup>[9]</sup>对338例经肾穿刺证实的肾炎患者病毒血清学特点进行分析,在血HBsAg(+)的肾炎患者中,HBV相关肾炎发病与体内HBV DNA复制程度密切相关.而本实验结果中可见HBV DNA在HBV-GN组高于乙型肝炎组( $P<0.05$ ),但肝功的改变在两组中无显著差别,这与上述报道相符合.

本实验结果证实,HBV CP区、C区基因多位点变异与HBV-GN的发病具有相关性,但是否HBV-GN与HBV基因突变导致HBV持续感染、病毒复制增加尚需大量的临床研究以进一步证实.在HBV-GN的病例中,以HBsAg与HBcAg沉积最为多见<sup>[10]</sup>,其次为HBcAg沉积.

总之,HBV-GN易感性与HBV基因变异可能有相关性,这有助于深入了解HBV变异株在HBV-GN发病机理中的作用以及临床上通过对乙型肝炎患者进行HBV常见变异位点进行检测,来判断是否增加了发生HBV-GN的危险性.此外,可寻找药物作用的新靶点,开发新的抗乙型

肝炎药,为HBV-GN的治疗提供新的方向.但鉴于样本量及地区性的限制,本研究结果还需要大规模多中心的流行病学研究进一步证实.此外,由于肝炎的发生取决病毒与宿主两方面,任何引起宿主免疫反应的改变都可能引起病情的变化,有的变异株可在某一宿主引起HBV-GN,而在另一宿主却引起慢性肝炎或重肝,故HBV-GN的发生除病毒变异外,还可能与病毒亚型、宿主免疫状态、细胞因子和组织相容性白细胞抗原有关.

### 4 参考文献

- Combes B, Shorey J, Barrera A, Stastny P, Eigenbrodt EH, Hull AR, Carter NW. Glomerulonephritis with deposition of Australia antigen-antibody complexes in glomerular basement membrane. *Lancet* 1971; 2: 234-237
- 闫伯英. 乙型肝炎病毒变异的临床研究进展. *国际病毒学杂志* 2006; 13: 29-32
- 中华医学会儿科学分会肾脏病学组. 乙型肝炎病毒相关肾炎的诊断和治疗(草案). *中国实用儿科杂志* 2003; 18: 189
- 雷春亮, 彭晓谋, 顾琳, 陈雪娟, 杨湛, 唐小平. HBeAg阴性慢性乙型肝炎患者出现前C和基本核启动子联合突变的意义. *中华传染病杂志* 2005; 23: 10-13
- Jammeh S, Tavner F, Watson R, Thomas HC, Karayiannis P. Effect of basal core promoter and pre-core mutations on hepatitis B virus replication. *J Gen Virol* 2008; 89: 901-909
- Kaneko M, Uchida T, Moriyama M, Arakawa Y, Shikata T, Gotoh K, Mima S. Probable implication of mutations of the X open reading frame in the onset of fulminant hepatitis B. *J Med Virol* 1995; 47: 204-208
- Papatheodoridis GV, Hadziyannis SJ. Diagnosis and management of pre-core mutant chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2001; 8: 311-321
- Ehata T, Omata M, Yokosuka O, Hosoda K, Ohto M.

- Variations in codons 84-101 in the core nucleotide sequence correlate with hepatocellular injury in chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Invest* 1992; 89: 332-338
- 9 王朝晖, 陈楠, 徐正义, 任红, 傅秀兰, 张文, 陆志檬. 乙型肝炎病毒相关肾炎临床与病毒血清学特点关联研究. *上海医学* 2001; 24: 674-676
- 10 Iida H, Izumino K, Asaka M, Kameyama T, Takata M, Mizumura Y, Sasayama S. Membranoproliferative glomerulonephritis associated with chronic hepatitis B in adults: pathogenetic role of HBsAg. *Am J Nephrol* 1987; 7: 319-324

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)消化系疾病诊治边缘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



# 胆总管结石与幽门螺旋杆菌感染的关系

宋敏, 吴杰, 王萍, 黄晓东, 张姮, 郑丹, 苏艳

## ■背景资料

近年来, 国内外大量研究表明胆囊结石患者中存在幽门螺旋杆菌(*H pylori*)感染, 而有关胆总管结石患者*H pylori*感染研究报道甚少。

宋敏, 吴杰, 王萍, 黄晓东, 张姮, 郑丹, 苏艳, 武汉市中心医院消化内科 湖北省武汉市 430014

**作者贡献分布:** 宋敏、吴杰、王萍、黄晓东、张姮、郑丹及苏艳对此文所作贡献均等; 此课题由宋敏、吴杰、王萍、黄晓东、张姮、郑丹及苏艳设计; 研究过程由宋敏、吴杰、王萍、黄晓东、张姮、郑丹及苏艳操作完成; 研究用新试剂及分析工具由宋敏、吴杰、王萍、黄晓东、张姮、郑丹及苏艳提供; 数据分析由宋敏完成; 本论文写作由宋敏完成。

**通讯作者:** 王萍, 主任医师, 430014, 湖北省武汉市, 武汉市中心医院消化内科。zxwywp@163.com

收稿日期: 2009-05-28 修回日期: 2009-07-15

接受日期: 2009-07-27 在线出版日期: 2009-08-18

## Relationship between common duct stones and *Helicobacter pylori* infection

Min Song, Jie Wu, Ping Wang, Xiao-Dong Huang, Heng Zhang, Dan Zheng, Yan Su

Min Song, Jie Wu, Ping Wang, Xiao-Dong Huang, Heng Zhang, Dan Zheng, Yan Su, Department of Gastroenterology, the Central Hospital of Wuhan, Wuhan 430014, Hubei Province, China

Correspondence to: Doctor Ping Wang, Department of Gastroenterology, the Central Hospital of Wuhan, Wuhan 430014, Hubei Province, China. zxwywp@163.com

Received: 2009-05-28 Revised: 2009-07-15

Accepted: 2009-07-27 Published online: 2009-08-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the rate of *Helicobacter pylori* (*H pylori*) infection in patients with common duct stones and analyze the relationship between common duct stones and *H pylori* infection.

**METHODS:** One hundred and five patients with common duct stones (experiment group) and 132 control subjects (control group) were included in the study. All the patients underwent electronic gastroscopy, rapid urease test and <sup>14</sup>C urea breath test (<sup>14</sup>C-UBT).

**RESULTS:** Sixty-eight patients in the experiment group were positive for *H pylori*, while 51 subjects in the control group were positive for *H pylori*. The rate of *H pylori* infection in the experiment group was significantly higher (64.8% vs 38.6%,  $P < 0.01$ ) than that in the control group.

**CONCLUSION:** The rate of *H pylori* infection is

high in patients with common duct stones, and *H pylori* infection may be related to the morbidity of common duct stones.

**Key Words:** *Helicobacter pylori*; Common duct stones; Peptic ulcer

Song M, Wu J, Wang P, Huang XD, Zhang H, Zheng D, Su Y. Relationship between common duct stones and *Helicobacter pylori* infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(23): 2426-2428

## 摘要

**目的:** 研究胆总管结石患者幽门螺旋杆菌(*H pylori*)感染率, 并进行临床分析。

**方法:** 采用对照研究方法, 对胆总管结石患者(实验组)105例和对照就诊者(对照组)132例行电子胃镜检查, 内镜下快速尿素酶以及<sup>14</sup>C呼气试验(<sup>14</sup>C-UBT)检查*H pylori*感染。

**结果:** 实验组*H pylori*阳性患者68例, *H pylori*感染率为64.8%。对照组*H pylori*阳性就诊者51例, 占38.6%。2组比较具有统计学差异( $P < 0.01$ )。

**结论:** 胆总管结石患者中存在*H pylori*高感染率, *H pylori*与胆总管结石的发病可能存在一定联系。

**关键词:** 幽门螺旋杆菌; 胆总管结石; 消化性溃疡

宋敏, 吴杰, 王萍, 黄晓东, 张姮, 郑丹, 苏艳. 胆总管结石与幽门螺旋杆菌感染的关系. 世界华人消化杂志 2009; 17(23): 2426-2428

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2426.asp>

## 0 引言

近年来, 国内外大量研究表明胆囊结石患者中存在幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)感染<sup>[1-7]</sup>, 而有关胆总管结石患者*H pylori*感染的研究报道甚少。为了研究胆总管结石患者*H pylori*感染率, 本课题组选取2005-01/2009-03在本院就诊的胆总管结石患

## ■同行评议者

林志辉, 教授, 福建省立医院消化内科

者105例, 内镜下逆行胰胆管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)术前均给予电子胃镜检查, 内镜下快速尿素酶及 $^{14}\text{C}$ 呼气试验( $^{14}\text{C}$ -UBT), 其结果报道如下。

## 1 材料和方法

1.1 材料 选取2005-01/2009-03在本院就诊的胆总管结石患者105例为实验组, 其中男58例, 女47例, 男女之比为1.2:1, 年龄19-77(均龄 $65\pm 3$ )岁。选取具有上腹不适症状, 肝胆胰彩超提示未见明显异常的就诊者132例为对照组。实验组患者临床表现为黄疸, 上腹痛, 寒战, 发热, 反酸, 暖气, 恶心, 呕吐, 黑便等, 其中黄疸97例(占92.3%), 上腹痛88例(占83.8%), 反酸、暖气47例(占44.8%), 寒战、发热43例(占41.0%), 恶心、呕吐3例(占2.9%), 解黑便2例(占1.9%)。

1.2 方法 实验组及对照组患者均给予电子胃镜, 内镜下快速尿素酶及 $^{14}\text{C}$ -UBT检查。胃镜前常规禁食, 水12 h以上, 经内镜取胃窦部黏膜组织1小块, 作快速尿素酶试验, 试剂采用福建三强生物化工有限公司生产的*H pylori*快速诊断试剂。所有患者按标准方法做 $^{14}\text{C}$ -UBT检查,  $^{14}\text{C}$ -UBT试剂盒由深圳市中核海得威生物科技有限公司提供。认为内镜下快速尿素酶检查阳性或 $^{14}\text{C}$ -UBT结果阳性患者为*H pylori*阳性患者; 内镜下快速尿素酶检查阴性及 $^{14}\text{C}$ -UBT结果均阴性患者为*H pylori*阴性患者。

**统计学处理** 对实验组与对照组的胃镜报告, 内镜下快速尿素酶检查及 $^{14}\text{C}$ -UBT结果进行归纳分析, 比较两组*H pylori*感染率是否存在差异, 采用SPSS11.5统计学软件进行统计学分析。

## 2 结果

2.1 *H pylori*感染率 实验组*H pylori*阳性患者68例, 占胆总管结石患者总数64.8%。对照组*H pylori*阳性患者51例, 占该组就诊者的38.6%。实验组*H pylori*感染率明显高于对照组(64.8% vs 38.6%) 两组间有统计学差异( $P<0.01$ )。

2.2 胃镜镜下表现 胃镜检查发现, 实验组105例患者中, 消化性溃疡39例, 占实验组患者的37.1%(其中十二指肠溃疡患者27例, 占25.7%, 胃溃疡患者10例, 占9.5%, 复合性溃疡2例, 占1.9%), 胃炎患者65例, 占61.9%, 胃癌患者1例, 占1.0%。部分消化性溃疡患者治疗后溃疡愈合择期行ERCP+EST+取石术, 1例胃癌患者转外科手术, 余患者顺利进行ERCP+EST+取石术。

对照组132例患者中, 消化性溃疡26例, 占对照组患者的19.7%(其中十二指肠溃疡患者13例, 占9.8%, 胃溃疡患者12例占9.1%, 复合性溃疡1例, 占0.8%), 胃炎患者106例, 占80.3%。

2.3 不同胃镜镜下表现患者*H pylori*感染率分析 实验组105例患者中, 消化性溃疡39例(其中十二指肠溃疡患者27例, *H pylori*阳性患者26例, 胃溃疡患者10例, *H pylori*阳性患者9例, 复合性溃疡2例, *H pylori*阳性患者2例), 胃炎患者65例, *H pylori*阳性患者31例, 胃癌患者1例, *H pylori*阴性。对照组132例患者中, 消化性溃疡26例(其中十二指肠溃疡患者13例, *H pylori*阳性患者9例, 胃溃疡患者12例, *H pylori*阳性患者8例, 复合性溃疡1例, *H pylori*阳性患者1例), 胃炎患者106例, *H pylori*阳性患者33例。

十二指肠溃疡患者中, 胆总管结石患者*H pylori*感染率明显高于对照组(96.3% vs 69.2%), 两组间有统计学差异( $P<0.05$ )。胃炎患者中, 胆总管结石患者*H pylori*感染率明显高于对照组(47.7% vs 31.1%), 两组间有统计学差异( $P<0.05$ )。胃溃疡患者中, 胆总管结石患者*H pylori*感染率高于对照组(90.0% vs 66.7%), 但两组间比较无统计学差异( $P>0.05$ )。

## 3 讨论

近年来, 国内外大量研究表明胆囊结石患者中存在*H pylori*感染, *H pylori*参与了胆囊结石的发生发展<sup>[1-7]</sup>。国内学者曹月敏 *et al*<sup>[6]</sup>采用PCR方法发现*H pylori* DNA存在于胆囊结石患者的胆汁及结石中并认为*H pylori*感染与胆囊结石形成有关。李霆 *et al*<sup>[7]</sup>对37例原发性肝内胆管结石患者胆汁及肝内胆管黏膜组织中*H pylori* DNA进行PCR检测发现, 原发性肝内胆管结石与*H pylori*感染相关。而有关胆总管结石与*H pylori*感染的研究, 国内外报道鲜见。

本研究结果表明, 胆总管结石患者的*H pylori*感染阳性率为64.8%。如此高的*H pylori*阳性感染率, 我们推测, *H pylori*参与了胆总管结石的发生发展。国内方驰华 *et al*<sup>[8]</sup>采用PCR技术对胆囊结石患者的胆汁、黏膜、结石和门静脉血细菌群进行同步研究发现胆汁中存在*H pylori* DNA, 而门脉血液及淋巴系统中均未检测到*H pylori* DNA, 故而推测胆汁中的*H pylori*可能系十二指肠逆流所致。此研究也为*H pylori*参与胆总管结石的发生发展奠定了基础。

*H pylori*参与胆总管结石形成的机理尚不

### ■ 相关报道

国内学者曹月敏 *et al*采用PCR方法发现*H pylori* DNA存在于胆囊结石患者的胆汁及结石中并认为*H pylori*感染与胆囊结石形成有关。李霆 *et al*对37例原发性肝内胆管结石患者胆汁及肝内胆管黏膜组织中*H pylori* DNA进行PCR检测发现, 原发性肝内胆管结石与*H pylori*感染相关。

### 同行评价

本研究立意尚可,内容具有一定的意义。

十分明确,目前相关报道鲜见。可能与*H pylori*感染导致胆道运动功能障碍,病理性迷走神经亢进等有关。关于*H pylori*感染所致胆道运动障碍的原因可能为*H pylori*感染易引起消化性溃疡的发生。我们的研究表明,105例胆总管结石患者中,消化性溃疡39例(其中十二指肠溃疡患者27例,占25.7%,胃溃疡患者10例,占9.5%,复合性溃疡2例,占1.9%)。反复溃疡刺激,使得溃疡周围纤维组织增生挛缩,十二指肠显著缩短,导致幽门至胆胰管壶腹部的距离缩短<sup>[9-10]</sup>。加上溃疡慢性炎症、穿孔与胆道的慢性粘连,二者因素可能使胆道正常解剖位置发生改变,致胆道梗阻胆汁滞留形成结石。另外,*H pylori*感染可导致神经功能紊乱引起胆囊、胆总管括约肌的痉挛,致使胆汁滞留不易排出而形成结石。本研究结果表明,十二指肠溃疡及胃炎患者中,实验组*H pylori*感染率高于对照组,两组间有统计学差异( $P < 0.05$ );而胃溃疡患者中,实验组*H pylori*感染率虽高于对照组,但两组间比较并无统计学差异( $P > 0.05$ )。这一结果可能与样本量较小有关。

总之,我们认为胆总管结石患者中存在*H pylori*高感染率,*H pylori*与胆总管结石的发病可能存在一定联系。但要在胆总管结石患者胆石中发现*H pylori*,真正揭示*H pylori*在胆总管结石发病

机制中的作用,仍有待于进一步研究。

### 4 参考文献

- 1 顾建平,黄桂余,徐子平,丁军彬,肖立俊,曹亦鸥,姜志宏,蔡劬,田志杰,蒋兆彦,韩天权,张圣道. 胆固醇结石患者胆道系统幽门螺杆菌研究. 中国普通外科杂志 2005; 14: 618-620
- 2 张卫红. 胆结石患者胆囊黏膜及胆汁和结石中幽门螺杆菌DNA的检测. 广西医学 2007; 29: 339-340
- 3 Stalke P, Al-Soud WA, Bielawski KP, Bakowska A, Trocha H, Stepinski J, Wadström T. Detection of Helicobacter species in liver and stomach tissues of patients with chronic liver diseases using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis and immunohistochemistry. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 1032-1041
- 4 黄成,吴志棉,郑朝旭,李勇,谭敏,樊嘉. 胆囊切除术与幽门螺杆菌感染关系的研究. 中国普外基础与临床杂志 2004, 11: 338-340
- 5 Fox JG, Dewhirst FE, Shen Z, Feng Y, Taylor NS, Paster BJ, Ericson RL, Lau CN, Correa P, Araya JC, Roa I. Hepatic Helicobacter species identified in bile and gallbladder tissue from Chileans with chronic cholecystitis. *Gastroenterology* 1998; 114: 755-763
- 6 曹月敏,张万星,郭怀斌,彭彦辉,王兰辉,谭文科,宁殿宾. 幽门螺杆菌与胆囊结石形成关系的研究. 中国微创外科杂志 2005; 5: 674-675
- 7 李霆,孟翔凌. 幽门螺杆菌与原发肝内胆管结石的关系. 中华消化外科杂志 2007; 6: 58-60
- 8 方驰华,康惠广. 胆囊结石胆汁、粘膜、结石幽门螺杆菌与结石核心形成的关系. 世界华人消化杂志 1999; 7: 233-235
- 9 徐成君,张光远. 溃疡病伴胆道疾患17例临床分析. 实用外科杂志 1986; 6: 302
- 10 吴彩星. 溃疡胆石综合征5例的治疗体会. 腹部外科 1992; 5: 120

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 •

## WJG 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, WJG*)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 2009-08-18)



# 复方苦参结肠溶胶囊对溃疡性结肠炎患者的治疗作用及其机制

范恒, 庄雄, 段雪云, 梁丽, 廖奕, 唐庆

范恒, 庄雄, 梁丽, 廖奕, 唐庆, 华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科 湖北省武汉市 430022  
段雪云, 湖北中医学院附属医院药剂科 湖北省武汉市 430061  
国家自然科学基金资助项目, No. 30772878  
作者贡献分布: 此课题由范恒设计; 研究过程由范恒、庄雄及段雪云操作完成; 数据分析与论文写作由范恒完成。  
通讯作者: 范恒, 副教授, 副主任医师, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科。fanheng009@yahoo.com.cn  
电话: 027-85726395  
收稿日期: 2009-04-04 修回日期: 2009-05-05  
接受日期: 2009-07-30 在线出版日期: 2009-08-18

## Therapeutic effects of colonic-coated compound lightyellow sophora root capsules in patients with ulcerative colitis and mechanisms underlying such effects

Heng Fan, Xiong Zhuang, Xue-Yun Duan, Li Liang, Yi Liao, Qing Tang

Heng Fan, Xiong Zhuang, Li Liang, Yi Liao, Qing Tang, Department of Integrated Chinese and Western Medicine, Union Hospital, Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China  
Xue-Yun Duan, Department of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei Province, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30772878

Correspondence to: Professor Heng Fan, Department of Integrated Chinese and Western Medicine, Union Hospital, Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. fanheng009@yahoo.com.cn  
Received: 2009-04-04 Revised: 2009-05-05  
Accepted: 2009-07-30 Published online: 2009-08-18

### Abstract

**AIM:** To investigate the therapeutic effects of colonic-coated compound lightyellow sophora root capsules (CCLSRC) in patients with ulcerative colitis (UC) and explore the mechanisms underlying such effects.

**METHODS:** Twenty-four patients diagnosed with ulcerative colitis by colonoscopy and biop-

sy were randomly divided into two groups: Chinese medicine treatment (CMT) group ( $n = 16$ ) and Western medicine treatment (WMT) group ( $n = 8$ ). Patients in the CMT group were treated with CCLSRC for eight weeks, while those in the WMT group were treated with mesalazine for the same duration. The positive expression rates of I $\kappa$ B- $\alpha$  in colonic mucosa in all patients were examined by immunohistochemistry before and after treatment.

**RESULTS:** The total response rates achieved in the CMT group and WMT group were 93.75% and 87.50%, respectively, with no significant difference between the two groups ( $P > 0.05$ ). The positive expression rate of I $\kappa$ B- $\alpha$  was higher in pretreated patients than in post-treated ones ( $25.6\% \pm 2.9\%$  vs  $21.5\% \pm 4.9\%$ ,  $23.5\% \pm 5.6\%$  vs  $21.8\% \pm 5.0\%$ , both  $P < 0.01$ ). After treatment, no significant difference was observed in the positive expression rate of I $\kappa$ B- $\alpha$  between the two groups ( $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** CCLSRC exerts good curative effects against UC perhaps through inhibition of I $\kappa$ B- $\alpha$  expression in colonic mucosa.

**Key Words:** Colonic-coated Compound Lightyellow Sophora Root Capsule; Mesalazine; Ulcerative colitis; Nuclear transcription factor-kappa B

Fan H, Zhuang X, Duan XY, Liang L, Liao Y, Tang Q. Therapeutic effects of colonic-coated compound lightyellow sophora root capsules in patients with ulcerative colitis and mechanisms underlying such effects. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(23): 2429-2432

### 摘要

**目的:** 观察复方苦参结肠溶胶囊对溃疡性结肠炎(UC)患者的治疗作用以及对结肠黏膜 I $\kappa$ B- $\alpha$ 蛋白的表达作用, 并探讨其作用机制。

**方法:** 经结肠镜及病理证实的 UC 患者 24 例, 随机分为复方苦参组和美沙拉嗪组, 复方苦参组 16 例用复方苦参结肠溶治疗, 美沙拉嗪组 8 例用美沙拉嗪治疗, 共治疗 8 wk。采用免疫组

### 背景资料

溃疡性结肠炎(UC)属炎症性肠病之一, 是一种原因不明的直肠和结肠炎性疾病。祖国医学文献中虽无“溃疡性结肠炎”病名记载, 但依据典型临床特点, 认为 UC 属于“痢疾”“肠僻”的范畴, 因患者一般表现有缓解期、发作期不同, 病程长, 易复发, 故应属“痢疾”中“休息痢”(慢性复发型)或“久痢”(慢性持续型)的范畴。

### 同行评议者

张声生, 教授, 首都医科大学附属北京中医医院消化中心

## ■ 研究前沿

目前UC病因与发病机制尚不十分明确,但已明确免疫反应异常是其发病中的重要环节.研究证实Toll样受体(TLRs)/核转录因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)通路在炎症性肠病(IBD)的发生发展中占举足轻重的地位,而NF- $\kappa$ B的抑制蛋白(I $\kappa$ B)是此通路的中间环节.

织化学法检测患者治疗前后I $\kappa$ B- $\alpha$ 蛋白的阳性细胞表达率.

**结果:**复方苦参组总有效率为93.75%,美沙拉嗪组为87.50%,2组差异无统计学意义( $P>0.05$ ).复方苦参组和美沙拉嗪组治疗前结肠黏膜I $\kappa$ B- $\alpha$ 蛋白阳性细胞表达率明显高于治疗后(25.6% $\pm$ 2.9% vs 21.5% $\pm$ 4.9%, 23.5% $\pm$ 5.6% vs 21.8% $\pm$ 5.0%,均 $P<0.01$ ),治疗后复方苦参组结肠黏膜I $\kappa$ B- $\alpha$ 蛋白阳性细胞表达率与美沙拉嗪组无明显统计学意义( $P>0.05$ ).

**结论:**复方苦参结肠溶胶囊对UC患者具有较好的治疗作用,治疗后患者结肠黏膜I $\kappa$ B- $\alpha$ 蛋白阳性细胞表达率明显降低,这可能是其作用机制之一.

**关键词:**复方苦参结肠溶;美沙拉嗪;溃疡性结肠炎;核转录因子 $\kappa$ B

范恒, 庄雄, 段雪云, 梁丽, 廖奕, 唐庆. 复方苦参结肠溶胶囊对溃疡性结肠炎患者的治疗作用及其机制. 世界华人消化杂志 2009; 17(23): 2429-2432

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2429.asp>

## 0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)属炎症性肠病之一,是一种原因不明的直肠和结肠炎性疾病<sup>[1]</sup>.其主要临床特征为反复发作和持续发作的腹泻,黏液脓血便,腹痛,里急后重. UC在欧美国家患病率为40-100/10万,在国内未见精确的统计报告数据,随着国内居民生活方式和饮食结构的巨大变化,近年来其发病率有明显增高的趋势<sup>[2]</sup>.虽然目前UC病因与发病机制尚不十分明确,但已明确免疫反应异常是其发病中的重要环节<sup>[3-4]</sup>.研究证实Toll样受体(toll-like receptors, TLRs)/核转录因子 $\kappa$ B(nuclear transcription factor-kappa B, NF- $\kappa$ B)通路在炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的发生发展中占举足轻重的地位<sup>[5]</sup>,而NF- $\kappa$ B的抑制蛋白(I $\kappa$ B)是此通路的中间环节<sup>[6]</sup>.复方苦参结肠溶胶囊由苦参、地榆、青黛、白及等组成,具有生肌止血、消肿敛疮、清热解毒、燥湿、杀虫、凉血止血之功效,治疗UC(湿热内蕴证)疗效明显<sup>[7]</sup>.在此基础上,本研究从NF- $\kappa$ B活化通路的环节入手,对UC患者结肠黏膜I $\kappa$ B- $\alpha$ (inhibitors  $\alpha$  of NF- $\kappa$ B)的蛋白表达进行检测,以期对复方苦参结肠溶胶囊治疗UC作用机制进行较深层次探讨.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 24例UC(湿热内蕴证)患者均为2008-07/2009-02经协和医院内镜中心结肠镜检查 and 病理科病理检查,诊断标准参照中华医学会消化分会2000年成都研讨会对“炎症性肠病诊断治疗规范的建议”及UC湿热内蕴型诊断参考慢性非特异性UC中西医结合诊断、辨证和疗效标准(试行方案)<sup>[8]</sup>.复方苦参结肠溶胶囊为北京中惠药业有限公司开发研制的中药,由苦参、地榆、青黛、白及等组成,每粒0.4 g;美沙拉嗪由上海福达制药有限公司生产,国药准字H31020840,每片0.25 g.兔抗人I $\kappa$ B- $\alpha$ 多克隆抗体为北京中杉金桥生物技术有限公司产品,免疫组织化学试剂盒购自晶美生物工程有限公司.

### 1.2 方法

**1.2.1 诊断及临床严重程度分级标准:** UC诊断及临床严重程度分级参照中华医学会消化病学分会2000年全国炎症性肠病学术研讨会(成都)标准<sup>[8]</sup>, UC湿热内蕴型诊断参考慢性非特异性UC中西医结合诊断、辨证和疗效标准(试行方案)<sup>[9]</sup>.

**1.2.2 纳入标准:** (1)符合UC诊断,类型包括慢性复发型、慢性持续型、初发型,但不包括暴发型,均为活动期.病情包括轻、中、重者;(2)中医辨证为湿热内蕴证;(3)在18-65岁,女性受试者应在试验期间采取严格的避孕措施,或者已进入绝经期、绝经3 mo以上,或者已接受绝育;(4)患者自愿签署知情同意书.

**1.2.3 排除标准:** (1)年龄在18岁以下,或者大于65岁以上者;(2)临床类型为急性暴发型;(3)UC缓解期患者;(4)细菌性痢疾、阿米巴痢、慢性血吸虫病、肠结核等感染性结肠炎及克罗恩病、缺血性肠炎、放射性肠炎患者,结肠癌及直肠癌患者;(5)有严重并发症如局部狭窄、肠梗阻、肠穿孔、直肠腺瘤、中毒性结肠扩张、肛门疾病患者;(6)妊娠或哺乳期妇女;(7)过敏体质或对多种药物(2种以上或对该药中的已知成分)有过敏史者,对水杨酸类药物过敏者;(8)有严重的原发性心、肝、肾、肺、血液系统疾病,哮喘病患者,肾功能异常者,肝功能ALT $\geq$ 正常值2倍以上者;(9)有生育要求的男性患者;(10)正在参加其他药物临床试验的患者;(11)医生认为不宜作为受试者的其他情况.

**1.2.4 患者分组及取材:** 将符合中、西医诊断标准的24例UC患者根据就诊时间先后顺序随机



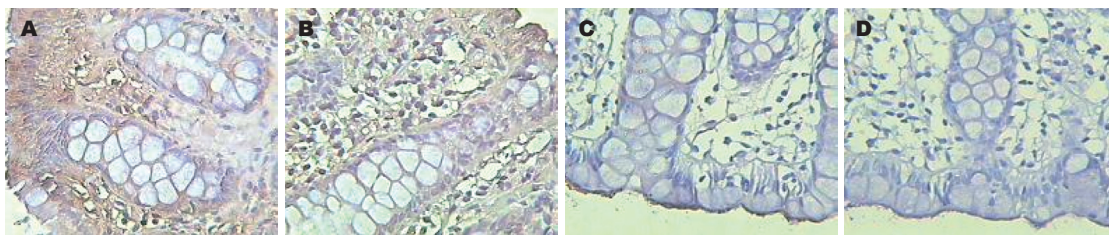


图 1 IκB-α蛋白在结肠组织中的表达(免疫组织化学染色×200). A: 复方苦参组治疗前; B: 美沙拉嗪组治疗前; C: 复方苦参组治疗后; D: 美沙拉嗪组治疗后.

■创新盘点

复方苦参结肠溶胶囊由苦参、地榆、青黛、白及等组成, 具有生肌止血、消肿敛疮、清热解毒、燥湿、杀虫、凉血止血之功效, 治疗UC(湿热内蕴证)疗效明显. 在此基础上, 本研究从NF-κB活化通路的环节入手, 对UC患者结肠黏膜IκB-α的蛋白表达进行检测, 以期对复方苦参结肠溶胶囊治疗UC作用机制进行较深层次探讨.

表 1 两组总体疗效比较

分组	n	完全缓解	有效	无效	总有效率n(%)
复方苦参组	16	7	8	1	15(93.75)
美沙拉嗪组	8	3	4	1	7(87.50)

分成复方苦参组16例和美沙拉嗪组8例, 两组患者在性别、年龄、病程、临床严重程度病变累及部位等差异无显著性(均P>0.05), 具有可比性. 复方苦参组口服复方苦参结肠溶胶囊每次4粒, 每天3次; 美沙拉嗪组口服美沙拉嗪, 每次3片, 每天3次, 疗程均为8 wk. 服药前后均行结肠镜检查并取肠黏膜组织活检, 行石蜡包埋切片.

1.2.5 IκB-α检测: 采用免疫组织化学, 按常规包埋, 切片, 厚度4 μm, 载玻片为防脱片. 用PBS按1:50稀释一抗, 按试剂盒操作说明进行免疫组织化学染色. 在光镜下, 细胞质和细胞核内出现棕黄色颗粒的细胞为IκB-α阳性细胞. 在40倍高倍镜下选取典型视野计数100个细胞, 其中阳性细胞数作为IκB-α计数值, 并以百分率表示.

统计学处理 采用SPSS13.0软件包进行检验, 治疗前后采用配对t检验分析, 组间采用方差分析.

2 结果

2.1 两组临床疗效评定 复方苦参组完全缓解7例, 有效8例, 无效1例, 总有效率93.75%; 美沙拉嗪组完全缓解3例, 有效4例, 无效1例, 总有效率87.50%; 两组总有效率比较,  $\chi^2 = 0.1066, P = 0.94$ , 差异无统计学意义. 说明复方苦参组临床疗效与美沙拉嗪组相当(表1).

2.2 两组治疗前后结肠黏膜IκB-α蛋白表达比较 复方苦参组和美沙拉嗪组2组治疗前结肠黏膜IκB-α蛋白阳性细胞表达率均明显高于治疗后(25.6%±2.9% vs 21.5%±4.9%, 23.5%±5.6% vs 21.8%±5.0%, 均P<0.01); 治疗后复方苦参组结肠黏膜IκB-α蛋白阳性细胞表达率与美沙拉嗪组无明显统计学意义(P>0.05, 图1).

3 讨论

祖国医学文献中虽无“溃疡性结肠炎”病名记载, 但依据典型临床特点, 认为UC属于“痢疾”“肠僻”的范畴, 因患者一般表现有缓解期、发作期不同, 病程长, 易复发, 故应属“痢疾”中“休息痢”(慢性复发型)或“久痢”(慢性持续型)的范畴. 中医对UC的病因病机有系统的认识, 就病因而论, 多责至于感受外邪, 饮食所伤, 情志失调及脾肾亏虚等. 起病机主要为或肝犯脾土、或肾虚中土失养、或湿邪困脾、或寒邪克脾、或饮食所伤、或情志失调, 导致脾失健运, 运化失职, 腐熟水谷失司而引起湿热内蕴, 气机失调, 气血凝滞等而发病.

一般来说, UC是免疫、遗传、环境及肠道细菌等多因素共同作用的结果. 对UC起主要致病作用的细胞因子, 如肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白介素(interleukin, IL)1β、IL-6、IL-8等在转录水平由NF-κB调控<sup>[10]</sup>. 国内外研究表明, NF-κB在UC中呈现过度激活状态, 导致并调控UC患者细胞因子及黏附分子等过度和持续表达, 放大炎症反应, 从而参与了UC肠道的炎症和免疫反应<sup>[11-13]</sup>. NF-κB是一类具有多向转录调节作用的核蛋白因子, NF-κB与IκB结合于细胞质中而使NF-κB处于非活性状态. 外源性刺激因子与TLRs结合形成复合物, 通过信号转导将IκB激酶(IκB kinase, IKK)磷酸化而激活, 活化的IKK再使IκB磷酸化进而被降解, 使得NF-κB从NF-κB-IκB复合物上解离, 发生活化, 进入细胞核, 与相应基因启动子上的特定序列(κB位点)结合, 启动靶基因转录<sup>[14]</sup>. 故IκB的磷酸化是激活NF-κB系统的关键步骤<sup>[13]</sup>, 而IκB是此通路的中间环节<sup>[15]</sup>.

研究发现的IκB家族包括IκB-α、IκB-β、IκB-γ、IκB-ε、Bcl-3、P50/P105(C端)和P100/P52(C端)等<sup>[6,16]</sup>, IκB-α是NF-κB的主要调控蛋白<sup>[17]</sup>. 当激活因素作用于NF-κB信号通路后, IκB-α氨基末端的32和36位丝氨酸在上游激酶



### ■同行评价

本研究设计合理, 结果可靠, 有一定的学术价值。

的作用下发生磷酸化, 磷酸化的I $\kappa$ B- $\alpha$ 氨基末端21和22位赖氨酸在E3泛素连接酶的作用下与泛素分子共价结合, 被泛素化。泛素化使I $\kappa$ B- $\alpha$ 空间构象改变, 从而使其可以被26S蛋白酶体复合物降解。I $\kappa$ B- $\alpha$ 的降解, 使得NF- $\kappa$ B从NF- $\kappa$ B-I $\kappa$ B- $\alpha$ 复合物上解离, 发生活化, 进入细胞核, 与相应基因启动子上 $\kappa$ B位点结合, 启动靶基因转录<sup>[14,18]</sup>, 从而调节炎症递质的产生, 进而导致UC炎症黏膜的损伤, 故I $\kappa$ B- $\alpha$ 与UC的发病密切相关, 通过抑制I $\kappa$ B- $\alpha$ 的磷酸化而抑制NF- $\kappa$ B的活化是治疗UC的途径之一。

现代药理学研究发现, 苦参清热燥湿, 苦参素可抑制多种炎症因子的释放, T细胞及对IL有抑制作用<sup>[19]</sup>; 地榆入大肠经, 凉血收敛止血, 解毒敛疮, 能缩短凝血时间, 并有抗菌作用; 青黛专清肠胃之热, 清除细胞中氧自由基, 下调NF- $\kappa$ B活性, 阻断Fas/FasL; 白芨收敛止血, 消肿生肌, 促进黏膜修复, 具有黏附能力, 将药物黏附于病变组织。诸药相配, 具有清热燥湿, 凉血止血生肌功效。

本研究表明, 复方苦参结肠溶胶囊对UC(湿热内蕴证)的疗效是肯定的。UC患者复方苦参结肠溶及美沙拉嗪治疗前结肠组织I $\kappa$ B- $\alpha$ 蛋白阳性细胞表达率明显高于治疗后各组, 表明I $\kappa$ B- $\alpha$ 的高表达与UC发病密切相关; 复方苦参组及美沙拉嗪阳性对照组I $\kappa$ B- $\alpha$ 阳性细胞表达率无明显统计学意义, 表明复方苦参组对UC患者过量表达的I $\kappa$ B- $\alpha$ 蛋白水平有下调作用, 这可能是复方苦参结肠溶能够抑制NF- $\kappa$ B活性并最终治疗UC的作用。

### 4 参考文献

- Hanauer SB. Medical therapy of ulcerative colitis. *Lancet* 1993; 342: 412-417
- 陈颖, 汪国华. 治疗溃疡性结肠炎的药物进展. *中药研究与信息* 2005; 7: 23-25
- 巫协宁. 炎症性肠病的发病机制新解. *国外医学·消化系统疾病分册* 2004; 24: 323-325
- Fan H, Chen R, Shen L, Lv J, Xiong P, Shou Z,

Zhuang X. Oxymatrine improves TNBS-induced colitis in rats by inhibiting the expression of NF- $\kappa$ B p65. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2008; 28: 415-420

- 张可. NF- $\kappa$ B与炎症性肠病. *国外医学·消化系疾病分册* 2003; 23: 94-96
- Moynagh PN. The NF- $\kappa$ B pathway. *J Cell Sci* 2005; 118: 4589-4592
- 范恒, 寿折星, 吕建芳, 沈霖, 杨胜兰, 陈瑞. 复方苦参结肠溶胶囊治疗溃疡性结肠炎11例. *中国中西医结合消化杂志* 2007; 15: 60-61
- 中华医学会消化病学分会. 对炎症性肠病诊断治疗规范的建议. *中华消化杂志* 2001; 21: 236-239
- 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会. 慢性非特异性溃疡性结肠炎中西医结合诊断、辨证和疗效标准(试行方案). *中国中西医结合杂志* 2004; 24: 1052-1055
- Abreu MT, Vora P, Faure E, Thomas LS, Arnold ET, Arditi M. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 2001; 167: 1609-1616
- Mitsuyama K, Suzuki A, Tomiyasu N, Takaki K, Toyonaga A, Sata M. Transcription factor-targeted therapies in inflammatory bowel disease. *Digestion* 2001; 63 Suppl 1: 68-72
- 甘华田, 欧阳钦, 贾道全, 夏庆杰. 溃疡性结肠炎患者核因子- $\kappa$ B活化与细胞因子基因表达. *中华内科杂志* 2002; 41: 252-255
- 李军华, 于皆平, 何小飞, 徐细明. 核因子- $\kappa$ B在大鼠实验性溃疡性结肠炎肠组织的表达及其意义. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 214-218
- Ponnappan S, Cullen SJ, Ponnappan U. Constitutive degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  in human T lymphocytes is mediated by calpain. *Immun Ageing* 2005; 2: 15
- 高小玲. I $\kappa$ B激酶的研究进展. *国外医学·临床生物化学与检验学分册* 2004; 25: 539-541
- Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D, Miyamoto S. Rel/NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* 1995; 9: 2723-2735
- Baldwin AS Jr. The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 649-683
- 陈丹英, 翟中和, 舒红兵. NF- $\kappa$ B激活的调节机理. *科学通报* 2003; 48: 1893-1911
- 吕建芳, 范恒, 沈霖, 寿折星, 庄雄. 氧化苦参碱对实验性结肠炎大鼠肠黏膜细胞因子和核因子- $\kappa$ B p65表达的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2289-2294

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

## 不同成分血浆滤过透析治疗重型肝炎患者56例

王宇, 郭利民, 熊号峰, 董庆华

王宇, 郭利民, 熊号峰, 董庆华, 北京地坛医院危重病救治中心 北京市 100015

作者贡献分布: 王宇完成此文章绝大部分工作, 郭利民予以指导; 熊号峰与董庆华协助查资料。

通讯作者: 王宇, 主治医师, 100015, 北京市朝阳区京顺东街8号, 北京地坛医院危重病救治中心. ruixin20001@yahoo.com.cn 电话: 010-84322678

收稿日期: 2009-07-28 修回日期: 2009-08-17

接受日期: 2009-08-17 在线出版日期: 2009-08-18

### Treatment of patients with liver failure using fractional plasma diafiltration: an analysis of 56 cases

Yu Wang, Li-Min Guo, Hao-Feng Xiong, Qing-Hua Dong

Yu Wang, Li-Min Guo, Hao-Feng Xiong, Qing-Hua Dong, Center of Critical Illness, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100015, China

Correspondence to: Yu Wang, Center of Critical Illness, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100015, China. ruixin20001@yahoo.com.cn

Received: 2009-07-27 Revised: 2009-08-17

Accepted: 2009-08-17 Published online: 2009-08-18

### Abstract

**AIM:** To evaluate the efficacy and safety of different types of plasma separators in patients with liver failure through comparing changes in clinical biochemical parameters between before and after fractional plasma diafiltration (FPDF).

**METHODS:** A cohort of 56 patients who underwent FPDF from 2004 to 2007 were included in the study. Three different types of plasma separators (evacure EC-2A, EC-3A and EC-4A) were used for comparative evaluation. Biochemical parameters such as TBIL, DBIL, TBA, CHE, TP, ALB, PTA, INR, PLT, BUN, CR and NH<sub>3</sub> were monitored before and after treatment.

**RESULTS:** Following treatment, patients showed significant improvement in liver and coagulation function, and partial improvement in renal function (all  $P < 0.05$ ). Evacure EC-4A plasma separator performed better than the other two types of plasma separators in eliminating toxins (both  $P < 0.05$ ), but loss of albumin was

observed. Though evacure EC-2A plasma separator performed better than the other two types of plasma separators in clearing BUN and CR, the treatment duration was relatively long (both  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** FPDF is effective for patients with liver failure. Different types of fractional plasma separators should be selected based on specific needs. Evacure EC-3A plasma separator is recommended for routine treatment.

**Key Words:** Fractional plasma separator; Plasma diafiltration; Liver failure

Wang Y, Guo LM, Xiong HF, Dong QH. Treatment of patients with liver failure using fractional plasma diafiltration: an analysis of 56 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(23): 2433-2437

### 摘要

**目的:** 通过检测成分血浆滤过透析(fractional plasma dia-filtration, FPDF)前后生化指标, 评价不同成分血浆分离器的临床生化指标变化。

**方法:** 收集我科2004-2007年行FPDF治疗的患者56例(110次), 选用EC-2A、EC-3A和EC-4A 3种蛋白分离器进行对照评价性治疗, 根据蛋白分离器型号将患者随机分成2A、3A、4A 3组, 分别记录其治疗前后TBIL、DBIL、TP、ALB、CHE、PTA、INR、PLT及BUN、CR、NH<sub>3</sub>等值, 并行统计学分析。

**结果:** 治疗前后肝功及凝血各项指标均有明显改善, 同时患者肾功能指标亦得到一定的改善( $P < 0.05$ )。各组之间, 4A组对蛋白结合毒素清除效果优于其他2组( $P < 0.05$ ), 但同时伴有ALB的丢失。2A组对BUN、CR的清除效果优于其他2组( $P < 0.05$ ), 但相对治疗时间较长。

**结论:** FPDF可作为重肝患者治疗的有效手段。在治疗过程建议根据患者情况选择不同成分血浆分离器, 在临床上推荐使用3A作为常规使用治疗方式。

**关键词:** 成分血浆分离器; 血浆滤过透析; 肝功能

### ■背景资料

各种原因所致的肝脏功能衰竭(LFF)及其并发症(肝肾综合征、肝性脑病、多脏器衰竭等)临床上十分常见, 一般内科治疗效果差, 临床死亡率一直居高不下, 成为危及肝病患者生命的主要原因之一。非生物人工肝治疗延长患者生存时间, 从内科治疗过渡到肝移植。

### ■同行评议者

田宇彬, 教授, 青岛大学医学院附属医院消化内科

## ■相关报道

2002年,日本Mori *et al*报道了PDF这一新颖的技术,PDF是使用血浆分离器进行HDF.由于滤器的孔径较血滤器大,在透析滤过过程中会有血浆的丢失,丢失的那部分血浆用FFP从后稀释液中补充.

## 衰竭

王宇, 郭利民, 熊号峰, 董庆华. 不同成分血浆滤过透析治疗重型肝炎患者56例. 世界华人消化杂志 2009; 17(23): 2433-2437  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2433.asp>

## 0 引言

各种原因所致的肝脏功能衰竭(liver function failure, LFF)及其并发症(肝肾综合征、肝性脑病、多脏器衰竭等)临床上十分常见,一般内科治疗效果差,临床死亡率一直居高不下,成为危及肝病患者生命的主要原因之一<sup>[1]</sup>.人工肝支持系统(artificial liver support system, ALSS)被认为是治疗重型肝炎患者的有效方法而受到广泛关注并应用于临床上<sup>[2-3]</sup>.其中非生物人工肝原理是通过暂时和部分替代肝脏功能,为肝细胞再生创造条件和赢得时间,促进肝功能自发恢复,或者在肝脏损伤严重的情况下,通过非生物人工肝治疗延长患者生存时间,从内科治疗过渡到肝移植<sup>[4]</sup>.目前常用的非生物人工肝治疗方法包括,血浆置换(plasma exchange, PE)、分子吸附再循环(molecular adsorbents recycling system, MARS)、血浆吸附(plasma absorption, PA)、连续性血液滤过(continuous venovenous hemofiltration, CVVH)和血浆滤过透析(fractional plasma dia-filtration, FPDF)等<sup>[5]</sup>.现将我院2004-2007年间收治的56例重型肝炎患者,行成分血浆滤过透析(fractional plasma dia-filtration, FPDF)治疗前后生化指标改变作一回顾性分析.

## 1 材料和方法

1.1 材料 2004-11/2007-12, 我院住院的接受FPDF治疗的肝衰竭者56例,男42例、女14例.其中急性肝衰2例,亚急性肝衰5例,慢加急性肝衰49例.诊断均符合我国2006年发布的肝衰竭诊治指南中的诊断标准.其中21例患者伴有肝肾综合征(hepatorenal syndrome, HRS), 22例患者伴有肝性脑病(hepatic encephalopathy, HE).患者治疗采用EVACURE血浆成分分离器,其膜孔径小于普通血浆分离器,普通血浆分离器膜孔径为0.2 μm,其白蛋白(albumin, ALB)筛选系数为1;在EC-4A中,分离器膜孔径为0.03 μm, ALB筛选系数为0.75;在EC-3A中,分离器膜孔径为0.02 μm, ALB筛选系数为0.65;在EC-2A中,分离器膜孔径为0.01 μm, ALB筛选系数为0.25;而血滤器的膜孔径通常小于10 nm.蛋白筛选系数在血浆分离器

和血滤器之间,又称“蛋白分离器”.其能根据需要清除一定相对分子质量的蛋白结合毒素.

## 1.2 方法

1.2.1 分组: 选用EC-2A、EC-3A和EC-4A 3种蛋白分离器进行对照评价性治疗,所有接受PDF治疗患者均签署“知情同意书”.根据蛋白分离器型号将患者随即分成2A治疗组、3A治疗组、4A治疗组.在治疗分组中: 2A组中患者8例,其中男6例,女2例,平均年龄43.2±14.5岁,共治疗12次; 3A组中患者28例,其中男20例,女8例,平均年龄44.6±12.4岁,共治疗51次; 4A组中患者20例,其中男16例,女4例,平均年龄49.6±16.1岁,共治疗47次.

1.2.2 FPDF治疗: 使用KURARAY 8900型人工肝血液净化仪,按血液滤过透析后稀释法安装连接管路.血流速度为100-120 mL/min,透析液流速3000 mL/h,超滤速度约300-500 mL/h.新鲜冰冻血浆(fresh frozen plasma, FFP)后稀释量约3000 mL, 2A组治疗时间8-12 h; 3A、4A组治疗时间6 h.

1.2.3 观察指标: 分别记录其治疗前后TBIL、DBIL、TBA、TP、ALB、CHE、PTA、INR、PLT及生化BUN、CR、NH<sub>3</sub>等值并行统计学分析.并对各组之间变化指标进行统计学分析.

统计学处理 用SPSS16.0软件进行统计分析,均值采用mean±SD表示,采用*t*检验,不同组间采用方差分析,所有统计分析显著性水准α=0.05.

## 2 结果

2.1 治疗安全性 各组患者均耐受良好,治疗中血流动力学稳定,无过敏反应,出血以及滤器凝血、破膜等不良事件发生.患者均能顺利完成上述治疗,并于治疗24 h后及时采血送检.

2.2 治疗前后各组蛋白结合毒素和凝血指标变化 治疗前后各组TBIL、DBIL、TBA、TP、CHE变化见表1. 3组治疗前后TBIL、DBIL、TBA、CHE均有了明显的改善( $P<0.05$ );血清TP水平均有了不同程度的提高( $P<0.05$ );对于ALB,在2A、3A组中,结果显示治疗前后其统计学无显著性差异( $P>0.05$ );在4A治疗组中,治疗后,各组患者ALB均有不同程度的下降( $P<0.05$ ),结果显示具有统计学差异.在凝血改善方面(表2),治疗前后PTA指标均显著上升, INR指标显著下降( $P<0.05$ );而在治疗前后,其PLT数值改变无统计学意义,在治疗过程中,各组血小板变化均无统计学意义.



表 1 治疗前后各组蛋白结合毒素指标变化 (mean ± SD)

分组	TBIL(umol/L)	DBIL(umol/L)	TBA(umol/L)	TP(g/L)	ALB(g/L)	CHE(g/L)
2A组						
治疗前	388.6 ± 81.29	203.4 ± 47.96	144.3 ± 89.45	55.80 ± 4.84	29.10 ± 3.12	2981.30 ± 2138.32
治疗后	260.9 ± 95.33	144.1 ± 53.15	125.9 ± 87.30	60.90 ± 3.20	29.90 ± 3.20	5228.70 ± 2238.75
降低幅度	127.8 ± 66.49	73.1 ± 38.28	18.50 ± 27.02	16.40 ± 29.72	0.80 ± 3.84	2247.40 ± 2069.02
t值	4.688	4.791	3.49	-2.496	-0.051	-5.514
P值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05	<0.05
3A组						
治疗前	531.2 ± 168.85	241.5 ± 96.86	187.2 ± 105.33	59.6 ± 7.97	31.2 ± 3.22	3339.1 ± 1596.37
治疗后	343.7 ± 114.01	155.2 ± 73.58	161.1 ± 92.10	63.2 ± 11.4	32.09 ± 4.22	6511.7 ± 2326.51
降低幅度	187.5 ± 83.93	86.2 ± 54.05	23.1 ± 33.11	3.5 ± 9.48	0.9 ± 3.55	3172.7 ± 1752.57
t值	7.98	7.765	4.96	-2.627	2.666	-7.794
P值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05	<0.05
4A组						
治疗前	561.2 ± 176.62	293.0 ± 101.4	179.7 ± 96.1	54.2 ± 5.67	29.7 ± 3.68	2846.4 ± 1655.48
治疗后	296.2 ± 128.51	146.1 ± 69.90	126.8 ± 59.45	57.3 ± 7.57	27.2 ± 3.81	7546.1 ± 2431.93
降低幅度	265.0 ± 142.20	146.9 ± 84.23	52.9 ± 51.6	9.37 ± 4.45	2.5 ± 4.56	4699.7 ± 2870.25
t值	9.95	6.124	3.355	-3.571	6.621	-9.386
P值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

## ■应用要点

FPDF可作为重肝患者治疗的有效手段. 在治疗过程建议根据患者情况选择不同成分血浆分离器, 在临床上推荐使用3A作为常规使用治疗方式.

表 2 治疗前后凝血指标变化 (mean ± SD)

分组	PTA(%)	INR	PLT(×10 <sup>12</sup> /L)
2A组			
治疗前	18.20 ± 9.87	3.17 ± 0.94	54.13 ± 28.95
治疗后	34.60 ± 11.82	2.06 ± 0.78	46.62 ± 19.60
降低幅度	16.65 ± 15.16	1.11 ± 1.15	7.50 ± 9.77
t值	3.106	2.740	2.172
P值	<0.05	<0.05	>0.05
3A组			
治疗前	18.98 ± 14.05	2.56 ± 1.42	89.96 ± 49.12
治疗后	42.27 ± 17.01	1.92 ± 0.96	96.61 ± 58.78
降低幅度	23.29 ± 19.81	0.64 ± 1.47	6.65 ± 29.38
t值	-5.993	2.210	-1.150
P值	<0.05	<0.05	>0.05
4A组			
治疗前	19.47 ± 14.33	2.54 ± 0.80	83.48 ± 61.82
治疗后	42.47 ± 16.13	1.70 ± 0.69	77.10 ± 52.08
降低幅度	23.01 ± 19.14	0.84 ± 0.83	9.38 ± 17.80
t值	5.508	4.636	1.640
P值	<0.05	<0.05	>0.05

在3组中, TBIL、DBIL和TBA降幅均以4A组为高. 在各治疗组中, 上述数值在4A组与3A及2A组之间比较, 均具有显著性差异( $P<0.05$ ), 提示4A组在清除蛋白结合毒素方面具有明显的优势(图1). 在ALB上, 4A组与3A、2A组之间同样存在着统计学差异( $P<0.05$ ), 4A在治疗过程中会丢失更多的ALB. 对于胆碱酯酶, 4A组在治疗中

有明显的提高, 与3A及2A组比较亦存在着明显统计学差异( $P<0.05$ ); 在3A组与2A组的各种数值比较中, 其统计学无差异( $P>0.05$ ), 2治疗组在蛋白结合毒素方面, 差值无统计学意义. 在凝血指标的检测中, 虽各组治疗前后之间有明显提高, 但在各组之间行统计学分析, 3组之间无统计学差异( $P>0.05$ ).

2.3 3组治疗前后水溶性毒素的变化 各组中治疗前后BUN、Cr、NH<sub>3</sub>等水溶性毒素变化, 治疗后各组BUN、Cr和NH<sub>3</sub>水平降低均有非常显著性的差异( $P<0.05$ ). 在3组不同物质清除比较中, 2A组的BUN、Cr清除下降幅度与3A组及4A组具有统计学差异( $P<0.05$ ), 能清除更多的水溶性物质. 而在血氨清除方面, 3组之间无统计学差异(表3).

### 3 讨论

重型肝炎是由多种原因导致的以肝脏大片坏死或凋亡为主要病理基础的临床综合征. 由于肝细胞大量坏死, 肝脏的代谢和屏障功能严重受损, 血清胆红素, 内毒素, 免疫复合物, 血清抑制因子及其他毒素因子等亦明显增加, 这些物质通过各种途径又加重肝细胞的损害, 形成恶性循环<sup>[6]</sup>. 这些毒素根据溶解性可分为水溶性毒素和脂溶性蛋白结合毒素. 传统的PE和血液滤过透析(hemodiafiltration, HDF), 在清除脂溶性毒素和清除水溶性毒素上各有侧重<sup>[7]</sup>.

### 同行评价

本文设计合理, 结果可信, 有一定实际应用价值, 对指导临床有意义。

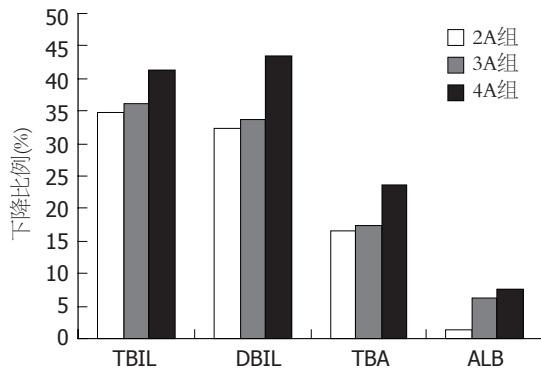


图 1 治疗前后蛋白结合毒素各组下降比例。

单纯血浆置换方法明显降低重症肝病患者血清胆红素、内毒素、中分子物质、肿瘤坏死因子及白介素等炎性介质, 对主要毒物具有非选择性及广泛的去除作用, 有效改善重症肝病患者的生化参数和临床症状<sup>[8-9]</sup>。因此成为国内最常用的人工肝治疗方法。然而, PE治疗也同时存在着一定局限性: 首先血浆置换需要补充大量枸橼酸抗凝的新鲜冰冻血浆((fresh frozen plasma, FFP)<sup>[10]</sup>, 易引起低钙、高钠以及代谢性碱中毒<sup>[11]</sup>; 血浆置换治疗时间相对较短, 在短时间内清除大量体内毒素, 易诱发渗透性脑水肿等不良反应; 同时PE不能有效清除在体内分布容积广的水溶性毒素, 对合并脑水肿、HRS等并发症的晚期肝衰竭患者无干预优势。

基于上述原因, 近年提倡连续血液透析滤过(continuous hemodiafiltration, CHDF)与PE结合在一起, 即PE+CHDF的联合治疗, 可能有望弥补单纯PE的上述缺陷。2002年, 日本Mori *et al*报道了PDF这一新颖的技术, PDF是使用血浆分离器进行HDF。由于滤器的孔径较血滤器大, 在透析滤过过程中会有血浆的丢失, 丢失的那部分血浆用FFP从后稀释液中补充。

而我院于2004年始, 行高流量的PDF。其透析液流量设置为标准床旁透析流量3000 mL/h, 新鲜冰冻血浆补充总量约3000 mL, 治疗时间6-12 h, 以期提高ALB结合毒素和水溶性毒素的清除效率。

高流量PDF在小分子溶质跨膜弥散增强的同时, 必然有蛋白结合物质对流转运的增强, 我们选用EC-2A、EC-3A和EC-4A 3种不同的蛋白分离器进行了对照研究。

根据以上统计结果提示: (1)ALB结合毒素的清除: 高流量PDF治疗各组的TBIL、DBIL平均降幅都达到35%左右, 疗效优于Eguchi报告结果。而在研究的3组中, 4A组的TBIL、DBIL平均

表 3 3组治疗前后水溶性毒素的变化(mean ± SD)

分组	BUN(mmol/L)	CR(Umol/L)	NH3(Umol/L)
2A组			
治疗前	17.4 ± 13.06	244.1 ± 203.09	68.1 ± 25.49
治疗后	11.9 ± 7.78	187.2 ± 147.74	42.8 ± 20.22
降低幅度	5.5 ± 6.87	56.9 ± 71.64	25.3 ± 13.38
P值	<0.05	<0.05	<0.05
3A组			
治疗前	9.97 ± 7.77	129.4 ± 77.91	69.1 ± 40.59
治疗后	7.14 ± 5.83	108.3 ± 53.19	47.8 ± 33.38
降低幅度	2.10 ± 2.26	21.1 ± 31.90	21.3 ± 24.24
P值	<0.05	<0.05	<0.05
4A组			
治疗前	9.03 ± 6.84	137.4 ± 96.57	71.6 ± 47.45
治疗后	6.64 ± 5.32	113.5 ± 56.91	54.3 ± 29.79
降低幅度	2.4 ± 2.37	23.9 ± 52.07	17.3 ± 34.99
P值	<0.05	<0.05	<0.05

降幅达到45%左右, TBA降幅达25%左右, 均明显高于其余2组。说明蛋白分离器膜孔径与ALB结合毒素清除率有关, 膜孔径越大, 清除TBIL等蛋白结合毒素的效率越高。但同时, 大孔径增加了ALB丢失的几率。4A治疗组ALB有明显丢失。治疗结束后易引起患者出现低蛋白血症, 并导致组织水肿, 因此在治疗后, 建议适当补充ALB, 并酌情利尿。而2A组、3A组治疗前后无明显ALB丢失, 不出现上述不良反应。但清除蛋白结合毒素(TBIL、DBIL)能力略有下降。(2)水溶性毒素清除: 水溶性毒素的清除: 由于采用标准床旁透析流量进行血浆透析, 各组治疗前后对BUN、Cr、NH3指标均有了明显改善。说明PDF治疗方法对清除水溶性毒素有明确的治疗作用, 显示出对HRS和肝性脑病的治疗前景。在2A治疗组中, 因治疗时间延长(12 h), 显示出了对BUN、Cr更好的清除能力。而对血氨的清除, 各族之间未能显示出明显的差异, 建议今后设置前瞻性试验, 单独观测各组对肝性脑病治疗效果。(3)凝血指标: 各组在治疗前后, 凝血指标都得到了明显改善, 取得了与血浆置换相同的治疗效果; 同时, 在各组之间比较中, 无论何治疗组, 均未显示出明显的治疗优势, 其考虑凝血因子分子质量大, 在使用成分血浆分离器时, 能够很好地截流凝血因子使之不被清除, 使各组凝血改善程度大致相同。(4)治疗安全性、有效性评价: 从清除ALB结合物质, 降低胆红素等肝衰竭蓄积毒素来说, 4A膜疗效最为满意。但分析治疗前后的血清ALB水平发现, 治疗后4A组

出现ALB绝对水平的降低,使患者出现组织水肿、甚至脑水肿的危险明显增高.在一定程度上影响了4A组在临床的使用.经上述结果分析,2A、3A组在清除蛋白结合毒素方面亦能达到不错的治疗效果(TBIL、DBIL均达35%左右),同时无明显ALB的丢失,不会引起患者组织水肿.2A组在水溶性毒素清除中显示了一定的优势,但其治疗时间延长,增加了出血及滤器凝血的风险,为抗凝增加了一定的难度,在临床上因引起注意.(5)个性化治疗建议:根据以上分析,我们建议在高流量PDF治疗时常规选用3A的蛋白分离器.2A膜由于蛋白筛选系数较低,蛋白丢失较少,适于节省FFP用量;而延长治疗时间,可明显提高BUN、Cr的清除,因此建议伴有HRS、脑水肿的患者,可考虑使用2A的蛋白分离器.而对于TBIL、DBIL基础水平高并且上升快的患者,可考虑使用4A的蛋白分离器,但必须注意术后及时补充ALB并适当利尿脱水.

总之,PDF属于延长时间的血液净化治疗范畴,与间断性治疗相比,具有血流动力学稳定,持续清除毒素可减少治疗后反跳等优势.与缓慢的PE治疗相比,则具有清除水溶性毒素,透析液反向跨膜弥散可减少肝素用量、滤器不易凝血等特点.故高流量PDF作为一种能够同时清除蛋白结合毒素和水溶性毒素、补充凝血因子、维持内环境稳态的人工肝血液净化方法,值得推广应用.至于PDF对于细胞因子、炎症介质等

病原学物质的清除作用,尚有待于进一步临床研究证实.

#### 4 参考文献

- Bernuau J, Rueff B, Benhamou JP. Fulminant and subfulminant liver failure: definitions and causes. *Semin Liver Dis* 1986; 6: 97-106
- Yoshida M, Inoue K, Sekiyama K, Koh I. Favorable effect of new artificial liver support on survival of patients with fulminant hepatic failure. *Artif Organs* 1996; 20: 1169-1172
- Kjaergard LL, Liu J, Als-Nielsen B, Gluud C. Artificial and bioartificial support systems for acute and acute-on-chronic liver failure: a systematic review. *JAMA* 2003; 289: 217-222
- 武文芳, 张晶, 马斌荣, 段钟平. 重型肝病病人人工肝治疗的生存分析. *首都医科大学学报* 2007; 28: 249-251
- 陈煜, 段钟平. 人工肝支持系统在重症肝炎和肝衰竭治疗中的应用. *临床内科杂志* 2008; 25: 299-301
- 易露茜, 杨旭, 唐晓朋. 血浆置换治疗慢性重型肝炎60例疗效观察. *中国医师杂志* 2001; 3: 357-359
- 甘建和, 赵卫峰, 徐杰, 罗二平, 江敏华, 吴建成, 吴旭东, 施敏, 庞中强. 血浆置换治疗慢性重型肝炎的疗效评估及影响因素分析. *透析与人工器官* 2004; 15: 26-30
- Kondrup J, Almdal T, Vilstrup H, Tygstrup N. High volume plasma exchange in fulminant hepatic failure. *Int J Artif Organs* 1992; 15: 669-676
- Clemmesen JO, Kondrup J, Nielsen LB, Larsen FS, Ott P. Effects of high-volume plasmapheresis on ammonia, urea, and amino acids in patients with acute liver failure. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1217-1223
- 龚德华, 季大玺, 徐斌, 谢红浪, 刘云, 黎磊石. 枸橼酸钠抗凝在重危患者连续性血液净化治疗中的应用. *中华内科杂志* 2003; 42: 121-122
- 傅强, 李翠萍, 陈津, 仲伟云, 周丽娟. 治疗性血浆置换术中的不良反应分析. *临床输血与检验* 2004; 6: 9-11

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》中文摘要要求

**本刊讯** 本刊中文摘要必须在350字左右,内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的),方法(必须包括材料或对象、应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写P, 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值). (常务副总编辑: 张海宁 2009-08-18)