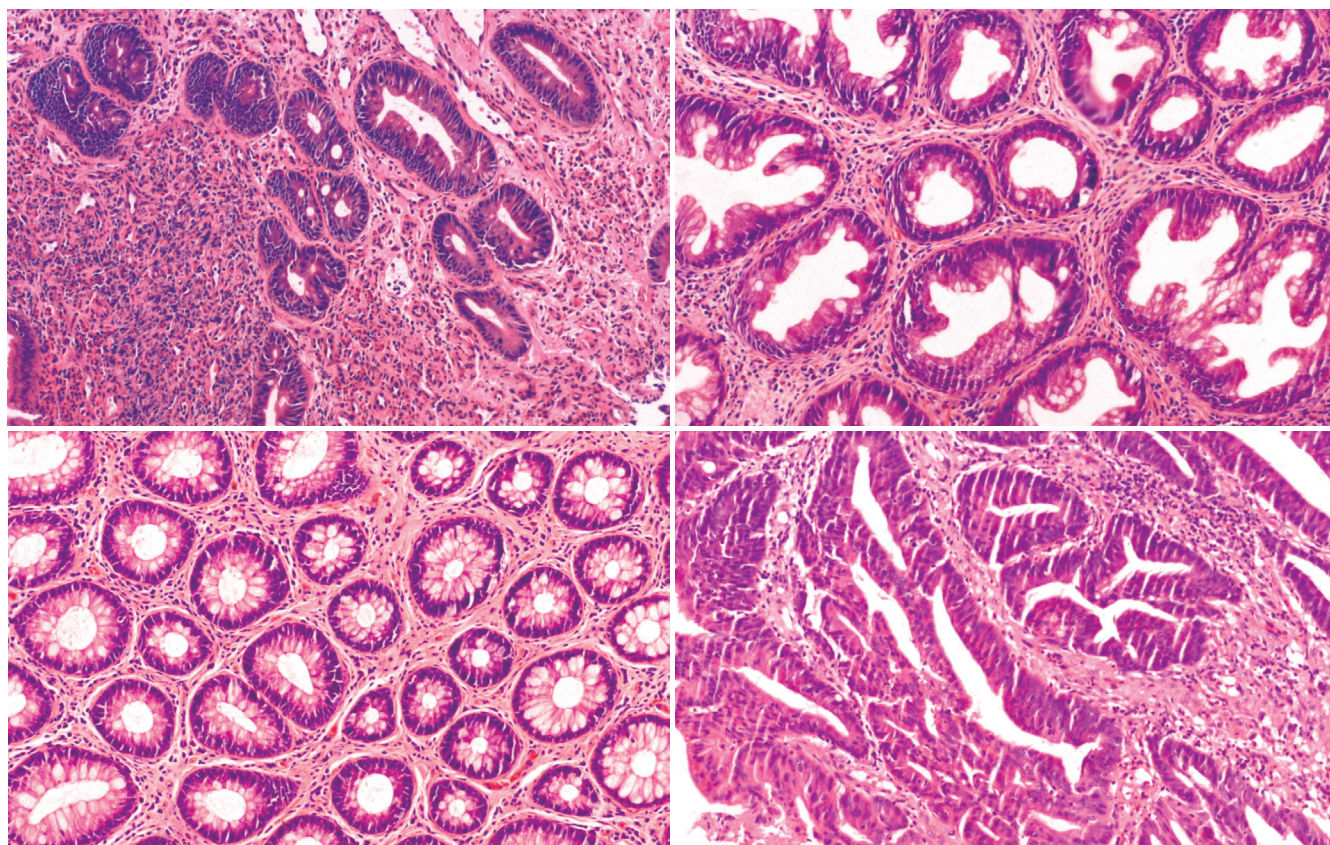


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2009年9月8日 第17卷 第25期 (Volume 17 Number 25)



25 / 2009

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2009-01-01/2011-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

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

名誉总编辑

潘伯荣教授

社长/总编辑

马连生教授

副总编辑

纪小龙教授
姜洪池教授
王苑本教授
吴云林教授
徐克成教授
杨思凤教授
姚希贤教授
岳茂兴教授
张万岱教授
周学文教授

常务编委

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

编委

消化内科学
白爱平副教授
聂新明教授
陈洪副教授

陈其奎教授
陈卫昌教授
陈贻胜教授
程斌副教授
迟宝荣教授
崔立红副教授
邓长生教授
丁士刚主任医师
董蕾教授
杜雅菊主任医师
樊晓明主任医师
房静远教授
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
高峰副教授
戈之铮教授
关玉盘教授
郭晓钟教授
何松教授
洪天配教授
胡伏莲教授
胡和平主任医师
黄晓东副主任医师
黄颖秋教授
黄缘教授
季国忠教授
江米足主任医师
姜春萌教授
姜慧卿教授
金瑞教授
蓝宇教授
李定国教授
李淑德教授
李瑜元教授
李玉民教授
李玉明教授
李祖国副教授
林志辉教授
刘冰熔教授
刘凤斌教授
刘改芳主任医师
刘海林主任医师
刘占举教授
陆伦根教授
马欣主任医师

倪润洲教授
欧希龙副教授
潘秀珍教授
朴云峰教授
秦成勇教授
任粉玉副教授
任建林教授
邵先玉教授
沈琳主任医师
沈守荣教授
沈薇教授
施瑞华教授
宋军副教授
宋于刚教授
唐世刚教授
田字彬教授
王邦茂教授
王炳元教授
王承党副教授
王晓艳副教授
闻勤生教授
夏冰教授
夏时海副教授
徐可树教授
许乐主任医师
杨建民教授
姚树坤教授
叶红军主任医师
张春清教授
张国梁主任医师
张军教授
张小晋主任医师
张晓岚教授
张筱茵副教授
张志坚教授
郑培永副教授
郑鹏远教授
周国雄主任医师
朱春兰主任医师
邹晓平主任医师
消化外科学
别平教授
蔡开琳副教授
蔡三军主任医师
曹杰主任医师

陈光教授
陈海龙教授
陈积圣教授
陈进宏副主任医师
陈力教授
陈立波副教授
陈凜教授
陈强谱教授
陈汝福教授
陈亚军主任医师
陈钟教授
程爱国教授
程爱群主任医师
程树群副教授
仇毓东副教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
单云峰副主任医师
丁义涛教授
董明教授
房林副教授
傅红副教授
傅华群教授
傅志仁主任医师
葛海燕教授
龚建平教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师
顾岩教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
何超教授
何裕隆教授
黄志勇教授
季加孚教授
英卫东副主任医师
蒋龙元副教授
李国威教授
李华副教授
李华山主任医师
李靖副教授
李奇林教授
李胜研究员
李涛副主任医师

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

王振宁教授	高润平教授	刘孟安教授	吴硕东教授	周晓东研究员
王正康教授	高泽立副教授	刘平教授	袁友红副教授	周晓武副主任医师
王志刚副主任医师	龚国忠教授	刘绍能主任医师		
王忠裕教授	管世鹤副教授	沈洪教授	消化中西医结合学	消化病理学
吴河水教授	何生松教授	唐志鹏研究员	唐文富副教授	杜祥教授
吴健雄教授	胡国信副主任医师	王富春教授	王学美研究员	李淳副教授
吴金术教授	林菊生教授	王新月教授	魏睦新教授	刘丽江教授
吴泰璜教授	刘杞教授	谢鸣教授	张春虎副教授	刘勇钢副主任医师
吴志勇教授	刘正稳教授	徐列明教授		马大烈教授
谢敏主任医师	貌盼勇研究员	许玲副教授	消化基础研究	潘兴华副主任医师
谢晓华副教授	宁琴教授	张声生教授	曹洁副教授	王鲁平主任医师
邢光明教授	钱林学主任医师		曹鹏副研究员	王娅兰教授
徐大华主任医师	秦波教授	消化肿瘤学	樊红副教授	魏蕾教授
徐迅迪副主任医师	石统东副教授	曹秀峰主任医师	高春芳研究员	阎晓初副教授
徐决副主任医师	孙殿兴主任医师	曹志成院士	高国全教授	颜宏利副教授
许戈良教授	谭德明教授	陈公琰主任医师	高英堂研究员	于颖彦教授
严律南教授	汤华研究员	李璦教授	管冬元副教授	余宏宇教授
杨柏霖副主任医师	唐霓副研究员	刘宝瑞教授	胡旭初副教授	张锦生教授
杨家和主任医师	唐晓鹏教授	刘彬彬副研究员	黄文林教授	赵景民教授
杨秋蒙副主任医师	王凯教授	刘云鹏教授	李刚教授	朱亮副教授
杨维良教授	王怡主任医师	沈克平主任医师	李杰副教授	
	魏来教授	肖文华主任医师	李永哲副研究员	
殷正丰教授	吴建国教授	熊斌教授	李增山副教授	
于聪慧教授	吴君主任医师	张凤春教授	刘克辛教授	
于则利教授	宣世英教授		梅林教授	
郁宝铭教授	杨江华副主任医师	消化影像学	彭曦副研究员	
元云飞教授	杨林副研究员	白彬主任医师	钱睿哲教授	
张佳林教授	姚鹏副教授	陈克敏教授	任超世研究员	
张进祥副教授	张继明教授	官泳松教授	任浩副教授	
张俊副研究员	张明辉副主任医师	韩新巍教授	台桂香教授	
张群华教授	张绪清副教授	李健丁教授	谭学瑞教授	
张水军教授	张占卿主任医师	龙学颖副主任医师	田颖刚副研究员	
张宗明教授	赵桂鸣主任医师	倪才方教授	汪思应教授	
周伟平教授	赵连三教授	魏经国教授	吴军研究员	
邹小明教授	周霞秋教授	肖恩华教授	吴俊华副教授	
	朱传武主任医师	徐爱民副教授	徐宁志研究员	
消化感染病学	庄林主任医师	徐克教授	许文燮教授	
陈国凤主任医师		扬业发教授	姚登福教授	
陈红松研究员	消化中医药学	杨建勇教授	阴赅宏研究员	
陈建杰教授	蔡淦教授	赵卫主任医师	郁卫东副研究员	
陈仕珠主任医师	陈治水主任医师		喻荣彬副教授	
陈耀凯副教授	杜群副研究员	消化内镜及介入治疗学	张青云研究员	
陈志辉副主任医师	黄恒青主任医师	丁佑铭教授	张学教授	
党双锁教授	李军祥教授	郝俊鸣副主任医师	赵平副教授	
丁惠国教授	李勇副教授	潘林娜教授	周南进研究员	
范建高教授	李振华教授	孙明军教授	周士胜教授	
范小玲主任医师	刘成海研究员	万军教授	周素芳教授	

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2009 年 9 月 8 日 第 17 卷 第 25 期 (总第285期)

述 评

- 2545 消化病中西医结合基础研究评述
魏睦新, 胡平

基 础 研 究

- 2550 体外灌注法分离大鼠肝脏Kupffer细胞及原代培养
曾仲, 黄汉飞, 宋飞, 段键
- 2555 γ -氨基丁酸B受体在CCl₄诱导肝纤维化大鼠中的表达
樊文梅, 石炳毅, 马锡慧, 魏红山, 黎立, 韩永, 何秀云
- 2561 脂质过氧化损伤对高脂血症大鼠重症急性胰腺炎的作用及机制
林志辉, 黄胡萍
- 2566 急性电刺激疑核对TNBS诱导的IBD大鼠IL-6 mRNA表达的影响
袁川评, 王玮, 母连志, 杨占清, 王贤平, 商秀玲, 姜艳福, 张峰, 张雪莉, 刘冬, 柳巨雄
- 2571 JAK/STAT抑制剂在TNBS诱发大鼠结肠炎中的作用
杨涓, 缪应雷
- 2577 抑瘤基因NGX6对结肠癌血管形成的影响
连平, 郭勤, 彭娅, 肖志明, 刘芬, 王晓艳, 沈守荣, 李桂源
- 2585 克氏螯虾壳聚糖抗菌的作用靶位
郑铁生, 朱旭明, 张燕玲

临 床 研 究

- 2589 细胞凋亡在结肠腺癌组织中的变化及其相关蛋白的表达
郭文娟, 王爱英, 高春

文 献 综 述

- 2595 HCV NS3/4A丝氨酸蛋白酶和NS5B RNA聚合酶抑制剂的临床研究进展
汪桦, 薛小平, 雷迎峰
- 2601 重症急性胰腺炎实验动物模型的研究进展
杨元生, 崔淑兰, 陈垦, 王晖
- 2607 内皮素B受体基因与先天性巨结肠关系的研究进展
张万里, 王国斌, 陶凯雄

研 究 快 报

- 2612 兔肝动脉插管技术的方法学及DSA表现
许卫国, 谭国胜, 彭秀斌, 王于, 陈伟, 杨建勇
- 2616 缬草波春对大鼠非炎症性结肠致敏模型的影响
叶建明, 王钰, 汪晓珍, 何学斌, 蒋朋, 薛存宽, 胡品津

临 床 经 验

- 2621 自主神经功能在肥胖者机械性胃扩张模拟进餐过程中的变化特征
张学丛, 姚树坤, 常丽丽, 郝顺霞, 赵英丽, 高富贵
- 2625 血清胃蛋白酶原、和G-17在功能性消化不良患者中的表达及其意义
刘露, 姜敏
- 2631 拉米夫定耐药变异株在急性HBV感染者中的流行调查
李兴库, 周志红, 金茜, 杜博, 施宇光, 房绍红, 刘伟, 张淑云
- 2635 HBV抗原肽冲击的DC对慢性乙型肝炎及HBV携带者的免疫治疗作用
牛春燕, 任天顺, 陈旭, 成碧萍

	<p>2640 三维容积超声在肝脏肿瘤诊断中的应用价值 王虹, 王洪波, 侯秀娟, 王晓蕾, 田家玮</p> <p>2644 内镜下黏膜切除术治疗老年及老年前期大肠息肉561例 张晓华, 朱人敏, 吴晓尉, 杨妙芳, 郭美霞, 许小兵</p>
病例报告	<p>2648 阑尾术后大网膜粘连综合征诊治1例 段亮, 蔡晓军</p>
致 谢	<p>2650 致谢世界华人消化杂志编委</p>
消 息	<p>2549 《世界华人消化杂志》标点符号用法</p> <p>2554 《世界华人消化杂志》被收录情况</p> <p>2570 《世界华人消化杂志》中文摘要要求</p> <p>2576 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标</p> <p>2584 《世界华人消化杂志》栏目设置</p> <p>2594 《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆2008年版《中文核心期刊要目总览》</p> <p>2600 《世界华人消化杂志》计量单位标准</p> <p>2615 《世界华人消化杂志》修回稿须知</p> <p>2624 2007年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序</p> <p>2630 第九届全国消化系恶性病变介入诊疗研讨会暨内镜/介入新技术论坛征文通知</p> <p>2634 WJG成功通过评审被PMC收录</p> <p>2639 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</p> <p>2643 汤姆森·路透公布2008年WJG影响因子2.081</p>
封面故事	<p>张晓华, 朱人敏, 吴晓尉, 杨妙芳, 郭美霞, 许小兵. 内镜下黏膜切除术治疗老年及老年前期大肠息肉561例. 世界华人消化杂志 2009; 17(25): 2644-2647 http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2644.asp</p>
本期责任人	<p>编务 刘晓芳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 吴鹏朕; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 李军亮; 形式规范 马连生</p>

<p>世界华人消化杂志</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2009-09-08 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>名誉总编辑 潘伯荣 总 编 辑 马连生 常务副总编辑 张海宁 编辑部主任 张海宁 期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病研治中心</p>	<p>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>印刷 北京科信印刷厂 发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱)</p> <p>订购 全国各地邮电局 邮购 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p>	<p>世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊. 《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录.</p> <p>世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://wcjd.wjgnet.com), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流.</p> <p>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</p> <p>2009年版权归世界华人消化杂志所有</p>
<p>中国标准连续出版物号 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R</p>	<p>邮发代号 82-262 国外代号 M 4481</p>	<p>国内定价 每期24.00元 全年864.00元 广告经营许可证 1401004000050</p>

World Chinese Journal of Digestology

September 2009 Contents in Brief Volume 17 Number 25

EDITORIAL	2545 Basic research in gastroenterology by integrated Chinese and Western medicine: a review of literature <i>Wei MX, Hu P</i>
BASIC RESEARCH	<p>2550 Isolation of rat Kupffer cells by ex vivo perfusion and their primary culture <i>Zeng Z, Huang HF, Song F, Duan J</i></p> <p>2555 Expression of γ-aminobutyric acid B receptor in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats <i>Fan WM, Shi BY, Ma XH, Wei HS, Li L, Han Y, He XY</i></p> <p>2561 Role of lipid peroxidation in the development of severe acute pancreatitis in rats with hyperlipemia <i>Lin ZH, Huang HP</i></p> <p>2566 Acute electrical stimulation of the nucleus ambiguus upregulates the expression of interleukin-6 mRNA in rats with trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis <i>Yuan CP, Wang W, Mu LZ, Yang ZQ, Wang XP, Shang XL, Jiang YF, Zhang F, Zhang XL, Liu D, Liu JX</i></p> <p>2571 Role of the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway in the pathogenesis of trinitrobenzenesulfonic acid-induced experimental colitis in rats <i>Yang J, Miao YL</i></p> <p>2577 Nasopharyngeal carcinoma-associated gene 6 inhibits tumor angiogenesis in colon cancer <i>Lian P, Guo Q, Peng Y, Xiao ZM, Liu F, Wang XY, Shen SR, Li GY</i></p> <p>2585 Target site for the antibacterial action of chitosan from red swamp crayfish <i>Zheng TS, Zhu XM, Zhang YL</i></p>
CLINICAL RESEARCH	2589 Apoptosis and expression of apoptosis-related proteins Bcl-2, Bcl-xl and Bcl-w in human colon adenocarcinoma <i>Guo WJ, Wang AY, Gao C</i>
REVIEW	<p>2595 Recent advances in the development of inhibitors targeting hepatitis C virus NS3/4A serine protease and NS5B RNA polymerase <i>Wang H, Xue XP, Lei YF</i></p> <p>2601 Advances in the development of experimental animal models of severe acute pancreatitis <i>Yang YS, Cui SL, Chen K, Wang H</i></p> <p>2607 Advances in research of the relationship between endothelin receptor type B and Hirschsprung's disease <i>Zhang WL, Wang GB, Tao KX</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>2612 Comparison of transfemoral hepatic artery catheterization and direct hepatic artery catheterization via laparotomy in rabbits <i>Xu WG, Tan GS, Peng XB, Wang Y, Chen W, Yang JY</i></p> <p>2616 Valepotriates reduce colorectal sensitivity and inhibit colonic motility in rats with noninflammatory colonic hypersensitivity <i>Ye JM, Wang Y, Wang XZ, He XB, Jiang P, Xue CK, Hu PJ</i></p>
CLINICAL PRACTICE	<p>2621 Characteristics of autonomic nervous activity in obese people during mechanical gastric distension that mimics gastric filling <i>Zhang XC, Yao SK, Chang LL, Hao SX, Zhao YL, Gao FG</i></p> <p>2625 Clinical significance of serum pepsinogen I and II and gastrin-17 in patients with functional dyspepsia</p>

CLINICAL PRACTICE	<p><i>Liu L, Jiang M</i></p> <p>2631 Prevalence of lamivudine-resistant HBV strains in patients with acute HBV infection <i>Li XK, Zhou ZH, Jin Q, Du B, Shi YG, Fang SH, Liu W, Zhang SY</i></p> <p>2635 Efficacy of immunotherapy using autologous dendritic cells pulsed with hepatitis B surface antigen in patients with chronic hepatitis B <i>Niu CY, Ren TS, Chen X, Cheng BP</i></p> <p>2640 Application of three-dimensional ultrasonography in the diagnosis of liver solid lesions <i>Wang H, Wang HB, Hou XJ, Wang XL, Tian JW</i></p> <p>2644 Endoscopic mucosal resection for treatment of colorectal polyps occurring in the senium and presenium: a report of 561 cases <i>Zhang XH, Zhu RM, Wu XW, Yang MF, Guo MX, Xu XB</i></p>
CASE REPORT	<p>2648 Diagnosis and treatment of omental adhesion syndrome after appendectomy: a report of one case <i>Duan L, Cai XJ</i></p>
ACKNOWLEDGMENT	<p>2650 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
COVER	<p><i>Zhang XH, Zhu RM, Wu XW, Yang MF, Guo MX, Xu XB.</i> Endoscopic mucosal resection for treatment of colorectal polyps occurring in the senium and presenium: a report of 561 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(25): 2644-2647 http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2644.asp</p>
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	<p>Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Peng-Zhen Wu</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i></p>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date September 8, 2009

NAME OF JOURNAL
World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION
Department of Science and Technology
of Shanxi Province

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

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

PRINTING
Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

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

OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

HONORARY EDITOR-IN-CHIEF
Bo-Rong Pan

EDITOR-IN-CHIEF
Lian-Sheng Ma

SCIENCE EDITORS
Director: Hai-Ning Zhang

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

CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

COPYRIGHT

© 2009 Published by *WCJD*. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

SPECIAL STATEMENT

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

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

消化病中西医结合基础研究评述

魏睦新, 胡平

魏睦新, 胡平, 南京医科大学第一附属医院中医科 江苏省南京市 210029

魏睦新, 教授, 医学博士, 博士生导师, 江苏省中医药领军人才, 主要从事消化病中西医结合基础与临床研究.

日本独立行政法人新能源产业技术综合开发署国际合作研究事业部分基金资助项目, No. NEDO2006-1

作者贡献分布: 魏睦新全文策划, 本课题组实验研究的主持, 部分核心内容的撰写与全文审定; 胡平资料收集分析研究, 文章撰写.

通讯作者: 魏睦新, 教授, 210029, 江苏省南京市, 南京医科大学第一附属医院中医科. weimuxin@njmu.edu.cn

电话: 025-83718836-6267

收稿日期: 2009-08-03 修回日期: 2009-09-04

接受日期: 2009-09-07 在线出版日期: 2009-09-08

Basic research in gastroenterology by integrated Chinese and Western medicine: a review of literature

Mu-Xin Wei, Ping Hu

Mu-Xin Wei, Ping Hu, Department of Chinese Medicine, the First Affiliated Hospital with Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by: the International Cooperation Program of New Energy and Industrial Technology Development Organization of Japan, No. NEDO2006-1

Correspondence to: Professor Mu-Xin Wei, Department of Chinese Medicine, the First Affiliated Hospital with Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. weimuxin@njmu.edu.cn

Received: 2009-08-03 Revised: 2009-09-04

Accepted: 2009-09-07 Published online: 2009-09-08

Abstract

In recent years, great achievements have been made in basic research in gastroenterology by integrated Chinese and Western medicine. In this article, we will review the recent advances in basic research in gastroenterology by integrated Chinese and Western medicine in three aspects: objectification of syndrome differentiation in Chinese medicine, application of animal models in Chinese medicine studies, and action mechanisms of Chinese medicines. Besides, we suggest that the combination of the theory and practice of Chinese medicine with modern life science technology will provide a possible avenue to develop a new gastroenterology.

Key Words: Chinese medicine; Integrated Chinese and Western medicine; Gastroenterology; Basic research

Wei MX, Hu P. Basic research in gastroenterology by integrated Chinese and Western Medicine: a review of literature. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(25): 2545-2549

摘要

近年来, 中西医结合在消化领域取得了长足的发展. 本文从消化病相关证的客观化研究, 模型动物在消化病中西医结合研究中的运用以及消化疾病中药作用机制的研究三个方面, 总结了中西医结合消化病学基础研究的现状, 并提出将现代生命科学和祖国医学的理论知识与诊治经验有机地结合起来, 逐步发展中西医结合新消化病学.

关键词: 中医药; 中西医结合; 消化病学; 基础研究

魏睦新, 胡平. 消化病中西医结合基础研究评述. 世界华人消化杂志 2009; 17(25): 2545-2549

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2545.asp>

0 引言

在我国, 中医学是当今并存的两大医学体系, 在消化病领域中, 中西医结合也取得了长足的发展. 人们应用现代科学的各种技术方法, 从多学科、多途径和多层次着手, 在整体、器官和细胞水平进行了广泛而深入的探讨, 初步复制了模拟中医证型的多种实验动物模型, 观察了各种反映机体内变化的微观实验指标, 验证了一系列证效结合的方药疗效. 本文从消化病相关证的客观化研究, 模型动物在消化病中西医结合研究中的运用以及消化疾病中药作用机制的研究, 总结中西医结合消化病学基础研究的现状, 并对中西医结合消化病学的未来进行展望, 提出以难治性消化系疾病为切入点, 进行与临床相关的中西医结合基础研究; 关注生命科学的高新技术, 以及更多地从基因、蛋白表达等更高层次, 深入探索, 促进消化病学的发展.

1 脾虚证的本质

脾虚是一个与消化病高度相关的中医基本证候.

背景资料

从早期脾虚证的客观化研究到现代中药抗肿瘤机制的探讨, 中西医结合在消化领域逐步得到了发展, 如何将现代生命科学和祖国医学的理论知识与诊治经验有机地结合起来, 逐步发展中西医结合新消化病学成为努力的目标.

同行评议者

曹志成, 英国生物医学科学研究所院士, 伊利沙伯医院临床肿瘤科

相关报道

魏睦新 *et al* 课题组的动物实验研究发现: 槟榔可通过促进胃平滑肌收缩幅度而增强胃运动, 加快运动频率, 是一种较强的胃肠动力中药, 可用于功能性消化不良及其他胃肠动力障碍性病症的治疗。

中医理论的核心是辨证论治, 而辨证论治首先要从证的研究着手, 故证的研究可以说是中医迈向现代化的起点。自20世纪80年代起, 中医学者就开始在脾虚的证候学研究上作出了很大的努力。

从胃肠激素和脑肠肽调节方面研究脾虚机制, 具有重要的意义。1982年北京中医学院金敬善 *et al*^[1]报道的“血清中胃泌素水平与脾虚证的关系”一文, 最早将中医脾虚证与胃肠激素结合起来, 开辟了脾虚证本质研究的新领域。后来聂克 *et al*^[2]对胃泌素与脾气虚证关系的研究进行了概括总结, 认为血清或组织中的胃泌素水平尚不能作为脾气虚证的诊断指标, 还需要从胃泌素受体数目、活性、基因表达以及受体后信息传递等方面去深入研究。吕琳 *et al*^[3]研究发现脾虚大鼠外周循环血浆、下丘脑和垂体内 β -EP的含量降低, 而胃窦和小肠组织 β -EP水平则升高; 脾虚大鼠脑-肠轴 β -EP水平与血T淋巴细胞及红细胞免疫功能相关, 而且网络内不同部位 β -EP的水平与上述免疫功能指标之间的相关性存在差异。对脑-肠轴 β -EP的双向调节作用, 可能是治疗脾虚证的作用机制之一。

李常青^[4]对41例辨证为脾气虚证的消化性溃疡患者进行唾液淀粉酶、D-木糖排泄率和胃电图检测, 并与20例健康人作对照, 结果显示脾气虚证组唾液淀粉酶活性比值、D-木糖排泄率和胃电图餐前餐后幅值均低于健康组, 差异均具有显著性意义。三者合参, 对脾气虚证诊断的阳性率为95.10%, 提示唾液淀粉酶活性比值、D-木糖排泄率和胃电图三者合参, 可以较全面反映脾气虚证的本质。

上述研究表明: 近年来对脾虚证本质的研究多集中在脾主运化方面, 而且主要是运化水谷精微, 尚不包括脾主水湿、脾主统血、脾失升清等其他内容, 这种单方面、单层次的研究较难反映脾虚的本质。过去在证的研究中希望寻找“证”的单一“金”指标, 现已认识到这是不现实的, 应该选择有代表意义的指标群, 也就是说, 多指标合参是“证”实质研究的最佳选择。故在今后的研究中, 加强脾主功能的多样化研究是脾虚证研究的关键任务。

消化系病理以外, 刘健 *et al*^[5]测定了40例脾气虚证患者淋巴细胞转化率及其他指标, 结果与正常对照组相比, 脾气虚证淋巴转化率、木糖吸收率、血红蛋白、血清总蛋白及白蛋白显著降低($P<0.01$)。王再谟 *et al*^[6]观察了24例脾气

虚患者红细胞免疫活性, 结果C3b花环率较健康对照组显著下降。这些在能量代谢、心功能、血液学、免疫学等其他方面的脾虚证的初步研究, 显示了脾虚证候机体多个方面都有特定的改变。可见中医的证是多因素的, 只有从多系统来研究中医的证, 才能体现中医证的整体性和多因素的特性。

魏睦新 *et al*对脾阴虚证进行了深入的研究, 探讨了脾阴虚证的诊断标准, 发现脾阴虚证患者存在消化功能低下, 免疫调节异常和细胞内第二信使环核苷酸异常等一系列病理改变^[7-9]。汤一新 *et al*^[10]对脾阴虚证也进行了广泛深入的研究, 并出版了专著。现在, 很多教科书开始把脾阴虚证纳入脾虚章节, 这对继承和发展中医脏腑理论, 有里程碑式的意义。

2 模型动物在研究中的运用

在现代的实验研究中, 动物模型是必不可少的, 而且对实验动物模拟疾病的相似性也有较高的要求, 公认的模型作出的实验结果才有一定的可信度。因为动物模型的标准与方法体现着某种生命观、疾病观和方法论, 他是实验医学的重要基础, 是基本理论赖以发展的前提条件。西医和中医都大量运用动物模型, 但各有其特点, 西医以结构实证为核心指导思想, 有效地将基础研究与临床实践相分离, 将动物模型取得的大量基础研究资料, 根据生物统一性、相似性原理, 类比于人体, 为最终的人体实验创造条件, 铺平道路。但是中医则以信息把握为原则, 长期以来, 直接通过临床实践为基础理论提供素材, 临床与基础研究不分, 因此没有发展出实验医学的方法, 中医药的研究要制造出和西医学研究中同样公认度的模型比较困难, 但是经过历代人的努力, 一小部分人类疾病动物模型, 证候模型及病症模型已得到一定的认可。就在几十年人们对脾虚证的研究中, 脾虚模型的建立也是经历了很多的尝试和发展。目前常见的造模方法主要有如下。

2.1 模拟中医传统病因建立脾虚证动物模型 利用苦寒中药大黄、番泻叶等煎剂灌服动物, 复制脾虚证动物模型。这是根据李东垣“苦寒之药损其脾胃”(脾胃论)的理论而来的。刘汶 *et al*^[11]采用番泻叶水浸剂灌服大白鼠, 结果实验组大鼠出现了泄泻食少、消瘦、体质量减轻、神志萎靡、四肢不收、毛色枯槁、蜷缩聚堆等症状, 且易疲劳, 游泳耐力降低, 认为灌服番泻叶水浸

剂可造脾虚证大鼠模型. 采用饮食失节的方法复制脾虚模型. 中医认为饮食失节、饥饱无度和过食肥甘能损伤脾胃. 采用营养不良型脾虚模型. 采用破气苦降加饮食失节法, 过劳加饮食失节法, 劳倦加饥饿型大鼠脾虚模型.

2.2 采用西医病因病理复制脾虚证动物模型 利用肾上腺素能神经阻滞药利血平注射, 模拟脾虚证的动物模型. 利血平可以耗竭动物体内的儿茶酚胺, 一定剂量的利血平能使动物引起与中医脾虚证类似的症状. 根据X线可损伤细胞的生化生理功能而造脾虚模型. 上海中医药大学刘平教授领导的团队, 在肝病病理模型研究方面居于国内领先地位, 创造性地运用了“中西医结合-证(方)-效结合”的研究模式, 部分解决了长期以来动物模型难于判断中医证型的问题, 对其他病证的动物模型的建立也有启迪作用^[12]. 在临床研究的基础上, 该课题研究小组还探索了大鼠脾阴虚证病理模型的建立.

各种动物模型制造方法都有优点和不足之处, 但总的来讲中医动物模型的制造还存在很多待解决的问题, 比如模型的研制忽视了中医药的规律和整体性等特点, 很多模型的复制方法均与某特异的、单一的病理变化相关联, 只反映临床病理的一个方面, 与中医理论关系不大, 难以体现中医证候的特征, 出现的病理状态很难等同于中医特定的症候, 因此中医药研究中造模不能完全照搬西医的模式.

动物模型研制成功后, 应对其正确性、可靠性进行检验以便于在实验中推广应用, 现在多采用方药反证法来验证, 如模型动物服用四君子汤后症状、体征和实验检测指标明显好转, 并恢复正常, 就证明此模型为脾虚证, 否则就不是. 但是这样的反证法尚缺乏严格的实验设计和统计学分析处理, 还不能作为标准进行验证.

如何继续发展和提高中医动物模型的相似度和可信度仍是中西医结合发展及中医客观化研究中的一个重要步骤. 中医证候是一个在很高层次的调节紊乱的综合征, 今后可能要更多地从基因、蛋白表达角度, 利用基因工程技术等复制中医证候模型. 生命科学的高新技术的导入可能是解决这个问题的重要和主要途径. 当代生命科学的高新技术, 可以说是以信息系统和分子生物学为代表方向, 而两者又是彼此紧密结合和相互联系的. 现代医学侧重于从微观上揭示生命的真谛, 尤其以DNA双螺旋结构

的发现和X射线衍射蛋白空间结构的测定为代表, 奠定了分子生物学的基础. 分子生物学全面地改变了生物学, 包括现代医学的面貌, 并涉及生命和疾病的最本质的内涵. 中医学则侧重于从宏观整体上认识人体的生命现象和疾病状态, 主张提高和调整人体的自控和潜在的能力, 从而维护健康水平和修复疾病状态. 我们要实现中医现代化和在深层次上进行中西医结合, 就要把中医学和生命科学中最先进和现代化的分子生物学有机地结合起来, 应用分子生物学和生物信息系统理论来探讨消化病相关中医证候的发病机制, 这才是最捷径和最有发展前途的研究途径和思维方法.

3 促胃肠动力中药和抗消化肿瘤中药的研究

3.1 胃肠动力中药研究 胃肠动力障碍性疾病在祖国医学多属“痞证”的范畴, 病位在脾胃, 多是由脾胃升降失常, 气郁壅塞, 胃气上逆所致, 故理气法是最主要的治疗手段^[13]. 近年来, 促胃肠动力中药已受到重视并进行了一些研究, 但成分中药的研究较少, 未筛选分离出有确切促胃肠运动的中药成分, 而从中药探寻并开发促胃肠动力药物是当前医学界的研究热点和今后的发展趋势之一. 西医药中的胃肠动力药种类多样, 按其作用机制有多巴胺受体阻断剂、胃动素受体激动剂、生长抑素及类似物、CCKA受体阻断剂等, 但多年的临床应用表明, 这些药物都存在着不同程度的不良反应, 目前尚缺乏能全面调节临床症状且不良反应小的动力药.

魏睦新 *et al* 课题组的动物实验研究发现^[14-16]: 槟榔可通过促进胃平滑肌收缩幅度而增强胃运动, 加快运动频率, 是一种较强的胃肠动力中药, 可用于功能性消化不良及其他胃肠动力障碍性病症的治疗. 而祛风药防风却表现出对胃肠运动的抑制作用, 可用于治疗胃肠动力亢进的病症. 该课题组还应用激光共聚焦显微镜技术探讨了槟榔碱具有促进结肠平滑肌细胞收缩与激活细胞内钙释放和外钙内流的调节效应, 并应用免疫组织化学、神经及离子通道阻断剂等手段进行了部分机制的探讨^[17]. 研究还发现, 促进胃肠动力中药不仅对胃肠动力障碍疾病本身有效, 而且对于急性胰腺炎等消化系重症也有重要意义^[18].

3.2 抗肿瘤中药的研究 随着分子生物学和分子药理学对肿瘤本质和作用机制方面的阐述, 中医药在肿瘤治疗方面的作用越来越受到关注,

创新盘点
本文从消化病相关证的客观化研究, 模型动物在消化病中西医结合研究中的运用以及消化疾病中药作用机制的研究3个方面, 总结了中西医结合消化病学基础研究的现状, 对中西医结合在这一领域的发展未来做出了一定的总结并提出了建议.

同行评价

本文总结了中西医结合消化病学基础研究的现状,并提出将现代生命科学和祖国医学的理论知识与诊治经验有机地结合起来,逐步发展中西医结合新消化病学。但欠缺机制研究和详细讨论,若能对高新技术基因、蛋白表达做深入研究,将对读者更有裨益。

不论是其对肿瘤发生、发展、转移的抑制作用,还是对机体免疫力的提高,都已成为中药抗肿瘤机制的研究热点。尽管人们对中药抗肿瘤的具体机制还不清楚,但众多的研究表明其机制可能是通过以下的途径。

3.2.1 免疫增强作用: 肿瘤的发生和发展与整个机体的免疫功能减退密切相关。杨传标 *et al* 报道中药健脾康复汤(党参、白术、茯苓、薏苡仁、卷柏、仙鹤草等)治疗大肠癌脾虚证,能增强患者免疫功能,治疗后自然杀伤(NK)细胞活性及T细胞亚群活性明显增强,同时临床症状改善,生存质量得到提高^[19]。此外,中药人参、黄芪、白术等都具有很好的增强机体免疫功能的作用。

3.2.2 诱导肿瘤细胞分化: 细胞恶变是增殖和分化两者平衡的失调,从细胞增殖角度说恶性肿瘤的增殖是失去控制的,从分化方面讲恶性肿瘤细胞是丧失分化或分化异常的细胞。诱导恶性肿瘤分化,抑制其增殖是肿瘤现代研究的重要领域。曾小莉 *et al* 用人参总皂甙处理人肝癌细胞HepG2后其生长明显受到抑制,细胞质增多,线粒体数量增加,糖原增多,高尔基复合体体积增大,发育较完善,粗面内质网和游离核蛋白体增多,提示HepG2细胞趋于成熟分化^[20]。也有研究发现,黄连素可以抑制YES1-YES6食管癌细胞系,细胞周期分析显示肿瘤细胞在G₀-G₁期积聚,而在S期相对减少,结果提示黄连素可能为治疗食管癌的另一方法^[21]。

3.2.3 促进肿瘤细胞凋亡: 细胞凋亡是机体为调控机体发育,维持内环境稳定,由其内在基因编程调节的细胞主动性的死亡。一旦细胞的增殖或凋亡发生异常,即可导致细胞的恶性转化,而促进肿瘤细胞凋亡可能达到肿瘤缩小,癌症消退的目的。中药雄黄的主要成分砷可促进急性早幼粒细胞白血病细胞凋亡,使抗凋亡基因PML-RAR和Bcl-2基因表达下降^[22]。

3.2.4 抑制肿瘤血管的生成: Carneiro *et al* 证实人参提取物作为一种抗癌剂,对小鼠肝癌模型有抗癌作用。用人参提取物干预小鼠角膜血管,血管定量分析系统显示有明显抑制血管生成的作用^[23]。白藜芦醇有抗肿瘤作用,尤其在抗肿瘤血管生成方面,研究较深入,体内实验中,白藜芦醇能明显抑制鸡胚绒毛尿囊膜新血管的形成^[24]。

3.2.5 其他: 此外在影响拓扑异构酶和端粒酶活性,抑制微管蛋白活性,调节相关基因表达,逆转多药耐药性,调节细胞信号转导等方面,中药也显示了一定的作用。

中药抗肿瘤作用机制是复杂的,不管是单味中药还是复方制剂,都含有多种成分,因此其作用不是单一的,其免疫抑癌作用为多靶点,遍及非特异性免疫与特异性免疫应答的各个主要环节。

中医基础理论有着丰富的科学内涵,尽管在理论的阐述上还有浓厚的自然哲学色彩,但中医学的理论框架,传统医学的医学模式,对自然、人体及疾病的认识,富含唯物论及辩证法,为解决疑难疾病的诊治提供了不少可贵的思路与切入方法。随着人们对中西医结合在基础和临床的深入研究,会有越来越多的科学试验证明中药发挥看似神奇作用的原理。

4 结论

创新是当今世界发展的一大趋势,传统医学也不能例外,只有顺应这一发展方向,才能激发出新的生机和活力。中西医结合医学既蕴含和保存着自远古至近代的传统医学的精华,又融汇了现代科学的内涵,根据科学发展的客观规律,两者必然会互相渗透、互相补充。在临床诊治实践和学术领域里达到融会贯通。在世界医学之林中,代表中华民族医学的独创优势和特色的中西医结合医学,正在不断产生和形成新的多元动态的医学体系,我们不仅要继承他,更重要的是去发扬和创新他,使之随着时代的潮流走向新的里程,这就是中西医结合的目标和历史任务。

近年来,随着现代医学胃肠内窥镜检查的广泛应用,胃肠道免疫学、胃肠道动力学、胃肠道激素、胃肠道屏障以及胃肠道微循环和血液流变学等理论研究的日益深入,胃肠道疾病的诊断和治疗也提高到了一个新的水平。在祖国医药方面,从《内经》至明清,历代著名医家对胃肠疾病多有系统而全面的阐述和极其丰富的临床诊治经验,形成了一个系统的理论联系实践的完整理论学说-“脾胃学说”。因此,历史发展到今天,作为现阶段从事消化系统疾病研究防治工作的医务人员,应当义不容辞、责无旁贷地把现代医学与祖国医学的理论知识与诊治经验有机地结合起来,各取所长,融会贯通,逐步发展成为中西医结合新消化病学。

5 参考文献

- 1 金敬善,王广才,张绳祖,李伍善,何俊仁,王丽华,危北海.血清中胃泌素水平与脾虚证的关系.中国中西医结合杂志 1982; 2: 25
- 2 聂克,王健华,王汝俊.胃泌素与脾虚证关系的研究进

- 展. 广州中医药大学学报 1999; 16: 12-15
- 3 吕琳, 陈永红, 肖国有, 韦金育, 李延, 董晔, 郭梅. 脾虚大鼠脑-肠轴 β -EP水平与免疫功能相关性研究. 湖北中医学院学报 2001; 3: 36-37
- 4 李常青. 唾液淀粉酶活性比值、D-木糖排泄率和胃电图三者合参对脾气虚证的研究. 湖南中医学院学报 1998; 18: 8-9
- 5 刘健, 孙蔚纲. 脾气虚证淋巴细胞转化率的研究(附40例资料分析). 中医药研究 1992; (3): 19-20, 35
- 6 王再谟, 周邦靖, 黎世尧. 脾虚泄泻红细胞免疫黏附活性研究. 中国实验临床免疫学杂志 1991; 3: 40-42
- 7 管学忠, 魏睦新, 贝叔英. 脾阴虚证治的临床探讨. 广西中医药 1989; 12: 18-19
- 8 陈德珍, 魏睦新. 大鼠脾阴虚证病理模型的建立. 新消化病学杂志 1997; 5: 8-10
- 9 魏睦新, 汤一新, 陈德珍, 贝叔英, 管学忠. 信息分析技术在脾胃阴虚证鉴别诊断中的运用. 辽宁中医杂志 2001; 28: 388-390
- 10 汤一新, 安浚. 中医脾阴学说研究. 第1版. 北京: 科学技术文献出版社, 1995: 120-140
- 11 刘汶, 张敦义. 番泻叶致脾虚证动物模型的造型方法. 中国中西医结合脾胃杂志 1998; 6: 231
- 12 慕永平, 刘平, 龙爱华, 都广礼, 王磊, 刘莺, 李风华. CCl_4 大鼠肝硬化成型阶段中医方证病机的研究. 中国中西医结合杂志 2006; 26: 344-347
- 13 田琳, 衣兰娟, 魏睦新. 大腹皮等七味中药对豚鼠离体胃纵行肌条的作用影响. 江苏医药 2006; 32: 1063-1065
- 14 邹百仓, 魏兰福, 魏睦新. 槟榔对功能性消化不良模型大鼠胃运动的影响. 中国中西医结合消化杂志 2003; 11: 6-8
- 15 刘振清, 魏睦新. 防风对大鼠结肠平滑肌收缩的抑制作用及其机制. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2946-2951
- 16 魏睦新, 魏兰福, 邹百仓. 莪术对大鼠胃动力及脑肠肽调节作用的实验研究. 中国中西医结合消化杂志 2008; 16: 292-298
- 17 梁宁霞, 衣兰娟, 田琳, 胡凡, 刘翠萍, 魏睦新. 槟榔碱促结肠平滑肌细胞收缩及对胞内钙离子浓度的影响. 世界华人消化杂志, 2006; 14: 676-681
- 18 魏睦新, 李建军, 汪幼学, 轩原清史. 急性胰腺炎大鼠清胰汤治疗的肠动力作用机制. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1369-1372
- 19 杨传标, 袁靖, 周亮, 张德春, 牛立志, 左建生, 徐克成. 健脾康复丸治疗大肠癌50例临床研究. 中国中医急症 2007; 16: 1198-1199
- 20 曾小莉, 涂植光. 人参总皂甙诱导人肝癌细胞分化初探. 肿瘤防治研究 2000; 28: 188
- 21 Iizuka N, Miyamoto K, Okita K, Tangoku A, Hayashi H, Yosino S, Abe T, Morioka T, Hazama S, Oka M. Inhibitory effect of Coptidis Rhizoma and berberine on the proliferation of human esophageal cancer cell lines. *Cancer Lett* 2000; 148: 19-25
- 22 Chen GQ, Zhu J, Shi XG, Ni JH, Zhong HJ, Si GY, Jin XL, Tang W, Li XS, Xiong SM, Shen ZX, Sun GL, Ma J, Zhang P, Zhang TD, Gazin C, Naoe T, Chen SJ, Wang ZY, Chen Z. In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As_2O_3 induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR α /PML proteins. *Blood* 1996; 88: 1052-1061
- 23 Carneiro CS, Costa-Pinto FA, da Silva AP, Pinello KC, da Silva TC, Matsuzaki P, Nagamine MK, Górniak SL, Haraguchi M, Akisue G, Dagli ML. *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) methanolic extract reduces angiogenesis in mice. *Exp Toxicol Pathol* 2007; 58: 427-431
- 24 Mousa SS, Mousa SS, Mousa SA. Effect of resveratrol on angiogenesis and platelet/fibrin-accelerated tumor growth in the chick chorioallantoic membrane model. *Nutr Cancer* 2005; 52: 59-65

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》标点符号用法

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体. (科学编辑: 李军亮 2009-09-08)

体外灌注法分离大鼠肝脏Kupffer细胞及原代培养

曾 仲, 黄汉飞, 宋 飞, 段 键

背景资料
KCs是肝脏最重要的非实质细胞之一, 在肝脏的炎症反应、缺血再灌注损伤、移植免疫、肝脏纤维化与再生等方面发挥着重要作用, 分离并培养高纯度的KCs是研究其生物性状的基础。

曾仲, 黄汉飞, 宋飞, 段键, 昆明医学院第一附属医院器官移植中心 云南省昆明市 650032
曾仲, 中国人民解放军第三军医大学博士, 副主任医师, 主要从事肝脏移植缺血再灌注损伤研究。
云南省自然科学基金资助项目, No. 2007C137M
云南省科技厅联合基金资助项目, No. 2007C0009R
作者贡献分布: 本文由曾仲设计; 研究过程由曾仲、黄汉飞及宋飞操作完成; 实验技术由段键指导; 本论文写作有曾仲与黄汉飞完成。
通讯作者: 曾仲, 副主任医师, 650032, 云南省昆明市西昌路295号, 昆明医学院第一附属医院器官移植中心。
zzong@medmail.com.cn
电话: 0871-5359202
收稿日期: 2009-06-16 修回日期: 2009-08-22
接受日期: 2009-08-24 在线出版日期: 2009-09-08

Isolation of rat Kupffer cells by ex vivo perfusion and their primary culture

Zhong Zeng, Han-Fei Huang, Fei Song, Jian Duan

Zhong Zeng, Han-Fei Huang, Fei Song, Jian Duan, Organ Transplantation Center, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Yunnan Province of China, No. 2007C137M; and the Joint Fund of Yunnan Provincial Science and Technology Department, No. 2007C0009R
Correspondence to: Zhong Zeng, Organ Transplantation Center, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, 295 Xichang Road, Kunming 650032, Yunnan Province, China. zzong@medmail.com.cn
Received: 2009-06-16 Revised: 2009-08-22
Accepted: 2009-08-24 Published online: 2009-09-08

Abstract

AIM: To explore a convenient and effective method for isolation and primary culture of rat Kupffer cells (KCs) *in vitro*.

METHODS: Ex vivo rat liver tissue was perfused with collagenase IV and diced into small pieces. The diced tissue was digested for 30 min at 37°C and centrifuged to remove hepatocytes. KCs were then separated by means of Percoll density gradient centrifugation and selective adherence. Phagocytosis assay and immunocytochemistry for ED2 were used to identify cells isolated.

RESULTS: The average cell yield per gram of liver before plastic adherence was (2.1 ± 0.3)

$\times 10^6$, and $(1.5 \pm 0.1) \times 10^6$ following plastic adherence. The viability of KCs isolated was higher than 92% as determined by trypan blue exclusion. The purity of KCs, identified by immunocytochemistry for ED2, was higher than 90%. Cultured KCs were functionally intact and exhibited irregular shape.

CONCLUSION: The method for isolation and culture of Kupffer cells by ex vivo perfusion is convenient, efficient and stable. Cultured Kupffer cells retain naive biological characteristics and can be used in future studies.

Key Words: Kupffer cells; Cell isolation; Primary culture

Zeng Z, Huang HF, Song F, Duan J. Isolation of rat Kupffer cells by ex vivo perfusion and their primary culture. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(25): 2550-2554

摘要

目的: 探讨一种简便、高效的大鼠离体肝脏分离Kupffer细胞(KCs)及原代培养的方法。

方法: 采用大鼠肝脏离体 型胶原酶灌注, 剪碎肝脏, 37°C消化30 min, 低速离心去除肝细胞, Percoll不连续密度梯度离心和选择性贴壁的方法分离KCs。通过墨汁吞噬实验和ED2免疫细胞化学来鉴定KCs。

结果: 分离的KCs的得率在细胞贴壁前 $(2.1 \pm 0.3) \times 10^6/g$ 肝脏、贴壁后 $(1.5 \pm 0.1) \times 10^6/g$ 肝脏, 用0.4%台盼蓝染色, 活率大于92%, ED2染色阳性的细胞达90%以上, 分离的细胞培养后功能完整并延伸呈不规则型。

结论: 本实验建立的大鼠肝脏KCs的分离培养方法简便、高效、稳定, 培养的细胞具有良好的生物学性状, 为进一步研究提供基础。

关键词: Kupffer细胞; 细胞分离; 原代培养

曾仲, 黄汉飞, 宋飞, 段键. 体外灌注法分离大鼠肝脏Kupffer细胞及原代培养. *世界华人消化杂志* 2009; 17(25): 2550-2554
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2550.asp>

同行评议者
龚建平, 教授, 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科

0 引言

Kupffer细胞(kupffer cells, KCs)是位于肝血窦内的巨噬细胞, 寄居于肝血窦内皮细胞之间或之上, 是体内固定型巨噬细胞中最大的群体, 约占肝非实质细胞的30%。KCs在肝脏的炎症反应、缺血再灌注损伤、移植免疫及维持肝脏内环境稳定等方面发挥着重要作用, 体外原代培养是探讨其特定功能和阐明作用机制的最有效方式。Knook *et al*^[1]首次从大鼠肝脏分离出KCs, 但原位灌注的方法操作较困难, 经过改进后也产生了一些新的分离方法, 但对于离体肝脏组织的KCs分离报道较少。我们参照Valatas *et al*^[2]和Alabraba *et al*^[3]的方法并加以改进, 摸索出一套简便、稳定而有效的体外灌注法分离大鼠肝脏KCs及其培养方法, 为进一步研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ SD大鼠, 清洁级, 体质量200-250 g, 由中国人民解放军第三军医大学附属大坪医院实验动物中心提供; HBSS液(无Ca²⁺, Mg²⁺)购自德国Hyclone公司; 无水CaCl₂(分析纯)购自天津市光复精细化工研究所; IV型胶原酶和HEPES购自美国Sigma公司; Percoll细胞分离液购自瑞典Pharmacia公司; RPMI 1640培养基和胎牛血清均购自美国Gibco公司; 青链霉素混合液购自德国Hyclone公司; 小鼠抗大鼠CD163 mAb(又名ED2)购自英国Serotec公司; 即用型SABC小鼠IgG免疫组织化学试剂盒和DAB显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞分离液的配置: 100 mg的IV型胶原酶用200 mL的HBSS溶解, 加无水氯化钙0.066 g, 即配成IV型胶原酶组织消化液(含胶原酶0.5 g/L、Ca²⁺ 3 mmol/L), 0.22 μm过滤器过滤除菌, 存放4℃冰箱备用。取Percoll原液90 mL高压灭菌, 加入1.5 mol/L灭菌氯化钠溶液10 mL配成100% Percoll工作液, 然后用100% Percoll工作液与0.15 mol/L灭菌氯化钠溶液以体积比配成30%和60%的Percoll工作液, 存放4℃冰箱。

1.2.2 KCs的分离: 取♂ SD大鼠1只, 乙醚吸入麻醉后碘伏消毒腹部皮毛, 以十字型切口打开腹腔, 将胃及肠管推向大鼠的左侧, 暴露出门静脉。剪开膈肌和膈上下腔静脉, 使大鼠体内血液流入胸腔, 肝脏颜色变成暗红, 此时经门静脉推注生理盐水20 mL, 驱除肝脏内的淤血, 肝脏会逐渐变成土黄色。取最大的左侧一整叶肝脏用于

分离KCs(注: 从肝静脉分支开口处切下, 保留该叶完整的肝静脉开口), 将取下的肝脏放于无菌的培养皿中。在无菌操作台上用37℃ HBSS液20 mL经肝静脉开口继续反复冲洗肝脏, 进一步冲出残留的血液, 至肝脏变成灰白色。将肝脏转移到另一培养皿中, 加入预热至37℃的IV型胶原酶消化液20 mL, 直接用注射器抽取消化液经门静脉开口反复冲洗肝脏, 使肝脏体积增大, 组织松散。肝脏用眼科小剪刀剪碎至2-3 mm³, 胶原酶消化液与肝脏组织一起转移至50 mL离心管中, 放入恒温振荡器中振荡消化30 min(200 r/min, 37℃)。振荡消化液经200目不锈钢筛网过滤, 滤除未完全消化掉的组织, 收集滤液以600 r/min, 4℃离心3 min, 使肝细胞沉淀。收集上清于另一50 mL离心管中, 1500 r/min, 4℃离心5 min, 沉淀肝脏非实质细胞, 弃上清, 沉淀用30% Percoll工作液重悬。取2支15 mL的离心管, 最下层分别铺上60% Percoll工作液3 mL, 中间层为含30% Percoll工作液的肝非实质细胞悬液3 mL, 最上层铺HBSS液3 mL, 加样时沿离心管管壁慢慢加入, 避免各层之间相混合。两离心管以1500 r/min, 4℃离心15 min, 取出后可以看见30% Percoll与60% Percoll液界面间有一膜状细胞层。小心吸取两离心管界面层细胞于另一50 mL离心管中, 用HBSS液10 mL稀释, 1500 r/min, 4℃离心5 min使细胞沉淀于管底。

1.2.3 KCs的培养与纯化: 将离心后所得的细胞沉淀用RPMI 1640培养液(含HEPES 10 mmol/L, 100 mL/L灭活胎牛血清, 青霉素100 kU/L, 链霉素100 mg/L)重悬后以2×10⁶/L浓度接种于培养瓶中, 放于50 mL/L CO₂, 37℃培养箱中培养。培养2 h后, 取出培养瓶, 用瓶内的培养液轻轻冲洗, 去除未贴壁细胞, 更换新的培养液继续放回培养箱中, 即可得到纯化后的肝脏KCs。

1.2.4 KCs的鉴定: 分离的KCs得率和活性测定, 取出5滴细胞悬液加入5滴0.4%台盼蓝染液, 将待测细胞悬液吹打均匀后滴入计数板计数, 活细胞不被染色。在细胞培养液中加入少量碳素墨水, 6-12 h后显微镜下观察细胞吞噬碳素颗粒的情况。收集梯度离心后不同层面的细胞与培养后的KCs使用ED2 mAb进行免疫细胞化学鉴定。

2 结果

2.1 KCs的得率和活性 Percoll密度梯度离心后分层明显, 从上依次是: HBSS层、细胞碎片层、

研发前沿
KCs在肝脏中所占的比例少, 而肝非实质细胞间大小形态相似, 分离KCs的方法也有很多种, 不同方法获得的KCs数量和纯度都有很大的差异。

相关报道
Alabraba *et al*曾报道通过链霉蛋白酶消化人肝脏和密度梯度离心的方法获得较高纯度的KCs, 提供了一种新的以非灌注为基础的获得KCs的方法。

创新盘点

本研究通过离体灌注,一步消化和不连续密度梯度离心方法,分离获得较多数量和高纯度的KCs,使用的方法操作简便,可操作性强。

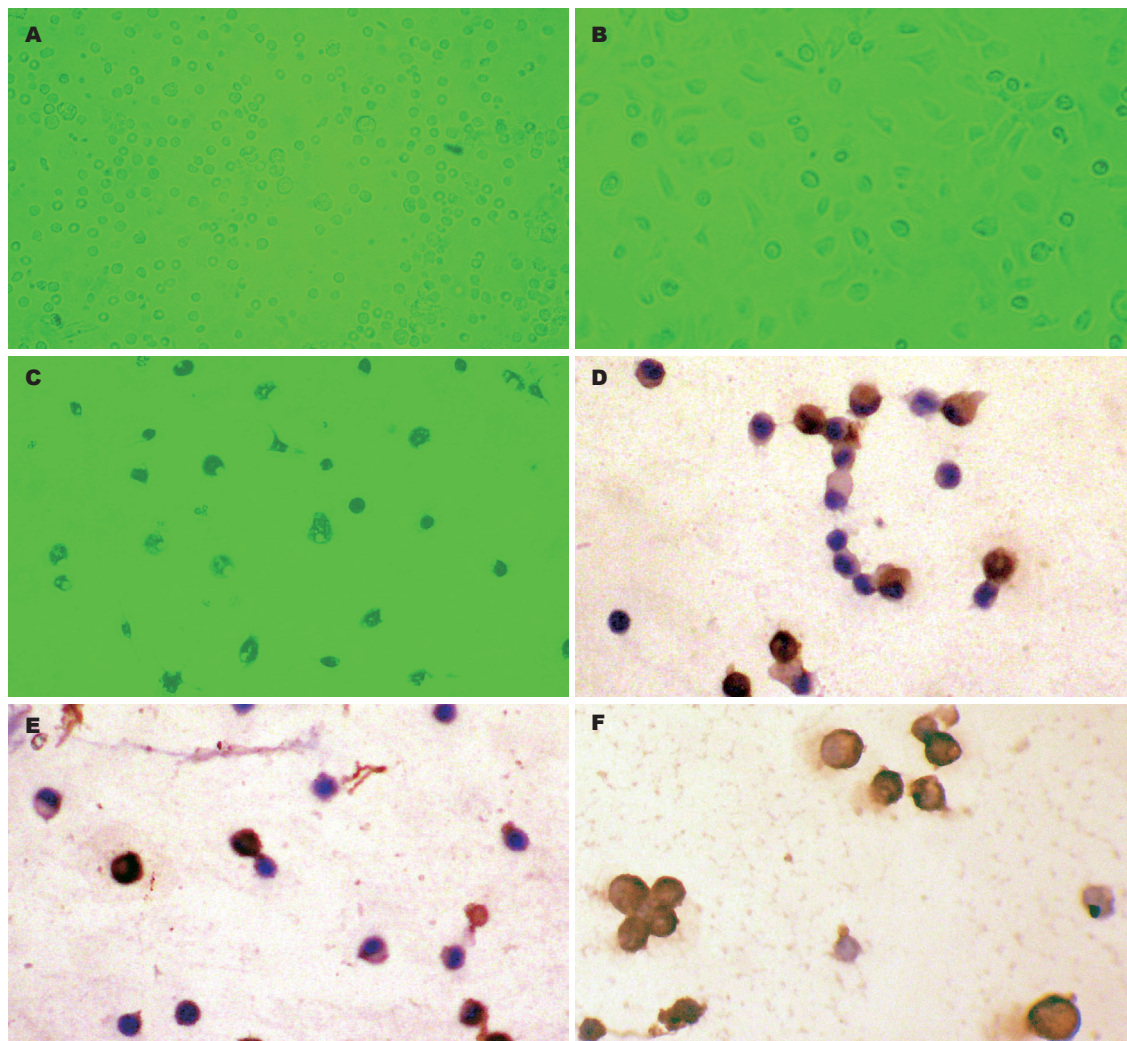


图1 细胞培养与鉴定. A: 新分离的KCs细胞, 呈圆形, 大小基本一致($\times 200$); B: 培养72 h后, 细胞体积增大, 延伸成不规则形, 伸出伪足($\times 200$); C: KCs吞噬碳素颗粒($\times 200$); D: 肝非实质细胞离心前ED2染色($\times 400$); E: 30% Percoll层细胞ED2染色($\times 400$); F: 30% Percoll层与60% Percoll层之间的细胞ED2染色($\times 400$).

30% Percoll层(富含星形细胞和内皮细胞)、富含KCs层、60% Percoll层(少量KCs和肝细胞)及沉淀(红细胞和肝细胞). 经梯度离心后KCs的得率为 $(2.1 \pm 0.3) \times 10^6/\text{g}$ 肝脏, 选择性贴壁后为 $(1.5 \pm 0.1) \times 10^6/\text{g}$ 肝脏, 经0.4%台盼蓝染色, 活率大于92%. 刚分离出来的KCs在328 nm波长的激发光下不发出荧光, 而肝星形细胞则会发出蓝绿色荧光。

2.2 细胞培养及墨汁吞噬实验 刚分离的KCs呈圆形, 体积较小, 折光性强, 培养15 min后开始贴壁, 1-2 h后贴壁牢靠(图1A). 培养24 h后, 细胞体积开始增大, 延伸成三角形与多边形等不规则形状, 2-3 d后开始伸出伪足, 可成梭形(图1B). 随着培养时间的延长, KCs内吞噬颗粒(细胞碎片)会逐渐增多, 间隔1-2 d换液1次, 培养2 wk后细胞仍能成活. 在细胞培养液中加入碳素6-12 h后, 镜下KCs胞质内可见吞噬大量的碳素颗粒, 细胞

核衬托得更加清晰(图1C).

2.3 ED2免疫细胞化学鉴定 收集离心前、离心后30% Percoll层、界面层和60% Percoll层的细胞, 分别涂于载玻片上行免疫细胞化学SABC法ED2染色, 离心前肝非实质细胞中约有30%阳性细胞(图1D), 30% Percoll层阳性细胞很少(图1E), 60% Percoll层细胞数量很少, 几乎为个体较大的肝细胞, 而界面层细胞阳性率达85%以上(图1F), 培养5 d后ED2阳性细胞达95%以上(图2).

3 讨论

KCs在肝脏中所占的比例少, 而且肝非实质细胞间大小相似, 分离得到高纯度的KCs比较困难. 目前, 国内外使用较多的有密度梯度离心法^[4-10]、离心淘析法^[11-13]及流式细胞术^[14-15]. 离心淘析法的优点在于能提高KCs的纯度, 获取的细胞数量也很可观, 但需要昂贵的设备, 在国

应用要点

本研究通过离体灌注消化肝脏, 简化操作流程, 降低成本, 可使用部分肝脏提取KCs, 适合于多次少量的获取细胞, 在不能使用完整的肝脏标本提取细胞时更为适用。

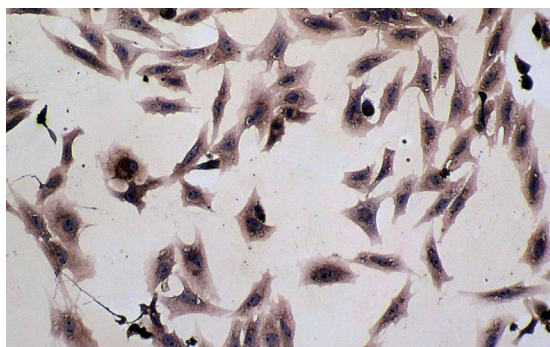


图 2 培养中KCs($\times 400$). ED2染色阳性细胞大于95%, 细胞体积增大, 伸出伪足, 伸展成不规则形。

内很少使用; 流式细胞术所得到的细胞纯度最高, 但细胞的数量有限, 不适合需求量大的实验, 且成本也较高, 应用受到限制; 密度梯度离心法在国内外应用最多, 主要是先用酶使肝脏消化成细胞悬液, 再通过密度梯度离心将不同密度的细胞分开, 但获得的KCs数量和纯度有很大的差异。

我们采用肝脏离体灌注消化法, 完整取下一叶肝脏, IV型胶原酶溶液经肝静脉开口处反复冲洗肝脏, 使肝脏体积增大, 结构松散, 再将肝脏剪碎消化。国内外大多采用链霉菌蛋白酶E和IV型胶原酶联合消化法^[13,16], 链霉菌蛋白酶E能选择性的破坏肝细胞, 消化后能直接得到肝非实质细胞悬液^[13,17-19]。本实验弃用了链霉菌蛋白酶E, 因为肝细胞破坏后会释放大量的DNA, 使细胞间形成粘连、聚集成絮状物, 影响细胞的分离效率和产率, 往往需要与DNA酶 I 一起使用, 而且DNA酶 I 的用量很大^[20]。另外, 有报道^[21]认为链霉菌蛋白酶E在破坏肝细胞的同时, 也对肝非实质细胞有影响, 可破坏KCs表面CD14分子的表达使KCs在初分离的24 h内CD14的表达很少, 影响KCs的功能。我们仅使用IV型胶原酶也能将肝脏消化得很好, 钙离子能增加胶原酶活性, 而且通过差速离心很容易把肝细胞去除, 可以去除肝细胞的80%-90%。也有报道直接将肝脏剪碎消化^[3], 省去肝脏离体冲洗步骤, 我们通过实验发现, 肝脏离体冲洗灌注, 可以大大提升胶原酶的消化效果。因为冲洗可以使肝脏体积增大, 更易于剪碎, 使相同体积的组织较不冲洗的实际组织小, 冲洗可以使胶原酶进入肝脏的微循环, 增加接触面积, 有利于其充分发挥消化作用。

获得肝脏非实质细胞后, 通过不连续密度梯度离心可以将KCs从其他非实质细胞中分离出来^[22-24], 密度梯度离心使用的细胞分离液有多种, 其中以Percoll细胞分离液应用最普遍, 具

有操作方便和性能稳定等优点, 分离细胞的产率和纯度都令人满意^[25-26]。我们采用的是30% Percoll工作液(1.040 kg/L)和60% Percoll工作液(1.075 kg/L), 虽然没有使用链霉菌蛋白酶E, 但在振荡消化过程中以及胶原酶消化过度都会导致少量细胞破坏, 使用30% Percoll重悬肝非实质细胞, 可以避免细胞碎片层及少量的DNA絮状物阻止KCs的沉降, 提高了KCs的产率。也有文献报道使用30% Percoll和70% Percoll两种密度梯度分离^[27], 我们发现该方法两层之间的细胞会有一定量的肝细胞污染, 可能是不同批次Percoll细胞分离液密度有细微差异所致。KCs与其他肝非实质细胞在体积和密度上有一部分重叠, 准确配置细胞分离液的密度很关键, 可以最大化的去除其他肝非实质细胞, 但要得到高纯度的KCs, 还要进一步纯化。KCs与其他肝非实质细胞的贴壁时间有较大差异, 培养1-2 h可以完全贴壁牢靠, 而其他细胞贴壁时间较长, 选择性贴壁是常用的方法。KCs培养时应使用灭活的胎牛血清, 没有灭活的血清含有一些补体成分, 激活的补体很容易导致KCs衰老、死亡^[3]。KCs培养几乎不分裂, 分离出多少就只能培养多少, 得到高产量和高纯度的细胞尤其重要。

我们摸索的这套方法可以用于KCs的进一步研究。与肝脏原位灌注消化法相比, 离体冲洗消化可以大大节约酶的用量。使用部分肝脏提取KCs, 适合用于多次少量的获取细胞, 在不能使用完整的肝脏标本提取细胞时尤为适用。

4 参考文献

- Knook DL, Sleyster EC. Separation of Kupffer and endothelial cells of the rat liver by centrifugal elutriation. *Exp Cell Res* 1976; 99: 444-449
- Valatas V, Xidakis C, Roumpaki H, Kolios G, Kouroumalis EA. Isolation of rat Kupffer cells: a combined methodology for highly purified primary cultures. *Cell Biol Int* 2003; 27: 67-73
- Alabraba EB, Curbishley SM, Lai WK, Wigmore SJ, Adams DH, Afford SC. A new approach to isolation and culture of human Kupffer cells. *J Immunol Methods* 2007; 326: 139-144
- Liu H, Cao H, Wu ZY. Isolation of Kupffer cells and their suppressive effects on T lymphocyte growth in rat orthotopic liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3133-3136
- Hirsch J, Hansen KC, Choi S, Noh J, Hirose R, Roberts JP, Matthey MA, Burlingame AL, Maher JJ, Niemann CU. Warm ischemia-induced alterations in oxidative and inflammatory proteins in hepatic Kupffer cells in rats. *Mol Cell Proteomics* 2006; 5: 979-986
- 郑雪莲, 严茂林, 廖大清, 周总光, 陈珂玲. 应用联合酶建立BALB/c鼠枯否氏细胞体外分离培养方法. *四川大学学报(医学版)* 2008; 39: 298-301
- 张长习, 高绪照, 谢文彪. 大鼠及人肝库否细胞的分离

名词解释
不连续密度梯度离心法: 用一定的介质在离心管内形成不连续的密度梯度, 将细胞混悬液或匀浆置于介质的顶部, 离心后不同大小、不同形状、有一定沉降系数差异的颗粒在密度梯度液中形成若干条界面清楚的不连续区带。

同行评价

本研究建立的大鼠肝脏KCs的分离培养方法简便、高效、稳定, 培养的细胞具有良好的生物学性状, 对实验研究有一定指导意义。

- 8 Qiu DK, Hua J, Li JQ, Li EL. CD14 expression on Kupffer cells during the course of carbon tetrachloride-mediated liver injury. *Chin J Dig Dis* 2005; 6: 137-141
- 9 蔡伟, 李非. 大鼠肝脏Kupffer细胞的分离, 纯化. *中国普外基础与临床杂志* 2007; 14: 292-295.
- 10 Tanimoto A, Wakabayashi G, Shinmoto H, Okuda S, Kuribayashi S, Mukai M. The mechanism of ring enhancement in hepatocellular carcinoma on superparamagnetic iron oxide-enhanced T1-weighted images: an investigation into peritumoral Kupffer cells. *J Magn Reson Imaging* 2005; 21: 230-236
- 11 Murthi P, Kalionis B, Ghabrial H, Dunlop ME, Smallwood RA, Sewell RB. Kupffer cell function during the erythrocytic stage of malaria. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 313-318
- 12 Dory D, Echchannaoui H, Letiembre M, Ferracin F, Pieters J, Adachi Y, Akashi S, Zimmerli W, Landmann R. Generation and functional characterization of a clonal murine periportal Kupffer cell line from H-2Kb-tsA58 mice. *J Leukoc Biol* 2003; 74: 49-59
- 13 Lee CM, Knight B, Yeoh GC, Ramm GA, Olynyk JK. Lymphotoxin-beta production following bile duct ligation: possible role for Kupffer cells. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1762-1768
- 14 Tomiyama K, Ikeda A, Ueki S, Nakao A, Stolz DB, Koike Y, Afrazi A, Gandhi C, Tokita D, Geller DA, Murase N. Inhibition of Kupffer cell-mediated early proinflammatory response with carbon monoxide in transplant-induced hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Hepatology* 2008; 48: 1608-1620
- 15 You Q, Cheng L, Kedl RM, Ju C. Mechanism of T cell tolerance induction by murine hepatic Kupffer cells. *Hepatology* 2008; 48: 978-990
- 16 柳枫, 朱继业, 李涛, 冷希圣. 大鼠库普弗细胞分离培养方法的改良. *中华肝脏病杂志* 2006; 14: 532-535
- 17 Burlak C, Twining LM, Rees MA. Carbohydrates borne on human glycophorin A are recognized by porcine Kupffer cells. *Transplantation* 2005; 80: 66-74
- 18 Yao HW, Li J, Chen JQ, Xu SY. Leflunomide attenuates hepatocyte injury by inhibiting Kupffer cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1608-1611
- 19 Kierner AK, Baron A, Gerbes AL, Bilzer M, Vollmar AM. The atrial natriuretic peptide as a regulator of Kupffer cell functions. *Shock* 2002; 17: 365-371
- 20 Zhang X, Yu WP, Gao L, Wei KB, Ju JL, Xu JZ. Effects of lipopolysaccharides stimulated Kupffer cells on activation of rat hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 610-613
- 21 Ikejima K, Enomoto N, Seabra V, Ikejima A, Brenner DA, Thurman RG. Pronase destroys the lipopolysaccharide receptor CD14 on Kupffer cells. *Am J Physiol* 1999; 276: G591-G598
- 22 李涛, 朱继业, 柳枫, 冷希圣. RNA干扰供体大鼠库普弗细胞B7分子表达对受体大鼠淋巴细胞激活的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 39-44
- 23 Xidakis C, Ljumovic D, Manousou P, Notas G, Valatas V, Kolios G, Kouroumalis E. Production of pro- and anti-fibrotic agents by rat Kupffer cells; the effect of octreotide. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 935-941
- 24 Xidakis C, Mastrodimou N, Notas G, Renieri E, Kolios G, Kouroumalis E, Thermos K. RT-PCR and immunocytochemistry studies support the presence of somatostatin, cortistatin and somatostatin receptor subtypes in rat Kupffer cells. *Regul Pept* 2007; 143: 76-82
- 25 Souza LJ, Shio MT, Molan NA, Machado MC, Jancar S. Acute pancreatitis affects non-parenchymal liver cells by a mechanism dependent on platelet-activating factor. *Pancreatol* 2007; 7: 67-73
- 26 Marangoni A, Aldini R, Sambri V, Giacani L, Di Leo K, Cevenini R. Production of tumor necrosis factor alpha by *Treponema pallidum*, *Borrelia burgdorferi* s.l., and *Leptospira interrogans* in isolated rat Kupffer cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004; 40: 187-191
- 27 刘亮, 张宗明, 张驰, 姜楠. 适于膜片钳技术的大鼠肝Kupffer细胞急性分离和鉴定. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 202-206

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》被收录情况

本刊讯 《世界华人消化杂志》被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析(科技部遴选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2008年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录。(科学编辑: 李军亮 2009-09-08)

γ -氨基丁酸B受体在CCl₄诱导肝纤维化大鼠中的表达

樊文梅, 石炳毅, 马锡慧, 魏红山, 黎立, 韩永, 何秀云

樊文梅, 石炳毅, 马锡慧, 韩永, 何秀云, 中国人民解放军第309医院全军器官移植中心移植研究室 北京市 100091
魏红山, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100015
黎立, 中国人民解放军第309医院实验动物中心 北京市 100091

樊文梅, 2004年北京大学医学部博士, 助理研究员, 主要从事肝病发病机制的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30800509

作者贡献分布: 此课题由樊文梅、石炳毅及魏红山设计; 研究过程由樊文梅、马锡慧、黎立及韩永操作完成; 研究所用试剂由樊文梅与何秀云提供; 数据分析由樊文梅完成; 论文写作由樊文梅完成。

通讯作者: 石炳毅, 教授, 100091, 北京市海淀区黑山扈路甲17号, 中国人民解放军第309医院器官移植中心。

shibingyi@medmail.com.cn

电话: 010-66775188 传真: 010-66775188

收稿日期: 2009-06-05 修回日期: 2009-07-28

接受日期: 2009-08-03 在线出版日期: 2009-09-08

Expression of γ -aminobutyric acid B receptor in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats

Wen-Mei Fan, Bing-Yi Shi, Xi-Hui Ma, Hong-Shan Wei, Li Li, Yong Han, Xiu-Yun He

Wen-Mei Fan, Bing-Yi Shi, Xi-Hui Ma, Yong Han, Xiu-Yun He, Center for Organ Transplantation, the 309th Hospital of Chinese PLA, Beijing 100091, China

Hong-Shan Wei, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100015, China

Li Li, Laboratory Animal Research Center, the 309th Hospital of Chinese PLA, Beijing 100091, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30800509

Correspondence to: Professor Bing-Yi Shi, Center for Organ Transplantation, the 309th Hospital of Chinese PLA, Beijing 100091, China. shibingyi@medmail.com.cn

Received: 2009-06-05 Revised: 2009-07-28

Accepted: 2009-08-03 Published online: 2009-09-08

Abstract

AIM: To investigate the expression of γ -aminobutyric acid (GABA) B receptor in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats.

METHODS: Male Sprague-Dawley rats were intraperitoneally injected with 50% carbon tetrachloride to induce liver fibrosis. Six weeks after induction, liver tissue samples were taken once a week. Each sample was divided into two parts: one was used for hematoxylin and eosin

and Masson's trichrome staining to assess the degree of liver fibrosis and immunohistochemistry to determine the level of α -smooth muscle actin (α -SMA), the other was used for real-time reverse transcription-polymerase chain reaction to detect the expression of GABA B receptor, α -SMA, transforming growth factor- β (TGF- β), collagen I and collagen III mRNAs.

RESULTS: The expression levels of α -SMA, TGF- β , collagen I, collagen III and GABA(B) receptor mRNAs in liver fibrosis at week 7 increased 19.2, 2.1, 37.5, 183.5 and 116.2 times as much as those at week 6, respectively. At week 6, the expression level of GABA(B) receptor in the liver in rats with liver fibrosis was reduced by two times when compared with that in normal control rats. At week 12 when pseudodubule formed, the expression levels of α -SMA and collagen I mRNAs increased 21.6 and 20.6 times as much as those at week 6, respectively, while those of TGF- β and collagen III mRNAs showed no obvious changes. The expression levels of these genes at other time points were almost unchanged when compared with those at week 6.

CONCLUSION: GABA(B) receptor may be involved in the progression of liver fibrosis. In advanced liver fibrosis, the extracellular matrix synthesized is mainly collagen I. The expression of α -SMA is positively correlated with the degree of liver fibrosis.

Key Words: γ -aminobutyric acid B receptor; Liver fibrosis; α -smooth muscle actin; Transforming growth factor- β

Fan WM, Shi BY, Ma XH, Wei HS, Li L, Han Y, He XY. Expression of γ -aminobutyric acid B receptor in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(25): 2555-2560

摘要

目的: 探讨 γ -氨基丁酸(GABA)B受体在肝纤维化大鼠中的表达。

方法: SD大鼠, 腹腔注射50% CCl₄制备大鼠肝纤维化模型。从第6周开始, 每周1次取大

背景资料

近年来, 相关证据表明, 肝纤维化甚至早期肝硬化都有逆转的可能。因此, 揭示肝纤维化的发生机制, 是解决肝病问题的根本所在。

同行评议者

王凯, 教授, 山东大学齐鲁医院肝病科

研发前沿

GABA是一种抑制性神经递质,在肝衰及肝性脑病患者血清中GABA水平升高,已有证据表明GABA与肝性脑病相关,一些肝病患者的神经综合征,而神经递质如何调控肝脏功能尚属空白。

鼠肝组织,得到不同肝纤维化程度的肝脏标本。一部分标本40 g/L甲醛固定,常规石蜡包埋,连续4 μm 切片,做组织病理学染色(HE、Masson)和免疫组织化学(α -SMA),以确定不同肝纤维化水平。另一部分标本 -80°C 保存用于提取肝脏RNA,逆转录得到cDNA,设计GABA(B)受体、 α -SMA、TGF- β 、胶原、胶原的引物,做实时荧光定量PCR,分析GABA(B)受体的表达与大鼠肝纤维化程度的相关性。

结果:建模7 wk时, α -SMA、TGF- β 、胶原和胶原较6 wk分别增加19.2倍、2.1倍、37.5倍和183.5倍。GABA(B)受体基因表达也明显升高,升高量达到116.2倍。6 wk对照组GABA(B)受体基因表达是模型组的2倍。到12 wk初步形成假小叶时,只有 α -SMA和胶原增加显著,分别为21.6倍和20.1倍。TGF- β 和胶原变化不明显。其他时间点基因表达与6 wk模型相比无明显变化。

结论:GABA(B)受体可能参与了肝纤维化的发生。在肝纤维化晚期,细胞外基质的合成主要以胶原为主,胶原次之。 α -SMA的表达与肝纤维化水平呈正相关。

关键词: γ -氨基丁酸B受体; 肝纤维化; α -平滑肌动蛋白; 转化生长因子- β

樊文梅, 石炳毅, 马锡慧, 魏红山, 黎立, 韩永, 何秀云. γ -氨基丁酸B受体在 CCl_4 诱导肝纤维化大鼠中的表达. 世界华人消化杂志 2009; 17(25): 2555-2560

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2555.asp>

0 引言

肝纤维化是大多数慢性肝病所共有的病理特征,是多种慢性肝病向肝硬化发展的主要中间环节^[1]。20世纪60-80年代,肝纤维化多被认为是不可逆转的,近20年来,越来越多的证据表明,肝纤维化甚至早期肝硬化都有逆转的可能^[2-4]。若能早期诊断和治疗可逆转这一过程,若诊断和治疗不及时则可进一步发展为肝硬化,部分病例最终导致肝癌,严重威胁着人们的健康和生命。因此,揭示肝纤维化的发生机制,是解决肝病问题的根本所在。众所周知,肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)的活化是肝纤维化发生的核心环节^[5-7]。我们前期研究表明, γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric, GABA)能够影响HSCs的基因表达谱、刺激HSCs活化的基因表达上调^[8]。GABA是脑内最重要的抑制性神

经递质,主要分布在哺乳动物脑内。临床研究表明,在肝病患者中,血清GABA水平升高,肝性脑病患者血清中GABA水平亦升高。GABA与其受体结合发挥生理功能,根据受体对激动剂和拮抗剂的敏感性,可以将GABA受体分为A型、B型及C型3个亚型^[9]。脑内GABA受体主要是GABA(A)受体, GABA(B)受体较少, GABA(C)受体目前仅在视网膜发现, GABA(B)受体属G蛋白偶联受体家族,他广泛存在于中枢神经系统和外周组织,在多种生理过程中发挥重要作用^[10]。本组前期用血管紧张素II刺激肝星状细胞系,随后的基因芯片结果表明, GABA(B)受体表达上调^[11]。因此本研究试图通过在大鼠肝纤维化模型的基础上,运用组织病理学染色、免疫组织化学、实时荧光定量PCR技术探讨GABA(B)受体基因在肝纤维化不同阶段表达量的差异,以期了解GABA(B)受体基因表达与大鼠肝纤维化水平的相关性,为开发新的抗肝纤维化药物提供一种新的靶点。

1 材料和方法

1.1 材料 雄性SD大鼠20只, SPF级动物, 体质量230-250 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。普通饲料喂养, 随机分成2组: 肝纤维化模型组15只(随机分到3个笼子里喂养, 每笼5只)、对照组5只。甲醛溶液、橄榄油、 CCl_4 购自北京化学试剂公司。即用型(非生物素)两步法免疫组织化学试剂盒购自北京中杉生物技术有限公司。TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司, 实时PCR试剂盒(货号DRR081A)购自大连宝生物公司。 α -SMA一抗购自武汉博士德生物工程公司。引物合成在上海生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 造模: 每周2次腹腔注射, 模型组注射剂量按0.1 mL/100 g体质量注射橄榄油配制的 CCl_4 溶液, 1:1配制, 对照组注射橄榄油。从第6周开始, 每周四随机选取模型组2只, 对照组1只, 颈椎脱臼处死, 进行取材。所取肝脏组织, 一部分用100 g/L的甲醛溶液固定, 一部分放入冻存管并于 -80°C 保存。

1.2.2 病理组织染色: 常规组织脱水、包埋, 切片, 染色。免疫组织化学用两步法(非生物素)检测试剂盒, α -SMA免疫组织化学染色步骤按说明书进行。

1.2.3 TRIzol法提取RNA, 逆转录得到cDNA: 称取50-100 mg肝脏组织, 在液氮中磨成粉末后,

相关报道

神经营养因子受体p75NTR对肝脏的保护是近来在神经和肝脏关系方面影响力较大的一篇研究。研究发现敲除营养因子受体的小鼠肝脏炎症明显加重。

加入1 mL TRIzol, 静置5 min, 转移到1.5 mL的eppendorf管中, 详细步骤按照TRIzol说明书进行, RNA沉淀重悬于DEPC水中, 用分光光度计测定样品浓度, 分别取1 μ g做逆转录。

1.2.4 荧光定量PCR: 用SYBR实时PCR试剂盒配制反应体系, 20 μ L反应体系中包含SYBR Premix Ex Taq II (2 \times)10 μ L、10 μ mol/L的Primer Forward 0.8 μ L、10 μ mol/L Primer Reverse 0.8 μ L、cDNA模板2 μ L、超纯水6.4 μ L。用Bio-rad Chromo4荧光定量PCR仪进行扩增检测, 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C, 30 s, 95 $^{\circ}$ C, 5 s, 60 $^{\circ}$ C, 20 s, 40个循环, 溶解曲线绘制秩序如下, 95 $^{\circ}$ C 3 min, 55.0 $^{\circ}$ C 3 min, 溶解曲线制作温度设定从55.0 $^{\circ}$ C-95.0 $^{\circ}$ C, 每0.5 $^{\circ}$ C读1次板, 停2 s。引物序列见表1。

统计学处理 用 $\Delta\Delta$ CT法处理数据并进行相对定量比较, 增加2倍以上或下降0.5倍以下被认为有显著性差异。

2 结果

2.1 肝纤维化程度与 α -SMA表达水平相一致 6 wk时, 对照组可见肝小叶结构完整, 中央静脉清晰, 肝细胞呈放射状排列, 马苏染色可见极少量的胶原纤维, α -SMA在汇管区和中央静脉处微量存在。肝纤维化模型组, 6 wk时, HE及马苏染色可见肝细胞气球样变较为严重, 胶原纤维散在分布, α -SMA在汇管区表达较正常对照组高。7 wk时, HE染色可见肝细胞排列紊乱, 中央静脉偏位。马苏染色可见汇管区有大量的胶原纤维, α -SMA在汇管区表达呈强阳性, 较6 wk时阳性都增强。12 wk时, HE及马苏染色可见大量纤维束包绕, 即形成初步假小叶。 α -SMA表达呈强阳性。6-7 wk时, 大鼠肝脏的结构及成分的变化最明显, 8-10 wk的纤维化程度无明显差异(数据未显示), 但都不如7 wk纤维化明显, 12 wk时, 初步假小叶形成, 即到了肝硬化初期(图1)。

2.2 GABA(B)受体、 α -SMA、TGF- β 、胶原和胶原 在建模期间相对于6wk的变化 如图2所示, GABA(B)受体、 α -SMA、TGF- β 、胶原I和胶原III这5个基因在建模6-7 wk的进程中表达量明显升高, 尤其是GABA(B)受体基因7 wk模型表达量达到6 wk模型的116倍。6 wk模型与6 wk对照相比, GABA(B)受体表达有所下降, 胶原III没有明显变化。而 α -SMA、TGF- β 和胶原I基因表达较6 wk对照分别增加3.1、2.9、1.7倍。10 wk模型GABA(B)受体基因表达较6 wk模型稍有升高, TGF- β 基因表达稍有降低, 而其他时间点GABA(B)受体基因表达与6 wk模型相比无明显

表 1 实时PCR引物序列表

基因	引物序列
β -actin	5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3' 5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3'
GABA(B)受体	5'-GTCCTGTACAAATGTGCTCGCTTC-3' 5'-GTGCTCAACGCATCATACACACC-3'
胶原 I	5'-TCCTGGCAATCGTGGTTCAA-3' 5'-ACCAGCTGGGCCAACATTTC-3'
胶原 III	5'-GGTCTGCAGTAACAGTGGTTC-3' 5'-TGCTCCAGTTAGCCCTGCAA-3'
TGF- β 1	5'-TGCGCCTGCAGAGATTCAAG-3' 5'-AGGTAACGCCAGGAATTGTTGCTA-3'
α -SMA	5'-AGCCAGTCGCCATCAGGAAC-3' 5'-CCGGAGCCATTGTCACACAC-3'

差异。12 wk模型 α -SMA、胶原I和胶原III基因表达较6 wk模型高, 其中 α -SMA、胶原I的升高幅度比较明显, 分别为21.6倍和20.1倍。

3 讨论

在肝纤维化形成过程中, HSCs是主要的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)形成细胞^[6-7]。任何病因的肝损伤都会导致HSCs的活化和大量增殖, 发生表型转化, 转变为肌成纤维细胞(myofibroblast, MFB)。MFB主要表达 α -SMA, 后者是MFB活跃的标志性抗原^[3,12-14]。MFB合成分泌大量的ECM, 导致肝纤维化的形成。GABA和GABA受体是最重要的抑制性神经递质, 早期的研究发现, 肝病患者的血清中GABA水平升高^[15], 肝性脑病患者的血清GABA浓度与脑病程度平行^[16]。早在2002年, Dubuisson *et al*用交感神经系统的抑制剂减缓了实验大鼠的肝纤维化^[17]。霍普金斯大学医学院的Oben *et al*也在这一领域作了探索, 他们发现HSCs表达肾上腺素受体, 能够释放去甲肾上腺素, 在HSCs中加入肾上腺素受体拮抗剂后, HSCs的生长即受到抑制, 去甲肾上腺素可以使HSCs重新活化^[18]。HSCs表达多种神经内分泌蛋白以及他们相应的受体^[19-21], 这些都暗示了肝脏和神经方面的联系。

本研究利用CCl₄诱导大鼠肝纤维化模型, 结果显示GABA(B)受体在7 wk增加了116.2倍。提示GABA(B)受体可能与肝纤维化的发展相关。本研究首次报道了GABA(B)受体在肝纤维化过程中的表达。GABA(B)受体是G蛋白偶联受体, 在所有组织器官中均有表达, 因而他可能广泛的控制着外周组织器官^[10]。他与药物成瘾、癫痫病和神经痛等有关^[22-24]。有研究显示GABA(B)

创新盘点

本研究的创新之处在于GABA(B)受体与肝纤维化的关系为国内外首次报道, 结果提示, 在肝纤维化早期GABA(B)受体显著上调, 建模7 wk时达到6 wk的116倍, 其上调的生物学意义尚待进一步研究。

应用要点

本研究初步发现GABA(B)受体在肝纤维化早期表达增加,其具体的生物学意义尚未明确,本课题组将通过进一步的动物实验来深入探讨GABA(B)受体在肝纤维化中的调节机制,从而为抗纤维化药物的研制提供新的靶点。

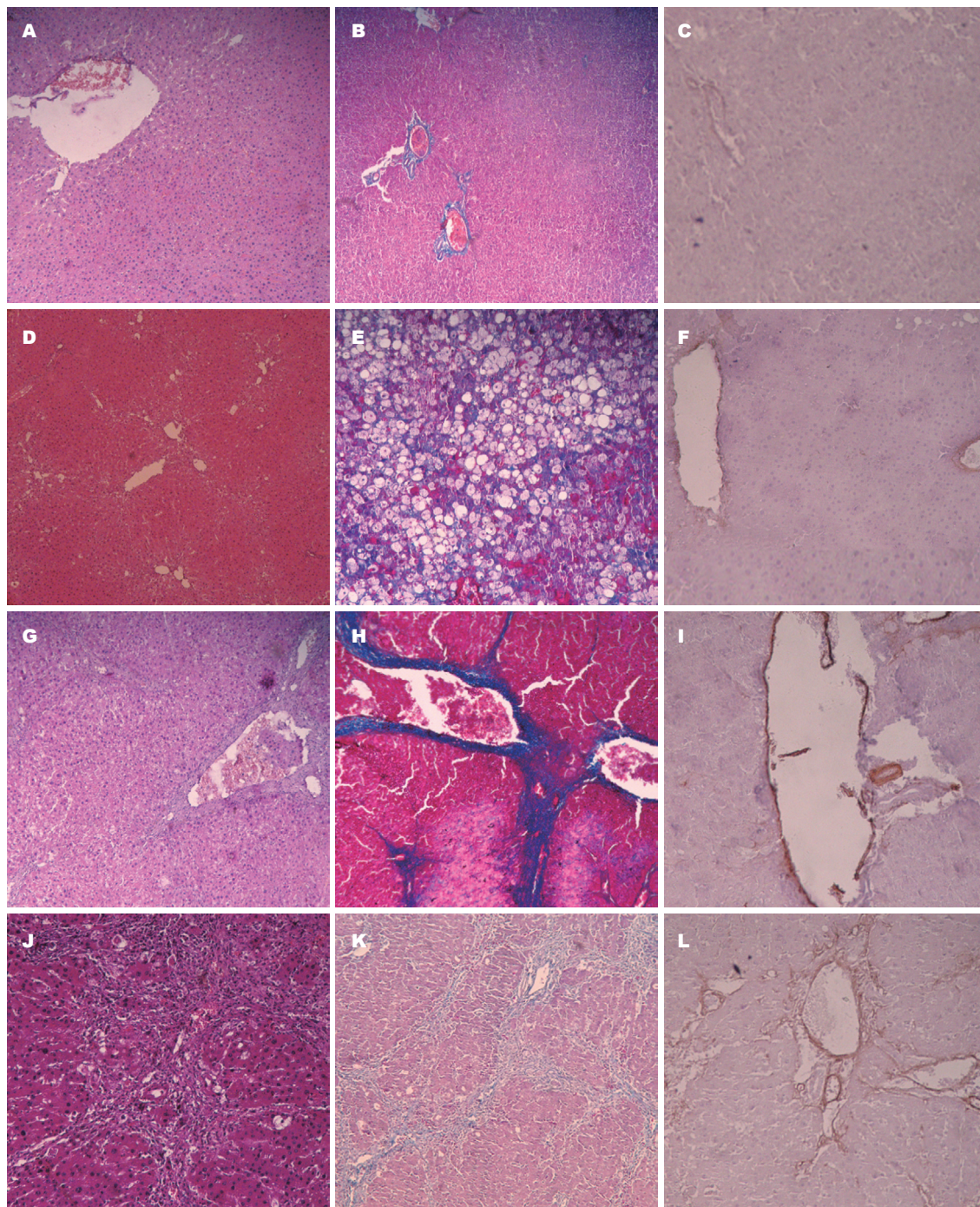


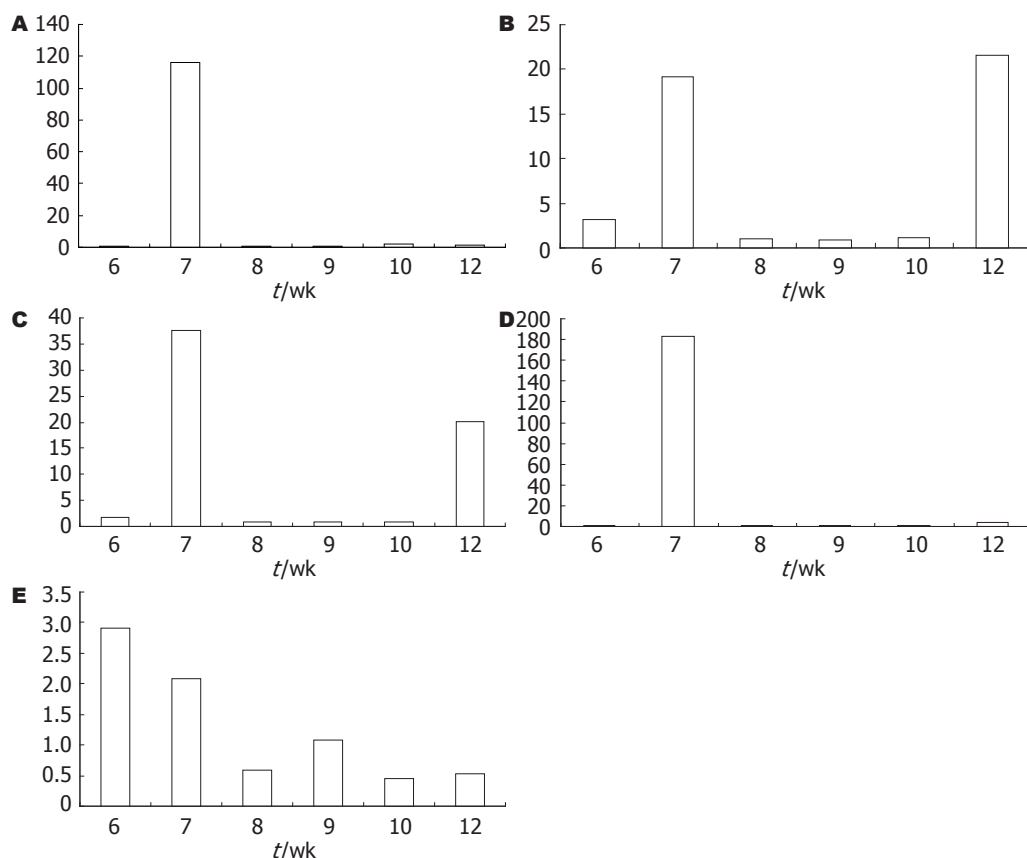
图1 肝纤维化程度与 α -SMA表达水平呈正相关。A, D, G, J: HE染色($\times 100$); B, E, H, K: Masson染色($\times 100$); C, F, I, L: α -SMA免疫组织化学($\times 100$); A-C: 对照组6 wk; D-F: 模型组6 wk; G-I: 模型组7 wk; J-L: 模型组12 wk。

受体激动剂可以抑制肝癌细胞的生长^[25], 提示GABA(B)受体与肝病之间的关系。其后的几周, GABA(B)没有显著的变化, GABA(B)受体在早期的显著升高, 到后期相对于基点的没有变化, 其具体的生物学意义尚未可知。

本组研究表明, 建模7 wk时的基因合成最为活跃。与肝纤维化发生明确相关的 α -SMA、TGF- β 、胶原I和胶原III分别增加19.2、2.1、37.5和183.5倍。可见7 wk是模型组大鼠肝纤维化

发生的关键期。到12 wk初步形成假小叶时, 只有 α -SMA和胶原I增加显著, TGF- β 和胶原III变化均不明显, 其中胶原I在12 wk时增加20.1倍, 而胶原III增加了4.4倍, 由此可见, 在肝纤维化晚期即肝硬化初期, ECM的合成主要以胶原I为主, 胶原III次之。 α -SMA的表达与肝纤维化水平呈正相关, 这与国外的研究结果是一致的^[24]。

TGF- β 是一组具有多种功能的蛋白多肽, 已有研究证明, 他在ECM的产生、修饰以及成



名词解释
细胞外基质 (ECM): 是由大分子构成的错综复杂的网络, 为细胞的生存及活动提供适宜的场所, 并通过信号转导系统影响细胞的形状、代谢、功能、迁移、增殖和分化。

图 2 不同建模周数相对于6 wk的基因表达变化, 计算方法依据 $\Delta\Delta CT$ 方法进行. A: GABA(B)受体; B: α -SMA; C: 胶原 ; D: 胶原 ; E: TGF- β .

分的变化、细胞黏附、细胞之间的相互作用中发挥着重要作用. 肝纤维化时, 活化的HSCs是细胞外基质的主要来源, 虽然多种因子参与了HSCs的活化, 但TGF- β 是最有效的刺激因子之一. 他有激活HSCs并促使其转化为肌成纤维细胞、合成大量ECM、抑制肝细胞再生、激活转录因子NF- κ B, 引起一系列靶基因激活等作用^[27-29]. 在CCl₄诱导的实验性大鼠肝纤维化模型中, TGF- β 在7 wk时明显升高, 达2.1倍, 6 wk模型组TGF- β 水平较对照组增加了2.9倍, 可见TGF- β 在肝纤维化发生中的重要作用. 理论上CCl₄诱导的肝纤维化程度呈进展性发展, HE和马苏染色也揭示了这样的一个过程. 但是7 wk后, TGF- β 水平呈下降趋势, 本研究只检测了TGF- β 1的表达, 有研究显示TGF- β 1主要表达于Kupffer细胞, 其次是星状细胞^[30]. 本研究中TGF- β 水平和组织纤维化不一致的原因可能与实验中称取的组织部位有关.

本组前期的研究证明, GABA能够影响HSCs的基因表达谱、刺激HSCs增殖相关基因上调^[8,11]. 本研究发现, GABA(B)受体基因表达与其他肝纤维化相关基因一样, 在建模6-7 wk

的进程中第1次出现表达量升高, 即在肝纤维化的早期, GABA(B)受体一过性升高, 到12 wk时有所下降, 可能GABA(B)受体在肝纤维化的早期促进了相关DNA的合成, Biju *et al*也发现GABA(B)受体参与了肝细胞DNA的合成, 加入GABA(B)受体激动剂可促进肝细胞DNA的合成^[31]. 6 wk时, GABA(B)受体表达水平和对照组相比下降了50%, 提示GABA(B)受体可能对于维持肝细胞的正常生理功能是必要的, 他在肝脏等周边组织中的表达, 也提示他可能具有的重要作用, 但是GABA(B)受体如何影响肝纤维化发生发展, 甚至肝细胞再生等过程, 其具体机制还有待于深入研究.

4 参考文献

- 1 李才. 器官纤维化基础与临床. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 52
- 2 Bonis PA, Friedman SL, Kaplan MM. Is liver fibrosis reversible? *N Engl J Med* 2001; 344: 452-454
- 3 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218
- 4 Kisseleva T, Brenner DA. Hepatic stellate cells and the reversal of fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21 Suppl 3: S84-S87
- 5 Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells--a key issue in liver fibrosis. *Front*

同行评价

本文选题明确, 设计思路清晰合理, 具有一定的创新性, 实验方法简单可靠, 文题较准确反映了研究工作的科学问题和特定内容, 可读性强。

- Biosci* 2002; 7: d808-d826
- 6 Moreira RK. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 1728-1734
 - 7 Kisseleva T, Brenner DA. Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S73-S78
 - 8 樊文梅, 李国力, 魏红山. 抑制性消减杂交技术筛选 γ -氨基丁酸调节的肝星状细胞系靶基因. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2831-2834
 - 9 Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, Gassmann M. Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol Rev* 2004; 84: 835-867
 - 10 Castelli MP, Inganni A, Stefanini E, Gessa GL. Distribution of GABA(B) receptor mRNAs in the rat brain and peripheral organs. *Life Sci* 1999; 64: 1321-1328
 - 11 肖凡, 魏红山, 李国力, 张剑平, 宋川. 应用基因表达谱芯片技术筛选GABA作用下肝星状细胞差异表达基因. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 629-632
 - 12 Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 2008; 88: 125-172
 - 13 Carpino G, Morini S, Ginanni Corradini S, Franchitto A, Merli M, Siciliano M, Gentili F, Onetti Muda A, Berloco P, Rossi M, Attili AF, Gaudio E. Alpha-SMA expression in hepatic stellate cells and quantitative analysis of hepatic fibrosis in cirrhosis and in recurrent chronic hepatitis after liver transplantation. *Dig Liver Dis* 2005; 37: 349-356
 - 14 Nouchi T, Tanaka Y, Tsukada T, Sato C, Marumo F. Appearance of alpha-smooth-muscle-actin-positive cells in hepatic fibrosis. *Liver* 1991; 11: 100-105
 - 15 Minuk GY. Gamma-aminobutyric acid and the liver. *Dig Dis* 1993; 11: 45-54
 - 16 Campolito O, MacGillivray BB, McIntyre N. [Association of plasma ammonia and GABA levels and the degree of hepatic encephalopathy] *Rev Invest Clin* 1992; 44: 483-490
 - 17 Dubuisson L, Desmouliere A, Decourt B, Evade L, Bedin C, Boussarie L, Barrier L, Vidaud M, Rosenbaum J. Inhibition of rat liver fibrogenesis through noradrenergic antagonism. *Hepatology* 2002; 35: 325-331
 - 18 Oben JA, Roskams T, Yang S, Lin H, Sinelli N, Torbenson M, Smedh U, Moran TH, Li Z, Huang J, Thomas SA, Diehl AM. Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters. *Gut* 2004; 53: 438-445
 - 19 Sato M, Suzuki S, Senoo H. Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct Funct* 2003; 28: 105-112
 - 20 Oben JA, Yang S, Lin H, Ono M, Diehl AM. Norepinephrine and neuropeptide Y promote proliferation and collagen gene expression of hepatic myofibroblastic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 302: 685-690
 - 21 Passino MA, Adams RA, Sikorski SL, Akassoglou K. Regulation of hepatic stellate cell differentiation by the neurotrophin receptor p75NTR. *Science* 2007; 315: 1853-1856
 - 22 Cousins MS, Roberts DC, de Wit H. GABA(B) receptor agonists for the treatment of drug addiction: a review of recent findings. *Drug Alcohol Depend* 2002; 65: 209-220
 - 23 Gambardella A, Manna I, Labate A, Chifari R, La Russa A, Serra P, Cittadella R, Bonavita S, Andreoli V, LePiane E, Sasanelli F, Di Costanzo A, Zappia M, Tedeschi G, Aguglia U, Quattrone A. GABA(B) receptor 1 polymorphism (G1465A) is associated with temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2003; 60: 560-563
 - 24 Sindrup SH, Jensen TS. Pharmacotherapy of trigeminal neuralgia. *Clin J Pain* 2002; 18: 22-27
 - 25 Wang T, Huang W, Chen F. Baclofen, a GABAB receptor agonist, inhibits human hepatocellular carcinoma cell growth in vitro and in vivo. *Life Sci* 2008; 82: 536-541
 - 26 Akpolat N, Yahsi S, Godekmerdan A, Yalniz M, Demirbag K. The value of alpha-SMA in the evaluation of hepatic fibrosis severity in hepatitis B infection and cirrhosis development: a histopathological and immunohistochemical study. *Histopathology* 2005; 47: 276-280
 - 27 贾杰, 梁永红. 转化生长因子 β 与肝纤维化的研究进展. *医学综述* 2008; 14: 3225-3226
 - 28 郭锐芳. 以TGF- β 为靶点的抗肝纤维化治疗. *实用肝病杂志* 2008; 11: 341-343
 - 29 Inagaki Y, Okazaki I. Emerging insights into Transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut* 2007; 56: 284-292
 - 30 De Bleser PJ, Niki T, Rogiers V, Geerts A. Transforming growth factor-beta gene expression in normal and fibrotic rat liver. *J Hepatol* 1997; 26: 886-893
 - 31 Biju MP, Pyroja S, Rajeshkumar NV, Paulose CS. Enhanced GABA(B) receptor in neoplastic rat liver: induction of DNA synthesis by baclofen in hepatocyte cultures. *J Biochem Mol Biol Biophys* 2002; 6: 209-214

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

脂质过氧化损伤对高脂血症大鼠重症急性胰腺炎的作用及机制

林志辉, 黄胡萍

林志辉, 黄胡萍, 福建医科大学省立临床学院 福建省立医院
消化内科 福建省福州市 350001

林志辉, 主任医师, 主要从事慢性肝胆胰病及胃肠动力障碍性疾病研究。

作者贡献分布: 林志辉与黄胡萍对此文所作贡献均等; 此课题由林志辉与黄胡萍设计; 研究过程由黄胡萍操作完成; 数据分析由黄胡萍完成; 本论文写作由林志辉与黄胡萍完成。

通讯作者: 林志辉, 主任医师, 350001, 福建省福州市东街134号, 福建省立医院消化内科. drlzh@sohu.com

电话: 0591-87557768

收稿日期: 2009-06-01 修回日期: 2009-07-23

接受日期: 2009-08-10 在线出版日期: 2009-09-08

Role of lipid peroxidation in the development of severe acute pancreatitis in rats with hyperlipemia

Zhi-Hui Lin, Hu-Ping Huang

Zhi-Hui Lin, Hu-Ping Huang, Department of Gastroenterology, Fujian Provincial Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Correspondence to: Zhi-Hui Lin, Department of Gastroenterology, Fujian Provincial Hospital, Fujian Medical University, 134 East Street, Fuzhou 350001, Fujian Province, China. drlzh@sohu.com

Received: 2009-06-01 Revised: 2009-07-23

Accepted: 2009-08-10 Published online: 2009-09-08

Abstract

AIM: To investigate the role of lipid peroxidation in the development of severe acute pancreatitis (SAP) in rats with hyperlipemia (HP).

METHODS: Sprague-Dawley (SD) rats were administered intragastrically a high-fat diet for two weeks to induce experimental HP. SAP was induced by retrograde injection of 3.5% sodium taurocholate into the pancreatic duct. Fifty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups: normal control group, HL group, SAP group and HAP (HL+SAP) group. The levels of amylase (AMS), triglyceride (TG) and cholesterol (CH) in the serum were measured. The changes in the concentrations of malonaldehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), xanthine oxidase (XOD) and nitric oxide (NO) in the serum and pancreatic tissue were

also measured. The pathological changes in the pancreas were evaluated under light microscopy.

RESULTS: The pathological changes in the pancreas were more severe in the HAP group than in the SAP group. The levels of MDA and XOD in the serum and pancreatic tissue were significantly higher in the HAP group than in the SAP group (serum: 30.76 ± 2.67 nmol/mL vs 23.14 ± 3.42 nmol/mL and 55.72 ± 10.49 U/L vs 45.78 ± 8.98 U/L, both $P < 0.01$; pancreatic tissue: 4.33 ± 0.48 nmol/mgprot vs 2.87 ± 0.45 nmol/mgprot and 5.57 ± 0.63 U/gprot vs 4.33 ± 0.79 U/gprot, both $P < 0.01$), while the levels of SOD and NO in the serum and pancreatic tissue were significantly lower in the HAP group than in the SAP group (serum: 85.46 ± 13.56 U/mL vs 97.16 ± 13.77 U/mL and 31.72 ± 10.50 μ mol/L vs 52.97 ± 6.01 μ mol/L, both $P < 0.05$; pancreatic tissue: 22.65 ± 3.85 U/mgprot vs 27.88 ± 4.43 U/mgprot and 1.09 ± 0.21 μ mol/gprot vs 1.48 ± 0.40 μ mol/gprot, both $P < 0.05$).

CONCLUSION: Hyperlipemia can aggravate pancreatic pathological changes caused by severe acute pancreatitis in rats perhaps through induction of lipid peroxidation.

Key Words: Hyperlipemia; Severe acute pancreatitis; Lipid peroxidation; Oxygen free radicals

Lin ZH, Huang HP. Role of lipid peroxidation in the development of severe acute pancreatitis in rats with hyperlipemia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(25): 2561-2565

摘要

目的: 观察高脂血症对大鼠急性胰腺炎病情的影响, 探讨脂质过氧化损伤在伴高脂血症重症急性胰腺炎(SAP)中的作用及其机制。

方法: SD大鼠脂肪乳剂灌胃2 wk建立高脂血症模型, 逆行胰胆管注射3.5%牛磺胆酸钠诱发SAP模型。将大鼠50只随机分为4组: 正常组

背景资料
重症急性胰腺炎(SAP)具有起病急、并发症多、死亡率高等特点, 属临床危重急症。高脂血症尤以高甘油三酯血症与SAP关系密切。目前认为急性胰腺炎(AP)及全身并发症的发生与氧自由基所致的损伤有关, 一氧化氮及氧自由基在AP发病中的作用逐渐受到重视, 脂质过氧化损伤被认为是AP的病理生理变化基础。

同行评议者
沈柏用, 副教授, 上海市交通大学医学院瑞金医院肝胆胰外科中心

研发前沿
高脂血症作为AP
的高危因素已日渐
受到人们的关注.

($n = 10$); 高脂血症对照组(HL组, $n = 10$); SAP组($n = 15$); 伴高脂血症SAP(HAP, $n = 15$). 检测血清淀粉酶(AMS)、甘油三酯(TG)及胆固醇(CH)水平, 并检测血清及胰腺组织的丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、黄嘌呤氧化酶(XOD)、一氧化氮(NO), 观察胰腺组织病理改变.

结果: HAP组胰腺组织病理改变较SAP组严重; HAP组血清及胰腺组织MDA、XOD水平显著高于SAP组(血清: 30.76 ± 2.67 nmol/mL vs 23.14 ± 3.42 nmol/mL, 55.72 ± 10.49 U/L vs 45.78 ± 8.98 U/L, 均 $P < 0.01$; 胰腺组织: 4.33 ± 0.48 nmol/mgprot vs 2.87 ± 0.45 nmol/mgprot, 5.57 ± 0.63 U/gprot vs 4.33 ± 0.79 U/gprot, 均 $P < 0.01$); 其血清及胰腺组织SOD、NO水平显著低于SAP组(血清: 85.46 ± 13.56 U/mL vs 97.16 ± 13.77 U/mL, 31.72 ± 10.50 μ mol/L vs 52.97 ± 6.01 μ mol/L, 均 $P < 0.05$; 胰腺组织: 22.65 ± 3.85 U/mgprot vs 27.88 ± 4.43 U/mgprot, 均 $P < 0.01$; 1.09 ± 0.21 μ mol/gprot vs 1.48 ± 0.40 μ mol/gprot, 均 $P < 0.05$).

结论: 高脂血症可加重SAP的胰腺病理改变; 脂质过氧化损伤可能在高脂血症加重SAP的机制中发挥重要作用.

关键词: 高脂血症; 重症急性胰腺炎; 脂质过氧化; 氧自由基

林志辉, 黄胡萍. 脂质过氧化损伤对高脂血症大鼠重症急性胰腺炎的作用及机制. 世界华人消化杂志 2009; 17(25): 2561-2565
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2561.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)具有起病急、并发症多、死亡率高等特点, 属临床危重急症, 高脂血症尤以高甘油三酯血症与SAP关系密切. 我国台湾地区的1项临床流行病学调查发现, 高甘油三酯血症占全部急性胰腺炎病因的12.3%^[1], 动物实验也证实其能加重胰腺炎的病理损害^[2-3]. 目前认为急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)及全身并发症的发生与氧自由基所致的损伤有关^[4-5], 一氧化氮(nitric oxide, NO)及氧自由基在AP发病中的作用逐渐受到重视, 脂质过氧化损伤被认为是AP的病理生理变化基础^[6]. 本研究建立了伴高脂血症的SAP大鼠模型, 通过对丙二醛(malonaldehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,

SOD)、黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD)、NO指标的观察, 初步探讨脂质过氧化损伤对高脂血症大鼠SAP的作用及机制.

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂SD大鼠, 清洁级, 体质量200-220 g, 共50只, 购自福建医科大学动物实验中心. 牛磺胆酸钠购自Sigma公司. MDA、SOD、XOD和NO测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所. 胆酸钠、胆固醇购自北京双旋培养基厂.

1.2 方法

1.2.1 分组及造模: 实验大鼠随机分为4组: 正常组($n = 10$): 均衡饲料饲养2 wk, 开腹仅翻动胰腺后关腹; 高脂血症对照组(hyperlipemia controls, HL组, $n = 10$): 均衡饲料饲养+自制脂肪乳剂灌胃2 wk, 开腹翻动胰腺后关腹; 重症急性胰腺炎组(SAP组, $n = 15$): 均衡饲料饲养2 wk, 逆行胰胆管注射35 g/L牛磺胆酸钠溶液诱发SAP; 高脂血症SAP组(HAP组, $n = 15$): 均衡饲料饲养+自制脂肪乳剂灌胃2 wk, 逆行胰胆管注射35 g/L牛磺胆酸钠溶液诱发AP.

1.2.2 自制脂肪乳剂灌胃法建立大鼠高脂血症模型: 脂肪乳剂配方参照刘明法^[7]加以改进: 200 g/L猪油+100 g/L胆固醇+200 g/L吐温80+20 g/L胆酸钠+10 g/L丙基硫氧嘧啶+适量蒸馏水. HL组及HAP组每日予脂肪乳剂灌胃1次, 剂量为1 mL/100 g体质量, 共2 wk; 逆行胰胆管注射牛磺胆酸钠溶液建立大鼠SAP模型: 采用传统的Aho法^[8]建立模型, 术前禁食12 h, 不禁水, 20 g/L戊巴比妥钠腹腔内注射麻醉, 将35 g/L牛磺胆酸钠溶液以微量泵恒速注入胰胆管内, 以1 mL/kg体质量、0.2 mL/min的速度注射完毕, 保持压力8 min后除去血管夹, 逐层关腹.

1.2.3 标本处理与检测: 模型制作完成6 h后取材: 腹主动脉取血, 离心提取血清备测; 取胰腺组织制作病理切片, HE染色, 光镜下观察胰腺组织病理改变, 参照Grewal法^[9]定量评估; 取胰腺组织制作匀浆待测.

统计学处理 所有数据以mean \pm SD表示, 使用SPSS12.0统计软件, 行单因素方差分析(ANOVA)和组间两两比较, 以 $P < 0.05$ 为有显著性意义.

2 结果

2.1 大鼠一般情况 至模型制备完毕6 h后取材时, 50只大鼠全部存活, 其中正常组及HL组大多活动如常, SAP及HAP组大鼠精神萎靡、平卧休息.

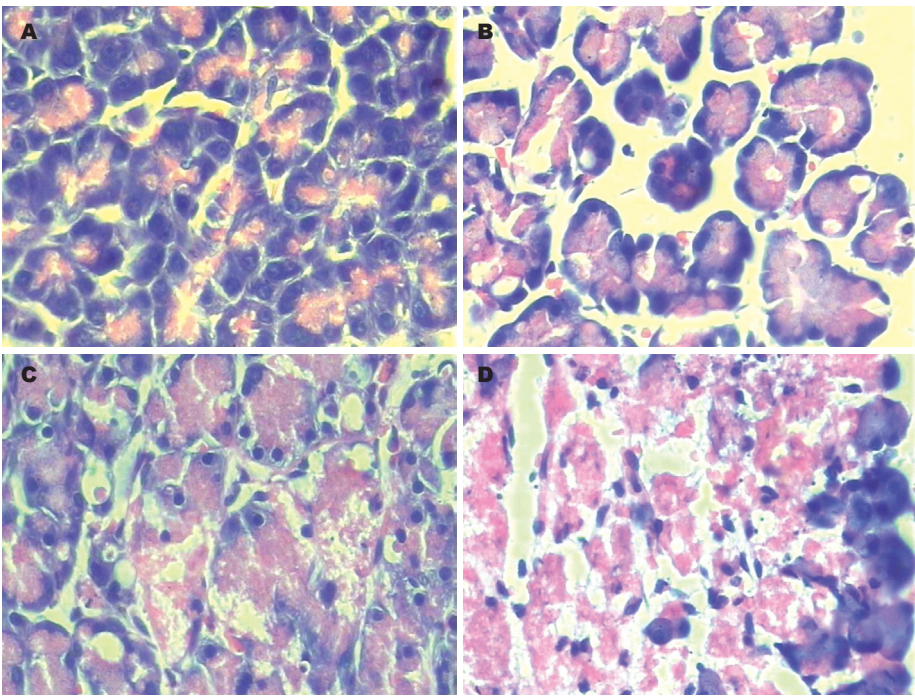


图 1 各组大鼠胰腺组织病理组织学表现(HE × 400). A: 正常组; B: HL组; C: SAP组; D: HAP组.

应用要点
通过脂肪乳剂灌胃法建立HL模型具有造模时间短、可定量控制、模型稳定等优点,牛磺胆酸钠逆行胰胆管注射诱发SAP模型是目前较为成熟且应用广泛的造模方法,此法诱发AP模型在病因、发病机制及组织病理改变等方面均与临床上的急性出血坏死性胰腺炎相似.

表 1 血清淀粉酶、甘油三酯及胆固醇水平

分组	n	淀粉酶(U/L)	甘油三酯(mmol/L)	胆固醇(mmol/L)
正常组	10	1078.00 ± 179.90	0.44 ± 0.13	1.82 ± 0.14
HL组	10	882.33 ± 88.90	1.37 ± 0.18 ^b	4.19 ± 1.32 ^b
SAP组	15	5480.75 ± 2087.51 ^b	0.67 ± 0.08 ^b	1.86 ± 0.21
HAP组	15	2877.67 ± 1669.90 ^c	0.86 ± 0.10 ^b	7.24 ± 3.69 ^b

^bP<0.01 vs 正常组; ^cP<0.05 vs SAP组.

表 2 胰腺组织病理评分

分组	水肿	坏死	炎症	出血
正常组	0.40 ± 0.52	0	0.20 ± 0.35	0
HL组	1.10 ± 1.10	0	2.10 ± 0.99 ^b	0
SAP组	3.27 ± 0.70 ^b	2.40 ± 1.06 ^b	3.07 ± 0.80 ^a	0.80 ± 0.41 ^b
HAP组	3.67 ± 0.49 ^b	3.40 ± 0.74 ^{bc}	3.60 ± 0.51 ^b	1.00 ± 0.00 ^b

^bP<0.01 vs 正常组; ^cP<0.05 vs SAP组.

2.2 血清淀粉酶、甘油三酯及胆固醇值 SAP组血清AMS值较正常组明显升高, HAP组血清AMS值较SAP组下降; 脂肪乳剂灌胃2 wk后, HL组血清甘油三酯、胆固醇值与正常组比较均明显升高(表1).

2.3 光镜下胰腺病理改变 正常组未见明显胰腺组织病理改变; HL组可见炎症细胞增多, 部分细胞内可见脂质空泡形成; SAP及HAP组均见水肿、炎症细胞浸润、出血、坏死等改变, 与正

常组比较具有统计学意义; HAP组的坏死评分显著高于SAP组(表2, 图1).

2.4 血清及胰腺组织MDA、SOD、XOD、NO水平 发生胰腺炎的大鼠血清及胰腺组织MDA、XOD水平均明显高于正常组和HL对照组; SAP组HAP组血清及胰腺组织MDA、XOD水平显著高于SAP组; HAP组血清及胰腺组织SOD、NO水平低于正常组和HL对照组, 也显著低于SAP组(表3-4).

同行评价
本研究动物实验设计合理, 实验过程目的明确, 结果可信, 对急性胰腺炎的发病转归有一定的参考价值.

表 3 各组血清MDA、SOD、XOD、NO水平

分组	n	血清			
		MDA($\mu\text{mol/L}$)	SOD(kU/L)	XOD(U/L)	NO($\mu\text{mol/L}$)
正常组	10	12.35 \pm 2.62	125.38 \pm 13.27	36.45 \pm 4.54	83.22 \pm 4.63
HL组	10	15.26 \pm 1.65 ^a	120.63 \pm 11.08	33.63 \pm 5.59	80.28 \pm 8.24
SAP组	15	23.14 \pm 3.42 ^b	97.16 \pm 13.77 ^b	45.78 \pm 8.98 ^b	52.97 \pm 6.01 ^b
HAP组	15	30.76 \pm 2.67 ^d	85.46 \pm 13.56 ^c	55.72 \pm 10.49 ^d	31.72 \pm 10.50 ^d

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 正常组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs SAP组.

表 4 各组胰腺组织MDA、SOD、XOD、NO水平

分组	n	胰腺组织			
		MDA(nmol/mgprot)	SOD(U/mgprot)	XOD(U/gprot)	NO($\mu\text{mol/gprot}$)
正常组	10	0.52 \pm 0.08	40.38 \pm 6.67	2.62 \pm 0.45	2.13 \pm 0.37
HL组	10	0.55 \pm 0.12	36.84 \pm 5.53	2.84 \pm 0.45	2.11 \pm 0.42
SAP组	15	2.87 \pm 0.45 ^b	27.88 \pm 4.43 ^b	4.33 \pm 0.79 ^b	1.48 \pm 0.40 ^b
HAP组	15	4.33 \pm 0.48 ^d	22.65 \pm 3.85 ^d	5.57 \pm 0.63 ^d	1.09 \pm 0.21 ^c

^b $P < 0.01$ vs 正常组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs SAP组.

3 讨论

高脂血症作为AP的高危因素已日渐受到人们的关注. 根据Frederickson分型, 高脂血症可分为5型, 临床上以TG升高为主的I型、IV型和V型高脂血症患者更倾向于发生AP^[10]. 通过脂肪乳剂灌胃法建立HL模型具有造模时间短、可定量控制、模型稳定等优点, 牛磺胆酸钠逆行胰胆管注射诱发SAP模型是目前较为成熟且应用广泛的造模方法^[11-12], 此法诱发AP模型在病因、发病机制及组织病理改变等方面均与临床上的急性出血坏死性胰腺炎相似. 本研究中HL组大鼠血清甘油三酯平均水平达到正常组的3.11倍, 血清胆固醇为2.30倍, 均有统计学意义. SAP组大鼠与正常组比较, 血清淀粉酶值显著升高, SAP组与HAP组大鼠胰腺组织病理证实均有严重的水肿、炎症细胞浸润、出血及坏死表现, 因此认为联合上述两法建立高脂血症相关的SAP大鼠模型是有效可行的.

脂质过氧化是一个发生在组织细胞膜性成分由自由基介导的过程, 在AP早期氧自由基就大量产生, 参与胰腺组织的病理损伤^[13]. 本实验显示SAP造模6 h后即SAP早期, 血清及胰腺组织MDA、XOD水平均明显高于正常组, SOD下降, 胰腺组织出现严重的出血及坏死改变, 表明SAP早期氧自由基大量产生, 存在胰腺组织脂质过氧化损伤, 而体内的抗氧化剂SOD明显降低,

因此脂质过氧化损伤可能是SAP早期的病理生理变化基础. 李雷 *et al*^[14]研究还发现在SAP早期, 胰腺、心、肺等组织MDA含量升高, SOD活性下降, 存在多个器官组织的脂质过氧化损害.

高脂血症不仅引起血粘度增高, 血流动力学异常, 亦能引起超氧阴离子自由基增多. 胰腺毛细血管中高浓度的胰脂酶使血清甘油三酯水解产生大量的游离脂肪酸(free fatty acid, FFA), 并可能通过以下机制导致胰腺组织损伤: 通过脂质过氧化作用损伤细胞膜; FFA增多, 诱发酸中毒, 激活胰蛋白酶原, 腺泡细胞自身消化及胰腺炎的病理损害加重; 引起胰腺毛细血管内皮细胞损伤, 导致微循环障碍^[15]. 高脂饮食喂养可使大鼠体内脂质过氧化反应增强, 抗氧化能力下降, 存在明显的脂质过氧化损伤^[16]. 国内倪鸿昌 *et al*^[17]通过建立大鼠高脂血症性脂肪肝模型, 发现脂肪乳剂灌胃2 wk时, 肝脏组织的MDA值明显升高、SOD降低, 到第3周时, 血清中MDA值亦升高、SOD水平则下降. 本实验通过脂肪乳剂灌胃2 wk建立大鼠HL模型, 发现HL组血清MDA水平较正常组显著升高, 提示体内自由基增多, 并存在脂质过氧化损伤作用, 但在胰腺组织还没有观察到这一现象. HAP组血清及组织中MDA、XOD水平高于SAP组, 而SOD值降低, 说明有高脂血症的SAP大鼠的脂质过氧化损害高于单纯SAP大鼠, 同时HAP组胰腺组织坏死分数

高于SAP组, 即病理损害重于SAP组, 推测脂质过氧化损伤可能在高脂血症加重SAP的机制中发挥作用。

由于NO在调节胰腺微循环、氧化作用、诱导细胞凋亡等方面的作用, 其在AP发病机制中的作用受到广泛关注。给予小剂量NO供体L-精氨酸(L-arg)可减轻胰腺组织病理损害, 而给予一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)抑制剂可加重胰实质病变^[18]。因此认为胰腺病理损害的减轻与NO可能呈剂量依赖性。目前对NO在AP发生过程中的作用仍然存在某些争议, 是抗氧化应激或启动脂质过氧化^[19-20], 尚需进一步实验证实。本研究提示SAP组大鼠血清及组织NO水平低于正常组, 这与多数文献的报道是一致的。NO还可中和氧自由基, SOD通过阻止超氧化物与NO反应的机制, 部分地延长了NO的生理性保护作用。但也有作者认为NO本身属于自由基, 大剂量的NO可与周围的超氧阴离子迅速反应, 从而启动脂质过氧化过程。因此, 体内NO等自由基的平衡及氧化-抗氧化机制紊乱可能在SAP发病中起重要作用^[21-22]。

4 参考文献

- 1 Chang MC, Su CH, Sun MS, Huang SC, Chiu CT, Chen MC, Lee KT, Lin CC, Lin JT. Etiology of acute pancreatitis--a multi-center study in Taiwan. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 1655-1657
- 2 姜翀弋, 韩天权, 姜志宏, 张圣道. 血清甘油三酯升高对大鼠急性胰腺炎的影响. *中华实验外科杂志* 2004; 21: 907-908
- 3 Ponzio O, Schreier L, Resnik R, Negri G, Scacchi P, Cresta MA, Wikinski R. Endogenous hypertriglyceridemia intensifies the course of cerulein-induced pancreatitis in rat: relation with changes in the VLDL composition. *Ann Nutr Metab* 2006; 50: 37-44
- 4 Rau B, Poch B, Gansauge F, Bauer A, Nüssler AK, Nevalainen T, Schoenberg MH, Beger HG. Pathophysiologic role of oxygen free radicals in acute pancreatitis: initiating event or mediator of tissue damage? *Ann Surg* 2000; 231: 352-360
- 5 Tsai K, Wang SS, Chen TS, Kong CW, Chang FY, Lee SD, Lu FJ. Oxidative stress: an important phenomenon with pathogenetic significance in the progression of acute pancreatitis. *Gut* 1998; 42: 850-855
- 6 耿直, 胡庆军, 张正安. 急性胰腺炎患者ET、NO、CGRP及MDA测定及意义. *山东医药* 2004; 44: 33-34
- 7 刘明, 董超仁, 苏静怡. 一种简便实用的大鼠高脂血症模型. *中国药理学通报* 1989; 5: 119-120
- 8 Aho HJ, Koskensalo SM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1980; 15: 411-416
- 9 Grewal HP, Mohey el Din A, Gaber L, Kotb M, Gaber AO. Amelioration of the physiologic and biochemical changes of acute pancreatitis using an anti-TNF-alpha polyclonal antibody. *Am J Surg* 1994; 167: 214-218; discussion 218-219
- 10 吴建新, 陈源文, 罗声政, 胡颖, 董国芳, 李定国, 陆汉明. 急性胰腺炎合并高甘油三酯血症的发病类型和预后. *中国实用内科杂志* 2004; 24: 667-669
- 11 Zhang XP, Li ZF, Liu XG, Wu YT, Wang JX, Wang KM, Zhou YF. Effects of emodin and baicalein on rats with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2095-2100
- 12 Hernández-Barbáchano E, San Román JL, López MA, Coveñas R, López-Novoa JM, Calvo JJ. Beneficial effects of vasodilators in preventing severe acute pancreatitis shock. *Pancreas* 2006; 32: 335-342
- 13 Uruñuela A, Sevillano S, de la Mano AM, Manso MA, Orfao A, de Dios I. Time-course of oxygen free radical production in acinar cells during acute pancreatitis induced by pancreatic duct obstruction. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1588: 159-164
- 14 李雷, 王桂敏, 蒋俊明, 夏庆, 黄宗文, 陈光远. 生脉注射液对重症急性胰腺炎早期多器官组织脂质过氧化的影响. *中国中医基础医学杂志* 2005; 11: 122-124
- 15 Nagai H, Henrich H, Wunsch PH, Fischbach W, Mössner J. Role of pancreatic enzymes and their substrates in autodigestion of the pancreas. In vitro studies with isolated rat pancreatic acini. *Gastroenterology* 1989; 96: 838-847
- 16 李全民, 张素华, 任伟, 吴静, 倪银星. PPAR α 激动剂对高脂饮食致胰岛素抵抗大鼠脂质过氧化的影响. *实用医学杂志* 2006; 22: 16-17
- 17 倪鸿昌, 李俊, 金涌, 臧红梅, 彭磊. 大鼠实验性高脂血症和高脂血症性脂肪肝模型研究. *中国药理学通报* 2004; 20: 703-706
- 18 Liu X, Nakano I, Yamaguchi H, Ito T, Goto M, Koyanagi S, Kinjoh M, Nawata H. Protective effect of nitric oxide on development of acute pancreatitis in rats. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 2162-2169
- 19 张淑文, 张在兴, 李非, 孙家邦. 内源性一氧化氮在急性胰腺炎大鼠并发肺损伤中的作用及其与氧化应激的关系. *首都医科大学学报* 2003; 24: 64-66
- 20 Al-Mufti RA, Williamson RC, Mathie RT. Increased nitric oxide activity in a rat model of acute pancreatitis. *Gut* 1998; 43: 564-570
- 21 张喜平, 王英. 中药治疗急性胰腺炎的主要机制与作用的实验研究进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 412-416
- 22 陈卫昌, 徐晓, 温晓持, 严辉. 急性胰腺炎患者血清氧自由基、一氧化氮测定及临床意义. *苏州大学学报(医学版)* 2002; 22: 428-429

编辑 李军亮 电编 何基才

急性电刺激疑核对TNBS诱导的IBD大鼠IL-6 mRNA表达的影响

袁川评, 王 玮, 母连志, 杨占清, 王贤平, 商秀玲, 姜艳福, 张 峰, 张雪莉, 刘 冬, 柳巨雄

背景资料
IBD是一种在我国及欧美等诸多国家极为普遍得慢性胃肠道疾病。IBD的病因和发病机制尚未明确, 目前认为免疫因素, 特别是Th1/Th2免疫应答失衡是引起IBD发病的主要原因之一。

袁川评, 王玮, 母连志, 杨占清, 王贤平, 商秀玲, 姜艳福, 张峰, 张雪莉, 刘冬, 柳巨雄, 吉林大学畜牧兽医学院 吉林省长春市 130062
袁川评, 2008级在读硕士, 主要从事神经-内分泌-免疫网络的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30671535

作者贡献分布: 此课题由柳巨雄设计; 动物模型构建由张峰、袁川评及母连志共同完成; 疑核刺激及定位鉴定由袁川评、刘冬、母连志及王玮完成; 动物取材和HE染色由杨占清、王贤平及商秀玲共同完成; 实时荧光定量由杨占清、姜艳福及张雪莉完成; 数据处理和论文撰写由袁川评与王玮完成。

通讯作者: 柳巨雄, 教授, 130062, 吉林省长春市, 吉林大学畜牧兽医学院基础兽医学系。juxiongliu@sina.com.cn
电话: 0431-87836163 传真: 0431-87836163

收稿日期: 2009-06-22 修回日期: 2009-08-20

接受日期: 2009-08-24 在线出版日期: 2009-09-08

Acute electrical stimulation of the nucleus ambiguous upregulates the expression of interleukin-6 mRNA in rats with trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis

Chuan-Ping Yuan, Wei Wang, Lian-Zhi Mu, Zhan-Qing Yang, Xian-Ping Wang, Xiu-Ling Shang, Yan-Fu Jiang, Feng Zhang, Xue-Li Zhang, Dong Liu, Ju-Xiong Liu

Chuan-Ping Yuan, Wei Wang, Lian-Zhi Mu, Zhan-Qing Yang, Xian-Ping Wang, Xiu-Ling Shang, Yan-Fu Jiang, Feng Zhang, Xue-Li Zhang, Dong Liu, Ju-Xiong Liu, Department of Basic Veterinary Medicine, College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, Jilin Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30671535

Correspondence to: Professor Ju-Xiong Liu, Department of Basic Veterinary Medicine, College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, Jilin Province, China. juxiongliu@sina.com

Received: 2009-06-22 Revised: 2009-08-20

Accepted: 2009-08-24 Published online: 2009-09-08

Abstract

AIM: To observe the regulatory effects of the nucleus ambiguous (NA) on interleukin-6 expression in inflammatory bowel disease (IBD) and investigate the role of NA in the development and progression of IBD.

METHODS: Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)

was used to induce colitis in rats. After stereotactic localization of the NA, electrical stimulation was applied. Real-time polymerase chain reaction was utilized to detect the expression of IL-6 mRNA in the colon, thymus, spleen and peripheral blood lymphocytes in rats with TNBS-induced colitis following acute electrical stimulation.

RESULTS: After acute electrical stimulation, the expression levels of IL-6 mRNA significantly increased in the colon, thymus, spleen and peripheral blood lymphocytes in rats with TNBS-induced colitis ($3.26E-02 \pm 5.83E-03$ vs $5.12E-03 \pm 6.86E-04$, $5.52E-02 \pm 9.56E-03$ vs $2.04E-02 \pm 3.58E-03$, $3.42E-02 \pm 7.19E-03$ vs $2.91E-03 \pm 3.41E-04$ and $8.12E-03 \pm 4.24E-04$ vs $3.74E-03 \pm 5.73E-04$, respectively; all $P < 0.01$), whereas those in normal control rats and sham-stimulated rats showed no obvious changes (all $P > 0.05$).

CONCLUSION: The NA can positively regulate the expression of cytokine IL-6 in IBD rats and may play a regulatory role in the development and progression of IBD.

Key Words: Electrical stimulation; Nucleus ambiguous; Inflammatory bowel disease; Interleukin-6

Yuan CP, Wang W, Mu LZ, Yang ZQ, Wang XP, Shang XL, Jiang YF, Zhang F, Zhang XL, Liu D, Liu JX. Acute electrical stimulation of the nucleus ambiguous upregulates the expression of interleukin-6 mRNA in rats with trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(25): 2566-2570

摘要

目的: 探讨疑核对炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)相关细胞因子IL-6的调控作用, 以及在IBD发生发展过程中发挥的作用。

方法: 三硝基苯磺酸(TNBS)诱导IBD大鼠动物模型, 采用脑立体定位技术和电生理方法, 应用Real-time PCR方法来检测急性电刺激疑核前后IBD大鼠结肠、胸腺、脾脏、外周血

同行评议者
杜群, 副研究员, 广州中医药大学脾胃研究所药理学; 王小众, 教授, 福建医科大学附属协和医院消化内科

淋巴细胞中IL-6 mRNA表达水平的变化.

结果: 经急性电刺激疑核后, IBD模型大鼠结肠、胸腺、脾脏及外周血淋巴细胞中IL-6的mRNA转录水平均显著升高($3.26\text{E}-02 \pm 5.83\text{E}-03$ vs $5.12\text{E}-03 \pm 6.86\text{E}-04$, $5.52\text{E}-02 \pm 9.56\text{E}-03$ vs $2.04\text{E}-02 \pm 3.58\text{E}-03$, $3.42\text{E}-02 \pm 7.19\text{E}-03$ vs $2.91\text{E}-03 \pm 3.41\text{E}-04$, $8.12\text{E}-03 \pm 4.24\text{E}-04$ vs $3.74\text{E}-03 \pm 5.73\text{E}-04$, 均 $P < 0.01$), 而假刺激组和对照组没有明显变化($P > 0.05$).

结论: 疑核对IBD大鼠相关细胞因子IL-6具有一定的调控作用, 且以正调控作用为主, 并且在IBD发生发展过程中可能发挥着重要的作用.

关键词: 电刺激; 疑核; 炎症性肠病; 白介素6

袁川评, 王玮, 母连志, 杨占清, 王贤平, 商秀玲, 姜艳福, 张峰, 张雪莉, 刘冬, 柳巨雄. 急性电刺激疑核对TNBS诱导的IBD大鼠IL-6 mRNA表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(25): 2566-2570
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2566.asp>

0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一种累及胃肠道的慢性炎症性疾病, 目前其病因和发病机制尚不明确, 多数研究^[1]认为细胞因子, 尤其是致炎因子与抗炎因子失衡在IBD发病过程中起着极其重要的作用. IL-6被视为细胞因子网络的核心成员之一, 是由多种细胞产生的一种具有多种生物学活性的刺激因子, 其在多种自身免疫及肿瘤疾病中均有异常, 并与这些疾病的病理过程及病情严重程度有关. 为了探讨细胞因子IL-6、IBD、疑核三者之间的联系, 我们利用TNBS诱导IBD大鼠动物模型, 采用脑立体定位技术和电生理方法, 并应用Real-time PCR方法来检测急性电刺激疑核前后IBD大鼠结肠、胸腺、脾脏、外周血淋巴细胞中IL-6 mRNA表达水平的变化, 为进一步探讨IBD的发生发展及其与神经-内分泌-免疫网络的关系提供了实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 未成年♀Wistar大鼠60只, 体质量 150 ± 10 g, 清洁级(由吉林大学基础医学部实验动物中心提供), 随机分3组, 空白对照组10只, 模型组50只. 放置于 $22-24^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $<60\%$ 、噪声 <50 db的环境中, 分笼饲养, 正常饮水摄食; 5% TNBS购自

Sigma公司.

1.2 方法

1.2.1 造模及分组: 将5% TNBS与无水乙醇以体积比2:1配成混合液, 按每只大鼠0.1 mL/100 g对模型组进行直肠灌注^[2], 对照组给予等体积的生理盐水. 灌注后, 正常进食饮水. 灌注7 d后, 将模型组随机平均分为3组, 分别为对照组、假刺激组和刺激组. 分别将正常组、模型对照组、假刺激组和刺激组大鼠进行脑立体定位. 参考Gerge *et al*^[3]定位大鼠疑核. 根据图谱, 疑核密集区的坐标为Bregma(-12.00)-(-12.84) mm, 左右1.98-2.38 mm, 深度9.22-9.68 mm. 按照坐标, 采用大脑立体定位, 将刺激电极(直径0.2 mm)深入大脑内部疑核位置. 用刺激器进行电刺激(刺激参数: 波宽5 ms, 频率100 Hz, 电流强度50-100 μA , 持续时间60 s). 待1 h后, 改变电流方向, 并将电流强度调至200 μA , 通直流电10 s烧毁刺激的疑核位置^[4], 作为标记. 然后通过心脏采血进行淋巴细胞的分离, 快速取大鼠结肠、胸腺、脾脏组织, 冷冻于液氮中, 用于后期的Real-time PCR的实验; 并打开头颅, 暴露并取出大脑, 快速冷冻于预冷的正己烷中. 用冰冻切片机做30 μm 冠状切片, 进行常规HE染色.

1.2.2 IL-6和GAPDH的引物和探针引物的设计: 根据GenBank中大鼠IL-6、GAPDH的基因序列设计引物见表1. 引物均由上海生物工程技术有限公司合成.

1.2.3 大鼠IL-6和GAPDH的克隆: 按照TRIzol使用说明书提取大鼠结肠、胸腺、脾脏及淋巴细胞总RNA. 以各基因特异性引物进行反转录和PCR扩增, 其中反转录体系为: 总RNA 2 μL , Oligo-dT Primer(10 $\mu\text{mol/L}$)1.0 μL , DEPC H_2O 9.5 μL , $5\times$ Buffer 4.0 μL , dNTP Mixture(2.5 mmol/L) 2.0 μL , Reverse Transcriptase(5 U/ μL) 1.0 μL , Rnase Inhibitor(40 U/ μL) 0.5 μL . 混匀后置于 42°C 水浴90 min, 90°C 水浴5 min, 冰浴冷却备用. PCR扩增反应体系为: H_2O 17.5 μL , $10\times$ PCR Buffer 2.5 μL , dNTP Mixture(2.5 mmol/L) 2 μL , 上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各1 μL , 反转录产物1 μL , Ex Taq(5 U/ μL)0.1 μL . 反应条件为: 95°C 预变性3 min; 95°C 变性30 s, 62°C 退火45 s, 72°C 延伸30 s, 35个循环; 72°C 延伸5 min. 并将获得的基因片段连接至pMD18-T, 进行PCR鉴定及测序.

1.2.4 IL-6 mRNA水平的定量检测: 对鉴定正确的GAPDH和IL-6质粒重新转化扩增, 提取质

研究前沿
延髓疑核是一特殊的内脏神经核团, 他与中枢神经系统和外周器官建立着广泛的神经联系, 并且在调节T细胞介导的免疫中发挥重要作用.

相关报道
李巨浪 *et al*研究发现急性电刺激家兔疑核, PHA诱导的外周血淋巴细胞转化活动明显增强, 并且在刺激后其外周学T淋巴细胞百分率明显提高. 梅英武 *et al*研究发现急性电刺激大鼠疑核, 可使脾脏淋巴细胞增殖, 并使其分泌IL-2、IL-6的能力明显增强.

创新盘点
本文从神经-内分泌-免疫调节网络和免疫稳态调节的角度出发,探讨了疑核与IBD之间的关系。

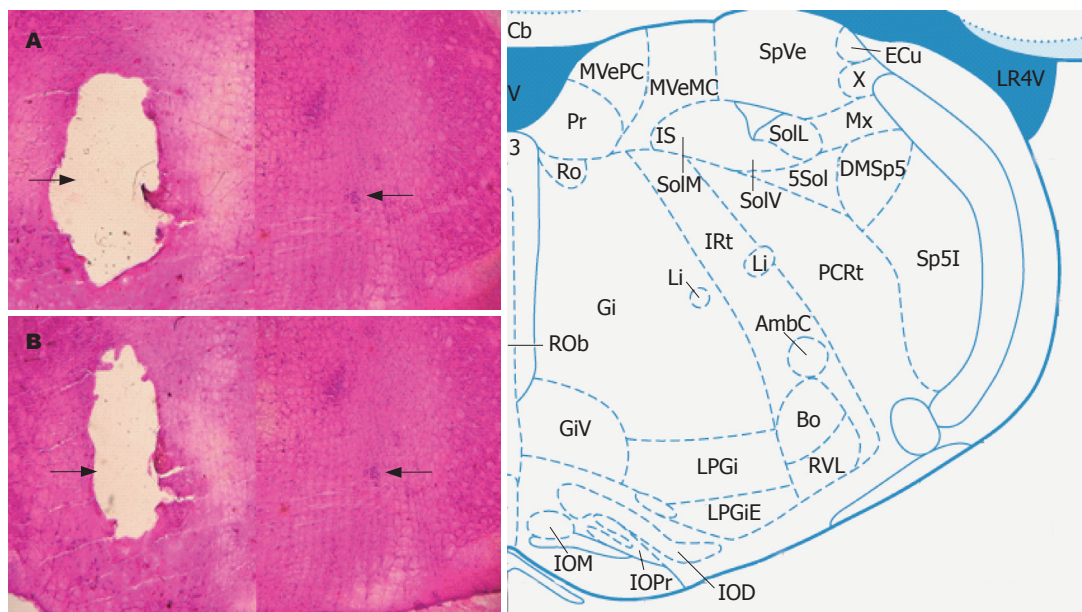


图1 疑核定位的组织学鉴定($\times 100$). 箭头所指为电刺激部位,即疑核所在的位置。

表1 Real-time PCR的引物和探针

基因	引物和探针	序列(5'-3')	片段大小(bp)
GAPDH	F	CTGACCTGCCGTCTGGAGAA	95
	R	TAGCCCAGGATGCCCTTGAG	
	P	CCTCGGACGCCTGCTTCACACCT	
IL-6	F	GCCCTTCAGGAACAGCTATGA	80
	R	TGTCAACAACATCAGTCCCAAGA	
	P	CTCTCCGCAAGAGACTTCCAGCCAGTT	

粒,进行梯度稀释,制作Real-time PCR标准曲线。反应体系为:反转录产物1 μ L, Taqman Real-time PCR Master Mix 12.5 μ L,上下游引物及探针各1 μ L, H₂O 8.5 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性3 min;95 $^{\circ}$ C变性30 s,62 $^{\circ}$ C退火45 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸5 min。将备好的结肠、胸腺、脾脏及淋巴细胞的样品分别进行Real-time PCR检测。用建立的荧光定量PCR测定,并绘制出标准曲线给出标准曲线的表达式。他们分别为:GAPDH: $y = -3.174230x + 32.527992$, $R^2 = 0.999347$; IL-6: $y = -3.53097x + 32.527992$, $R^2 = 0.999279$ 。我们的实验结果采用相对定量即IL-6初始浓度/GAPDH初始浓度表示,根据样品荧光定量扩增曲线和SPSS13.0软件分析,得出急性电刺激疑核前后IL-6, GAPDH mRNA在IBD大鼠不同组织及外周血淋巴细胞中的表达。

统计学处理 各组数据结果以mean \pm SD表示。统计用SPSS13.0软件包,实验结果进行单因

素方差分析和LSD检验。

2 结果

2.1 疑核定位的组织学鉴定 将疑核定位后的冰冻切片进行HE染色,图片左侧的空白位置就是疑核烧毁部位,而右侧箭头所指即为疑核部位(图1)。

2.2 IL-6、GAPDH基因重组质粒构建 成功提取大鼠结肠、胸腺、脾脏及淋巴细胞总RNA,电泳后,在紫外灯下可见28S、18S、6S 3条清晰的条带(图2A)。以结肠、胸腺、脾脏及外周血淋巴细胞总RNA为模板,以GAPDH、IL-6基因特异性引物进行反转录和PCR扩增,分别获得了95、80 bp的基因片段,与预期目的片段大小一致(图2B-C)。分别将PCR产物连接转化,提取质粒,并进行质粒的PCR鉴定(图3)。

2.3 样品荧光定量PCR 急性电刺激疑核前后IL-6, GAPDH mRNA在IBD大鼠不同组织及外周血淋巴细胞中的表达见表2。

3 讨论

IBD是一种病因未明的慢性非特异性的肠道炎症性疾病,包含两个独立的疾病,溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD)。他可能与多种因素有关,目前仍假设由遗传易感性、胃肠道益生菌与致病菌失衡、肠上皮细胞完整性受损以及宿主免疫功能失调等综合因素的作用而致病^[1]。而神经内分泌免疫调节网络已逐渐为大家所认识,中枢神经

应用要点
本文研究疑核对IBD相关细胞因子IL-6的调控作用,以期探讨IBD的发生发展及其与神经-内分泌-免疫网络的关系奠定基础,为进一步丰富和完善神经-内分泌-免疫网络学说提供实验依据,为IBD的防治提供新的思路。

表 2 急性电刺激疑核前后IL-6 mRNA在IBD大鼠不同组织中的表达 (mean \pm SD)

组织	对照组	假刺激组	刺激组
结肠			
正常组	1.41E-04 \pm 3.49E-05	1.57E-04 \pm 1.00E-05	2.35E-04 \pm 3.94E-05
模型组	5.12E-03 \pm 6.86E-04	3.98E-03 \pm 5.72E-04	3.26E-02 \pm 5.83E-03 ^b
胸腺			
正常组	4.69E-03 \pm 8.27E-04	5.37E-03 \pm 7.74E-04	8.95E-03 \pm 7.41E-04 ^a
模型组	2.04E-02 \pm 3.58E-03	1.41E-02 \pm 4.12E-03	5.52E-02 \pm 9.56E-03 ^b
脾脏			
正常组	7.71E-04 \pm 8.06E-05	7.10E-04 \pm 7.27E-05	1.60E-03 \pm 2.56E-04
模型组	2.91E-03 \pm 3.41E-04	3.44E-03 \pm 4.81E-04	3.42E-02 \pm 7.19E-03 ^b
外周血淋巴细胞			
正常组	8.25E-04 \pm 1.62E-04	7.65E-04 \pm 3.80E-05	1.73E-03 \pm 1.25E-04 ^b
模型组	3.74E-03 \pm 5.73E-04	3.62E-03 \pm 2.95E-04	8.12E-03 \pm 4.24E-04 ^b

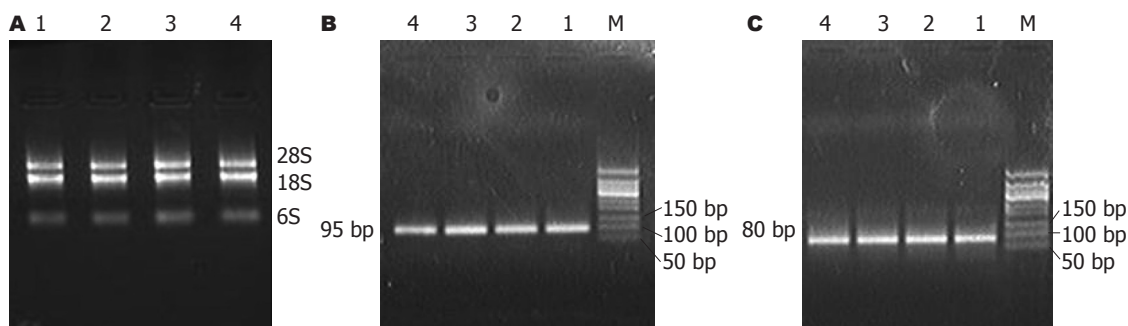
^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 假刺激组、对照组。

图 2 总RNA提取和IL-6、GAPDH扩增. A: 大鼠组织总RNA; B: GAPDH PCR; C: IL-6; M: 50 bp DNA Marker; 1: 结肠; 2: 胸腺; 3: 脾脏; 4: 外周血淋巴细胞。

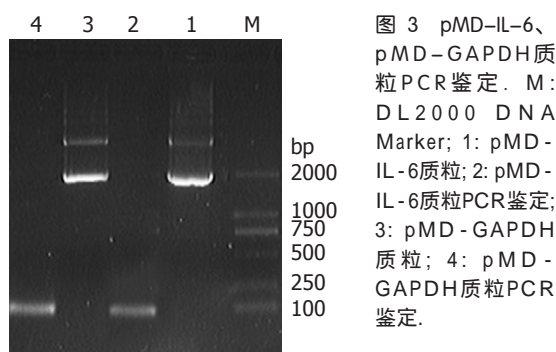


图 3 pMD-IL-6、pMD-GAPDH质粒PCR鉴定. M: DL2000 DNA Marker; 1: pMD-IL-6质粒; 2: pMD-IL-6质粒PCR鉴定; 3: pMD-GAPDH质粒; 4: pMD-GAPDH质粒PCR鉴定。

系统可通过下丘脑-垂体-肾上腺轴和交感神经系统广泛地影响机体免疫和内分泌系统^[5]. 延髓疑核是一个特殊的内脏神经核团, 属于迷走神经核, 含有多神经元, 形态学研究表明: 支配胃的迷走神经的节前神经元大部分位于迷走神经运动背核(DMV), 一小部分位于疑核(NA). 大量资料表明: 来自疑核的神经元纤维主要支配着胃肠道的平滑肌^[6-7]. 许多研究表明, IBD的发生与多种细胞因子的作用关系密切. 细胞因子

名词解释

疑核: 属迷走神经核, 是一个特殊的内脏运动核, 位于延髓腹外侧的网状结构中, 内含肾上腺素能神经元、乙酰胆碱能神经元、肽能神经元等多种神经元. 他与中枢神经系统和外周器官建立着广泛的神经联系。

(cytokine, CK)是多种细胞所分泌的, 能调节细胞生化分化、调节免疫功能、参与炎症发生和创伤愈合等小分子多肽的统称^[8-9]. 其中IL-6是某些自身免疫性疾病中的关键性炎症因子, 与许多疾病的发生与转归密切相关^[10-12]. 因而, IL-6在慢性肠道炎性反应的发病机制中起着至关重要的作用^[13-14]. 本研究发现, 在未刺激情况下, 模型组结肠、胸腺、脾脏及外周血淋巴细胞中IL-6的mRNA转录水平平均高于正常组. 因为IL-6在急性炎症反应中的作用主要表现为多种细胞的促炎作用和诱导肝组织产生急性反应蛋白, 故活动期IBD大鼠在结肠等组织中IL-6水平比正常大鼠显著升高^[15]. 然而急性电刺激疑核后, 模型组结肠、胸腺、脾脏及外周血淋巴细胞中IL-6的mRNA转录水平平均显著高于假刺激组和对照组, 证明在这些组织中IL-6的表达量经疑核电刺激后有明显升高, 其中在胸腺中最为明显. 因为T细胞由一群功能不同的异质性淋巴细胞组成, 并在中枢淋巴器官胸腺内分化成熟为Th1、Th2

同行评价

本文观察急性电刺激疑核对TNBS诱导的IBD大鼠IL-6 mRNA表达水平的影响, 具有较好的科学意义, 文章方法较先进, 数据可信, 讨论得当。

和Th3三种亚群后再运送到淋巴结和脾脏等免疫器官^[16]。因而在刺激疑核后, 模型组胸腺中分泌的IL-6的表达水平理应明显高于其他组织器官。另外, 在脾脏和结肠组织中, IL-6的表达水平和变化趋势几乎一致。脾脏是机体最大的免疫器官, 含有大量的淋巴细胞和巨噬细胞, 是细胞免疫和体液免疫的中心。经急性电刺激模型组疑核, Th2细胞通过血液循环从胸腺运送至脾脏和结肠组织中产生大量的促炎因子IL-6, 从而介导体液免疫应答^[14]。外周血液中的淋巴细胞由于不断的运送至结肠和脾脏等免疫器官, 因此在外周血液中由Th2细胞产生的IL-6的升高幅度低于结肠组织和其他免疫器官。但从整体变化趋势来看, 急性电刺激疑核后, 模型组结肠等组织中IL-6的mRNA转录水平均显著高于假刺激组和对照组, 说明在IBD中, 疑核对IL-6呈现正调控作用。使其表达量显著升高, 但具体的调控机制还有待于我们进一步研究。

总之, 该实验为进一步探讨IBD的发生发展与神经-内分泌-免疫网络的关系提供了实验依据, 并很可能为IBD的防治提供新的思路。

4 参考文献

- 1 邓长生, 夏冰. 炎症性肠病. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 58-73
- 2 杨占清. 粘蛋白1、粘蛋白2 mRNA在炎症性肠病大鼠结肠粘膜细胞表达规律的研究. 吉林大学, 2007: 25-32
- 3 Gerge P, Charles W. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. San Diego: ELISEVIER Academic Press, 2007: 165-190
- 4 梅英武, 杨占清, 王伟, 尹秀玲, 柳巨雄. 电刺激大鼠疑核对胸腺中胸腺素和TGF- β mRNA水平的影响. 吉林农业大学学报 2008; 30: 184-187
- 5 Wrona D. Neural-immune interactions: an integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. *J Neuroimmunol* 2006; 172: 38-58
- 6 Chiocchetti R, Clavenzani P, Barazzoni AM, Grandis A, Bombardi C, Costerbosa GL, Petrosino G, Avoni GB, Bortolami R. Viscerotopic representation of the subdiaphragmatic tracts of the digestive apparatus within the vagus complex in the sheep. *Brain Res* 2003; 961: 32-44
- 7 张学英, 艾洪滨. 疑核的研究进展. 中国神经科学杂志 2004; 20: 180-186
- 8 Goral V, Celenk T, Kaplan A, Sit D. Plasma cytokine levels in ulcerative colitis. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 1130-1133
- 9 Petrović-Rackov L. Cytokines in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Med Pregl* 2005; 58: 245-251
- 10 董吉祥, 谢莹. Graves病患者外周血IL-6、TNF- α 水平表达的变化及意义. 中国免疫学杂志 2006; 22: 378-379
- 11 Pecoits-Filho R, Lindholm B, Axelsson J, Stenvinkel P. Update on interleukin-6 and its role in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 1042-1045
- 12 Hong DS, Angelo LS, Kurzrock R. Interleukin-6 and its receptor in cancer: implications for Translational Therapeutics. *Cancer* 2007; 110: 1911-1928
- 13 Reddy KP, Markowitz JE, Ruchelli ED, Baldassano RN, Brown KA. Lamina propria and circulating interleukin-8 in newly and previously diagnosed pediatric inflammatory bowel disease patients. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 365-372
- 14 Newton C, Klein T, Friedman H. The role of macrophages in THC-induced alteration of the cytokine network. *Adv Exp Med Biol* 1998; 437: 207-214
- 15 Feister HA, Auerbach BJ, Cole LA, Krause BR, Karathanasis SK. Identification of an IL-6 response element in the human LCAT promoter. *J Lipid Res* 2002; 43: 960-970
- 16 Cardillo MR, Ippoliti F. IL-6, IL-10 and HSP-90 expression in tissue microarrays from human prostate cancer assessed by computer-assisted image analysis. *Anticancer Res* 2006; 26: 3409-3416

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)。(科学编辑: 李军亮 2009-09-08)

JAK/STAT抑制剂在TNBS诱发大鼠结肠炎中的作用

杨涓, 缪应雷

杨涓, 缪应雷, 昆明医学院第一附属医院消化内科 云南省昆明市 650032

杨涓, 2006级昆明医学院在读硕士, 主要从事消化系统疾病的研究。

云南省自然科学基金资助项目, No. 2005C0069M

作者贡献分布: 缪应雷对此文所作贡献大; 此课题由缪应雷设计; 研究过程由缪应雷与杨涓操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由缪应雷提供; 数据分析由杨涓完成; 本论文写作由缪应雷与杨涓完成。

通讯作者: 缪应雷, 副教授, 650032, 云南省昆明市, 昆明医学院第一附属医院消化内科。yingleim@yahoo.com.cn

电话: 0871-6468574

收稿日期: 2009-06-19 修回日期: 2009-08-22

接受日期: 2009-08-24 在线出版日期: 2009-09-08

Role of the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway in the pathogenesis of trinitrobenzenesulfonic acid-induced experimental colitis in rats

Juan Yang, Ying-Lei Miao

Juan Yang, Ying-Lei Miao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Yunnan Province of China, No. 2005C0069M

Correspondence to: Dr. Ying-Lei Miao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China. yingleim@yahoo.com.cn

Received: 2009-06-19 Revised: 2009-08-22

Accepted: 2009-08-24 Published online: 2009-09-08

Abstract

AIM: To investigate the role of the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling pathway in the pathogenesis of trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)-induced experimental colitis in rats.

METHODS: TNBS was used to induce experimental colitis in rats. The rats were then intraperitoneally injected with rapamycin (RPM) and AG490 (a specific inhibitor of Janus kinase). Colonic inflammation was evaluated by histology. Western blot was used to detect the expression of matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-2,

MMP-3 and TIMP-1 proteins in the colon. Gelatin zymography was used to examine the activity of MMP-2 in colitis.

RESULTS: The pathological inflammation scores in the AG490 treatment group and RPM treatment group were significantly lower than that in the control group (5.50 ± 2.16 and 5.17 ± 1.80 vs 8.53 ± 2.18 , respectively; $P = 0.012$ and $P < 0.05$). The expression levels of MMP-1 and MMP-2 proteins in the AG490 treatment group and RPM treatment group were significantly lower than those in the control group (all $P < 0.05$). In contrast, there were no significant changes in the expression levels of MMP-3 and TIMP-1 proteins between the control group and the two treatment groups (both $P > 0.05$). Compared with the control group, the activity of MMP-2 was obviously reduced in the two treatment groups (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: Inhibition of the JAK/STAT signaling pathway by AG490 or RPM reduces disease activity in TNBS-induced experimental colitis through downregulation of MMP-1 and MMP-2 mRNA expression in colonic tissue.

Key Words: AG490; Rapamycin; Signal transducer and activator of transcription pathway; Experimental colitis; Matrix metalloproteinase

Yang J, Miao YL. Role of the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway in the pathogenesis of trinitrobenzenesulfonic acid-induced experimental colitis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(25): 2571-2576

摘要

目的: 探讨抑制Janus激酶/信号转导和转录激活子(JAK/STAT)通路在大鼠结肠炎发病机制中的作用。

方法: 建实验性大鼠结肠炎模型后, 给予JAK特异性抑制剂AG490和STAT抑制剂雷帕霉素(RPM), 腹腔注射治疗1 wk后处死大鼠, 观察结肠炎症改变并进行评分, 采用蛋白印迹法(Western blot)检测MMP-1、MMP-2、

背景资料

既往认为IBD的病因及发病机制与感染因素、遗传因素、免疫反应异常等有关, 近年来研究较热的细胞因子网络备受关注, 不少学者把研究的方向转向了信号转导与炎症介质之间的关系, 炎症介质及细胞因子可导致机体多条信号通路活化, 从而通过他直接或间接地介导炎症介质的表达, 导致肠黏膜受损产生; 而JAK/STAT通路环节少而简洁, 他把细胞膜上感受的信号直接传递到核内启动基因转录, 因而引起人们的普遍兴趣。

同行评议者

秦成勇, 教授, 山东省立医院消化内科; 许玲, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科

研发前沿

近年来有多位学者对MMPs在IBD中的表达情况及其可能作用进行了研究,以探索MMPs在IBD发病及其病程进展中的作用,结果令人鼓舞。

MMP-3、TIMP-1蛋白表达;用明胶酶谱法检测结肠组织中MMP-2的活性。

结果:与对照组相比,AG490治疗组肠道损伤积分降低(5.50 ± 2.16 分 vs 8.53 ± 2.18 分, $P = 0.012$);RPM治疗组肠道损伤积分(5.17 ± 1.80 分)较对照组低($P < 0.05$)。AG490组和RPM组MMP-1、MMP-2的蛋白质表达量均明显低于对照组(均 $P < 0.05$),而两实验组分别与对照组比较其MMP-3、TIMP-1蛋白质表达均无明显差异(均 $P > 0.05$)。与对照组相比,两实验组MMP-2的活性均显著下降($P < 0.05$)。

结论:AG490和RPM通过阻断JAK/STAT信号通路的活化能缓解大鼠结肠炎,这一作用可能是通过抑制MMP-1、MMP-2的表达来实现的。

关键词:AG490;雷帕霉素;JAK/STAT信号转导通路;实验性结肠炎;基质金属蛋白酶

杨涓, 缪应雷. JAK/STAT抑制剂在TNBS诱发大鼠结肠炎中的作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(25): 2571-2576
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2571.asp>

0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD),属于原因不明的肠道非特异性炎症疾病。由于其病因和发病机制不明,给治疗带来很大的困难。既往认为IBD的病因及发病机制与感染因素、遗传因素、免疫反应异常等有关,近年来研究较热的细胞因子网络备受关注,不少学者把研究的方向转向了信号转导与炎症介质之间的关系上,炎症介质及细胞因子可导致机体多条信号通路活化,从而通过他直接或间接地介导炎症介质的表达,导致肠黏膜受损产生;而JAK/STAT通路环节少而简洁,他把细胞膜上感受的信号直接传递到核内-启动基因转录,因而引起人们的普遍兴趣^[1]。我们利用TNBS诱发大鼠结肠炎模型,探索肠黏膜基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的高表达是否经过JAK/STAT途径传递信息,开辟治疗IBD的新途径。

1 材料和方法

1.1 材料 ♀、未育、健康的清洁级SD大鼠36只,体质量193-205 g,购自昆明医学院实验动物中心, TNBS购于美国Sigma公司; AG490购于美国Calbiochem公司; RPM购于美国Biomol

公司; BCA蛋白浓度测定试剂盒购于北京博奥森生物技术有限公司; 兔抗大鼠MMP-1多抗、MMP-2多抗、MMP-3多抗、TIMP-1多抗、ACTIN多抗、HRP标记的羊抗兔IgG购于武汉博士德公司; PageRuler™ Prestained Protein Ladder(Fermentas)。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模: 参考Morris *et al*^[2]的二次致炎细胞免疫方法, 随机选24只SD大鼠, 轻度乙醚麻醉, TNBS 30 mg溶于500 mL/L的乙醇中(共0.85 mL), 用硅胶管从肛门插入8 cm灌肠。3 wk后再次从肠道灌入10 mg TNBS+0.25 mL生理盐水, 造模慢性复发性大鼠结肠炎成功后, 将大鼠随机分为2组, AG490组($n = 12$)将1 mg AG490粉剂溶于二甲基亚砜(dimethyl sulphoxide, DMSO)中, 配成50 g/L溶液, 注射时溶于0.4 mL生理盐水中配成混悬液, JAK2抑制剂AG490 8 mg/(kg·d)腹腔注射, 治疗7 d; RPM处理组($n = 12$): 将RPM粉剂溶于DMSO中, 配成浓度为25 g/L溶液, 注射时溶于0.4 mL生理盐水中配成混悬液, RPM 0.4 mg/(kg·d)腹腔注射, 治疗7 d; 对照组($n = 12$)生理盐水0.4 mL/d腹腔注射, 共7 d。治疗结束后, 乙醚麻醉后开胸摘除心脏处死大鼠, 立刻(1 min内)开腹观察肠道病变, 距肛门6 cm左右截断肠道, 置冰上, 沿系膜对侧纵行剖开以冰盐水冲洗干净, 仔细观察肠道病变, 按照Medina *et al*^[3]的标准做出大体和组织损伤评分; 另取结肠组织, 液氮速冻后于-70℃冰箱保存备用。次日从-70℃冰箱取出大鼠结肠组织。称取各组大鼠结肠组织100 mg将组织放于冰上, 将其剪碎, 置于匀浆器中, 加入组织提取液, 匀浆后离心, 并取其上清, 并置于-20℃保存。蛋白质浓度用BCA法测定。

1.2.2 MMPs与TIMP-1的蛋白测定: 采用Western blot法分析肠黏膜中MMP-1(52 kDa)、MMP-2(72 kDa)、MMP-3(57 kDa)、TIMP-1(28.5 kDa)蛋白质表达。β-actin兔多克隆抗体(42 kDa)作为内参。每个样品取60 μg总蛋白以2×上样缓冲液, 煮沸5 min。将样品经10%聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白, 4℃下电转至PVDF硝酸纤维素膜上。用50 g/L脱脂牛奶封闭后, 分别加1:400稀释的抗actin、MMP-1、MMP-2、MMP-3及TIMP-1抗体4℃过夜。PBST洗膜后, 再加1:5000, HRP标记的IgG于室温孵育2 h, PBST洗膜后, 用化学增强荧光剂检验蛋白条带, 柯达X光胶片曝光、显影。数码照相后, Image J

表 1 对照组和雷帕霉素组、AG490处理组体质量的变化 (g, mean \pm SD)

时间	对照组	雷帕霉素组	AG490组
第1天	201.10 \pm 2.60	199.20 \pm 5.41	198.70 \pm 5.54
第1周	175.90 \pm 5.13 ^a	176.50 \pm 7.10 ^a	176.00 \pm 7.04 ^a
第2周	184.50 \pm 6.72 ^c	186.70 \pm 5.86 ^c	187.30 \pm 4.50 ^c
第3周	226.90 \pm 11.97 ^e	225.98 \pm 13.00 ^e	224.10 \pm 12.48 ^e
第4周	204.80 \pm 6.59	234.30 \pm 11.02 ^g	232.10 \pm 10.94 ^g

^a $P < 0.05$ vs 第1天; ^c $P < 0.05$ vs 第1周; ^e $P < 0.05$ vs 第2周; ^g $P < 0.05$ vs 对照组.

软件进行图像处理, 测定灰度值. 将同一张蛋白印迹膜曝光后, 0.5% SDS洗脱抗体, 再用 β -actin进行孵育杂交以作为内参照.

1.2.3 MMP-2的活性测定: 采用明胶酶谱分析法, SDS-PAGE的分离胶浓度为8%, 每毫升凝胶含2 mg明胶, 浓缩胶为5%, 取90 μ g总蛋白加等体积的2 \times SDS非还原加样缓冲液, 室温下混匀后直接点样, 4 $^{\circ}$ C条件下恒压电泳(120 V)至溴酚蓝达凝胶下沿. 电泳结束后, 凝胶置2.5% TritonX-100中漂洗15 min \times 2次, 然后浸入反应缓冲液, 37 $^{\circ}$ C孵育9 h. 取出凝胶, 用0.5%考马斯亮蓝R250染色0.5 h, 脱色液脱色至蓝色背景现出清晰的白色条带.

统计学处理 采用SPSS11.5统计软件. 所有数据用mean \pm SD表示. 计量资料的多组数据比较采用随机区组设计的方差分析, 组间的两两比较采用 q 检验. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 大鼠的体质量和大便质地 在第1次TNBS灌肠后未给予治疗的3 wk内, 大鼠主要在第1周内出现腹泻, 大便为黄色稀便, 或肛周体毛被稀便沾染. 灌肠后第1周体质量明显降低(P 值分别为0.000、0.000、0.000). 第2周体质量开始增加(P 值分别为0.002、0.001、0.001), 腹泻症状开始好转. 第3周后, 大便正常, 体质量逐渐恢复正常(P 值分别为0.000、0.000、0.000). 第4周再次给予TNBS灌肠后, 对照组直到处死前, 仍有腹泻; 而雷帕霉素组与AG490处理组出现腹泻, 持续3 d, 以后逐渐恢复正常. 第4周结束时, 雷帕霉素组与AG490组体质量较对照组高(P 值均为0.000). 逐周的体质量变化见表1.

2.2 大鼠结肠炎症的大体和组织评分 对照组(图1A)结肠可见肠壁充血、水肿明显, 少数腹腔粘连, 近端肠道扩张. 沿系膜缘剖开后见黏膜充血、水肿、糜烂及溃疡形成, 几乎所有大鼠均



图 1 大鼠结肠黏膜大体观察. A: 对照组; B: AG490组; C: RPM组.

有肠壁增厚; 光镜下(图2A)病变主要位于黏膜和黏膜下层, 少数出现在肌层, 甚至是全层炎症, 以中性粒细胞、浆细胞、淋巴细胞浸润为主, 黏膜及黏膜下层有单核细胞和巨噬细胞的浸润, 甚至溃疡形成, 肠道损伤积分(包括大体和组织学积分)为 8.53 ± 2.18 . AG490处理组大体观察结肠炎症较轻, 无明显糜烂和溃疡出现(图1B); 光镜下观察可见黏膜及黏膜下层炎症明显减轻(图2B), 肠道损伤积分为 5.50 ± 2.16 , 低于对照组($t = 2.825$, $P < 0.05$). RPM处理组大体观察结肠炎症较轻, 无明显糜烂和溃疡出现(图1C); 光镜下观察可见黏膜及黏膜下层炎症明显减轻(图2C), 肠道损伤积分为 5.17 ± 1.80 , 低于对照组($t = 3.963$, $P < 0.01$).

2.3 TNBS模型大鼠肠黏膜MMPs与TIMP-1的蛋白表达 AG490组和RPM组MMP-1, MMP-2表达量显著低于对照组, 差异有统计学意义(均 $P < 0.05$). AG490组和RPM组MMP-3, TIMP-1表达量与对照组差异无统计学意义(均 $P > 0.05$, 表2, 图3).

2.4 TNBS模型大鼠肠黏膜MMP-2的活性 AG490组和RPM组MMP-2(66 kDa)活性显著低于对照组($P < 0.05$, 图4).

3 讨论

本研究采用TNBS二次致炎细胞免疫方法构建

相关报道
最近有多项研究显示活化的STAT3通过调节炎症反应在结肠炎发病机制中起着重要作用.

应用要点

通过干预JAK/STAT通路调控MMP的表达与活性,可能达到防御或治疗IBD的目的。这对未来治疗IBD开辟了新的途径。

表 2 TNBS诱发结肠炎大鼠MMPs与TIMP-1蛋白表达(mean ± SD)

分组	MMP-1/ β -actin	MMP-2/ β -actin	MMP-3/ β -actin	TIMP-1/ β -actin
对照组	1.99 ± 0.50	1.90 ± 0.69	2.27 ± 0.42	2.93 ± 0.19
AG490组	0.79 ± 0.27 ^a	0.67 ± 0.36 ^a	2.30 ± 0.39	2.91 ± 0.17
RPM组	0.88 ± 0.14 ^a	0.80 ± 0.54 ^a	2.24 ± 0.40	2.90 ± 0.18

^a $P < 0.05$ vs 对照组。

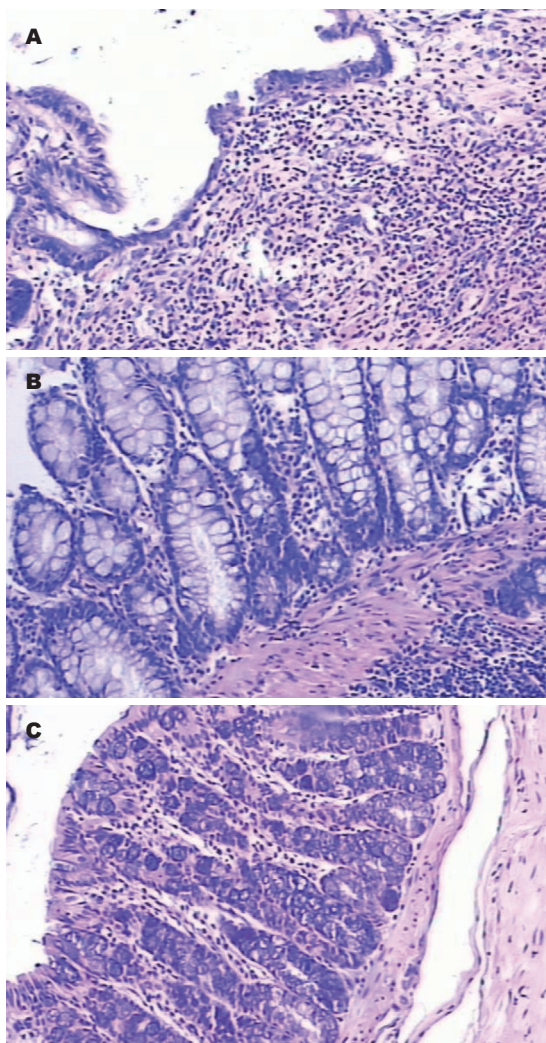


图 2 大鼠结肠黏膜光镜观察(HE × 100)。A: 对照组; B: AG490组; C: RPM组。

实验性大鼠结肠炎模型,第1次给予TNBS刺激后,大鼠出现腹泻、便血、体质量减轻等症状,急性期后症状渐缓解,大鼠结肠炎进入慢性期;3 wk后再次给予小剂量的TNBS灌肠后病情复发,再次出现上述症状。4 wk后处死大鼠,观察发现结肠肠壁黏膜充血、水肿、糜烂及溃疡形成,几乎所有大鼠均有肠壁增厚;光镜下病变主要位于黏膜和黏膜下层,少数出现在肌层,甚至是全层炎症,以中性粒细胞、浆细胞、淋巴细

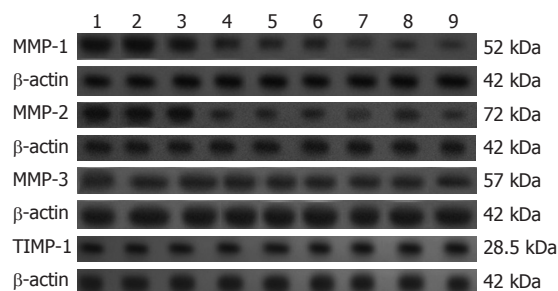


图 3 肠黏膜中MMP-1、MMP-2、MMP-3及TIMP-1的蛋白表达。1-3: 对照组; 4-6: AG490组; 7-9: RPM组。



图 4 明胶酶谱分析结果。1-3: AG490组; 4-6: RPM组; 7-9: 对照组。

胞浸润为主,黏膜及黏膜下层有单核细胞和巨噬细胞的浸润,甚至溃疡形成,肠道损伤积分明显增高。结果表明本研究的大鼠结肠炎模型构建成功,并且通过采用2次刺激法,使大鼠在慢性结肠炎的基础上再次出现急性结肠炎的表现,具有急、慢性结肠炎共存的特点,类似于慢性复发性炎症,更接近人类IBD反复发作-缓解-复发的慢性病程。我们给予AG490与雷帕霉素治疗TNBS大鼠结肠炎后,动物体质量增加,腹泻、便血等症状好转,大体观察结肠炎症较轻,无明显糜烂和溃疡出现;光镜下观察可见黏膜及黏膜下层炎症明显减轻,本研究结果提示AG490与雷帕霉素治疗能够有效抑制TNBS大鼠结肠炎的炎症反应。文献[4]报道AG490是JAK2的特异性抑制剂, RPM是STAT的阻断剂,他们通过阻断各自激酶701位丝氨酸和727位酪氨酸磷酸化,来阻断下游激酶的活化进而抑制细胞的生理和病理效应。最近有多项研究^[5-6]显示活化的STAT3通过调节炎症反应在结肠炎发病机制中起着重要作用。在多种结肠炎动物模型中, Suzuki *et al*^[7]均发现活化STAT3的高表达;另外,有多个研究^[5,8]也发现在UC和DC患者炎症肠黏膜总STAT3和磷酸

化的STAT3水平持续性升高,且无论在动物模型还是IBD患者炎症肠黏膜中活化的STAT3水平都与这些组织炎症损伤程度呈正相关。但Takeda *et al*^[9]敲除了小鼠单核细胞的STAT3基因,发现STAT3基因缺失使小鼠对内毒素的敏感性增加,TNF- α 、IL-1等炎性细胞因子的数量也增加,提示STAT3可能具有免疫抑制功能。STAT3在肠道炎症反应中的作用尚需进一步深入研究。

近年来有多位学者对MMPs在IBD中的表达情况及其可能作用进行了研究,以探索MMPs在IBD发病及其病程进展中的作用,结果令人鼓舞。Danese *et al*^[10]测定了52例UC患者病变区MMPs及TIMPs的含量,结果显示:MMP-1、MMP-2、MMP-9和TIMPs在病变组织基质细胞中表达;MMP-3在基质细胞和上皮细胞中均表达;MMP-7则主要表达在溃疡边缘的上皮细胞内,而且其表达与炎症的严重度相关,故认为MMP-7的表达可作为评价UC炎症活动度的重要指标。有研究者对21例UC患者和21例CD患者内镜结肠活检标本的MMP及其抑制物TIMP mRNAs的含量进行了测定,结果显示,MMP-2、MMP-14及TIMP-1的mRNAs含量在所有病变标本中均显著增加,其中MMP-1及MMP-3的mRNA含量是正常组织的15倍,因而推测MMPs在IBD的组织破坏和重构中发挥重要作用^[11]。IBD不仅具有慢性消耗性特征,可造成局部组织的炎症坏死,而且有导致局部癌变的可能。因而,研究如何有效阻断这一病变过程具有重要的现实意义。正常时,在结肠或身体其他组织,MMPs和TIMPs协同作用,使ECM的合成和降解处于动态平衡,保持人体结构和功能的完整性,一旦代谢失衡,势必出现一系列病理状态。在肠道,这种代谢失衡则可破坏肠黏膜屏障,导致溃疡等的形成^[10]。最近大量研究报道均提示,IBD活检组织有MMPs的过表达,包括mRNA和蛋白质水平。MMPs主要通过降解ECM、促进细胞凋亡、影响新生血管生成、促进细胞因子释放等多种途径参与IBD及其并发症的发生、发展。

另有多项研究证实MMPs抑制剂能有效地防止肠道的损伤和炎症,并降低肠道炎症的积分^[3,12]。局部MMPs的浓度与黏膜破坏间存在因果关系,对该酶的抑制可导致组织破坏的减轻,且该酶与黏膜的重构间有很强的相关性,然而,总的胶原降解程度取决于局部有活性的酶和该酶天然抑制剂之间的平衡。TIMPs是MMPs的一种天然抑制剂,研究发现,在炎症肠病的病变肠

黏膜中TIMPs的表达并没有相应的升高,导致MMPs/TIMPs比值升高,MMPs和其天然抑制剂的平衡被破坏,导致组织损伤的发生^[13]。

本实验进一步探讨了JAK/STAT通路是否参与IBD肠组织MMP表达的调控过程,旨在为寻找有效干预MMP表达途径提供新的线索。实验结果显示,以TNBS诱导的IBD大鼠模型中AG490与RPM能明显降低肠组织中MMP-1、MMP-2的蛋白表达和MMP-2的活性,而不影响MMP-3与TIMP-1的表达;抑制JAK/STAT通路能显著减少TNBS诱导的IBD大鼠模型中肠组织糜烂和溃疡的出现。结果表明JAK/STAT参与了IBD肠组织MMP表达的调节过程,抑制JAK/STAT通路可下调MMP的表达,并有助于防止IBD肠组织的损伤。

总之,通过干预JAK/STAT通路调控MMP的表达与活性,可能达到防御或治疗IBD的目的。这对未来治疗IBD开辟了新的途径。关于JAK/STAT与MMP的确切作用机制及临床意义有待更深入的研究。

4 参考文献

- 1 Mudter J, Weigmann B, Bartsch B, Kiesslich R, Strand D, Galle PR, Lehr HA, Schmidt J, Neurath MF. Activation pattern of signal transducers and activators of transcription (STAT) factors in inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 64-72
- 2 Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szwczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989; 96: 795-803
- 3 Medina C, Videla S, Radomski A, Radomski M, Antolín M, Guarner F, Vilaseca J, Salas A, Malagelada JR. Therapeutic effect of phenantroline in two rat models of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 1314-1319
- 4 姚胜, 姚咏明, 李红云, 董宁, 于燕, 梁华平. 抑制JAK/STAT通路对烫伤后金黄色葡萄球菌脓毒症大鼠肝损伤的影响. *中国危重病急救医学* 2002; 14: 336-339
- 5 Lovato P, Brender C, Agnholt J, Kelsen J, Kaltoft K, Svejgaard A, Eriksen KW, Woetmann A, Ødum N. Constitutive STAT3 activation in intestinal T cells from patients with Crohn's disease. *J Biol Chem* 2003; 278: 16777-16781
- 6 Musso A, Dentelli P, Carlino A, Chiusa L, Repici A, Sturm A, Fiocchi C, Rizzetto M, Pegoraro L, Sategna-Guidetti C, Brizzi MF. Signal transducers and activators of transcription 3 signaling pathway: an essential mediator of inflammatory bowel disease and other forms of intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 91-98
- 7 Suzuki A, Hanada T, Mitsuyama K, Yoshida T, Kamizono S, Hoshino T, Kubo M, Yamashita A, Okabe M, Takeda K, Akira S, Matsumoto S, Toyonaga A, Sata M, Yoshimura A. CIS3/SOCS3/SSI3 plays a negative regulatory role in STAT3 activation and intestinal inflammation. *J Exp Med*

同行评价
本研究选题合理,
实验方法正确,参
考文献引用恰当,
学术价值较好。

- 2001; 193: 471-481
- 8 Musso A, Dentelli P, Carlino A, Chiusa L, Repici A, Sturm A, Fiocchi C, Rizzetto M, Pegoraro L, Sategna-Guidetti C, Brizzi MF. Signal transducers and activators of transcription 3 signaling pathway: an essential mediator of inflammatory bowel disease and other forms of intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 91-98
- 9 Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, Tsujimura T, Terada N, Förster I, Akira S. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* 1999; 10: 39-49
- 10 Danese S. Negative regulators of angiogenesis in inflammatory bowel disease: thrombospondin in the spotlight. *Pathobiology* 2008; 75: 22-24
- 11 Chidlow JH Jr, Shukla D, Grisham MB, Kevil CG. Pathogenic angiogenesis in IBD and experimental colitis: new ideas and therapeutic avenues. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G5-G18
- 12 Di Sebastiano P, di Mola FF, Artese L, Rossi C, Mascetta G, Pernthaler H, Innocenti P. Beneficial effects of Batimastat (BB-94), a matrix metalloproteinase inhibitor, in rat experimental colitis. *Digestion* 2001; 63: 234-239
- 13 消化系疾病分册 2005; 25: 340-342

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位胃肠病学和肝病学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学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学领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医药学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。(科学编辑: 李军亮 2009-09-08)

抑瘤基因NGX6对结肠癌血管形成的影响

连平, 郭勤, 彭娅, 肖志明, 刘芬, 王晓艳, 沈守荣, 李桂源

连平, 郭勤, 彭娅, 肖志明, 刘芬, 王晓艳, 沈守荣, 中南大学湘雅三医院消化内科 湖南省长沙市 410013
李桂源, 中南大学湘雅医学院肿瘤研究所 湖南省长沙市 410078

连平, 中南大学湘雅三医院消化内科博士, 主要从事于消化系统肿瘤的研究。

国家重大科学研究计划基金资助项目, No. 2006CB910503

国家自然科学基金资助项目, No. 30370801; No. 30770972

湖南省自然科学基金资助项目, No. 06JJZ0068

国家教育部博士专项科研基金资助项目, No. 20040533062

作者贡献分布: 此课题由连平、沈守荣及李桂源设计; 实验操作与数据分析由连平、郭勤、彭娅、肖志明、刘芬及王晓艳完成; 本论文写作主要由连平完成; 由沈守荣指导课题完成。

通讯作者: 沈守荣, 教授, 主任医师, 博士生导师, 410078, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅医学院肿瘤研究所。

ssr_35403@163.com

电话: 0731-88618457

收稿日期: 2009-02-23 修回日期: 2009-08-19

接受日期: 2009-08-24 在线出版日期: 2009-09-08

Nasopharyngeal carcinoma-associated gene 6 inhibits tumor angiogenesis in colon cancer

Ping Lian, Qin Guo, Ya Peng, Zhi-Ming Xiao, Fen Liu, Xiao-Yan Wang, Shou-Rong Shen, Gui-Yuan Li

Ping Lian, Qin Guo, Ya Peng, Zhi-Ming Xiao, Fen Liu, Xiao-Yan Wang, Shou-Rong Shen, Department of Gastroenterology, the Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, Hunan Province, China

Gui-Yuan Li, Institute of Cancer Research, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, Hunan Province, China

Supported by: the Major State Basic Research Development Program of China, No. 2006CB910503; National Natural Science Foundation of China, No. 30370801 and 30770972; the Natural Science Foundation of Hunan Province of China, No. 06JJZ0068; and the Doctoral Fund of Ministry of Education of China, No. 20040533062

Correspondence to: Professor Shou-Rong Shen, Department of Gastroenterology, the Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, Hunan Province, China. ssr_35403@163.com

Received: 2009-02-23 Revised: 2009-08-19

Accepted: 2009-08-24 Published online: 2009-09-08

Abstract

AIM: To investigate the role of nasopharyngeal carcinoma-associated gene 6 (NGX6) in tumor angiogenesis in colon cancer.

METHODS: HT-29 cells were divided into three groups, namely, untransfected cells (normal

control group) and cells transfected with empty vector [pcDNA3.1(+)/HT-29 group] or vector harboring NGX6 gene [pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 group]. These cells were inoculated on the chorioallantoic membrane (CAM) of fertilized chicken eggs to observe the role of NGX6 in angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. In addition, the cells were subcutaneously injected into nude mice. The microvessel density (MVD) in xenograft tumors was determined by immunohistochemistry. The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: The average number of blood vessels (6.2 ± 0.2 vs 8.6 ± 0.2 and 8.4 ± 0.3 , respectively; both $P < 0.05$), the average weight of xenograft tumors (1.83 ± 0.25 g vs 4.06 ± 0.20 g and 4.16 ± 0.4 g, respectively; both $P < 0.05$) and MVD (1.83 ± 0.52 vs 7.36 ± 1.12 and 6.96 ± 1.43 , respectively; both $P < 0.05$) in xenograft tumors were significantly lower in the pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 group than in the normal control group and pcDNA3.1(+)/HT-29 group. The expression level of VEGF mRNA was also lower in the pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 group than in the normal control group and pcDNA3.1(+)/HT-29 group. Lung metastases were found in nude mice in the normal control group and pcDNA3.1(+)/HT-29 group, but not in the pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 group.

CONCLUSION: NGX6 gene inhibits tumor angiogenesis and metastasis in colon cancer.

Key Words: Colon cancer; Nasopharyngeal carcinoma-associated gene 6 gene; Nude mouse; Angiogenesis

Lian P, Guo Q, Peng Y, Xiao ZM, Liu F, Wang XY, Shen SR, Li GY. Nasopharyngeal carcinoma-associated gene 6 inhibits tumor angiogenesis in colon cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(25): 2577-2584

摘要

目的: 探讨抑瘤基因NGX6对结肠癌血管形成的影响。

背景资料

结直肠癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一, 在西方国家结肠癌是癌相关性死亡的主要原因, 近年来我国结肠癌的发病率亦呈上升趋势。

同行评议者

唐世刚, 教授, 大连大学附属中山医院消化内科

研究前沿
研究表明结直肠癌发病机制涉及多个抑瘤基因的失活和癌基因的激活,尤其是抑瘤基因的失活。

方法: 将HT-29细胞分为3组: pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组(稳定转染并表达NGX6基因的HT-29细胞)、pcDNA3.1(+)/HT-29组(转染空白质粒的HT-29细胞)及HT-29对照组。通过鸡胚绒毛尿囊膜血管形成实验检测结肠癌细胞接种鸡胚血管形成情况。裸鼠成瘤实验观测种植瘤及其对裸鼠的影响,然后对种植瘤进行免疫组织化学实验检测其内部血管生成。RT-PCR检测NGX6基因及VEGF基因在各组细胞中的表达。

结果: pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组鸡胚血管形成平均数量较HT-29与pcDNA3.1(+)/HT-29组明显减少(6.2 ± 0.2 vs 8.6 ± 0.2 , 8.4 ± 0.3 , $P < 0.05$); HT-29组裸鼠明显消瘦且pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组与HT-29和pcDNA3.1(+)/HT-29组种植瘤平均质量、种植瘤微血管密度明显降低(1.83 ± 0.25 g vs 4.06 ± 0.20 g, 4.16 ± 0.4 g; 1.83 ± 0.52 vs 7.36 ± 1.12 vs 6.96 ± 1.43 , 均 $P < 0.05$); VEGF在pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29细胞及种植瘤中较其余两组明显降低,而pcDNA3.1(+)/HT-29细胞与未转染的HT-29细胞与种植瘤中呈高表达;且HE染色切片显示HT-29组及PcDNA3.1(+)/HT-29组种植瘤血管内都有癌栓,而PcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组种植瘤内未见有癌栓形成。

结论: NGX6基因能抑制结肠癌细胞HT-29血管的形成,抑瘤基因NGX6的抑癌能力部分是通过抑制血管形成来实现的。

关键词: 结肠癌; NGX6基因; 裸鼠; 血管形成

连平, 郭勤, 彭娅, 肖志明, 刘芬, 王晓艳, 沈守荣, 李桂源. 抑瘤基因NGX6对结肠癌血管形成的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(25): 2577-2584
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2577.asp>

0 引言

结肠癌是最常见的人类恶性肿瘤之一,在我国其发病率近年来呈上升趋势。NGX6基因是中南大学肿瘤研究所分子遗传室采用定位候选克隆策略克隆的候选抑瘤基因(GenBank登录号AF188239)^[1-2]。将NGX6基因分别转染鼻咽癌和结肠癌细胞后可使鼻咽癌细胞和结肠癌细胞的恶性表型得到部分逆转^[3-4]。为进一步明确NGX6在结肠癌中的作用,我们利用鸡胚绒毛尿囊膜血管形成(angiogenesis of chick chorioallantoic membrane, CAM)实验、裸鼠成瘤实验、RT-PCR、免疫组织化学实验分析NGX6基因对结

肠癌血管形成以及机制的影响,来探讨其在结肠癌发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 低分化结肠癌细胞系HT-29与转染空白质粒载体pcDNA3.1(+)/HT-29以及稳定转染NGX6基因的pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29,用含120 mL/L胎牛血清的DMEM培养基,50 mL/L的CO₂,37℃条件下培养;北京白鸡种鸡胚,购自种鸡场,37.8℃±0.5℃培养箱中孵育;♂,Balb/c裸鼠,周龄4 wk,体质量18-22 g,购自中国科学院上海药物研究所动物中心,饲养于湘雅医学院动物学部,无菌净化屏障系统内饲养;随机引物标记盒、逆转录试剂盒、Taq酶购自美国Promega公司;TRIzol™试剂购自美国Gibco公司;胎牛血清,DMEM培养基购自华美生物工程公司;von Willebrand Factor单抗以及免疫组织化学SABC检测试剂盒与DAB显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;PCR引物由上海博亚生物技术有限公司合成: (1)内对照GAPDH的引物: L: 5'-TGACCTGTTCCAAAGAGTCCCTG-3', R: 5'-GCAGCTTCCAGCACATATCGACT-3',扩增目的片段为700 bp; (2)NGX6基因的引物: L: 5'-CAACAGCCTCAAGATCATCAGCA-3', R: 5'-GAGGAGGGGAGATTTCAGTGTGGT-3',扩增目的片段为498 bp; (3)VEGF引物: L: 5'-TTGCTGCTCTACTCCAC-3', R: 5'-AATGCTTTCTCCGCTCTG-3',扩增目的片段为418 bp。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR实验: 利用TRIzol™试剂抽提细胞总RNA,用DNase- I 消化RNA中的痕量DNA,按逆转录试剂盒操作程序进行逆转录。PCR结果的琼脂糖电泳照片用TIPAS98图像分析仪的图像分析系统进行灰度扫描。

1.2.2 CAM实验: 鸡胚孵育第7天,选取孵育完好的种鸡胚,取对数生长期的HT-29、pcDNA3.1(+)/HT-29 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 3组癌细胞悬液30 μL含4×10⁶个,分别接种到鸡胚CAM表面,再用透明胶纸封好,继续孵育21 d后取出观测拍照。计数CAM上由瘤体放射发出的血管数。

1.2.3 裸鼠成瘤实验: 取对数生长期的HT-29、pcDNA3.1(+)/HT-29、pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29 3组癌细胞悬液0.1 mL(5×10⁷/mL),接种于4周龄裸鼠的前肢腋下,定时观测裸鼠生长情况及移植瘤生长情况,分两批于30 d及60 d处死裸鼠,测量裸鼠以及移植瘤质量,并用甲醛固定

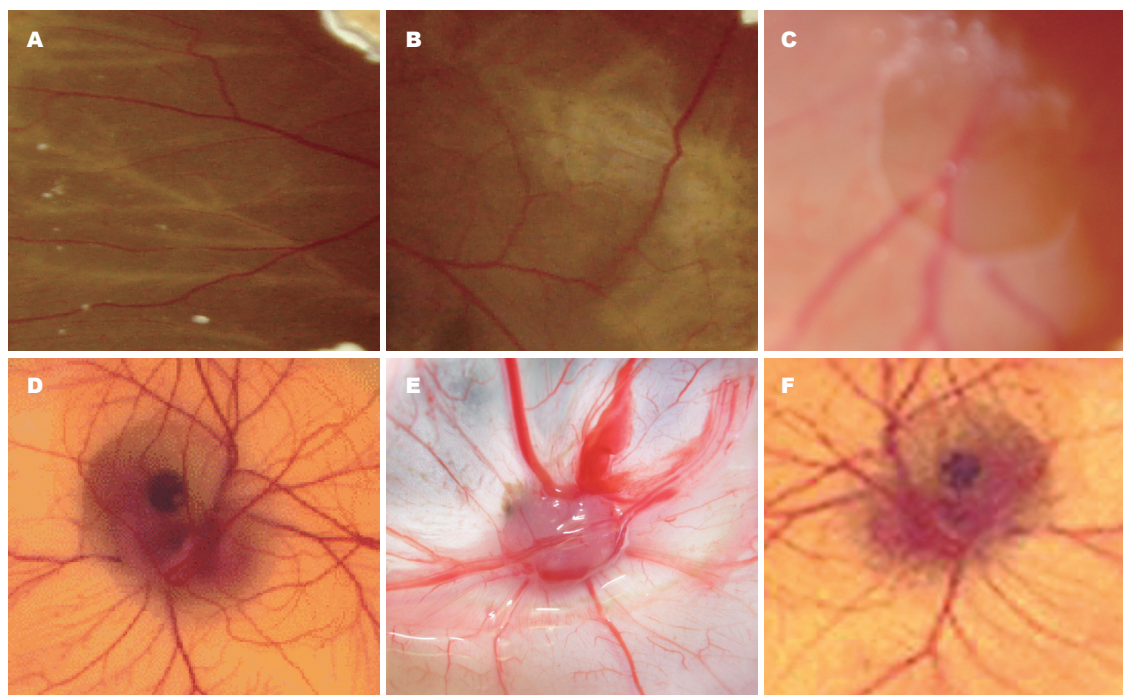


图1 鸡胚绒毛尿囊膜血管(CAM)形成实验结果. A-B: 鸡胚孵育第7天; C: PBS对照组; D: HT-29组; E: pcDNA3.1(+)/HT-29组; F: pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组.

相关报道
生物信息学分析显示, NGX6基因cDNA预测编码蛋白含有2个跨膜结构域(第234-256位氨基酸, 269-291), 胞外区含有1个EGF样结构域(185-221)和3个糖基化位点(92-95, 100-103, 172-175), 胞内区较短, 含有一个酪氨酸激酶磷酸化位点(257-265), 其EGF样结构域应该是其发挥生物学功能的结构基础.

石蜡包埋制成病理切片做HE染色.

1.2.4 免疫组织化学实验: 将组织切片在65℃恒温箱中烘烤60 min, 然后趁热将组织切片置于二甲苯中浸泡10 min, 更换二甲苯后再浸泡10 min, 无水乙醇中浸泡5 min, 950 mL/L乙醇中浸泡5 min, 700 mL/L乙醇中浸泡5 min, 500 mL/L乙醇中浸泡5 min, PBS洗3次各5 min; 用配置新鲜的3% H₂O₂, 室温封闭30 min, PBS洗3次各5 min. 抗原修复: 微波炉里加热0.01 mol/L枸橼酸钠缓冲溶液(pH6.0)至沸腾后将组织芯片放入, 断电, 间隔10 min, 反复3次, PBS洗3次各5 min; 滴加正常山羊血清封闭液, 室温20 min, 甩去多余液体; 滴加I抗, 4℃过夜; PBS洗3次每次2 min, 滴加生物素化二抗, 室温下30 min; PBC洗3次每次2 min, 滴加试剂SABC, 室温下20 min; PBS洗4次每次5 min, DAB显色(镜下掌握显色程度); 蒸馏水洗, 苏木素复染4 min、盐酸乙醇分化; 脱水、透明、封片、镜检.

统计学处理 应用SPSS11.0统计分析软件对所得数据进行相关检验, 检验水准 $P=0.05$.

2 结果

2.1 CAM形成实验结果 分别将30 μ L含 4×10^6 的HT-29、pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29、pcDNA3.1(+)/HT-29 3种细胞接种于CAM表面, 置37.8℃ \pm 0.5℃培养箱中孵育. 细胞接种24 h后,

CAM血管开始向接种部位生长; 第2天, 新生小血管直接趋向接种部位; 第3天, 新生血管形成以接种部位为中心的放射状血管网; 尔后随培养时间的延长, 血管数目及直径均明显增加. 非接种部位与接种部位比较, CAM血管数目少, 大血管与小血管呈脉样均匀分布. 接种后第11天拍照, 见PBS对照组未形成放射状血管网, 而HT-29组、pcDNA3.1(+)/HT-29组及pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组均形成放射状血管网, 但pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组较前两组血管数目明显减少, 计数pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组鸡胚血管形成平均为 6.2 ± 0.2 条, HT-29组鸡胚血管形成平均为 8.6 ± 0.2 条, pcDNA3.1(+)/HT-29组鸡胚血管形成平均为 8.4 ± 0.3 条, pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组细胞pcDNA3.1(+)/HT-29组细胞及HT-29组细胞CAM血管数比较($P<0.05$, 图1).

2.2 裸鼠体质量变化 将HT-29组、PcDNA3.1(+)/HT-29组、PcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组3组肿瘤细胞悬液接种于裸鼠腋前皮下后, 2组裸鼠有一个体质量增长的过程, 3组裸鼠间无明显差别, 至第30天时, 3组裸鼠体质量变化无差异($P>0.05$). 从第51天HT-29组与PcDNA3.1(+)/HT-29组裸鼠体质量有所下降, 缓慢消瘦, 至第60天时, 可见HT-29组与PcDNA3.1(+)/HT-29组裸鼠与PcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组裸鼠比较消瘦明显(图2). 3组裸鼠体质量变化有显著性差异

创新盘点
NGX6基因是克隆出的一个新基因, 本研究证实NGX6基因对于结肠癌是个抑瘤基因。

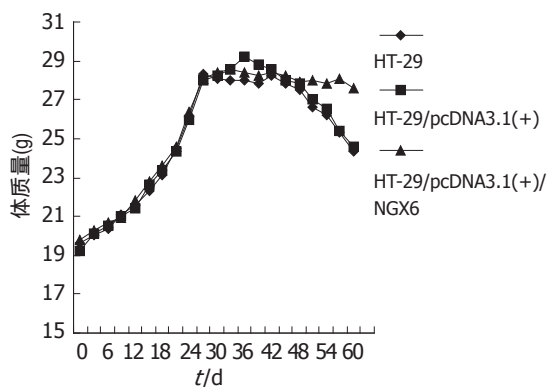


图2 接种结肠癌细胞后裸鼠的体重变化。

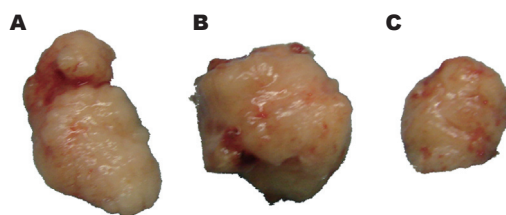


图3 第60天处理裸鼠时3组种植瘤比较。A: HT-29组; B: pcDNA3.1(+)/HT-29组; C: pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组。

($P < 0.05$).

2.3 种植瘤生长变化 将HT-29组、PcDNA3.1(+)/HT-29组、PcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组3组肿瘤细胞悬液以0.1 mL(含 5×10^6 个肿瘤细胞)分别接种于裸鼠腋前皮下。接种肿瘤细胞7 d后, 在种植部位可触摸到一小点突起感的种植灶, 其后可见种植瘤迅速生长, 至16-23 d, 3组种植瘤生长均有增长缓慢期, 而后HT-29组及PcDNA3.1(+)/HT-29组种植瘤又开始迅速生长, 而PcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组种植瘤停滞于此增长缓慢期, 至第37天后, PcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组种植瘤亦开始迅速生长, 但仍不及HT-29组及PcDNA3.1(+)/HT-29组种植瘤增长, 至第60天处理裸鼠时, HT-29组种植瘤平均 4.06 ± 0.20 g, PcDNA3.1(+)/HT-29组种植瘤平均 4.16 ± 0.43 g, PcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组种植瘤平均 1.83 ± 0.25 g, 3组种植瘤质量有显著性差异($P < 0.05$, 图3)。

2.4 种植瘤HE染色病理结果 将结肠癌细胞接种于裸鼠腋前皮下后, 分第30天与第60天两批处理裸鼠。取出种植灶(图4), 经HE染色切片证实均为低分化结肠腺癌。

2.5 种植瘤微血管密度检测 pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组种植瘤微血管密度较HT-29组及pcDNA3.1(+)/HT-29组明显减少(图5)。种植瘤微血管密度按文献方法[5]用3个200倍视野下的

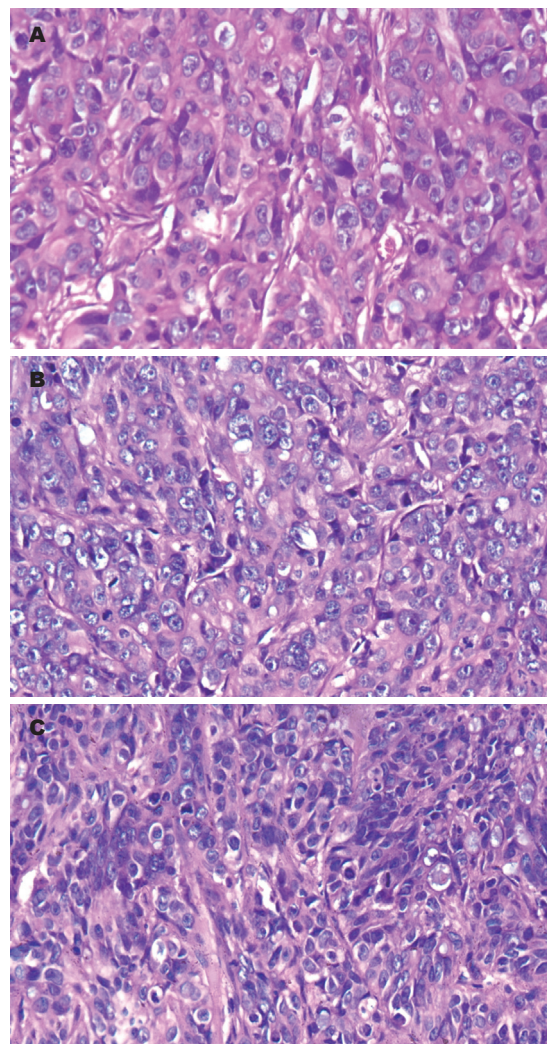


图4 3组裸鼠种植瘤HE染色病理结果($\times 200$)。A: HT-29组; B: pcDNA3.1(+)/HT-29组; C: pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组。

血管数目的平均数表示, HT-29组种植瘤微血管 7.36 ± 1.12 条, pcDNA3.1(+)/HT-29组 6.96 ± 1.43 条, pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组种植瘤微血管密度 1.83 ± 0.52 , 3组种植瘤微血管密度有显著性差异($P < 0.05$)。

2.6 NGX6基因对结肠癌HT-29细胞及移植瘤VEGF表达的影响 VEGF在pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29细胞及种植瘤中较其余两组细胞与种植六表达明显降低, 而pcDNA3.1(+)/HT-29细胞和未转染的HT-29细胞与种植瘤中呈高表达(图6)。

2.7 种植瘤血管内癌栓 将结肠癌细胞接种于裸鼠腋前皮下后, 第60天处理裸鼠。取出种植灶, 经HE染色切片显示HT-29组及PcDNA3.1(+)/HT-29组种植瘤血管内都有癌栓, 而PcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组种植瘤内未见有癌栓形成(图7)。

2.8 裸鼠体内的肿瘤转移 处理裸鼠时, HT-29组

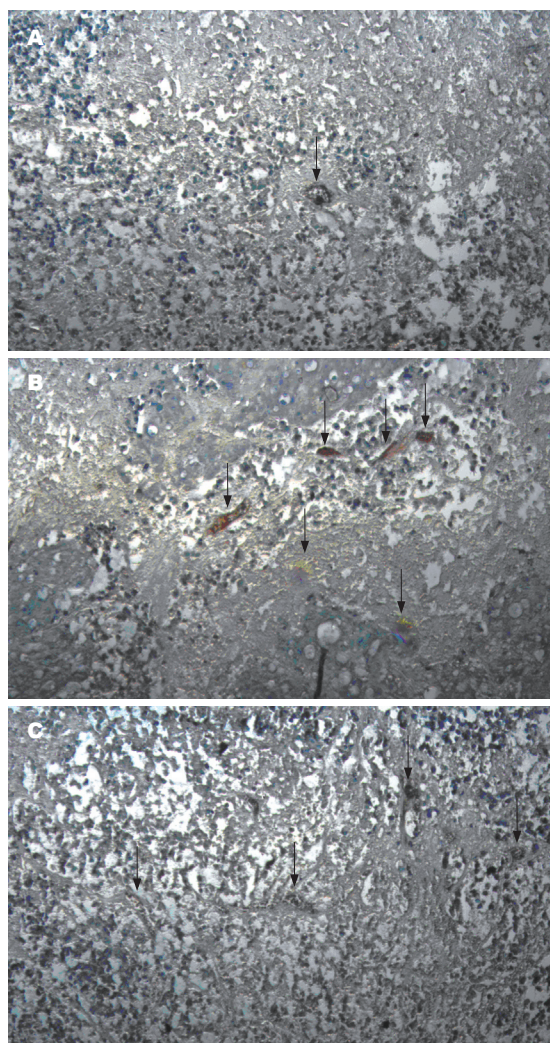


图 5 3组种植瘤微血管密度镜下观察结果($\times 200$). A: pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组; B: HT-29组; C: pcDNA3.1(+)/HT-29组.

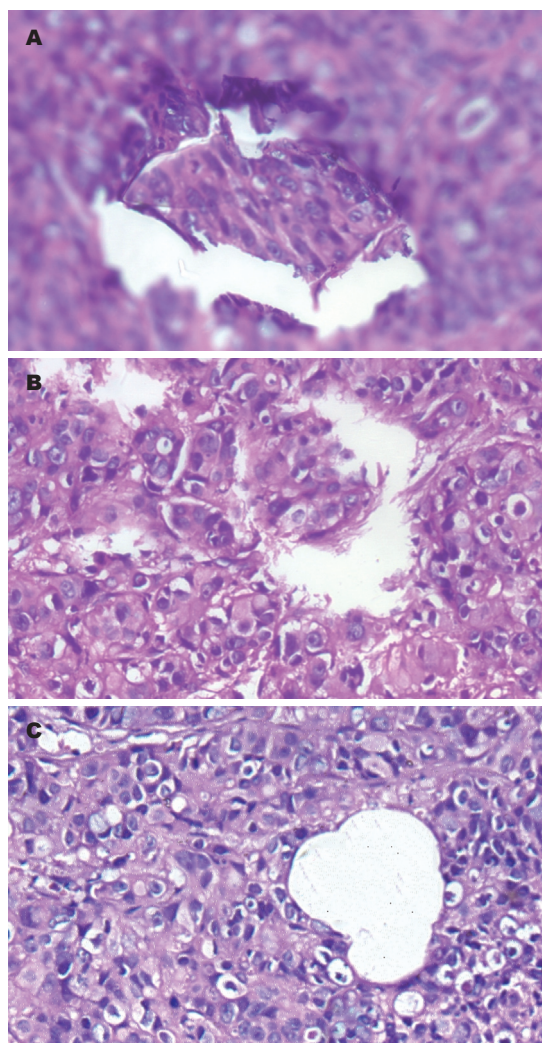


图 7 3组裸鼠种植瘤癌栓组织病理图(H&E $\times 200$). A: HT-29组; B: pcDNA3.1(+)/HT-29组; C: pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组.

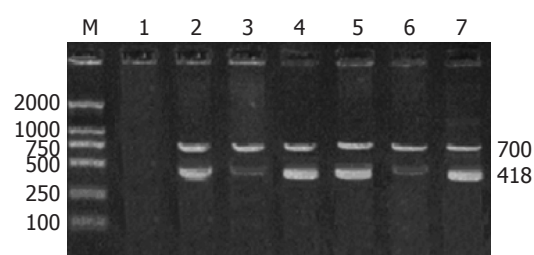


图 6 VEGF表达的RT-PCR鉴定结果. M: DL-2000; 1: H_2O 阴性对照; 2: 未转染的HT-29细胞; 3: pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29细胞; 4: pcDNA3.1(+)/HT-29细胞; 5: 未转染的HT-29种植瘤; 6: pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29种植瘤; 7: pcDNA3.1(+)/HT-29种植瘤.

及PcDNA3.1(+)/HT-29组裸鼠肺脏表面发现有灰白色结节, 而PcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组裸鼠肺脏表面未发现. 经HE染色切片证实HT-29组及PcDNA3.1(+)/HT-29组裸鼠肺脏表面灰白色结节为低分化结肠腺癌, PcDNA3.1(+)/NGX6/

应用要点
本研究证明NGX6基因对于结肠癌是个抑瘤基因, 对更进一步证明结肠癌发病机制、对结肠癌的治疗以及预后都有积极的作用.

HT-29组裸鼠肺脏HE染色经连续切片未发现转移灶(图8). 3组裸鼠肝、脾、肾及脑均未见有结肠癌转移灶.

3 讨论

生物信息学分析显示, NGX6基因cDNA预测编码蛋白含有2个跨膜结构域(第234-256位氨基酸, 269-291), 胞外区含有1个EGF样结构域(185-221)和3个糖基化位点(92-95, 100-103, 172-175), 胞内区较短, 含有一个酪氨酸激酶磷酸化位点(257-265), 其EGF样结构域应该是其发挥生物学功能的结构基础^[6]. 我们的前期工作已经证实NGX6基因在结肠癌, 尤其是有远处转移的结肠癌中表达明显下降甚至缺失^[7], 而在结肠癌转移过程中, 经血行转移是结肠癌转移最为重要的途径. 实验研究表明EGF样结构域与肿瘤血管的生成有着密切的关系^[8-9]. Li *et al*研究发现

同行评价

本文研究了NGX6对结肠癌血管形成的抑制作用,进一步阐明NGX6的抑制肿瘤的机制。文章设计合理,层次分明,有很好的科学性和实用性。

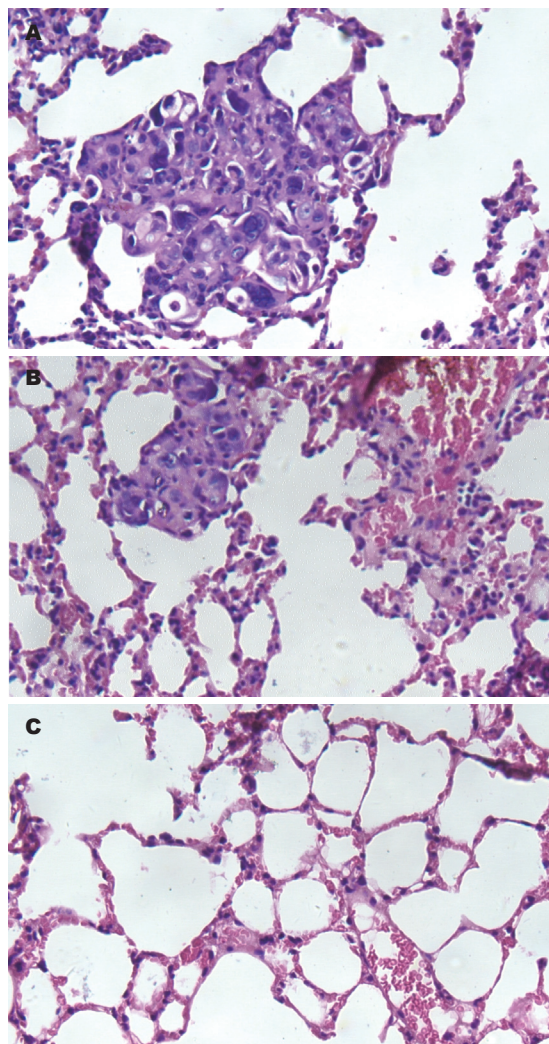


图 8 3组裸鼠肺脏转移灶病理图(HE $\times 200$). A: HT-29组; B: pcDNA3.1(+)/HT-29组; C: pcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组.

Urokinase氨基端片段通过其EGF样结构域能抑制肿瘤血管生成从而抑制肿瘤生长,并且抑制肿瘤转移^[10]. Laminin是位于基底膜上的糖蛋白, Laminin的B1亚单位是Laminin与胶原和细胞受体结合的部位, B1包含了几个EGF样结构域,具体的结合部位正处于EGF样结构域中,如果失去该段结合部位, Laminin介导的细胞黏附、迁移和受体结合就无法进行^[11]. Laminin对细胞的运动、生长及分化起调节作用,而且与肿瘤的浸润转移有关^[12]. Nakano *et al*的研究表明具有EGF样结构域的NTAK/Neuregulin-2具有抗血管生成的作用^[13]. 近年来更有实验研究表明一些含EGF样结构域的蛋白正是通过EGF样结构域影响肿瘤血管生成从而抑制肿瘤并且抑制肿瘤转移的^[14]. NGX6基因亦有可能依靠其EGF样结构域在影响肿瘤血管生成方面发挥了作用. 本实验利用已建立的稳定转染NGX6的HT-29细胞系进行研

究^[4], RT-PCR检测证实NGX6基因稳定表达.

鸡胚绒毛尿囊膜实验表明, 转染NGX6基因的HT-29结肠癌细胞组较未转染HT-29结肠癌细胞组以及转染空白载体结肠癌细胞血管数目减少, 血管密度明显降低, 证明NGX6基因确实能抑制肿瘤血管的生成. 为进一步研究NGX6基因抑制肿瘤血管在体内所产生的效应, 我们建立了HT-29结肠癌细胞裸鼠腋前皮下种植瘤模型. 结果NGX6基因组种植瘤与另两相比较, 生长明显减慢, 种植瘤质量比较具有显著差异; 到第60天处理裸鼠时, HT-29组与PcDNA3.1(+)/HT-29组裸鼠与PcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组裸鼠比较消瘦明显, 有统计学意义. 移植瘤HE染色病理切片显示3组均为低分化腺癌, 无组间差异. HT-29及pcDNA3.1(+)/HT-29组移植瘤中第30天时即可见镜下血管形成但血管内未见癌栓, 而转染了NGX6基因的PcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组种植瘤中很少见有血管形成, 免疫组织化学结果显示转染了NGX6基因的PcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组微血管密度明显降低. Lee *et al*应用2'-hydroxy-4'-methoxychalcone抑制了血管生长从而起到抗肿瘤的作用^[15]. Yano *et al*的研究发现糖皮质激素抑制前列腺癌的生长可能是通过下调VEGF与IL-8的表达抑制血管生成而实现的^[16]. Zou *et al*研究通过下调VEGF的表达能抑制裸鼠结肠癌种植瘤的生长及血管的形成^[17]. Khromova *et al*研究发现突变的p53能促进肿瘤血管形成是通过ROS上调HIF1/VEGF-A途径实现的^[18].

正常情况下, 血管的生长和抑制在体内受到严密的调控而处于平衡状态, 机体在荷瘤状态下表现为血管生长的失控性, 依赖于血管形成因子和血管形成抑制因子的调节失衡, NGX6基因抑制血管生成对结肠癌生长的影响也应该建立在血管形成因子和血管形成抑制因子的调节的基础上. 为进一步探讨NGX6基因抑制血管生成的原因, 我们应用RT-PCR检测了HT-29细胞中以及HT-29细胞裸鼠种植瘤中VEGF的表达水平, 结果无论是在HT-29细胞中还是在HT-29细胞裸鼠种植瘤中, 转染了NGX6基因HT-29组较未转染组和转染空白载体组VEGF的表达水平明显降低, 表明pcDNA3.1(+)/HT-29细胞和未转染的HT-29细胞种植瘤中VEGF呈高表达, NGX6基因抑制血管生成的作用可能是因为引起VEGF的低表达来实现的. Boquoi *et al*研究发现VEGF的过表达能促进结肠肿瘤的生成、肿瘤内血管的

形成以及结肠肿瘤生长^[19]. Imamura *et al*的研究结果表明结肠肿瘤的血管生成与VEGF及HIF1密切相关^[20]. Terris *et al*对结肠癌的研究发现, VEGF在浸润性结肠癌组织中表达明显升高, 微血管密度也明显升高^[21]. Kimura *et al*的研究表明通过抑制VEGF介导的血管生成能起到抑制结肠癌肿瘤生长的结果^[22-23]. Fernando *et al*的研究发现内源性血管因子能引起肿瘤中VEGF及(PDGF)-A的上调, 从而使肿瘤摆脱内源性血管因子对血管生成的抑制^[24].

到第60天处理的种植瘤切片HE染色显示在HT-29组及PcDNA3.1(+)/HT-29组种植瘤血管内都有癌栓, 且血管壁不完整, 有些血管内癌栓可见为种植瘤的一部分, 肿瘤细胞根本不需要穿过内皮细胞即可进到血管内. 在PcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组种植瘤内血管壁相对比较完整, 未见1只有血管内癌栓形成. 进一步切取裸鼠肝、脾、肺、肾及脑等器官, 在处理的裸鼠的过程中发现, HT-29组及PcDNA3.1(+)/HT-29组裸鼠肺脏表面似乎有灰白色小结节, PcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组裸鼠肺脏表面未发现, HE染色切片证实肺脏表面灰白色结节为低分化结肠腺癌, HT-29组及PcDNA3.1(+)/HT-29组裸鼠每1只都有肺部结肠癌转移灶, 而PcDNA3.1(+)/NGX6/HT-29组裸鼠肺部组织经连续切片未发现1只有肺部结肠癌转移灶. 实验结果表明NGX6基因有改善结肠癌种植瘤内新生血管结构的作用, 使种植瘤新生血管更为完整, 这样在瘤细胞要穿透到血管内的过程中, 肿瘤细胞必须通过比较完整的血管壁, 因此增加了肿瘤细胞自原发性肿瘤瘤体脱离后, 浸透血管壁进到血管内这最重要一步的难度. 而没有转染NGX6基因的HT-29及PcDNA3.1(+)/HT-29细胞种植瘤新生血管结构没有得到改善, 血管壁很不完整, 因而肿瘤细胞很容易便从原发性浸透血管壁进到血管内. Xu *et al*研究证实PIGF通过抑制血管的生成最终抑制了肺癌的转移^[25]. Bouquet *et al*也报道了通过腺病毒转染AGT后抑制了肿瘤血管生成同时抑制肿瘤的生长和转移^[26]. Parker *et al*研究发现, 一个名为EGFL7(EGF-like domain 7)的分泌因子, 在脊椎动物胚胎的脉管发育过程中参与管状结构的形成, EGFL7似乎参与协调内皮细胞的细胞间相互作用和局部迁移, 以确保主要血管的正确组装, 在维持新生血管结构完整方面起重要的作用^[27]. Gouyer *et al*发现用抗体对抗胰蛋白酶抑制蛋白TATI能抑制结肠肿瘤的

生长, 肿瘤的血管生成, 并能抑制肿瘤的转移^[28]. Jie *et al*研究发现通过抗体抑制HGF能通过抑制结肠癌血管生成及诱导肿瘤凋亡抑制肿瘤的生长, 还能抑制结肠癌的转移^[29]. Kim *et al*研究发现通过阻止STAT3及VEGF能抑制结肠癌的血管形成与肿瘤转移^[30].

总之, 抑瘤基因NGX6抑制了结肠癌的血管生成, 并通过抑制血管形成以及影响新生血管的结构抑制了肿瘤的生长并抑制了肿瘤的转移. 在抑制血管生成方面其功能的实现应该是通过其EGF样结构域来完成的; 抑瘤基因NGX6下调了HT-29细胞中以及HT-29细胞裸鼠种植瘤中VEGF的表达, 这应该是其抑制血管形成的部分机制, 其他影响因素还需要进一步实验来发现. 我们正通过更多的实验来研究抑瘤基因通过抑制血管生成对结肠癌转移中的作用并阐明其机制.

4 参考文献

- 1 阳剑波, 唐湘娜, 邓龙文, 谭国林, 周鸣, 曾朝阳, 曹莉, 李桂源. 鼻咽癌染色体9p21-22区域精细缺失图谱的构建. 中华肿瘤杂志 1999; 21: 419-421
- 2 阳剑波, 宾亮华, 李忠花, 张小慧, 钱骏, 张必成, 周鸣, 谢奕, 邓龙文, 李桂源. 精细定位和克隆9p21-22区域内鼻咽癌候选抑瘤基因. 癌症 2000; 19: 6-9
- 3 李江, 黄宇琛, 张秋红, 谭琛, 李小玲, 李桂源. 鼻咽癌相关基因NGX6对鼻咽癌细胞周期的影响. 生命科学研究 2002; 6: 300-304
- 4 王晓艳, 沈守荣, 刘华英, 张晓梅, 彭聪, 黄河, 刘芬, 李晓玲, 李桂源. 抑瘤基因NGX6对人结肠癌细胞HT-29生长的影响. 世界华人消化杂志 2004; 12: 574-579
- 5 Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 36: 169-180
- 6 Falls DL. Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res* 2003; 284: 14-30
- 7 张晓梅, 沈守荣, 王晓艳, 王洁如, 李江. 胃癌和大肠癌中肿瘤相关基因NGX6的表达. 世界华人消化杂志 2002; 10: 873-876
- 8 Wang T, Ward Y, Tian L, Lake R, Guedez L, Stetler-Stevenson WG, Kelly K. CD97, an adhesion receptor on inflammatory cells, stimulates angiogenesis through binding integrin counterreceptors on endothelial cells. *Blood* 2005; 105: 2836-2844
- 9 Fiedler U, Krissl T, Koidl S, Weiss C, Kobizek T, Deutsch U, Martiny-Baron G, Marmé D, Augustin HG. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 share the same binding domains in the Tie-2 receptor involving the first Ig-like loop and the epidermal growth factor-like repeats. *J Biol Chem* 2003; 278: 1721-1727
- 10 Li H, Soria C, Griscelli F, Opolon P, Soria J, Yeh P, Legrand C, Vannier JP, Belin D, Perricaudet M, Lu H. Amino-terminal fragment of urokinase inhibits tumor cell invasion in vitro and in vivo: respective contribution of the urokinase plasminogen activator receptor-dependent or -independent pathway. *Hum Gene Ther* 2005; 16: 1157-1167
- 11 Schenk S, Hintermann E, Bilban M, Koshikawa N, Hojilla C, Khokha R, Quaranta V. Binding to

- EGF receptor of a laminin-5 EGF-like fragment liberated during MMP-dependent mammary gland involution. *J Cell Biol* 2003; 161: 197-209
- 12 Yoon SY, Lee YJ, Seo JH, Sung HJ, Park KH, Choi IK, Kim SJ, Oh SC, Choi CW, Kim BS, Shin SW, Kim YH, Kim JS. uPAR expression under hypoxic conditions depends on iNOS modulated ERK phosphorylation in the MDA-MB-231 breast carcinoma cell line. *Cell Res* 2006; 16: 75-81
- 13 Nakano N, Higashiyama S, Ohmoto H, Ishiguro H, Taniguchi N, Wada Y. The N-terminal region of NTAK/neuregulin-2 isoforms has an inhibitory activity on angiogenesis. *J Biol Chem* 2004; 279: 11465-11470
- 14 Chlenski A, Liu S, Baker LJ, Yang Q, Tian Y, Salwen HR, Cohn SL. Neuroblastoma angiogenesis is inhibited with a folded synthetic molecule corresponding to the epidermal growth factor-like module of the follistatin domain of SPARC. *Cancer Res* 2004; 64: 7420-7425
- 15 Lee YS, Lim SS, Shin KH, Kim YS, Ohuchi K, Jung SH. Anti-angiogenic and anti-tumor activities of 2'-hydroxy-4'-methoxychalcone. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 1028-1031
- 16 Yano A, Fujii Y, Iwai A, Kageyama Y, Kihara K. Glucocorticoids suppress tumor angiogenesis and in vivo growth of prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 3003-3009
- 17 Zou X, Qiao H, Jiang X, Dong X, Jiang H, Sun X. Downregulation of developmentally regulated endothelial cell locus-1 inhibits the growth of colon cancer. *J Biomed Sci* 2008 Dec 25. [Epub ahead of print]
- 18 Khromova NV, Kopnin PB, Stepanova EV, Agapova LS, Kopnin BP. p53 hot-spot mutants increase tumor vascularization via ROS-mediated activation of the HIF1/VEGF-A pathway. *Cancer Lett* 2009; 276: 143-151
- 19 Boquoi A, Jover R, Chen T, Pennings M, Enders GH. Transgenic expression of VEGF in intestinal epithelium drives mesenchymal cell interactions and epithelial neoplasia. *Gastroenterology* 2009; 136: 596-606.e4
- 20 Imamura T, Kikuchi H, Herraiz MT, Park DY, Mizukami Y, Mino-Kenduson M, Lynch MP, Rueda BR, Benita Y, Xavier RJ, Chung DC. HIF-1alpha and HIF-2alpha have divergent roles in colon cancer. *Int J Cancer* 2009; 124: 763-771
- 21 Terris B, Scoazec JY, Rubbia L, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in digestive neuroendocrine tumours. *Histopathology* 1998; 32: 133-138
- 22 Kimura Y, Sumiyoshi M, Baba K. Antitumor activities of synthetic and natural stilbenes through antiangiogenic action. *Cancer Sci* 2008; 99: 2083-2096
- 23 Kimura Y, Sumiyoshi M, Taniguchi M, Baba K. Antitumor and antimetastatic actions of anthrone-C-glucoside, cassialoin isolated from *Cassia garrettiana* heartwood in colon 26-bearing mice. *Cancer Sci* 2008; 99: 2336-2348
- 24 Fernando NT, Koch M, Rothrock C, Gollogly LK, D'Amore PA, Ryeom S, Yoon SS. Tumor escape from endogenous, extracellular matrix-associated angiogenesis inhibitors by up-regulation of multiple proangiogenic factors. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 1529-1539
- 25 Xu L, Cochran DM, Tong RT, Winkler F, Kashiwagi S, Jain RK, Fukumura D. Placenta growth factor overexpression inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis by depleting vascular endothelial growth factor homodimers in orthotopic mouse models. *Cancer Res* 2006; 66: 3971-3977
- 26 Bouquet C, Lamandé N, Brand M, Gasc JM, Jullienne B, Faure G, Griscelli F, Opolon P, Connault E, Perricaudet M, Corvol P. Suppression of angiogenesis, tumor growth, and metastasis by adenovirus-mediated gene transfer of human angiotensinogen. *Mol Ther* 2006; 14: 175-182
- 27 Parker LH, Schmidt M, Jin SW, Gray AM, Beis D, Pham T, Frantz G, Palmieri S, Hillan K, Stainier DY, De Sauvage FJ, Ye W. The endothelial-cell-derived secreted factor Eglf7 regulates vascular tube formation. *Nature* 2004; 428: 754-758
- 28 Gouyer V, Fontaine D, Dumont P, de Wever O, Fontayne-Devaud H, Leteurtre E, Truant S, Delacour D, Drobecq H, Kerckaert JP, de Launoit Y, Bracke M, Gespach C, Desseyn JL, Huet G. Autocrine induction of invasion and metastasis by tumor-associated trypsin inhibitor in human colon cancer cells. *Oncogene* 2008; 27: 4024-4033
- 29 Jie JZ, Wang JW, Qu JG, Hung T. Suppression of human colon tumor growth by adenoviral vector-mediated NK4 expression in an athymic mouse model. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1938-1946
- 30 Kim ES, Hong SY, Lee HK, Kim SW, An MJ, Kim TI, Lee KR, Kim WH, Cheon JH. Guggulsterone inhibits angiogenesis by blocking STAT3 and VEGF expression in colon cancer cells. *Oncol Rep* 2008; 20: 1321-1327

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. (科学编辑: 李军亮 2009-09-08)

克氏螯虾壳聚糖抗菌的作用靶位

郑铁生, 朱旭明, 张燕玲

郑铁生, 江苏大学基础医学与医学技术学院 江苏省镇江市 212013

朱旭明, 南京医科大学附属无锡市人民医院检验科 江苏省无锡市 214023

张燕玲, 天津医科大学检验系 天津市 300070

郑铁生, 教授, 硕士生导师, 主要从事生物制品及其临床应用方面的研究。

高校基金资助项目, No. 2291270004

作者贡献分布: 此课题由郑铁生设计; 研究过程由朱旭明与张燕玲操作完成; 研究所用新试剂由张燕玲提供; 数据分析由朱旭明完成; 本论文写作由郑铁生与朱旭明完成。

通讯作者: 郑铁生, 教授, 江苏省镇江市学府路301号, 江苏大学基础医学与医学技术学院。jsdxzts@163.com

电话: 0511-88887776

收稿日期: 2009-03-21 修回日期: 2009-07-20

接受日期: 2009-08-03 在线出版日期: 2009-09-08

Target site for the antibacterial action of chitosan from red swamp crayfish

Tie-Sheng Zheng, Xu-Ming Zhu, Yan-Ling Zhang

Tie-Sheng Zheng, School of Medical Science and Laboratory Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu Province, China

Xu-Ming Zhu, Clinical Laboratory, Wuxi People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi 214023, Jiangsu Province, China

Yan-Ling Zhang, Department of Medical Laboratory Science, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Supported by: the Natural Science Foundation for Colleges and Universities in Jiangsu Province, No. 2291270004

Correspondence to: Professor Tie-Sheng Zheng, School of Medical Science and Laboratory Medicine, Jiangsu University, 301 Xuefu Road, Zhenjiang 212013, Jiangsu Province, China. jsdxzts@163.com

Received: 2009-03-21 Revised: 2009-07-20

Accepted: 2009-08-03 Published online: 2009-09-08

Abstract

AIM: To investigate the potential target site for the antibacterial action of chitosan from red swamp crayfish and explore its antibacterial mechanism.

METHODS: Chitosan from red swamp crayfish was labeled with 5(6)-carboxy-tetramethylrhodamine-5-maleimide. The labeled chitosan was then incubated with *Escherichia coli* (*E.coli*) and *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*), respectively. The total protein (TP) and nucleic acid contents in cell-free supernatants of chitosan-treated *E.coli*

and *S.aureus* were determined. Laser scanning confocal microscopy (LSCM) was used to observe the distribution of fluorescently labeled chitosan in bacteria.

RESULTS: Chitosan treatment significantly increased the nucleic acid and TP contents in cell-free supernatants of *E.coli* (1.13 ± 0.06 vs 0.00 and 1.49 ± 0.05 vs 0.22 ± 0.01 , respectively; both $P < 0.01$) and *S.aureus* (1.00 ± 0.10 vs 0.03 ± 0.06 and 0.81 ± 0.01 vs 0.21 ± 0.02 , respectively; both $P < 0.01$) in a concentration-dependent manner. LSCM showed that the fluorescent signal in the bacterial cytoplasm was stronger than that in the bacterial membrane.

CONCLUSION: Bacterial cytoplasm is the main target site for the antibacterial action of chitosan from red swamp crayfish.

Key Words: Chitosan from red swamp crayfish; Antibiosis; Nucleic acid; Protein; Laser scanning confocal microscopy; Target site

Zheng TS, Zhu XM, Zhang YL. Target site for the antibacterial action of chitosan from red swamp crayfish. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(25): 2585-2588

摘要

目的: 研究克氏螯虾壳聚糖抗菌的作用靶位, 探讨其抗菌机制。

方法: 用5(6)-羧-四甲基罗丹明-5-马来酰亚胺标记克氏螯虾壳聚糖, 应用标记克氏螯虾壳聚糖与大肠埃希菌及金黄色葡萄球菌在pH5.6, 37℃条件下220 r/min作用3.5 h, 观察作用前后上清液中的核酸和蛋白质含量变化, 并用激光共聚焦显微镜观察其对细菌的聚集部位。

结果: 荧光标记克氏螯虾壳聚糖对大肠埃希菌作用前后的上清液中, 核酸和蛋白质的含量由作用前的0.00和 0.22 ± 0.01 升高为 1.13 ± 0.06 和 1.49 ± 0.05 ($P < 0.01$); 对金黄色葡萄球菌作用前后的上清液中, 核酸和蛋白质的含量由作用前的 0.03 ± 0.06 和 0.21 ± 0.02 升高为 1.00 ± 0.10 和 0.81 ± 0.01 ($P < 0.01$); 并且荧光标记克

背景资料

克氏螯虾壳聚糖是本课题组从克氏螯虾外壳中提取制备的一种碱性氨基多糖, 经实验对*E.coli*、*S.aureus*及*H.pylori*等具有较强的天然抗菌活性, 但其抗菌作用的机制, 未见报道。

同行评议者

曹志成, 英国生物医学科学研究所院士, 伊利沙伯医院临床肿瘤科

创新盘点

本研究发现用荧光标记克氏螯虾壳聚糖与菌作用后,菌体由表及里其荧光强度逐渐增强;并随荧光标记克氏螯虾壳聚糖浓度增高,核酸及蛋白质的泄漏量也逐渐增高,且其作用时间越长,核酸泄漏量越多。究其抗菌作用的靶位可能是细胞膜和细胞核、线粒体这样的细胞器。

氏螯虾壳聚糖浓度越高,核酸及蛋白质含量也逐渐增高;激光共聚焦显微镜下显示两种实验细菌由表及里的荧光强度逐渐增强。

结论:克氏螯虾壳聚糖的抗菌作用靶位,除部分作用于细菌细胞膜外,主要是进入细菌内作用于细胞器。

关键词:克氏螯虾壳聚糖;抗菌;核酸;蛋白质;激光共聚焦显微镜;作用靶位

郑铁生,朱旭明,张燕玲.克氏螯虾壳聚糖抗菌的作用靶位.世界华人消化杂志 2009; 17(25): 2585-2588

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2585.asp>

0 引言

克氏螯虾壳聚糖(chitosan from redswamp crayfish)是从克氏螯虾的外壳中提取、制备的一种碱性氨基多糖^[1],具有降血脂^[2]和调节血糖及糖耐量的作用^[3]。体外抗菌研究发现,克氏螯虾壳聚糖对幽门螺杆菌和皮肤浅表真菌均具有较强的杀抑作用,临床应用前景较好^[4-5],但其抗菌的作用机制尚未见报道。本研究采用荧光标记克氏螯虾壳聚糖与实验菌作用后,测定其上清液中核酸和蛋白质的含量,并用激光共聚焦显微镜观察荧光标记克氏螯虾壳聚糖在细菌中的聚集靶位,以探讨克氏螯虾壳聚糖抗菌的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 克氏螯虾壳聚糖由按文献[1]方法从克氏螯虾的外壳中提取制备,脱乙酰度为90%、平均相对分子质量 5.5×10^5 Da。大肠埃希菌(ATCC25922)及金黄色葡萄球菌(ATCC25923)质控菌株,由江苏大学附属人民医院提供。液体培养基中的蛋白胨、酵母提取物等成分,购于Oxoid公司;荧光试剂5(6)-羧-四甲基罗丹明-5-马来酰亚胺[5(6)-TAMRA-5-maleimide],来自Biotium公司;蛋白质检测试剂(双缩脲比色法),由上海科华公司提供;其余试剂均为分析纯级别。Biophotometer核酸紫外监测仪(德国Eppendoff公司),AU2700全自动生化分析仪(日本Olympus公司),LSM510激光共聚焦显微镜(德国Zeiss公司),Centrifuge 54172超速离心机(德国Eppendoff公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验样品制备:取10 000 mg/L克氏螯虾壳聚糖溶液与游离荧光试剂5(6)-羧-四甲基罗丹

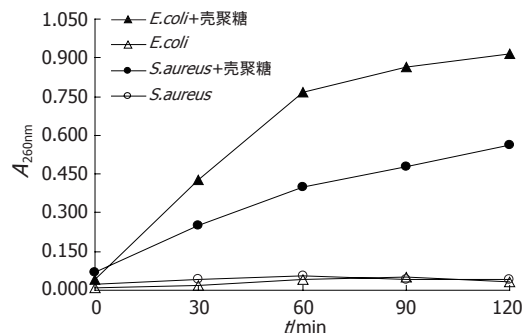


图1 大肠埃希菌或金黄色葡萄球菌与2.5 g/L克氏螯虾壳聚糖或167 mmol/L醋酸作用后菌内泄漏物的260 nm吸光度值。

明-5-马来酰亚胺9:1(V/V)进行混合,4℃过夜,然后加1 mol/L氢氧化钠,析出沉淀,冲洗,将洗净的沉淀烘干,得荧光标记克氏螯虾壳聚糖。取一定量上述荧光标记克氏螯虾壳聚糖溶于167 mmol/L醋酸,得10 000 mg/L荧光标记克氏螯虾壳聚糖溶液,再用二倍稀释法制成2500、625 mg/L的溶液,并用1 mol/L氢氧化钠将各浓度荧光标记克氏螯虾壳聚糖溶液及游离荧光对照的pH调节到5.8。

1.2.2 核酸蛋白质测定:将大肠埃希菌(*E. coli*)及金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)实验菌分别在液体培养基中培养至对数期,离心收集,用生理盐水洗2次后制成菌体浓度为 10^8 - 10^9 CFU/mL的菌悬液,各取0.8 mL菌液与0.2 mL不同浓度的荧光标记克氏螯虾壳聚糖溶液或游离荧光对照混合,荧光标记壳聚糖的终浓度分别为2000、500、125 mg/L,整个体系的pH为5.6,其后37℃条件下220 r/min作用3.5 h,10 000 g离心5 min,吸取上清液,用核酸紫外监测仪(A_{260nm})测核酸含量、全自动生化分析仪测蛋白质含量。每组实验均重复3次,取平均值。

1.2.3 激光共聚焦显微镜观察:将浓度为 10^7 - 10^8 CFU/mL的2种实验菌分别与荧光标记克氏螯虾壳聚糖实验组及游离荧光对照组1:1(V/V)混合,220 r/min摇8 h,其后5000 g离心10 min,收集沉淀,再清洗3次,最后取沉淀在激光共聚焦显微镜下以488 nm为激发波长,进行断层扫描。

2 结果

2.1 核酸蛋白质检测 细菌上清液中出现菌内容物,说明细菌细胞膜的屏障功能遭到破坏。与克氏螯虾壳聚糖作用3.5 h后,*E. coli*及*S. aureus*上清液中各种物质含量如表1所示。结果表明,pH5.6条件下,相比167 mmol/L醋酸对照,克氏螯虾壳聚糖可以使AST、TP及核酸这样的菌内物质发生泄漏

表 1 不同浓度克氏螯虾壳聚糖引起实验菌物质泄漏的测定结果

	<i>E.coli</i>			<i>S.aureus</i>		
	AST(U/L)	TP(g/L)	<i>A</i> _{260nm}	AST(U/L)	TP(g/L)	<i>A</i> _{260nm}
壳聚糖(mg/L)						
2000	8.33 ± 0.58 ^b	1.13 ± 0.06 ^b	1.49 ± 0.05 ^b	4.33 ± 0.58 ^b	1.00 ± 0.10 ^b	0.81 ± 0.01 ^b
500	3.33 ± 0.58 ^b	0.43 ± 0.06 ^a	1.13 ± 0.02 ^a	2.33 ± 0.58 ^b	0.37 ± 0.06 ^a	0.64 ± 0.03 ^b
125	2.33 ± 0.58 ^a	0.13 ± 0.06 ^a	0.71 ± 0.01 ^a	0.67 ± 0.58	0.17 ± 0.05	0.51 ± 0.01 ^a
对照组	0.67 ± 0.58	0.00	0.22 ± 0.01	0.33 ± 0.57	0.03 ± 0.06	0.21 ± 0.02
<i>F</i> 值	98.00	307.00	1017.60	30.25	107.94	526.68
<i>P</i> 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 对照组.

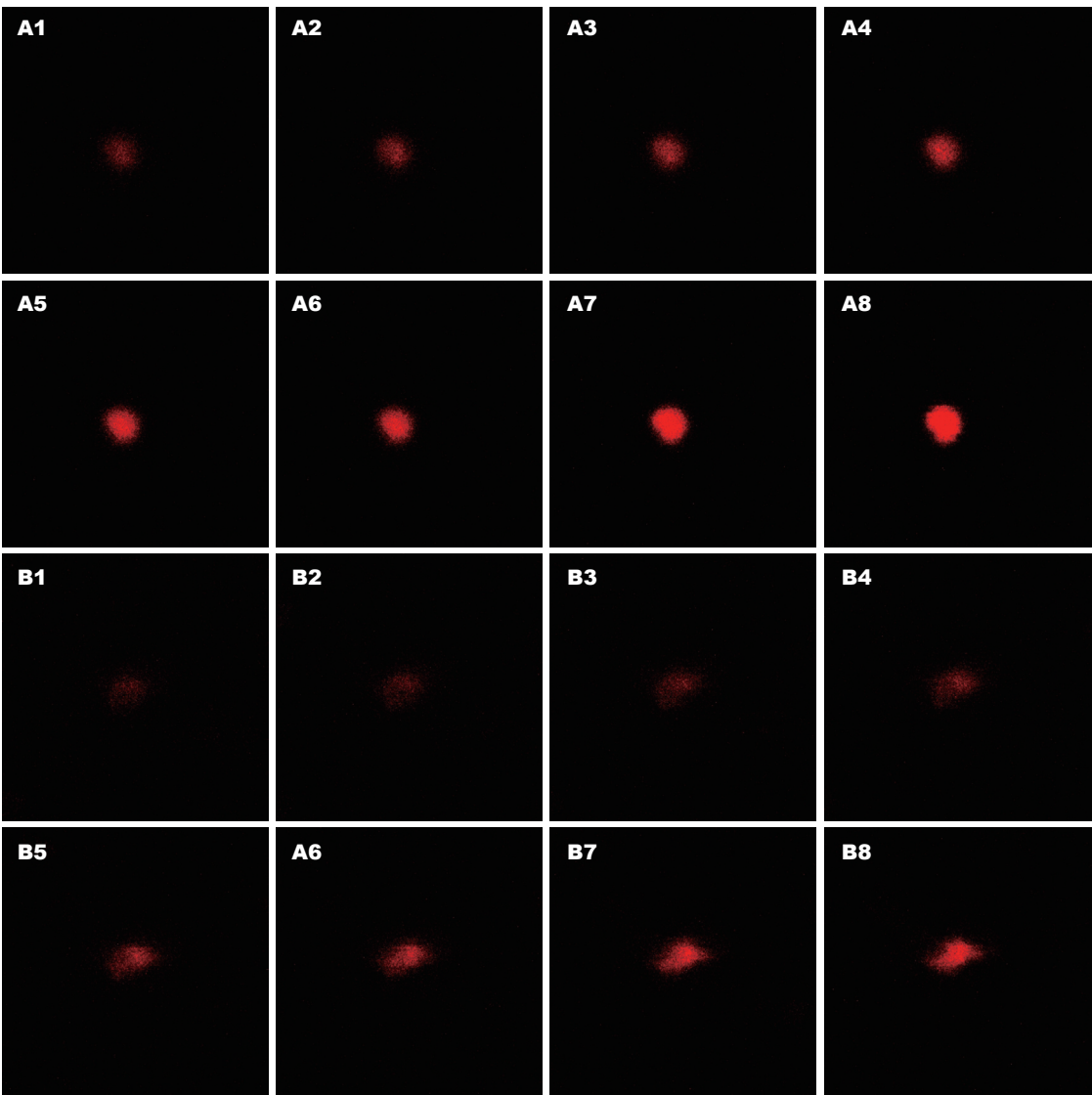


图 2 荧光标记壳聚糖作用实验菌8 h后的激光共聚焦图(× 5000). A: 大肠埃希菌; B: 金黄色葡萄球菌. 1-8依次为菌体由表及里的剖面图.

(*P*<0.05); 并且克氏螯虾壳聚糖浓度越高, 细菌上清液中AST活性及TP及核酸含量也逐渐增高(图1).

2.2 激光共聚焦显微镜观察结果 荧光标记克氏螯虾壳聚糖实验组和游离荧光对照组分别与2

www.wjgnet.com

种实验菌作用8 h后, 对照组在激光共聚焦显微镜下无荧光; 实验组其2种实验菌由表及里的荧光强度逐渐增强, 可见荧光标记克氏螯虾壳聚糖已进入活细胞内(图2).

应用要点
克氏螯虾壳聚糖对*E.coli*、*S.aureus*及*H.pylori*等具有较强的天然抗菌活性, 弄清其作用机制, 可为临床研发应用提供依据.

同行评价
本研究选题尚可,
设计合理,结果可
靠,实用性较强.

3 讨论

克氏螯虾为地产盱眙龙虾,学名克氏原螯虾.由于人为传播和他自身繁殖,目前,已遍布长江中下游南北的每个角落,并成为我国自然水体的一个种群,资源十分丰富.我们从克氏螯虾的外壳提取纯化的一种天然碱性氨基多糖, pK_a 为6.3,单体结构为1, 4-2-氨基-2-脱氧- β -D葡萄糖^[1],对 *H pylori*和皮肤浅表真菌均具较强的杀抑作用,临床应用前景较好^[4-5],但其抗菌的作用机制尚未见报道.本研究采用荧光标记克氏螯虾壳聚糖与大肠埃希菌及金黄色葡萄球菌作用后,从检测生化物质的改变和跟踪荧光标记克氏螯虾壳聚糖的聚集部位来观察克氏螯虾壳聚糖对细菌表面结构和菌体内部的作用特性,以探讨其抗菌机制.

荧光试剂5(6)-羧-四甲基罗丹明-5-马来酰亚胺是罗丹明类标准荧光素的衍生物,具有很强的光稳定性及荧光产量, pH敏感性低,其活性基团可以通过与对方大分子结构上的氨基结合形成荧光标志物^[6].激光共聚焦显微镜利用激光作为光源,在传统光学显微镜基础上采用共轭聚焦的原理和装置,与传统光学显微镜相比,具有更高的分辨率,能实现多重荧光的同时观察,并可形成清晰的三维图像.激光共聚焦显微镜对生物样品进行观察时,能实现无损伤的断层扫描和成像^[7],是图像分析的有效工具.克氏螯虾壳聚糖分子上存在有游离氨基^[1],能够和5(6)-羧-四甲基罗丹明-5-马来酰亚胺结合形成克氏螯虾壳聚糖荧光标记物^[8].可作为一种荧光探针,用于克氏螯虾壳聚糖抗菌作用靶位的研究.

本研究用荧光标记克氏螯虾壳聚糖与大肠埃希菌及金黄色葡萄球菌作用3.5 h后,测定作用前后上清液中的核酸及蛋白质含量,发现荧光标记克氏螯虾壳聚糖对大肠埃希菌作用前后的上清液中,核酸和蛋白质的含量由作用前的0.00和 0.22 ± 0.01 升高为 1.13 ± 0.06 和 1.49 ± 0.05 , ($P < 0.01$);对金黄色葡萄球菌作用前后的上清液中,核酸和蛋白质的含量由作用前的 0.03 ± 0.06 和 0.21 ± 0.02 升高为 1.00 ± 0.10 和 0.81 ± 0.01 , ($P < 0.01$);并且随着荧光标记克氏螯虾壳聚糖浓度增高,核酸及蛋白质含量也逐渐增高;另外,其作用时间越长,上清液中核酸含量越高.说明克氏螯虾壳聚糖具有破坏细菌细胞膜屏障功能的效应.原因可能与克氏螯虾壳聚糖所带的氨基有关.由于克氏螯虾壳聚糖的等电点高达6.3,在微酸性条件下其氨基带正电荷,可以结合细

菌表面(细胞壁、细胞膜)带负电荷的蛋白质及磷脂等重要大分子,破坏细菌表面结构,保护胞内物质的屏障功能丧失,导致菌内物质大量漏出.对其他来源壳聚糖的抗菌机制研究,也有类似的报道^[9-11].用荧光标记克氏螯虾壳聚糖与两种实验菌作用8 h后,在激光共聚焦显微镜下观察发现,菌体由表及里其荧光强度逐渐增强,可见荧光标记克氏螯虾壳聚糖已进入活细胞内.

由此可见,克氏螯虾壳聚糖的抗菌作用靶位,除作用于细菌的细胞膜外,还能进入细菌内,作用于细胞核、线粒体这样的细胞器.其作用机制可能是:(1)在酸性条件下,克氏螯虾壳聚糖分子中的质子化铵- NH^+ 具有正电性,吸附带有负电荷的细菌,使细菌细胞壁和细胞膜上的负电荷分布不均,干扰细胞壁的合成,使细胞壁趋向于溶解,细胞膜因不能承受渗透压而变形破裂,细胞的内容物如水、蛋白质等渗出,发生细菌溶解而死亡.(2)克氏螯虾壳聚糖吸附细菌后,穿过细菌的多孔细胞壁进入到细胞内,作用于DNA,导致核酸、蛋白质外泄,影响细菌的核酸代谢和蛋白质代谢,从而抑制了细菌的生长繁殖.

4 参考文献

- 1 郑铁生, 辛淮生, 卞爱民, 王亚娜, 宗爱萍. 地产龙虾壳甲壳素的提取和壳聚糖的制备. 时珍国医国药 2005; 16: 1208-1209
- 2 郑铁生, 王亚娜, 宗爱萍. 壳聚糖对实验大鼠降血脂作用的初步研究. 现代检验医学杂志 2005; 20: 26-27
- 3 郑铁生, 王亚娜, 宗爱萍. 龙虾壳聚糖干预后糖尿病小鼠血糖和糖耐量的变化. 中国临床康复 2006; 10: 67-69
- 4 郑铁生, 王亚娜, 宗爱萍. 壳聚糖体外抗幽门螺杆菌的作用及其影响因素. 世界华人消化杂志 2006; 14: 993-996
- 5 丁恒生, 王亚娜, 宗爱萍, 郑铁生. 龙虾壳聚糖抗皮肤浅表真菌的实验研究. 检验医学与临床 2007; 4: 13-14
- 6 Liu H, Du Y, Wang X, Sun L. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *Int J Food Microbiol* 2004; 95: 147-155
- 7 Neu TR, Woelfl S, Lawrence JR. Three-dimensional differentiation of photo-autotrophic biofilm constituents by multi-channel laser scanning microscopy (single-photon and two-photon excitation). *J Microbiol Methods* 2004; 56: 161-172
- 8 Shapiro HM. Microbial analysis at the single-cell level: tasks and techniques. *J Microbiol Methods* 2000; 42: 3-16
- 9 Chung YC, Chen CY. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresour Technol* 2008; 99: 2806-2814
- 10 Helander IM, Nurmiaho-Lassila EL, Ahvenainen R, Rhoades J, Roller S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria. *Int J Food Microbiol* 2001; 71: 235-244
- 11 Je JY, Kim SK. Chitosan derivatives killed bacteria by disrupting the outer and inner membrane. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 6629-6633

细胞凋亡在结肠腺癌组织中的变化及其相关蛋白的表达

郭文娟, 王爱英, 高 春

郭文娟, 王爱英, 高春, 北京大学第三医院消化科 北京市 100191

郭文娟, 2007年北京大学医学部消化科硕士, 主要从事消化系统肿瘤方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30571810

作者贡献分布: 郭文娟、王爱英及高春对此文所作贡献均等; 此课题由王爱英设计; 研究过程由郭文娟与高春操作完成; 数据分析由郭文娟与高春协作完成; 论文写作主要由郭文娟完成; 王爱英指导课题完成。

通讯作者: 王爱英, 主任医师, 100191, 北京市海淀区花园北路49号, 北京大学第三医院消化科。wangaiy@bjmu.edu.cn

电话: 010-82265533

收稿日期: 2009-04-28 修回日期: 2009-08-20

接受日期: 2009-08-24 在线出版日期: 2009-09-08

Apoptosis and expression of apoptosis-related proteins Bcl-2, Bcl-xL and Bcl-w in human colon adenocarcinoma

Wen-Juan Guo, Ai-Ying Wang, Chun Gao

Wen-Juan Guo, Ai-Ying Wang, Chun Gao, Department of Gastroenterology, the Third Hospital of Peking University, Beijing 100191, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30571810

Correspondence to: Ai-Ying Wang, Department of Gastroenterology, the Third Hospital of Peking University, 49 Huayuan North Road, Haidian District, Beijing 100191, China. wangaiy@bjmu.edu.cn

Received: 2009-04-28 Revised: 2009-08-20

Accepted: 2009-08-24 Published online: 2009-09-08

Abstract

AIM: To examine the occurrence of apoptosis in colon adenocarcinoma and investigate the role of Bcl-2, Bcl-xL and Bcl-w as mediators of apoptosis.

METHODS: Fourteen human colon adenocarcinoma specimens were obtained by surgical resection and pathologically confirmed. Twenty-seven normal colon tissue specimens were obtained by colonoscopic biopsy. Apoptosis was detected using the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) assay. The expression of Bcl-2, Bcl-xL and Bcl-w proteins was measured by immunohistochemistry.

RESULTS: Compared with normal colon tis-

sues, the apoptosis index (AI) in colon adenocarcinoma tissues significantly decreased ($t = 3.35$, $P = 0.002$). The expression levels of Bcl-xL and Bcl-w proteins were significantly higher in colon adenocarcinoma tissues than in normal colon tissues (92.86% vs 11.11% and 85.71% vs 0%, respectively; $P < 0.01$ and 0.05), whereas no significant difference was noted in the expression level of Bcl-2 protein between adenocarcinoma and normal colon tissues ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Apoptosis occurs in normal colon tissue but decreases in colon adenocarcinoma. Both Bcl-xL and Bcl-w proteins, rather than Bcl-2 protein, may play an important role in the suppression of apoptosis in colon adenocarcinoma.

Key Words: Colon adenocarcinoma; Bcl-2; Bcl-xL; Bcl-w; Apoptosis

Guo WJ, Wang AY, Gao C. Apoptosis and expression of apoptosis-related proteins Bcl-2, Bcl-xL and Bcl-w in human colon adenocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(25): 2589-2594

摘要

目的: 观察结肠腺癌组织细胞凋亡的变化, 探讨抑制凋亡蛋白Bcl-2、Bcl-xL及Bcl-w在结肠腺癌中的作用。

方法: 收集14例我院手术切除结肠腺癌标本, 肠镜取正常结肠黏膜组织27例, 所有标本均经病理明确诊断。用TUNEL法检测其组织细胞凋亡水平, 并用免疫组织化学PV法检测蛋白Bcl-2、Bcl-xL及Bcl-w的表达水平。

结果: 正常结肠黏膜组织的细胞凋亡指数明显高于结肠腺癌, 有统计学显著性差异($t = 3.35$, $P = 0.002$); 结肠腺癌中Bcl-xL与Bcl-w的表达均高于正常结肠黏膜组织, 有统计学差异(92.86% vs 11.11%; 85.71% vs 0%, $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); Bcl-2的表达与正常结肠黏膜组织没有统计学差异($P > 0.05$)。

结论: 结肠腺癌的组织细胞凋亡明显低于正

背景资料

结肠癌在西方国家肿瘤相关性死亡中位居第3位, 而肿瘤的发生与细胞凋亡和增殖的失衡有关。Bcl-2家族在内源性凋亡途径中发挥了重要作用, 其家族成员表达的失调一定程度上导致了肿瘤的发生和对化疗药物敏感性的降低。

同行评议者

曹秀峰, 主任医师, 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心

研发前沿
尽管结肠癌的
诊断水平和治疗
技术有所提高, 但
其预后仍然不容
乐观。大量研究
表明, 结肠腺癌
的发生、发展与
细胞凋亡的失调
有密切关系。

常结肠组织; 结肠腺癌中抑制凋亡蛋白Bcl-xL
与Bcl-w的高表达可能发挥了重要的作用。

关键词: 结肠腺癌; Bcl-2; Bcl-xL; Bcl-w; 凋亡

郭文娟, 王爱英, 高春. 细胞凋亡在结肠腺癌组织中的变化
及其相关蛋白的表达. 世界华人消化杂志 2009; 17(25):
2589-2594
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2589.asp>

0 引言

尽管结肠癌的诊断水平和治疗技术有所提高, 但其预后仍然不容乐观。大量研究表明, 结肠腺癌的发生、发展与细胞凋亡的失调有密切关系。而Bcl-2家族在细胞凋亡中发挥了重要作用, 该家族包括抑制凋亡蛋白(如Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-w等)和促进凋亡蛋白(如Bax、Bad等), 他们之间形成同源或异源二聚体, 从而发挥不同的作用。一旦促凋亡蛋白和抑制凋亡蛋白之间的平衡打破, 不仅影响DNA损伤或周期异常细胞的凋亡, 甚至影响肿瘤细胞的凋亡。本研究通过检测正常结肠组织和结肠腺癌组织的细胞凋亡以及Bcl-2家族成员(Bcl-2、Bcl-xL和Bcl-w蛋白)在两者中表达的差异, 探讨其在结肠腺癌发生发展中的作用, 为结肠腺癌的化疗药物选择和基因治疗提供新的理论支持。

1 材料和方法

1.1 材料 标本来源于北京大学第三医院, 27例正常结肠黏膜标本取自结肠镜黏膜活检, 14例结肠腺癌黏膜标本取自手术标本, 术前所有患者均未经化疗、放疗或免疫治疗, 所有病例均经病理明确诊断。标本用40 g/L甲醛固定, 常规石蜡包埋, 4 μ m厚连续切片, 每份标本均制作成免疫组织化学用的切片, 另有一张做HE染色。细胞凋亡试剂盒、DNase I、蛋白酶K和NBT/BCIP显色液均购自罗氏公司; Bcl-w兔抗人/鼠多克隆抗体(1:300)由Abcam公司提供, Bcl-2鼠抗人mAb(1:600)由美国Sigma公司提供, Bcl-xL兔抗人mAb(1:200)由Cell signaling公司提供。DAB显色液购于DAKO公司。PV-6001、PV-6002为两步法的非生物素标记的检测系统, 购自北京中衫公司。多聚赖氨酸、0.01 mol/L磷酸盐(PBS)缓冲液(pH7.2-7.4)、0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液(pH6.0)及其他常规试剂均购自北京中衫公司。

1.2 方法

1.2.1 TUNEL法检测细胞凋亡: 石蜡切片脱蜡、

水化后, 蛋白酶K(1:10)37℃孵育10 min, PBS冲洗后加入TUNEL反应液, 避光湿盒孵育60 min, PBS冲洗后加入Converter-POD反应液, 湿盒孵育30 min, 最后NBT/BCIP显色, 甲基绿复染。阴性对照使用Lable Solution取代TUNEL反应液。结果判定: 每张切片选5-10个高倍镜视野, 计数黏膜及腺管上皮细胞, 核染色阳性者记为TUNEL阳性细胞, 计数阳性细胞占视野总细胞数的百分比, 其均值即为该标本的凋亡指数(apoptotic index, AI)。

1.2.2 免疫组织化学检测Bcl-2、Bcl-xL和Bcl-w蛋白在组织中的表达: 按照PV两步法进行。100 g/L中性甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋切片(厚度4 μ m), 贴于涂有多聚赖氨酸的玻片上, 常规脱蜡至水, 微波修复高火15 min, 30 mL/L过氧化氢甲醇溶液灭活内源性过氧化物酶, 余步骤按照试剂盒说明操作。对照设立包括阳性对照、阴性空白对照和阴性替代对照; 阳性对照由已知阳性切片做阳性对照, 空白对照由既往实验证实, 阴性替代对照用0.01 mol/L的PBS(pH7.4)代替一抗。

1.2.3 结果判定: 计分参照Rahman的标准并作适当修改, 染色强度计分: 无色0分; 淡黄色1分; 黄色2分; 棕褐色3分^[3]。阳性细胞数计分: <25% 1分; 26%-50% 2分; 51%-75% 3分; >75% 4分。根据染色强度和阳性细胞数计分之之和进行判断: 0分为阴性(-), 1-2分为弱阳性(+), 3-5分为中等阳性(++), 6-7分为强阳性(+++)。所有结果均经3位作者在病理医生帮助下分别阅片, 若有异议共同商议后确定。

统计学处理 用SPSS13.0软件, 细胞凋亡指数组间均数的比较采用独立样本的 t 检验; 结肠腺癌与正常结肠蛋白阳性率之间的比较采用卡方检验。以 $\alpha = 0.05$ 为检验标准。

2 结果

2.1 TUNEL检测各组结肠组织细胞凋亡 在正常结肠黏膜组织中, 凋亡不仅出现在黏膜上皮细胞, 也出现在腺管上皮细胞。在结肠腺癌组织中, 则散在分布于腺管状癌组织中。27例正常结肠黏膜组织的AI均值为8.61%, 14例结肠腺癌组织AI均值为0.47%。正常结肠黏膜组织和腺癌组织进行比较($t = 3.35$, $P = 0.002$), 提示二者之间有统计学差异, 正常结肠黏膜组织的AI明显高于结肠腺癌(图1)。

2.2 Bcl-2、Bcl-xL和Bcl-w在正常结肠黏膜组织和腺癌中的表达 Bcl-2在结肠腺癌中的阳性率为

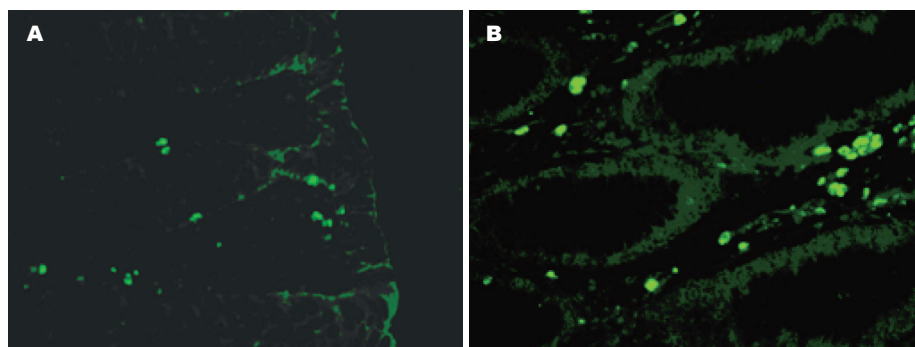


图 1 细胞凋亡 (TUNEL法×400). A: 正常结肠黏膜, 凋亡位于黏膜上皮和腺管上皮; B: 结肠腺癌中, 凋亡主要散在于腺管状癌组织中.

相关报道
Lee *et al* 的研究表明, Bcl-w 可以通过抑制 SAPK/JNK 的激活, 降低细胞对 anti-Fas、血清撤退等促凋亡刺激的反应; 在 Bae *et al* 的研究中, Bcl-w 通过促进基质金属蛋白激酶 MMP2 或黏着斑激酶 (FAK) 含量, 促进细胞的迁移.

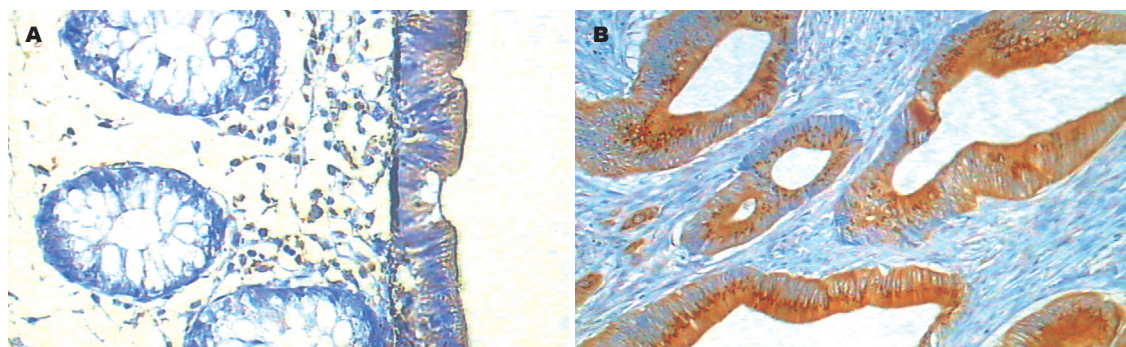


图 2 Bcl-2 的表达(×400). A: 正常结肠黏膜, Bcl-2 主要表达于上皮细胞的游离缘胞质; B: 结肠腺癌中, Bcl-2 弥漫表达于细胞胞质.

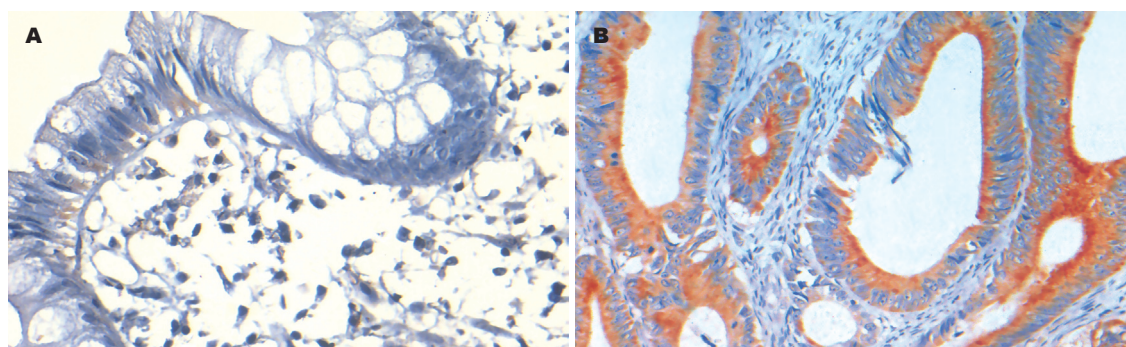


图 3 Bcl-xL 的表达(×400). A: 正常结肠黏膜, Bcl-xL 少量表达于黏膜上皮核的基底部; B: 结肠腺癌中, Bcl-xL 在胞质中呈颗粒状强阳性表达.

表 1 正常结肠黏膜组织和结肠腺癌中 Bcl-2、Bcl-xL 和 Bcl-w 蛋白表达 $n(\%)$

	n	Bcl-2	Bcl-xL	Bcl-w
正常结肠黏膜	27	12(44.44)	3(11.11)	0(0.00)
结肠腺癌	14	9(64.29)	13(92.86)	12(85.71)

64.29%, 正常结肠黏膜组织为 44.44%, 两者比较没有统计学差异($P = 0.276$). Bcl-2 在正常组织中主要位于上皮游离缘胞质, 在结肠腺癌组织中则弥漫的分布于胞质和胞膜. Bcl-xL 在结肠腺癌中的阳性率明显高于正常结肠, 分别为 92.86% 和 11.11%, 统计学有显著性差异($P < 0.01$). Bcl-

xL 在正常结肠黏膜组织中表达主要分布在黏膜上皮细胞核的下方, 在结肠腺癌中则广泛表达于细胞质, 多呈强阳性颗粒状着色, 明显不同于 Bcl-2 的表达. Bcl-w 在结肠腺癌中的阳性表达率高于正常结肠, 分别为 85.17% 和 0%, 有统计学差异($P = 0.00$), Bcl-w 在正常结肠组织中黏膜上皮和腺体未见阳性表达, 在结肠腺癌中则主要在胞质着色(表 1, 图 2-4).

3 讨论

凋亡参与体内细胞数量的调节, 清除体内无功能的细胞、对机体有害的细胞、突变的细胞以及受损后不能存活的细胞, 在机体正常生长发

应用要点

由于Bcl-xL在结肠癌中的高表达,降低了细胞的凋亡水平,因此应用针对Bcl-xL的反义寡核苷酸,通过降低Bcl-xL的表达水平,可以引起细胞凋亡的增加和增殖的减少,并增加了对肿瘤化疗药物的敏感性。

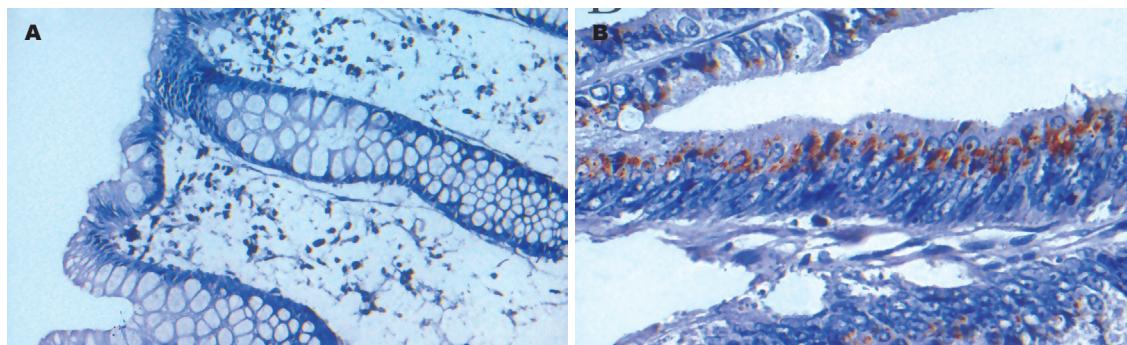


图4 Bcl-w的表达($\times 400$)。A: 正常结肠黏膜, 上皮和胞质均未见Bcl-w阳性表达; B: 在结肠腺癌中, Bcl-w在胞质呈弥漫性表达。

育和稳态调节中发挥了重要的作用^[4-5]。凋亡在维持结肠的正常结构和功能中有重要意义^[6]。在正常结肠中, 隐窝基底部的干细胞不断分化出新的细胞转移并到隐窝顶部, 同时每天大约有 10^{10} 个细胞脱落到肠腔, 维持了肠道细胞数量的平衡^[7-8]。结肠癌的发生过程经历了息肉-腺瘤-含有腺瘤的腺癌-腺癌的一系列病理过程^[9], 同时伴随着凋亡水平的降低和增殖水平的升高^[10]。Bcl-2家族是调节细胞凋亡的重要成员, 其抑制凋亡蛋白的升高促进了肿瘤的发生^[11]。在本研究中, 正常结肠的凋亡显著高于结肠腺癌组织, 推测与Bcl-2家族中抑制凋亡蛋白的表达水平升高有关。

Bcl-2是研究最为广泛的抑制凋亡蛋白之一, 本研究发现, Bcl-2在正常结肠的黏膜和腺体中均有表达, 在腺癌中则弥散分布于整个胞质中, 且在细胞膜和核膜中亦有表达。有研究表明Bcl-2在没有淋巴血管侵犯, 没有淋巴结转移的早期结肠癌中的表达较高^[12], 因此Bcl-2可能在结肠腺癌形成的早期发挥了重要的作用, 同时其表达与较好的临床预后相关^[13-14]。Bendardaf *et al*^[15-16]研究表明, Bcl-2和胸苷酸合酶的表达与结直肠癌的无瘤生存期有关。另有研究表明, 随结肠腺癌恶性程度的进一步发展, 其表达量又相对下降^[17]。在结肠腺瘤由轻度异型性到中度、重度异型性进展的过程中, Bcl-2的表达逐渐减少甚至消失, 但降低的Bcl-2表达并没有导致凋亡活性的升高, 因此Bcl-2在结肠肿瘤的晚期可能并不发挥主要作用^[18-20]。在本研究中, 14例结肠腺癌中, 有12例中分化腺癌, 2例低分化腺癌, 因此Bcl-2在结肠腺癌中的表达与正常组织中没有统计学差异, 可能与所选标本的恶性程度较高有关。

与Bcl-2相比, Bcl-xL在正常结肠黏膜组织

主要位于黏膜上皮核的基底部, 在结肠腺癌组织中则广泛表达于胞质, 且多为强阳性着色。本研究发现, Bcl-xL在结肠腺癌中的表达水平明显高于正常结肠黏膜组织, 且有统计学意义, 这与Zhang *et al*^[21]的研究结果一致。有研究报道Bcl-xL的表达在结直肠癌中明显高于Bcl-2, 另有研究表明, Bcl-xL/Bax而非Bcl-2/Bax与结直肠癌细胞系对5-FU化学敏感性显著相关^[22-23]。Bcl-xL可能通过与Bcl-2不同的机制发挥抑制凋亡的作用。在Ras诱导的抗失巢凋亡中, 发挥抗凋亡作用的为Bcl-xL而非Bcl-2^[24-25]。在神经胶质瘤中, JNK(c-Jun氨基末端激酶)对Bcl-xL和Bcl-2的拮抗作用不同^[26]。由于Bcl-xL的过表达可以抑制一些细胞的凋亡, 而Bcl-2的过表达却不能, 因此, 越来越多的研究结果显示在一些组织(如膀胱癌)^[27]Bcl-xL的抗凋亡作用强于Bcl-2, 而且他们可能通过不同的路径发挥作用, 尽管其结构存在相似性^[28-29]。

Bcl-w是Bcl-2家族中重要成员之一, 其抑制凋亡的作用受到越来越多的关注。本研究发现Bcl-w在腺癌中表达的阳性率为85.71%, 而正常结肠黏膜组织中未见阳性表达($P < 0.01$)。Wilson *et al*研究表明Bcl-w在正常结肠, 结肠腺瘤和结肠腺癌中的表达逐渐升高^[31], 这与本研究结果相一致。在胃癌组织, Bcl-w表达明显高于正常组织, 在2种不同的人类胃腺癌细胞系(SNU-16和SNU-620)的研究中, SNU-16较SNU-620对各种促进凋亡刺激敏感, 后者Bcl-w的含量明显高于前者。同时, Bcl-w含量高的细胞其侵袭力强^[32]。在Bcl-w敲除的老鼠, 只表现为精子的发生异常^[33-34], 但在 γ 射线或细胞毒性药物的作用下, Bcl-w敲除的老鼠其肠道细胞凋亡明显增加^[35]。在小肠大部切除术的研究中, 也表明Bcl-w表达的增高对于促进切除后小肠细胞增殖中发挥了重要作用。

用^[36]。Bcl-w促进结肠腺癌发生的机制尚不清楚,但有研究表明,在结直肠腺癌中, Met可通过增加Bcl-w的表达而抑制癌细胞的凋亡^[32,37]。β-catenin可以激活Bcl-w的启动子,导致Bcl-w的高表达,抑制了结肠癌细胞的凋亡^[38]。在Bae *et al*的研究中, Bcl-w也可以通过激活PI3K/AKT进而激活了转录因子Sp1的活性,使得MMP2表达增加,分解细胞外基质,从而促进胃癌细胞的侵袭力^[39];也可以在激活转录因子Sp1后,诱导了uPA(尿激酶型纤维蛋白酶原激活剂)的表达,从而使黏着斑激酶(FAK)的水平升高,促进了细胞的侵袭力^[40]。

本研究发现,结肠腺癌组织的凋亡明显低于正常组织,抑制凋亡蛋白Bcl-xL和Bcl-w在腺癌中的高表达可能发挥了重要的作用。因此,降低抑制凋亡蛋白的表达,对降低结肠腺癌耐药性和结肠腺癌进展有重要的意义。

4 参考文献

- 1 Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007; 18: 581-592
- 2 Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007; 57: 43-66
- 3 高春, 王爱英, 韩亚京. 内源性生物素在结肠组织中的表达及其对免疫组化的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 551-555
- 4 Fulda S. Apoptosis pathways and neuroblastoma therapy. *Curr Pharm Des* 2009; 15: 430-435
- 5 Cotter TG. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 501-507
- 6 Watson AJ, Pritchard DM. Lessons from genetically engineered animal models. VII. Apoptosis in intestinal epithelium: lessons from transgenic and knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278: G1-G5
- 7 Rajagopalan H, Nowak MA, Vogelstein B, Lengauer C. The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 695-701
- 8 Leedham SJ, Wright NA. Expansion of a mutated clone: from stem cell to tumour. *J Clin Pathol* 2008; 61: 164-171
- 9 Kukitsu T, Takayama T, Miyanishi K, Nobuoka A, Katsuki S, Sato Y, Takimoto R, Matsunaga T, Kato J, Sonoda T, Sakamaki S, Niitsu Y. Aberrant crypt foci as precursors of the dysplasia-carcinoma sequence in patients with ulcerative colitis. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 48-54
- 10 Oumouna-Benachour K, Oumouna M, Zerfaoui M, Hans C, Fallon K, Boulares AH. Intrinsic resistance to apoptosis of colon epithelial cells is a potential determining factor in the susceptibility of the A/J mouse strain to dimethylhydrazine-induced colon tumorigenesis. *Mol Carcinog* 2007; 46: 993-1002
- 11 Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 47-59
- 12 Han HS, Park YM, Hwang TS. Differential expression of Bcl-2, Bcl-XL and p53 in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1108-1114
- 13 Ilyas M, Hao XP, Wilkinson K, Tomlinson IP, Abbasi AM, Forbes A, Bodmer WF, Talbot IC. Loss of Bcl-2 expression correlates with tumour recurrence in colorectal cancer. *Gut* 1998; 43: 383-387
- 14 Leahy DT, Mulcahy HE, O'Donoghue DP, Parfrey NA. bcl-2 protein expression is associated with better prognosis in colorectal cancer. *Histopathology* 1999; 35: 360-367
- 15 Bendardaf R, Ristamaki R, Syrjanen K, Pyrhonen S. Bcl-2 expression significantly correlates with thymidylate synthase expression in colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6218-6223
- 16 Bendardaf R, Lamlum H, Ristamäki R, Syrjänen K, Pyrhönen S. Oncoprotein Bcl-2 and microsatellite instability are associated with disease-free survival and treatment response in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2008; 20: 999-1004
- 17 Watson AJ, Merritt AJ, Jones LS, Askew JN, Anderson E, Becciolini A, Balzi M, Potten CS, Hickman JA. Evidence of reciprocity of bcl-2 and p53 expression in human colorectal adenomas and carcinomas. *Br J Cancer* 1996; 73: 889-895
- 18 Berney CR, Downing SR, Yang JL, Russell PJ, Crowe PJ. Evidence for post-transcriptional down-regulation of the apoptosis-related gene bcl-2 in human colorectal cancer. *J Pathol* 2000; 191: 15-20
- 19 Carr NJ, Emory TS, Sobin LH. Epithelial neoplasms of the appendix and colorectum: an analysis of cell proliferation, apoptosis, and expression of p53, CD44, bcl-2. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126: 837-841
- 20 Yang SY, Sales KM, Fuller B, Seifalian AM, Winslet MC. Apoptosis and colorectal cancer: implications for therapy. *Trends Mol Med* 2009; 15: 225-233
- 21 Zhang YL, Pang LQ, Wu Y, Wang XY, Wang CQ, Fan Y. Significance of Bcl-xL in human colon carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3069-3073
- 22 Zhang L, Yu J, Park BH, Kinzler KW, Vogelstein B. Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. *Science* 2000; 290: 989-992
- 23 Maurer CA, Friess H, Bühler SS, Wahl BR, Graber H, Zimmermann A, Büchler MW. Apoptosis inhibiting factor Bcl-xL might be the crucial member of the Bcl-2 gene family in colorectal cancer. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 2641-2648
- 24 Coll ML, Rosen K, Ladeda V, Filmus J. Increased Bcl-xL expression mediates v-Src-induced resistance to anoikis in intestinal epithelial cells. *Oncogene* 2002; 21: 2908-2913
- 25 Alfano D, Iaccarino I, Stoppelli MP. Urokinase signaling through its receptor protects against anoikis by increasing BCL-xL expression levels. *J Biol Chem* 2006; 281: 17758-17767
- 26 Jeong HS, Choi HY, Choi TW, Kim BW, Kim JH, Lee ER, Cho SG. Differential regulation of the antiapoptotic action of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) and B-cell lymphoma extra long (Bcl-xL) by c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) 1-involved pathway in neuroglioma cells. *Biol Pharm Bull* 2008; 31: 1686-1690
- 27 Hameed DA, Abdel Raheem AM, Mosad E, Hammouda HM, Kamel NA, Abdel Aziz MA. Bcl-XL and Bcl-2 expression in bilharzial squamous cell carcinoma of the urinary bladder: which protein is

同行评价
本研究通过检测正常结肠和结肠腺癌的细胞凋亡以及Bcl-2家族成员在两者中表达的差异,探讨其在结肠腺癌发生发展中的作用,为结肠腺癌的药物治疗和基因治疗提供了新的理论支持。

- prognostic? *Urology* 2008; 72: 374-378
- 28 Zheng X, Wang Y, Wei H, Ling B, Sun R, Tian Z. Bcl-xL is associated with the anti-apoptotic effect of IL-15 on the survival of CD56(dim) natural killer cells. *Mol Immunol* 2008; 45: 2559-2569
- 29 Wang Y, Zhang B, Peng X, Perpetua M, Harbrecht BG. Bcl-xL prevents staurosporine-induced hepatocyte apoptosis by restoring protein kinase B/mitogen-activated protein kinase activity and mitochondria integrity. *J Cell Physiol* 2008; 215: 676-683
- 30 Wachek V, Selzer E, Günsberg P, Lucas T, Meyer H, Thallinger C, Monia BP, Jansen B. Bcl-x(L) antisense oligonucleotides radiosensitise colon cancer cells. *Br J Cancer* 2003; 89: 1352-1357
- 31 Wilson JW, Nostro MC, Balzi M, Faraoni P, Cianchi F, Becciolini A, Potten CS. Bcl-w expression in colorectal adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2000; 82: 178-185
- 32 Lee HW, Lee SS, Lee SJ, Um HD. Bcl-w is expressed in a majority of infiltrative gastric adenocarcinomas and suppresses the cancer cell death by blocking stress-activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase activation. *Cancer Res* 2003; 63: 1093-1100
- 33 Ross AJ, Waymire KG, Moss JE, Parlow AF, Skinner MK, Russell LD, MacGregor GR. Testicular degeneration in Bclw-deficient mice. *Nat Genet* 1998; 18: 251-256
- 34 Print CG, Loveland KL, Gibson L, Meehan T, Stylianou A, Wreford N, de Kretser D, Metcalf D, Köntgen F, Adams JM, Cory S. Apoptosis regulator bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 12424-12431
- 35 Pritchard DM, Print C, O'Reilly L, Adams JM, Potten CS, Hickman JA. Bcl-w is an important determinant of damage-induced apoptosis in epithelia of small and large intestine. *Oncogene* 2000; 19: 3955-3959
- 36 Stern LE, Falcone RA Jr, Kemp CJ, Stuart LA, Erwin CR, Warner BW. Effect of massive small bowel resection on the Bax/Bcl-w ratio and enterocyte apoptosis. *J Gastrointest Surg* 2000; 4: 93-100
- 37 Kitamura S, Kondo S, Shinomura Y, Kanayama S, Miyazaki Y, Kiyohara T, Hiraoka S, Matsuzawa Y. Met/HGF receptor modulates bcl-w expression and inhibits apoptosis in human colorectal cancers. *Br J Cancer* 2000; 83: 668-673
- 38 Lapham A, Adams JE, Paterson A, Lee M, Brimmell M, Packham G. The Bcl-w promoter is activated by beta-catenin/TCF4 in human colorectal carcinoma cells. *Gene* 2009; 432: 112-127
- 39 Bae IH, Park MJ, Yoon SH, Kang SW, Lee SS, Choi KM, Um HD. Bcl-w promotes gastric cancer cell invasion by inducing matrix metalloproteinase-2 expression via phosphoinositide 3-kinase, Akt, and Sp1. *Cancer Res* 2006; 66: 4991-4995
- 40 Bae IH, Yoon SH, Lee SB, Park JK, Ho JN, Um HD. Signaling components involved in Bcl-w-induced migration of gastric cancer cells. *Cancer Lett* 2009; 277: 22-28

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)采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12400余种. 本版还加大了专家评审力度, 5500多位学科专家参加了核心期刊评审工作. 经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目. 《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表, 第66页). (科学编辑: 李军亮 2009-09-08)

HCV NS3/4A丝氨酸蛋白酶和NS5B RNA聚合酶抑制剂的临床研究进展

汪桦, 薛小平, 雷迎峰

汪桦, 薛小平, 西北工业大学生命科学院 陕西省西安市 710072
雷迎峰, 中国人民解放军第四军医大学微生物学教研室 陕西省西安市 710032
国家自然科学基金资助项目, No. 30600564; No. 30700710; No. 3070030
作者贡献分布: 此文由汪桦综述; 薛小平与雷迎峰审校。
通讯作者: 薛小平, 教授, 710072, 陕西省西安市友谊西路127号, 西北工业大学生命科学院. xuexp99@gmail.com
电话: 029-88460541 传真: 029-88460541
收稿日期: 2009-07-12 修回日期: 2009-08-20
接受日期: 2009-08-24 在线出版日期: 2009-09-08

Recent advances in the development of inhibitors targeting hepatitis C virus NS3/4A serine protease and NS5B RNA polymerase

Hua Wang, Xiao-Ping Xue, Ying-Feng Lei

Hua Wang, Xiao-Ping Xue, College of Life Science, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, Shaanxi Province, China
Ying-Feng Lei, Department of Microbiology, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30600564, 30700710 and 3070030
Correspondence to: Professor Xiao-Ping Xue, College of Life Science, Northwestern Polytechnical University, 127 Youyi West Road, Xi'an 710072, Shaanxi Province, China. xuexp99@gmail.com
Received: 2009-07-12 Revised: 2009-08-20
Accepted: 2009-08-24 Published online: 2009-09-08

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) NS3/4A serine protease and NS5B RNA-dependent RNA polymerase are vital for the processing and maturation of viral protein precursors and RNA replication. Recently, many studies focus on developing inhibitors targeting these two enzymes to fight against HCV infection. In this article, we will review the recent advances in the development of inhibitors targeting HCV NS3/4A protease and NS5B polymerase.

Key Words: Hepatitis C; NS3/4A serine protease; NS5B RNA-dependent RNA polymerase; Enzyme

inhibitor

Wang H, Xue XP, Lei YF. Recent advances in the development of inhibitors targeting hepatitis C virus NS3/4A serine protease and NS5B RNA polymerase. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(25): 2595-2600

摘要

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)NS3/4A丝氨酸蛋白酶和NS5B RNA依赖的RNA聚合酶是病毒蛋白前体加工成熟和复制过程中十分重要的两个酶, 是抗HCV治疗的理想靶点. 近年来, 关于HCV NS3/4A蛋白酶和NS5B RNA聚合酶抑制剂的研究是抗HCV研究最为活跃的方向, 本文综述了他们在临床试验中的最新研究进展.

关键词: 丙型肝炎; NS3/4A丝氨酸蛋白酶; NS5B RNA依赖的RNA聚合酶; 酶类抑制剂

汪桦, 薛小平, 雷迎峰. HCV NS3/4A丝氨酸蛋白酶和NS5B RNA聚合酶抑制剂的临床研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17(25): 2595-2600
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2595.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)是引起慢性肝炎的主要病原体之一, 主要通过血源传播. HCV基因组变异较大, 按照Simmonds命名系统, 可将HCV分为6个主要基因型即 I-VI, 各型又可分为若干个亚型(如 I a、I b、II a、II b、III a、III b等). HCV基因型分布具有明显的地域性, 其中 I、II 和 III 型呈全球性分布, 我国北方以 II a 型为主, 南方以 I b 型为主. 全球范围内, HCV感染人数约占总人口数的3%, 约为2亿人, 其中 I 型感染者占感染总人数的40%-80%^[1]. 目前, 我国的HCV感染者约4000万, 其中69%为 I 型感染(以 I b 型为主), 13%为 II 型感染(以 II a 型为主), 18%为其他类型感染^[2]. HCV的感染者约有60%-80%发展为慢性肝炎, 其中约20%发展

背景资料

HCV感染往往易引起慢性肝炎, 因此HCV感染已成为全球严重的公共卫生问题. 目前, 临床上标准的HCV治疗方案是IFN α 或peg-IFN α 和RBV联合使用. 但是, 这种治疗方案的疗效较低, 周期较长, 费用较高, 不良反应较严重. 随着临床上应用蛋白酶和逆转录酶抑制剂治疗HIV取得较好的疗效, 研发NS3/4A SP和NS5B RdRp抑制剂成为近年来抗HCV治疗的重要方向.

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; 刘纪, 教授, 重庆医科大学病毒性肝炎研究所

研发前沿

目前,以HCV NS3/4A SP和NS5B RdRp为靶标,研发特异有效的药物是抗HCV研究的热点。但是,如何减少药物产生的各种不良反应是亟待解决的问题。

为肝硬化,并有约2%-5%的患者死于HCV感染导致的肝硬化和肝癌^[1]。因此,HCV感染已成为全球严重的公共卫生问题。目前,由于缺少特异有效的药物和疫苗,临床上标准的HCV治疗方案是 α -干扰素(interferon alfa, IFN- α)或聚乙二醇化 α -干扰素(pegylated interferon alpha, peg-IFN α)和利巴韦林(ribavirin, RBV)联合使用。其治疗效果在不同基因型之间有很大差异,I型的疗效仅为40%-50%,且治疗周期较长,费用较高,不良反应较严重^[3]。目前,抗HCV感染的临床研究主要有2个方向:一是改进干扰素和RBV;另一个是研发特异有效的抗HCV药物。RBV前体药物taribavirin和新型干扰素alb-IFN α -2b相继进入临床试验,结果表明:taribavirin虽然可以有效降低贫血等不良反应的发生率,但疗效却大大降低^[4],并且alb-IFN α -2b不能明显提高治疗效果^[5]。近年来,以HCV NS3/4A丝氨酸蛋白酶(NS3/4A serine protease, NS3/4A SP)和NS5B RNA依赖的RNA聚合酶(NS5B RNA-dependent RNA polymerase, NS5B RdRp)等为靶标,寻找HCV特定靶点抗病毒治疗(specifically targeted antiviral therapy for HCV, STAT-C)药物是抗HCV研究的重要方向。

1 HCV NS3/4A丝氨酸蛋白酶和NS5B RNA聚合酶
HCV属黄病毒(Flaviviridae)科,是单股、正链RNA病毒,基因全长9.6 kb,由5'非编码区,3'非编码区及位于其间的单一开放阅读框架(open reading frame, ORF)组成。ORF编码约3010个氨基酸的NH₂-C-E1-E2/NS1-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH多聚蛋白前体^[1]。其中C, E1, E2, P7为结构蛋白区,NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B为非结构蛋白区。

NS3/4A SP是由NS3氨基末端180个氨基酸及辅助因子NS4A组成的异源二聚体。NS3/4A SP在病毒多聚蛋白前体的加工成熟中有着非常重要的作用,他在4个连接区域切割多聚蛋白前体: NS3/NS4A、NS4A/NS4B、NS4B/NS5A、NS5A/NS5B。此外,NS3/4A SP可以抑制细胞内抗病毒因子IRF-3的活性,从而抑制细胞内抗病毒反应^[6]。因此,NS3/4A SP已经成为研制抗HCV药物和疫苗的重要靶点。

NS5B RdRp是HCV复制过程中的关键酶。NS5B RdRp以HCV释放出的正链RNA为模板催化RNA负链的合成,再通过负链复制出大量的正链,与多聚蛋白体裂解产生的病毒蛋白共同包装为成熟病毒颗粒。此外,正常的哺乳动物细

胞不表达与NS5B RdRp功能相同的酶,使针对NS5B RdRp的抑制剂具有良好的选择性^[7]。因此,NS5B RdRp也是当今抗HCV研究的重要靶点。目前,已有多项NS3/4A SP和NS5B RdRp抑制剂进入临床试验^[8]。

2 NS3/4A丝氨酸蛋白酶抑制剂

NS3/4A SP抑制剂根据其作用位点,可分为2类:可逆共价结合抑制剂和非共价结合抑制剂^[9]。

2.1 NS3/4A SP可逆共价结合抑制剂 NS3/4A SP可逆共价结合抑制剂是基于NS3/4A SP的底物设计的抑制剂。其抑制原理是利用不易被切割的底物类似物来竞争NS3/4A SP的反应中心,从而降低NS3/4A SP的活性,抑制病毒的复制^[9]。

2.1.1 Telaprevir(VX-950): Telaprevir是一种口服的拟肽类抑制剂,其作用效果在HCV I型、II型和III型之间无明显差异^[10]。在Forestier *et al*^[11]进行的一项小规模I b期临床试验中,peg-IFN α 与Telaprevir联合治疗组经2 wk治疗后,血液中病毒载量平均下降可达5.5 log₁₀ IU/mL。此外,联合治疗组没有患者表现出病毒载量反弹(viral breakthrough),且病毒序列分析表明:抗药突变仅为2/7^[11]。因此,TPR(telaprevir, peg-IFN α , RBV)联合治疗可有效提高患者的持续病毒应答(sustained virological response, SVR),并降低抗药突变的发生率。在II期临床试验“PROVE-1”中,260例未经治疗的HCV I型感染者被分为4组。结果显示,TPR治疗12 wk后,PR(peg-IFN α , RBV)再治疗12 wk组和36 wk组,患者的SVR可分别达到61%和67%,复发率为2%和6%。然而,PR治疗48 wk组和单用TPR治疗12 wk组的SVR仅为41%和35%,复发率高达23%和33%^[12]。在另一项II期临床试验“PROVE-2”中,TPR治疗12 wk后,PR再治疗12 wk组的SVR为69%,复发率仅为14%。PR治疗48 wk组、TPR治疗12 wk组和TP治疗12 wk组的SVR分别为46%、60%和36%,复发率高达22%、30%和48%^[13]。以上结果表明,TPR治疗与PR治疗分段联合应用可以有效提高患者SVR的比率,总治疗周期控制在24 wk即可,且RBV在TPR治疗中不可或缺。但是,TPR治疗产生皮疹、瘙痒、贫血等不良反应的比率明显比PR治疗高^[12-13]。目前,Telaprevir已经进入III期临床试验。

2.1.2 Boceprevir(SCH-503034): Boceprevir是又一种口服的拟肽类抑制剂,能有效抑制HCV RNA复制。Sarrazin *et al*^[14]对PR治疗无效的I

相关报道

2007年,De Francesco *et al*以化学结构和作用机制为重点,较为详尽地介绍了HCV NS3/4A SP和NS5B RdRp抑制剂。

型感染者进行Boceprevir临床研究发现: 仅服用Boceprevir 2 wk, 400 mg tid, 治疗组的平均病毒载量可下降2.06 log₁₀ IU/mL. 并且, Boceprevir与peg-IFN α 联合治疗2 wk, 治疗组的平均病毒载量可下降2.88 log₁₀ IU/mL^[14].

在Kwo *et al*^[15]进行的II期临床试验“SPRINT-1”中, 595例HCV I型患者被分为6组, 采用较高剂量Boceprevir(800 mg tid)研究Boceprevir与PR的联合治疗情况. 并且, 为了减少Boceprevir耐药突变和提高SVR, 在2个试验组先进行4 wk的PR治疗, 再分别进行BPR(boceprevir, peg-IFN α , RBV)联合治疗24 wk和44 wk. 结果表明, 先进行4 wk PR前期治疗来提高试验组SVR的效果并不明显. 单独应用BPR联合治疗28 wk或48 wk, 可使试验组患者SVR(55%, 56%)或SVR12(66%, 74%)明显高于PR对照组SVR(36%)^[15]. 并且, 另一项研究表明, peg-IFN α 和RBV可减少Boceprevir治疗引起的耐药突变^[16].

以上试验结果表明, peg-IFN α 和RBV在Boceprevir临床治疗中必不可少, 他们不但可以提高患者中SVR的比率, 而且可以有效减少V36M, R155K, V36L等耐药突变的产生. 然而, BPR治疗产生的贫血等不良反应的比率比PR标准治疗要高, 且对于PR治疗无效患者采用BPR治疗产生SVR的比率仅为7%-14%^[16]. 目前, Boceprevir也已经进入III期临床试验.

2.2 NS3/4A SP非共价结合抑制剂 NS3/4A SP非共价结合抑制剂是基于NS3/4A SP的酶切产物设计的抑制剂. 其抑制原理是, NS3/4A SP产生的酶切N末端产物可占据NS3/4A SP的活性位点, 且这种结合是非共价的^[9]. 因此, 利用酶切N末端产物类似物可抑制NS3/4A SP的活性.

2.2.1 BILN 2061: BILN 2061属于大环拟肽类药物, 是第一个进入临床试验的NS3/4A SP抑制剂. 用较高剂量的BILN 2061对HCV I型患者进行治疗, 2 d后, 患者的HCV病毒载量可下降2 log₁₀ IU/ml以上^[17]. 但是, 由于BILN 2061在动物实验中表现出的心脏毒性, 该药已被暂停临床试验^[18].

2.2.2 TMC435350: TMC435350也属于大环拟肽类药物. 在Reesink *et al*^[19]进行的临床I期试验中, HCV I型患者用药5 d后, 200 mg qd(once daily)组的平均病毒载量下降最大, 可达3.9 log₁₀ IU/mL. 并且, 试验过程中无患者出现严重的不良反应. 但是, 未感染HCV的对照组用药5 d后, TMC435350在其体内的积累效应高于HCV

患者3倍, 值得引起注意^[19]. 目前, TMC435350已进入II期临床试验.

2.3 其他NS3/4A SP抑制剂 ACH-806与其他NS3/4A SP抑制剂不同, 他阻止NS4A与NS3结合, 使其不能形成高活性的NS3/4A蛋白酶复合物, 从而达到抑制效果. 因此, ACH-806不会与其他抑制剂产生交叉抗性. 在I b期临床试验中, 对HCV I型感染者用药5d后, 患者HCV病毒载量平均下降0.9 log₁₀ IU/mL^[20]. 近期研究表明, ACH-806可以引起肾脏功能紊乱, 因此该药已被暂停临床试验. 但是, ACH-806提供的抑制思路仍值得借鉴. 此外, 新型NS3/4A SP抑制剂MK-7009已进入II期临床试验, R7227(ITMN-191)和VX-500也进入I期临床试验.

3 NS5B RNA依赖的RNA聚合酶抑制剂

NS5B RNA聚合酶抑制剂可根据其化学结构和作用机制分为2大类: 核苷类似物抑制剂(nucleoside analogue inhibitors, NI)和非核苷类似物抑制剂(non-nucleoside analogue inhibitors, NNI).

3.1 NS5B RdRP核苷类似物抑制剂 NI的抑制原理是非磷酸化的NI进入感染HCV的细胞后, 通过胞内磷酸激酶的催化, 转变为具有活性的NTP形式. 然后, 作为NS5B的底物与胞内NTPs竞争, 参与NS5B催化的HCV RNA复制. NTP形式的NI被插入到新生RNA链上后, 其糖单元上的特殊结构会阻止后续碱基的插入, 从而抑制新生RNA链的延伸^[21].

3.1.1 R7128: R7128是可口服的PSI-6130前体药物, 也是一种胞嘧啶类似物抑制剂. Reddy *et al*^[22]对PR治疗无效的HCV I型患者进行I期临床试验, 治疗2 wk后, 1500 mg bid组的平均病毒载量下降最大, 可达5 log₁₀ IU/mL. Lalezari *et al*^[23]将R7128与peg-IFN α , RBV联合应用, 对未经治疗的HCV I型患者进行临床研究. 经过4 wk联合治疗, 患者病毒载量下降约4.0 log₁₀ IU/mL, 快速病毒应答(rapid virological response, RVR)比率为45%. 治疗期间, 没有患者发生病毒载量反弹, 且R7128与peg-IFN α , RBV联合应用时, 基本无患者产生严重的不良反应^[23]. I期临床试验结果表明, R7128具有高效率和低毒性等诸多优点, 因此该药已成为具有应用前景的NI类抑制剂之一.

3.1.2 R1626: R1626是R1479的前体药物, 也是一种胞嘧啶类似物抑制剂. 在Roberts *et al*^[24]进行

创新盘点
本文集中介绍了进入临床试验的HCV NS3/4A SP和NS5B RdRP抑制剂, 重点阐述了这些抑制剂的临床试验疗效、不良反应和未来发展趋势.

应用要点

本文可为HCV NS3/4A SP和NS5B RdRP抑制剂的研究人员提供参考,并且,为临床医生了解HCV酶类抑制剂的研究现状提供帮助。

的I期临床试验中,47例HCV I型患者被分为3组,分别服用R1626 1500 mg bid, 3000 mg bid, 4500 mg bid. 治疗2 wk后,组内平均病毒载量下降分别为1.2、2.6和3.7 log₁₀ IU/mL^[24]. 在Pockros *et al*^[25]进行的II期临床试验中,104例未经治疗的HCV I型患者被分为4组,来研究R1626与peg-IFN α , RBV的联合治疗情况. 治疗48 wk后, R6PR(R1626, peg-IFN α , RBV)联合治疗组的平均病毒载量下降最大,高达5.2 log₁₀ IU/mL. 然而,试验患者发生4级嗜中性白细胞减少症(<500个/ μ L)的比率高达42%-78%^[25]. 此外, R1626试验组患者发生皮疹和肠胃不良反应的比率也明显高于对照组. 因此, Roche公司已于2008-10暂停该药的临床试验.

3.1.3 Valopicitabine(NM283): Valopicitabine是第一个进入临床试验的NI类抑制剂. I期临床试验中, 800 mg/d的试验组平均病毒载量下降最大,可达1.21 log₁₀ IU/mL^[26]. 然而, II期临床试验表明, Valopicitabine会产生严重的肠胃不良反应^[27]. 2007-09, FDA宣布暂停该药的临床试验. 此外, 新型NI类抑制剂IDX184已进入I期临床试验. 另一种NI类抑制剂MK-0608, 已被Merck公司宣布放弃研发.

3.2 NS5B RdRP非核苷类似物抑制剂 NNI的抑制原理与NI不同, NNI通过与NS5B RNA聚合酶表面的变构位点结合, 改变酶的空间构象, 从而抑制其活性. 研究表明, NS5B RNA聚合酶表面至少存在4个变构结合位点^[28].

3.2.1 VCH-759: VCH-759是一种口服的NNI类抑制剂. 在Cooper *et al*^[29]进行的I期临床试验中, 32例未接受过治疗的HCV I型患者分别接受400 mg tid、800 mg bid、800 mg tid的VCH-759治疗. 经过10 d的治疗, 800 mg tid组的平均病毒载量下降最大,可达2.5 log₁₀ IU/mL^[29]. 虽然较多患者出现腹泻,但是无严重的不良反应发生. 此外,有部分患者体内出现M423T/V、L419M、I482L等突变株,引起病毒载量反弹. 这说明,该药可能需要与其他药物联合应用,以增加药效并减少突变株的产生. 目前, VCH-759与其他药物联合治疗的II期临床试验正在进行.

3.2.2 HCV-796: HCV-796是第一个进入II期临床试验的NNI类抑制剂. 在I期临床试验中, 1000 mg bid和1500 mg bid试验组患者平均病毒载量下降最大,可达1.4 log₁₀ IU/mL^[30]. 没有患者出现严重的不良反应,但有部分患者出现C316Y突变引起的病毒载量反弹. 在Kneteman

et al^[30]进行的II期临床试验中,研究了HCV-796与peg-IFN α , RBV的联合治疗情况. 初期结果表明, HCV-796与peg-IFN α 联合治疗可增加治疗效果,减少突变株的发生. 但是,试验中发现HCV-796具有严重的肝脏毒性. 因此, HCV-796已被停止临床试验. 此外, 新型NNI类抑制剂A-837093, GS-9190, GSK625433, VCH-916, PF-868554, ABT-333, ANA598已进入I期临床试验. 并且,由于治疗效果不佳, XTL 2125已被停止临床试验.

4 结论

近年来,许多大型医药企业针对NS3/4A SP和NS5B RdRP研发抑制剂,并相继进入临床试验. 尽管,一些NS3/4A SP和NS5B RdRP抑制剂可以有效降低患者体内的HCV RNA病毒载量,并呈现良好的应用前景. 但是,这些抑制剂单独用于抗HCV治疗,往往易使HCV产生抗药突变株,而引起病毒载量的反弹. 因此,未来对HCV抗药突变株进行分析研究,以及对抗HCV药物联合应用进行临床研究,是NS3/4A SP和NS5B RdRP抑制剂进行STAT-C治疗的重要趋势. 临床试验表明:一些NS3/4A SP和NS5B RdRP的抑制剂与peg-IFN α , RBV联合应用可以减少HCV抗药突变株的发生,增加抑制剂的治疗效果. 但是,某些抑制剂单独治疗或与PB联合治疗会产生各种严重的不良反应. 不久前, R1626、HCV-796等被停止临床试验,都是因为其产生的严重不良反应. 因此,如何减少NS3/4A SP和NS5B RdRP抑制剂产生的各种严重不良反应,也是开发新型药物需要解决的重要问题. 虽然NS3/4A SP和NS5B RdRP抑制剂目前仍存在的问题,但是从总体上看,他们的各项临床试验结果还是令人满意的. 因此,随着未来各项研究的深入,有理由相信:一种毒性低、药效高、治疗周期短、用药成本低的理想抗HCV药物必将会出现.

5 参考文献

- 1 Modi AA, Liang TJ. Hepatitis C: a clinical review. *Oral Dis* 2008; 14: 10-14
- 2 Yu ML, Chuang WL. Treatment of chronic hepatitis C in Asia: when East meets West. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 336-345
- 3 Soriano V, Madejon A, Vispo E, Labarga P, Garcia-Samaniego J, Martin-Carbonero L, Sheldon J, Bottecchia M, Tuma P, Barreiro P. Emerging drugs for hepatitis C. *Expert Opin Emerg Drugs* 2008; 13: 1-19
- 4 Gish RG, Arora S, Rajender Reddy K, Nelson DR, O'Brien C, Xu Y, Murphy B. Virological response and safety outcomes in therapy-naïve patients

- treated for chronic hepatitis C with taribavirin or ribavirin in combination with pegylated interferon alfa-2a: a randomized, phase 2 study. *J Hepatol* 2007; 47: 51-59
- 5 Zeuzem S, Yoshida EM, Benhamou Y, Pianko S, Bain VG, Shouval D, Flisiak R, Rehak V, Grigorescu M, Kaita K, Cronin PW, Pulkstenis E, Subramanian GM, McHutchison JG. Albinterferon alfa-2b dosed every two or four weeks in interferon-naïve patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology* 2008; 48: 407-417
- 6 Gale M Jr, Foy EM. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* 2005; 436: 939-945
- 7 Beaulieu PL, Tsantrizos YS. Inhibitors of the HCV NS5B polymerase: new hope for the treatment of hepatitis C infections. *Curr Opin Investig Drugs* 2004; 5: 838-850
- 8 Thompson AJ, McHutchison JG. Review article: investigational agents for chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 29: 689-705
- 9 De Francesco R, Carfi A. Advances in the development of new therapeutic agents targeting the NS3-4A serine protease or the NS5B RNA-dependent RNA polymerase of the hepatitis C virus. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59: 1242-1262
- 10 Tong X, Guo Z, Wright-Minogue J, Xia E, Prongay A, Madison V, Qiu P, Venkatraman S, Velazquez F, Njoroge FG, Malcolm BA. Impact of naturally occurring variants of HCV protease on the binding of different classes of protease inhibitors. *Biochemistry* 2006; 45: 1353-1361
- 11 Forestier N, Reesink HW, Weegink CJ, McNair L, Kieffer TL, Chu HM, Purdy S, Jansen PL, Zeuzem S. Antiviral activity of telaprevir (VX-950) and peginterferon alfa-2a in patients with hepatitis C. *Hepatology* 2007; 46: 640-648
- 12 McHutchison JG, Everson GT, Gordon SC, Jacobson IM, Sulkowski M, Kauffman R, McNair L, Alam J, Muir AJ. Telaprevir with peginterferon and ribavirin for chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2009; 360: 1827-1838
- 13 Hézode C, Forestier N, Dusheiko G, Ferenci P, Pol S, Goeser T, Bronowicki JP, Bourlière M, Gharakhanian S, Bengtsson L, McNair L, George S, Kieffer T, Kwong A, Kauffman RS, Alam J, Pawlotsky JM, Zeuzem S. Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N Engl J Med* 2009; 360: 1839-1850
- 14 Sarrazin C, Rouzier R, Wagner F, Forestier N, Larrey D, Gupta SK, Hussain M, Shah A, Cutler D, Zhang J, Zeuzem S. SCH 503034, a novel hepatitis C virus protease inhibitor, plus pegylated interferon alpha-2b for genotype 1 nonresponders. *Gastroenterology* 2007; 132: 1270-1278
- 15 Kwo P, Lawitz E, McCone J, Schiff E, Vierling J, Pound D, Davis M, Galati J, Gordon S, Ravendhran N, Rossaro L, Anderson F, Jacobson I, Rubin R, Koury K, Brass C, Chaudhri E, Albrecht J. HCV SPRINT-1 final results:SVR 24 from a phase 2 study of boceprevir plus peginterferon (peginterferon alfa-2B)/ribavirin in treatment-naïve subjects with genotype-1 chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2009; 50(Suppl 1): S4
- 16 Schiff E, Poordad E, Jacobson I, Flamm S, Bacon B, Lawitz E, Gordon S, McHutchison J, Ghalib R, Poynard T, Sulkowski M, Trepo C, Rizzetto M, Zeuzem S, Marcellin P, Mendez P, Brass C, Albrecht JK. Boceprevir (B) combination therapy in null responders (NR): response dependent on interferon responsiveness. *J Hepatol* 2008; 48(Suppl 2): S46
- 17 Hinrichsen H, Benhamou Y, Wedemeyer H, Reiser M, Sentjens RE, Calleja JL, Fornis X, Erhardt A, Crönlein J, Chaves RL, Yong CL, Nehmiz G, Steinmann GG. Short-term antiviral efficacy of BILN 2061, a hepatitis C virus serine protease inhibitor, in hepatitis C genotype 1 patients. *Gastroenterology* 2004; 127: 1347-1355
- 18 Reiser M, Hinrichsen H, Benhamou Y, Reesink HW, Wedemeyer H, Avendano C, Riba N, Yong CL, Nehmiz G, Steinmann GG. Antiviral efficacy of NS3-serine protease inhibitor BILN-2061 in patients with chronic genotype 2 and 3 hepatitis C. *Hepatology* 2005; 41: 832-835
- 19 Reesink H, Verloes R, Abou Farha K, Van Vliet A, Weegink C, van't Klooster G, Aharchi F, Marien K, Van Remoortere P, de Kock H, Broeckaert F, Fanning G, Meyvisch P, Van Beirendonck E, Simmen K. Safety of the HCV protease inhibitor TMC435350 in healthy volunteers and safety and activity in chronic hepatitis C infected individuals: a phase I study. *J Hepatol* 2008; 48(Suppl 2): S28
- 20 Pottage JC, Lawitz E, Mazur D, Wyles D, Vargas H, Ghalib R, Gughotti R, Donohue M, Robison H. Short-term antiviral activity and safety of ACH-806 (GS-9132), an NS4A antagonist, in HCV genotype 1 infected individuals. *J Hepatol* 2007; 46(Suppl 1): S294
- 21 Carroll SS, Olsen DB. Nucleoside analog inhibitors of hepatitis C virus replication. *Infect Disord Drug Targets* 2006; 6: 17-29
- 22 Reddy R, Rodrigues-Torres M, Gane E, Robson R, Lalezari J, Everson GT, DeJesus E, McHutchison JG, Vargas HE, Beard A, Rodriguez CA, Hill GZ, Symonds W, Berrey M. Antiviral activity, pharmacokinetics, safety, and tolerability of R7128, a novel nucleoside HCV RNA polymerase inhibitor, following multiple, ascending, oral doses in patients with HCV genotype 1 infection who have failed prior interferon therapy. *Hepatology* 2007; 46(Suppl 1): LB9
- 23 Lalezari J, Gane E, Rodriguez-Torres M, DeJesus E, Nelson D, Everson G, Jacobson I, Reddy R, Hill GZ, Beard A, Symonds WT, Berrey MM, McHutchison JG. Potent antiviral activity of the HCV nucleoside polymerase inhibitor R7128 with PEG-IFN and ribavirin: interim results of R7128 500 mg bid for 28 days. *J Hepatol* 2008; 48(Suppl 2): S29
- 24 Roberts SK, Cooksley G, Dore GJ, Robson R, Shaw D, Berns H, Hill G, Klumpp K, Najera I, Washington C. Robust antiviral activity of R1626, a novel nucleoside analog: a randomized, placebo-controlled study in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2008; 48: 398-406
- 25 Pockros PJ, Nelson D, Godofsky E, Rodriguez-Torres M, Everson GT, Fried MW, Ghalib R, Harrison S, Nyberg L, Shiffman ML, Najera I, Chan A, Hill G. R1626 plus peginterferon Alfa-2a provides potent suppression of hepatitis C virus RNA and significant antiviral synergy in combination with ribavirin. *Hepatology* 2008; 48: 385-397
- 26 Godofsky E, Afdhal N, Rustgi V, Shick L, Duncan L, Zhou XJ, Chao G, Fang C, Fielman B, Myers M, Brown N. Phase I/II dose escalation trial assessing tolerance, pharmacokinetics, and antiviral activity

名词解释

- 1 持续病毒应答 (SVR): 治疗结束后24 wk内, 患者血清HCV RNA的PCR检测为阴性, SVR是丙型肝炎药物治疗评价的重要指标。
- 2 SVR12: 治疗结束后12 wk内, 患者血清HCV RNA的PCR检测为阴性。
- 3 快速病毒应答 (RVR): 治疗4 wk时患者血清HCV RNA的PCR检测为阴性, RVR是SVR的重要预测因子。

同行评价

本文综述了HCV NS3/4A蛋白酶和NS5B RNA聚合酶抑制剂的研发的最新研究进展,对临床及研究具有参考价值.

- of NM283, a novel antiviral treatment for hepatitis C. *Gastroenterology* 2004; 126: A681
- 27 Toniutto P, Fabris C, Bitetto D, Fornasiere E, Rapetti R, Pirisi M. Valopicitabine dihydrochloride: a specific polymerase inhibitor of hepatitis C virus. *Curr Opin Investig Drugs* 2007; 8: 150-158
- 28 Tomei L, Altamura S, Bartholomew L, Bisbocci M, Bailey C, Bosserman M, Cellucci A, Forte E, Incitti I, Orsatti L, Koch U, De Francesco R, Olsen DB, Carroll SS, Migliaccio G. Characterization of the inhibition of hepatitis C virus RNA replication by nonnucleosides. *J Virol* 2004; 78: 938-946
- 29 Cooper C, Lawitz EJ, Ghali P, Rodriguez-Torres M, Anderson FH, Lee SS, Bédard J, Chauret N, Thibert R, Boivin I, Nicolas O, Proulx L. Evaluation of VCH-759 monotherapy in hepatitis C infection. *J Hepatol* 2009; 51: 39-46
- 30 Kneteman NM, Howe AY, Gao T, Lewis J, Pevear D, Lund G, Douglas D, Mercer DF, Tyrrell DL, Immermann F, Chaudhary I, Speth J, Villano SA, O'Connell J, Collett M. HCV796: A selective nonstructural protein 5B polymerase inhibitor with potent anti-hepatitis C virus activity in vitro, in mice with chimeric human livers, and in humans infected with hepatitis C virus. *Hepatology* 2009; 49: 745-752

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》计量单位标准

本刊讯 本刊计量单位采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 M_r 30 000或30 kDa(M 大写斜体, r 小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A 大写斜体, r 小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是 u (小写正体). 计量单位在+、-、 \pm 及-后列出. 如 $37.6 \pm 1.2^\circ\text{C}$, 45.6 ± 24 岁, 56.4 ± 0.5 d, 3.56 ± 0.27 pg/ml应为 3.56 ± 0.27 ng/L, 131.6 ± 0.4 mmol/L, $t = 28.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $\times 10^{12}/\text{L}$, WBC数用 $\times 10^9/\text{L}$, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或 $\mu\text{mol/L}$ 表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm \times 6 cm \times 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、 CO_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B₁、维生素B₂、维生素B₆、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B₁₂用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 μg , hr改成h, 重量 γ 改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg \cdot d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO_2 , 50 mL/L CO_2 ; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示. (科学编辑: 李军亮 2009-09-08)

重症急性胰腺炎实验动物模型的研究进展

杨元生, 崔淑兰, 陈 垦, 王 晖

杨元生, 陈垦, 广东药学院临床医学院内科学教研室 广东省广州市 510310
崔淑兰, 广东药学院附属门诊部 广东省广州市 510224
王晖, 广东药学院中药学院药理学教研室 广东省广州市 510006
广东省科学事业计划基金资助项目, No. 2007A060305007; No. 2007B030702004
广州市科学技术基金资助项目, No. 2007Z3-E5011
广东省自然科学基金资助项目, No. 8151022401000012
作者贡献分布: 本综述由杨元生完成; 崔淑兰, 陈垦及王晖审核。
通讯作者: 崔淑兰, 教授, 510224, 广东省广州市, 广东药学院附属门诊部. mzbcs1@163.com
电话: 020-34074552
收稿日期: 2009-06-19 修回日期: 2009-08-26
接受日期: 2009-08-31 在线出版日期: 2009-09-08

Advances in the development of experimental animal models of severe acute pancreatitis

Yuan-Sheng Yang, Shu-Lan Cui, Ken Chen, Hui Wang

Yuan-Sheng Yang, Ken Chen, Department of Internal Medicine, College of Clinical Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510310, Guangdong Province, China

Shu-Lan Cui, Out-Patient Department, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510224, Guangdong Province, China

Hui Wang, Department of Pharmacology, College of Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

Supported by: the Scientific Research Program of Guangdong Province, No. 2007A060305007 and 2007B030702004; the Science and Technology Foundation of Guangzhou, No. 2007Z3-E5011; the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 8151022401000012

Correspondence to: Professor Shu-Lan Cui, Out-Patient Department, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510224, Guangdong Province, China. mzbcs1@163.com

Received: 2009-06-19 Revised: 2009-08-26

Accepted: 2009-08-31 Published online: 2009-09-08

Abstract

In order to offer clues to the etiology, pathogenesis, pathophysiology and therapy of severe acute pancreatitis (SAP), multiple animal models of SAP have been established. These animal models can simulate different aspects of the disease process of human SAP. Due to different manipulation protocols used in the development of animal models, these animal models can meet

different research needs. A suitable, simple and reproducible animal model should be selected based on experiment purposes. In this article, we will briefly review the recent advances in the development of animal models of SAP and highlight the direction of future research.

Key Words: Severe acute pancreatitis; Animal model; Etiopathogenesis; Retrograde injection

Yang YS, Cui SL, Chen K, Wang H. Advances in the development of experimental animal models of severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(25): 2601-2606

摘要

为探讨重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)的病因、发病机制、病理生理变化及其治疗方法, 已用多种方式建立了活体动物SAP模型。鉴于各种活体SAP模型能在不同侧面模拟人类SAP病变过程, 但操作及控制各异、部分便于动态观察各项指标变化及治疗效果, 可根据不同的实验目的选择合适、操作简单、重复性好的建模方案进行研究。本文简述目前SAP研究现状, 启迪未来探索方向。

关键词: 重症急性胰腺炎; 动物模型; 发病机制; 逆行注射法

杨元生, 崔淑兰, 陈垦, 王晖. 重症急性胰腺炎实验动物模型的研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(25): 2601-2606

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2601.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是临床上常见的急腹症, 按病理分又名急性坏死性胰腺炎(acute necrotizing pancreatitis, ANP), 起病急, 进展快, 病情重, 死亡率高, 发病机制尚未完全阐明, 且无理想的防治方案, 故复制SAP模型进行病因学和治疗学研究是必要的。因SAP并发症多, 至今尚未找到一种能全面解释SAP发病机制的模型, 继续探索仍是今后的科研焦点。研究发病机制旨在为临床治疗提供新思路。本

背景资料

重症急性胰腺炎(SAP)是临床常见的急腹症, 发病急、进展快、病情重、死亡率高, 且一直以来其发病机制未得到阐明, 成功复制SAP模型是研究发病机制的关键点。目前有多种方法可诱导动物SAP, 但各法均有优劣, 需根据研究目的进行选择。研究SAP发病机制可为疾病的防治提供指导性思路。

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; 樊晓明, 主任医师, 复旦大学附属金山医院消化科

研发前沿

本文综述了近年来国内外有关SAP动物模型研究进展,但尚未找到一种能全面阐述SAP病程演变理想模型,对模型的探索仍是今后科研焦点,难点在于如何建立能成功模拟人SAP发病过程的动物模型,为研究其发病机制和治疗开辟新路。

文简述最近几年有关SAP建模及其相关机制的进展,探究目前SAP研究的现状,启迪今后科研探索方向。

1 雨蛙素诱导法

自Lampel *et al*^[1]首次成功用雨蛙素(caerulein, CAE)非创伤性复制大鼠急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)模型后, CAE渐在实验动物AP模型中应用。CAE为多肽类物质,与胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)化学结构及药理作用相似,具有较强的刺激胆囊收缩和胰酶分泌作用。给药途径有2种:(1)静脉注射(intravenous injection, iv)法;(2)腹腔注射(intraperitoneal injection, ip)法。ip法可致更严重和持久的损伤。诱导SAP模型方法为ip CAE 50 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ 连续6次,每次间隔1 h。

CAE诱导过氧化物增殖激活受体基因敲除小鼠SAP,以水肿、坏死、中性粒细胞浸润及血清淀粉酶(serum amylase, SAM)升高为特征,研究发现胰腺和肺的炎症浸润与细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)和P-选择蛋白的表达升高有关^[2]。Moreno *et al*^[3]发现CAE诱导雄性CCR5-缺陷(CCR5-deficient, CCR5^{-/-})小鼠AP胰腺损伤比野生型小鼠更严重,研究显示CCR5^{-/-}导致CC化学增殖素水平升高,加重实验性CAE诱导的AP,表明CCR5表达能调节AP的严重程度。CAE诱导小鼠SAP伴有40%腺泡细胞坏死,但诱导大鼠和其他动物通常为轻型和普遍自限性^[4]。此外,Andraus *et al*^[5]将CAE诱导的AP放入中度低温(28 $^{\circ}\text{C}$ -32 $^{\circ}\text{C}$)环境中,发现能加重AP大鼠的炎症反应,可能的机制是在这过程中加速了氧化还原反应的不平衡。总之,CAE诱导基因工程小鼠易得到SAP模型,但研究成本较高,较难推广。

CAE诱导SAP可能机制是大剂量CAE刺激胰酶分泌,引起胰酶异常激活造成胰腺及其他器官损伤。胰酶激活磷脂酶A2(phospholipase A2, PLA2)转化脑磷脂和卵磷脂变成高度细胞毒性的溶血脑磷脂和溶血卵磷脂,损伤血脑屏障,溶解细胞膜的磷脂结构,水解线粒体,导致大脑代谢障碍和水肿^[6]。CAE诱导SAP是否存在其他途径机制还需继续探索证实。

2 无胆盐乙硫氨酸饮食法

为寻找简单易行复制SAP方法,1975年Iombardi *et al*^[7]用无胆盐乙硫氨酸(choline deficient ethionine supplemental, CDE)喂食法成功诱导雌性幼

小鼠SAP。CDE基本配方为蔗糖55.8%,猪油20%,大豆蛋白10%,配以无机盐和各种维生素,再加3%乙硫氨酸。CDE诱导雌性幼鼠SAP,随后发生胰腺及弥漫性腹腔脂肪坏死和若干全身效应如缺氧、酸中毒、血容量减少。为确保同质性和重复性,小鼠的体重、性别、年龄和摄食必须相近匹配,该模型可通过控制饮食CDE的不同持续时间而控制其死亡率。

CDE诱发小鼠SAP机制未阐明,且模型易并发高血糖和低血钙等内分泌紊乱症状,可控性较差,不适宜对新诊疗技术价值评估和成批复制。但成模稳定,复制简便,属非侵入性方法,对内环境影响小,能良好的模拟人体SAP病理生理变化,适于SAP发病机制的探讨和药物效果的研究。此外,Jerrells *et al*^[8]用乙醇(提供36%热量)混合饮食法(通常超过10 d)诱导6-8 mo龄雌性C57BL/6小鼠胰腺炎,研究显示乙醇消耗不会产生胰腺损伤,但在感染强毒病毒后导致更严重和长远的胰腺炎,有趣的是在感染无毒株病毒后也如此,这与病毒在胰腺和脾脏的增加和降低对病毒体液免疫反应有关。

3 L-精氨酸诱导法

1984年Mizunuma *et al*^[9]开创L-精氨酸(L-arginine, L-Arg)复制AP,此后L-Arg便用于动物SAP模型研究。方法:ip L-Arg(2-3 g/kg)2次或3次,每次间隔1 h。L-Arg诱发SAP的机制还未明了,许多研究显示与一氧化氮(nitrogen monoxidum, NO)、细胞因子、氧自由基等介导组织细胞损伤有关。龙友明 *et al*^[10]认为大剂量L-Arg使NO生成增多,NO与巯基作用,使与能量代谢或抗氧化相关酶失活;与铁-硫基团结合,干扰能量代谢;使超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)发生酪氨酸硝基化,丧失其保护作用;直接损伤DNA,导致细胞死亡;降低循环血压,使胰腺血流灌注减少。促炎因子(IL-1, IL-18, TNF- α 等)和抗炎因子(IL-11, IL-10, C5a等)的失衡已被认为是SAP并发远处器官功能损伤的重要因素。有研究示P物质能直接激活TK腺泡细胞受体介导大鼠AP炎症反应^[11]。Rajinder *et al*^[12]对雄性C57BL/6和Balb/c小鼠ip L-Arg(4 g/kg)2剂,间隔1 h诱发SAP模型,发现注射L-Arg后SAM和胰腺髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)均升高,48 h后胰腺MPO活性显著升高,72 h后达到高峰,与SAM高峰相一致,L-Arg损伤胰腺缓慢,于72 h达到高峰,接着高峰损伤,模型组胰腺切片显示

相关报道

近年来人们科研中常用的SAP复制法为Aho改良法,该法技术成熟,效果可靠,成功率较高,然而开腹创伤大、出血多、死亡率和成本均高。现行各种复制法均有优劣,联合法诱导也许是今后寻找理想模型的突破口,CAE联合GDOC较为常用,但其诱发SAP机制未明了,需继续研究。

显著积液, 组织结构紊乱, 腺泡细胞空泡化, 广泛的腺泡细胞坏死和中性粒细胞浸润。

L-Arg诱发SAP简便、价廉、重复性好, 胰腺病变均匀, 对内环境影响小, 损伤小, 且减少了外源性细菌感染机会, 胰腺损害呈现剂量和时间依赖性, 为研究SAP各阶段病变机制和防治提供了良好的途径。

4 逆行注射法

目前最热点的诱发SAP方法, 以模拟胰胆管阻塞, 胆汁和胰液反流为理论基础, 多经主胰胆管逆行注射胰酶激活物或活性胰酶, 能较高成功率的复制动物SAP模型。最常用注射物为3%-5%牛黄胆酸钠(sodiaurocholate, ST), 尚有脱氧胆酸(glycodeoxycholic acid, GDOC)、胆汁混合胰酶、细菌及其毒素等。早期实验主要用狗, 现普遍使用大鼠。逆行注射法分切开十二指肠插管法、直接十二指肠穿刺法及直接胆胰管穿刺法。

4.1 切开十二指肠插管逆行注射法 Aho *et al*^[13]

首次采用开腹经十二指肠头, 向胰胆管内逆行注射5% ST成功模拟胆汁反流诱发大鼠SAP模型。Zhang *et al*^[14]建模后观察到SAP大鼠胰腺充血, 水肿, 片状坏死和大量白细胞浸润, 多器官均有病理变化并与临床SAP相似, 有助于多器官损伤发病机制和治疗研究, 研究认为该法创伤小, 操作便捷和成功率高, 是实验研究的理想动物模型。SAP时Caspase-1/ICE活性以及IL-1和IL-18超量产生对肺部损伤发挥重要作用^[15]。近来Lutgendorff *et al*^[16]发现SAP屏障功能障碍是以上皮细胞凋亡和紧密连接蛋白的变更为特征, 并与脂质过氧化作用相联系。Zhang *et al*^[17]以高剂量地塞米松治疗SAP大鼠, 观察到治疗组炎症介质明显降低, 胰头和胰尾细胞凋亡指数升高, 其治疗机制与抑制炎症介质产生和诱导胰腺腺泡细胞凋亡相关。Bax蛋白表达于胰腺腺泡细胞与SAP严重度呈负相关, 而模型组胰头腺泡细胞Bcl-2蛋白表达逐渐增加, 与其病理变化的严重度相关, Bcl-2表达在12 h高于治疗组($P<0.01$), 研究表明地塞米松上调Bax蛋白和抑制Bcl-2蛋白表达均能保护胰腺细胞^[18]。Zhang *et al*^[19]探索黄芩素和善得定对SAP大鼠肝损伤的保护作用, 结果显示二者通过降低Bcl-2蛋白表达水平而提高Bax二聚体的促细胞凋亡作用, 使肝脏Kupffer细胞和肝细胞凋亡, 从而减轻肝脏的病理变化, 降低血清丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)和天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotrans-

ferase, AST)含量和改善SAP大鼠的生存。最近Matsumura *et al*^[20]发现早期免疫反应的抑制可能是感染性并发症的发生机制。切开十二指肠, 创伤大、易损伤血管致出血, 且有易发生肠漏、肠腔狭窄及腹腔感染等不足, 人们对其进行了许多改良。

4.2 直接十二指肠穿刺法 全麻后行剖腹术找出十二指肠乳头并确定胆胰管开口, 在其对侧肠系膜无血管区钻一小孔将导管逆行插入胆胰管, 以0.2 mL/min的速度灌注诱导剂, 术毕逐层关腹为Aho法改良后常用的复制动物SAP法。Bluth *et al*^[21]在肝门处结扎总胆胰管, 插管后注射3% ST诱发SD大鼠ANP, ANP诱导再生蛋白(regenerating protein, reg-1)受体RNA在胰腺组织中表达, 但reg-1受体表达于腺泡细胞和导管损伤后, 这可能允许reg-1提高其再生作用, 表明reg-1及其受体在胰腺炎损伤反应和康复中均有重要作用。Comert *et al*^[22]按改良法建模并尝试联合高压氧和别嘌呤醇治疗实验性ANP大鼠, 发现联合法能更有效地阻止胰腺损伤进程, 使SAM, 组织病理评分, 氧化应激标记及细菌易位等均有较好改善。

Zhang *et al*^[23]建模后发现肝脏和肾脏核因子- κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)表达水平升高, NF- κ B介导炎症反应致器官损伤。NF- κ B是一种重要的炎症调控因子, SAP时大鼠胰腺组织中NF- κ B过度激活, 活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)生成增加, 而NBD多肽可能通过抑制NF- κ B激活, 调节ROS合成, 使NF- κ B表达减低, ROS合成减少, 胰腺病理损伤减轻^[24]。NF- κ B p65在SAP发生和发展过程中发挥着重要作用, 活化的胰弹性蛋白酶激活NF- κ B p65经TLR4/NF- κ B路径发挥其炎症反应诱导效应, 随后发生胰腺自身消化损伤及胰腺外器官损伤^[25]。体外研究发现NF- κ B表达与ICAM-1 mRNA表达呈正相关, 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激AR42J细胞炎性反应时NF- κ B表达及活性增强, 并调控着致炎细胞因子ICAM-1表达, 认为抑制NF- κ B的表达及活性可能为治疗AP提供新途径^[26]。该法对十二指肠创伤小, 但遗留穿刺孔, 易出现肠漏和腹腔感染, 穿刺针易损伤肠壁及乳头处血管引起出血, 且注射物易经“假道”反流影响复制成功率。

4.3 直接胆胰管逆行注射法 操作特点是直接经胆胰管穿刺逆行注射诱导剂复制SAP。Qiu *et al*^[27]观察到SAP组SAM、内皮素-1(endothelin-1,

创新盘点

本文概述了SAP动物模型研究的相关进展, 包括CAE法、CDE法、*L*-Arg法、逆行注射法、结扎法、联合法、胰腺被膜下注射法; 侧重于对逆行注射法的阐述, 突出了该法在SAP发病机制科研中的重要性, 并提出了联合法建模可能为今后研究方向。

应用要点

本文阐述了建立理想SAP动物模型对研究SAP发病机制有重要作用,不断深入认识发病机制,为探讨和研发临床治疗SAP的理想方案,减少并发症和降低死亡率有一定的现实意义,并为后续的科研提供了方向和思路。

ET-1)、TNF- α 浓度显著升高,低分子量肝素能使上述指标均显著下降($P<0.01$),阻止炎症爆发的启动,并通过抗纤维蛋白酶作用、下调血清ET-1和TNF- α 水平减轻微循环障碍(microcirculatory disorder, MCD)的严重度,提高SAP的生存率。He *et al*^[28]研究显示ST诱导ANP组中谷胱甘肽合成酶(glutathione synthetase, GSH)、SOD和三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)水平显著下降,导致细胞骨架戏剧性改变并早期瓦解和F-肌动蛋白丢失,用康得灵腹膜内治疗大鼠能恢复减少的内源性抗氧化剂(GSH, SOD),限制细胞膜过氧化,减少ATP的消耗。此外, Xu *et al*^[29]用5% ST诱导杂种狗SAP并发肠道感染模型,发现对SAP狗早期生态免疫营养(ecoimmunonutrition, EIN)能维持肠道黏膜屏障完整性和减少细菌迁移发生率。

总之,逆行注射法复制SAP模型效果可靠,但AP的严重度和重复性很大程度上取决于灌注物、灌注压、灌注量和时间,且灌注物的浓度也影响所诱导SAP的严重度,故宜做病因学而非治疗学研究。不足是操作较繁杂、创伤大、费用及死亡率高,然而,逆行注射法技术成熟是目前较理想的SAP制备方法。

5 结扎法

该法为临床科研常用的诱导SAP法,依据是胆管内压力升高,使胆汁、胰液及肠内容物反流进入胰腺,损伤胆胰管黏膜屏障,激活胰酶,引起胰腺损伤,继发全身炎症反应和多器官功能障碍严重后果。结扎法分十二指肠闭袢法和单纯胆胰管结扎法。前者为结扎十二指肠乳头近、远两端肠腔导致十二指肠内容物(胆汁、胰液和肠内容物)反流入闭袢环,逆流入胆胰管,可诱导不同严重度的AP大鼠。缺陷是该法易致细菌易位而不利推广。Sawa *et al*^[30]诱发雌性C3H/HeN小鼠SAP模型,并ip抗高迁移率族-1(anti-high mobility group box 1, Anti-HMGB1), SAP时Anti-HMGB1可显著减轻SAM升高水平及胰腺和肺的组织学改变,且明显改善SAP时血清ALT和肌酐的升高,却加重了肠道细菌易位至胰腺,表明高迁移率族-1(high mobility group box 1, HMGB1)在SAP炎症反应和器官损伤中可能是一个关键介质。Yang *et al*^[31]发现缓释丙酮酸乙酯疗法能降低实验性SAP大鼠血清HMGB1水平,减轻SAP的严重程度,保护远处器官免受损伤并延长SAP大鼠的生存时间,推测对SAP患者也可

能有效。胆胰管结扎法为在奥狄括约肌处结扎总胆胰管,使胰液流出受阻和潜在胆汁反流入胰管产生胰腺炎。有学者统计该法只在美洲鼠才致SAP^[4]。因单纯结扎胆胰管诱导SAP动物局限,不适推广。

十二指肠闭袢法成模与人体胆汁反流性SAP相似且稳定,但阻断肠道致胃潴留,干扰了机体内环境,胆胰管内压力随时间推移而升高, SAP进展快且死亡率高,故该法只适合短期病因学而不宜中长期治疗研究,限制普及。

6 胰腺被膜下注射法

是复制SAP常用方法,机制为被膜下注射诱导剂直接损伤胰腺细胞,使腺泡细胞破裂释放胰酶,并激活胰酶造成胰腺自身消化,出血和坏死,胰酶入血继发MCD和多器官损伤。诱导剂有ST、GDOC、胆汁混合胰酶等,以ST最常用。操作是全麻动物后行剖腹术,找出确认胰腺,用5号注射针逆行刺入胰腺被膜下缓慢注射诱导剂,使被膜均匀隆起,注毕拔针压迫针口2 min,逐层关腹。5% ST诱导SD大鼠ANP 5-10 min后,胰腺水肿和点状出血,血流显著减慢($P<0.01$), ANP组病理恶化明显,肠内MPO活性明显升高($P<0.01$),研究显示肠内血流与MPO活性呈负相关($r = -0.981, P<0.01$),与病理学评分呈负相关($r = -0.922, P<0.05$),认为MCD是ANP肠道损伤的一个重要因素^[32]。Zhang *et al*^[33]发现胰腺的病理变化随时间延长而变得更严重, ANP组肺病理变化明显加重,肺湿/干比重显著增加($P<0.05$), MPO活性显著高于对照组($P<0.01$),认为MCD是ANP肺损伤的重要因素。Dang *et al*^[34]观察到ANP组血清IL-2水平显著高于对照组($P<0.01$),并在6 h时达到高峰,血清IL-10水平在6 h和12 h时显著高于对照组($P<0.01$), IL-2/IL-10值在0.5 h和2 h时显著高于对照组($P<0.01$), ANP组病理变化明显加重。SAP早期观察到胃血流减少和炎症介质增加,这在胃黏膜损伤中为重要因素^[35]。该法建模可靠、制备简单、快捷, SAP病程进展较缓,死亡率相对低,适于SAP及并发症治疗学研究,缺点是易损伤被膜下血管致出血,影响模型评价。

7 联合法

鉴于以上各种复制法均有其缺陷,联合法诱导SAP可能是较为理想的方法,他综合各法优点,趋长避短。Kleinhans *et al*^[36]以1 mL/h速度

iv CAE 5 mg/(kg·h)超过6 h, 联合ip GDOC(10 mmol/L)成功复制SAP模型, 并观察到胰腺明显MCD及白细胞粘连. 联合法诱导SAP机制还未清楚, 可能与胰腺MCD、多种炎症因子及补体的释放与激活有关, 尚需进一步求证. Hackert *et al*^[37]在容量、时间和压力控制下ip GDOC(2.5 mmol/L)入胰管联合动脉内注射CAE 5 μg/(kg·h)超过6 h诱导SAP, 活体显微镜检查发现SAP组血小板-内皮相互作用显著增多, 红细胞速率减慢, 白细胞黏附性增强, 研究显示SAP急性期血小板激活发挥着重要作用, 血小板-内皮相互作用在轻型AP期间是短暂的, 但在SAP是牢固的吸附相连引起凝集和灌注衰竭, 血小板-内皮及血小板-白细胞相互作用以及血栓素的释放在AP进展中有不同的重要性. Chen *et al*^[38]研究显示AP引起血小板激活因子释放, 诱导系统效应有助于MCD和多器官功能衰竭, 并示为SAP进展中的关键介质, 导致并发症和难以承受的高死亡率. Hartwig *et al*^[39]将导管套入胆胰管并重力引流胆汁和胰液5 min后在肝门处夹闭总肝管, 在一定条件下逆行注射GDOC氢氧化钠缓冲液进入胆胰管, 并iv CAE 6 h后成功诱导Wistar大鼠SAP, 研究发现SAP大鼠血浆C3a水平显著升高并强力激活补体, 以补体和白细胞间相互作用为基础, 通过可溶性补体受体-1抑制补体、阻断其激活, 使C3a水平和总溶血活性下降, 这在SAP白细胞相关性器官损伤的治疗中可能是一个有用的选择.

联合法诱导SAP胰腺坏死均匀, 病理形态与人类相似, 并可通过改变GDOC浓度、剂量及注射速度人为的控制AP严重程度, 适合SAP各病变阶段病因及治疗学研究. 此外, CAE联合LPS腹腔注射亦可诱导ANP模型. 联合法操作简单, 重复性好、成模快且稳定, 是一种比较理想的建模方法, 适合推广.

8 结论

探索尽可能重现人类SAP发病过程的理想动物模型, 应具备操作简便、重复性好、价廉、发病机制和治疗反应等与人类SAP相似, 目的是寻找理想的SAP治疗方案. 尽管人们已探索过多种方法, 如CAE法、L-Arg法、逆行注射法等, 但各法均有其优劣, 都不能完全解释SAP病程中病理生理变化, 只能依不同研究目的选择相应模型. SAP并发症多且重, 是其高死亡率主因, 探索SAP并发症模型及其发病机制和治疗策略是

今后研究的新视窗, 分个器官发病机制的探讨, 后再系统总结内在联系串联成体系可能是探索SAP疾病的突破口. 联合改良现有建模法, 也许是系统研究SAP发病机制的切入点.

9 参考文献

- 1 Lampel M, Kern HF. Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1977; 373: 97-117
- 2 Genovese T, Mazzone E, Di Paola R, Muia C, Crisafulli C, Malleo G, Esposito E, Cuzzocrea S. Role of peroxisome proliferator-activated receptor- α in acute pancreatitis induced by cerulein. *Immunology* 2006; 118: 559-570
- 3 Moreno C, Nicaise C, Gustot T, Quertinmont E, Nagy N, Parmentier M, Louis H, Devière J. Chemokine receptor CCR5 deficiency exacerbates cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G1089-G1099
- 4 van Minnen LP, Blom M, Timmerman HM, Visser MR, Gooszen HG, Akkermans LM. The use of animal models to study bacterial translocation during acute pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 2007; 11: 682-689
- 5 Andraus W, Jukemura J, Dutra F, Bechara E, Cunha JE, Leite KR, Machado MC. Oxidative stress is enhanced by hypothermia imposed on cerulein-induced pancreatitis in rats. *Clinics (Sao Paulo)* 2007; 62: 483-490
- 6 Zhang XP, Tian H. Pathogenesis of pancreatic encephalopathy in severe acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6: 134-140
- 7 Lombardi B, Rao NK. Acute hemorrhagic pancreatic necrosis in mice. Influence of the age and sex of the animals and of dietary ethionine, choline, methionine, and adenine sulfate. *Am J Pathol* 1975; 81: 87-100
- 8 Jerrells TR, Vidlak D, Strachota JM. Alcoholic pancreatitis: mechanisms of viral infections as cofactors in the development of acute and chronic pancreatitis and fibrosis. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 430-439
- 9 Mizunuma T, Kawamura S, Kishino Y. Effects of injecting excess arginine on rat pancreas. *J Nutr* 1984; 114: 467-471
- 10 龙友明, 陈垦, 谢文瑞. L-精氨酸制备大鼠急性轻症胰腺炎模型的研究. *广东药学院学报* 2006; 22: 662-664
- 11 Broccardo M, Linari G, Agostini S, Amadoro G, Carpino F, Ciotti MT, Petrella C, Petrozza V, Severini C, Improta G. Expression of NK-1 and NK-3 tachykinin receptors in pancreatic acinar cells after acute experimental pancreatitis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G518-G524
- 12 Dawra R, Sharif R, Phillips P, Dudeja V, Dhaulakhandi D, Saluja AK. Development of a new mouse model of acute pancreatitis induced by administration of L-arginine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G1009-G1018
- 13 Aho HJ, Koskensalo SM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1980; 15: 411-416
- 14 Zhang XP, Ye Q, Jiang XG, Ma ML, Zhu FB, Zhang

名词解释

高迁移率族-1: 一种高度保守的核蛋白, 广泛分布于哺乳动物细胞中, 有多种细胞生物效应, 也为细胞骨架蛋白并参与转录调节, 具有致死作用, 是内毒素致死效应晚期重要炎症介质, 此外, 对血液系统和免疫系统亦有影响.

同行评价

本文较为全面论述了重症急性胰腺炎实验动物模型的研究进展,内容较全面,层次较为清楚,逻辑性强,参考文献新,对临床上开展重症急性胰腺炎动物实验有重要的参考价值。

- RP, Cheng QH. Preparation method of an ideal model of multiple organ injury of rat with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4566-4573
- 15 Zhang XH, Zhu RM, Xu WA, Wan HJ, Lu H. Therapeutic effects of caspase-1 inhibitors on acute lung injury in experimental severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 623-627
- 16 Lutgendorff F, Nijmeijer RM, Sandström PA, Trulsson LM, Magnusson KE, Timmerman HM, van Minnen LP, Rijkers GT, Gooszen HG, Akkermans LM, Söderholm JD. Probiotics prevent intestinal barrier dysfunction in acute pancreatitis in rats via induction of ileal mucosal glutathione biosynthesis. *PLoS One* 2009; 4: e4512
- 17 Zhang XP, Chen L, Hu QF, Tian H, Xu RJ, Wang ZW, Wang KY, Cheng QH, Yan W, Li Y, Li QY, He Q, Wang F. Effects of large dose of dexamethasone on inflammatory mediators and pancreatic cell apoptosis of rats with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5506-5511
- 18 Zhang XP, Tian H, Lu B, Chen L, Xu RJ, Wang KY, Wang ZW, Cheng QH, Shen HP. Tissue microarrays in pathological examination of apoptotic acinar cells induced by dexamethasone in the pancreas of rats with severe acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6: 527-536
- 19 Zhang XP, Zhang J, Ren Z, Feng GH, Zhu W, Cai Y, Yang QJ, Ju TF, Xie Q, Yuan WQ. Study on protecting effects of baicalin and octreotide on hepatic injury in rats with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6551-6559
- 20 Matsumura N, Takeyama Y, Ueda T, Yasuda T, Shinzeki M, Sawa H, Nakajima T, Kuroda Y. Decreased expression of Toll-like receptor 2 and 4 on macrophages in experimental severe acute pancreatitis. *Kobe J Med Sci* 2007; 53: 219-227
- 21 Bluth MH, Patel SA, Dieckgraefe BK, Okamoto H, Zenilman ME. Pancreatic regenerating protein (reg I) and reg I receptor mRNA are upregulated in rat pancreas after induction of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4511-4516
- 22 Comert B, Isik AT, Aydin S, Bozoglu E, Unal B, Deveci S, Mas N, Cinar E, Mas MR. Combination of allopurinol and hyperbaric oxygen therapy: a new treatment in experimental acute necrotizing pancreatitis? *World J Gastroenterol* 2007; 13: 6203-6207
- 23 Zhang XP, Zhang L, Chen LJ, Cheng QH, Wang JM, Cai W, Shen HP, Cai J. Influence of dexamethasone on inflammatory mediators and NF-kappaB expression in multiple organs of rats with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 548-556
- 24 谢文瑞, 陈垦, 阳小雅, 龙友明, 王晖, 刘君君, 杨剑. 核因子- κ B在急性胰腺炎中的激活及NBD多肽的干预作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1980-1984
- 25 Xia SH, Fang DC, Hu CX, Bi HY, Yang YZ, Di Y. Effect of BN52021 on NFkappa-Bp65 expression in pancreatic tissues of rats with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 882-888
- 26 刘学进, 陈垦, 龙友明, 王晖, 谢文瑞. 不同浓度的脂多糖刺激AR42J细胞对NF- κ B及ICAM-1表达的影响. *广东药学院学报* 2007; 23: 71-75
- 27 Qiu F, Lü XS, Huang YK. Effect of low molecular weight heparin on pancreatic micro-circulation in severe acute pancreatitis in a rodent model. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120: 2260-2263
- 28 He ZY, Guo RX. Effects of chondroitin sulfate on alteration of actin cytoskeleton in rats with acute necrotizing pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6: 537-543
- 29 Xu GF, Lu Z, Gao J, Li ZS, Gong YF. Effect of ecoimmunonutrition supports on maintenance of integrity of intestinal mucosal barrier in severe acute pancreatitis in dogs. *Chin Med J (Engl)* 2006; 119: 656-661
- 30 Sawa H, Ueda T, Takeyama Y, Yasuda T, Shinzeki M, Nakajima T, Kuroda Y. Blockade of high mobility group box-1 protein attenuates experimental severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7666-7670
- 31 Yang ZY, Ling Y, Yin T, Tao J, Xiong JX, Wu HS, Wang CY. Delayed ethyl pyruvate therapy attenuates experimental severe acute pancreatitis via reduced serum high mobility group box 1 levels in rats. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4546-4550
- 32 Zhang JX, Dang SC, Qu JG, Wang XQ. Preventive effect of tetramethylpyrazine on intestinal mucosal injury in rats with acute necrotizing pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6386-6390
- 33 Zhang JX, Dang SC. Ligustrazine alleviates acute lung injury in a rat model of acute necrotizing pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006; 5: 605-609
- 34 Dang SC, Zhang JX, Qu JG, Mao ZF, Wang XQ, Zhu B. Dynamic changes of IL-2/IL-10, sFas and expression of Fas in intestinal mucosa in rats with acute necrotizing pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2246-2250
- 35 Dang SC, Zhang JX, Qu JG, Wang XQ, Fan X. Ligustrazine alleviates gastric mucosal injury in a rat model of acute necrotizing pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6: 213-218
- 36 Kleinhans H, Mann O, Schurr PG, Kaifi JT, Hansen B, Izbicki JR, Strate T. Oxygen radical formation does not have an impact in the treatment of severe acute experimental pancreatitis using free cellular hemoglobin. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2914-2918
- 37 Hackert T, Pfeil D, Hartwig W, Fritz S, Schneider L, Gebhard MM, Büchler MW, Werner J. Platelet function in acute experimental pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 2007; 11: 439-444
- 38 Chen C, Xia SH, Chen H, Li XH. Therapy for acute pancreatitis with platelet-activating factor receptor antagonists. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4735-4738
- 39 Hartwig W, Klafs M, Kirschfink M, Hackert T, Schneider L, Gebhard MM, Büchler MW, Werner J. Interaction of complement and leukocytes in severe acute pancreatitis: potential for therapeutic intervention. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G844-G850

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

内皮素B受体基因与先天性巨结肠关系的研究进展

张万里, 王国斌, 陶凯雄

张万里, 王国斌, 陶凯雄, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科 湖北省武汉市430022
国家自然科学基金资助项目, No. 30872473
作者贡献分布: 本综述由张万里写作; 王国斌与陶凯雄审核。
通讯作者: 陶凯雄, 医学博士, 主任医师, 博士研究生导师, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科. kaixgtao@public.wh.hb.cn
电话: 027-85351619
收稿日期: 2009-03-06 修回日期: 2009-05-13
接受日期: 2009-05-18 在线出版日期: 2009-09-08

Advances in research of the relationship between endothelin receptor type B and Hirschsprung's disease

Wan-Li Zhang, Guo-Bin Wang, Kai-Xiong Tao

Wan-Li Zhang, Guo-Bin Wang, Kai-Xiong Tao, Department of General Surgery, Wuhan Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30872473

Correspondence to: Kai-Xiong Tao, Department of General Surgery, Wuhan Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. kaixgtao@public.wh.hb.cn
Received: 2009-03-06 Revised: 2009-05-13
Accepted: 2009-05-18 Published online: 2009-09-08

Abstract

The endothelin receptor type B (EDNRB)/endothelin-3 (EDN3)/endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1) signaling pathway plays an important role in the differentiation and migration of neural crest cells to form ganglion cells during embryonic development. Mutations in the EDNRB gene can give rise to abnormalities in the EDNRB/EDN3/ECE-1 signaling pathway and terminate the migration of neural crest cells. The absence of ganglion cells in the myenteric and submucosal plexuses of the distal colon and rectum results in the development of Hirschsprung's disease.

Key Words: Endothelin receptor type B; Hirschsprung's disease; Gene mutation

Zhang WL, Wang GB, Tao KX. Advances in research of

the relationship between endothelin receptor type B and Hirschsprung's disease. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(25): 2607-2611

摘要

EDNRB/EDN3/ECE-1信号传导通路在胚胎发育期神经嵴细胞分化、迁移、发育为神经节细胞的过程中起到关键作用. 内皮素B受体(endothelin receptor type B, EDNRB)基因突变导致该信号传导通路异常, 神经嵴细胞迁移停顿, 远端结肠肌层间和黏膜下神经丛神经节细胞缺如而发生先天性巨结肠.

关键词: 内皮素B受体; 先天性巨结肠; 基因突变

张万里, 王国斌, 陶凯雄. 内皮素B受体基因与先天性巨结肠关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17(25): 2607-2611
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2607.asp>

0 引言

先天性巨结肠(Hirschsprung's disease, HD)又称无神经节细胞症, 是一种受环境与遗传因素共同影响的神经嵴细胞源性多基因性疾病, 在新生儿中发病率约1/5000, 男女发病率之比为4:1^[1]. 其发病机制为患儿在胚胎发育过程中, 遗传因素和环境因素造成神经嵴细胞分化、迁移、发育障碍, 肌层和黏膜下神经丛的神经节细胞缺如, 导致受累肠段异常收缩, 近端肠段代偿性扩张与肥厚^[2-3]. HD可以分成两类表型: 病变不超过乙状结肠上部占患者总数80%的短节段表型(short-segment HSCR)和病变到达乙状结肠底部占患者总数20%的长节段表型(long-segment HSCR)^[4]. 根据发病来源分类又分成散发性和家族性, 其中家族性约占20%. HD的基本病理变化是在肠壁肌间和黏膜下的神经丛内缺乏神经节细胞, 无髓鞘性的副交感神经纤维数量增加且变粗, 病变肠段痉挛状态, 90%左右的病例无神经节细胞肠段位于直肠和乙状结肠远端, 个别病例甚至波及全结肠、末端回肠或仅在直肠末端^[5]. HD的发病机制目前认为与环境因素和遗传因素相关, 其中环境因

背景资料

EDNRB基因在先天性巨结肠的发生中扮演着重要角色, 其发生突变导致胚胎发育期间EDNRB/EDN3/ECE-1信号传导通路异常, EDNRB基因突变有碱基缺失, 插入, 错配等形式.

同行评议者

王正康, 教授, 北京中日友好医院普外科

研究前沿
研究EDNRB基因突变导致先天性巨结肠是当前的研究热点,目前对环境因素如何产生EDNRB基因突变没有明确的机制。

素在HD发生中起着更为重要的作用。迄今为止,已经发现内皮素B受体(endothelin receptor type B, EDNRB)、原癌基因(ret proto-oncogene, RET)^[6]、胶质细胞源性神经营养因子(glial cell derived neurotrophic factor, GDNF)、NRTN^[7]、内皮素转换酶1(endothelin converting enzyme 1, ECE1)^[8]、内皮素3(endothelin 3, ET3)、SOX10^[9]、SIP1^[10]、KIAA1279^[11]以及NTRK3^[12]等10种基因与HD发生有关。在所有HD患者中EDNRB基因突变作为病因约占5%-10%,在HD致病病因中仅次于RET占第2位^[13]。

1 EDNRB

EDNRB由442个氨基酸构成,是一种G蛋白偶联受体, N端在细胞外侧, C端形成细胞内的尾巴,中段形成7个跨膜的 α 螺旋结构和3个细胞外环和3个细胞内环^[14]。EDNRB在人体内除脂肪细胞、结缔组织、软骨、红细胞、血小板外广泛存在,特别是在结肠的肠肌层神经丛、黏膜层、神经节、黏膜下层的血管中含量较高^[15-16]。在生理情况下定位于细胞膜,属于G蛋白偶联受体超家族。EDNRB与配体内皮素(endothelin, ET)结合,通过细胞内 Ca^{2+} 磷脂依赖性蛋白激酶第二信使系统将信息传入细胞内,促进内质网和肌浆网内钙储库内 Ca^{2+} 迅速释放,胞质内 Ca^{2+} 浓度迅速升高^[17]。内皮素家族包括三种亚型ET-1, ET-2和ET-3,内皮素在人体内分布存在差异,不同组织存在的数量和活性不同^[18]。EDNRB与3种配体均具有亲和力,其中与ET-3亲和力最强。ET多为无活性的多肽前体,通过两步水解反应生成具有活性的大内皮素(big ET),大内皮素在特定的内皮素转换酶(endothelin converting enzyme, ECE)作用下生成活性ET作为配体与EDNRB结合激活胞内相关第二信使系统将信息传入胞内^[19]。胚胎发育过程中,EDNRB/ET-3在神经嵴细胞迁移发育分化成神经节细胞时候扮演着重要角色,对结直肠肠神经系统形成不可缺少^[20]。

EDNRB基因位于13号染色体q22,长度大约为24 kb, GenBank ID1910,含有7个外显子6个内含子,其编码产物EDNRB,与配体ET结合传递来自细胞外的信号,其介导的信息通路对肠神经节细胞的正常分化发育形成有重要作用。目前发现EDNRB基因参与血管发育并维持其正常功能,以及促进神经嵴细胞和黑色素细胞生长和分化,与Waardenburg综合征,黑色素瘤以及

HD等疾病的发病相关^[21-23]。

2 EDNRB基因突变与HD

正常的EDNRB基因经过转录和翻译2个步骤产生无活性EDNRB前体,在转录过程中,转录因子调控EDNRB基因转录活性,转录因子缺陷以及EDNRB基因本身原因会下调或者终止转录;翻译过程中,mRNA碱基序列异常可能会导致不能翻译成正常具有受体活性的蛋白质产物,转录和翻译过程出现异常均会导致EDNRB合成减少甚至完全消失^[24],使得正常的EDNRB/EDN3/ECE1信号传导路径由于缺少受体而产生HD。从分子水平上影响基因转录的DNA分子突变原因包括:错配(mismatch),缺失(deletion),插入(insertion),其中错配可能导致编码氨基酸的改变产生错义突变或者mRNA翻译提前遇到终止密码子而结束产生无义突变,而缺失、插入均可能导致框移(frame shift)突变产生。

越来越多的文献报道EDNRB表达异常与HD存在相关性。1994年Puffenberger *et al*^[25]对HD患者EDNRB基因测序检测,发现第四个外显子G→T错义突变(W276C),该突变导致EDNRB高度保守的第五段跨膜螺旋276位色氨酸被半胱氨酸取代,变异EDNRB介导诱导产生量依赖性的短暂性 Ca^{2+} 流量水平下降。Auricchio *et al*^[26]在17个非近亲结婚后代HD患者检测发现两个新的EDNRB突变位点:散发性巨结肠患者外显子5处错义突变S305N,使得mRNA翻译时相应的丝氨酸被天冬酰胺取代,导致正常的磷脂化结合位点功能缺失;家族性巨结肠患者外显子7处单核酸缺失突变N378I,导致转录提前终止产生不完全mRNA,翻译成的EDNRB结构不完整,失去正常功能。Kusafuka *et al*^[13,27]于1996年与1997年在HD患者中检测到2个单个碱基替换:外显子四处275G→A, 827G→A, 878位插入T, 3种突变均产生终止密码子,mRNA翻译提前遇到终止密码子而产生无功能的EDNRB。1998年Tanaka *et al*^[28]发现3个新突变,2个替换:外显子2处311位A与T(N104I)和325位T被C取代(C109R),外显子7处1170位C与A(S390R),其中S390R和C109R突变和HSCR相关。Abe *et al*^[29]发现HD患者A183G、W276C、R319W、M374I、P383L等5个无功能错义突变,人工诱导该部位突变检测胞内 Ca^{2+} 浓度和胞膜EDNRB表达水平,发现两者明显下降,5个错义突变导致的EDNRB与ET-1结合能力存

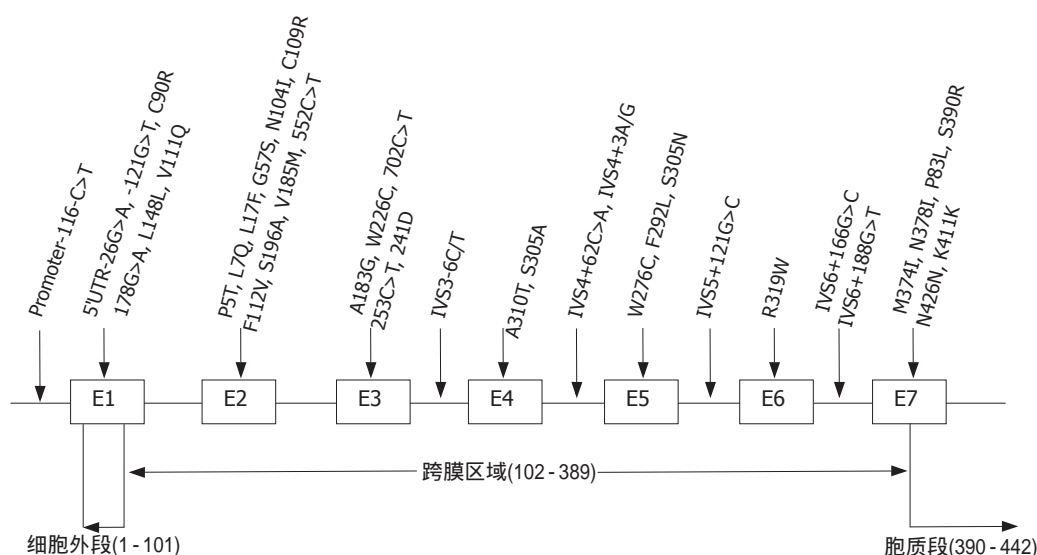


图1 HD患者EDNRB基因突变位点和相应碱基变化。方框显示外显子相对位置, 其编号E1-E7, 外显子之间为内含子, 上排箭头表示检测到的基因突变, 下面表示EDNRB在细胞膜分布。

相关报道

Lin *et al*总结了先天性巨结肠患者中EDNRB基因突变位点和突变形式, 提示了EDNRB基因的突变潜在热点。

在差异, EDNRB基因突变位点影响EDNRB与内皮素结合能力。这些检测到的自然自然状态下EDNRB基因自然突变揭示了其与HD的产生紧密相关。1994年Hosoda *et al*^[30]通过体外杂交实验证实EDNRB基因缺失可以产生巨结肠, EDNRB基因剔除制作的转基因小鼠模型, 其他部位的大体结构正常, 结肠内也是局部短段结肠内无神经节细胞, 而不是全部结肠。Yamada *et al*^[31]在EDNRB基因内含子1处插入一段反转录类元素导致EDNRB表达下降。Druckenbrod *et al*^[32]小鼠胚胎干细胞靶向将loxP位点插入第3个外显子侧翼, 导致转录的mRNA剪接时由于外显子3变异而将外显子2和4剪接在一起, 制作成嵌合体小鼠, 该小鼠表型为HD。这些非自然状态下诱导的EDNRB基因突变模型重现HD发病过程, 诠释了EDNRB基因突变和HD之间的因果关系。总结所有HD患者中检测到的EDNRB基因突变位点和碱基变化见图1。

3 EDNRB基因突变与种族地域等环境因素

EDNRB基因突变目前没有找到明确的发生原因, 对于非家族遗传性患者, 突变发生的起因仍然没有明确的答案^[33]。不同的地域以及不同的种族之间基因突变率和突变位点各不相同。Inoue *et al*^[34]对日本患者EDNRB基因突变检测, 发现外显子3处TGCAGGTAAATTT→TGCAGGCAAATTT。1999年Sakai *et al*^[35]发现HD外显子1非编码区域G→A, 次年检测发现外显子1非编码区域26G→A, 外显子4处

A301T突变, 在所有检测的患者中EDNRB基因突变率只有10.7%^[36]。Svensson *et al*^[37]检测瑞典人EDNRB基因C109R、W226C、G57S基因突变, 基因突变率8.7%。Duan *et al*^[38]通过单链构象多态性分析我国患者中发现EDNRB基因外显子3和外显子6处两个基因突变, 突变率为11.8%。Garcia-Barceló *et al*^[39]全面分析我国HD患者EDNRB突变, 发现新的四个碱基突变: P383L, D241D, N426N, IVS4-14T>C。Wu *et al*^[40]对台湾地区人群做EDNRB基因分析, 外显子4单核苷酸发生处SNP现象。Chen *et al*^[41]对1例台湾地区新生儿EDNRB基因外显子1处C90R突变。Kim *et al*^[42]对韩国人散发性HD患者检查发现8处基因突变: promoter-116C>T, 5'UTR-121G>T, IVS4+62C>A, IVS5+121G>C, 831G>A, IVS6+166G>C, IVS6+188G>T, IVS5+121G>C。突变率为83.3%, Moore *et al*^[43]对120例南非HD患者检测分析发现EDNRB基因突变率为3.3%。Sangkhatat *et al*^[44]对泰国南部HD患者EDNRB基因检测, 外显子1处V110Q错义突变, L148L产生转录提前终止, 外显子7处K411K提前终止, 基因突变率为9.8%。

4 结论

HD是一种病因复杂、由多基因与环境因素共同决定的疾病, 其发生率和表型在不同的人群中存在很大的差异。EDNRB是影响胚胎发育期间神经嵴细胞移行、发育、分化的一个重要因素, EDNRB基因碱基的插入、缺失产生框移突

应用要点

本文对EDNRB基因与先天性巨结肠作了全面系统的综述,为进一步了解先天性巨结肠的发病机制提供了新的研究方向。

变,导致mRNA翻译时密码子改变而产生异常EDNRB;碱基替换可能产生终止密码而导致翻译提前终止,这些突变的EDNRB基因在胚胎发育期失去正常的生理功能直接影响结直肠神经丛的产生。EDNRB基因突变能够导致HD的位点很多,主要集中在1、2、3、4、7等5个外显子处,而内含子和启动子突变对其影响不大,其中某些位点在不同的文献报道中均可以检测到,提示这些位点可能是HD的易感位点。基因突变不能完全解释HD病因,种族地域等环境因素和EDNRB基因突变有重要的联系,其不仅影响突变的位点,而且对突变位点的数目以及突变方式至关重要,提示HD的发生与表观遗传学相关。DNA甲基化^[45]、染色质组蛋白化学修饰等可能是环境因素导致疾病发生的原因之一^[46]。众多文献报道,EDNRB基因启动子区域表观遗传学改变与癌症相关^[47-49]。因此,研究EDNRB基因与环境的关系有助于更深入的了解HD发病机制,同时对先天性巨结肠检查筛选、预后推测以及预防有极其重要的意义。

5 参考文献

- 1 Haricharan RN, Georgeson KE. Hirschsprung disease. *Semin Pediatr Surg* 2008; 17: 266-275
- 2 Young HM, Hearn CJ, Newgreen DF. Embryology and development of the enteric nervous system. *Gut* 2000; 47 Suppl 4: iv12-14; discussion iv26
- 3 Goyal RK, Hirano I. The enteric nervous system. *N Engl J Med* 1996; 334: 1106-1115
- 4 Amiel J, Sproat-Emison E, Garcia-Barcelo M, Lantieri F, Burzynski G, Borrego S, Pelet A, Arnold S, Miao X, Griseri P, Brooks AS, Antinolo G, de Pontual L, Clement-Ziza M, Munnich A, Kashuk C, West K, Wong KK, Lyonnet S, Chakravarti A, Tam PK, Ceccherini I, Hofstra RM, Fernandez R. Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. *J Med Genet* 2008; 45: 1-14
- 5 Newgreen D, Young HM. Enteric nervous system: development and developmental disturbances--part 1. *Pediatr Dev Pathol* 2002; 5: 224-247
- 6 Runeberg-Roos P, Saarma M. Neurotrophic factor receptor RET: structure, cell biology, and inherited diseases. *Ann Med* 2007; 39: 572-580
- 7 Fernandez RM, Ruiz-Ferrer M, Lopez-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S. Polymorphisms in the genes encoding the 4 RET ligands, GDNF, NTN, ARTN, PSPN, and susceptibility to Hirschsprung disease. *J Pediatr Surg* 2008; 43: 2042-2047
- 8 Hofstra RM, Valdenaire O, Arch E, Osinga J, Kroes H, Löffler BM, Hamosh A, Meijers C, Buys CH. A loss-of-function mutation in the endothelin-converting enzyme 1 (ECE-1) associated with Hirschsprung disease, cardiac defects, and autonomic dysfunction. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 304-308
- 9 Stanchina L, Baral V, Robert F, Pingault V, Lemort N, Pachnis V, Goossens M, Bondurand N. Interactions between Sox10, Edn3 and Ednrb during enteric nervous system and melanocyte development. *Dev Biol* 2006; 295: 232-249
- 10 Gao H, Li XF, Zhang ZB, Wang WL, Huang Y. [Coding-sequence point mutation and polymorphism analyses of SIP1 gene in Hirschsprung disease] *Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi* 2008; 25: 82-85
- 11 Brooks AS, Bertoli-Avella AM, Burzynski GM, Breedveld GJ, Osinga J, Boven LG, Hurst JA, Mancini GM, Lequin MH, de Coe RF, Matera I, de Graaff E, Meijers C, Willems PJ, Tibboel D, Oostra BA, Hofstra RM. Homozygous nonsense mutations in KIAA1279 are associated with malformations of the central and enteric nervous systems. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 120-126
- 12 Fernández RM, Sánchez-Mejías A, Mena MD, Ruiz-Ferrer M, López-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S. A novel point variant in NTRK3, R645C, suggests a role of this gene in the pathogenesis of Hirschsprung disease. *Ann Hum Genet* 2009; 73: 19-25
- 13 Kusafuka T, Wang Y, Puri P. Mutation analysis of the RET, the endothelin-B receptor, and the endothelin-3 genes in sporadic cases of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 1997; 32: 501-504
- 14 McCallion AS, Chakravarti A. EDNRB/EDN3 and Hirschsprung disease type II. *Pigment Cell Res* 2001; 14: 161-169
- 15 Inagaki H, Bishop AE, Escrig C, Wharton J, Allen-Mersh TG, Polak JM. Localization of endothelinlike immunoreactivity and endothelin binding sites in human colon. *Gastroenterology* 1991; 101: 47-54
- 16 Sakamoto A, Yanagisawa M, Sakurai T, Takuwa Y, Yanagisawa H, Masaki T. Cloning and functional expression of human cDNA for the ETB endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 178: 656-663
- 17 Nakatsuji T, Ieiri S, Masumoto K, Akiyoshi J, Taguchi T, Suita S. Intracellular calcium mobilization of the aganglionic intestine in the endothelin B receptor gene-deficient rat. *J Pediatr Surg* 2007; 42: 1663-1670
- 18 Barton M, Yanagisawa M. Endothelin: 20 years from discovery to therapy. *Can J Physiol Pharmacol* 2008; 86: 485-498
- 19 Kimura S, Kasuya Y, Sawamura T, Shinimi O, Sugita Y, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T. Conversion of big endothelin-1 to 21-residue endothelin-1 is essential for expression of full vasoconstrictor activity: structure-activity relationships of big endothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 Suppl 5: S5-S7; discussion S18
- 20 Shin MK, Levorse JM, Ingram RS, Tilghman SM. The temporal requirement for endothelin receptor-B signalling during neural crest development. *Nature* 1999; 402: 496-501
- 21 Soufir N, Meziani R, Lacapère JJ, Bertrand G, Fumeron F, Bourillon A, Gérard B, Descamps V, Crickx B, Ollivaud L, Archimbaud A, Lebbe C, Basset-Seguin N, Saiag P, Grandchamp B. Association between endothelin receptor B nonsynonymous variants and melanoma risk. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1297-1301
- 22 Moore SW. The contribution of associated congenital anomalies in understanding Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int* 2006; 22:

- 305-315
- 23 Fernandez LP, Milne RL, Pita G, Floristan U, Sendagorta E, Feito M, Avilés JA, Martin-Gonzalez M, Lázaro P, Benítez J, Ribas G. Pigmentation-related genes and their implication in malignant melanoma susceptibility. *Exp Dermatol* 2009; 18: 634-642
 - 24 Oue T, Puri P. Altered endothelin-3 and endothelin-B receptor mRNA expression in Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 1999; 34: 1257-1260
 - 25 Puffenberger EG, Hosoda K, Washington SS, Nakao K, deWit D, Yanagisawa M, Chakravart A. A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease. *Cell* 1994; 79: 1257-1266
 - 26 Auricchio A, Casari G, Staiano A, Ballabio A. Endothelin-B receptor mutations in patients with isolated Hirschsprung disease from a non-inbred population. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 351-354
 - 27 Kusafuka T, Wang Y, Puri P. Novel mutations of the endothelin-B receptor gene in isolated patients with Hirschsprung's disease. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 347-349
 - 28 Tanaka H, Moroi K, Iwai J, Takahashi H, Ohnuma N, Hori S, Takimoto M, Nishiyama M, Masaki T, Yanagisawa M, Sekiya S, Kimura S. Novel mutations of the endothelin B receptor gene in patients with Hirschsprung's disease and their characterization. *J Biol Chem* 1998; 273: 11378-11383
 - 29 Abe Y, Sakurai T, Yamada T, Nakamura T, Yanagisawa M, Goto K. Functional analysis of five endothelin-B receptor mutations found in human Hirschsprung disease patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275: 524-531
 - 30 Hosoda K, Hammer RE, Richardson JA, Baynash AG, Cheung JC, Giaid A, Yanagisawa M. Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* 1994; 79: 1267-1276
 - 31 Yamada T, Ohtani S, Sakurai T, Tsuji T, Kunieda T, Yanagisawa M. Reduced expression of the endothelin receptor type B gene in piebald mice caused by insertion of a retroposon-like element in intron 1. *J Biol Chem* 2006; 281: 10799-10807
 - 32 Druckenbrod NR, Powers PA, Bartley CR, Walker JW, Epstein ML. Targeting of endothelin receptor-B to the neural crest. *Genesis* 2008; 46: 396-400
 - 33 Lin YC, Lai HS, Hsu WM, Lee PI, Chen HL, Chang MH. Mutation analysis of endothelin-B receptor gene in patients with Hirschsprung disease in Taiwan. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; 46: 36-40
 - 34 Inoue M, Hosoda K, Imura K, Kamata S, Fukuzawa M, Nakao K, Okada A. Mutational analysis of the endothelin-B receptor gene in Japanese Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 1998; 33: 1206-1208
 - 35 Sakai T, Wakizaka A, Nirasawa Y, Ito Y. Point nucleotidic changes in both the RET proto-oncogene and the endothelin-B receptor gene in a Hirschsprung disease patient associated with Down syndrome. *Tohoku J Exp Med* 1999; 187: 43-47
 - 36 Sakai T, Nirasawa Y, Itoh Y, Wakizaka A. Japanese patients with sporadic Hirschsprung: mutation analysis of the receptor tyrosine kinase proto-oncogene, endothelin-B receptor, endothelin-3, glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin genes: a comparison with similar studies. *Eur J Pediatr* 2000; 159: 160-167
 - 37 Svensson PJ, Tapper-Persson M, Anvret M, Molander ML, Eng C, Nordenskjöld A. Mutations in the endothelin-receptor B gene in Hirschsprung disease in Sweden. *Clin Genet* 1999; 55: 215-217
 - 38 Duan XL, Zhang XS, Li GW. Clinical relationship between EDN-3 gene, EDNRB gene and Hirschsprung's disease. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2839-2842
 - 39 Garcia-Barceló M, Sham MH, Lee WS, Lui VC, Chen BL, Wong KK, Wong JS, Tam PK. Highly recurrent RET mutations and novel mutations in genes of the receptor tyrosine kinase and endothelin receptor B pathways in Chinese patients with sporadic Hirschsprung disease. *Clin Chem* 2004; 50: 93-100
 - 40 Wu TT, Tsai TW, Chu CT, Lee ZF, Hung CM, Su CC, Li SY, Hsieh M, Li C. Low RET mutation frequency and polymorphism analysis of the RET and EDNRB genes in patients with Hirschsprung disease in Taiwan. *J Hum Genet* 2005; 50: 168-174
 - 41 Chen WC, Chang SS, Sy ED, Tsai MC. A De Novo novel mutation of the EDNRB gene in a Taiwanese boy with Hirschsprung disease. *J Formos Med Assoc* 2006; 105: 349-354
 - 42 Kim JH, Yoon KO, Kim H, Kim JK, Kim JW, Lee SK, Seo JM. New variations of the EDNRB gene and its association with sporadic Hirschsprung's disease in Korea. *J Pediatr Surg* 2006; 41: 1708-1712
 - 43 Moore SW, Zaahl MG. A review of genetic mutation in familial Hirschsprung's disease in South Africa: towards genetic counseling. *J Pediatr Surg* 2008; 43: 325-329
 - 44 Sangkhathat S, Kusafuka T, Chengkriwate P, Patrapinyokul S, Sangthong B, Fukuzawa M. Mutations and polymorphisms of Hirschsprung disease candidate genes in Thai patients. *J Hum Genet* 2006; 51: 1126-1132
 - 45 Serman A, Vlahović M, Serman L, Bulić-Jakus F. DNA methylation as a regulatory mechanism for gene expression in mammals. *Coll Antropol* 2006; 30: 665-671
 - 46 Waggoner D. Mechanisms of disease: epigenesis. *Semin Pediatr Neurol* 2007; 14: 7-14
 - 47 Ellinger J, Bastian PJ, Jurgan T, Biermann K, Kahl P, Heukamp LC, Wernert N, Müller SC, von Ruecker A. CpG island hypermethylation at multiple gene sites in diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Urology* 2008; 71: 161-167
 - 48 Zhou L, Feng X, Shan W, Zhou W, Liu W, Wang L, Zhu B, Yi H, Yao K, Ren C. Epigenetic and genetic alterations of the EDNRB gene in nasopharyngeal carcinoma. *Oncology* 2007; 72: 357-363
 - 49 Yates DR, Rehman I, Abbod MF, Meuth M, Cross SS, Linkens DA, Hamdy FC, Catto JW. Promoter hypermethylation identifies progression risk in bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2046-2053

同行评价
本文介绍了内皮素受体B(EDNRB)突变与先天性巨结肠关系的最新研究进展, 材料较新, 简明扼要, 有参考价值, 唯内容欠丰满。

编辑 李军亮 电编 何基才

兔肝动脉插管技术的方法学及DSA表现

许卫国, 谭国胜, 彭秀斌, 王 于, 陈 伟, 杨建勇

背景资料
经肝动脉向肝脏灌注各种类型的药物是介入放射学临床实践中最重要的工作之一。实验兔是常用的医学实验动物, 在实验研究有着较为广泛的应用, 寻求建立完善有效的肝脏动脉插管途径, 具有十分重要的意义。

许卫国, 彭秀斌, 暨南大学第三附属医院 广东省珠海市人民医院放射科 广东省珠海市 519000
谭国胜, 王于, 陈伟, 杨建勇, 中山大学附属第一医院放射科介入专科 广东省广州市 510000
作者贡献分布: 此研究经费以及设计由杨建勇及谭国胜提供; 研究过程由许卫国、谭国胜及王于完成; 论文由许卫国完成; 实验过程及论文写作由彭秀斌、陈伟及杨建勇提供技术支持和指导。
通讯作者: 谭国胜, 主治医师, 510000, 广东省广州市, 中山大学附属第一医院放射科介入专科. xwg315@163.com
电话: 0756-2157805
收稿日期: 2009-06-22 修回日期: 2009-08-24
接受日期: 2009-08-31 在线出版日期: 2009-09-08

Comparison of transfemoral hepatic artery catheterization and direct hepatic artery catheterization via laparotomy in rabbits

Wei-Guo Xu, Guo-Sheng Tan, Xiu-Bin Peng, Yu Wang, Wei Chen, Jian-Yong Yang

Wei-Guo Xu, Xiu-Bin Peng, Department of Radiology, the Third Affiliated Hospital of Jinan University, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China
Guo-Sheng Tan, Yu Wang, Wei Chen, Jian-Yong Yang, Department of Interventional Radiology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China
Correspondence to: Guo-Sheng Tan, Department of Interventional Radiology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China. xwg315@163.com
Received: 2009-06-22 Revised: 2009-08-24
Accepted: 2009-08-31 Published online: 2009-09-08

Abstract

AIM: To compare the operation duration and operation success rate between transfemoral hepatic artery catheterization and direct hepatic artery catheterization via laparotomy in rabbits.

METHODS: Twenty-four rabbits were randomly divided into two groups: control group and study group. Rabbits in the study group underwent transfemoral hepatic artery catheterization, while those in the control group underwent direct hepatic artery catheterization via laparotomy. The operation duration and operation success rate were compared between the two groups.

RESULTS: No significant difference was noted in the operation success rate between the study group and the control group [91.67% (11/12) vs 75% (8/12), $P > 0.05$]. The mean operation duration was significant lower in the study group than in the control group (41.5 ± 3.6 min vs 58.6 ± 5.4 min, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Transfemoral hepatic artery catheterization is simple, has a high success rate, and is suitable for hepatic artery infusion therapy in rabbits.

Key Words: Hepatic artery; Catheterization; Rabbit

Xu WG, Tan GS, Peng XB, Wang Y, Chen W, Yang JY. Comparison of transfemoral hepatic artery catheterization and direct hepatic artery catheterization via laparotomy in rabbits. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(25): 2612-2615

摘要

目的: 探讨实验兔肝动脉插管的实验方法。

方法: 大耳白兔24只, 随机等分为2组, 实验组, 经股动脉穿刺插管至肝动脉; 对照组, 剖腹直视穿刺插管至肝动脉, 比较2组的手术操作时间及手术成功率。

结果: 实验组的手术成功率为91.67%(11/12), 对照组为75%(8/12), 两者相比无显著性差异($P > 0.05$); 实验组的手术操作时间为 41.5 ± 3.6 min, 对照组为 58.6 ± 5.4 min, 两者相比有显著性差异($P < 0.05$)。

结论: 实验兔进行股动脉穿刺插管进行肝动脉灌注的方法简单、容易掌握、成功率高, 适用于研究药物或细胞悬液经肝动脉灌注对肝脏的作用。

关键词: 肝动脉; 插管; 兔

许卫国, 谭国胜, 彭秀斌, 王于, 陈伟, 杨建勇. 兔肝动脉插管技术的方法学及DSA表现. *世界华人消化杂志* 2009; 17(25): 2612-2615
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2612.asp>

同行评议者
程英升, 教授, 同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心

0 引言

介入放射学临床工作中需要面临大量的肝脏疾病患者, 而经肝动脉向肝脏灌注各种类型的药物是介入放射学临床实践中最重要的工作之一^[1-2]. 基于此种情况, 介入放射学基础实验研究中常需要观察经肝动脉向肝脏灌注各种干预因子对肝脏及整个机体的影响, 如何有效地将各种药物或细胞悬液等各种干预因素直接经肝动脉注入肝脏并减少创伤、提高生存率是实验研究中关键步骤之一^[3-4]. 实验兔是常用的医学实验动物, 在实验研究有着较为广泛的应用, 寻求建立完善有效的肝动脉插管途径, 是本研究的主要目的.

1 材料和方法

1.1 材料 新西兰大白兔24只, 雌雄各半, 体质量2-3.5 kg, 购自中山大学医学院动物中心. 手术器械: 显微直剪、显微直镊、显微弯镊各1把, 动脉夹3个, 止血钳5把, 有齿镊、无齿镊、持针器各1把, 缝合针数枚, 1号、4号缝合丝线各数支, 自制动脉插管数根(管径0.5-1.2 mm, 由硬膜外麻醉导管拉细而成), 肝素12 500 U数支, 生理盐水数瓶. 介入器械: 4F血管鞘, 4F导管, 3F微导管, 主要设备Toshiba大C臂DSA. 选用德国先灵公司非离子型对比剂优维显(Ultravist 300).

1.2 方法

1.2.1 分组: 实验动物分为实验组和对照组, 实验组采用经股动脉穿刺插管, 对照组采用外科手术直视下行肝动脉插管法.

1.2.2 动物处理: 实验组采用股动脉插管法进行肝动脉的造影, 所有实验兔麻醉固定后, 腹股沟区常规消毒铺巾. 沿股动脉纵行切开皮肤, 分离皮下组织, 钝性分离肌肉组织, 暴露股动脉鞘, 剪开股动脉鞘, 分离出股动脉长约1.5-2 cm. 近端及远端分别穿手术缝线备用. 提紧近端缝线, 暂时阻断血流, 用18G带针芯穿刺针穿刺成功后, 退出针芯引入短导丝, 退出穿刺针外鞘管, 将4F导管鞘沿导丝向股动脉近端插入. 经鞘管引入4F Cobra导管在T12-L1间寻找到腹腔动脉后, 行腹腔动脉造影, 确认肝固有动脉; 引入3F微导管, 超选择至肝固有动脉, 经造影证实肝实质显影, 并可进一步超选择肝左或肝右动脉进行造影. 所有实验兔介入操作后均用0.5 mL肝素盐水冲洗导管. 术毕拔除导管及鞘管的同时结扎股动脉近端及远端, 逐层缝合并包扎切口, 专门饲养. 对照组采用外科手术行肝动脉插管法, 术前实验兔禁食、禁水12 h, 耳缘静脉留置

26G留置针, 经留置针注入戊巴比妥钠溶液进行静脉麻醉麻醉生效后, 取仰卧位固定于兔台, 上腹部备皮, 常规消毒后铺巾. 于剑突下依次切开皮肤、皮下组织、肌肉. 打开腹膜腔, 暴露位于十二指肠后方的胃十二指肠动脉, 直视下分离该动脉0.5-1 cm, 其色鲜红, 可见搏动. 分离后近心端和远心端穿丝线作牵引备用, 将分离的胃十二指肠动脉主干前壁处, 用显微剪横向剪开约1/3血管壁, 将充盈了肝素的导管(硬膜外麻醉导管, 事先利用其受热延展性拉伸至所需口径)经破口送入胃十二指肠动脉内, 在DSA监视下超选择插管至肝动脉行造影确定导管在肝动脉, 用含80 000 U庆大霉素的10 mL生理盐水冲管, 并结扎胃十二指肠动脉, 逐层缝合关腹.

1.2.3 DSA造影: 实验组经导管行腹腔动脉和肝固有动脉造影, 前后位, 流速分别为1 mL/s×3 s和0.5 mL/s×3 s.

统计学处理 应用SPSS11.0统计学软件包, 采用 t 检验和 χ^2 检验, 设定 $P<0.05$ 为差异有显著性.

2 结果

外科手术剖腹直视下插管方法, 2只兔发现肝动脉变异, 无法完成手术穿刺置管, 2只术中损伤周围血管网, 出血过多休克导致死亡, 其余8只兔均置管成功, 插管成功率75%(8/12), 平均手术时间 58.6 ± 5.4 min, 出血均在10 mL以内, 动物耐受尚可. 术后36 h饮食以及活动逐渐恢复正常, 伤口9-14 d完全愈合.

经股动脉透视下插管方法, 除1只麻醉意外死亡外, 其余11只兔均成功插管至肝固有动脉并保持血管通畅, 并可以超选择肝左动脉或肝右动脉, 插管成功率91.67%(11/12), 平均手术时间 41.5 ± 3.6 min, 出血少于2 mL, 动物耐受好. 24 h饮食以及活动逐渐恢复正常, 伤口5-10 d完全愈合. 经统计学比较, 实验组和对照组的手术成功率无明显差异($\chi^2 = 1.011$, $P = 0.315$), 而平均手术时间则有明显差异($t = -15.739$, $P = 0.000$).

经DSA检查, 腹腔动脉造影观察腹腔动脉的走行及其分支情况, 在分支中较细的一支行向左下, 为脾动脉, 胃左和肝总动脉共干, 胃左动脉走行于胃小弯, 肝总动脉向右走行后, 分出胃十二指肠动脉与肝固有动脉, 肝固有动脉分为肝左动脉与肝右动脉, 胆囊动脉发至肝右动脉(图1).

3 讨论

经肝动脉向肝脏灌注各种类型的药物是介入放

研发前沿
随着介入放射学的迅猛发展, 有关实验兔的肝动脉灌注的文章较多, 但是详细探讨实验兔肝动脉插管技术的文章较少, 相关的具体操作介绍较为笼统, 且没有专门的对于直视下外科手术和经股动脉插管的对比研究, 无法满足当前实验研究的需要.

创新盘点

本研究介绍了行实验兔肝动脉插管的两种方法,并进行了比较,详细介绍了技术操作中的经验和教训,对于进行实验兔肝动脉插管的实验人员提供的很有价值的参考。

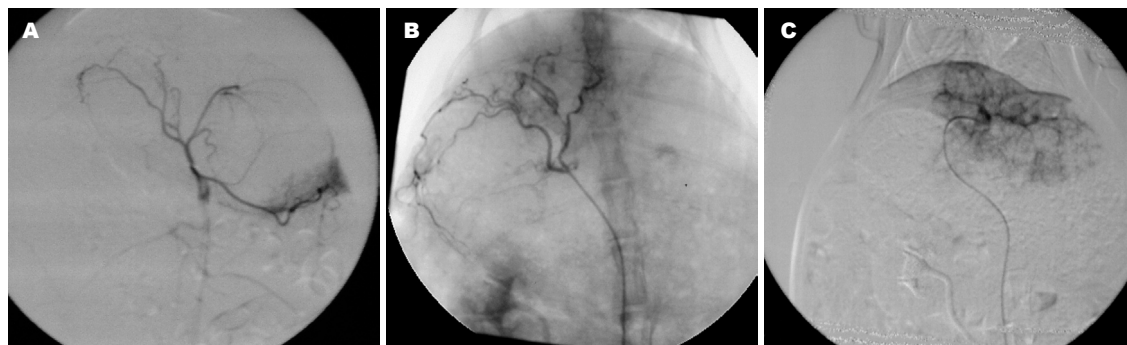


图1 插管至实验兔的腹腔动脉DSA造影. A: 腹腔动脉和及其主要分支显影; B: 肝右动脉; C: 肝左动脉.

射学临床实践中最重要的工作之一^[5],故肝动脉插管途径的建立成功与否是相关实验研究是否成功的重要保障^[6].目前兔肝动脉的插管方法主要有2种:直视下经胃十二指肠动脉插管和经股动脉透视下插管,不同方法各有其优缺点.寻求建立完善有效的实验兔肝脏动脉插管途径,是本研究的主要目的.

直视下经胃十二指肠动脉插管的方法手术时间较长、出血较多,并且肝固有动脉和胃十二指肠动脉细小易痉挛,游离和穿刺过程中轻微刺激损伤即易导致血管出血痉挛甚至闭塞和断裂,失败率相对较高,需要一定的外科基础,需要较长的预实验时间.在本研究中,2只兔因肝动脉变异无法穿刺置管,2只出血过多休克导致死亡,插管成功率75%,较经股动脉插管成功率低,平均手术时间亦相对较长.在分离插管的过程中,我们积累的经验是:(1)寻找插管动脉时操作要轻柔,不要损伤肝脏,不要损伤门静脉和胆总管等重要的组织结构;(2)插管动脉与周围结缔组织要充分分离以便于血管结扎、剪切口、插导管及固定导管;(3)固定自制导管前要检查导管是否通畅;(4)插管手术中,必须注意在腹腔内注入一定量的生理盐水,以补充因出血而造成的血容量降低,可以注入含庆大霉素的生理盐水;在术后,可以每天或隔天在腹腔内注入稀释庆大霉素,术后多注意观察,但若无感染迹象,可不必注入庆大霉素.

经股动脉透视下插管是近年来出现的新方法,由于不需要开腹,创伤小,动物耐受性好,手术时间短,出血少.各家报道的具体的穿刺插管方法有所不同.王晓东 *et al*^[7]报道直接采用3F微导管插管腹腔动脉,不使用血管鞘和4F导管,成功率为80%;而朱光宇 *et al*^[8]认为直视下经股动脉插管过程中,要使用4F导管鞘,并首先使用4F导管插管至腹腔动脉后,再采用3F微导管进行

超选择插管至肝左或肝右动脉,插管成功率为96.9%.在本实验中,我们采用的股动脉插管方法与朱光宇 *et al*研究大致相同.

我们认为直接采用3F微导管插管腹腔干动脉,由于腹腔动脉开口与腹主动脉有一定的角度,而微导管头端没有角度,故超选择插管常常十分困难.本实验中,12只实验兔中除1只麻醉意外死亡外,其余11只兔均成功插管至肝固有动脉并保持血管通畅,并可以超选择肝左动脉或肝右动脉,插管成功率高,平均手术时间较短,出血量较少,动物耐受好.使用该方法进行肝动脉插管途径建立中,其优点是:操作相对简单,全过程1人就可完成;各种介入器材可以反复使用(可收集患者手术后的器材,消毒后使用),费用相对不高.但同时须注意以下几点:(1)实验兔的股动脉相对细小,同时直接采用Seldinger法穿刺插管较为困难,故采用外科手术分离直视下操作成功率高;(2)外科手术暴露股动脉后并穿刺后,最好置入4F血管鞘,这样可以反复进行置换导管和导丝的操作;(3)选择插管肝总动脉的过程中,直接采用微导管非常困难,需先采用4F Cobra导管插管腹腔动脉后,再采用微导管进一步超选择肝左动脉或肝右动脉;(4)术毕需结扎实验兔的股动脉,在手术切口的上方和下方均需结扎,这样方可避免术后出血;(5)在手中行DSA造影的过程,由于实验兔不能进行闭气等配合,需采用较快的采集,如6-8 帧/s;(6)同时术中注意补液等处理,避免血容量减少造成实验兔的休克,补液速度要适中,过快易造成实验兔的心力衰竭.

实验方法学的研究与探讨是进行动物实验的先决条件^[9].本实验研究表明,只要注意操作的细节,熟练掌握并加强术后护理后,通常可以成功超选择肝动脉进行造影,并且实验兔的成活率较高.直视下插管胃十二指肠动脉的方法

需要比较厚实的外科学手术基础, 预实验的时间较长, 操作相对较难掌握; 而经股动脉插管操作具有相对简单方便、针对性强、容易掌握以及成功率高等特点, 便于在相关实验研究中推广使用。

4 参考文献

- 1 曹喜才, 王晓东, 谭建. 经肝动脉灌注32P玻璃微球联合化疗栓塞治疗肝癌的临床研究. 中华放射学杂志 2005; 39: 1068-1073
- 2 刘亚民, 蒋冬梅, 覃红. 肝癌经肝动脉化疗栓塞及门静脉持续灌注化疗的临床研究. 实用放射学杂志 2004; 20: 1022-1027
- 3 Bruix J, Sala M, Llovet JM. Chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127: S179-S188
- 4 王晓东, 曹喜才. 经肝动脉灌注放射性核素微球治疗肝癌的临床研究进展. 临床放射学杂志 2002; 21: 825-830
- 5 Kim P, Prapong W, Sze DY, So SK, Razavi MK. Treatment of hepatocellular carcinoma with sub-selective transcatheter arterial oily chemoinfusion. *Tech Vasc Interv Radiol* 2002; 5: 127-131
- 6 刘振堂, 郭万亮, 戴社教, 张大鲲, 胡洪兵, 周斌, 毛继刚, 史步进, 陈凯, 程丽丽, 张亚红, 李迎春, 牛凤枝. 兔肝血管插管技术及兔VX2肝癌超声、DSA表现的实验研究. 实用放射学杂志 2005; 21: 113-116
- 7 王晓东, 杨仁杰, 张宏志, 孙宏亮. 兔肝血管影像解剖、变异和肝动脉插管方法的初步探讨. 介入放射学杂志 2006; 15: 750-753
- 8 朱光宇, 滕皋军, 牛焕章, 郭金和, 卢勤, 李国昭, 余辉, 陈晟. 兔VX2肝癌模型建立方法的比较及股动脉插管方法的应用. 中国医学影像技术 2006; 22: 1785-1788
- 9 王于, 李鹤平, 连帆, 谭国胜, 向贤宏, 许卫国, 陈伟, 杨建勇. 胃十二指肠动脉逆行肝动脉插管技术在动物实验中的应用. 世界华人消化杂志 2008; 16: 4088-4092

同行评价
本研究紧密结合
临床, 设计合理,
参考价值较好。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》修回稿须知

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

1 修回稿信件

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

2 稿件修改

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

3 版权

本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期); 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录。(科学编辑: 李军亮 2009-09-08)

缬草波春对大鼠非炎症性结肠致敏模型的影响

叶建明, 王钰, 汪晓珍, 何学斌, 蒋朋, 薛存宽, 胡品津

背景资料
缬草波春目前国内外有较多研究, 其对血管、胆道及胃肠道平滑肌的作用已得到公认, 对中枢作用有些初步研究, 其镇静作用可能与GABA受体相关, 但对IBS是否有治疗作用, 尚未见报道。

叶建明, 王钰, 中山市人民医院消化内科 广东省中山市 528403
汪晓珍, 中山市人民医院儿科 广东省中山市 528403
何学斌, 蒋朋, 薛存宽, 华中科技大学同济医学院老年医学研究所 湖北省武汉市 430077
胡品津, 中山大学附属第一医院消化内科 广东省广州市 510080
广东省中医药局建设中医药强省科研基金资助项目, No2007290

作者贡献分布: 叶建明与胡品津对此文所作贡献均等; 此课题由叶建明与胡品津设计; 研究过程由叶建明、王钰、汪晓珍、何学斌、蒋朋、薛存宽及胡品津操作完成; 研究所用缬草波春由薛存宽提供; 数据分析由叶建明完成; 本论文写作由叶建明完成。

通讯作者: 叶建明, 副主任医师, 528402, 广东省中山市石岐区孙文中路2号, 中山市人民医院消化内科. yjm3839@sina.com
电话: 0760-8840528

收稿日期: 2009-05-14 修回日期: 2009-07-30
接受日期: 2009-08-03 在线出版日期: 2009-09-08

Valepotriates reduce colorectal sensitivity and inhibit colonic motility in rats with noninflammatory colonic hypersensitivity

Jian-Ming Ye, Yu Wang, Xiao-Zhen Wang, Xue-Bin He, Peng Jiang, Cun-Kuan Xue, Pin-Jin Hu

Jian-Ming Ye, Yu Wang, Department of Gastroenterology, Zhongshan People's Hospital, Zhongshan 528402, Guangdong Province, China

Xiao-Zhen Wang, Department of Pediatrics, Zhongshan People's Hospital, Zhongshan 528402, Guangdong Province, China

Xue-Bin He, Peng Jiang, Cun-Kuan Xue, Institute of Geriatric Medicine, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430020, Hubei Province, China

Pin-Jin Hu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Supported by: the Foundation for Development of Chinese Medicine in Guangdong Province, No. 2007290

Correspondence to: Jian-Ming Ye, Department of Gastroenterology, Zhongshan People's Hospital, Zhongshan 528402, Guangdong Province, China. yjm3839@sina.com

Received: 2009-05-14 Revised: 2009-07-30

Accepted: 2009-08-03 Published online: 2009-09-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of valepotriates on colorectal visceral sensitivity and colonic motility in rats with noninflammatory visceral hypersensitivity.

METHODS: Thirty-two male Wistar rats were randomly divided into four groups: normal con-

trol group, model control group, morphine treatment group and valepotriate treatment group. A model of noninflammatory visceral hypersensitivity was induced in rats by giving a rectal perfusion of sodium butyrate solution. Rats in the morphine treatment group and valepotriate treatment group were given morphine solution at a dose of 0.4 mg/(kg·d) and valepotriate solution at a dose of 2.5 mg/(kg·d), respectively, while those in the normal control group and model control group were given equal volume of normal saline. Rectal distention test was performed to examine rectal sensitivity. A pressure sensor was used to record pressure changes in the colon and rectum before and after treatment. The pressures to produce initial sensation and maximum tolerated sensation in the rectum as well as the average and maximum pressures in the colon were compared among each group.

RESULTS: No significant differences were noted in the scores for rectal distention between the valepotriate treatment group and model control group under a pressure of 0, 1.33 or 2.66 kPa. In contrast, significant differences were noted in the scores between the two groups under a pressure of 3.99, 5.32, 6.65 or 7.98 kPa ($t = -2.50, -4.58, -3.00$ and -2.38 , respectively; all $P < 0.05$ or 0.01). However, there were no significant differences in the scores between the two treatment groups under the above conditions. The pressures to produce initial sensation and maximum tolerated sensation in the rectum were significantly higher in the valepotriate treatment group than in the model control group ($t = 5.892$ and 5.075 , respectively; both $P < 0.01$) though no significant differences were noted between the two treatment groups. The average and maximum pressures in the colon were significantly lower in the valepotriate group than in the model control group and morphine treatment group ($t = -6.583, -3.85, -3.698$, and -2.440 , respectively; all $P < 0.01$ or 0.05).

CONCLUSION: Valepotriates can reduce colorectal sensitivity and inhibit colonic motility in rats with noninflammatory colonic hypersensitivity, suggesting that valepotriates could potentially be used to treat irritable bowel syndrome.

同行评议者
陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科

Key Words: Valepotriates; Sodium butyrate; Irritable bowel syndrome; Visceral hypersensitivity

Ye JM, Wang Y, Wang XZ, He XB, Jiang P, Xue CK, Hu PJ. Valepotriates reduce colorectal sensitivity and inhibit colonic motility in rats with noninflammatory colonic hypersensitivity. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(25): 2616-2620

摘要

目的: 探讨中药提取物缬草波春对大鼠非炎症性结肠致敏模型的影响。

方法: 将32只雄性Wistar大鼠随机分为4组($n=8$): 空白对照组、模型对照组、吗啡对照组及缬草波春药物实验组。正丁酸钠灌注直肠法制造大鼠非炎症性结肠致敏模型, 缬草波春药物实验组给予缬草波春2.5 mg/(kg·d), 吗啡对照组吗啡0.4 mg/(kg·d), 生理盐水对照组和模型对照组等量生理盐水灌胃, 共2 wk。直肠扩张法检验大鼠直肠的敏感性, 气囊通过压力感受器记录结肠用药前后直肠压力改变。分析各组直肠初始压力感觉与最大压力, 结肠平均压力与最大耐受压力。

结果: 缬草波春组与模型对照组比较, 在压力为0、1.33、2.66 kPa时, 直肠扩张积分差异无统计学意义, 在压力为3.99、5.32、6.65、7.98 kPa时, 则有统计学意义($t=-2.50, -4.58, -3.00, -2.38, P<0.05$ 或 $P<0.01$), 而与吗啡对照组比较, 在上述压力下差异均无统计学意义; 缬草波春组与模型对照组初始感觉压力比较明显升高, 差异有显著意义($t=5.892, P<0.01$), 而与吗啡对照组比较, 差异无显著意义; 缬草波春组与模型对照组初始感觉压力和最大压力耐受值比较明显升高, 差异有显著意义($t=5.892, 5.075, P<0.01$), 而与吗啡对照组上述两项指标差异无显著意义; 缬草波春组与模型对照组和与吗啡组比较结肠运动平均压力与其运动最大压力明显降低, 差异有显著意义($t=-6.583, -3.85, -3.698, -2.440, P<0.01$ 或 0.05)。

结论: 缬草波春可降低大鼠非炎症性结肠致敏模型结、直肠的敏感性, 抑制模型大鼠的结肠运动。

关键词: 缬草波春; 缬草三酯; 正丁酸钠; 肠易激综合征; 内脏高敏感

叶建明, 王钰, 汪晓珍, 何学斌, 蒋朋, 薛存宽, 胡品津. 缬草波春对大鼠非炎症性结肠致敏模型的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17(25): 2616-2620
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2616.asp>

0 引言

缬草波春是从纯中药神农缬草中所提取的化合物, 基本结构为环烯醚萜酯^[1]中医上常用于治疗脘腹胀痛、风湿痹痛等, 藏医则常用于痛经。国外研究发现, 缬草在治疗失眠、抗焦虑有良好的效果, 我们前期研究发现缬草波春有扩张胆道平滑肌、促进胆汁排泄、治疗胆囊结石、舒张胃肠平滑肌、扩张冠状动脉和子宫螺旋小动脉的作用^[2-5]。

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是指以腹部不适或腹痛伴大便性状和排便习惯改变为特征的一组肠功能紊乱综合征。IBS的病因和发病机制并不完全清楚, 主要与肠道动力异常、内脏感觉异常、炎症、脑肠肽、遗传因素、食物因素以及近几年提出的肠道神经内分泌网络调控失常有关^[6-9]。过去对于IBS的治疗主要局限于调节胃肠动力, 常用的有泽马可、普瑞博思、斯巴敏、得舒特等, 临床应用效果并不理想。缬草波春不仅对胃肠道、胆道和子宫平滑肌有广泛的作用, 而且同时对中枢有明显调节作用, 使我们推测是否对IBS的非炎症性内脏高敏感有治疗作用。为探索缬草波春是否对IBS的肠感觉和运动功能有影响, 我们进行了如下研究。

1 材料和方法

1.1 材料 缬草波春由华中科技大学同济医学院老年医药学研究所薛存宽教授馈赠。电子天平称取720 mg缬草波春, 加入增溶剂吐温-80、丙二醇各1 mL, 充分搅匀后持续磁力搅拌同时缓慢加入蒸馏水至288 mL, 浓度为25 g/L, 继续搅拌30 min, 充分溶解后备用。正丁酸钠($C_4H_7O_2Na$)由厦门农牧发展有限公司产, 批号20031456。正丁酸盐用pH6.9的磷酸缓冲液配制成3.00 mmol/L溶液备用。盐酸吗啡注射液由沈阳第一制药厂产, 产品批号060205。丙二醇由天津津Q/HG 3-1018-85。天津市博迪化工有限公司吐温-80由国药集团化学试剂有限公司生产, 批号: F20040213。MacLab/8e生理信号采集系统(澳大利亚), 苹果计算机(美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物及分组: 选用Wistar大鼠32只, 平均体重250 g, ♂, 购自华中科技大学同济医学院实验动物中心随机分为药物(缬草波春)实验组, 药物(吗啡)对照组, 模型对照组, 空白对照组4组, 每组各8只药物(缬草波春)实验组、药物(吗啡)

研发前沿

IBS治疗目前临床所用的一些西药存在较多的局限性, 中药及中药提取物对IBS治疗具有价廉、不良反应小的优点, 是目前研究的热点。

创新盘点
法国学者Sophie Bourdu首先用正丁酸盐诱导结肠高敏感模型, 无结肠黏膜损伤, 符合IBS生理改变, 模型制作时间短, 只需1 wk, 节约了研究成本。本文应用上述模型研究中药提取物缬草波春对IBS模型的影响, 对中药及中药提取物治疗IBS进行探索。

表 1 缬草波春对大鼠非炎症性结肠致敏模型直肠扩张行为积分的影响

分组	压力(kPa)						
	0	1.33	2.66	3.99	5.32	6.65	7.98
缬草波春组	0	1.00 ± 0.00	1.25 ± 0.46	1.37 ± 0.74	1.75 ± 0.70	2.75 ± 0.71	3.13 ± 0.35
吗啡组	0	1.00 ± 0.00	1.25 ± 0.46	1.37 ± 0.51	1.62 ± 0.52	2.37 ± 0.52	2.87 ± 0.35
模型对照组	0	1.00 ± 0.00	1.50 ± 0.53	1.50 ± 0.53 ^a	3.62 ± 0.74 ^a	3.63 ± 0.74 ^a	3.75 ± 0.70 ^a
空白对照组	0	1.00 ± 0.00	1.25 ± 0.46	1.25 ± 0.46	1.75 ± 0.70	2.50 ± 0.93	3.25 ± 0.89

^a $P < 0.05$ vs 缬草波春组。

对照组及模型对照组均为非炎症性大鼠结肠致敏模型, 空白对照组为非造模组。

1.2.2 模型制作: 以300 mmol/L正丁酸钠($C_4H_7O_2Na$)1 mL, 每天2次, 连续6 d大鼠直肠灌注的方法制造大鼠非炎症性结肠致敏模型, 空白对照组则以等量生理盐水灌肠^[10]。

1.2.3 结肠敏感性评估: 在造模6天后进行注药或生理盐水30 min后和药物实验后1 wk用2%的异氟烷(isoflurane)麻醉, 麻醉后放入40 cm×40 cm的盒内, 用长9 cm血管成形气囊, 插入距肛门7 cm处, 气囊可测压直肠扩张(CRD colorectal distension)的压力为1.33, 2.66, 3.99, 5.32, 6.65, 7.98 kPa, 以半定量的方法观察大鼠对CRD的反应评分标准为: 0分, 对CRD无反应; 1分, 简单的头部运动, 而后不动; 2分, 腹部肌肉收缩; 3分, 腹部肌肉收缩提起; 4分, 部分身体弓起, 跨部上提上述观测10 min记录初始感觉压力和最大耐受压力。初始感觉压力即大鼠对结肠压力升高开始有行为反应时的压力, 最大耐受压力为大鼠在出现身体弓起, 跨部上提时的结肠压力。

结肠运动压力变化: 在结肠内插入测压气囊后, 给予一定的初始压力(囊内注入0.2 mL生理盐水, 初始压力为5.32 kPa), 连接压力换能器, 用苹果计算机分析, 记录时间为10 min分别记录平均压力、最大压力(均为记录压力减去基础压力)。

1.2.4 药物实验: 造模成功后, 缬草波春配成2.5 g/L溶液, 缬草波春组以缬草波春溶液每次1.25 mg/kg剂量, 加生理盐水配成1 mL溶液, 每天2次(上午9时, 下午4时)灌胃; 吗啡对照组以吗啡溶液每次0.2 mg/kg, 亦配成1 mL溶液, 每天2次灌胃; 空白对照组和模型对照组以等量生理盐水灌胃, 连续2 wk。

用药2 wk后分别检测其对结肠敏感性和结肠运动的影响(记录结肠压力改变)并与模型对照组比较。结肠敏感性检测同前面所述结肠敏感性评估, 压力用压力换能器转换成压力波, 用MacLab

生理信号采集系统记录分别记录于用药2 wk后结肠压力变化, 记录时间为10 min, 分析平均压力、最大压力、初始压力感觉、最大耐受压力。

统计学处理 统计数字以mean±SD表示, 数据用方差分析、T检验分析, 统计资料用统计表和图表示, 所有资料用SPSS11.0统计软件分析。

2 结果

2.1 用药2 wk后, 缬草波春对大鼠非炎症性结肠致敏模型直肠扩张行为积分的影响 模型组与空白对照组比较, 在压力为0、1.33及7.98 kPa, 差异无显著意义($t = 0, 0, 1.18$, 均 $P > 0.05$), 在压力为2.66-7.98 kPa时, 结果显示有统计学意义($t = 2.65, 2.50, 5.61, 2.83$, $P < 0.05$ 或 0.01), 模型符合要求。缬草波春组与模型对照组比较, 在压力为0、1.33及2.66 kPa时, 差异无显著意义($t = 0, 0, -7.98$, 均 $P > 0.05$), 在压力为3.99、5.32、6.65、7.98 kPa时, 结果显示有统计学意义($t = -2.50, -4.58, -3.00, -2.38$, $P < 0.05$ 或 0.01)。缬草波春组与吗啡对照组比较, 在压力为0、1.33、2.66、3.99、5.32、6.65、7.98 kPa时, 差异无显著意义($t = 0, 0, 1.00, 0, 0.55, 1.43, 1.528$, 均 $P > 0.05$, 表1)。缬草波春组与空白对照组比较, 不同压力差异均无显著意义($t = 1.00, 0.00, 1.00, 1.23, 1.38, 1.46, 1.52$, 均 $P > 0.05$, 表1)。

2.2 用药2 wk后对直肠初始感觉压力阈值的影响 缬草波春用药2 wk后, 初始感觉压力与模型对照组比较明显升高, 差异有显著意义($t = 5.89$, $P < 0.01$), 与吗啡对照组及空白对照组比较, 差异均无显著意义($t = 1.00, 0.98$, 均 $P > 0.05$, 图1A)。

2.3 用药2 wk后对直肠最大耐受压力阈值的影响 缬草波春用药后2 wk后, 最大压力耐受值与模型对照组比较明显升高, 差异均有显著差异($t = 5.08$, $P < 0.01$)与吗啡对照组、空白对照组比较差异均无明显意义($t = -0.60, -0.58$, 均 $P > 0.05$, 图1B)。

2.4 药物治疗2 wk后对结肠运动平均压力的影

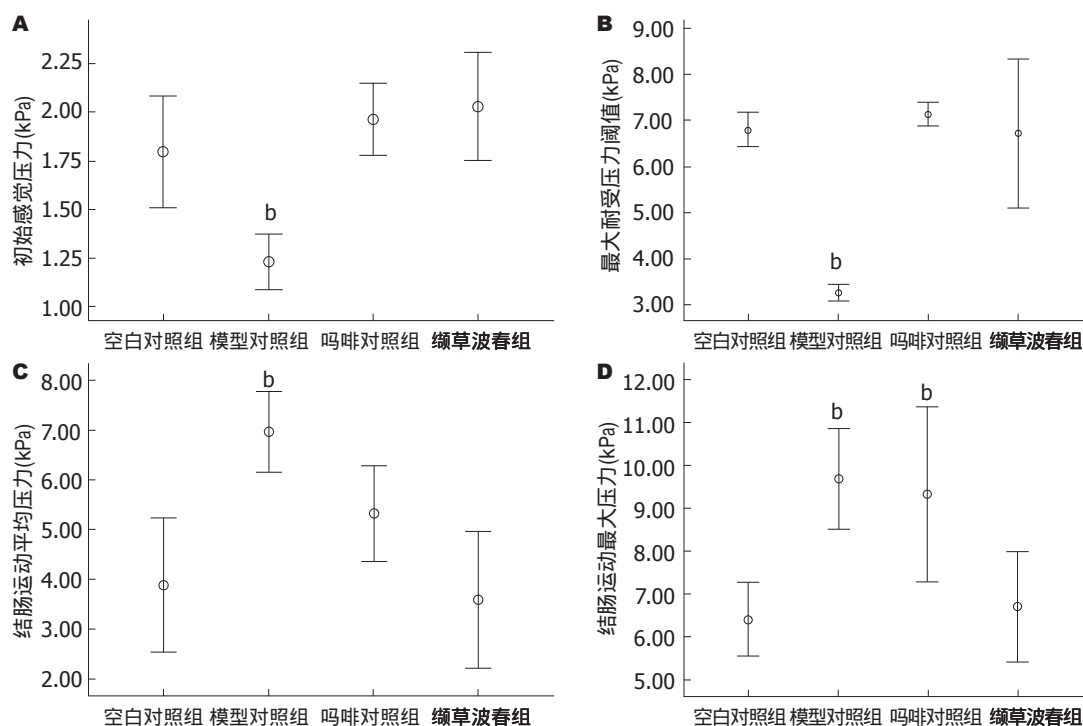


图 1 用药治疗2 wk后对结肠运动的影响。A: 初始感觉压力; B: 最大耐受压力阈值; C: 结肠运动平均压力; D: 结肠运动最大压力。^b $P < 0.01$ vs 缬草波春组。

响: (球囊压力为5.32 kPa/0.2 mL)时间为2 wk 缬草波春用药2 wk后, 与模型对照组比较结肠运动平均压力明显降低, 差异有显著意义($t = -658$, $P < 0.01$)与吗啡组比较亦明显降低, 差异均有显著性意义($t = -3.85$, $P < 0.01$, 图1C), 与空白组比较差异无显著意义($t = 1.72$, $P > 0.05$)。

2.5 用药治疗2 wk后对结肠运动最大压力的影响: (球囊初始压力为5.32 kPa/0.2 mL)缬草波春用药2 wk后, 与模型对照组比较结肠运动最大压力与模型组比较明显降低($t = -3.70$, $P < 0.01$), 与吗啡组比较亦明显降低, 差异亦有显著性意义($t = -2.44$, $P < 0.01$), 与空白组比较差异无显著意义($t = 1.58$, $P > 0.05$, 图1D)。

3 讨论

缬草波春是从缬草属植物中提取的特征性化学成分基本结构为环烯醚萜酯, 可以分为双烯键和单烯键两类前者主要有缬草三酯(valeporiates)、异缬草三酯(isovaleporiates)、乙酰缬草三酯(acevaleporiates)等, 后者主要有二氢缬草三酯(didrovalleporiates)、异二氢缬草三酯(isodidrovalleporiates)等。缬草在中医上常用于治疗脘腹胀痛、风湿痹痛等, 藏医则常用于痛经。国外Malva *et al*发现缬草可降低神经网络的兴奋性, 保护神经, 防止神经元容量减少和相关神经

退化^[5]。国外很多研究发现, 缬草在治疗失眠、抗焦虑有良好的效果, 还有研究发现其有治疗癫痫的功效^[7]。

缬草波春还有扩张胆道平滑肌、促进胆汁排泄、治疗胆囊结石、舒张胃肠平滑肌、扩张冠状动脉和子宫螺旋小动脉的作用^[10-11]。除此之外, 还发现缬草产物可预防血管狭窄^[12]、保护肾脏功能及抗病毒作用^[13-15]等, 国外Santos *et al*^[16]研究了缬草水提取物对鼠大脑皮层突触体对 γ -氨基丁酸(GABA)的摄入和释放, 发现其在抑制 $[^3\text{H}]$ GABA摄入的同时刺激 $[^3\text{H}]$ GABA的释放增加GABA释放的作用与Na-K-ATP酶的活性和膜电位无关缬草对 $[^3\text{H}]$ 纳洛酮及 μ -鸦片受体无明显抑制^[16]。我们的前期研究发现, 缬草波春对S-180腹水癌、结肠癌、肝癌有明显抑制作用, 可诱导胃癌细胞凋亡^[17-20]。

研究发现, 模型对照组与空白对照组比较, 直肠敏感性、结肠运动各项参数, 差异有显著意义, 造模是成功的。缬草波春使直肠扩张积分降低, 与药物对照组吗啡比较, 具有相似的效果。对最大耐受压力的影响与吗啡类似。对结肠运动平均压力、最大压力的影响强于吗啡。上述结果提示: 缬草波春对直肠感觉的影响与吗啡类似, 对各项结肠运动指标的影响, 亦与吗啡对照组具有相似或更好的效果。

同行评价

本文研究了缬草波春对大鼠非炎症性结肠致敏模型的影响和相关结果,有一定的研究价值。

Santos *et al*^[16]曾报道缬草水提物可抑制GABA摄入的同时刺激GABA释放,并可结合GABA_A,有可能产生类似安定的镇静作用,达到减少伤害性刺激上传的作用Simmin *et al*^[21]研究证实,缬草提取物并不作用于鸦片受体,所以其作用机制与吗啡并不相同Wagner *et al*^[4]发现缬草提取物valmanol(含didrovaltrate, valtrate, acevaltrate)具有比罂粟更强的解痉作用,并可抑制回肠的收缩,上述作用与自主神经系统受体无关。缬草三酯是缬草提取物中有效大类-缬草波春(缬草环烯醚萜酯)的主要成分。国内外研究表明,缬草波春具有中枢镇静、抑制胃肠平滑肌运动,扩张血管平滑肌及抗癌作用。缬草波春对中枢神经系统的作用主要是通过促进γ-氨基丁酸(GABA)释放及抑制GABA酶对GABA的分解,从而提高GABA浓度^[22]。GABA存在A、B两种受体, A受体分布在大脑边缘系统、情感中枢^[23], GABA与A受体结合产生催眠作用和对情感中枢的抑制。B受体分布于中枢和周围神经系统的许多位点,存在GABAB受体^[24]抑制性。GABAB受体在迷走神经输入末端的背侧髓核前突触分布广泛,对迷走神经核的递质释放有抑制作用,抑制呼吸、胃、结肠松弛反射。

IBS是临床的常见病、多发病,主要发病机制为内脏感觉异常、肠道平滑肌运动异常及情感障碍等^[24]。缬草波春既有中枢镇静、调节情感中枢的作用,又可抑制胃肠平滑肌运动,可能是对大鼠非炎症性结肠致敏模型有治疗作用的主要原因。

4 参考文献

- Piccinelli AL, Arana S, Caceres A, di Villa Bianca R, Sorrentino R, Rastrelli L. New lignans from the roots of Valeriana prionophylla with antioxidative and vasorelaxant activities. *J Nat Prod* 2004; 67: 1135-1140
- Fernández S, Wasowski C, Paladini AC, Marder M. Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from Valeriana officinalis. *Pharmacol Biochem Behav* 2004; 77: 399-404
- 张振学, 姚新生. 药用植物缬草的化学研究进展. *中国药物化学杂志* 2000; 10: 226-230
- Wagner H, Jurcic K. [On the spasmolytic activity of valeriana extracts (author's transl)] *Planta Med* 1979; 37: 84-86
- Malva JO, Santos S, Macedo T. Neuroprotective properties of Valeriana officinalis extracts. *Neurotox Res* 2004; 6: 131-140
- Eadie MJ. Could valerian have been the first anticonvulsant? *Epilepsia* 2004; 45: 1338-1343
- Trapet P. [Antidepressants. Principles and rules of use] *Rev Prat* 1995; 45: 1696-1700
- 薛存宽, 叶建明, 尹虹, 杨静, 蒋鹏, 彭仁秀, 陈金和, 黎

- 士雄. 缬草提取物对胆道系统作用的实验研究. *深圳中西医结合杂志* 1999; 9: 6-8
- 叶建明, 薛存宽, 钱俊方, 汪晓珍, 尹虹, 朱咸中, 李颖, 曾伶. 缬草提取物对胆囊结石治疗作用与肝、胆囊组织内TNF及IL-1水平的关系. *临床消化病杂志* 2001; 13: 6-8
- Bourdu S, Dapoigny M, Chapuy E, Artigue F, Vasson MP, Dechelotte P, Bommelaer G, Eschaliere A, Ardid D. Rectal instillation of butyrate provides a novel clinically relevant model of noninflammatory colonic hypersensitivity in rats. *Gastroenterology* 2005; 128: 1996-2008
- 叶建明, 薛存宽, 尹虹, 汪晓珍, 朱军. 缬草提取物对类脂质代谢的影响与对胆囊结石治疗作用的关系. *临床消化病杂志* 2002; 14: 25-27
- 尹虹, 薛存宽, 叶建明, 朱咸中, 李颖, 曾伶. 缬草提取物抗心肌缺血再灌注损伤的实验研究. *微循环学杂志* 2000; 10: 12-14
- 陈柏华. 宽叶缬草对兔血管平滑肌细胞增殖及迁移抑制作用的实验研究. *数理医药学杂志* 2004; 17: 281-282
- 陈玲, 贾汝汉, 丁国华, 刘红燕, 杨定平, 彭隽, 田少江. 缬草油对2型糖尿病大鼠肾脏的保护作用及机制探讨. *中华肾病杂志* 2003; 19: 168-172
- Chen SD, Xie XL, Du BN, Su QH, Wei QD, Wang YQ, Li HL, Wang ZG, Wang YH, Cheng SJ. Infantile rotavirus enteritis treated with herbal Valeriana jatamansi (VJ). *J Tradit Chin Med* 1984; 4: 297-300
- Santos MS, Ferreira F, Cunha AP, Carvalho AP, Ribeiro CF, Macedo T. Synaptosomal GABA release as influenced by valerian root extract-involvement of the GABA carrier. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1994; 327: 220-231
- 叶建明, 易粹琼, 薛存宽, 呼闯营, 陈凤鸣, 钱伟. 缬草波春诱导胃癌细胞凋亡与信号分子表达的关系. *中华消化杂志* 2004; 24: 619-620
- 叶建明, 易粹琼, 薛存宽, 钱伟, 呼闯营, 陈凤鸣. 缬草波春联合Caspases抑制剂诱导MKN-45胃癌细胞凋亡. *胃肠病学与肝病学杂志* 2004; 13: 619-621
- 薛存宽, 何学斌, 张书勤, 黄晓桃. 缬草环烯醚萜抗肿瘤作用的实验研究. *现代中西医结合杂志* 2005; 14: 1969-1972
- 叶建明, 胡品津, 易粹琼, 薛存宽, 呼闯营, 陈凤鸣, 钱伟. 缬草波春诱导MKN-45胃癌细胞凋亡. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 22-28
- Simmen U, Schweitzer C, Burkard W, Schaffner W, Lundstrom K. Hypericum perforatum inhibits the binding of mu- and kappa-opioid receptor expressed with the Semliki Forest virus system. *Pharm Acta Helv* 1998; 73: 53-56
- Ortiz JG, Nieves-Natal J, Chavez P. Effects of Valeriana officinalis extracts on [3H]flunitrazepam binding, synaptosomal [3H]GABA uptake, and hippocampal [3H]GABA release. *Neurochem Res* 1999; 24: 1373-1378
- Hajós M, Hoffmann WE, Orbán G, Kiss T, Erdi P. Modulation of septo-hippocampal Theta activity by GABAA receptors: an experimental and computational approach. *Neuroscience* 2004; 126: 599-610
- Kaupmann K, Huggel K, Heid J, Flor PJ, Bischoff S, Mickel SJ, McMaster G, Angst C, Bittiger H, Froestl W, Bettler B. Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* 1997; 386: 239-246

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

自主神经功能在肥胖者机械性胃扩张模拟进餐过程中的变化特征

张学丛, 姚树坤, 常丽丽, 郝顺霞, 赵英丽, 高富贵

张学丛, 常丽丽, 赵英丽, 石家庄市第一医院消化内科 河北省石家庄市 050011

姚树坤, 卫生部中日友好医院 北京市 100029

郝顺霞, 高富贵, 河北省卫生厅卫生监督局 河北省石家庄市 050071

石家庄市科技局2008年石家庄市科学技术研究与发展基金资助项目, No. 08146483

作者贡献分布: 论文写作者与心电图记录由张学丛完成; 常丽丽为课题负责人; 姚树坤进行课题指导; 自主神经功能检测由郝顺霞与赵英丽完成; 高富贵负责收集受试者。

通讯作者: 高富贵, 主任医师, 050071, 河北省石家庄市, 河北省卫生厅卫生监督局. guifugao@163.com

电话: 0311-87825141

收稿日期: 2009-06-10 修回日期: 2009-08-17

接受日期: 2009-08-24 在线出版日期: 2009-09-08

Characteristics of autonomic nervous activity in obese people during mechanical gastric distension that mimics gastric filling

Xue-Cong Zhang, Shu-Kun Yao, Li-Li Chang,
Shun-Xia Hao, Ying-Li Zhao, Fu-Gui Gao

Xue-Cong Zhang, Li-Li Chang, Ying-Li Zhao, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050011, Hebei Province, China

Shu-Kun Yao, China-Japan Friendship Hospital, the Ministry of Health, Beijing 100029, China

Shun-Xia Hao, Fu-Gui Gao, Health Supervision Office, Health Department of Hebei Province, Shijiazhuang 050071, Hebei Province, China

Supported by: the Science and Technology Development Program of Shijiazhuang, No. 08146483

Correspondence to: Fu-Gui Gao, Health Supervision Office, Health Department of Hebei Province, Shijiazhuang 050071, Hebei Province, China. guifugao@163.com

Received: 2009-06-10 Revised: 2009-08-17

Accepted: 2009-08-24 Published online: 2009-09-08

Abstract

AIM: To investigate the characteristics of autonomic nervous activity in obese people during mechanical gastric distension and analyze the relationship between autonomic nervous function and gastric sensitivity.

METHODS: Sixty-seven obese subjects and thirty-two normal controls were studied using a barostat and an electrocardiograph. Before and

during mechanical distension of the proximal stomach, myocardial electrical activity was recorded, and heart rate variability (HRV) analysis was performed.

RESULTS: At baseline, obese subjects had significantly higher total power (TP), ultra-low-frequency power (ULF), low-frequency power (LF) and high-frequency power (HF) in the HRV power spectrum than control ones (all $P < 0.01$ or 0.05). At initial satiety level, TP, ULF, LF and HF values declined compared with baseline values, and the changes in these values were significantly greater in obese subjects than in control ones (all $P < 0.01$). At maximal tolerated volume, TP and ULF values increased while LF and HF values decreased, and the changes in these values were significantly greater in obese subjects than in control ones (both $P < 0.01$).

CONCLUSION: Obese people have large gastric capacity, higher gastric compliance and accommodation, and delayed satiety compared to non-obese ones, which is closely associated with abnormal autonomic nervous function.

Key Words: Obesity; Mechanical distension; Autonomic nervous activity; Electrocardiography

Zhang XC, Yao SK, Chang LL, Hao SX, Zhao YL, Gao FG. Characteristics of autonomic nervous activity in obese people during mechanical gastric distension that mimics gastric filling. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(25): 2621-2624

摘要

目的: 观察单纯性肥胖者机械性胃扩张模拟进餐过程中自主神经的变化特征, 探讨其与肥胖者胃内脏感觉异常的关系。

方法: 采用电子恒压器和动态心电图记录仪, 对67例单纯性肥胖者与32例正常体质量健康志愿者进行胃底机械性扩张, 模拟进餐过程, 记录其进餐过程中的心电信号, 通过心率变异分析, 观察自主神经功能的变化。

背景资料

肥胖是当前最广泛的严重威胁人类健康的疾病之一。肥胖不仅影响工作、生活、美观, 更重要的是对人体健康有一定的危害性。肥胖可引起或加重很多疾病, 如高血压、高血脂、糖尿病、痛风、动脉硬化性心脏病等。肥胖发病机制的研究及防治工作已经受到高度重视。肥胖者可能存在自主神经功能异常, 导致胃感觉异常。

同行评议者

彭曦, 副研究员, 重庆市西南医院烧伤研究所; 许文燮, 教授, 上海交通大学生命科学与技术学院生物医学工程系

研究前沿

国内外对肥胖者自主神经功能的变化研究报道不多,且结论不一。有报道交感神经功能亢进,迷走神经功能减弱;肥胖者交感神经功能减弱,迷走神经功能亢进;可能与入选的肥胖者标准不统一有关,且上述报道主要探讨肥胖者心率变异、能量调控、并发症与自主神经变化的关系,而自主神经功能异常是否导致肥胖者胃感觉异常,尚无研究报道。

应用要点

本课题采用PI动态心电图记录仪和电子恒压器,进行机械性胃扩张,模拟进餐过程,观察肥胖者进餐过程中自主神经功能变化特征,探讨肥胖者自主神经功能变化与胃内脏感觉的关系,为开发药物、针灸治疗肥胖提供科学依据。

结果:机械性胃扩张前静息状态肥胖组TP、ULF、LF、HF显著高于对照组($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。初始饱感状态静息状态TP、ULF、LF、HF差值差异显著($P<0.01$),肥胖组显著高于对照组(均 $P<0.01$)。最大耐受饱感状态与静息状态TP、ULF、LF、HF差值差异显著,肥胖组显著高于对照组(均 $P<0.01$)。

结论:肥胖者较正常体质量者胃容积增加,顺应性增高,容受性增强及饱感延迟发生与自主神经功能异常有密切关系。

关键词:单纯性肥胖;机械性胃扩张;自主神经;电记录仪

张学丛,姚树坤,常丽丽,郝顺霞,赵英丽,高富贵.自主神经功能在肥胖者机械性胃扩张模拟进餐过程中的变化特征.世界华人消化杂志 2009; 17(25): 2621-2624

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2621.asp>

0 引言

肥胖者存在胃容量增加,顺应性增高,容受性增强,饱感延迟发生,胃敏感性降低,摄食量增加,这些近端胃的功能改变在肥胖形成中可能起重要作用^[1-3],而胃的顺应性和容受性受自主神经的调节^[4-6]。本研究观察单纯性肥胖者机械性胃扩张模拟进餐过程中自主神经活动的变化特征,探讨了自主神经与肥胖者内脏感觉异常之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 从志愿者中选取单纯性肥胖者(体质量指数BMI ≥ 30 kg/m²)67例,男35例,女32例,平均年龄 24.12 ± 5.98 岁, BMI为 31.88 ± 2.05 kg/m²为肥胖组。正常体质量健康志愿者32例为对照组,男15例,女17例,平均年龄 22.56 ± 6.23 岁, BMI为 21.28 ± 1.84 kg/m²。所有受试对象没有胃肠道疾病史,消化系手术史,无高血压及冠心病,哮喘、呼吸暂停综合征,吸烟及饮酒史。排除标准: (1)继发于神经-内分泌-代谢紊乱基础上的肥胖症,如下丘脑病、垂体病、胰岛疾病、甲状腺功能减退症、肾上腺皮质功能亢进症及性腺功能低下症; (2)妊娠期、哺乳期女性。所有志愿者签署知情同意书。

1.2 方法 受试者禁食12 h后于早晨8点接受观察,之前排尽大小便,取坐位经口插入聚乙烯双腔气囊导管(气囊最大容量为1500 mL),使气囊位于胃底部。患者平静30 min后,采用美国PI(preideal instruments)公司生产的十二导

联动态心电图记录仪记录心电信号15 min。用内脏电子刺激器/电子气压泵(SVS/barostat, 瑞典Medtronic synectice公司),首先向气囊内注入气体30 mL,测出气囊内的压力水平,即最小扩张压力(MDP)。然后从0开始,采用阶梯样等容注气方式,每次增加容积50 mL,并持续2 min,同时记录相应的胃内气囊压力。囊内气体容积达到初始容积时(即受试者在接受胃扩张刺激时,开始感觉到上腹不适应或胀满时的容积)时,记录胃内气囊压力变化同时,记录心电信号15 min。等容扩张达到最大耐受容积(即受试者在接受胃扩张刺激时,开始感觉到上腹疼痛或难以忍受时的容积)时,记录气囊内相应的压力变化,并记录心电信号15 min。进行心率变异分析,观察下列指标:总功率(TP, ms²)、高频功率(HF, ms²)、超低频功率(ULF, ms²)、低频功率(LF, ms²)。

统计学处理 计量资料以mean \pm SD表示,采用STATA 8.0软件,两样本均数间比较采用 t 检验,方差不齐采用 t' 检验。

2 结果

2.1 静息状态自主神经活动 肥胖组TP、ULF、LF、HF显著高于对照组($P<0.01$ 或 0.05 ,表1)。

2.2 初始饱感状态 肥胖组和对照组TP、ULF、LF、HF较静息状态下降,2组之间功率值无显著差异($P>0.05$);但初始饱感状态与静息状态TP、ULF、LF、HF差值差异显著,肥胖组显著高于对照组($P<0.01$,表2)。

2.3 最大耐受饱感状态 肥胖组和对照组TP、ULF较初始饱感状态有所增高,LF、HF较初始饱感状态下降,2组之间功率值无显著差异($P>0.05$);但最大耐受饱感状态与静息状态TP、ULF、LF、HF差值差异显著,肥胖组显著高于对照组($P<0.01$,表3)。

3 讨论

胃肠道运动是靠消化系管壁平滑肌的收缩和舒张活动来完成的。胃壁平滑肌经常保持着一定程度的收缩状态,称紧张性收缩(张力性收缩),其意义在于维持胃内一定的压力和胃的形状、位置。在进餐时,食物吞咽后近端胃立即松弛,胃内压短时下降,胃接受食团,此阶段称“容受性松弛(舒张)”;当食物到达胃部后,胃内压小幅度升高,刺激胃内压力感受器,通过迷走神经抑制性传出纤维,释放VIP或NO,反射性地引起胃底和胃体平滑肌紧张性降低,肌肉舒张,胃容积扩大,使胃能适应大量食物的涌入,而胃内压

表 1 机械性胃扩张前肥胖组与对照组HRV参数比较 (mean ± SD)

参数	对照组(n = 32)	肥胖组(n = 67)	t	P
TP	4613.05 ± 1848.21	6537.68 ± 2071.61	-4.47	<0.01
ULF	2532.13 ± 2378.00	3774.47 ± 2301.66	-2.49	<0.05
LF	900.24 ± 487.23	1464.20 ± 801.94	-3.66	<0.01
HF	816.72 ± 379.56	1110.62 ± 541.83	-2.76	<0.01

表 2 初始饱感状态与静息状态肥胖组与对照组HRV参数差值比较 (mean ± SD)

参数	对照组(n = 32)	肥胖组(n = 67)	t	P
TP	1340.71 ± 415.13	2283.65 ± 892.36	-5.68	<0.01
ULF	606.41 ± 135.67	1919.74 ± 435.67	-16.66	<0.01
LF	323.91 ± 143.82	749.72 ± 302.55	-5.41	<0.01
HF	279.95 ± 189.23	614.53 ± 297.24	-5.83	<0.01

上升不多, 胃壁张力降低和顺应性增加, 以完成贮存食物的功能, 称之为胃的“适应性松弛(舒张)”。进餐开始时, 近端胃张力降低, 以接受食物。远端胃则出现蠕动收缩, 自胃体向胃窦蠕动, 将食物送向幽门^[1-3]。

单纯性肥胖者存在者胃容量增加、顺应性增高, 容受性增强, 饱感延迟发生, 胃敏感性降低, 摄食量增加^[4-6]。近端胃的容受性及适应性舒张功能主要受自主神经调控, 尤其是迷走神经调控。心率变异系统能够反映患者的自主神经活动情况^[8-12]。ULF反映交感神经活性, HF反映迷走神经活性, TP、LF反映迷走和交感的综合效应。机械性胃扩张前, 即静息状态下, 肥胖组TP、ULF、LF、HF显著高于对照组($P<0.01$), 说明肥胖组迷走神经活性和交感神经活性均显著高于对照组^[13-15]。械性胃扩张初始饱感和最大耐受饱感状态, 肥胖组和对照组TP、ULF、LF、HF无显著差异, 均呈下降趋势($P>0.05$), 但与静息状态时各项指标的差值两组间差异显著, 肥胖组各功率下降值显著高于对照组($P<0.01$)。说明肥胖者胃扩张时交感神经和迷走神经功能较正常体质量者变化更显著, 迷走神经抑制性传出纤维兴奋性增强, 释放出较正常体质量者更多的VIP或NO, 诱发胃容受性松弛(舒张)和适应性松弛(舒张), 胃底和胃体平滑肌紧张性降低, 肌肉舒张, 胃容积扩大, 而胃内压上升不多, 胃壁张力降低和顺应性增加。肥胖者迷走神经活性下降值显著高于对照组, 表明肥胖者对迷走神经反射处于亢进状态, 说明肥胖者较正常

表 3 最大耐受饱感状态与静息状态肥胖组与对照组参数差值比较 (mean ± SD)

参数	对照组(n = 32)	肥胖组(n = 67)	t	P
TP	648.22 ± 342.12	2143.77 ± 879.45 ^b	-9.27	<0.01
UL	103.49 ± 67.09	670.42 ± 209.99 ^b	-9.18	<0.01
LF	377.28 ± 143.90	784.27 ± 230.18 ^b	-14.95	<0.01
HF	312.21 ± 112.37	608.80 ± 210.65 ^b	-7.47	<0.01

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 对照组。

体质量者胃容量增大, 顺应性增加, 容受性增强, 饱感延迟发生与自主神经功能紊乱有密切关系, 尤其是与迷走神经反射过度有关, 而交感神经出现相应的改变, 可能是为保持迷走交感平衡而发生的代偿性反应。

自主神经功能异常与肥胖的因果关系目前尚不明确, 自主神经功能异常导致患者食欲亢进, 进餐量增大, 胃排空加快, 可能是肥胖发生或加重的机制之一; 也可能是肥胖达到一定程度导致了自主神经功能异常, 确切关系和机制有待更深入的研究和探讨。

4 参考文献

- Lee JS. [Obesity and gastrointestinal motility] *Korean J Gastroenterol* 2006; 48: 89-96
- Wisén O, Hellström PM. Gastrointestinal motility in obesity. *J Intern Med* 1995; 237: 411-418
- 叶任高, 路再英. 内科学. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 834
- 常丽丽, 姚树坤. 单纯性肥胖症近端胃功能变化. *中华消化杂志* 2006; 26: 783-784
- Geliebter A, Yahav EK, Gluck ME, Hashim SA. Gastric capacity, test meal intake, and appetitive hormones in binge eating disorder. *Physiol Behav* 2004; 81: 735-740
- Geliebter A, Melton PM, McCray RS, Gallagher DR, Gage D, Hashim SA. Gastric capacity, gastric emptying, and test-meal intake in normal and bulimic women. *Am J Clin Nutr* 1992; 56: 656-661
- Liatis S, Tentolouris N, Katsilambros N. Cardiac autonomic nervous system activity in obesity. *Pediatr Endocrinol Rev* 2004; 1 Suppl 3: 476-483
- 陈志云, 袁华萍, 麻新梅, 马利. 动态心电图心率变异性的临床应用价值. *中国病案* 2004; 5: 46-47
- 朱宗耀, 潘祖英, 陈勇. 肠易激综合征与心率变异性的关系. *临床荟萃* 2004; 19: 545-546
- 吴金彦, 王国付, 钦光跃. 睡眠呼吸暂停/低通气综合征患者心率变异的临床观察. *心脑血管病防治* 2004; 4: 36-38
- Rabbia F, Silke B, Conterno A, Grosso T, De Vito B, Rabbone I, Chiandussi L, Veglio F. Assessment of cardiac autonomic modulation during adolescent obesity. *Obes Res* 2003; 11: 541-548
- Friederich HC, Schild S, Schellberg D, Quenter A, Bode C, Herzog W, Zipfel S. Cardiac parasympathetic regulation in obese women with binge eating disorder. *Int J Obes (Lond)* 2006; 30:

名词解释

单纯性肥胖症: 是指没有发生明显的神经系统、内分泌系统疾病, 而是机体摄入的热量超过了消耗的能量, 造成体内脂肪堆积过多, 体质量增加或脂肪分布异常的一种常见的代谢性疾病。

同行评价

本文在探索单纯性肥胖发生与自主神经功能之间的关系方面有一定的意义。

- 534-542
- 13 王晓燕, 李敬茁. 针刺对单纯性肥胖症患者体表胃电图影响的研究. 中国美容医学 2006; 15: 570-572
- 14 常丽丽, 姚树坤, 任锡玲, 高富贵, 周晓娜, 张淑梅, 刘润. 单纯性肥胖者进餐前后自主神经功能的变化特征.

世界华人消化杂志 2007; 15: 2955-2957

- 15 Greenfield JR, Campbell LV. Role of the autonomic nervous system and neuropeptides in the development of obesity in humans: targets for therapy? *Curr Pharm Des* 2008; 14: 1815-1820

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	内科急重症杂志	276	37	-0.72	0.318	36	-0.41
G746	实用肝脏病杂志	297	35	-0.70	1.100	3	1.04
G190	世界华人消化杂志	2353	5	1.37	0.568	15	0.05
G800	胃肠病学	376	33	-0.62	0.372	33	-0.31
G326	胃肠病学和肝病杂志	468	27	-0.53	0.399	29	-0.26
G451	现代消化及介入诊疗	84	43	-0.92	0.230	41	-0.58
G083	心肺血管病杂志	214	40	-0.78	0.206	42	-0.62
G419	心血管病学进展	467	28	-0.53	0.419	27	-0.23
G260	心脏杂志	523	24	-0.47	0.392	31	-0.28
G610	胰腺病学	223	38	-0.78	0.282	38	-0.48
G234	中国动脉硬化杂志	869	16	-0.13	0.521	18	-0.04
G422	中国脑血管病杂志	223	38	-0.78	0.503	21	-0.07
G267	中国实用内科杂志	2121	7	1.13	0.601	13	0.11
G211	中国糖尿病杂志	1284	11	0.29	0.931	7	0.72
G203	中国心脏起搏与心电生理杂志	616	23	-0.38	0.599	14	0.11
G633	中国血液净化	449	31	-0.55	0.478	23	-0.12
G119	中国循环杂志	643	22	-0.35	0.411	28	-0.24
G231	中华肝脏病杂志	2746	4	1.76	1.056	4	0.95
G235	中华高血压杂志	982	15	-0.01	0.757	9	0.40
G639	中华老年多器官疾病杂志	143	42	-0.86	0.235	39	-0.57
G876	中华老年心脑血管病杂志	465	30	-0.53	0.431	26	-0.20
G150	中华老年医学杂志	1010	14	0.02	0.510	20	-0.06
G155	中华内分泌代谢杂志	1548	9	0.56	1.032	5	0.91
G156	中华内科杂志	3238	3	2.26	0.847	8	0.57
G161	中华肾脏病杂志	1477	10	0.49	1.018	6	0.88
G285	中华消化内镜杂志	1271	12	0.28	0.607	12	0.12
G168	中华消化杂志	2249	6	1.26	1.123	2	1.08
G892	中华心率失常学杂志	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.

血清胃蛋白酶原 I、II 和 G-17 在功能性消化不良患者中的表达及其意义

刘露, 姜敏

刘露, 姜敏, 中国医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省沈阳市 110001

作者贡献分布: 课题设计、文献检索、资料分析及论文撰写由刘露完成; 选题与审校由姜敏完成。

通讯作者: 姜敏, 教授, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院消化内科. jiang-min@163.com

电话: 024-83282199

收稿日期: 2009-06-20 修回日期: 2009-08-24

接受日期: 2009-08-31 在线出版日期: 2009-09-08

Clinical significance of serum pepsinogen I and II and gastrin-17 in patients with functional dyspepsia

Lu Liu, Min Jiang

Lu Liu, Min Jiang, Department of Gastroenterology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Professor Min Jiang, Department of Gastroenterology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. jiang-min@163.com

Received: 2009-06-20 Revised: 2009-08-24

Accepted: 2009-08-31 Published online: 2009-09-08

Abstract

AIM: To investigate the clinical significance of serum pepsinogen (PG) I and II and gastrin-17 (G-17) in patients with functional dyspepsia (FD).

METHODS: A case-control study was performed. Two hundreds and twenty-nine FD patients recruited were diagnosed according to Rome III criteria. Serum PG I and II and G-17 levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The PG I/II ratio (PGR) was calculated. Serum IgG antibody against *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) was determined by ELISA to evaluate *H. pylori* infection.

RESULTS: In FD patients, the PGR was lower in the ≥ 61 age group than in the ≤ 40 age group ($P = 0.049$). The levels of serum PG II and G-17 were significantly higher in FD patients than in normal controls (both $P = 0.000$), while the PGR was significantly lower in FD patients than in

normal controls ($P = 0.000$). No significant difference was noted in serum PG I level between FD patients and normal controls ($P = 0.067$). The receiver operating characteristic (ROC) curve analysis showed that the optimal cut-off points of PG II and G-17 values for the diagnosis of FD were $13.2 \mu\text{g/L}$ (sensitivity 52.8%, specificity 100%, and accuracy 67.5%) and $6.84 \mu\text{g/L}$ (sensitivity 52.8%, specificity 100%, and accuracy 67.5%), respectively. The levels of serum PG I and PG II were significantly higher in male FD patients than in female ones ($P = 0.003$ and 0.004 , respectively). The positive rate of serum IgG antibody against *H. pylori* was higher in FD patients than in normal controls ($P = 0.028$).

CONCLUSION: The levels of serum PGII and G-17 are elevated in FD patients, which may suggest functional changes in gastric sinus and proximal duodenal mucosa. There is an association between FD and *H. pylori* infection.

Key Words: Functional dyspepsia; Pepsinogen; Gastrin-17; *Helicobacter pylori*

Liu L, Jiang M. Clinical significance of serum pepsinogen I and II and gastrin-17 in patients with functional dyspepsia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(25): 2625-2630

摘要

目的: 探讨功能性消化不良(FD)患者血清胃蛋白酶原(PG) I、II 及胃泌素-17(G-17)的水平和意义。

方法: 根据罗马 III 诊断标准, 229例FD患者纳入本研究。均采用酶联免疫吸附试验(ELISA)定量测定血清PG I、PG II 和G-17含量, 计算PG I / II 比值(PGR), 血清幽门螺杆菌(*H. pylori*)抗体滴度大于等于35EIU为阳性。

结果: 以 ≤ 40 岁、41-50岁、51-60岁和 ≥ 61 岁进行年龄分组。FD组年龄 ≥ 61 岁组PGR低于 ≤ 40 岁组($P = 0.049$)。FD患者PG II、G-17水平要明显高于对照组($P = 0.000, 0.000$), PG I

背景资料

近年来研究发现大多数胃肠疾病均存在PG与G-17改变, 但在FD患者中PG与G-17是否存在改变尚未引起关注。

同行评议者
李国忠, 教授, 南京医科大学第二附属医院消化科

研发前沿

本文提示FD患者PG、G-17改变,但是PG、G-17与FD相关症状是否存在一定关系,且本文研究范围仅在中国北方地区,其他地区、民族未包含在本研究内。这些问题都值得进一步研究。

没有明显变化($P = 0.067$),而PGR明显低于对照组($P = 0.000$)。根据ROC曲线计算出诊断FD的PGII和G-17的最佳界值分别为13.2 $\mu\text{g/L}$ (灵敏度51.5%,特异度96.2%,准确率65.5%),6.84 $\mu\text{g/L}$ (灵敏度52.8%,特异度100%,准确度67.5%)。FD组男性在PG与PG水平均显著高于女性($P = 0.003, 0.004$)。FD组 $H. pylori$ 抗体阳性率高于对照组($P = 0.028$)。

结论:FD患者血清PG与G-17水平增加,胃窦与十二指肠近端黏膜可能存在功能学的改变,FD与 $H. pylori$ 感染相关。

关键词:功能性消化不良;胃蛋白酶原;胃泌素-17;幽门螺杆菌

刘露,姜敏.血清胃蛋白酶原、和G-17在功能性消化不良患者中的表达及其意义.世界华人消化杂志 2009; 17(25): 2625-2630
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2625.asp>

0 引言

功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)是常见的消化系统症候群,消化不良占胃肠病门诊患者的30%,而其中40-60%为FD^[1]。目前FD的诊断以罗马III为标准,即无可以解释症状的器质性疾病的证据(包括内镜),诊断前症状至少出现6 mo,近3 mo症状符合以下1点或以上:餐后饱胀不适、早饱、上腹痛、上腹烧灼感^[2]。FD的诊断是一排除性诊断,需要行胃镜活检等其他检查,操作复杂,成本较高,患者遭受一定的痛苦。近年来,胃蛋白酶原(pepsinogen, PG)与胃泌素在胃肠疾病中的关系一直受到人们的关注,特别是在胃癌筛查方面^[3-5]。但至今没有研究显示胃蛋白酶原和胃泌素与功能性消化不良之间的联系,我们研究的目的是探讨FD患者血清PG I、PG II、胃泌素-17(gastrin-17, G-17)水平及其意义,为FD的诊断提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料 2008-09/2009-02我院门诊和住院FD患者229例,根据罗马III诊断,其中男105例(45.85%),女124例(54.15%),年龄17-87(平均53.18)岁。对照组104例,其中男35例(33.65%),女69例(66.35%),年龄19-79(平均51.15)岁。所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 分组:将FD患者与对照组均按年龄分为4组:A组(≤ 40 岁)、B组(41-50岁)、C组(51-60岁)

和D组(≥ 61 岁)。

1.2.2 血清胃蛋白酶原含量及G-17检测:取受检者空腹静脉血5 mL,分离血清后迅速冷冻,存于-20℃冰箱中待测。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)方法检测血清PG I、PG II ($\mu\text{g/L}$)和G-17含量($\mu\text{mol/L}$, ELISA试剂盒均购自芬兰Biohit公司),计算PG I/II比值。

1.2.3 幽门螺杆菌($H. pylori$)感染判定:血清 $H. pylori$ -IgG抗体测定(抗体滴度 ≥ 35 EIU为阳性, $H. pylori$ -IgG试剂盒购自芬兰Biohit公司),进行 $H. pylori$ 感染判定。

统计学处理 采用SPSS13.0软件包,以Kolmogorov-Smirnov测定变量的分布。偏态分布的计量资料用中位数表示。两组间比较采用Mann-Whitney U 检验。多组间比较采用Kruskal Wallis检验。计数资料用 χ^2 检验。接受者操作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC曲线)计算每个变量诊断FD的最佳界值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 FD组血清PG与G-17水平 任2个年龄组间,除PGR外,PG I、PG II和G-17组间差异均无统计学意义。D组PGR低于A组PGR($P < 0.05$)。A、B、C、D组间,PG I、PG II、PGR和G-17差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$,表1)。

2.2 对照组血清PG和G-17水平 4个年龄组PGR具有统计学差异($P < 0.05$),而PG I、PG II与G-17在4组中无统计学差异($P = 0.604, P = 0.064, P = 0.725$)。PG I检测值由A组到D组是逐渐降低的,但是组间差异不具有统计学意义($P = 0.406, P = 0.290, P = 0.609$)。G-17各年龄组间差异无统计学意义。C组PG II高于A组($P < 0.05$)。PGR在C组(11.95 $\mu\text{g/L}$)与D组(13.50 $\mu\text{g/L}$)均低于A组(17.80 $\mu\text{g/L}$)($P < 0.01; P < 0.05$),虽然A、B、C组PGR逐渐降低,但年龄组间无统计学意义($P = 0.123, P = 0.107, P = 0.488$,表2)。

FD组PG II和G-17水平明显高于对照组($P < 0.01$),PGR显著低于对照组($P < 0.01$),PG I两组间没有明显差异($P > 0.05$,表3)。

2.3 不同性别组血清PG与G-17水平 将FD组进行按性别分组,PG I和PG II在男性中的水平要显著高于女性($P < 0.01$),PGR和G-17在2组中差异没有统计学意义($P > 0.05$,表4)。

对照组按性别分类,PG I在男性中水平显著高于女性($P < 0.01$),G-17水平男性显著低于女

相关报道

孙俪萍 *et al* 研究显示胃黏膜炎性病变对血清PG含量影响较大,胃黏膜萎缩性病变对血清PG、PG含量均有影响。

创新盘点
胃镜检查为消化不良诊断的主要手段,血清PG、G-17检测与胃镜检查相比,具有简便、患者耐受性好等特点,为FD的诊断提供参考。

表 1 FD组各年龄组血清PG和G-17 (中位数)

分组	n	PG I (μg/L)	PG II (μg/L)	PGR	G-17(μmol/L)
A组	40	113.80	12.30	9.75	7.03
B组	53	108.40	10.10	8.50	8.32
C组	70	114.31	12.45	8.70	5.50
D组	66	114.85	16.80	7.10 ^a	8.76
P值		0.890	0.090	0.235	0.167

^a $P < 0.05$ vs A组。

表 2 对照组各年龄组血清PG和G-17 (中位数)

分组	n	PG I (μg/L)	PG II (μg/L)	PGR	G-17(μmol/L)
A组	23	98.10	5.60	17.80	1.70
B组	26	97.30	7.05	14.45	1.55
C组	34	93.55	8.90 ^a	11.95 ^a	2.60
D组	21	85.30	8.20	13.50 ^a	1.90
P值		0.604	0.064	0.024	0.725

^a $P < 0.05$ vs A组。

性($P < 0.01$), PG II 与PGR组间差异没有统计学意义($P > 0.05$, 表5)。

将参与本研究所有人员进行性别分组, PG I 和PG II 水平男性均显著高于女性($P < 0.01$, $P < 0.01$), PGR和G-17组间差异不具有统计学意义($P > 0.05$, 表6)。

2.4 血清PG与G-17的ROC曲线 以FD作为病例组(229例), 做PG II、PGR、G-17的ROC曲线。PG II的曲线下面积 $AUC_{ROC} = 0.732$ (95%CI: 0.680-0.784), 根据ROC曲线计算最佳分界值为13.2 μg/L(灵敏度51.5%, 特异度96.2%, 准确率65.5%, 图1A)。

PGR的曲线下面积 $AUC_{ROC} = 0.21$ (95%CI: 0.170-0.268)。G-17 ROC曲线下面积 $AUC_{ROC} = 0.791$ (95%CI: 0.744-0.838)。根据ROC曲线计算最佳分界值为6.84 μg/L(灵敏度52.8%, 特异度100%, 准确度67.5%, 图1B)。

2.5 血清H pylori抗体 FD组H pylori抗体阳性者(102/229)44.5%, 对照组H pylori抗体阳性者(16/104)15.4%, FD组H pylori抗体阳性率高于对照组H pylori抗体阳性率($P < 0.05$)。

3 讨论

FD是一组持续或反复发作的, 经检查排除可引起这些症状的器质性疾病的一组临床综合征, 主要症状包括上腹痛或不适、上腹胀饱、

表 3 FD组与对照组血清PG和G-17 (中位数)

分组	n	PG I (μg/L)	PG II (μg/L)	PGR	G-17(μmol/L)
FD组	229	112.80	13.70	8.60	7.60
对照组	104	95.70	7.50	13.60	1.75
P值		0.067	0.000	0.000	0.000

表 4 FD组不同性别组血清PG和G-17 (中位数)

	n	PG I (μg/L)	PG II (μg/L)	PGR	G-17(μmol/L)
男性	105	126.50	17.30	7.65	4.45
女性	124	92.30	9.20	10.60	4.02
P值		0.003	0.004	0.192	0.601

表 5 对照组不同性别组血清PG和G-17 (中位数)

	n	PG I (μg/L)	PG II (μg/L)	PGR	G-17(μmol/L)
男性	35	102.22	8.20	13.50	1.28
女性	69	90.10	6.30	14.00	2.40
P值		0.009	0.214	0.992	0.009

表 6 FD组和对照组不同性别组血清PG和G-17 (中位数)

	n	PG I (μg/L)	PG II (μg/L)	PGR	G-17(μmol/L)
男性	140	117.05	11.95	9.95	4.45
女性	193	92.30	9.20	10.60	4.02
P值		0.000	0.000	0.114	0.709

早饱、嗳气、恶心、呕吐等。根据症状群分为餐后不适综合征(postprandial distress syndrome, PDS)和上腹疼痛综合征(epigastric pain syndrome, EPS)^[2]。其发病机制尚未完全清楚, 目前认为与胃动力障碍、感觉过敏、精神社会因素、H pylori感染相关。Sha et al^[6-7]研究发现大多数的FD患者胃电图(electrogastrography, EGG)异常以及胃窦和十二指肠动力异常, 胃肌电活性及胃慢波协调性受损。Fruehauf et al^[8]发现通过MRI直接测定胃耐受容积, FD患者胃耐受容积要明显低于正常人。近年来一些大样本研究显示胃排空延迟与上腹胀、恶心、呕吐、胃容受性扩张不良与早饱、感觉过敏与上腹痛存在显著性关系。Aro et al^[9]研究发现焦虑与FD类型中PDS较EPS更具有相关性。最近有研究显示职业粉尘接触、高脂肪饮食以及不良习惯均与FD及其症状相关^[10-12]。但至今没有研究表明FD患者是否存在胃黏膜分泌功能上的改变。

应用要点
本研究结果显示FD患者血清PG与G-17水平增加,胃窦与十二指肠近端黏膜可能存在功能学改变,对FD诊断具有辅助参考价值。

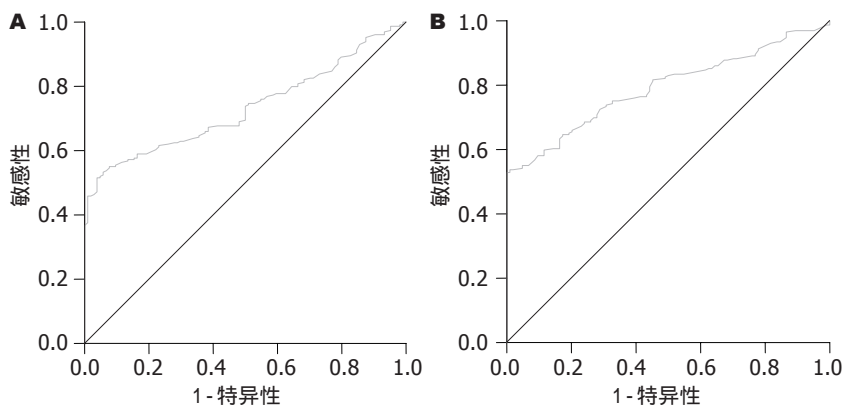


图1 诊断功能性消化不良的ROC曲线。A: PG ; B: G17.

血清PG是胃蛋白酶的前体,反映主细胞的数量,可在胃液、血清和24 h尿液中测量其含量。PG有I型和II型两种,其中PG I主要由胃底腺的主细胞和颈黏液细胞分泌,PG II除来源于上述细胞外还来源于幽门腺及十二指肠腺。PG大部分分泌入胃腔,一小部分酶原透过胃黏膜毛细血管入血^[13-15]。血清PG水平可反映胃蛋白酶分泌及胃黏膜的状态和功能^[14,16-18]。非萎缩性胃炎PG I含量增加,萎缩性胃炎者PG I水平下降,而PG II含量在两者均增加。对于大多数胃肠疾病, PGR都是降低的。在疾病应激或低压低氧环境下,胃黏膜将会出现缺血甚至坏死的变化。马拉松运动后胃泌素含量增加而PGR下降^[14]。近年来,许多临床研究将PG与G-17含量检测用于胃癌筛查。但没有研究证明FD的PG与G-17水平是否有意义。本研究即探讨功能性消化不良患者血清PG I、PG II、G-17水平及其意义。人血清PG水平受种族、性别、年龄、胃黏膜病变和 *H. pylori* 感染因素影响^[19],本研究根据FD患者的性别、年龄进行分组,评价不同亚组PG与G-17的水平以及意义。本研究中,FD组年龄 ≥ 61 岁组PGR水平明显低于 ≤ 40 岁组,虽然在4个年龄组中没有观察到动态变化,但这提示在此年龄段的FD患者胃黏膜功能发生明显改变。同时,对照组 ≤ 40 岁组的PGR水平均高于其他年龄组,但没有观察到PGR随年龄的动态变化。而大样本流行病学调查显示,人群中PGR随年龄的增加而降低^[19]。这提示FD患者在年龄影响PGR情况下,胃黏膜功能发生明显改变。胃泌素是由胃窦及十二指肠近端黏膜中的G细胞分泌,具有促进胃酸分泌、胃窦收缩和消化道黏膜再生等生理作用,其中80%-90%是G-17,由胃窦部G细胞分泌^[20]。PG和G-17含量增加反映增生或黏膜肥大的功能性细胞团^[13]。本研究FD患者PG II、G-17水平明显高于对照组,PG I没有明显变化,

而PGR明显低于对照组。前文提到胃黏膜存在炎症时PG I明显升高,这提示FD患者胃黏膜功能细胞团存在增生或肥大的改变,但并非炎症改变,此结果有助于活动性非萎缩性胃炎与FD之间的鉴别诊断。PG II和G-17水平显著增高同时提示胃窦部与十二指肠近端可能存在黏膜功能学上的改变,即功能细胞团的增生或肥大,而非炎症改变。升高的G-17水平可促进胃酸分泌增多^[21],而高胃酸导致上腹痛和上腹部不适等消化不良症状,因此临床上应用抑酸药物治疗FD可使消化不良症状减轻^[22-24]。本研究的缺陷是收集病例时未作FD相关症状调查,对于G-17和/或PG II增高时与FD症状的关系未作分析。这一问题可作为下一步研究方向。同时由于血清PG水平受种族、年龄、饮食、检测方法等影响,本研究的研究对象均选自中国北方地区,因此研究结果是否适用于其他地区仍待进一步研究。

同时我们根据ROC曲线计算出诊断FD的PG II、PGR和G-17的最佳界值,三者ROC曲线下面积分别是0.732, 0.21, 0.791。因此只有PG II与G-17能够有助于提示FD患者胃黏膜存在形态和功能学上的改变,PG II ROC曲线计算最佳分界值为13.2 $\mu\text{g/L}$ (灵敏度51.5%, 特异度96.2%, 准确率65.5%), G-17 ROC曲线下面积 $\text{AUC}_{\text{ROC}} = 0.791$ (95%CI: 0.744-0.838)。根据ROC曲线计算最佳分界值为6.84 $\mu\text{g/L}$ (灵敏度52.8%, 特异度100%, 准确度67.5%)。FD组结果显示男性在PG I与PG II水平均显著高于女性,而对照组结果显示男性在PG I水平显著高于女性,在G-17水平显著低于女性。而本研究333例受试者整体研究显示,男性PG I与PG II水平显著高于女性。这与Sun *et al*^[19]研究一致。理论上,*H. pylori*感染在胃黏膜产生的炎症介质有可能影响胃的运动和感觉功能,且其产生的尿素酶可水解胃内的

尿素,在正常体温下产生CO₂,参与腹胀与嗝气的形成^[1]。有研究结果显示FD患者根除*H pylori*治疗后FD症状有显著改善^[25-26]。此外,*H pylori*感染与血清PG含量之间存在相关性,*H pylori*感染者血清PG值高于非感染者,除菌后则显著下降^[27-29]。本研究结果显示FD组*H pylori*-IgG抗体阳性率要明显高于对照组。上述研究证明,*H pylori*感染与FD发病密切相关。

总之,本研究结果显示FD患者血清PG II与G-17水平增加,胃窦与十二指肠近端黏膜可能存在功能学改变,FD与*H pylori*感染相关。

4 参考文献

- 1 池肇春, 元玉琴, 董全江, 司军利. 幽门螺杆菌感染及其相关疾病的诊断与治疗. 第1版. 北京: 军事医学科学出版社, 2008; 215-216
- 2 Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology* 2006; 130: 1377-1390
- 3 Haj-Sheykholeslami A, Rakhshani N, Amirzargar A, Rafiee R, Shahidi SM, Nikbin B, Khosravi F, Massarrat S. Serum pepsinogen I, pepsinogen II, and gastrin 17 in relatives of gastric cancer patients: comparative study with type and severity of gastritis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6: 174-179
- 4 Iijima K, Abe Y, Kikuchi R, Koike T, Ohara S, Sipponen P, Shimosegawa T. Serum biomarker tests are useful in delineating between patients with gastric atrophy and normal, healthy stomach. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 853-859
- 5 Cao Q, Ran ZH, Xiao SD. Screening of atrophic gastritis and gastric cancer by serum pepsinogen, gastrin-17 and *Helicobacter pylori* immunoglobulin G antibodies. *J Dig Dis* 2007; 8: 15-22
- 6 Sha W, Pasricha PJ, Chen JD. Correlations among electrogastrogram, gastric dysmotility, and duodenal dysmotility in patients with functional dyspepsia. *J Clin Gastroenterol* 2009; 43: 716-722
- 7 Sha W, Pasricha PJ, Chen JD. Rhythmic and spatial abnormalities of gastric slow waves in patients with functional dyspepsia. *J Clin Gastroenterol* 2009; 43: 123-129
- 8 Fruehauf H, Steingoetter A, Fox MR, Kwiatek MA, Boesiger P, Schwizer W, Fried M, Thumshirn M, Goetze O. Characterization of gastric volume responses and liquid emptying in functional dyspepsia and health by MRI or barostat and simultaneous C-acetate breath test. *Neurogastroenterol Motil* 2009; 21: 697-e37
- 9 Aro P, Talley NJ, Ronkainen J, Storskrubb T, Vieth M, Johansson SE, Bolling-Sternevald E, Agréus L. Anxiety is associated with uninvestigated and functional dyspepsia (Rome III criteria) in a Swedish population-based study. *Gastroenterology* 2009; 137: 94-100
- 10 Coppeta L, Pietroiusti A, Magrini A, Somma G, Bergamaschi A. Prevalence and characteristics of functional dyspepsia among workers exposed to cement dust. *Scand J Work Environ Health* 2008; 34: 396-402
- 11 Pilchiewicz AN, Feltrin KL, Horowitz M, Holtmann G, Wishart JM, Jones KL, Talley NJ, Feinle-Bisset C. Functional dyspepsia is associated with a greater symptomatic response to fat but not carbohydrate, increased fasting and postprandial CCK, and diminished PYY. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 2613-2623
- 12 Geeraerts B, Van Oudenhove L, Fischler B, Vandenberghe J, Caenepeel P, Janssens J, Tack J. Influence of abuse history on gastric sensorimotor function in functional dyspepsia. *Neurogastroenterol Motil* 2009; 21: 33-41
- 13 Korstanje A, den Hartog G, Biemond I, Lamers CB. The serological gastric biopsy: a non-endoscopic diagnostic approach in management of the dyspeptic patient: significance for primary care based on a survey of the literature. *Scand J Gastroenterol Suppl* 2002; (236): 22-26
- 14 Gritti I, Banfi G, Roi GS. Pepsinogens: physiology, pharmacology pathophysiology and exercise. *Pharmacol Res* 2000; 41: 265-281
- 15 Kageyama T. Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution, and development. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 288-306
- 16 Miki K, Morita M, Sasajima M, Hoshina R, Kanda E, Urita Y. Usefulness of gastric cancer screening using the serum pepsinogen test method. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 735-739
- 17 Ley C, Mohar A, Guarner J, Herrera-Goepfert R, Figueroa LS, Halperin D, Parsonnet J. Screening markers for chronic atrophic gastritis in Chiapas, Mexico. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 107-112
- 18 Dinis-Ribeiro M, da Costa-Pereira A, Lopes C, Barbosa J, Guilherme M, Moreira-Dias L, Lomba-Viana H, Silva R, Abreu N, Lomba-Viana R. Validity of serum pepsinogen I/II ratio for the diagnosis of gastric epithelial dysplasia and intestinal metaplasia during the follow-up of patients at risk for intestinal-type gastric adenocarcinoma. *Neoplasia* 2004; 6: 449-456
- 19 Sun LP, Gong YH, Wang L, Yuan Y. Serum pepsinogen levels and their influencing factors: a population-based study in 6990 Chinese from North China. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 6562-6567
- 20 杜娟, 王秀琴. 胃泌素的生物活性及其信号传导通路. *解剖科学进展* 2003; 9: 347-352
- 21 孟云霞, 杨华. 慢性萎缩性胃炎的实验室诊断价值. *中国老年保健医学* 2007; 5: 40-43
- 22 Bytzer P, Talley NJ. Current indications for acid suppressants in dyspepsia. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2001; 15: 385-400
- 23 Talley NJ, Meineche-Schmidt V, Paré P, Duckworth M, Räisänen P, Pap A, Kordecki H, Schmid V. Efficacy of omeprazole in functional dyspepsia: double-blind, randomized, placebo-controlled trials (the Bond and Opera studies). *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 12: 1055-1065
- 24 Blum AL, Arnold R, Stolte M, Fischer M, Koelz HR. Short course acid suppressive treatment for patients with functional dyspepsia: results depend on *Helicobacter pylori* status. The Frosch Study Group. *Gut* 2000; 47: 473-480
- 25 de Artaza Varasa T, Valle Muñoz J, Pérez-Gruoso MJ, García Vela A, Martín Escobedo R, Rodríguez Merlo R, Cuenca Boy R, Carrobes Jiménez JM. [Effect of *Helicobacter pylori* eradication on patients with functional dyspepsia] *Rev Esp Enferm Dig* 2008; 100: 532-539
- 26 Gwee KA, Teng L, Wong RK, Ho KY, Sutedja DS, Yeoh

同行评价

本文探讨了FD患者血清PG、PG、G-17的水平及意义,指出FD患者PG与G-17水平增加,对FD的诊断有一定的辅助参考价值。

- KG. The response of Asian patients with functional dyspepsia to eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009; 21: 417-424
- 27 Watabe H, Mitsushima T, Yamaji Y, Okamoto M, Wada R, Kokubo T, Doi H, Yoshida H, Kawabe T, Omata M. Predicting the development of gastric cancer from combining *Helicobacter pylori* antibodies and serum pepsinogen status: a prospective endoscopic cohort study. *Gut* 2005; 54: 764-768
- 28 Ricci C, Vakil N, Rugge M, Gatta L, Perna F, Osborn JF, Russo VM, Tampieri A, Bernabucci V, Miglioli M, Vaira D. Serological markers for gastric atrophy in asymptomatic patients infected with *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1910-1915
- 29 Shirai N, Furuta T, Sugimoto M, Kanaoka S, Watanabe F, Takashima M, Yamada M, Futami H, Sato Y, Kubota H, Kodaira M, Kajimura M, Maekawa M, Hishida A. Serum pepsinogens as an early diagnostic marker of *H. pylori* eradication. *Hepatogastroenterology* 2008; 55: 486-490

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《医学信息内科学杂志》共同参与协办. 会议将着重介绍消化系病变内镜治疗、介入放射学治疗、肿瘤内外科治疗的新理论、新技术和新方法, 为各相关交叉学科之间的相互交流和研讨搭建一个平台. 本次会议拟安排相关学科的著名专家围绕食管、胆管、胃肠道等消化系管腔内支架治疗应用技术和发生的问题以及消化系病变、门静脉高压、胆道结石等疾病的消化内镜、介入放射、内外科治疗新进展等热点课题进行精彩演讲及深入研讨. 会议还将邀请美国、德国和韩国专家介绍相关领域的技术进展并安排内容丰富的手术演示. 参会者将授予国家级一类继续医学教育学分10分.

1 征文内容

(1)消化系恶性病变内镜治疗、介入放射治疗、外科治疗、肿瘤化学治疗、生物治疗及免疫治疗等; (2)消化系良性病变, 如: 门静脉高压、胆管结石、消化系出血等的内镜及介入新技术应用; (3)消化系疾病诊治前沿交叉学科与消化介入诊治新技术相关的论著、文献综述、临床经验、个案报告等各类稿件.

2 投稿要求

(1)专题讲座由组委会约稿, 也可自荐, 需全文; (2)论著需1000字以内的标准论文摘要, 包括目的、方法、结果与结论四要素. 经验交流、短篇报道等全文限1000字以内; (3)所有稿件内容应科学、创新、实用、数据准确, 书写规范, 稿件应是未发表过的论文. 优秀论文将安排在国家级杂志上发表. (4)所有稿件一律要求电脑打印(Word格式), 邮寄者需附软盘, 特别鼓励用E-mail投稿(以附件Word格式); (5)截稿日期: 2009-09-31.

3 联系方式

杨瑞民, 453100, 河南省卫辉市健康路88号, 新乡医学院第一附属医院介入科. y-rmin@163.com, 电传: 0373-4402942, 手机: 13903805978

梁宝松, 450003, 河南省郑州市纬五路7号, 河南省人民医院内镜科. lbaosong@hotmail.com, 电话: 0371-65063502

拉米夫定耐药变异株在急性HBV感染者中的流行调查

李兴库, 周志红, 金茜, 杜博, 施宇光, 房绍红, 刘伟, 张淑云

李兴库, 周志红, 金茜, 杜博, 施宇光, 房绍红, 刘伟, 张淑云, 哈尔滨医科大学附属第二医院科研实验中心 黑龙江省哈尔滨市 150086

黑龙江省自然科学基金资助项目, No. D2007-18

哈尔滨医科大学附属第二医院博士科研基金资助项目, No. BS2007-07

黑龙江省卫生厅医学科研课题基金资助项目, No. 2005-311
作者贡献分布: 李兴库与周志红对此文所作贡献两均等; 此课题由李兴库、周志红、房绍红、刘伟及张淑云设计; 研究过程由李兴库、金茜、杜博、施宇光、房绍红及刘伟操作完成; 研究所用试剂及分析工具由刘伟提供; 数据分析及本论文写作由李兴库、周志红及张淑云完成。

通讯作者: 张淑云, 教授, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路246号, 哈尔滨医科大学附属第二医院科研实验中心。

zhshuyun136@yahoo.com.cn

电话: 0451-86664393 传真: 0451-86664393

收稿日期: 2009-07-19 修回日期: 2009-08-07

接受日期: 2009-08-08 在线出版日期: 2009-09-08

Prevalence of lamivudine-resistant hepatitis B virus strains in patients with acute hepatitis B virus infection

Xing-Ku Li, Zhi-Hong Zhou, Qian Jin, Bo Du, Yu-Guang Shi, Shao-Hong Fang, Wei Liu, Shu-Yun Zhang

Xing-Ku Li, Zhi-Hong Zhou, Qian Jin, Bo Du, Yu-Guang Shi, Shao-Hong Fang, Wei Liu, Shu-Yun Zhang, Scientific Research Center, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province, No. D2007-18; the Doctor Research Fund of the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, No. BS2007-07; and the Medical Research Foundation of Health Department of Heilongjiang Province, No. 2005-311

Correspondence to: Professor Shu-Yun Zhang, Research Center, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 246 Xuefu Road, Nangang District, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. zhshuyun136@yahoo.com.cn

Received: 2009-07-19 Revised: 2009-08-07

Accepted: 2009-08-08 Published online: 2009-09-08

Abstract

AIM: To investigate the prevalence of lamivudine-resistant hepatitis B virus (HBV) strains (YIDD/YVDD variants) in patients with acute HBV infection (AHB).

METHODS: A total of 321 patients with HBV infection (HBV DNA $\geq 1.0 \times 10^7$ copies/L)

were included in the study, of which 100 had AHB and underwent no treatment, and 221 had chronic HBV infection (CHB) and were treated with lamivudine (100 mg/d). Serum specimens were taken from these patients and used to identify wild-type and YMDD motif mutant HBV strains by fluorescent hybridization biprobe-based polymerase chain reaction (PCR) and melting curve assay (FH-PCR-MC).

RESULTS: Only wild-type HBV was detected in patients with AHB (YMDD, 100%). Both wild-type and YMDD motif mutant HBV strains were detected in patients with CHB. The YMDD mutation rate in CHB patients was 63.4%. Of all YMDD mutations detected, YIDD variant accounted for 52.1%, YVDD variant 37.9%, and the mixed type (YIDD + YVDD) 10.0%. The YMDD mutation rates in CHB patients treated with lamivudine for < 1 year, 1-2 years, 2-3 years, 3-4 years and > 4 years were 45%, 66%, 77%, 75% and 40%, respectively. There was a significant difference in the YMDD mutation rate between the two groups of patients ($\chi^2 = 112.3, P = 0.00$).

CONCLUSION: Lamivudine-resistant HBV strains are not detected in patients with acute HBV infection.

Key Words: Hepatitis B virus; Acute hepatitis B; Chronic hepatitis B; Lamivudine; YMDD mutations; Polymerase chain reaction

Li XK, Zhou ZH, Jin Q, Du B, Shi YG, Fang SH, Liu W, Zhang SY. Prevalence of lamivudine-resistant HBV strains in patients with acute HBV infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(25): 2631-2634

摘要

目的: 调查YMDD变异株在急性HBV感染(AHB)中的流行情况, 为指导AHB的防治提供依据。

方法: 收集HBV感染者321例(HBV DNA $\geq 1.0 \times 10^7$ copies/L), 其中未开始治疗的AHB患者100例和拉米夫定治疗(100 mg/d)不同时期的CHB患者221例。采集外周血标本, 用荧光标

背景资料

在国外拉米夫定不仅能安全有效地用于慢性乙型肝炎的治疗, 也安全有效地用于急性(重症)乙型肝炎的治疗, 以促进病毒清除和机体康复。但大量的临床实践已证明, 应用拉米夫定治疗慢性乙型肝炎易发生HBV YMDD基序的变异(用药3年变异率可达70%), 变异株的存在会导致拉米夫定疗效下降或无效, 部分病例还会出现病情加重, 威胁生命。而且目前国内外也均有报道在未经拉米夫定治疗的慢性乙型肝炎患者中也有YMDD变异株存在, 比率高达20%以上。有必要调查急性HBV感染者中是否有YMDD变异株存在, 以明确YMDD变异株的流行情况, 更好地指导拉米夫定安全有效地应用。

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
抗病毒药物的开发、应用和耐药变异的防控仍是该研究领域的热点和重点。

记杂交双探针PCR融解曲线法(FH-PCR-MC)检测血清HBV YMDD及其变异, 统计分析HBV YMDD变异在两组中的分布。

结果: 在AHB组, 只检出HBV YMDD野生型, 未检出变异型。而在CHB组, YMDD变异检出率为63.4%, 其中YIDD占52.1%, YVDD占37.9%, YIDD+YVDD混合变异占10.0%; 1年内、1-2年、2-3年、3-4年和4年以上疗程YMDD变异率分别为45%, 66%, 77%, 75%和40%, YMDD变异检出率在两组中差异显著($\chi^2 = 112.3, P = 0.00$)。

结论: 目前在用拉米夫定治疗的CHB患者中仍有较高比率的YMDD变异株存在, 但尚未发现该变异株在AHB患者中流行。

关键词: 乙型肝炎病毒; 急性乙型肝炎; 慢性乙型肝炎; 拉米夫定; YMDD变异; 聚合酶链反应

李兴库, 周志红, 金茜, 杜博, 房绍红, 刘伟, 张淑云. 拉米夫定耐药变异株在急性HBV感染者中的流行调查. 世界华人消化杂志 2009; 17(25): 2631-2634
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2631.asp>

0 引言

核苷(酸)类似物作用于乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)多聚酶区, 终止HBV DNA链的合成, 抑制病毒复制, 具有较好的抗病毒作用^[1-2]。拉米夫定是第1个在全球和我国批准的核苷类似物, 大量临床研究证明拉米夫定能迅速降低外周血HBV载量, 改善肝功能和肝组织学病变, 延缓肝硬化进展和减少肝癌的发生率, 已被广泛应用于慢性HBV感染(chronic hepatitis B, CHB)的抗病毒治疗, 其长期应用的安全性和有效性已得到评价^[3-4]。目前在国外, 拉米夫定也已安全有效地用于治疗急性(重症)乙型肝炎(acute hepatitis B, AHB), 以促进病毒清除和机体康复^[5-6]。但大量的临床实践已证明, 应用拉米夫定治疗CHB易发生HBV耐药变异, 主要表现为HBV聚合酶区酪氨酸-蛋氨酸-天门冬氨酸-天门冬氨酸(tyrosine-methionine-aspartic acid-aspartic acid, YMDD)基序变异, 即第522位蛋氨酸(M)被缬氨酸(V)或异亮氨酸(I)所取代, 形成M552V(YVDD)与M552I(YIDD)变异株, 变异株的存在会导致拉米夫定疗效下降或无效, 部分病例还会出现病情加重, 威胁生命^[3-4, 7]。近年国内外也有研究报道在未经拉米夫定治疗的CHB中存在YMDD基序自然变异^[8-11]。那么, 在AHB

人群是否有HBV YMDD变异株的传播目前还不清楚。因此, 我们检测了100例AHB患者中的HBV YMDD及其变异, 初步调查了HBV YMDD变异株的流行情况, 以便指导AHB的防治。

1 材料和方法

1.1 材料 2006-10/2008-12我院就诊的AHB患者100例, 男68例, 女32例, 平均年龄 38.47 ± 13.03 岁; 选同期就诊的口服拉米夫定(100 mg/d)治疗的CHB患者221例作为对照组, 男182例, 女39例, 平均年龄 37.66 ± 9.81 岁。诊断均符合第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^[12]。AHB组: 入组时HBsAg阳性和HBcAb-IgM阳性, 追踪1年HBsAg阴性和(或)HBsAb阳性; CHB组: HBsAg阳性持续超过6 mo以上。所有入组病例HBV DNA $\geq 1.0 \times 10^7$ copies/L, 均排除免疫性疾病和共感染因素。HBV DNA荧光定量试剂盒和HBV YMDD突变核酸扩增(PCR)荧光检测试剂盒均购自深圳匹基生物工程有限公司。仪器主要使用美国罗氏公司的LightCycler™荧光定量PCR仪。

1.2 方法 HBV血清学和酶学检测采用临床常规方法, 即病毒感染的血清学检测采用ELISA方法, 酶学检测采用生化方法; 血清HBV DNA定量采用实时荧光定量PCR法。

HBV YMDD变异检测采用荧光标记杂交双探针PCR融解曲线法(FH-PCR-MC), 具体操作步骤按试剂盒说明进行。该方法的原理和阳性对照品检测结果及分析参见文献^[13]。

统计学处理 数据处理采用SPSS13.0统计软件完成。组间比较采用 t 检验和 χ^2 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 321例急慢性HBV感染者的一般临床资料 在两组资料中, 年龄和HBV DNA水平相匹配, 无统计学差异。AHB组的女性和HBeAb(+)比率、ALT和AST水平均较CHB组高, 而HBeAg(+)比率较CHB组低, 均有统计学差异($P < 0.01$), 反映两组疾病的性质不同(表1)。

2.2 HBV YMDD及其变异 在AHB组中, 100份检测标本均为YMDD野生型, 占100%, 未检出YMDD变异型。在CHB组中, 检出YMDD野生型81例, 占36.7%; YMDD变异型140例, 占63.4%, 其中YIDD变异(YIDD/YIDD+YMDD)73例, 占52.1%; YVDD变异(YVDD/YVDD+YMDD)53

创新盘点
已有大量报道总结和评价了拉米夫定治疗慢性HBV感染者的安全性、有效性和YMDD基序变异率; 也有报道调查了在未经拉米夫定治疗的慢性HBV感染者中有YMDD变异株存在, 但在急性HBV感染人群中是否有HBV YMDD变异株的传播目前报道较少。本文即对新发HBV感染人群中是否有YMDD变异株存在进行了调查。

表 1 321例急性HBV感染者的一般临床资料

分组	AHB (<i>n</i> = 100)	CHB (<i>n</i> = 221)	<i>P</i> 值
年龄 (mean ± SD, 岁)	38.5 ± 13.0	37.7 ± 9.8	NS
性别 (男/女)	68 32	182 39	0.004
ALT 水平 (mean ± SD, U/L)	1361.4 ± 1165.9	115.5 ± 252.5	0.000
AST 水平 (mean ± SD, U/L)	816.0 ± 684.8	95.4 ± 141.2	0.000
HBV DNA (copies/L)	9.6 ± 6.4 × 10 ⁹	2.1 ± 5.7 × 10 ⁹	NS
HBeAg阳性(%)	31(31)	159(72.0)	0.000
HBeAb阳性(%)	57(57)	23(10.4)	0.000

表 2 221例CHB患者拉米夫定治疗时间和YMDD变异

治疗时间(年)	<i>n</i>	YMDD	变异类型				变异检出率(%)
			YIDD	YVDD	YIDD+YVDD	合计	
<1	44	24	12	7	1	20	45
1-2	112	38	34	32	8	74	66
2-3	43	10	20	10	3	33	77
3-4	12	3	5	2	2	9	75
4	10	6	2	2	0	4	40
合计	221	81	73	53	14	140	63.4

例, 占37.9%; YIDD+YVDD混合变异14例, 占10.0%。两组比较, YMDD变异检出率有显著差异(0.0% vs 63.4%, $\chi^2 = 112.3$, $P = 0.00$)。

2.3 CHB组中YMDD变异与治疗时间的关系 拉米夫定治疗3年左右YMDD变异率高达70%以上(表2)。

3 讨论

1996年Tipples *et al*^[14]和Ling *et al*^[15]就报道了拉米夫定治疗HBV感染Ⅱ期临床试验时发现的耐药YMDD基序变异。1998年Allen *et al*^[7]报道了体外验证的结果。但拉米夫定确实能迅速降低外周血HBV载量, 改善肝功能和肝组织学病变, 因而在1999年在我国正式批准上市。姚光弼 *et al*^[3]系统总结和评价了拉米夫定治疗HBeAg阳性慢性乙型肝炎患者7年结果, 认为拉米夫定治疗HBeAg阳性慢性乙型肝炎是安全有效的, 但同时也报道了拉米夫定治疗5年内HBV YMDD基序的高变异率, 分别为12.1%、49.7%、70.5%、67.0%和70.8%。我们对本地区近两年就诊的221例接受拉米夫定治疗不同时期的CHB患者进行了HBV YMDD及其变异检测和分析, 用药1-4年变异检出率分别为45%、66%、76%和75%, 总变异检出率为63.4%, 包括YIDD、YVDD及其混合型, 用药3年左右YMDD基序变异率高达70%

以上, 与其他报道基本一致^[3-4], 但比我们以前统计报道的总变异检出率结果略高^[13-16], 说明本地区在拉米夫定治疗人群中仍有较高比率的HBV YMDD变异株存在。

那么如此高比率的HBV YMDD变异株在人群中是否有流行, 以及对AHB临床表现及其防治有何影响尚不清楚。我们对100例AHB患者治疗前外周血中的HBV YMDD及其变异进行检测, 均为YMDD野生型, 未检出YMDD变异型, 初步表明本地区尚无明显的YMDD变异株引起的AHB患者, YMDD变异株尚未成为AHB预防和治疗的问题。日本学者Hayashi *et al*^[17]曾对AHB患者HBV YMDD变异株进行检测, 也未检出HBV YMDD变异株。分析YMDD变异株尚未引起AHB患者的原因可能有以下几点: (1)接受拉米夫定治疗的患者也接受了预防HBV传播的教育, 可能会避免HBV YMDD变异株传播的机会。(2)在拉米夫定治疗过程中一旦检测到HBV YMDD变异株会采取新的治疗措施, 如联合应用干扰素或改用阿德福韦酯等, 控制变异株, 使HBV YMDD变异株没有足够的时间引起新的感染。(3)体外实验证明HBV YMDD变异株复制能力较野生株低, 认为其可能具有较弱的传染性, 但尚需进一步证明。

在本研究中AHB组均为急性自限性HBV

名词解释

YMDD基序变异: 即HBV聚合酶区酪氨酸-蛋氨酸-天门冬氨酸-天门冬氨酸(YMDD)基序的第522位蛋氨酸(M)被缬氨酸(V)或异亮氨酸(I)所取代, 形成M552V(YVDD)与M552I(YIDD)变异株。由于HBV不同基因型在基因组长度上的差异, 使得对于耐药突变的命名有些混乱。基因型不同突变位点基因序列数目表示不同, 在基因型A为M552V/I, 在基因型B和C为M550V/I, 基因型D为M539V/I, 基因型E和G为M549V/I。这个区域中的突变应该这样描述: 在前缀字母rt后的是原始的氨基酸, 接着是从此区域开始计数的密码子编号, 最后是突变的氨基酸。

同行评价
本研究调查YMDD变异株在急性HBV感染(AHB)中的流行情况,显示在AHB中,只检出HBV YMDD野生型,未检出变异型,对防治AHB具有临床意义。

感染,使本研究可能有一定局限性,因为有报道在未经拉米夫定治疗的慢性HBV感染者中有YMDD变异株存在,比率高达20%以上,而且该类慢性感染是否有由YMDD变异株急性感染所致尚不清楚^[9-11]。所以,我们认为应该研究新发病例的HBV特征,更好地了解HBV感染后的临床表现。另外在应用拉米夫定治疗时要选择合适的患者和治疗方案,提高疗效,减少HBV突变发生^[18]。

4 参考文献

- 1 Humphries JC, Dixon JS. Antivirals for the treatment of chronic hepatitis B: current and future options. *Intervirology* 2003; 46: 413-420
- 2 Quan DJ, Peters MG. Antiviral therapy: nucleotide and nucleoside analogs. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 371-385
- 3 姚光弼,朱玫,马秀云,蔡皓东.拉米夫定治疗HBeAg阳性慢性乙型肝炎患者7年结果总结. *肝脏* 2007; 12: 81-85
- 4 Yuen MF, Fong DY, Wong DK, Yuen JC, Fung J, Lai CL. Hepatitis B virus DNA levels at week 4 of lamivudine treatment predict the 5-year ideal response. *Hepatology* 2007; 46: 1695-1703
- 5 Miyake Y, Iwasaki Y, Takaki A, Fujioka S, Takaguchi K, Ikeda H, Kobashi H, Sakaguchi K, Shiratori Y. Lamivudine treatment improves the prognosis of fulminant hepatitis B. *Intern Med* 2008; 47: 1293-1299
- 6 Lisotti A, Azzaroli F, Buonfiglioli F, Montagnani M, Alessandrelli F, Mazzella G. Lamivudine treatment for severe acute HBV hepatitis. *Int J Med Sci* 2008; 5: 309-312
- 7 Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, Tipples GA, Walters KA, Tyrrell DL, Brown N, Condreay LD. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. *Hepatology* 1998; 27: 1670-1677
- 8 Shin YM, Heo J, Kim GH, Kang DH, Song GA, Cho M, Yang US, Kim CM, Park HK, Jang HJ. [Natural YMDD motif mutations of HBV polymerase in the chronic hepatitis B virus infected patients] *Taehan Kan Hakhoe Chi* 2003; 9: 1-9
- 9 Ramezani A, Velayati AA, Roshan MR, Gachkar L, Banifazl M, Keyvani H, Aghakhani A. Rate of YMDD motif mutants in lamivudine-untreated Iranian patients with chronic hepatitis B virus infection. *Int J Infect Dis* 2008; 12: 252-255
- 10 张照华,孟红.乙型肝炎病毒YMDD变异研究进展. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)* 2008; 2: 64-66
- 11 覃亚勤,赵登蕴,覃后继,李朝敢,黄重敏.125例广西壮族慢性肝病HBV YMDD自然变异研究. *中国医师杂志* 2005; 7: 1551-1552
- 12 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订.病毒性肝炎防治方案. *中华传染病杂志* 2001; 19: 56-62
- 13 张淑云,刘伟,李迪,谷鸿喜; 仰曙芬,周志红,杜博,金茜,常曼丽.荧光标记杂交双探针PCR融解曲线法在临床的应用评价. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1291-1294
- 14 Tipples GA, Ma MM, Fischer KP, Bain VG, Kneteman NM, Tyrrell DL. Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine in vivo. *Hepatology* 1996; 24: 714-717
- 15 Ling R, Mutimer D, Ahmed M, Boxall EH, Elias E, Dusheiko GM, Harrison TJ. Selection of mutations in the hepatitis B virus polymerase during therapy of transplant recipients with lamivudine. *Hepatology* 1996; 24: 711-713
- 16 Li D, Gu HX, Zhang SY, Zhong ZH, Zhuang M, Hattori T. YMDD mutations and genotypes of hepatitis B virus in northern China. *Jpn J Infect Dis* 2006; 59: 42-45
- 17 Hayashi K, Katano Y, Takeda Y, Honda T, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Nakano I, Yano M, Goto H, Yoshioka K, Toyoda H, Kumada T. Comparison of hepatitis B virus subgenotypes in patients with acute and chronic hepatitis B and absence of lamivudine-resistant strains in acute hepatitis B in Japan. *J Med Virol* 2007; 79: 366-373
- 18 Gish RG. Hepatitis B treatment: Current best practices, avoiding resistance. *Cleve Clin J Med* 2009; 76 Suppl 3: S14-S19

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 2009-09-08)

HBV抗原肽冲击的DC对慢性乙型肝炎及HBV携带者的免疫治疗作用

牛春燕, 任天顺, 陈旭, 成碧萍

牛春燕, 陈旭, 成碧萍, 西安医学院附属医院消化内科 陕西省西安市 710077
任天顺, 西安医学院附属医院普外科 陕西省西安市 710077
作者贡献分布: 此课题由牛春燕与任天顺设计; 研究过程由牛春燕、陈旭及成碧萍操作完成; 数据分析及论文写作由牛春燕完成。
通讯作者: 牛春燕, 副主任医师, 710077, 陕西省西安市, 西安医学院附属医院消化内科. nchy69@163.com
电话: 029-84278402
收稿日期: 2009-06-14 修回日期: 2009-07-30
接受日期: 2009-08-10 在线出版日期: 2009-09-08

Efficacy of immunotherapy using autologous dendritic cells pulsed with hepatitis B surface antigen in patients with chronic hepatitis B

Chun-Yan Niu, Tian-Shun Ren, Xu Chen, Bi-Ping Cheng

Chun-Yan Niu, Xu Chen, Bi-Ping Cheng, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an 710077, Shaanxi Province, China
Tian-Shun Ren, Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an 710077, Shaanxi Province, China
Correspondence to: Chun-Yan Niu, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an 710077, Shaanxi Province, China. nchy69@163.com
Received: 2009-06-14 Revised: 2009-07-30
Accepted: 2009-08-10 Published online: 2009-09-08

Abstract

AIM: To investigate the efficacy of immunotherapy using hepatitis B surface antigen (HbsAg)-pulsed autologous dendritic cells (DCs) in patients with chronic hepatitis B (CHB).

METHODS: After autologous DCs were loaded with HbsAg and cultured, they were intravenously infused back to patients. The overall course of treatment was divided into four phases: three months of intensive therapy, three months of consolidation therapy, six months of observation of short-term curative effect, and one year of observation of long-term curative effect. A high-throughput detection of HBV mutations was performed in each patient before

therapy. Liver and renal function, HBV DNA level and HBV markers were measured in all patients before and after each treatment.

RESULTS: HBV core gene mutations occurred in 15.1% of patients (58/384). Of 134 patients with HBeAg-positive CHB, 58 showed virological response to the therapy, 21 showed serological response, and 75 showed biochemical response. Of 102 patients with HBeAg-negative CHB, 40 showed virological response, and 53 showed biochemical response. Complete response was observed in 112 (29.2%) and 124 (32.4%) patients in one and two years, respectively. After treatment, serum HBsAg, HBeAg and HBV DNA levels significantly decreased (2484.39 ± 185.2 ng/L vs 1616.28 ± 169.81 ng/L; 32.1 ± 5.78 ng/L vs 69.9 ± 7.61 ng/L; $0.08 \pm 1.78 \times 10^8$ copies/L vs $1.79 \pm 1.21 \times 10^8$ copies/L, all $P < 0.05$ or 0.01). No serious adverse events were noted during and after treatment.

CONCLUSION: HbsAg-pulsed DCs are effective in the treatment of CHB patients and HBV carriers.

Key Words: Chronic hepatitis B; Autologous dendritic cell; Immunotherapy

Niu CY, Ren TS, Chen X, Cheng BP. Efficacy of immunotherapy using autologous dendritic cells pulsed with hepatitis B surface antigen in patients with chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(25): 2635-2639

摘要

目的: 观察HBV抗原肽冲击的自体树突状细胞对慢性乙型肝炎(CHB)及HBV携带者的疗效及安全性。

方法: HBV抗原肽致敏的树突状细胞, 经培养后回输给患者, 总疗程6 mo, 分为: 密集治疗期(第1-3月), 10-20 d为1个周期; 巩固治疗期(第4-6月), 30 d为1周期。临床疗效跟踪期(第7-12月); 远期疗效观察期(第13-24月)。首次治疗前行高通量HBV变异基因检测, 每次治疗前、后

背景资料

我国人群的HBV检出率为9.09%, 约有1.1亿人为慢性HBV感染。慢性乙型肝炎的发病率和死亡率与病毒持续复制和疾病进展为肝硬化或肝癌密切相关。纵向研究表明, 慢性乙型肝炎确诊后, 肝硬化累积5年发生率约8%-20%, 肝脏失代偿5年累积发生率约20%。肝硬化患者每年HBV相关肝细胞癌的发生率为2%-5%。HBV慢性化主要与机体免疫状况、病毒载量及两者的平衡关系有关, 其中树突状细胞(DC)发挥着极其重要的作用。现有的治疗慢性乙型肝炎的药物之所以对HBV携带者疗效不佳, 最主要的原因就是免疫耐受而使抗病毒药不能发挥作用, 只能抑制病毒的复制, 却不能清除病毒。

背景资料

姚登福, 教授, 南通大学附属医院分子医学中心

相关报道

彭建平 *et al* 对 CHB 患者外周血 DC 的研究发现, CHB 患者外周血 DC 可被 HBV DNA 感染, 并可检测到, 而且患者 DC HBV DNA 载量与 DC 功能有密切关系, 病毒载量低者 DC 功能好, 病毒载量高者 DC 功能差. 国内外的动物实验和人体临床研究也已证实, DC 增强免疫疗法的基本原理是提高 CHB 患者体内 DC 功能, 诱导强烈的 HBV 特异性免疫反应清除病毒.

检查 HBV-M, HBV DNA, 血常规、肝功能、肾功能、肝胆胰脾 B 超及血 HBV DNA 载量.

结果: 384 例慢性 HBV 感染患者中, 发生 C 区变异最多: 58 例 (15.1%); HBeAg(+) CHB 134 例中, 分别有 58 例 (43.3%)、21 例 (15.7%)、75 例 (55.6%) 发生单项病毒学、血清学及生化学应答; HBeAg(-) 慢 CHB 102 例中, 分别有 40 例 (39.2%)、53 例 (52%) 发生单项病毒学及生化学应答; 81 例慢性 HBV 携带者中, 28 例及 33 例分别发生病毒学、血清学应答. 1 年时, 完全应答 112 例 (29.2%), 2 年时, 完全应答 124 例 (32.4%); 与治疗前相比 HBsAg、HBeAg 及血清 HBV DNA 载量均发生显著性的变化 (2484.39 ± 185.2 ng/L *vs* 1616.28 ± 169.81 ng/L; 32.1 ± 5.78 ng/L *vs* 69.9 ± 7.61 ng/L; $0.08 \pm 1.78 \times 10^8$ copies/L *vs* $1.79 \pm 1.21 \times 10^8$ copies/L, $P < 0.05$ 或 0.01); 治疗期间及结束后, 无严重不良反应发生.

结论: HBV 抗原肽冲击的树突状细胞可用于 CHB 的治疗, 疗效及安全性确切.

关键词: 慢性乙型肝炎; 树突状细胞; 免疫治疗

牛春燕, 任天顺, 陈旭, 成碧萍. HBV 抗原肽冲击的 DC 对慢性乙型肝炎及 HBV 携带者的免疫治疗作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(25): 2635-2639
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2635.asp>

0 引言

HBV 感染人体后, 机体的免疫反应决定疾病的发生、发展与转归, 机体对 HBV 形成免疫耐受是 HBV 持续感染的主要原因. 树突状细胞 (dendritic cell, DC) 是人体内功能最强的抗原提呈细胞 (antigen presenting cell, APC), 其功能状态直接影响细胞和体液免疫应答. 慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 患者 DC 功能低下, 导致机体内 T、B 淋巴细胞呈耐受状态, 因此, 打破免疫耐受状态, 诱导有效的机体免疫, 抑制并清除 HBV 是 CHB 免疫治疗的关键. 目前, 用于治疗 CHB 的药物主要有干扰素和核苷类似物, 因不良反应明显、疗程难以确定、长期应用费用增加及导致耐药突变等限制了其广泛应用^[1]. 本研究以 HBV 抗原表位肽在体外冲击患者自体 DC 细胞后, 予以回输, 观察该方法对 CHB 的疗效及安全性.

1 材料和方法

1.1 材料 选取 2006-06/2008-08 在我院门诊就诊

的 CHB 患者 384 例, 其中男 278 例, 女 106 例, 年龄 18-58 (平均 38.2 ± 10.5) 岁, 病程 1-26 mo. 有家族史者 78 例 (父母或兄弟姐妹). HBeAg 阳性 134 例, 年龄 19-53 岁, 男 84 例, 女 50 例; HBeAg 阴性 102 例, 年龄 19-55 岁, 男 69 例, 女 33 例. 慢性 HBV 携带者 81 例, 年龄 20-56 岁, 男 48 例, 女 33 例. MCS+ED 血细胞分离机 (美国血液技术公司), 微电脑控制 CO₂ 培养箱 (Intr logic, 美国), 倒置显微镜 (Olympus, 日本), -86℃ 超低温冰箱 (美国热电公司), PCR 仪 (Applied Biosystems 7500, 美国), 实时核酸杂交定量分析系统 (通亿公司), VICTOR2 高通量液态基因分析系统 (美国应用生物系统公司). HBV 抗原表位肽购自中国人民解放军第四军医大学全军基因诊断技术研究所. 本研究经过西安医学院附属医院伦理委员会批准, 所有患者签署书面知情同意书.

1.2 方法

1.2.1 纳入及排除标准: 病例纳入标准: (1) 符合我国《慢性乙型肝炎防治指南》^[2] 诊断标准; (2) 1 mo 前血清白蛋白 > 35 g/L, TBIL \geq 正常 1.5 倍, 凝血酶原活动度 (PTA) $> 60\%$; (3) 依从性好; (4) 6 mo 内未用任何抗病毒药物及免疫调节药物治疗, 期间也不使用任何抗 HBV 药物及免疫调节剂. 排除对象: (1) 血清抗-HCV、抗-HIV 阳性者; (2) 其他病毒性、药物性、酒精性肝病及自身免疫性疾病者; (3) 确诊肿瘤、肝硬化失代偿期、其他传染病 (如结核); (4) 有明显的心、脑、肾功能障碍者; (5) 甲状腺功能异常者; (6) 有血液病、糖尿病、酗酒和吸毒史者; (7) 妊娠和哺乳期、育龄期妇女.

1.2.2 DC 制备及体外培养: 用 MCS+血细胞分离机采集患者外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) $(1-4) \times 10^9$. 在符合千级空气层流净化室、GLP (good laboratory practice) 的实验室条件下, 置于透气性培养袋中, 于不同时间加入一定剂量的培养液. 用粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 和白介素 4 (IL-4) 等细胞因子诱导扩增出 DC, 于 37℃, 50 mL/L CO₂ 悬浮培养. 所有可能开放的操作均在百级超净台内进行. 于培养的第 7 天, 加入 HBV 抗原表位肽, 同时做细菌培养、真菌及支原体检测, 至第 10 天, 如活细胞 $> 95\%$, 将 DC 细胞悬液离心、去上清, 再用 2 g/L 白蛋白及 IL-2 100 IU/L 的生理盐水洗涤 2 次, 最后将细胞悬浮于 100 mL 含白蛋白 (5 g) 的生理盐水中, 经静脉回输给患者, 同时以 IL-2 50 万 U 皮下注射.

表 1 384例CHB患者HBV基因变异检测结果															
变异基因	C	C,P	C,X	CPX	P	PX	S	S,C	S,X	SCX	S,P	SCP	SPX	X	SCPX
<i>n</i>	58	38	18	30	12	6	12	5	2	3	3	8	2	24	8
比例(%)	15.1	9.9	4.7	7.8	3.1	1.6	3.1	1.3	0.5	0.8	0.8	2.1	0.5	6.3	2.1

表 2 HBV抗原表位肽冲击的CD对CHB的治疗效果													
诊断	<i>n</i>	单项应答			时间顺序应答			治疗1年后联合应答			治疗2年后联合应答		
		病毒学	血清学	生化学	初始	持久	复发	完全	部分	无	完全	部分	无
HBeAg(+)	134	58	21	75	85	76	25	52	49	33	46	57	31
HBeAg(-)	102	40		53	59	46	22	37	40	25	39	36	27
慢性HBV携带者	81	28	33		31	25	8	23	36	22	27	31	22

表 3 抗HBV-DC治疗前后HBsAg、HBeAg及HBV DNA定量比较			
指标	HBsAg(ng/L)	HBeAg(ng/L)	HBV DNA × 10 ⁸ copies/L
治疗前	2484.39 ± 185.2	69.9 ± 7.61	1.79 ± 1.21
治疗后	1616.28 ± 169.81 ^b	32.1 ± 5.78 ^b	0.08 ± 1.78 ^a
<i>n</i>	384	134	384
<i>t</i> 值	3.36	2.45	1.61
<i>P</i> 值	<0.001	<0.005	<0.05

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 治疗前.

1.2.3 治疗方法: 总疗程共6 mo, 分为(1)密集治疗期(第1-3月), 10-20 d为1个周期; (2)巩固治疗期(第4-6月), 30 d为1周期. (3)临床疗效跟踪期(第7-12月); (4)远期疗效观察期(第13-24月).

1.2.4 治疗前后的指标观察: 治疗前、后检查HBV-M, 血HBV DNA载量, 高通量HBV变异基因检测, 血尿常规、肝功能、肾功能、肝胆胰脾B超, 胸部透视及心电图(必要时). HBV DNA ≥ 1 × 10⁶ copies/L为阳性.

统计学处理 采用治疗前后自身对照, 指标的比较应用配对*t*检验及χ²检验, 所有数据利用SPSS12.0软件进行统计分析, *P*<0.05为有统计学意义.

2 结果

2.1 HBV变异基因检测结果 384例CHB患者中, 发生C区变异最多, 为58例(15.1%), 其次为C区+P区变异, 为38例(9.9%), CPX变异30例(7.8%), X区变异为24例(6.3%)(表1).

2.2 HBV抗原表位肽冲击的CD对CHB的治疗效果 HBeAg(+)CHB 134例中, 分别有58例(43.3%)、21例(15.7%)、75例(55.6%)发生单

项病毒学、血清学及生化学应答. 1年后, 完全、部分、无应答分别为52例(38.8%)、49例(36.6%)、33例(24.6%). 2年后, 完全、部分、无应答分别为46例(34.3%)、57例(42.5%)、31例(23.1%). HBeAg(-)CHB 102例中, 分别有40例(39.2%)、53例(52%)发生单项病毒学及生化学应答. 1年后, 完全、部分、无应答分别为37例(36.3%)、40例(39.2%)、25例(24.5%). 2年后, 完全、部分、无应答分别为39例(38.2%)、36例(35.3%)、27例(26.5%). 慢性HBV携带者81例中, 分别有28例(34.6%)、33例(40.7%)发生单项病毒学及血清学应答. 1年后, 完全、部分、无应答分别为23例(28.4%)、36例(44.4%)、22例(27.2%). 2年后, 完全、部分、无应答分别为27例(33.3%)、31例(38.3%)、22例(27.2%)(表2).

2.3 治疗前后HBsAg、HBeAg及血清HBV DNA载量的变化 治疗前后HBsAg、HBeAg及血清HBV DNA载量的变化, 差异均有显著性(表3).

3 讨论

卫生部公布的2005年度传染病疫情信息显示, 我国乙型肝炎的患者数位列所有传染病第2位,

创新盘点
本文检测了全部观察病例的基因突变区域, 并进行分析, 为治疗方案的制定提供了理论基础及指导; 对所有观察病例完成了2年的随访, 证实DC治疗的疗效确切, 具有进一步应用及拓展前景, 并为今后及其他有关CHB的发病机制和免疫治疗等研究提供了参考依据.

应用要点

近年来许多研究证实慢性乙型肝炎患者外周血中存在DC表型功能及其亚群平衡失调等现象,提出DC在HBV的免疫耐受形成中充当主要角色。CHB体内MDC和PDC细胞数量和功能均有不同程度的降低,从而影响机体的天然免疫应答和特异性免疫应答等方面,而控制或清除体内的病毒,必须依靠机体针对多子活化慢性乙肝患者外周血中DCs,经体外HBsAg致敏,刺激自身的T淋巴细胞,可有效抑制HBeAg的表达,其抑制率明显大于未负载抗原的DCs及未经DCs刺激的T细胞等,而且其最大抑制率可达87.8%。这种DC治疗方法具有治疗慢性乙肝的作用,为治疗CHB开辟了一条新的用途。

仅次于肺结核。CHB的后果是进展为肝纤维化,并发展成为肝硬化、终末期肝病。CHB患者体内HBV持续存在不易清除的原因可能是机体免疫功能低下,对感染的HBV形成免疫耐受所致^[3]。患者免疫功能缺陷的重要原因之一是其外周血中DC数量下降,表型不成熟,功能降低,无法有效呈递HBV抗原肽,不能诱发有效的特异的体液免疫和细胞免疫应答^[4]。CHB患者病情迁延不愈的主要原因是由于HBV形成的特异性的免疫耐受所导致的病毒持续感染。而DC功能的异常可能导致抗原提呈功能失调,引起体液和细胞免疫紊乱,最终导致患者病情迁延不愈。彭建平 *et al*^[5]对CHB患者外周血DC的研究发现,CHB患者外周血DC可被HBV DNA感染,并可检测到,而且患者HBV DNA载量与DC功能有密切关系,病毒载量低者DC功能好,病毒载量高者DC功能差。

CHB患者抗病毒治疗后DC的研究显示抗病毒药物和IFN- α 可改善DC功能,促进DC增殖和成熟,增强DC抗原提呈作用,上调机体体液和细胞免疫应答,CHB病情控制,DC功能好转,说明DC功能下降是造成CHB持续感染的原因之一。HBsAg激活的DC在患者体内诱导强烈的HBV特异性免疫反应,可识别相应的HBsAg,使机体摆脱对HBV免疫耐受状态,从而彻底清除持续感染的病毒。

目前,用于CHB治疗的免疫调节剂通过调节免疫,期望改善或恢复机体免疫系统对HBV的免疫反应,但效果并不理想。而核苷类似物和干扰素等抗病毒药物只能抑制HBV的复制,不能清除肝细胞核内的共价闭合环状DNA(cccDNA),易致病毒变异及耐药,停药后容易复发,要达到持久地抑制或彻底地清除HBV,有赖于机体免疫系统功能的恢复^[6]。

在体外培养条件下,通过定向诱导扩增PBMC,可获得大量携带HBV抗原信息,并且功能正常、成熟的DC。将这些DC同输给慢性HBV感染者,可直接打破机体免疫系统对HBV的免疫耐受状态,恢复机体有缺陷的免疫系统的功能,重新启动抗HBV的免疫反应,清除病毒。所以,理论上的治疗效果应该明显优于目前的药物治疗,国内外的动物实验和人体临床研究均已得到证实^[7-8]。DC增强免疫疗法的基本原理是提高CHB患者体内DC功能,诱导强烈的HBV特异性免疫反应清除病毒。

从本文结果可以看出,经HBV抗原肽冲击

DC细胞后,无论是HBeAg阳性或HBeAg阴性及慢性HBV携带者都有一定疗效,部分患者肝功能复常,HBV DNA下降或转阴。HBV DNA水平高低与机体免疫功能相关^[9],HBV DNA水平下降提示机体免疫功能提高。HBeAg(+)慢性乙肝134例中,分别有58例(43.3%)、21例(15.7%)、75例(55.6%)发生单项病毒学、血清学及生化学应答;HBeAg(-)慢性乙肝102例中,分别有40例(39.2%)、53例(52%)发生单项病毒学及生化学应答;81例慢性HBV携带者中,28例及33例分别发生病毒学、血清学应答。1年后,完全应答112例,占29.2%,2年后,完全应答124例,占32.4%。以上结果表明,体外诱导扩增自身PBMC来源的DC,并经HBsAg致敏后的抗HBV-DC静脉回输,可有效打破慢性HBV携带者免疫系统对HBV的免疫耐受状态,有效抑制慢性HBV携带者的病毒复制,显著降低病毒抗原,促进HBeAg/HBeAb的血清学转换,部分患者的HBsAg、HBeAg及HBV DNA得到有效清除。

本文的观察,治疗后HBsAg、HBeAg、HBV DNA的定量均较治疗前明显下降,差异有显著性。全部病例在治疗期间及结束后,无严重不良反应发生。证明了本治疗方法的有效性 & 安全性。

HBV易发生变异。前C区和基本核心启动子(BCP)的变异可产生HBeAg阴性变异株。P基因变异主要见于POL/RT基因片段(349-692 aa,即rt1-rt344)。在拉米夫定治疗中,最常见的是酪氨酸-蛋氨酸-天门冬氨酸-天门冬氨酸(YMDD)变异,即由YMDD变异为YIDD(rtM204I)或YVDD(rtM204V),并常伴有rtL180M变异,且受药物选择而逐渐成为对拉米夫定耐药的优势株^[10]。S基因变异可导致隐匿性HBV感染(occult HBV infection),表现为血清HBsAg阴性,但仍可有HBV低水平复制(血清HBV DNA常 $<10^7$ copies/L)^[11]。本文的检测结果显示,西安地区CHB患者中,以C、CP、CPX、X及CX基因变异较多见,分别占15.1%(58例)、9.9%(38例)、7.8%(30例)及6.3%(24例),其中C区变异率最高。C基因型是我国最流行的HBV基因型之一,目前关于基因C型的研究结果差异较大。研究表明,BCP和前C区突变的发生早于HBe转换,BCP和前C区突变与疾病的进程和预后有关,是导致HBeAg阴性CHB的原因之一;另外,具有前C和/或BCP变异的CHB患者可能是发生对某种核苷(酸)类似物耐药突变的高危人群^[12-14]。因此我们认为,

有必要加强对这类人群的密切观察和动态监测。

从提高CHB患者免疫功能为出发点的CHB特异性免疫治疗途径, 增强CHB患者的T细胞应答是安全、有效和可行的, 特别是慢性HBV携带者, 因其血液中有较高水平的HBV患者本人及其周围人的心理负担较重, 迫切要求治疗, 采用特异性免疫治疗, 多数患者较乐于接受^[15]。但这种免疫治疗方法尚不能使所有接受治疗的患者都出现对HBV的完全应答。CHB患者外周血DC内亦可检测到HBV DNA, 说明DC亦能受到HBV的感染。而且DC的表型、刺激同种异体T细胞增殖能力及分泌IL-12能力与DC内HBV载量呈显著负相关关系, 在一定程度上反映了DC的功能状态对机体清除HBV的影响。因此, 寻求恢复或提高患者DCs的功能, 可能将是治疗CHB的一种新的方法^[5]。如何充分上调DC细胞功能, 打破机体的免疫耐受, 虽然目前的研究有了较大进展, 但DC机制仍不清楚, 比如在CHB感染中, DC免疫耐受的具体信号传导通路、分子调控机制、DC疗法中DC调节抗病毒免疫应答水平、人体应用HBsAg的来源和HBsAg激活的DC生物学特性以及制定适用于临床的DC疗法等, 仍是今后相关研究要解决的问题, 需要继续长期、大样本的临床观察, 并且探讨与其他治疗方法的联合治疗以提高和维持抗病毒疗效。

4 参考文献

- 1 Guan R. Interferon monotherapy in chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15 Suppl: E34-E40
- 2 中华医学会肝病学会、中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. *胃肠病学* 2006; 11: 550-557
- 3 Tavakoli S, Schwerin W, Rohwer A, Hoffmann S, Weyer S, Weth R, Meisel H, Diepolder H, Geissler M, Galle PR, Lohr HF, Böcher WO. Phenotype and

- function of monocyte derived dendritic cells in chronic hepatitis B virus infection. *J Gen Virol* 2004; 85: 2829-2836
- 4 司方明, 姜海山, 郑鹏远, 熊灵军, 范毅凯, 李俊红, 白经修. 树突状细胞治疗HBeAg阴性慢性乙型肝炎患者的临床观察. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3746-3748
- 5 彭建平, 孙克伟, 伍玉南, 何芳. 慢性乙型肝炎患者外周血树突状细胞HBV DNA载量与其功能的关系. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3556-3560
- 6 吴邦富, 杨江英, 周贻, 张大维, 温凌, 肖间开, 王巧瑜, 吴伟鸿, 张美华, 潘洁, 彭英宇, 杨军, 吴荧. 抗HBV-DC治疗慢性HBV携带者的初步临床研究. *中国医药导报* 2008; 5: 55-57
- 7 Fazle Akbar SM, Furukawa S, Yoshida O, Hiasa Y, Horiike N, Onji M. Induction of anti-HBs in HB vaccine nonresponders in vivo by hepatitis B surface antigen-pulsed blood dendritic cells. *J Hepatol* 2007; 47: 60-66
- 8 Jiang WZ, Fan Y, Liu X, Zhang YL, Wen JJ, Hao WL, Qian M. Therapeutic potential of dendritic cell-based immunization against HBV in transgenic mice. *Antiviral Res* 2008; 77: 50-55
- 9 陈明泉, 施光峰, 卢清, 李谦, 张琼华, 秦刚, 翁心华. 不同病毒载量的慢性乙型肝炎患者外周血树突状细胞的表型和功能. *中华肝脏病杂志* 2007; 15: 19-23
- 10 Lai CL, Dienstag J, Schiff E, Leung NW, Atkins M, Hunt C, Brown N, Woessner M, Boehme R, Condreay L. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 687-696
- 11 Hu KQ. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. *J Viral Hepat* 2002; 9: 243-257
- 12 李彤, 庄辉. 与HBeAg阴性相关的HBV突变. *中国医学论坛报* 2009; 35: D2-D3
- 13 王杰, 李杰, 庄辉. 乙型肝炎病毒基因型研究进展. *肝脏* 2007; 12: 498-500
- 14 Sakamoto T, Tanaka Y, Orito E, Co J, Clavio J, Sugauchi F, Ito K, Ozasa A, Quino A, Ueda R, Sollano J, Mizokami M. Novel subtypes (subgenotypes) of hepatitis B virus genotypes B and C among chronic liver disease patients in the Philippines. *J Gen Virol* 2006; 87: 1873-1882
- 15 郑鹏远, 白蓉, 姜海山, 唐芙爱, 白经修, 司方明, 琚新, 徐建强. HBsAg疫苗冲击树突状细胞联合乙肝免疫球蛋白对慢性乙型肝炎及HBV携带者的疗效. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1735-1738

同行评价

本研究样本量较大, 文章的科学性和可读性较好地反映我国胃肠病学临床的水平。

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

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种期刊的第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种期刊的第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。(科学编辑: 李军亮 2009-09-08)

三维容积超声在肝脏肿瘤诊断中的应用价值

王虹, 王洪波, 侯秀娟, 王晓蕾, 田家玮

背景资料
术前对肝肿瘤血管及其与周围血管的关系准确定位关系到能否精细切除, 三维容积超声技术能立体、动态地显示肿瘤整体的血流灌注, 提供较二维超声更为丰富的信息, 对肝肿瘤的诊治有重要意义。

王虹, 王洪波, 侯秀娟, 王晓蕾, 田家玮, 哈尔滨医科大学附属第二医院超声医学科 黑龙江省哈尔滨市 150086
作者贡献分布: 王虹与田家玮对此文所作贡献均等; 此课题由王虹与田家玮设计; 研究过程由王虹、田家玮、王洪波、侯秀娟及王晓蕾操作完成; 数据分析及写作由王虹完成。
通讯作者: 王虹, 主治医师, 150086, 黑龙江省哈尔滨市学府路246号, 哈尔滨医科大学附属第二医院超声医学科。
luandansong@sina.com
电话: 0451-86605253 传真: 0451-86662965
收稿日期: 2009-06-29 修回日期: 2009-08-17
接受日期: 2009-08-24 在线出版日期: 2009-09-08

Application of three-dimensional ultrasonography in the diagnosis of liver solid lesions

Hong Wang, Hong-Bo Wang, Xiu-Juan Hou, Xiao-Lei Wang, Jia-Wei Tian

Hong Wang, Hong-Bo Wang, Xiu-Juan Hou, Xiao-Lei Wang, Jia-Wei Tian, Department of Ultrasonography, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Correspondence to: Hong Wang, Department of Ultrasonography, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 246 Xuefu Road, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. luandansong@sina.com
Received: 2009-06-29 Revised: 2009-08-17
Accepted: 2009-08-24 Published online: 2009-09-08

Abstract

AIM: To explore the application of three-dimensional ultrasonography in the diagnosis of liver solid lesions.

METHODS: A total of 78 liver solid lesions in 60 patients were examined using three-dimensional ultrasonography. The three-dimensional images of blood vessels in liver solid lesions and their surrounding liver tissues were obtained. The three-dimensional ultrasonography findings were then confirmed pathologically.

RESULTS: In 78 liver solid lesions, the detection rate of blood flow signal by three-dimensional ultrasonography was higher than that by two-dimensional ultrasonography. Three-dimensional ultrasonography permitted acquisition of stereoscopic images of blood vessels in liver solid lesions and their surrounding liver tissues.

In hepatocellular carcinoma patients, blood flow signal was more abundant in tumor center than in tumor margin. In metastatic liver tumor patients, blood vessels were mainly distributed in tumor margin. The coincidence rate between three-dimensional ultrasonographic diagnosis and pathological diagnosis was 94.9%.

CONCLUSION: Three-dimensional ultrasonography can be used to precisely localize space-occupying lesions in the liver based on stereoscopic localization of blood vessels in these lesions and their surrounding tissues, and is therefore useful for differential diagnosis of liver neoplasms.

Key Words: Three-dimensional imaging; Ultrasonography; Liver neoplasm

Wang H, Wang HB, Hou XJ, Wang XL, Tian JW. Application of three-dimensional ultrasonography in the diagnosis of liver solid lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(25): 2640-2643

摘要

目的: 探讨三维容积超声在肝脏肿瘤术前诊断中的临床应用价值。

方法: 应用三维超声重建技术, 采集60例共78个肝实质性肿块内部及其周围肝脏组织的血供信息, 观察其立体图像, 并与病理结果对照。

结果: 三维重建后瘤体内血管显示率较二维图像增多, 并可获取二维实时扫查不能直接显示的肝脏肿瘤血管和周围血管分布的立体构象, 进行定位诊断。78个病灶中HCC以内部血流为主, MLT以瘤周血流为主, 总诊断符合率为94.9%。

结论: 三维容积超声技术可根据肝脏肿瘤内部和周围血管的走行及空间位置关系进行准确的定位, 并为临床鉴别诊断提供依据。

关键词: 三维成像; 超声; 肝脏肿瘤

王虹, 王洪波, 侯秀娟, 王晓蕾, 田家玮. 三维容积超声在肝脏

同行评议者
刘成海, 研究员, 上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝病研究所

肿瘤诊断中的应用价值. 世界华人消化杂志 2009; 17(25): 2640-2643
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2640.asp>

0 引言

原发性肝癌中肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)占90%以上, 是我国常见高发肿瘤之一^[1], 目前, 肝外科学对肝脏肿瘤的术式已经达到肝段、肝亚段甚至楔形切除的水平. 基于肿瘤血管结构与其病理基础密切相关, 在肿瘤鉴别诊断中的作用重大, 术前对肝脏病变定性及其与周围血管的关系准确定位关系到能否达到精细切除的目的. 三维容积超声技术能立体直观动态地显示器官和肿瘤整体的血流灌注, 提供较二维(two-dimensional, 2D)超声更为丰富的声学 and 血流信息. 重建生理状态下的肿瘤立体结构及其周围大血管的三维图像^[2-3]. 我们回顾性分析采用此项技术对60例肝脏肿瘤术前进行检查的结果, 并与手术结果进行对比, 旨在探讨三维超声对肝脏肿瘤术前诊断的临床应用价值.

1 材料和方法

1.1 材料 选取2008-07/2009-05我院69例肝脏占位性病变患者共87个肝实质性肿块, 排除因心脏搏动、体位限制等影响而成像效果不好的9例患者, 有60例患者共78个肝实质性肿块纳入本研究范围, 肿块直径19-67 mm, 平均 36 ± 13 mm, 其中HCC 31例, 33个病灶; 转移性肝癌(metastatic liver tumor, MLT)8例, 19个病灶; 肝血管瘤(hepatic hemangioma, HCH)15例, 18个病灶; 肝硬化结节(cirrhotic nodule)3例, 5个病灶; 炎性假瘤(inflammatory pseudotumor of the liver, IPL)2例2个病灶; 肝局灶性结节性增生(focal nodular hyperplasia, FNH)1例1个病灶. 所有病例均经手术后病理或超声引导下穿刺活检病理证实.

1.2 方法

1.2.1 仪器: 使用GE Voluson E8彩色超声诊断仪, 凸阵三维容积探头, 频率3.5-5.0 MHz, 并配有腹部三维超声成像后处理软件.

1.2.2 图像采集: 在2D图像基础上检测肝内肿块大小、形态、位置及其与周围组织关系. 首先应用彩色多普勒血流显像(color doppler flow imaging, CDFI)和能量多普勒(power doppler imaging, PDA)观察病灶周围和内部肿瘤血管的走行、分布和结构, 频谱多普勒判断血流信号的性质和方向, 将病灶血管显示最丰富的2D图

像清晰显示后启动仪器三维功能键进行取样, 调节各项参数, 在不损失肿瘤自身信息的同时尽量增大肿瘤与周围相邻组织的对比度, 然后分别在CDFI和PDA条件下进行三维扫描. 开始扫描时嘱患者缓慢平稳呼吸或屏气, 固定探头于体表不动, 可根据取样框的大小调整速度, 观察X, Y, Z轴所产生的A, B, C面图像, 以及由X, Y, Z轴所共同构成的动态三维图像. 采集过程持续约5-10 s, 通过旋转X、Y或Z轴使立体图像处于最佳显示角度, 采用电影回放方式从不同角度动态观察图像.

1.2.3 图像处理: 取样结束后, 使用仪器内已设置的三维图像重建系统进行重建, 模式选择玻璃体容积成像模式, 利用滤过功能对周围低回声结构进行适当的抑制. 应用电子刀选择性去除部分灰阶或彩色信息, 突出显示感兴趣区结构. 三维资料以数字化的形式存储于机器的硬盘上并通过刻录光盘形式输出.

2 结果

本组肝脏肿瘤78个与病理诊断符合率为94.9%(74/78); 误诊的4个中1个HCC诊断为肝血管瘤(HCH), 1个MLT诊断为HCC, 2个肝硬化结节(Cirrhotic nodule)诊断为HCC.

将资料用容积超声显像中的玻璃体容积成像模式进行重建, 根据重建的立体构像图将肿瘤内部血流分为以下类型: 瘤内点状血流、瘤内网状血流、瘤周血流、提篮型血流、轮辐型血流(表1).

HCC中, 三维重建后瘤体内血管显示率较二维图像增多, 由48.5%(16/33)达到78.8%(26/33), 11例肿瘤以内部血流为主, 走行迂曲, 呈点状、簇状、分支状分布并不规则增粗; 5例进展期肝癌在癌肿周围出现具有搏动性的高速血流, 病理显示为围绕肿瘤的滋养动脉; 17例肿瘤见穿支动脉血管进入肿瘤后逐渐分支并有不规则增粗, 表现为提篮型或吊篮型血流, 具有特征性; MLT二维图像血流显示率为57.9%(11/19), 三维图像为73.7%(14/19), 15例以瘤周血流为主, 内部血流稀少, 呈空心球样改变, 在其周围见绕行、移位的静脉血流, 3例为稀少的内部血流, 1例血运丰富, 呈吊篮型血流, 被误诊为HCC. HCH瘤体二维图像血流显示率为77.7%(14/18), 而三维图像为83.3%(15/18), 以瘤周型血流为主, 周边可见部分血管环绕, 6例可见门静脉输入血管, 检出率为33.3%(6/18). 肝硬化结节(cirrhotic nodule)瘤体血

研发前沿
三维容积超声目前在肝脏方面的应用研究较少, 但外科肝脏肿瘤切除时的精确定位对三维容积超声有很大需求, 下一步研发工作的重点是三维超声在肝脏手术中和介入治疗中的应用.

相关报道
由于三维容积超声成像技术可以重建生理状态下的肿瘤立体结构及其周围大血管的三维图像, 近期国内外文献报道, 三维容积超声在术前判断手术切除的可能性、术中精确实施叶段切除、术后随访治疗效果及指导介入治疗等方面均具临床实用价值.

创新盘点

本文研究了三维容积超声这一新型超声成像技术在肝脏占位病变的临床应用,由于其能够精确显现肿瘤与其附近滋养血管的解剖关系,为确定肿瘤的良恶性和肿瘤分期提供帮助,这对于肝内占位尤其是HCC的诊断与治疗至关重要。

表 1 78个肝脏肿瘤三维容积超声血管构型(个)

分组	瘤内型血流		瘤周型血流	提篮型血流	轮辐型血流
	点状	网状			
HCC	2	9	5	17	
MLT	1	2	15	1	
HCH	2	9	7		
Cirrhotic nodule	3	1	1		
IPL	1	1			
FNH					1

流显示率为80.0%(4/5),瘤周可见少量血管环绕,瘤内见极少量条状血流,分支少、分布均匀。2例炎性假瘤三维图像上瘤周可见细条状血流,瘤内见少量网状、条状血流。1例FNH血管进入病灶中心后沿各个方向分支到边缘,呈轮辐型血流,具特征性。

在三维图像中,肝静脉和门静脉在长短轴向上可分别显示,呈“交握手”形。术前对38例与肝静脉、门静脉关系密切的肿瘤进行了断层扫描和重建,三维超声血管立体构成图和术中所见一致。术前1例HCC患者二维超声图像显示肿瘤位于左内叶下段,与门静脉左支矢状部关系较密切,三维重建后发现各个层面上均见肿瘤左侧靠近门静脉左支矢状部,但与之分界清楚,可手术切除;1例外生性HCC患者探及与之相延续的肝内血管树,证实为肝肿瘤而不是后腹膜肿瘤并经手术切除;1例单发肝转移癌患者于右前叶探及一有穿支动脉进入的低回声肿瘤,重建后可见肝中静脉的主干上段和门静脉右支均在其附近经过,但未见浸润,与术中所见一致,此项检查所获取的数据资料可获取二维实时扫查不能直接显示的平面或位于扫查盲区的病灶信息。

3 讨论

目前三维超声成像显示模式分为断面显示和容积显示两种方式^[4]。断面显示法即壁龛模式,他主要获取2D不能获得的冠状面的回声信息。容积显示包括表面成像和透明成像以及玻璃体容积成像模式等,各种模式适当组合能产生更具有纹理特征的三维图像,如本文中应用的玻璃体容积成像模式采集的容积数据可包括CDFI信息和PDA信息,容积数据以灰阶信息和彩色信息结合的形式显示。该模式对肿瘤与周围血管的三维空间位置关系如血管受推压的方向、浸润的程度等显示清晰,由于肿瘤与其附近滋养

血管的解剖关系的精确显现涉及确定肿瘤的良恶性和肿瘤分期,这对于肝内占位尤其是HCC的诊断与治疗至关重要。

恶性肿瘤的生长依赖于新生血管的形成与生长,目前彩超对于良恶性肿瘤的鉴别诊断正是基于两者血流信号的差异。本研究观察结果表明,容积超声能有效地显示原发性肝癌的相关动脉,特别是主要的滋养血管,有研究表明其对肝动脉血管的显示与动脉灌注造影表现相符^[5-6]。应用玻璃体容积成像模式,本组33个HCC中有15个内部可见贯穿肿瘤的扭曲扩张的穿支样血流及其不规则分支等三维特有图像,呈提篮型,与相关文献[7-10]结论一致。肝硬化结节以瘤内血流为主,呈细条状,走行规则,分支少。MLT则以瘤周型血管为主,内部血管较细,分布稀疏,其丰富程度不及HCC。有研究表明^[9],再生结节和腺瘤样增生以门静脉为主要营养血管;随着细胞分化形成恶性结节,内部血管也由低门静脉血供、低动脉血供转变为以肝动脉为主。当发展至进展期肝癌时,肿瘤内部有丰富的新生血管和肿瘤血管,门静脉主要分布在肿瘤,受压并边缘被浸润,而肝转移癌的供血动脉贫乏或管腔狭小,且多位于瘤周。故上述肝脏肿瘤的血流特性和其病理基础密切相关。

本组HCH重建图像上血管粗细均匀,终末细小血管分支少,周边见环绕的血管;部分中心无血管,呈空心状改变,2例血管丰富的HCH血管粗大、分支多呈藤条样缠绕,三维重建时4例局部血管呈圆形,HCH在病理上由纤维间隙支撑和分隔的单层内皮细胞覆衬的多血管腔和血窦组成,可能由于血窦较大时重建显示血管呈圆形的回声。炎性假瘤由于观察例数少,三维图像上未见明显特征。但1例FNH三维重建后显示了特征性轮辐型血流。

三维容积超声近年来被引入产科领域^[11],并产生了深刻的影响,其在肝脏方面的应用研究很少^[12]。在外科肝脏肿瘤切除时,由于肝叶或段内肿瘤的浸润生长,挤压肝裂和肝内管道系统,使其变形或模糊不清,此时仅凭肝的分叶分段难以精确定位^[13-14]。本研究应用的容积超声中的各种不同成像模式重建的血管立体构象则可在判断肿瘤内部血管分布的基础上,对占位性病变进行准确定位。尤其周围主要血管的走行、位置关系等均可清晰显示,有利于术前判断手术切除的可能性,术中精确实施叶段切除、减少对正常组织的损伤,术后随访治疗效果并可

应用要点

三维容积超声成像技术的应用能够为肝脏病变尤其是HCC术前选择手术方式和路径、术后残留病灶介入治疗效果评估及进一步指导临床治疗提供准确可靠的信息,具有重要的临床应用价值。

指导介入治疗, 从而提高患者的生活质量。

在使用三维容积超声对实质性脏器如肝脏进行成像时, 首先应学会对伪像加以识别; 其次由于容积探头大而重, 操作时应稳持探头, 否则会引起图像质量的下降; 采样开始后患者不能移动体位, 否则会出现伪像。另外, 三维容积超声的容积测量虽可对感兴趣区提供精确的体积测量, 但由于其过程费时, 目前临床应用相对较少, 在以后的研究工作将对其应用价值进行探讨^[15]。

总之, 在肝脏疾病的检测中应用三维容积成像, 能显示占位病变其相关血管的走向, 通过显示血管主干与分支的连续形态结构, 综合评估肝脏及瘤体脉管系统血流灌注情况, 并可于三维重建后展示血管立体结构, 多角度观察血管网的组成及血管间解剖关系, 排除了二维检测中常见的部分容积效应, 提高对疾病的定位诊断和引导穿刺的准确性, 为肝脏病变尤其是HCC术前选择手术方式和路径、术后残留病灶介入治疗效果评估及进一步指导临床治疗提供准确可靠的血流信息, 因此三维容积超声在肝脏具有良好的临床应用价值, 将为超声诊断开辟新的研究领域。

4 参考文献

- 1 陈敏华. 消化系统疾病超声学. 第1版. 北京: 北京出版社, 2003: 83
- 2 周玉清, 张清萍, 肖先桃, 李开艳, 乐桂蓉. 实质性脏
- 3 器内血管结构的三维超声重建. 中国超声医学杂志 1998; 14: 13-15
- 4 王淑玲, 蒋雪梅, 刘鸿玉, 孙增涛. 能量多普勒显像和三维血管能量成像在肝癌诊断中的应用价值. 中国医学影像技术 1999; 15: 340-341
- 5 宋旭升, 钱晓芹, 夏泽. 肝脏肿瘤的三维超声诊断. 临床超声医学杂志 2007; 9: 279-281
- 6 蒋雪梅, 王淑玲, 刘鸿玉, 蔡志春, 徐红玉, 胡静, 张新毅, 宋吉青. 三维彩色多普勒能量图在评价原发性肝癌血流灌注特点中的应用. 中华超声影像学杂志 2000; 9: 677-680
- 7 孙彦, 林礼务, 薛恩生, 林学英, 高上达, 何以枚. 三维超声及彩色多普勒成像对肝脏恶性肿瘤的鉴别诊断. 中华医学超声杂志(电子版) 2005; 2: 363-365
- 8 孙彦, 林礼务. 三维超声成像诊断肝脏疾病的现状与进展. 中国医学影像学杂志 2004; 13: 55-57
- 9 曾婕, 罗葆明. 三维超声技术及其在肝癌诊治中的应用. 中国介入影像与治疗学 2007; 4: 76-78
- 10 陈敏华. 消化系统疾病超声学. 第1版. 北京: 北京出版社, 2003: 104
- 11 翟玉霞, 李从铸. 彩色多普勒超声在肝脏肿瘤鉴别诊断中的应用. 中国超声医学杂志 1999; 15: 921-923
- 12 Downey DB, Fenster A, Williams JC. Clinical utility of three-dimensional US. *Radiographics* 2000; 20: 559-571
- 13 周建华, 陈孝岳, 曾辉, 王悦. 多种三维超声成像方法在肝脏肿瘤中的应用研究. 中国超声医学杂志 2000; 18: 765-768
- 14 张亿倬, 贺业春, 谢遵江, 焦明德, 李益民, 刘颖, 石惠杰. 肝脏三维超声立体断层图的解剖学基础. 中国超声医学杂志 2004; 20: 814-816
- 15 吴长君, 石惠杰, 刘丽, 贺业春, 刘露阳, 张春梅, 张雪菊, 焦明德. 肝血管三维超声立体断层成像和三维能量成像的临床应用. 中华超声影像学杂志 2007; 16: 404-407
- 16 孙鲲, 张宏, 程琳, 贺声, 张云山, 贾文凯, 辛虹, 朱世华. 肝脏肿瘤三维超声成像的临床意义. 中华医学超声杂志(电子版) 2005; 2: 153-155

名词解释

三维容积超声: 是在容积数据采集的基础上, 采用包括表面成像、透明成像以及玻璃体容积成像等多种成像模式的三维容积分析方法, 分析图像的立体空间关系, 并可在灰阶模式的基础上, 根据需要与彩色多普勒、能量多普勒等联合应用, 获取较二维超声更丰富、立体、直观的信息。

同行评价

本文观察三维超声技术在肝癌诊断中的价值, 文章方法学新颖可靠, 有临床指导意义。

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 2009-09-08)

内镜下黏膜切除术治疗老年及老年前期大肠息肉561例

张晓华, 朱人敏, 吴晓尉, 杨妙芳, 郭美霞, 许小兵

背景资料
大肠息肉好发于老年人, 因其与大肠癌关系密切而备受关注。内镜下黏膜切除术(EMR)是目前对胃肠道表浅型病变的一种安全有效的微创治疗。

张晓华, 朱人敏, 吴晓尉, 杨妙芳, 郭美霞, 许小兵, 中国人民解放军南京军区南京总医院消化内科干部病区 江苏省南京市 210002

作者贡献分布: 此课题由张晓华与朱人敏设计; 临床内镜检查由张晓华、朱人敏、吴晓尉及杨妙芳操作完成; 数据分析由张晓华、郭美霞及许小兵完成; 本论文写作由张晓华完成。

通讯作者: 张晓华, 主任医师, 教授, 210002, 江苏省南京市, 南京军区南京总医院消化内科干部病区。jszhxh@sina.com
电话: 025-80860027

收稿日期: 2009-06-16 修回日期: 2009-08-20

接受日期: 2009-08-24 在线出版日期: 2009-09-08

Endoscopic mucosal resection for treatment of colorectal polyps occurring in the senium and presenium: a report of 561 cases

Xiao-Hua Zhang, Ren-Min Zhu, Xiao-Wei Wu, Miao-Fang Yang, Mei-Xia Guo, Xiao-Bing Xu

Xiao-Hua Zhang, Ren-Min Zhu, Xiao-Wei Wu, Miao-Fang Yang, Mei-Xia Guo, Xiao-Bing Xu, Department of Gastroenterology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Xiao-Hua Zhang, Department of Gastroenterology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China. jszhxh@sina.com

Received: 2009-06-16 Revised: 2009-08-20

Accepted: 2009-08-24 Published online: 2009-09-08

Abstract

AIM: To investigate the efficacy of endoscopic mucosal resection (EMR) for colorectal polyps occurring in the senium and presenium, and analyze the clinical and pathological features of resected lesions as well as the indications for and the complications of EMR.

METHODS: A total of 513 patients with 766 lesions were included in this study. The "inject and cut" EMR technique was used. The resected lesions were observed pathohistologically. The patients were followed up for a period of 1 to 60 months to evaluate the efficacy of EMR. Intra-operative and postoperative complications and treatments were recorded.

RESULTS: A cure rate of 96.3% was achieved by

EMR. Twenty-one patients (2.7%) were referred for surgery because of invasive cancer revealed by pathological examination after EMR. Bleeding occurred in 23 patients (4.2%) during EMR procedures, all of which underwent successful endoscopic hemostasis. Delayed bleeding occurred in ten patients (1.8%), of which seven underwent successful endoscopic hemostasis, and three received blood transfusion and conservative medical management. No perforation, infection and other complications occurred. The incidences of inflammatory polyps, hyperplastic polyps, adenomatous polyps and cancerous adenoma were 29.0%, 21.1%, 45.7% and 4.2%, respectively. The incidence of adenomatous polyps increased gradually with age. No recurrence was found during the follow-up period.

CONCLUSION: EMR is safe, minimally invasive, and more effective than traditional endoscopic approach in the treatment of colorectal polyps.

Key Words: Endoscopic mucosal resection; Colorectal polyps; Senium; Presenium

Zhang XH, Zhu RM, Wu XW, Yang MF, Guo MX, Xu XB. Endoscopic mucosal resection for treatment of colorectal polyps occurring in the senium and presenium: a report of 561 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(25): 2644-2647

摘要

目的: 观察内镜下黏膜切除术(EMR)对老年及老年前期大肠息肉的疗效, 并对其临床病理特征、适应证及并发症等进行探讨。

方法: 2003-10/2008-10我院消化内科内镜中心老年及非老年大肠息肉EMR手术561例766处病变, 对切除标本进行病理组织学观察, 术后定期内镜随访1-60 mo, 以评价切除效果, 记录术中及术后发生的并发症及处理情况。

结果: 766处病变总治愈率96.3%; 21处病变(2.7%, 21例)术后病理示浸润癌再追加外科开腹手术。术中出血23例(4.1%), 均内镜下止血成功; 术后迟发出血10例(1.8%); 7例经内

背景资料
冯志杰, 主任医师, 河北医科大学第二医院消化内科; 樊晓明, 主任医师, 复旦大学附属金山医院消化科

镜下止血成功, 3例经输血及内科保守治疗后出血停止; 无穿孔、感染及其他并发症发生。病理结果示炎性息肉、增生性息肉、腺瘤性息肉、腺瘤癌变分别占29.0%, 21.1%, 45.7%, 4.2%, 随着年龄的增加, 腺瘤性息肉的比例逐渐升($P<0.01$)。随访期间所有病例均无复发。

结论: EMR是一种安全、微创的内镜治疗手段, 对老年及老年前期大肠息肉治疗的效果优于传统的内镜下治疗方法。

关键词: 内镜下黏膜切除术; 大肠息肉; 老年期; 老年前期

张晓华, 朱人敏, 吴晓尉, 杨妙芳, 郭美霞, 许小兵. 内镜下黏膜切除术治疗老年及老年前期大肠息肉561例. 世界华人消化杂志 2009; 17(25): 2644-2647

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2644.asp>

0 引言

大肠息肉好发于老年人, 因其与大肠癌关系密切而备受关注。内镜下黏膜切除术(endoscopic mucosal resection, EMR)是目前对胃肠道表浅型病变的一种安全有效的微创治疗, 尤适用于常规内镜难以处理的大肠平坦型病变, 特别是大肠的侧向发育型肿瘤(laterally spreading tumor, LST)^[1]。2003-10/2008-10我院561例大肠息肉患者行EMR治疗, 现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 2003-10/2008-10我院消化内科内镜中心561例大肠息肉患者, 其中男376例, 女185例, 年龄11-91(平均 59.3 ± 15.4)岁, 其中老年组(60岁以上)275例(49.0%), 老年前期组(45-59岁)占179例(31.9%), 青年组(45岁以下)107例(19.1%)。患者临床表现有: 大便次数多、黏液便、血便及下腹部疼痛等。术前常规检查心电图、胸片、肝肾功能及凝血机制。所有患者术前均签署知情同意书。采用Olympus CF-H260电子肠镜, 高频电设备为ERBE氩气刀(ERBE 200 D, 德国), 圈套器用Olympus公司的EMR专用圈套器。

1.2 方法

1.2.1 EMR: 患者术前肌注地西洋10 mg和山莨菪碱10 mg, 在脉搏和血氧饱和度监测下, 插入肠镜(参数设置如下: 切割功率40 W, 凝固功率60 W, 混合模式用纯切, 切割方式选Endo-cut), 找到病变后, 黏膜下注射1:10 000肾上腺素5-10 mL, 使病变黏膜隆起, 再用圈套器套牢以病变为中

心的黏膜, 切除范围包括整个病变及病变边缘至少2 mm正常黏膜, 切除深度包括黏膜全层、黏膜肌层及黏膜下全层, 要求完整保留固有肌层, 残基基底为裸露的固有肌层。对直径超过20 mm的平坦型病变, 可用圈套器分多次套取病变, 分次切除, 最后完整切除病变。用三爪钳取出切除物, 送病理学检查。

1.2.2 EMR创面及残留病变的处理: 仔细检查切除创面, 以去甲肾上腺素4 mg或凝血酶2000-4000 U冲洗创面, 必要时用1-3枚钛夹止血, 术后密切观察。EMR时未能完整切除的良性病变, 其边缘的少量残留病变术中采用氩气刀(ERBE 200D, 德国)凝固法(APC)对病变行凝固治疗。息肉切除后, 创面呈灰白色或有焦痂, 周围黏膜充血, 水肿, 甚至糜烂。第3-8天后焦痂脱落形成溃疡, 约2-3 wk愈合。故术后应卧床休息1-2 d, 少渣半流食物2-3 d, 保持大便通畅。应用抗生素3 d, 注意观察有无腹痛、便血、发热等症状, 同时亦应注意迟发并发症的发生, 发现要及时就诊。

1.2.3 术后随访: 所有病例均纳入内镜随访计划, 最少随访1次。炎症性或增生性息肉首次随访为术后6 mo, 以后每12 mo随访1次; 腺瘤性息肉首次随访为术后3 mo, 间隔6 mo后再次随访, 以后每12 mo随访1次; 早期癌首次随访为术后1 mo, 间隔3 mo后再次随访, 以后每6 mo随访1次。若息肉发生在原部位组织病理类型与原息肉相同者为复发。

统计学处理 采用SPSS11.0软件进行统计分析。所得计数资料组间比较用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有显著性统计学意义。

2 结果

2.1 息肉的部位 老年、老年前期及青年人 大肠息肉均好发于左半结肠, 分别占54.2%(224/413)、64.2%(145/226)、63.8%(81/127), 尤以乙状结肠及直肠多见, 3组之间大肠息肉分布比较差异无统计学意义($\chi^2=8.20$, $P>0.05$)。但老年前期组升结肠和横结肠也有较高的发病率, 分别占22.8%(94/413)和18.9%(78/413)(表1)。

2.2 息肉的病理类型 766处病变中, 炎性息肉占29.0%(222/766), 增生性息肉21.1%(162/766), 腺瘤性息肉45.7%(350/766), 腺瘤癌变4.2%(32/766)(图1)。随着年龄的增加, 腺瘤性息肉的比例逐渐升高($P<0.01$, 表2)。32例肠腺瘤癌变中, 3例发生于回盲部, 2例于升结肠, 4例于降结肠,

研发前沿
EMR是在息肉电切术和黏膜注射术的基础上发展起来的一种治疗手段, 目前国内广泛应用这一技术切除消化系广基或平坦型病变, 特别是对早期消化系癌或癌前病变的治疗是研究的热点和难点。

相关报道
目前关于EMR治疗消化系癌前病变或早期癌的报道较多, 但EMR对老年及老年前期大肠息肉的治疗效果, 少见有大量病例、资料齐全的报道。

创新盘点

本文通过大量病例总结EMR对老年及老年前期大肠息肉的治疗效果,并对其临床病理特征、适应证、并发症等临床问题作出客观的评价,为临床诊治提供参考。

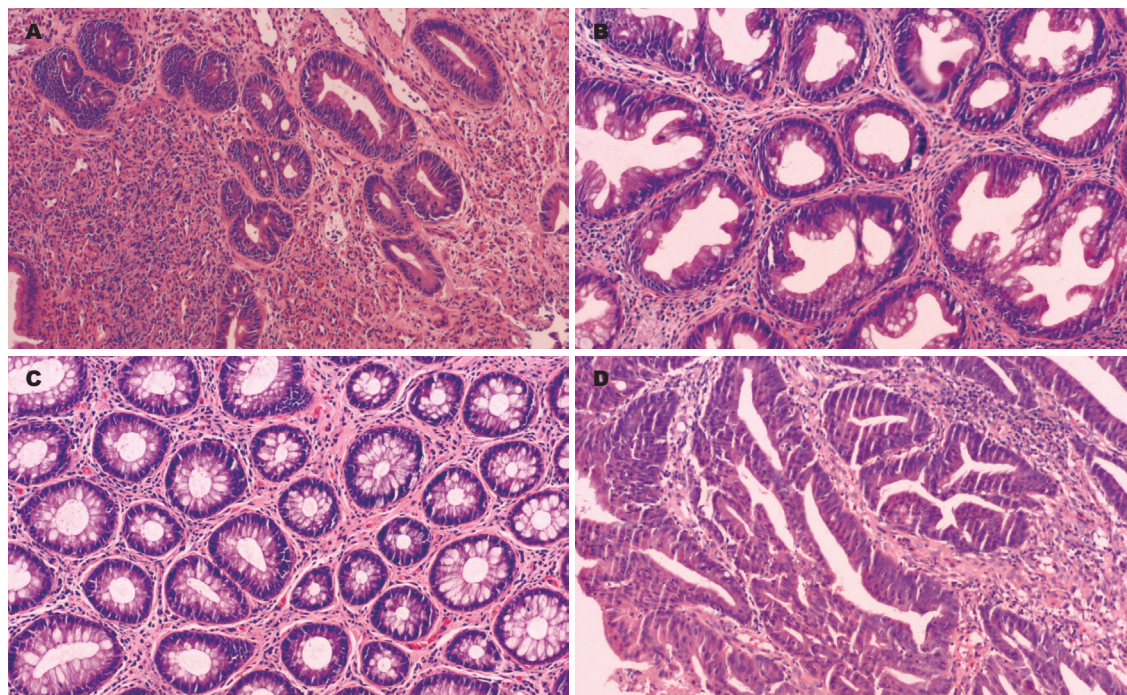


图1 大肠息肉的病理类型($\times 100$). A: 炎症性息肉; B: 增生性息肉; C: 腺瘤性息肉; D: 腺瘤癌变。

表1 老年及老年前期大肠息肉分布比较 枚(%)

年龄(岁)	回盲部	升结肠	横结肠	降结肠	乙状结肠	直肠	合计
<45	9(7.1)	18(14.2)	19(15.0)	9(7.1)	35(27.6)	37(29.1)	127
45-59	11(4.9)	41(18.1)	29(12.8)	25(11.1)	67(29.6)	53(23.4)	226
≥ 60	17(4.1)	94(22.8)	78(18.9)	64(15.5)	91(22.0)	69(16.7)	413

表2 各年龄段大肠息肉病理类型比较 枚(%)

年龄(岁)	炎症性息肉	增生性息肉	腺瘤性息肉	腺癌	合计
<45	51(40.2)	31(24.4)	42(33.1)	3(2.4)	127
45-59	65(28.8)	52(23.0)	100(44.2) ^b	9(4.0)	226
≥ 60	106(25.7)	79(19.1)	208(50.4) ^{bd}	20(4.8)	413

^b $P < 0.01$ vs <45岁; ^d $P < 0.01$ vs 45-49岁。

其余全在直肠和乙状结肠。

2.3 切除效果评价 术毕即时内镜观察判断病灶边缘及基底有无病变残留,切缘为正常黏膜,基底为正常固有肌层者判断为完整切除。766处病变中738处经首次或再次EMR治疗病变完整清除,治愈率为96.3%;21处病变(占2.7%,21例患者)术后病理示浸润癌再追加外科开腹手术。

2.4 并发症 术中出血23例(4.1%),主要为创面渗血,经去甲肾上腺素局部喷洒后即可止血。术后迟发出血(>24 h)10例(1.8%),其中7例经内镜下找到出血部位,分别用钛夹和APC行凝固治疗,

止血成功,3例经输血及内科保守治疗后出血停止。无穿孔、感染及其他并发症发生。

2.5 术后随访 全组561例患者术后均内镜随访1-60 mo,均未见复发的病例。

3 讨论

结肠与直肠息肉是老年常见病,临床症状无特异性,常因便血、腹泻、腹痛、便秘与腹泻交替出现及血肿瘤标志物升高等进行肠镜检查时被发现,其中便血与较大的腺瘤及癌变关系密切^[2]。因此,对老年及老年前期行肠镜检查

的指征应放宽, 尽早进行肠镜检查, 以免漏诊或贻误早期发现的时机. 大肠息肉好发于左半结肠, 尤以乙状结肠及直肠多见^[3], 本组占46.0%(352/766), 与文献报道一致, 同时本研究结果还显示: 老年升结肠、横结肠息肉仍有较高的发生率, 故老年患者在进行大肠镜检查时, 只要能耐受均应检查全大肠, 而不能只局限于远端大肠病变的诊断. 老年患者因腹壁及肠壁松弛, 或腹腔手术后, 或心、肺功能等因素, 均影响肠镜操作, 对不能继续进镜者, 应该考虑行钡灌肠检查, 以了解其余大肠情况, 同时结合血清肿瘤标志物综合判断. 随着内镜设备及内镜技术的进步, 大肠息肉尤其是大肠平坦型病变的检出率逐年升高, 这一类病变较有蒂的隆起型病变更易于癌变. 大肠息肉的恶变与其大小、形态及病理类型有关^[4-5]. 息肉体积大、基底部宽的平坦型息肉、绒毛成分多、表面糜烂出血、结节状或分叶状容易发生癌变; 大肠腺瘤性息肉与大肠癌的发生有密切关系, 文献[6]报道直径1-2 cm的腺瘤性息肉恶变率为10%左右, 而直径 ≥ 2 cm的腺瘤恶变率接近50%. 一般认为随着腺瘤的增大, 腺瘤中的绒毛状成分比例逐渐增多, 不典型增生加重, 因而绒毛状腺瘤性息肉较管状腺瘤性息肉更易癌变. 本研究表明, 老年人随着年龄的增加, 腺瘤性息肉的比例逐渐升高, 而且恶变息肉均为腺瘤性息肉, 主要发生部位为乙状结肠和直肠. 因此, 尽早发现和切除大肠息肉对预防癌变有重要的意义, 可切断腺瘤-大肠癌序贯.

内镜下息肉摘除方法很多^[7-8], 包括息肉电切除术、微波、冷冻、药物注射、射频及激光等治疗方法, 各有优缺点. EMR是在息肉电切术和黏膜注射术的基础上发展起来的一种治疗手段, 大量临床资料已证实这一技术安全高效, 是治疗消化管平坦型病变的最成熟的微创手段^[9], 且EMR的各种治疗附件品种齐全, 价格低廉, 便于推广应用, 目前国内应用这一技术切除消化系广基或平坦型病变均取得了很好的效果. 通过黏膜下注射肾上腺素或生理盐水使浅表型黏膜病变抬高, 再行圈套高频电流切除, 具有即刻疗效明确、简洁快速及息肉可回收行病理检查等优点. EMR的主要并发症为术后出血和穿孔,

尤其是老年患者, 由于血管弹性差, 曾经使用抗凝药或多发性息肉以及合并严重慢性疾病, 息肉切除后应卧床休息, 减少活动, 以防迟发性出血发生. 对于术中出血的患者, 可以采用内镜下局部肾上腺素注射、喷洒凝血酶等或局部电灼、APC等措施, 直至出血完全停止. 本组患者术中或术后迟发性出血, 经内镜下相应的处理均可控制, 未发生穿孔、感染及其他并发症发生; 传统的内镜下结肠息肉切除后的复发率较高, 达31.4%, 大多在2年内复发^[10], 本组对全部患者进行随访1-60 mo不等, 均未发现复发病例. 提示EMR对老年人及老年前期大肠息肉的治疗, 安全高效, 优于传统的内镜下治疗方法.

致谢: 本文病理图片由中国人民解放军南京军区南京总医院病理科石群立主任帮助拍摄, 特此致谢.

4 参考文献

- Conio M, Ponchon T, Bianchi S, Filiberti R. Endoscopic mucosal resection. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 653-663
- Cappell MS. From colonic polyps to colon cancer: pathophysiology, clinical presentation, screening and colonoscopic therapy. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2007; 53: 351-373
- 陈春华, 邱立华. 786例大肠腺瘤性息肉的癌变特征. *中国肿瘤临床* 2005; 32: 1290-1292
- Koga Y, Yao T, Hirahashi M, Kumashiro Y, Ohji Y, Yamada T, Tanaka M, Tsuneyoshi M. Flat adenoma-carcinoma sequence with high-malignancy potential as demonstrated by CD10 and beta-catenin expression: a different pathway from the polypoid adenoma-carcinoma sequence. *Histopathology* 2008; 52: 569-577
- 钟晓刚, 黄顺荣, 殷舞, 麦威, 秦千子. 结直肠高级别上皮内瘤变的临床分析38例. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1968-1971
- Arai T, Kino I. Role of apoptosis in modulation of the growth of human colorectal tubular and villous adenomas. *J Pathol* 1995; 176: 37-44
- 王伟, 李兆申. 消化道早期癌内镜治疗现状与评价. *中国实用外科杂志* 2009; 29: 30-32
- 袁海峰, 唐少波, 奚锦要. 氩离子凝固术在放大色素内镜下治疗胃黏膜癌前病变90例. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3805-3809
- Kaltenbach T, Friedland S, Maheshwari A, Ouyang D, Rouse RV, Wren S, Soetikno R. Short- and long-term outcomes of standardized EMR of nonpolypoid (flat and depressed) colorectal lesions > 1 cm (with video). *Gastrointest Endosc* 2007; 65: 857-865
- 崔西玉, 黄燕霞, 罗笑雁. 2706例大肠息肉内镜治疗及随访. *中华消化内镜杂志* 2005; 22: 123-124

同行评价
本报道病例数较多, 资料齐全, 书写规范, 对临床具有一定的应用价值.

编辑 李军亮 电编 何基才

阑尾术后大网膜粘连综合征诊治1例

段亮, 蔡晓军

背景资料
大网膜粘连综合征为普外科及消化内科相对常见疾病, 但目前辅助检查对诊断该病无特异性。多发生于阑尾切除术后或盆腔手术后, 常易误诊漏诊。

段亮, 辽宁医学院研究生学院 辽宁省锦州市 121001
蔡晓军, 武警总医院普外科 北京市 100039
作者贡献分布: 本文资料搜集及撰写由段亮完成, 蔡晓军主要完成操作。
通讯作者: 段亮, 121001, 辽宁省锦州市, 辽宁医学院研究生学院. duanliang0620@163.com
电话: 010-88276260
收稿日期: 2009-06-15 修回日期: 2009-08-19
接受日期: 2009-08-24 在线出版日期: 2009-09-08

Diagnosis and treatment of omental adhesion syndrome after appendectomy: a report of one case

Liang Duan, Xiao-Jun Cai

Liang Duan, Graduate School, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China
Xiao-Jun Cai, Department of General Surgery, General Hospital of Armed Police Forces, Beijing 100039, China
Correspondence to: Liang Duan, Graduate School, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. duanliang0620@163.com
Received: 2009-06-15 Revised: 2009-08-19
Accepted: 2009-08-24 Published online: 2009-09-08

Abstract

Omental adhesion syndrome is a relatively common disease. Auxiliary examination has poor specificity for diagnosis of the disease. In this article, we will evaluate the clinical value of pneumoperitoneography in the diagnosis of omental adhesion syndrome after appendectomy, with a view to increasing understanding of the disease, reducing the rate of missed diagnosis and misdiagnosis, and enriching our knowledge on chronic postoperative abdominal pain.

Key Words: Omental adhesion syndrome; Pneumoperitoneography; CT imaging; Imaging diagnosis

Duan L, Cai XJ. Diagnosis and treatment of omental adhesion syndrome after appendectomy: a report of one case. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(25): 2648-2649

摘要

大网膜粘连综合征为普外科及消化内科相对

常见疾病, 但目前辅助检查对诊断该病无特异性。本文对气腹造影技术在诊断阑尾术后大网膜粘连综合征的应用及诊断价值进行分析讨论, 以期增加普外科医师和消化内科医师对此类疾病的认识, 减少对该病诊断的漏诊及误诊, 同时可扩充普外科医师及消化内科医师对诊断术后慢性腹痛的思维。

关键词: 大网膜粘连综合征; 气腹造影; 螺旋CT; 影像诊断

段亮, 蔡晓军. 阑尾术后大网膜粘连综合征诊治1例. 世界华人消化杂志 2009; 17(25): 2648-2649
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2648.asp>

0 引言

大网膜粘连综合征系手术后或腹腔炎症致大网膜与下腹部的壁层腹膜或器官粘连, 使部分大网膜纤维化, 瘢痕挛缩, 致大网膜缩短, 牵拉横结肠下移, 可造成横结肠不全梗阻, 出现腹胀, 腹痛, 便秘, 或进食后胃肠蠕动牵拉大网膜, 引起反射性呕吐及上腹疼痛, 可出现腹膜牵拉症状。多发生于阑尾切除术后或盆腔手术后, 常易误诊漏诊。在气腹造影螺旋CT扫描诊断术后右下腹局限性腹壁粘连的工作基础上^[1], 我们依据人工气腹的特性, 对1例阑尾术后腹痛进行了人工气腹造影检查, 并同时经过全麻下经腹腔镜肠粘连松解术得以证实, 现报道如下。

1 病例报告

王某, 男, 55岁, 因右下腹疼痛>1 mo, 加重>20 d入院。患者因阑尾炎于20年前在当地医院行麦氏点切口, 阑尾切除术。患者入院后常弯腰, 追述病史, 患者诉直腰挺身时右下腹内有牵拉感, 而弯腰则牵拉与疼痛感可减轻。院外行全消化道钡餐造影双对比造影: 胃炎。查体: 右下腹深压痛, 以手压迫切口瘢痕上缘向下牵拉时有不适感。临床诊断为: 慢性腹痛。

患者排空膀胱后, 取平卧位, 左下腹消毒铺巾, 以反麦氏点为穿刺点, 局部浸润麻醉, 以18

同行评议者
魏经国, 教授, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院放射科; 倪才方, 副教授, 苏州大学附属第一医院介入放射科

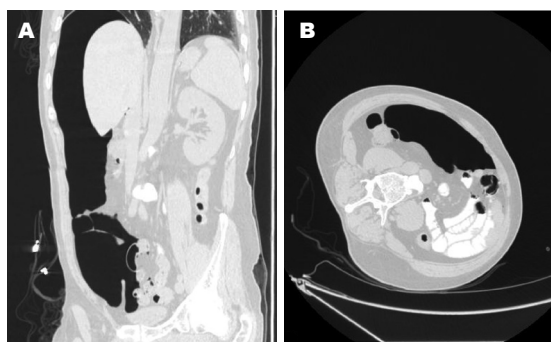


图1 肺窗下64排CT大网膜粘连综合征不同体位影像学图像. A:矢状图,显示右侧麦氏点下一条索状网膜粘连;B:左侧卧位轴位图,显示右下腹回盲部网膜与侧腹壁粘连.

号套管针行腹部穿刺. 针头入皮后有腹外斜肌腱膜和腹膜两次突破感,深度进针约3 cm左右,进行腹腔注气试验. 推注约20 mL的气体无阻力,可确认进入腹腔,拔除气腹针芯,用连接导管接中心氧气泵,给予1 mL/min的速度灌注,直至腹部叩诊呈弥漫性鼓音,且腹壁皮肤及肌肉呈紧张状态. 即行螺旋CT腹部平扫. 检查完毕后,放消气腹.

患者腹壁膨隆,腹内形成穹隆的气腹空间,矢状位可见右侧网膜与腹壁有一约3 cm×3 cm的条索粘连. 同时左侧卧位轴位可见回盲部有网膜与侧腹壁粘连(图1-2),诊断为大网膜粘连综合征. 在全麻下行经腹腔镜肠粘连松解术中见大网膜与侧腹壁粘连成条索带同时发现回盲部与大网膜成束片状粘连(范围约3 cm×3 cm)粘连紧密,电钩加操作钳多角度松解. 术后第1天患者自主排气,可自如下床活动,原症状消失. 术后第5天出院.

2 讨论

大网膜粘连综合征临床少见,1988年Howtg首次报道,我们复习了近20年的文献报告及病例均为术后诊断,该病术前诊断困难,只要术前诊断明确,行腹腔镜松解后,就可解除大网膜牵拉引起的内脏痛,效果很满意. 一般来说^[2],大网膜疾病没有特异性检查手段,我们根据文献报道^[3]大网膜按病理可分为4种:(1)仅一小部分大网膜与病灶瘢痕粘连;(2)粘连面积较为广泛,横结肠轻度向下移位;(3)粘连严重,横结肠被牵拉至下腹部;(4)大部分腹膜呈纤维化改变并伴有横结



图2 三维重建矢状位图显示右下腹回盲部网膜与侧腹壁粘连. 箭头所指处粘连.

同行评价
本文简洁,思路清晰,结果可靠,有一定学术价值.

肠明显下垂. 再结合国内诊断大网膜粘连综合征的临床诊断经验:(1)有腹部手术史特别以下腹部尤其阑尾和输卵管结扎术;(2)往往主诉以腹痛,恶心,呕吐,腹胀,便秘以及自感腹内有牵拉感;(3)查体躯干过伸时,可引起切口瘢痕区以上腹部疼痛不适,用手牵拉手术瘢痕上缘向下牵拉可引起不同程度疼痛和不适;(4)钡餐检查可见右半结肠扩张,固定,蠕动功能紊乱及钡剂排空延迟等现象. 而文献报道的腹腔内粘连影像检查主要是超声或MRI等观察腹腔内脏器运动受限的间接影像来反映粘连的存在,借助腹腔注水超声可诊断盆腔粘连,但直视性差. 本检查方法的特点是在原本密闭的腹腔内注入气体,使得腹壁向前膨起,腹内脏器压向后腹壁,腹腔空间扩大,腹膜与腹壁粘连得以拉伸展开,呈现索带状结构,该结构在气腹背景下清晰显示. 同时还可以运用螺旋CT图像后处理技术建立起立体三维图模拟出腹腔镜手术直视下所能看到的,比腹腔镜优越的是还可以同时进行不同角度旋转,不受周围器官及组织的约束,更令人惊喜的是它还可以对粘连带进行不同厚薄切割采集术者术中所需要的大量信息,大大降低了全麻和腹腔镜手术时间和难度.

总之,结合患者主诉,同时行气腹造影腹部CT平扫检查很容易在术前明确诊断大网膜粘连综合征.

3 参考文献

- 1 蔡晓军,叶道斌,邱凯. CT气腹造影诊断术后局限性腹壁肠粘连. 中国医学影像学杂志 2008; 16: 301-303
- 2 郑扶民. 大网膜疾病的检查手段及诊断. 中国实用外科杂志 1994; 14: 589-591
- 3 高清泽,刘建华,侯广昌,王秀霞. 大网膜粘连综合征治疗体会. 河北中西医结合杂志 1999; 14: 468

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

曹秀峰 主任医师

南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心

曹志成 英国生物医学科学研究所院士

香港伊利沙伯医院临床肿瘤科

陈卫昌 教授

苏州大学附属第一医院消化内科

程英升 教授

同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心

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

杜群 副研究员

广州中医药大学脾胃研究所药理室

樊晓明 主任医师

复旦大学附属金山医院消化科

范学工 教授

中南大学湘雅医院感染病科

冯志杰 主任医师

河北医科大学第二医院消化内科

龚建平 教授

重庆医科大学附属第二医院肝胆外科

黄恒青 主任医师

福建省第二人民医院消化内科

季国忠 教授

南京医科大学第二附属医院消化科

金瑞 教授

首都医科大学附属佑安医院肝病消化科

刘成海 研究员

上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝病研究所

刘杞 教授

重庆医科大学病毒性肝炎研究所

倪才方 副教授

苏州大学附属第一医院介入放射科

施瑞华 教授

南京医科大学第一附属医院消化科

潘秀珍 教授

福建省立医院消化内科

彭曦 副研究员

重庆市西南医院烧伤研究所

秦成勇 教授

山东省立医院消化内科

沈柏用 副教授

上海市交通大学医学院瑞金医院肝胆胰外科中心

孙诚谊 教授

贵阳医学院附属医院普外科

唐世刚 教授

大连大学附属中山医院消化内科

王凯 教授

山东大学齐鲁医院肝病科

王小众 教授

福建医科大学附属协和医院消化内科

王正康 教授

北京中日友好医院普外科

魏经国 教授

中国人民解放军第四军医大学唐都医院放射科

许玲 副教授

中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科

姚登福 教授

南通大学附属医院分子医学中心

周伟平 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
三科