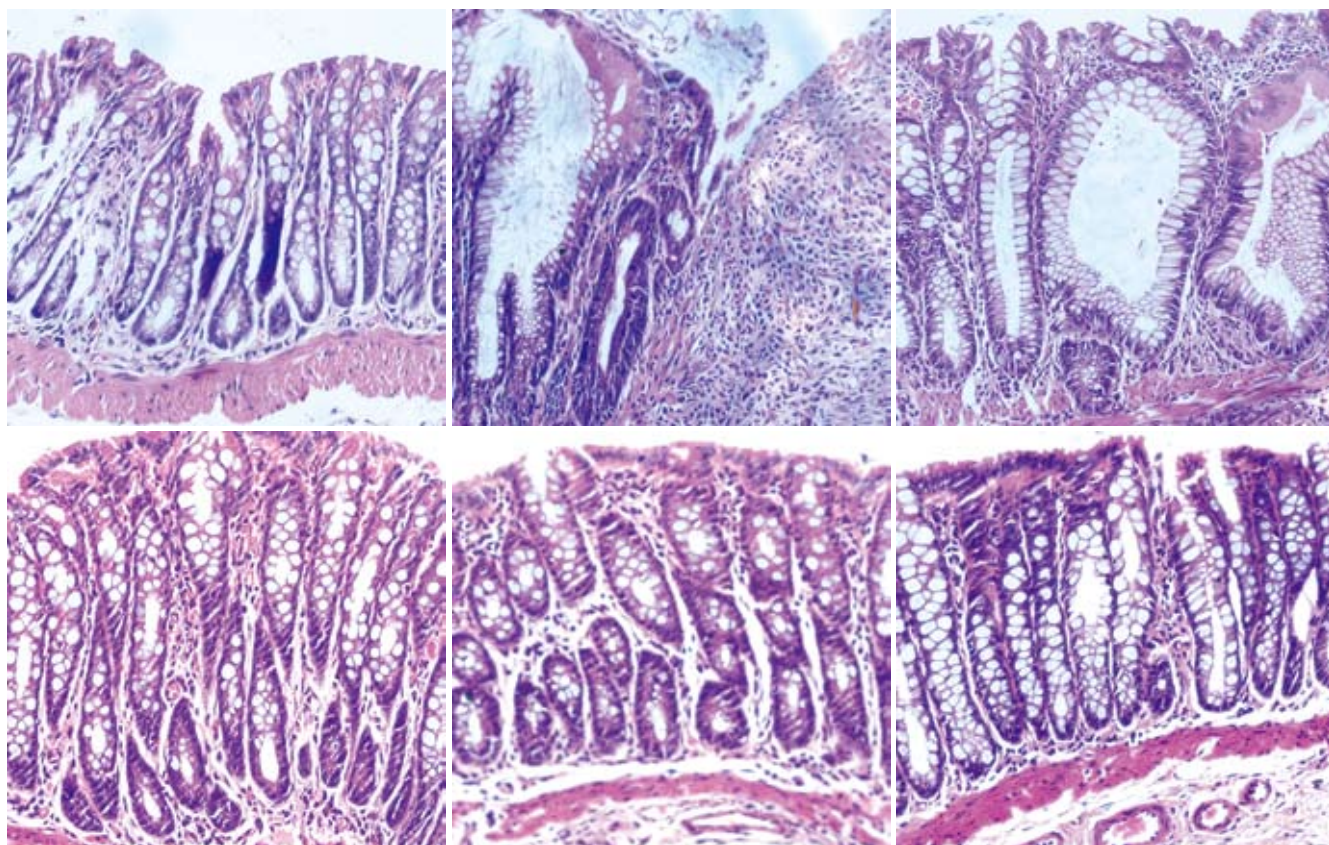


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2009 年 1 月 28 日 第 17 卷 第 3 期 (Volume 17 Number 3)



3 / 2009

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2009-01-01/2011-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

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

名誉总编辑

潘伯荣教授

社长/总编辑

马连生教授

副总编辑

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

常务编委

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

编委

消化内科学

白爱平副教授
聂新明教授
陈洪副教授

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

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

消化外科学

别平教授
蔡开琳副教授
蔡三军主任医师
曹杰主任医师

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

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

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

消化感染病学

陈国凤主任医师
陈红松副研究员
陈建杰教授
陈仕珠主任医师
陈耀凯副教授
陈志辉副主任医师
党双锁教授
丁惠国教授
范建高教授
范小玲主任医师

高润平教授
高泽立副教授
龚国忠教授
管世鹤副教授
何生松教授
胡国信副主任医师
林菊生教授
刘杞教授
刘正稳教授
貌盼勇研究员
宁琴教授
钱林学主任医师
秦波教授
石统东副教授
孙殿兴主任医师
谭德明教授
汤华研究员
唐霓副研究员
唐晓鹏教授
王凯教授
王怡主任医师
魏来教授
吴建国教授
吴君主任医师
宣世英教授
杨江华副主任医师
杨林副研究员
姚鹏副教授
张继明教授
张明辉副主任医师
张绪清副教授
张占卿主任医师
赵桂鸣主任医师
赵连三教授
周霞秋教授
朱传武副主任医师
庄林主任医师

消化中医药学

蔡淦教授
陈治水主任医师
杜群副研究员
黄恒青主任医师
李军祥教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员

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

消化肿瘤学

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

消化影像学

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

消化内镜及介入治疗学

丁佑铭教授
郝俊鸣副主任医师
潘林娜教授
孙明军教授
万军教授

吴硕东教授
袁友红副教授

消化中西医结合学

唐文富副教授
王学美研究员
张春虎副教授

消化基础研究

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

周晓武副主任医师

消化病理学

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

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2009 年 1 月 28 日

第 17 卷

第 3 期

(总第263期)

述 评

229 茶多酚没食子儿茶素没食子酸酯抗肿瘤机制研究进展

崔云甫, 石林, 秦虹, 刘适

基 础 研 究

236 肺组织瓣内衬壳聚糖支架对食管部分缺损的修补

陈刚, 石文君

241 携带TRAIL基因的新型溶瘤病毒体外诱导肝癌细胞凋亡

刘永靖, 陈飞虎, 苏长青, 王星华, 钱炎珍, 钱其军

247 ABCG2在肝细胞性肝癌组织和肝癌细胞株中的表达及意义

奚忠, 江春平, 丁义涛

253 参茸方对三硝基苯磺酸诱导结肠炎大鼠结肠SP和VIP表达的影响

戴彦成, 唐志鹏, 王臻楠, 张亚利, 李凯, 何新颖

259 酸性成纤维细胞生长因子片段脑室内及皮下注射对大鼠夜间摄食的影响

赵艳军, 李学良, 林琳, 粟生修司, 大村裕

临 床 研 究

265 肝癌组织核转录因子- κ B表达与HBV复制及其临床病理学特征

王以浪, 姚登福, 吴玮, 于洪波, 赛文莉, 钱静, 李姗姗, 卞银珠

270 Aurora-B在肝癌组织中的表达及其意义

单人锋, 周福庆, 吴波, 肖国胜, 饶雪峰, 彭贵主

273 维生素D受体基因多态性与酒精性肝病的相关性

孙平, 王沁

279 基于细胞形态学定量参数的良恶性胸/腹水鉴别诊断模型

袁帅, 张焜和, 肖波, 陈江, 祝金泉, 朱莹, 吕农华

文 献 综 述

284 基于蛋白质组学技术的肝癌实验诊断研究进展

廖剑, 殷正丰

288 磁共振弥散成像在肝纤维化中的研究进展

胡兴荣, 陈军

293 SC结构、功能及其临床研究进展

付金龙, 刘沛

研 究 快 报

299 疏肝理气法对夹尾应激大鼠行为学及胃组织学的影响

凌江红, 张钰琴, 梁纲, 韦连明, 陈业强, 刘耀利, 李勇杰

303 小鼠胃白念珠菌感染动物模型的建立

马耀辉, 王刚生, 邓洁华, 张晓光, 王爱学, 四荣联

307 内源性硫化氢在不同时期大鼠肝硬化中的作用

张宁, 郑勇, 王于理, 李睿, 孙侃, 常向云, 陈卫刚, 赵瑾, 李洪安

临 床 经 验

312 食管破裂的影像学表现

王勇, 邓先波, 江科, 王孝英

316 骶骨胃肠间质瘤的临床病理学特点、克隆性及c-kit基因突变分析

巩丽, 赵建业, 李艳红, 张力, 韩秀娟, 刘小艳, 朱少君, 张伟

321 应用胃癌组织芯片研究RUNX3、VEGF与MVD的相关性及其意义

伏洁, 张煦, 王靖

326 安定联合氟马西尼应用于无痛胃镜44例

黄骏, 吴小薇, 曾勇

	<p>329 干扰素治疗慢性乙型肝炎疗效与HBV基因型的关系 黄重发, 施斌斌, 朱清, 武凌, 裴小红, 朴全慧, 周怿</p> <p>333 乙型肝炎患者血清IL-27的检测及其意义 左维泽, 张丽丽</p> <p>336 多潘立酮联合复方消化酶治疗功能性消化不良84例 郑丹, 夏冰, 施先艳, 宋敏, 吴杰, 王萍, 张姮</p>
病例报告	<p>340 急性暴发型溃疡性结肠炎合并特发性血小板减少性紫癜1例 邵幼林, 赵卫峰, 黄小平, 陈良云, 甘建和, 林敏</p>
致 谢	<p>342 致谢世界华人消化杂志编委</p>
消 息	<p>235 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>240 世界华人消化杂志英文摘要要求</p> <p>246 世界华人消化杂志标点符号用法</p> <p>252 世界华人消化杂志中文摘要要求</p> <p>258 世界华人消化杂志名词术语标准</p> <p>264 世界华人消化杂志栏目设置</p> <p>278 世界华人消化杂志计量单位标准</p> <p>283 世界华人消化杂志参考文献要求</p> <p>292 世界华人消化杂志作者署名要求</p> <p>306 中国科技期刊引证报告(核心版)发布WJG 2007年影响因子0.745</p> <p>315 世界华人消化杂志修回稿须知</p> <p>320 世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标</p> <p>325 世界华人消化杂志外文字符标准</p> <p>328 世界华人消化杂志数字用法标准</p> <p>332 WJG荣获2007年“中国百种杰出学术期刊”和2008年中国国际化精品科技期刊</p> <p>339 世界华人消化杂志正文要求</p>
封面故事	<p>戴彦成, 唐志鹏, 王臻楠, 张亚利, 李凯, 何新颖. 参青方对三硝基苯磺酸诱导结肠炎大鼠结肠SP和VIP表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(3): 253-258 http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/253.asp</p>
本期责任人	<p>编务 李慧; 送审编辑 李军亮, 史景红; 组版编辑 吴鹏朕; 责任编辑 李军亮; 英文编辑 张海宁; 审核编辑 张海宁; 形式规范 马连生</p>

<h2 style="text-align: center;">世界华人消化杂志</h2> <p style="text-align: center;">Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p style="text-align: center;">吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p style="text-align: center;">创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2009-01-28 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</p> <p>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</p> <p>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 国内定价 每期24.00元 全年864.00元 广告经营许可证 1401004000050</p> <p style="text-align: center;">www.wjgnet.com</p>		

World Chinese Journal of Digestology

January 2009 Contents in Brief Volume 17 Number 3

EDITORIAL	229 Research progress in mechanisms of the anticancer effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate <i>Cui YF, Shi L, Qin H, Liu S</i>
BASIC RESEARCH	<p>236 Repairing partial esophagus defection with an inner chitosan stent in rabbits <i>Chen G, Shi WJ</i></p> <p>241 A novel oncolytic adenovirus carrying human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand gene induces hepatocellular carcinoma cell line apoptosis <i>in vitro</i> <i>Liu YJ, Chen FH, Su CQ, Wang XH, Qian YZ, Qian QJ</i></p> <p>247 Expression of stem cell marker ABCG2 and its significance in hepatocellular carcinoma tissue and cell lines <i>Xi Z, Jiang CP, Ding YT</i></p> <p>253 Effect of Shenqing recipe on the expression of substance P and vasoactive intestine polypeptide in TNBS-induced rat colitis <i>Dai YC, Tang ZP, Wang ZN, Zhang YL, Li K, He XY</i></p> <p>259 Effects of acidic fibroblast growth factor fragments on nocturnal feeding in rats by intracerebroventricular and hypodermic injection <i>Zhao YJ, Li XL, Lin L, Aou S, Oomura Y</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>265 Nuclear-transcription factor-κB expression and HBV replication and their clinicopathological features in hepatocellular carcinoma <i>Wang YL, Yao DF, Wu W, Yu HB, Sai WL, Qian J, Li SS, Bian YZ</i></p> <p>270 Expression of Aurora-B in hepatocarcinoma and its clinical significance <i>Shan RF, Zhou FQ, Wu B, Xiao GS, Rao XF, Peng GZ</i></p> <p>273 Relationship between vitamin D receptor gene polymorphisms and alcoholic liver disease <i>Sun P, Wang Q</i></p> <p>279 A differential diagnostic model based on the morphological parameters of exfoliated cells for differentiating malignant pleural and peritoneal effusions from the benigns <i>Yuan S, Zhang KH, Xiao B, Chen J, Zhu JQ, Zhu X, Lv NH</i></p>
REVIEW	<p>284 Progress in proteomics-based diagnosis of hepatocellular carcinoma <i>Liao J, Yin ZF</i></p> <p>288 Progress in magnetic resonance diffusion-weighted imaging in liver fibrosis <i>Hu XR, Chen J</i></p> <p>293 Clinical research progress in secretory component structure and function <i>Fu JL, Liu P</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>299 Effect of soothing the liver and regulating method on behavior and gastric histology in rats with constant tail-clipped stress <i>Ling JH, Zhang YQ, Liang G, Wei LM, Chen YQ, Liu YL, Li YJ</i></p> <p>303 Establishment of a mouse model of stomach infection with <i>candida albicans</i> <i>Ma YH, Wang GS, Deng JH, Zhang XG, Wang AX, Si RL</i></p> <p>307 Role of endogenous hydrogen sulfide in rats with hepatic cirrhosis at different stages <i>Zhang N, Zheng Y, Wang YL, Li R, Sun K, Chang XY, Chen WG, Zhao J, Li HA</i></p>
CLINICAL PRACTICE	<p>312 Imaging presentations of esophageal perforation <i>Wang Y, Deng XB, Jiang K, Wang XY</i></p> <p>316 Clinicopathological observation, clonal status and <i>c-kit</i> gene mutation of gastrointestinal stromal tumor in sacrum <i>Gong L, Zhao JY, Li YH, Zhang L, Han XJ, Liu XY, Zhu SJ, Zhang W</i></p>

	<p>321 Correlation analysis among RUNX3, VEGF and MVD and their significance using gastric cancer tissue microarray <i>Fu J, Zhang X, Wang J</i></p> <p>326 Clinical application of diazepam in combination with flumazenil in painless gastroscopy: an analysis of 44 cases <i>Huang J, Wu XW, Zeng Y</i></p> <p>329 Relationship between therapeutic efficacy of interferon in treating chronic hepatitis B and HBV genotypes <i>Huang CF, Shi BB, Zhu Q, Wu L, Pei XH, Pu QH, Zhou Y</i></p> <p>333 Assay of serum IL-27 and its significance in HBV-infected patients <i>Zuo WZ, Zhang LL</i></p> <p>336 Combined therapy of domperidone and compound digestive enzymes for functional dyspepsia: an analysis of 84 cases <i>Zheng D, Xia B, Shi XY, Song M, Wu J, Wang P, Zhang H</i></p>
CASE REPORT	<p>340 A case study of acute fulminant ulcerative colitis complicated with idiopathic thrombocytopenic purpura <i>Shao YL, Zhao WF, Huang XP, Chen LY, Gan JH, Lin M</i></p>
ACKNOWLEDGMENT	<p>342 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
COVER	<p><i>Dai YC, Tang ZP, Wang ZN, Zhang YL, Li K, He XY.</i> Effect of Shenqing recipe on the expression of substance P and vasoactive intestine polypeptide in TNBS-induced rat colitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(3): 253-258 http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/253.asp</p>
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	<p>Assistant Editor: <i>Hui Li</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li, Jing-Hong Shi</i> Electronic Page Editor: <i>Peng-Zhen Wu</i> Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i> English Language Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i> Proof Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i></p>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date January 28, 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: wjgd@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: wjgd@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*

茶多酚没食子儿茶素没食子酸酯抗肿瘤机制研究进展

崔云甫, 石林, 秦虹, 刘适

崔云甫, 石林, 刘适, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外一科 黑龙江省哈尔滨市 150001

秦虹, 哈尔滨医科大学公共卫生学院营养与食品卫生教研室 黑龙江省哈尔滨市 150001

崔云甫, 教授, 主要从事肿瘤方面研究.

作者贡献分布: 崔云甫和石林对此论文所做贡献均等; 此文构思及文献查阅由崔云甫、刘适及石林完成, 论文写作由石林与秦虹共同完成.

通讯作者: 崔云甫, 150001, 黑龙江省哈尔滨南岗区保健路86号, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外一科.

cleverstone2006@yahoo.com.cn

电话: 0451-86605113

收稿日期: 2008-12-17 修回日期: 2009-01-04

接受日期: 2009-01-05 在线出版日期: 2009-01-28

Research progress in mechanisms of the anticancer effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate

Yun-Fu Cui, Lin Shi, Hong Qin, Shi Liu

Yun-Fu Cui, Lin Shi, Shi Liu, Department of the First General Surgery, the Second Hospital Affiliated to Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Hong Qin, Department of Nutrition and Food Hygiene, Public Health College, Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Yun-Fu Cui, Department of the First General Surgery, the Second Hospital Affiliated to Harbin Medical University, 86 Baojian Road, Nangang District, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. cleverstone2006@yahoo.com.cn

Received: 2008-12-17 Revised: 2009-01-04

Accepted: 2009-01-05 Published online: 2009-01-28

Abstract

Green tea is a worldwide popular beverage, which is found to have a broad anticancer activity. Polyphenol, one of the major constituents of green tea, is composed of catechins, mainly (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG). It is known anticancer effects of green tea are associated with this component. It has been well established that EGCG has strong anticancer effects. Studies have shown that the mechanisms through which EGCG exerts its anticarcinogenesis potential are very complex, such as cell division, apoptosis induction, angiogenesis inhibition, and so on. Recently, many new findings have been reported, like the action on 67 kDa Laminin receptors and AKT signaling pathway, which are not well cov-

ered by the previous researches. The mechanisms of its anticancer effects are becoming clear. In this paper we mainly discussed the mechanisms of anticancer effects of EGCG, based on the latest findings and proved conclusions, in hope of providing rationale for future cancer managements and giving enlightenment to the design of next-generation chemotherapeutics.

Key Words: Epigallocatechin gallate; Mitogen-Activated protein kinase; Apoptosis; Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway

Cui YF, Shi L, Qin H, Liu S. Research progress in mechanisms of the anticancer effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(3): 229-235

摘要

绿茶的主要成分之一茶多酚由多种儿茶素组成, 其中没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)含量最多. 大量研究表明, 绿茶的抗肿瘤作用主要与该分子有关. EGCG具有强烈的抗肿瘤作用, 其机制复杂, 如抑制细胞分裂、诱导细胞凋亡、抑制血管生成等等. 最近又发现了很多新的机制, 如EGCG对67 kDa层黏连蛋白受体及AKT信号传导系统的作用等. EGCG抗肿瘤作用机制正逐渐变得清晰起来. 本文综合了最新的发现和已证实的研究结论, 对EGCG抗肿瘤机制作一综述, 期待可以为新一代化疗药物的进一步深入研究提供依据.

关键词: 没食子儿茶素没食子酸酯; 有丝分裂原激活蛋白激酶信号传导通路; 凋亡; 磷酸肌醇三激酶/AKT信号通路

崔云甫, 石林, 秦虹, 刘适. 茶多酚没食子儿茶素没食子酸酯抗肿瘤机制研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(3): 229-235
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/229.asp>

0 引言

绿茶是一种世界性流行的保健饮料, 近年来发现其具有较强的抗肿瘤作用. 为了全面了解绿茶的抗肿瘤作用, 我们查阅了大量茶多酚抗肿瘤方面的相关文献, 对绿茶多酚类物质的抗肿

■背景资料

绿茶是一种世界性饮料, 研究发现其具有生物多效性, 如抗氧化、抗高脂血症及提升机体免疫力等作用, 因此受到世界广泛关注. 绿茶主要成分茶多酚由多种儿茶素组成, 其中没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)含量最多. 已证明, 绿茶的上述生物活性大多来自EGCG.

■同行评议者

许玲, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科

■研发前沿

目前有多家大型实验室正通过细胞实验和动物实验对茶多酚EGCG进行抗肿瘤、抗氧化等方面的研究,研究重点主要集中在分子机制等方面。据报道,相关的大规模随机临床研究正在进行,以了解EGCG作为抗肿瘤药物的可能性和治疗效果。

■相关报道

Naghma *et al*对EGCG抗肿瘤作用的机制进行了详细论述,包括对细胞传导通路的作用、抗肿瘤血管生成作用以及抗肿瘤转移的作用等方面。

瘤机制作一综述,期待可以为肿瘤的药物治疗提供理论基础,为新一代化疗药物的开发提供帮助。

1 茶多酚的抗肿瘤作用及肿瘤的分子靶向化学治疗

1.1 细胞信号传导通路与肿瘤的分子靶向化学治疗 通常生物体内细胞膜上的受体分子与细胞外配体结合,其细胞内部分会发生构象的改变,从而产生蛋白激酶的活性,并使其下游分子磷酸化或去磷酸化,将细胞外信号传至细胞内,进而影响基因表达和蛋白合成。受体、蛋白激酶、磷酸酶及细胞核内转录因子等多个层面的分子组成了复杂的细胞信号网络。在这个网络中,任何一个环节出现问题都有可能导致细胞信号的改变,使细胞发生恶变^[1]。因此,通过作用于细胞信号通路抑制细胞过度生长的药物必然具有强大的抗肿瘤作用^[2]。肿瘤的分子靶向化学治疗是指能特异性识别癌细胞的某一个分子而发挥针对性抗肿瘤作用的药物治疗方法。靶向化疗凭借其特异性、非细胞毒性、有效性和毒副反应低、耐受性高的特点,在肿瘤的治疗中取得了很大的成功。各种能与细胞信号传导系统上的关键分子结合并发挥特异性抗肿瘤作用的药物已成为目前国内外肿瘤治疗研究的热点。很多新一代分子靶向化疗药物已快速通过FDA的检验并上市应用,但这些药物大多只针对几种肿瘤,或者只对某个阶段的肿瘤有效,因此仍有很大局限性。目前学术界正致力于寻找广谱对抗肿瘤多个发展阶段的分子靶向化疗药物。

1.2 没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)的抗肿瘤作用 绿茶是一种世界性流行的保健饮料。绿茶的主要成分之一茶多酚由多种儿茶素组成,其中EGCG含量最多^[3-5]。众多研究证实,绿茶的抗肿瘤作用主要与该分子有关^[6-7],其相关的作用机制包括诱导细胞凋亡、抑制细胞增殖以及抑制肿瘤血管生成等^[8-11],体外实验已证明绿茶对多种肿瘤均有疗效^[12-17]。最新研究显示,EGCG对人源肿瘤细胞也有明显抑制作用。Ravindranath *et al*报道,EGCG有明显抑制人黑色素瘤细胞生长的作用^[18]。此外,EGCG在动物实验及流行病学实验中也表现出明显抑制肿瘤发生和发展的作用。Imai *et al*进行的对384名肿瘤患者进行研究,发现大量服用绿茶的患者肿瘤发生时间明显推迟^[19]。在472名一期或二期肿瘤患者中,服用绿茶较多的患者复发率明显

较低^[20]。另外,Neukam *et al*用进行的实验证明,EGCG处理CWR22R裸鼠抑制了其非雄激素依赖性前列腺癌的生长,该现象与血清前列腺特异抗原(PSA)水平、肿瘤血管生成以及凋亡率上升呈正相关,且没有相关副作用发生^[21]。可见,绿茶及EGCG对肿瘤的发生、发展和复发均有抑制作用。因此EGCG是一种广谱抗肿瘤分子,并具有分子靶向化疗药物的特点。

2 EGCG抑制肿瘤生长和诱导凋亡的作用机制

肿瘤细胞中EGCG发挥作用的信号通路比他的抗肿瘤作用要复杂得多,涉及到受体、下游蛋白激酶和磷酸酶、核转录因子等诸多环节。细胞表面的受体与细胞外液中EGCG结合后,激活一系列下游蛋白激酶和磷酸酶,最后激活特殊的功能基因转录,合成抑制增殖和促进凋亡的蛋白,从而发挥抗肿瘤作用。目前尚无关于EGCG本身穿过细胞膜直接与细胞膜内相关分子结合的报道。

2.1 受体 多年来研究人员一直在寻找EGCG的受体。近期研究证实,EGCG能与一种分子质量为67 kDa的层黏连蛋白受体(67LR)结合,这是一种癌转移相关蛋白,在多种肿瘤组织中都有表达。EGCG是唯一能与67LR结合的儿茶素。维甲酸能增强EGCG与67LR的结合^[22]。67LR可与层黏连蛋白相互作用发生磷酸酶激酶级联反应,诱导层黏连蛋白的降解,进而导致肿瘤细胞的转移。在细胞表面,67LR与整联蛋白 $\alpha 6$ 亚基相连,后者是层黏连整联蛋白 $\alpha 6\beta 4$ 和 $\alpha 6\beta 1$ 的一部分^[23]。近期研究显示,存在着两种 $\alpha 6$ 亚基, $\alpha 6A$ 和 $\alpha 6B$,他们都在A375SM黑色素瘤细胞中表达。67LR的减少能很明显的下调 $\alpha 6B$ 亚基的表达,而不会下调 $\alpha 6A$ 亚基,这提示67LR与 $\alpha 6B$ 亚基可能有共同调节关系。最新研究表明,在EGCG-67LR信号通路中包含了肽链延长因子(eEF1A)和肌球蛋白磷酸酶(MYPT1)。体外实验显示,肿瘤细胞中67LR、eEF1A或MYPT1的沉默使EGCG诱导的肿瘤生长抑制作用消失,提示由67LR、eEF1A和MYPT1介导的EGCG信号传导,在EGCG抗肿瘤作用中是必不可少的^[24-25]。同时有证据显示在人黑色素瘤细胞转移过程中,丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)和二元特异性磷酸酶是层黏连蛋白信号途径的重要分子^[26]。

然而,对于EGCG受体,有学者提出了不同观点。Adachi *et al*认为,EGCG可能并不直接作用于细胞表面的受体。他们通过荧光标记等技术

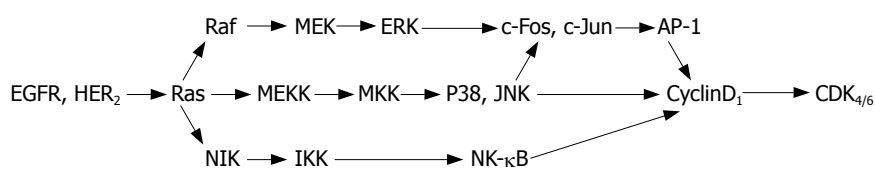


图1 MAPK通路.

■创新盘点

本文综合了已被证实的观点和最新研究发现,对EGCG抗肿瘤及诱导凋亡作用的机制进行了详细综述。

研究发现经EGCG处理后细胞表面的表皮生长因子(EGFR)转移到细胞质中的内涵体中,即内化作用,进而使生长信号阻断^[27]。

2.2 多靶点生长抑制和凋亡诱导作用

2.2.1 生长抑制作用和凋亡诱导作用: 很多研究证实, EGCG的细胞生长抑制和凋亡诱导作用是一个多靶点多途径共同参与的过程^[28]。EGCG作用于细胞后, 通过直接和间接方式, 作用于许多与细胞周期进程相关的因子, 导致细胞生长促进通路阻断和生长抑制通路激活, 进而使细胞生长停滞。另一方面, EGCG激活凋亡通路, 促进肿瘤细胞凋亡。

2.2.2 抑制MAPK通路: EGFR是一种细胞膜上的糖蛋白受体, 是表皮生长因子的受体。EGFR与表皮生长因子结合后, 其胞内部分会发生构象改变并表现出酪氨酸激酶的活性, 并磷酸化下游分子, 从而激活细胞生长信号通路, 其中包括MAPK通路。在哺乳动物细胞中最重要的MAPK包括细胞外信号调节蛋白激酶(ERK), P38 MAPK, 和Jun氨基末端激酶(JNK)。MAPK通路如图1所示。这些MAPK的亚族在许多生理过程中均起着不同的作用, 包括影响细胞增殖, 分化和死亡。有研究证实, 过表达的EGFR和高活性的MAPK信号通路, 是很多肿瘤形成的主要机制之一^[29]。研究表明, EGCG对不同组织的MAPK通道可能存在不同的效应。有报道称在JB6小鼠表皮肿瘤细胞系中, EGCG能通过使ERK等分子磷酸化而抑制MAPK通路^[30-31]。而其他学者发现正常人表皮细胞在紫外线照射之前用EGCG处理后, ERK1/2、JNK和P38蛋白的磷酸化形式下降, 进而使紫外线诱导的表皮损伤减轻^[32]。在人类癌克隆细胞ECE16-1、HeLa、Caski和SiHa细胞中, EGCG能抑制MAPK通路和AP-1的活性^[33-34]。此外, Koichi *et al*指出, 在凋亡过程中, EGCG激活了JNK和P38 MAPK介导的凋亡通路^[35]。在3T3-L1前脂肪细胞中, EGCG抑制ERK活性, 但不抑制JNK和P38 MAPK^[36]。以上结果表明, 对不同的组织, EGCG对MAPK通路的作用并不完全一致, 有时甚至相反。需要进一步大规模实验来对上述结论加以证实。

2.2.3 抑制NF-κB通路: 核转录因子NF-κB是一种氧化应激转录因子, 参与调节多种重要生理过程, 包括炎症、免疫、生长和细胞死亡。据报道在乳腺癌组织中存在NF-κB的多种亚基被异常激活的情况^[37-38]。通常, NF-κB在胞质中与IκB处于结合状态, 此时NF-κB无活性。磷酸化的IκB与NF-κB解离, 从而使NF-κB可以移动到核内并影响基因表达。在人表皮角化细胞中, EGCG可抑制紫外线诱导的NF-κB的激活, 这可能是EGCG抗氧化损伤作用的机制之一^[32]。在预后较差的人结肠癌细胞中, EGCG可抑制NF-κB级联反应, 进而抑制结肠癌细胞生长^[34]。可见, EGCG对NF-κB的抑制可能是EGCG抗肿瘤作用的一条重要机制。

2.2.4 抑制AKT/蛋白激酶B(PKB)信号通路: AKT/PKB信号通路也是细胞内一条重要的信号通路, 与细胞生长, 凋亡, 以及细胞内糖脂代谢及血管生成等重要生理过程密切相关。磷酸肌醇三激酶(PI3K)是EGFR细胞内部分的下游分子, EGFR激活后, PI3K随后活化, 并进一步磷酸化激活AKT。磷酸化的AKT直接或间接参与许多生理和病理过程^[39]。EGCG抑制了EGFR依赖的AKT激活过程, 并且导致凋亡诱导过程中重要蛋白的磷酸化形式比例改变, 如Forkhead家族和BAD家族等, 这可能是细胞周期停滞以及发生凋亡的关键因素^[33]。

2.2.5 抑制细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶(CDK)和细胞周期蛋白: 在CDK-细胞周期蛋白复合体中, CDK是催化亚基, 细胞周期蛋白是调节亚基。CDK和细胞周期蛋白是细胞周期必不可少的因子, 直接调控细胞周期。研究发现EGCG可下调细胞周期蛋白D1和Rb, 并抑制CDK^[36], 这被认为是导致细胞周期多种负性调节的主要事件^[39]。最近, 研究者发现EGCG诱导的ERK和AKT活性下降与P53, P21WAF-1和P27KIP-1水平升高有相关性, 同时细胞周期蛋白E与CDK2活性的降低也有相同的下降趋势^[33,40]。因此可以推测EGCG可能通过直接或间接的方式作用于细胞核内增殖相关分子, 并影响他们的活性。

2.2.6 抑制DNA甲基转移酶, 端粒酶和拓扑异构酶: 有研究证明EGCG能明显抑制肿瘤细胞

■应用要点

全面了解EGCG的抗肿瘤机制,有助于为新一代靶向抗癌药物的研发提供理论基础。

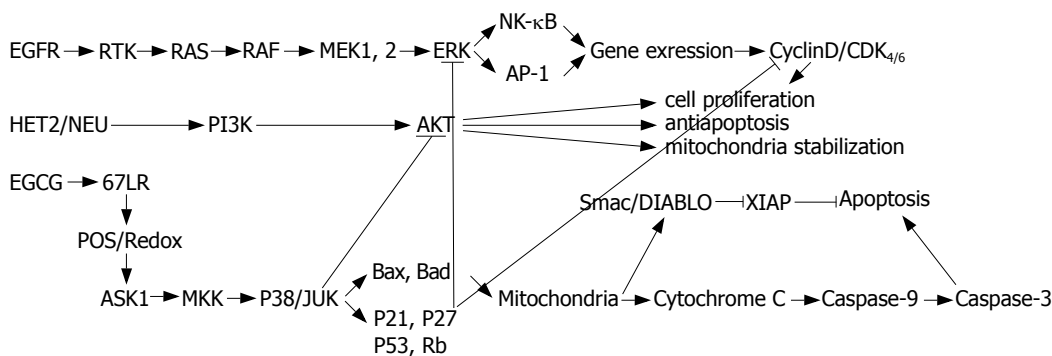


图2 EGCG传导通路。

系中DNA甲基转移酶的活性,从而抑制肿瘤的生长^[41]。此外,一些细胞实验和动物实验显示,EGCG抗肿瘤作用与其对肿瘤相关端粒酶的封闭作用直接相关^[42-43]。Bandelet *et al*进行的实验表明,EGCG通过与拓扑异构酶共价结合使其改变构象,进而表现出氧化还原反应依赖性拓扑异构酶毒性,与1,4-苯醌的作用机制相似。作者认为这是EGCG抗癌的重要机制^[21,44]。然而,这些结论还有待进一步大规模随机实验的证明。

2.2.7 EGCG对Wnt和Id通路的影响:不久前,Liu和Sartippour *et al*通过基因芯片技术及real-timePCR技术检测了EGCG对VEGF刺激的血管内皮的调节作用。他们发现共有421基因上调,72基因下调,他们还发现Wnt和Id通路在EGCG依赖性细胞生长抑制中有重要作用,并证明抗血管生成的作用来自于EGCG对生长因子刺激下血管内皮细胞增殖的广泛抑制作用。他们认为,EGCG抗肿瘤作用是由其对细胞增殖相关基因的调控实现的^[45-46]。目前,关于EGCG对这两条通路的研究报道较少,但这两条通路在EGCG生物活性中发挥的作用值得关注。

2.2.8 诱导细胞凋亡:凋亡,可用于清除不应该继续存在的细胞,是一种由细胞内凋亡系统精细调控的生理性保护机制,以前称作程序性细胞死亡,用于清除不应该继续存在的细胞。大量实验已证明EGCG可以诱导肿瘤细胞凋亡,其机制涉及Bax寡聚化,Bcl-2减少,线粒体膜的去极化,细胞色素C的释放和激活等^[47-49]。此外,EGCG的促凋亡作用并不影响正常细胞^[9]。最新研究表明,EGCG可以通过增加过氧化物H₂O₂的产生促进凋亡^[39,50-51]。Koichi *et al*发现EGCG可通过N-乙酰末端敏感的细胞内氧化事件激活ASK1, MKK及JNK/P38 MAPK凋亡途径,进而诱发细胞凋亡,其与化学和受体介导的凋亡为不同凋亡途径^[35]。可见,EGCG介导的凋亡有可能是通过激

活细胞内氧化应激通路的关键分子,如活性氧、H₂O₂等,这些分子进一步激活下游ASK1, MKK及JNK/P38,通过一系列复杂的细胞内反应完成凋亡的诱导^[47],使线粒体去极化释放细胞色素C,进而诱导凋亡^[52]。然而,Jerome *et al*发现EGCG不影响表皮生长因子受体依赖的JNK激活过程^[33]。Khan *et al*发现EGCG可下调ERK, p38和JNK的含量,进而抑制MAPK通路^[39]。此外,本实验室目前有研究证明EGCG对胰腺癌Panc-1细胞有促凋亡作用,在这个过程中,EGCG对Akt通路的抑制发挥了重要作用。不久前Raza *et al*报道,体外实验证明EGCG改变了活性氧、谷胱甘肽、脂质过氧化反应和蛋白氧化的发生情况,同时改变了细胞的氧化还原反应,他们还发现EGCG处理后细胞出现DNA裂解和凋亡标志物如细胞色素C、Caspase-3等的激活^[53-57]。由此可见,EGCG促凋亡的具体机制十分复杂,涉及细胞内多个信号传导通路,具体机制仍有待进一步研究(图2)。

3 动物实验和临床试验

当前EGCG抗肿瘤作用的动物实验和临床试验正在国内外很多实验室逐渐展开。动物实验方面,很多研究结果证实,针对不同组织,如肺、胃、结肠、肝、皮肤等,EGCG处理组动物的肿瘤发生率和复发率比对照组明显降低^[58-59]。Mantena *et al*提出,EGCG处理的动物患紫外线诱导的表皮损伤及皮肤癌比例较低^[60-61]。临床研究方面,不久前EGCG应用于人体的一期和二期临床试验也开始进行^[62-63],目前未有相关研究结果的报道。

4 结论

可以特异性抑制生长失控细胞继续繁殖甚至清除这种细胞的药物目前受到学术界普遍关注。如前所述,EGCG就是这样的一种很有潜在

开发价值的药物。很多流行病学实验、细胞实验、动物实验以及临床研究都证实EGCG具有广谱对抗肿瘤生成、转移的作用^[64]。EGCG可直接作用于细胞增殖和凋亡等多个水平,并可影响肿瘤血管生成。具体机制十分复杂,涉及到细胞内几乎所有增殖相关通路,如生长因子通路、MAPK依赖通路、Akt信号通路和泛素/蛋白酶降解通路等^[65-68]。很多实验结论甚至互相矛盾。如前文所述,有的实验证明EGCG通过激活MAPK依赖性通路而发挥作用,还有的研究人员认为EGCG对该通路的直接作用是抑制。有的研究发现EGCG可以直接封闭Akt酶的活性,相反也有人认为EGCG是通过作用于其上游的蛋白而发挥抑制作用。虽然当前学者们对其确切机制仍莫衷一是,但正是其复杂的作用方式使EGCG具有广谱的多方面的抗肿瘤作用。目前关于EGCG仍然有许多方面需要进行进一步研究。首先日常生活对茶的饮用量虽然很大,但这种摄入方式所带来的茶多酚EGCG血液浓度并不能达到离体实验中的浓度,因此这个浓度EGCG对人体的作用是否与细胞实验所得结论一致值得关注。整体情况下机体的自我调节机制会对EGCG的作用产生何种影响也未见报道。在动物体内,非常有可能出现EGCG的作用被机体免疫系统或内分泌系统弱化甚至抵消的情况。此外,目前报道的动物实验和临床研究结果都来自小规模单中心的实验。因此,未来研究应注重大规模动物实验及随机双盲临床研究,以进一步研究并验证EGCG的抗肿瘤作用,以期为癌症的化学治疗提供足够的理论依据,为未来新一代化疗药物的研发打下基础。

5 参考文献

- 1 Brown MS, Goldstein JL. Sterol regulatory element binding proteins (SREBPs): controllers of lipid synthesis and cellular uptake. *Nutr Rev* 1998; 56: S1-S3; discussion S54-S75
- 2 Mukhtar H, Ahmad N. Cancer chemoprevention: future holds in multiple agents. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 158: 207-210
- 3 Mukhtar H, Ahmad N. Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 1698S-1702S; discussion 1703S-1704S
- 4 Cheynier V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 223S-229S
- 5 Graham HN. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med* 1992; 21: 334-350
- 6 Katiyar SK, Afaq F, Azizuddin K, Mukhtar H. Inhibition of UVB-induced oxidative stress-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in cultured human epidermal keratinocytes by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 176: 110-117
- 7 Conney AH, Lu Y, Lou Y, Xie J, Huang M. Inhibitory effect of green and black tea on tumor growth. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 220: 229-233
- 8 Adhami VM, Ahmad N, Mukhtar H. Molecular targets for green tea in prostate cancer prevention. *J Nutr* 2003; 133: 2417S-2424S
- 9 Ahmad N, Feyes DK, Nieminen AL, Agarwal R, Mukhtar H. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1881-1886
- 10 Ju J, Lu G, Lambert JD, Yang CS. Inhibition of carcinogenesis by tea constituents. *Semin Cancer Biol* 2007; 17: 395-402
- 11 Eatock MM, Schatzlein A, Kaye SB. Tumour vasculature as a target for anticancer therapy. *Cancer Treat Rev* 2000; 26: 191-204
- 12 Pianetti S, Guo S, Kavanagh KT, Sonenshein GE. Green tea polyphenol epigallocatechin-3 gallate inhibits Her-2/neu signaling, proliferation, and transformed phenotype of breast cancer cells. *Cancer Res* 2002; 62: 652-655
- 13 Yang F, de Villiers WJ, McClain CJ, Varilek GW. Green tea polyphenols block endotoxin-induced tumor necrosis factor-production and lethality in a murine model. *J Nutr* 1998; 128: 2334-2340
- 14 Liang YC, Chen YC, Lin YL, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JK. Suppression of extracellular signals and cell proliferation by the black tea polyphenol, theaflavin-3,3'-digallate. *Carcinogenesis* 1999; 20: 733-736
- 15 Kavanagh KT, Hafer LJ, Kim DW, Mann KK, Sherr DH, Rogers AE, Sonenshein GE. Green tea extracts decrease carcinogen-induced mammary tumor burden in rats and rate of breast cancer cell proliferation in culture. *J Cell Biochem* 2001; 82: 387-398
- 16 Brown MD. Green tea (*Camellia sinensis*) extract and its possible role in the prevention of cancer. *Altern Med Rev* 1999; 4: 360-370
- 17 Umemura T, Kai S, Hasegawa R, Kanki K, Kitamura Y, Nishikawa A, Hirose M. Prevention of dual promoting effects of pentachlorophenol, an environmental pollutant, on diethylnitrosamine-induced hepato- and cholangiocarcinogenesis in mice by green tea infusion. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1105-1109
- 18 Ravindranath MH, Ramasamy V, Moon S, Ruiz C, Muthugounder S. differential growth suppression of human melanoma cells by tea (*camellia sinensis*) epicatechins (ECG, EGC and EGCG). *Evid Based Complement Alternat Med* 2008 Jan 3 [Epub ahead of print]
- 19 Imai K, Suga K, Nakachi K. Cancer-preventive effects of drinking green tea among a Japanese population. *Prev Med* 1997; 26: 769-775
- 20 Nakachi K, Suemasu K, Suga K, Takeo T, Imai K, Higashi Y. Influence of drinking green tea on breast cancer malignancy among Japanese patients. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89: 254-261
- 21 Neukam K, Pastor N, Cortés F. Tea flavanols inhibit cell growth and DNA topoisomerase II activity and induce endoreduplication in cultured Chinese hamster cells. *Mutat Res* 2008; 654: 8-12
- 22 Tachibana H, Koga K, Fujimura Y, Yamada K. A

■名词解释

分子靶向化学治疗: 指能特异性识别癌细胞的某一个分子而发挥针对性抗肿瘤作用的药物治疗方法。

■同行评价

本文从肿瘤细胞信号传导通路多方面综述了茶多酚没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)在抑制肿瘤生长、诱导肿瘤细胞凋亡方面的作用机制。对人们了解EGCG及EGCG在肿瘤领域应用的深入研究有一定的帮助。

- receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11: 380-381
- 23 Montuori N, Müller F, De Riu S, Fenzi G, Sobel ME, Rossi G, Vitale M. Laminin receptors in differentiated thyroid tumors: restricted expression of the 67-kilodalton laminin receptor in follicular carcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2086-2092
- 24 Umeda D, Yano S, Yamada K, Tachibana H. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate signaling pathway through 67-kDa laminin receptor. *J Biol Chem* 2008; 283: 3050-3058
- 25 Kim K, Li L, Kozlowski K, Suh HS, Cao W, Ballermann BJ. The protein phosphatase-1 targeting subunit TIMAP regulates LAMR1 phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 1327-1334
- 26 Givant-Horwitz V, Davidson B, Reich R. Laminin-induced signaling in tumor cells: the role of the M(r) 67,000 laminin receptor. *Cancer Res* 2004; 64: 3572-3579
- 27 Adachi S, Nagao T, To S, Joe AK, Shimizu M, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Moriwaki H, Maxfield FR, Weinstein IB. (-)-Epigallocatechin gallate causes internalization of the epidermal growth factor receptor in human colon cancer cells. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1986-1993
- 28 Kazi A, Wang Z, Kumar N, Falsetti SC, Chan TH, Dou QP. Structure-activity relationships of synthetic analogs of (-)-epigallocatechin-3-gallate as proteasome inhibitors. *Anticancer Res* 2004; 24: 943-954
- 29 Guo S, Lu J, Subramanian A, Sonenshein GE. Microarray-assisted pathway analysis identifies mitogen-activated protein kinase signaling as a mediator of resistance to the green tea polyphenol epigallocatechin 3-gallate in her-2/neu-overexpressing breast cancer cells. *Cancer Res* 2006; 66: 5322-5329
- 30 Dong Z, Ma W, Huang C, Yang CS. Inhibition of tumor promoter-induced activator protein 1 activation and cell transformation by tea polyphenols, (-)-epigallocatechin gallate, and theaflavins. *Cancer Res* 1997; 57: 4414-4419
- 31 Chung JY, Park JO, Phyu H, Dong Z, Yang CS. Mechanisms of inhibition of the Ras-MAP kinase signaling pathway in 30.7b Ras 12 cells by tea polyphenols (-)-epigallocatechin-3-gallate and theaflavin-3,3'-digallate. *FASEB J* 2001; 15: 2022-2024
- 32 Afaq F, Adhami VM, Ahmad N, Mukhtar H. Inhibition of ultraviolet B-mediated activation of nuclear factor kappaB in normal human epidermal keratinocytes by green tea Constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Oncogene* 2003; 22: 1035-1044
- 33 Sah JF, Balasubramanian S, Eckert RL, Rorke EA. Epigallocatechin-3-gallate inhibits epidermal growth factor receptor signaling pathway. Evidence for direct inhibition of ERK1/2 and AKT kinases. *J Biol Chem* 2004; 279: 12755-12762
- 34 Shimizu M, Deguchi A, Lim JT, Moriwaki H, Kopelovich L, Weinstein IB. (-)-Epigallocatechin gallate and polyphenon E inhibit growth and activation of the epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor-2 signaling pathways in human colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2735-2746
- 35 Saeki K, Kobayashi N, Inazawa Y, Zhang H, Nishitoh H, Ichijo H, Saeki K, Isemura M, Yuo A. Oxidation-triggered c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways for apoptosis in human leukaemic cells stimulated by epigallocatechin-3-gallate (EGCG): a distinct pathway from those of chemically induced and receptor-mediated apoptosis. *Biochem J* 2002; 368: 705-720
- 36 Hung PF, Wu BT, Chen HC, Chen YH, Chen CL, Wu MH, Liu HC, Lee MJ, Kao YH. Antimitogenic effect of green tea (-)-epigallocatechin gallate on 3T3-L1 preadipocytes depends on the ERK and Cdk2 pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288: C1094-C1108
- 37 Sovak MA, Bellas RE, Kim DW, Zanieski GJ, Rogers AE, Traish AM, Sonenshein GE. Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J Clin Invest* 1997; 100: 2952-2960
- 38 Romieu-Mourez R, Kim DW, Shin SM, Demicco EG, Landesman-Bollag E, Seldin DC, Cardiff RD, Sonenshein GE. Mouse mammary tumor virus c-rel transgenic mice develop mammary tumors. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 5738-5754
- 39 Khan N, Afaq F, Saleem M, Ahmad N, Mukhtar H. Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Res* 2006; 66: 2500-2505
- 40 Kuo PL, Lin CC. Green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits Hep G2 cell proliferation and induces apoptosis through p53-dependent and Fas-mediated pathways. *J Biomed Sci* 2003; 10: 219-227
- 41 Fang MZ, Wang Y, Ai N, Hou Z, Sun Y, Lu H, Welsh W, Yang CS. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res* 2003; 63: 7563-7570
- 42 Naasani I, Oh-Hashi F, Oh-Hara T, Feng WY, Johnston J, Chan K, Tsuruo T. Blocking telomerase by dietary polyphenols is a major mechanism for limiting the growth of human cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2003; 63: 824-830
- 43 Akiyama M, Yamada O, Kanda N, Akita S, Kawano T, Ohno T, Mizoguchi H, Eto Y, Anderson KC, Yamada H. Telomerase overexpression in K562 leukemia cells protects against apoptosis by serum deprivation and double-stranded DNA break inducing agents, but not against DNA synthesis inhibitors. *Cancer Lett* 2002; 178: 187-197
- 44 Bandele OJ, Osheroff N. (-)-Epigallocatechin gallate, a major constituent of green tea, poisons human type II topoisomerases. *Chem Res Toxicol* 2008; 21: 936-943
- 45 Liu L, Lai CQ, Nie L, Ordovas J, Band M, Moser L, Meydani M. The modulation of endothelial cell gene expression by green tea polyphenol-EGCG. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52: 1182-1192
- 46 Sartippour MR, Shao ZM, Heber D, Beatty P, Zhang L, Liu C, Ellis L, Liu W, Go VL, Brooks MN. Green tea inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF) induction in human breast cancer cells. *J Nutr* 2002; 132: 2307-2311
- 47 Qanungo S, Das M, Haldar S, Basu A. Epigallocatechin-3-gallate induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis* 2005; 26: 958-967
- 48 Lambert JD, Hong J, Yang GY, Liao J, Yang CS.

- Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 284S-291S
- 49 Kazi A, Smith DM, Zhong Q, Dou QP. Inhibition of bcl-x(l) phosphorylation by tea polyphenols or epigallocatechin-3-gallate is associated with prostate cancer cell apoptosis. *Mol Pharmacol* 2002; 62: 765-771
- 50 Chen C, Shen G, Hebbar V, Hu R, Owuor ED, Kong AN. Epigallocatechin-3-gallate-induced stress signals in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1369-1378
- 51 Coimbra S, Castro E, Rocha-Pereira P, Rebelo I, Rocha S, Santos-Silva A. The effect of green tea in oxidative stress. *Clin Nutr* 2006; 25: 790-796
- 52 Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309-1312
- 53 Raza H, John A. In vitro effects of tea polyphenols on redox metabolism, oxidative stress, and apoptosis in PC12 cells. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1138: 358-365
- 54 Artali R, Beretta G, Morazzoni P, Bombardelli E, Meneghetti F. Green tea catechins in chemoprevention of cancer: A molecular docking investigation into their interaction with glutathione S-transferase (GST P1-1). *J Enzyme Inhib Med Chem* 2008 Sep 29; 1 [Epub ahead of print]
- 55 Dou QP, Landis-Piwowar KR, Chen D, Huo C, Wan SB, Chan TH. Green tea polyphenols as a natural tumour cell proteasome inhibitor. *Inflammopharmacology* 2008; 16: 208-212
- 56 Ishii T, Mori T, Tanaka T, Mizuno D, Yamaji R, Kumazawa S, Nakayama T, Akagawa M. Covalent modification of proteins by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate through autooxidation. *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 1384-1394
- 57 Hakim IA, Harris RB, Brown S, Chow HH, Wiseman S, Agarwal S, Talbot W. Effect of increased tea consumption on oxidative DNA damage among smokers: a randomized controlled study. *J Nutr* 2003; 133: 3303S-3309S
- 58 Dreosti IE, Wargovich MJ, Yang CS. Inhibition of carcinogenesis by tea: the evidence from experimental studies. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1997; 37: 761-770
- 59 Lu YP, Lou YR, Lin Y, Shih WJ, Huang MT, Yang CS, Conney AH. Inhibitory effects of orally administered green tea, black tea, and caffeine on skin carcinogenesis in mice previously treated with ultraviolet B light (high-risk mice): relationship to decreased tissue fat. *Cancer Res* 2001; 61: 5002-5009
- 60 Mantena SK, Meeran SM, Elmetts CA, Katiyar SK. Orally administered green tea polyphenols prevent ultraviolet radiation-induced skin cancer in mice through activation of cytotoxic T cells and inhibition of angiogenesis in tumors. *J Nutr* 2005; 135: 2871-2877
- 61 Zykova TA, Zhang Y, Zhu F, Bode AM, Dong Z. The signal transduction networks required for phosphorylation of STAT1 at Ser727 in mouse epidermal JB6 cells in the UVB response and inhibitory mechanisms of tea polyphenols. *Carcinogenesis* 2005; 26: 331-342
- 62 Chen D, Milacic V, Chen MS, Wan SB, Lam WH, Huo C, Landis-Piwowar KR, Cui QC, Wali A, Chan TH, Dou QP. Tea polyphenols, their biological effects and potential molecular targets. *Histol Histopathol* 2008; 23: 487-496
- 63 Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2005; 45: 287-306
- 64 Pitot HC. The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer* 1993; 72: 962-970
- 65 Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 1994; 79: 13-21
- 66 Kuhn D, Lam WH, Kazi A, Daniel KG, Song S, Chow LM, Chan TH, Dou QP. Synthetic peracetate tea polyphenols as potent proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human cancer cells. *Front Biosci* 2005; 10: 1010-1023
- 67 Nam S, Smith DM, Dou QP. Ester bond-containing tea polyphenols potentially inhibit proteasome activity in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 2001; 276: 13322-13330
- 68 Seemuller E, Lupas A, Stock D, Lowe J, Huber R, and Baumeister W. Huber R, Baumeister W. Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science* 1995; 268: 579-582

编辑 史景红 电编 吴鹏联

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

• 消息 •

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

本刊讯 2007年世界华人消化杂志的总被引频次为2353, 位居全部1723种中国科技论文统计源期刊的第86位, 内科医学类28中期刊的第5位. 2007年世界华人消化杂志的影响因子为0.568, 内科医学类28中期刊的第15位. 即年指标0.082, 他引率0.69, 引用刊数372种, 扩散因子15.81, 学科影响指标0.54. (编辑: 程剑侠 2009-01-28)

肺组织瓣内衬壳聚糖支架对食管部分缺损的修补

陈刚, 石文君

■背景资料

食管疾病是我国常见的消化系统疾病之一, 食管切除后需要重建以恢复消化系统的连续性。目前常用的食管重建替代物, 但效果都不甚理想。理想的替代物应具有易获取、无毒性、无排斥反应、无致癌性以及可吸收性等特点。

陈刚, 石文君, 中国医科大学附属盛京医院胸外科 辽宁省沈阳市 110004

陈刚, 博士, 副主任医师, 主要研究生物材料在食管气管重建中的应用。

卫生部立项资助项目, No. WKZ-2000-1-17

作者贡献分布: 本文研究课题由石文君构思, 陈刚设计; 生物材料制作由陈刚完成; 动物实验由陈刚与石文君共同完成; 论文撰写由陈刚完成, 修改由石文君完成。

通讯作者: 石文君, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属盛京医院胸外科. shiwj@cmu2h.com

电话: 024-83955064

收稿日期: 2008-09-18 修回日期: 2008-11-25

接受日期: 2008-12-01 在线出版日期: 2009-01-28

Repairing partial esophagus defection with an inner chitosan stent in rabbits

Gang Chen, Wen-Jun Shi

Gang Chen, Wen-Jun Shi, Department of Thoracic Surgery, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Supported by: the Foundation of Ministry of Health, No. WKZ-2000-1-17

Correspondence to: Wen-Jun Shi, Department of Thoracic Surgery, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. shiwj@cmu2h.com

Received: 2008-09-18 Revised: 2008-11-25

Accepted: 2008-12-01 Published online: 2009-01-28

Abstract

AIM: To examine feasibility of patching esophagus damage with chitosan tube stent.

METHODS: Fifty Japanese rabbits were randomly divided into two groups, experimental group ($n = 25$) which underwent patching center-section esophagus partial damages with body lung tissue petal (inside lining chitosan tube stent) and control group ($n = 25$) which underwent non-inside lining stent. At the 2nd, 4th, 8th week after surgery, healing status was observed roughly and histologically. At the 10th week after surgery, the survived rabbits were given barium meal to detect esophagus. The rabbits were followed up for survival time and death cause.

RESULTS: Forty five experimental animals survived over two weeks. Five rabbits died during perioperative period with a 10% death rate.

Reliable cicatrisation between the lung tissue petal and damage area, and squamose epidermis metaplasia were observed. At the 10th week after surgery, the esophagus barium test showed that barium agents went through the esophagus smoothly, and there were no obvious stenosis or reflux and moderate peristalsis in the experiment group. However, there was mild stenosis and no obvious obstruction or reflux in the control group. Followed-up rabbits survived 6-8 months and their death cause was irrelevant to surgery.

CONCLUSION: The lung tissue petal patching esophagus damage is one feasible method, and the chitosan tube, as the inside lining stent, may prevent narrowing.

Key Words: Lung; Tissue petal; Chitosan; Stent; Esophagus reconstruction

Chen G, Shi WJ. Repairing partial esophagus defection with an inner chitosan stent in rabbits. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(3): 236-240

摘要

目的: 探讨肺组织瓣内衬壳聚糖管修补食管缺损的可行性。

方法: 取50只日本大耳白兔, 随机分为2组, 实验组25只, 行自体肺组织瓣修补中段食管部分缺损(内衬壳聚糖管支架); 对照组25只, 无内衬支架, 术后第2、4、8周时, 大体及组织学观察缺损修补处肺组织瓣愈合情况, 并于术后10 wk对存活兔行钡餐透视观察食管通畅情况。随访观察剩余兔长期存活时间及死因。

结果: 45只实验动物存活超过2 wk以上, 围手术期死亡5只, 死亡率10%, 肺组织瓣与食管缺损处牢固愈合, 肺组织瓣表面有鳞状上皮化生。术后10 wk: 食管钡餐检查见实验组食管钡剂通过顺利, 无明显狭窄及反流, 蠕动尚可, 对照组轻度狭窄, 无明显梗阻及反流。随访实验动物存活6-8 mo, 死亡原因与手术无关。

结论: 肺组织瓣修补食管缺损是一种可行的

■同行评议者

伊力亚尔·夏合丁, 教授, 新疆医科大学第一附属医院胸外科

方法,壳聚糖管可以作为内衬支架防止狭窄.

关键词: 肺;组织瓣;壳聚糖;支架;食管重建

陈刚, 石文君. 肺组织瓣内衬壳聚糖支架对食管部分缺损的修补. 世界华人消化杂志 2009; 17(3): 236-240

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/236.asp>

0 引言

食管疾病是我国常见的消化系疾病之一,食管切除后需要重建以恢复消化系的连续性.目前常用的食管重建替代物主要有:(1)自体组织,包括自体管腔组织:胃、结肠和空肠;自体非管腔组织:各种带血管蒂的肌皮瓣^[1]、颈阔肌皮瓣^[2-3]、骨膜肋间肌瓣等^[4].(2)人工食管,如塑料管、金属管、Teflon管、硅胶管等,但效果都不甚理想.理想的替代物应具有易获取、无毒性、无排斥反应、无致癌性以及可吸收性等特点.

目前,食管重建术式较多^[5],有各自的优缺点,手术方法仍处于不断改进和完善中.无论那种重建,减轻瘢痕增生、预防狭窄的发生仍是关键问题.我们在应用自体肺组织瓣重建气管获得临床成功以后^[6],应用自体肺组织瓣,内衬金属和硅胶管支架,在动物实验取得成功,但异物反应无法克服,本实验采用内衬一种新型可吸收生物材料-壳聚糖管作为支架,预防术后狭窄,原位修补部分食管缺损,探讨其应用的可行性及出现的一些问题,为今后整段缺损的进一步研究奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 健康日本大耳白兔50只,体质量3 kg左右,雌雄不限,由中国医科大学附属第二医院动物实验中心提供,其中25只设为对照组,25只为实验组;壳聚糖管状支架,长15 mm,内径4 mm(壳聚糖粉纯度99%,脱乙酰度为99%,山东济南海洋生物制品有限公司,本人自行研制,戊二醛灭菌);TKR-200C小动物呼吸机1台(江西省特立麻醉呼吸设备有限公司);婴儿喉镜、3.0-4.0型号气管插管.

1.2 方法

1.2.1 手术前处理:全部大耳白兔术前均未给药,无需术前禁食水.200 g/L乌拉坦(5 mL/kg),ip,3 min内兔麻醉,四肢瘫软,呼吸变慢变浅,腹式呼吸,角膜反射存在,肌注氯胺酮(1 mg/kg),减少痛觉反射.将麻醉好的大白兔取仰卧位,用100 g/L普鲁卡因喷洒咽喉部,迅速垂直插入气管插管,

距门齿13 cm左右,接呼吸机,将氧气调到低流量,暂不给机械通气,保持自主呼吸.

1.2.2 手术方法:将大白兔左侧卧位,左侧垫高,便于暴露胸腔,四肢绑定,行右侧开胸,于6-7肋间,逐层切开肌肉,切开胸膜,注意不要损伤到肺组织,开胸见肺萎陷,给与机械通气,呼吸频率30次/min,吸呼比1:1.5,潮气量20 mL左右,可根据肺膨胀大小来调整;胸内手术操作时气流量调小,便于操作,将胃管置入,在主动脉旁可见撑起的食管,寻找中段,将其游离,用细纱布条吊起,切除中段食管为环3 mm×3 mm周径的食管壁,制成食管壁部分缺损的动物模型,实验组将壳聚糖管从破损处置于食管内,并于上下各缝一针固定,将就近的肺组织瓣从食管后穿过,包绕在破损处,与食管破损处边缘3-0丝线连续全层缝合,将胃管退出,要求无张力,放回食管;对照组无需内衬壳聚糖管.关胸前检查无胸内出血及肺漏气,当关胸膜最后一针前给与过渡通气几次,在吸气末关闭胸膜腔,无需胸腔引流管和穿刺排气,逐层缝合.术后补液抗炎治疗,5 d后给予鲜奶,1 wk后逐渐过渡饮食.

1.2.3 观察指标:(1)一般情况观察:大白兔术后的存活情况、进食情况、体质量变化,以及有无并发症发生.(2)大体观察:如实验兔在观察期中死亡,及时尸检,分析死亡原因,病理学检查,术后第2、4、8周分别处死两组存活动物各6只,肉眼大体观察缺损处肺组织瓣愈合情况及壳聚糖管的情况.(3)组织学观察:取缺损修补处组织进行HE染色、光镜检查肺组织瓣生长情况.(4)钡餐透视:术后10 wk对各组存活兔行钡餐透视观察食管通畅情况.(5)随访观察存活兔进食生长情况6-8 mo.

2 结果

2.1 动物存活情况 术后存活45只,实验组23只,对照组22只,围手术期死亡5只,其中术中死亡1只,术后当日死亡1只,死于麻醉过深,第4天死于吻合口瘘1只,第7天死于输液意外1只;第2周死于营养不良衰竭1只,死亡后不再补充.

2.2 一般情况 实验组及对照组禁食5 d后均能经口进食,前5 d禁食,输液,5 d给流质鲜奶,食欲旺盛,未发现呕吐现象,每日少量多餐,10 d后正常饮食,实验组未出现明显进食障碍,对照组于3 wk后饮食差,大白兔术后1 wk内体质量均下降约1-2 kg,对照组体质量未能恢复术前状况.实验组体质量无明显减轻.

■ 研发前沿

食管重建是食管外科研究热点,尚未找到理想的食管重建替代物.

■创新盘点

本研究采用壳聚糖制成管型可吸收支架,在肺组织瓣修复食管缺损重建中防止狭窄和排斥反应。

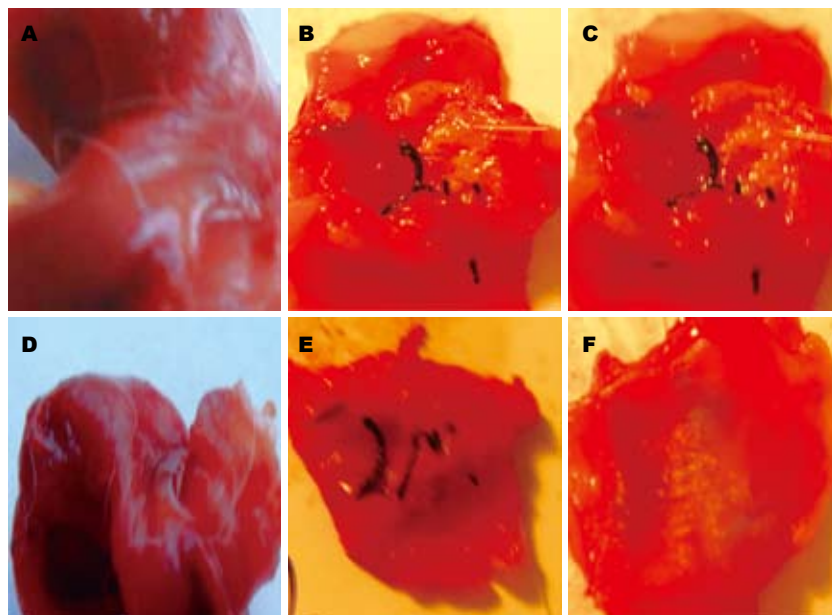


图1 肺修复食管术后大体标本. A: 对照组2 wk; B: 对照组4 wk; C: 对照组8 wk; D: 实验组2 wk; E: 实验组4 wk; F: 实验组8 wk.

2.3 大体观察 术后2 wk: 见食管缺损处食管断端与肺组织瓣结合紧密, 伴有水肿, 替代物肺组织瓣下可触及壳聚糖管, 质地软, 管腔表面有一层污秽膜状物; 术后4 wk: 缺损处完全修复, 缝线可见, 尚未吸收, 实验组食管替代物部分的管腔内表面光滑, 血运丰富, 壳聚糖管部分分解, 触及有颗粒感, 对照组, 缺损处肺组织红色, 有组织增生物覆盖, 伴有水肿; 术后8 wk: 实验组食管缺损处完全被白色厚膜状物覆盖, 管壁无水肿, 无明显狭窄, 无坏死和溃疡; 未见壳聚糖管状物. 对照组愈合良好, 组织瓣表面有增生物存在(图1).

2.4 组织学观察 取缺损部组织行病理检查: 术后2 wk: 实验组及对照组均见肺组织结构, 肺泡萎陷, 肺泡细胞变性肿大, 炎性细胞浸润, 表现为急性炎症反应; 术后4 wk: 实验组替代物表面肺组织结构依然可辨, 肺泡变大, 结构不典型, 炎症反应减弱, 未见明显纤维组织增生, 伴有少许中性粒细胞和淋巴细胞; 对照组缺损处中央肺泡结构不典型, 可见纤维组织细胞生长, 伴有少许炎性细胞; 术后8 wk: 实验组肺组织瓣表面大部分鳞状上皮化, 肺泡结构不明显, 慢性炎症反应明显减轻; 对照组为慢性炎症反应, 伴有明显纤维组织增生, 表面无鳞状上皮化生(图2).

2.5 钡餐透视 术后10 wk食管钡餐检查, 实验组见食管钡剂通过顺利, 无明显狭窄及返流, 吻合部上下无扩张, 无钡剂漏出, 蠕动良好; 对照组出现轻度的狭窄, 吻合口上伴有扩张, 钡剂通过顺畅, 蠕动一般(图3).

2.6 随访情况 剩余各组兔长期存活6-8 mo, 死亡

原因与手术无关, 皆为其他原因所致.

3 讨论

食管切除与食管重建是食管外科领域的一个重要方面, 近年来研究的生物类替代物, 如智发朝 *et al*^[7]应用由猪主动脉经理化处理后制成生物型人工食管, 无生物活性, 对30只实验犬进行食管替代, 结果发现组织相容性好, 质地柔软、有弹性、脱落不构成危险, 围手术期有效率为93.3%, 有良好的研究及开发应用前景, 张兰军 *et al*^[8]应用30只中国杂种犬经右侧开胸切除胸段食管, 并以8 cm长生物型人工食管进行重建, 目前仍旧面临的还有吻合口瘘, 狭窄, 以及植入长度的限制, 仍需进一步的深入研究. 采用生物可降解材料与非降解材料复合制成人工食管, 既对自身食管组织爬行再生有一定的诱导作用, 同时生物材料降解速度与之相匹配, 非降解材料起到支架作用, 延长了单纯生物材料的支撑时间, 最终再生食管完全替代人工食管. 组织工程化食管取得了一定进展, 目前尚未应用于临床.

本课题组^[6]首创肺组织瓣用于气管缺损修复获得成功, 证明肺组织瓣可作为胸内修复重建材料, 这为我们修补食管缺损提供了新的思路, 即将肺组织瓣包裹缺损部位, 形成人工食管管腔, 内置金属和硅胶管支架, 有助于近期预防狭窄的发生, 但支架的排斥反应无法避免^[9], 远期效果不理想, 容易造成远期排斥反应, 这是我们课题组前期遇到的问题, 改进方法, 选择壳聚糖材料制成可吸收支架, 来解决排斥反应. 肺组织瓣血运丰富. 在手术中观察无缺血改变, 术后

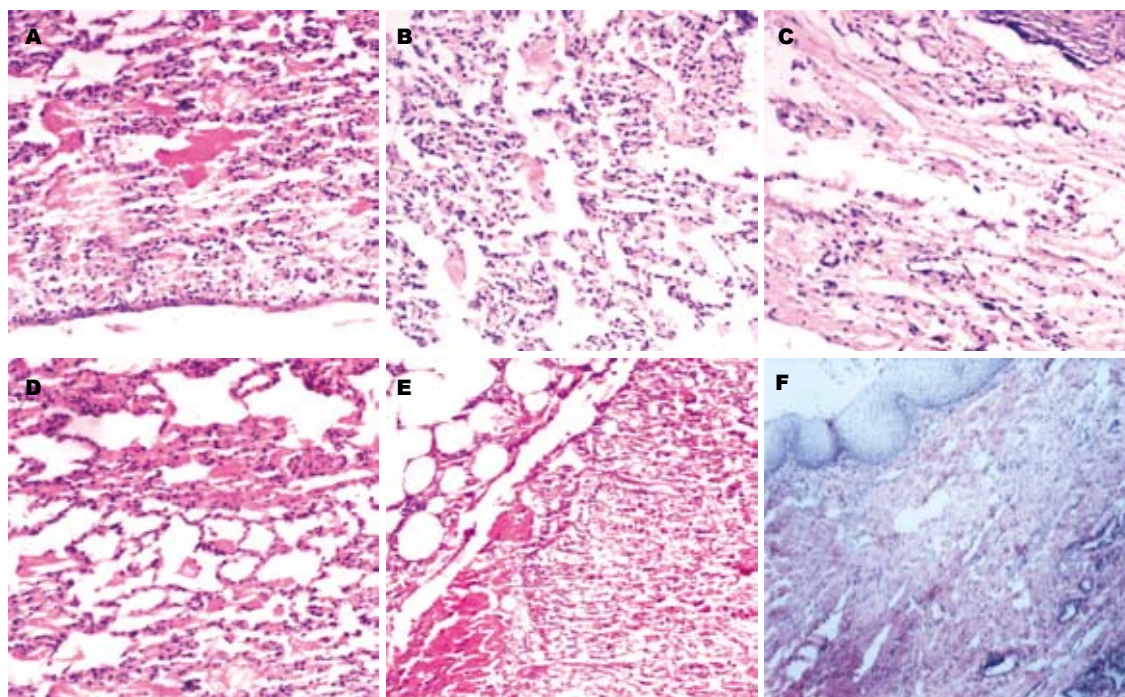


图 2 肺修补食管术后光镜下肺组织瓣变化(HE染色, $\times 10$). A-C: 对照组2、4、8 wk; D-F: 实验组2、4、8 wk.

同行评价

本研究采用可吸收生物材料-壳聚糖管作为内衬支架, 用自体肺组织瓣替代食管缺损, 为食管缺损修补提供了新的思路. 立题新颖, 具有重要的学术价值, 但需扩大样本含量进一步研究.

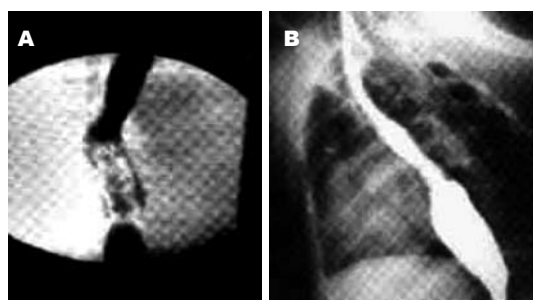


图 3 兔术后10 wk钡餐透视变化. A: 实验组; B: 对照组.

病理及电镜检查也证实这一点. 修补物为自体组织, 避免了人工食管的异物排斥反应, 能与食管缺损缘形成牢固的纤维愈合. 肺组织瓣有一定的延展性, 选取不同的肺叶可以制成不同长度的肺组织瓣. 总之, 肺组织瓣取材方便, 组织相容性好, 血运丰富, 愈合能力强, 抗感染性好, 能够提供食管再上皮化的良好环境.

甲壳素^[10]是存在于自然界中的唯一一种带阳离子能被生物降解的分布极其广泛的高分子材料, 壳聚糖可用于生物工程支架等的研究^[11-13]. 我们将其制成管状, 有一定的弹性和韧性, 遇水略变软, 具有抑制炎症反应的作用, 防止黏连的发生, 可以防止破损处瘢痕形成. 在体内经过体液和体温的环境作用下, 壳聚糖管被逐渐降解吸收, 并且无毒无刺激, 无排斥反应. 以前我们研究发现, 再上皮化后的食管缺损处有一定程度的狭窄, 但没有发生严重狭窄导致进食障

碍, 在给狗做食管修补手术的实验中^[14], 应用金属管和硅胶管作为内衬支架, 存在一定的异物反应, 表现为慢性炎症的过程, 我们采用壳聚糖制成管状支架, 利用壳聚糖自身的组织相容性好、可降解性的特点, 既能够有效地预防组织瘢痕收缩狭窄形成, 在度过狭窄期后, 可在体内自行降解, 产物无毒、无害、无副作用, 是一种理想的生物可降解材料, 值得我们深入研究.

本实验研究肺组织瓣内衬壳聚糖管修补食管壁部分缺损, 是一种创新研究, 他的应用前景是可以直接在胸腔内原位替代食管, 不需开腹和重新吻合血管, 手术操作相对简便, 创伤小. 进一步地研究包括平滑肌及神经丛、腺体的再生^[15], 蠕动功能的恢复, 长段食管的重建等, 如能成功应用于临床, 则可为既往曾行胃或肠道手术且无法用空腔脏器替代食管的患者提供了新的手术方法.

参考文献

- 1 Chen HC, Kuo YR, Hwang TL, Chen HH, Chang CH, Tang YB. Microvascular prefabricated free skin flaps for esophageal reconstruction in difficult patients. *Ann Thorac Surg* 1999; 67: 911-916
- 2 王如文, 蒋耀光, 范士志, 向杰. 颈阔肌皮瓣在颈段食管外科中的应用. *中华胸心血管外科杂志* 1995; 11: 1-3
- 3 赵云平, 王如文, 蒋耀光, 龚太乾, 周景海, 谭群友. 颈阔肌皮瓣修复或重建颈部食管缺损术后并发症探讨. *中国胸心血管外科临床杂志* 2001; 8: 169-171
- 4 张旭, 王笑茹, 李汝泓, 胡建功, 侯继申, 周士杰. 应用骨膜肋间肌瓣行食管成形术. *中华胸心血管外科杂志*

- 2000; 16: 163-164
- 5 廖兵. 儿童食管良性狭窄的临床分析. 中国胸心血管外科临床杂志 2008; 15: 71-72
- 6 石文君, 张苏宁, 杨伟, 赵俊刚, 赵洋, 刘军. 用肺组织瓣重建胸段气管的动物实验与临床应用. 中华外科杂志 2003; 41: 218-221
- 7 智发朝, 张兰军, 彭秀凡, 吴湘惠, 潘德寿, 万田莫, 刘思德, 张振书, 周殿元. 用生物型人工食管进行食管重建的实验研究. 中华消化杂志 2003; 23: 137-141
- 8 张兰军, 智发朝, 戎铁华, 彭秀凡, 温东东, 颜世强. 生物型人工食管的实验研究. 中华胃肠外科杂志 2001; 9: 157-160
- 9 赵俊刚, 石文君, 张苏宁, 韩云, 赵洋, 刘军. 自体肺组织瓣修补食管壁部分缺损的实验研究. 中华胸心血管外科杂志 2003; 19: 166-168
- 10 Berglund JD, Mohseni MM, Nerem RM, Sambanis A. A biological hybrid model for collagen-based tissue engineered vascular constructs. *Biomaterials* 2003; 24: 1241-1254
- 11 敖强, 王爱军, 孙志刚, 张秀芳. 一种壳聚糖神经组织工程支架的制备及表征. 中国组织工程研究与临床康复 2008; 12: 47-50
- 12 Holland TA, Tabata Y, Mikos AG. Dual growth factor delivery from degradable oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogel scaffolds for cartilage tissue engineering. *J Control Release* 2005; 101: 111-125
- 13 Zhang WF, Chen XG, Li PW, He QZ, Zhou HY. Preparation and characterization of theophylline loaded chitosan/beta-cyclodextrin microspheres. *J Mater Sci Mater Med* 2008; 19: 305-310
- 14 刘军, 石文君, 张苏宁, 韩云, 赵俊刚. 犬自体肺组织瓣替代胸段食管部分缺损的实验研究. 中国修复重建外科杂志 2006; 20: 507-510
- 15 秦雄, 徐志飞, 赵学维, 史宏灿, 周建华, 孙康, 高向阳. 可降解复合人工食管重建犬颈段食管的实验研究. 中国修复重建外科杂志 2003; 17: 374-377

编辑 史景红 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

世界华人消化杂志英文摘要要求

本刊讯 本刊英文摘要包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致. 具体格式要求如下: (1)题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致; (2)作者 署名一般不超过8人. 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”; (3)单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China; (4)基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801; (5)通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com; (6)收稿及修回日期 格式如: Received: Revised: . (常务副总编辑: 张海宁 2009-01-28)

携带TRAIL基因的新型溶瘤病毒体外诱导肝癌细胞凋亡

刘永靖, 陈飞虎, 苏长青, 王星华, 钱炎珍, 钱其军

刘永靖, 中国人民解放军第105医院胸心外科 安徽省合肥市 230031

陈飞虎, 安徽医科大学药学院 安徽省合肥市 230032

苏长青, 王星华, 钱炎珍, 钱其军, 中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院病毒-基因实验室 上海市 200438

刘永靖, 主治医师, 主要从事肿瘤的生物治疗研究。

南京军区重大专项课题资助项目, No. 07Z006

国家自然科学基金国际合作重大资助项目, No. 30120160823

作者贡献分布: 该实验课题由刘永靖, 钱其军及陈飞虎酝酿设计; 实验过程由刘永靖与钱炎珍操作完成; 实验研究所用试剂及仪器由陈飞虎与钱其军提供; 数据分析由刘永靖完成; 论文写作由刘永靖完成, 苏长青及王星华提出修改和指导建议。

通讯作者: 刘永靖, 230031, 安徽省合肥市长江西路424号, 中国人民解放军第105医院胸心外科. yongjingliu@163.com

电话: 0551-2163212

收稿日期: 2008-11-03 修回日期: 2008-12-12

接受日期: 2008-12-15 在线出版日期: 2009-01-28

A novel oncolytic adenovirus carrying human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand gene induces hepatocellular carcinoma cell line apoptosis *in vitro*

Yong-Jing Liu, Fei-Hu Chen, Chang-Qing Su, Xing-Hua Wang, Yan-Zhen Qian, Qi-Jun Qian

Yong-Jing Liu, Department of Cardiothoracic Surgery, the 105th Hospital of Chinese PLA, Hefei 230031, Anhui Province, China

Fei-Hu Chen, College of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China

Chang-Qing Su, Xing-Hua Wang, Yan-Zhen Qian, Qi-Jun Qian, Virus & Genetherapy Lab., Eastern Hepatobiliary Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200438, China

Supported by: the Special Foundation for Key Program of Nanjing Military District, No. 07Z006; and the International Cooperation Important Project of National Natural Sciences Foundation of China, No. 30120160823

Correspondence to: Yong-Jing Liu, Department of Cardiothoracic Surgery, the 105th Hospital of Chinese PLA, Hefei 230031, Anhui Province, China. yongjingliu@163.com

Received: 2008-11-03 Revised: 2008-12-12

Accepted: 2008-12-15 Published online: 2009-01-28

Abstract

AIM: To evaluate the efficiency of transgene expression and inducing apoptosis on tumor-specific replication-competent adenovirus carrying human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand gene, a novel gene-viral therapeutic system CNHK500-hTRAIL, in

hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines *in vitro*.

METHODS: HCC cell lines HepG2, Hep3B and normal hepatocyte lines WRL-68 were transfected with CNHK500-hTRAIL. Virus replication assay was performed to evaluate the selective replication ability of CNHK500-hTRAIL. ELISA assay was used to detect the transgene expression of TRAIL. The cytotoxicity in cultured HCC and normal cells was evaluated by Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT). Flow cytometry (FCM) was used to detect the early apoptotic induced by CNHK500-hTRAIL.

RESULTS: CNHK500-hTRAIL was selectively proliferated in the telomerase-positive HCC cell lines HepG2 and Hep3B. 72 hours after infection with CNHK500-hTRAIL, the expression of TRAIL in the supernatant of cultured cell lines HepG2 and Hep3B were 167.4 and 173.22 ng/L, respectively; CNHK500-hTRAIL killed more HepG2 and Hep3B cells significantly with MOI = 0.1 and induced obvious apoptosis but not in WRL-68 even with MOI = 50. The ability of transgene expression and inducing apoptosis were significantly stronger than that of replication-competent adenovirus CNHK500 or replication-defective Ad-hTRAIL.

CONCLUSION: Replication-competent adenovirus carrying human TRAIL gene is more effective than simplex oncolytic adenovirus or replication-defective adenovirus carrying human TRAIL gene in both cytotoxicity and efficiency of gene transfer in HCC, and holds great promise in the area of HCC therapy.

Key Words: Gene-therapy; Adenoviral vector; TRAIL; Apoptosis; Hepatocellular carcinoma; Methyl thiazolyl tetrazolium; Flow cytometry

Liu YJ, Chen FH, Su CQ, Wang XH, Qian YZ, Qian QJ. A novel oncolytic adenovirus carrying human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand gene induces hepatocellular carcinoma cell line apoptosis *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(3): 241-246

摘要

目的: 评价携带TRAIL基因的肿瘤特异性增殖

■背景资料

原发性肝癌已成为我国恶性肿瘤死亡率的第2位。虽然在不断发展的综合治疗模式下诊治水平取得了很大进步,但居高不下的发病率、复发率和死亡率仍然非常棘手。因而寻求新的肝癌有效辅助治疗手段十分必要。

■同行评议者

禄韶英, 副主任医师, 西安交通大学医学院第一附属医院普外科; 杨林, 副研究员, 中山大学附属第三医院感染病科

■ 研发前沿

肿瘤的基因治疗是近年来的研究热点之一。这种新的生物治疗方法具有完全不同的作用机制,与现有的肿瘤治疗方法无交叉耐受且有协同作用,因而受到了越来越多的关注。

型腺病毒CNHK500-hTRAIL在人肝癌细胞株中介导TRAIL基因表达及对肝癌细胞的凋亡诱导作用。

方法: CNHK500-hTRAIL感染人肝癌细胞株HepG2、Hep3B以及人正常肝细胞株WRL-68,通过增殖实验观察病毒的选择性增殖能力,并进行酶联免疫吸附试验(ELISA)检测TRAIL蛋白的表达量,四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法检测其杀伤肝癌细胞的功效,流式细胞术(FCM)检测其对细胞早期凋亡的影响。

结果: CNHK500-hTRAIL能选择性地在地HepG2、Hep3B细胞内高效增殖;感染72 h后HepG2、Hep3B细胞培养上清中TRAIL的表达量分别为167.4、173.22 ng/L;在MOI = 0.1时,CNHK500-hTRAIL即可明显杀伤HepG2、Hep3B细胞,并选择性地诱导细胞早期凋亡,均显著高于空病毒CNHK500及非增殖型腺病毒Ad-hTRAIL;而对人正常肝细胞株WRL-68则无明显杀伤作用。

结论: 携带TRAIL基因的肿瘤特异性增殖型腺病毒载体对肿瘤细胞的杀伤能力和目的基因的表达,明显优于单纯的病毒载体及传统的非增殖型腺病毒载体,应用前景广阔。

关键词: 基因治疗; 腺病毒; 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体; 凋亡; 肝细胞癌; 四甲基偶氮唑蓝; 流式细胞术

刘永靖, 陈飞虎, 苏长青, 王星华, 钱炎珍, 钱其军. 携带TRAIL基因的新型溶瘤病毒体外诱导肝癌细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2009; 17(3): 241-246

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/241.asp>

0 引言

以往研究表明,肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)具有明显的抗肿瘤活性,但由于系统给药可能存在的肝细胞毒性,限制了其进一步应用^[1]. 如果能使TRAIL仅在肿瘤局部形成高浓度,则是提高疗效、降低毒性的关键所在. 为此,我们利用增殖型腺病毒载体可特异性地靶向肿瘤细胞内增殖复制的特点,以携带人TRAIL基因的肿瘤特异性增殖型腺病毒治疗肝癌,并以携带人TRAIL基因的传统非增殖型腺病毒为对照,观察并比较对肝癌细胞的杀伤能力。

1 材料和方法

1.1 材料 携带人肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体可溶性胞外区基因的增殖型腺病毒

CNHK500-hTRAIL、空病毒载体CNHK500以及增殖缺陷型腺病毒载体Ad-hTRAIL由第二军医大学东方肝胆外科医院病毒-基因治疗实验室构建并保存^[2]. 胎牛血清(FBS)、DMEM、MEM培养液均购于Gibco BRL公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞株及培养: 人肝癌细胞株HepG2、Hep3B, 正常人肝细胞株WRL-68均购自ATCC(American Type Culture Collection, USA). HepG2、Hep3B用含100 mL/L FBS的DMEM培养液, WRL-68用含100 mL/L FBS的MEM培养液. 所有细胞37℃、50 mL/L CO₂条件下培养, 2.5 g/L胰酶消化、传代。

1.2.2 病毒增殖实验: 取对数生长期的HepG2、Hep3B、WRL-68细胞铺6孔板, 3×10^5 /孔, 置于37℃ 50 mL/L CO₂孵箱内24 h(正常人肝细胞株WRL-68则需培养48 h), 待细胞贴壁后, 换用无血清培养液1 mL, 按MOI = 5分别加入病毒CNHK500-hTRAIL和wtAd5, 2 h后弃去含病毒的培养液, 换用含50 mL/L血清的培养液3 mL, 分别在0、6、12、48、96 h用细胞刮子将细胞移至5 mL离心管中, 置于-80℃冰箱中, 反复冻融3次, 使病毒自细胞中释放, 用TCID₅₀法测定病毒滴度. 以0 h病毒滴度为参照, 计算病毒的增殖倍数。

1.2.3 TRAIL基因表达的检测: 以上述相同方法配制成的单个HepG2、Hep3B、WRL-68细胞悬液加入6孔培养板, 3×10^5 个细胞/孔, 常规培养24 h后按MOI = 5加入CNHK500-hTRAIL病毒液100 μL, 2 h后换20 mL/L血清培养液2 mL, 再孵育24h后收集细胞, 均计数为 5×10^9 个/L, 提取细胞总RNA, 以TRAIL可溶性胞外区(114-281AA)cDNA引物(上海基康公司合成), 序列见表1. 以相同体系进行RT-PCR(反应体积25 μL, 1 μL抽提的总RNA为模板), 反应条件为50℃ 30 min, 94℃ 2 min, [94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 90 s]×35个循环, 最后一个循环72℃延伸10 min, 产物全部进行琼脂糖凝胶电泳. 紫外灯下观察结果并照相。

1.2.4 MTT检测细胞活力: 按不同MOI值进行MTT实验. 以配制成的单个HepG2、Hep3B、WRL-68细胞悬液, 按100 μL/孔加入96孔培养板, 置于37℃ 50 mL/L CO₂孵箱内24 h. 无血清培养液稀释病毒, 按MOI = 0、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10, 加入CNHK500-hTRAIL或CNHK500病毒液100 μL, 按MOI = 0、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50、100

表 1 TRAIL可溶性胞外区mRNA引物序列及扩增产物片段大小

引物	序列	片段(bp)
P1	AGCCCTCTGGCCCAGGCAGTGAGAGAAAGAGGTCCTCA	537
P2	TGCTCTAGACTATTAGCCAACTAAAAAGGCCCCGA	

加入Ad-hTRAIL病毒液100 μ L, 对应于每个MOI值设8个复孔, 37 $^{\circ}$ C 50 mL/L CO₂孵箱培养7 d. 进行MTT检测, 测定波长570 nm, 校正波长655 nm(具体方法见Roche公司MTT检测试剂盒操作说明). 相同条件下重复实验3次, 结果取均数.

1.2.5 ELISA检测TRAIL蛋白表达量: 以配制成的单个细胞悬液加入6孔培养板, 常规孵育24 h后换无血清培养液1 mL, CNHK500-hTRAIL按MOI = 1、Ad-hTRAIL按MOI = 20加入用无血清培养液稀释的病毒液各100 μ L, 空白对照组加Ad-Buffer液100 μ L, 感染2 h后换2%血清培养液2 mL, 置于孵箱72 h后收集培养液上清, 行ELISA检测. 测定波长450 nm, 校正波长为540 nm.

1.2.6 FCM检测细胞早期凋亡: 常规铺6孔板, 肿瘤细胞 5×10^5 /孔, 正常细胞 1×10^6 /孔, 3 mL/孔. 孵育24 h后换用无血清培养液1 mL/孔, CNHK500-hTRAIL及CNHK500按MOI = 1, Ad-hTRAIL按MOI = 10分别加入病毒100 μ L/孔, 十字摇匀; 2 h后换用50 mL/L血清培养液3 mL/孔, 再培养24 h; 收集细胞, 冷PBS洗细胞2次, $1 \times$ Annexin V结合缓冲液重悬细胞至 1×10^9 /L; 取100 μ L重悬液(1×10^5)至5 mL培养管; 加10 μ L(20 mg/L)Annexin V-FITC, 室温避光30 min, 轻轻混匀, 再加入PI(50 mg/L)5 μ L, 室温避光孵育5 min; 每管加400 μ L $1 \times$ Annexin V结合缓冲液, 1h内流式细胞仪检测. 同时以不加Annexin V-FITC及PI的一管作为阴性对照. 避光, 1 h内检测.

统计学处理 采用SPSS ver.11.5软件进行统计分析, 实验数据以mean \pm SD表示, 两样本均数差别采用 t 检验. $P < 0.01$ 认为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 TRAIL基因的表达 经CNHK500-hTRAIL处理的HepG2、Hep3B细胞株, 可以检测到TRAIL可溶性胞外区mRNA的表达, 并且明显多于WRL-68细胞中的表达量(图1).

2.2 增殖实验 在HepG2、Hep3B人肝癌细胞株中进行病毒增殖实验, 结果显示, CNHK500-hTRAIL与wtAd5的增殖能力相近, 48-96 h达到较高水平, 48 h时CNHK500-hTRAIL在

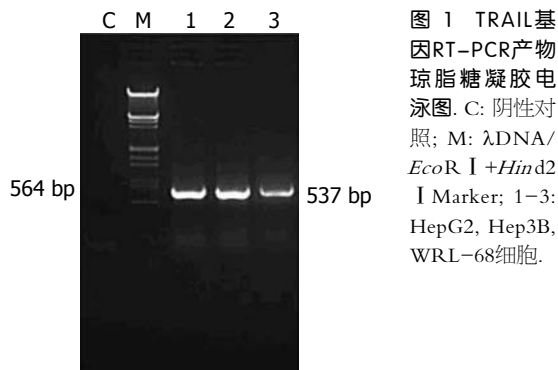


图 1 TRAIL基因RT-PCR产物琼脂糖凝胶电泳图. C: 阴性对照; M: λ DNA/*Eco*R I + *Hind*II Marker; 1-3: HepG2, Hep3B, WRL-68细胞.

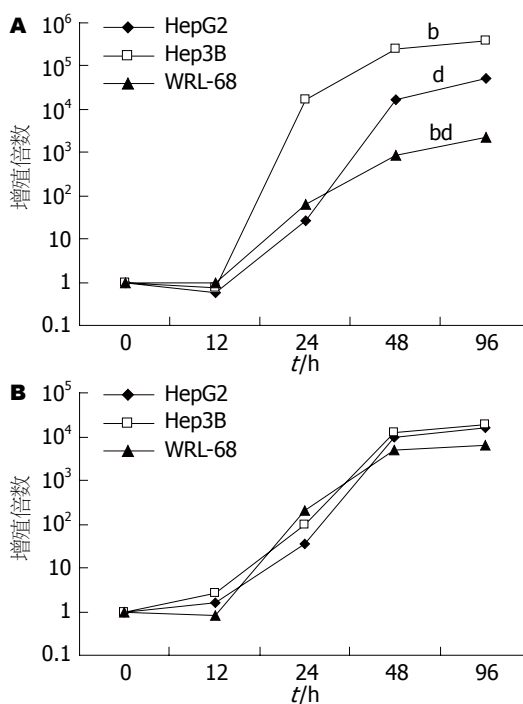


图 2 CNHK500-hTRAIL与wtAd5在不同细胞中的增殖曲线. A: CNHK500-hTRAIL增殖实验; B: wtAd5病毒增殖实验. ^b $P < 0.01$, ^d $P < 0.01$ vs WRL-68组.

HepG2、Hep3B细胞中病毒滴度比0 h时高16 120及251 156.5倍, 在正常细胞株WRL-68中, CNHK500-hTRAIL病毒48 h增殖倍数仅为831.64倍, 而野生型腺病毒增殖可达5063.29倍(图2). 说明CNHK500-hTRAIL可以选择性地在肿瘤细胞内增殖, 而在正常细胞WRL-68中增殖能力较野生型腺病毒明显降低, 仅为前者的10%左右. CNHK500-hTRAIL在HepG2、Hep3B中比在WRL-68中的增殖能力高出300倍之多.

■ 相关报道

缺乏肿瘤特异性是肿瘤基因治疗面临的一个主要问题. 近年来的研究重点也在于寻求提高靶向性, 但将病毒与治疗基因二者联合的“病毒-基因治疗”鲜见报道.

■创新盘点

本研究是建立在肿瘤特异增殖病毒及肿瘤基因治疗基础上的新方案。该病毒能选择性地使肿瘤细胞内复制增殖, 特异性地杀伤肿瘤细胞; 携带的TRAIL基因通过病毒的增殖复制, 在肿瘤细胞内特异且高效表达, 二者协同作用, 提高抗肿瘤疗效、降低潜在的毒性。

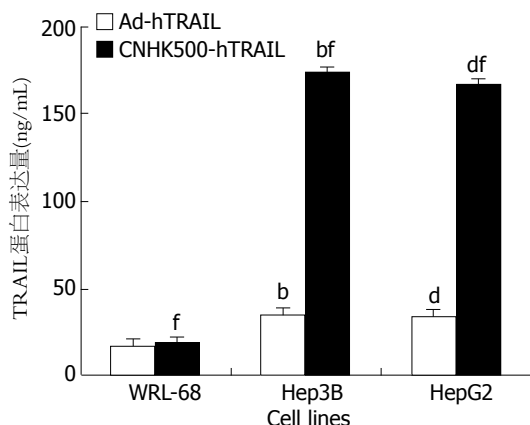


图3 ELISA法检测细胞培养上清中TRAIL蛋白的表达量。^b $P < 0.01$, ^d $P < 0.01$ vs Ad-hTRAIL组; ^f $P < 0.01$ vs WRL-68组。

2.3 TRAIL蛋白的表达量 CNHK500-hTRAIL感染HepG2、Hep3B、WRL-68细胞, 72 h后收集细胞培养液上清, 间接法酶联免疫吸附试验(ELISA)检测, CNHK500-hTRAIL感染HepG2、Hep3B细胞培养液上清TRAIL的表达量分别为 167.4 ± 2.13 、 173.22 ± 3.26 ng/L, 感染Ad-hTRAIL病毒HepG2、Hep3B细胞上清中TRAIL蛋白的表达量仅为 32.89 ± 2.73 、 34.02 ± 2.42 ng/L; 而CNHK500-hTRAIL及Ad-hTRAIL感染WRL-68细胞后TRAIL的表达量分别为 18.43 ± 3.24 、 17.08 ± 4.41 ng/L(图3)。

2.4 CNHK500-hTRAIL对细胞活力的影响 四甲基偶氮唑蓝比色实验(MTT)发现, 腺病毒CNHK500-hTRAIL可以在较低MOI值时杀伤HepG2、Hep3B细胞, 达到半数杀伤时约为MOI = 0.1, 对正常细胞WRL-68, 当MOI = 50时, 细胞仍有约50%存活, 说明CNHK500-hTRAIL对HepG2、Hep3B细胞的杀伤效应明显高于对正常细胞的杀伤效应($P < 0.01$), 而且对Hep3B相对更加敏感; 而在MOI = 5时, 感染CNHK500、Ad-hTRAIL的各细胞也都有50%存活, 说明CNHK500-hTRAIL对HepG2、Hep3B细胞的杀伤效应明显高于CNHK500、Ad-hTRAIL($P < 0.01$, 图4)。

2.5 CNHK500-hTRAIL对细胞早期凋亡的影响 Annexin V-FITC法检测细胞的早期凋亡非常敏感, 在流式细胞散点图上凋亡细胞聚集在B₄区。B₄区细胞占总细胞的比例即是细胞发生凋亡的比例。CNHK500-hTRAIL感染各细胞后, 其表达的TRAIL蛋白均可诱导细胞凋亡, CNHK500-hTRAIL诱导HepG2、Hep3B细胞凋亡的细胞数百分比分别为23.43% ±

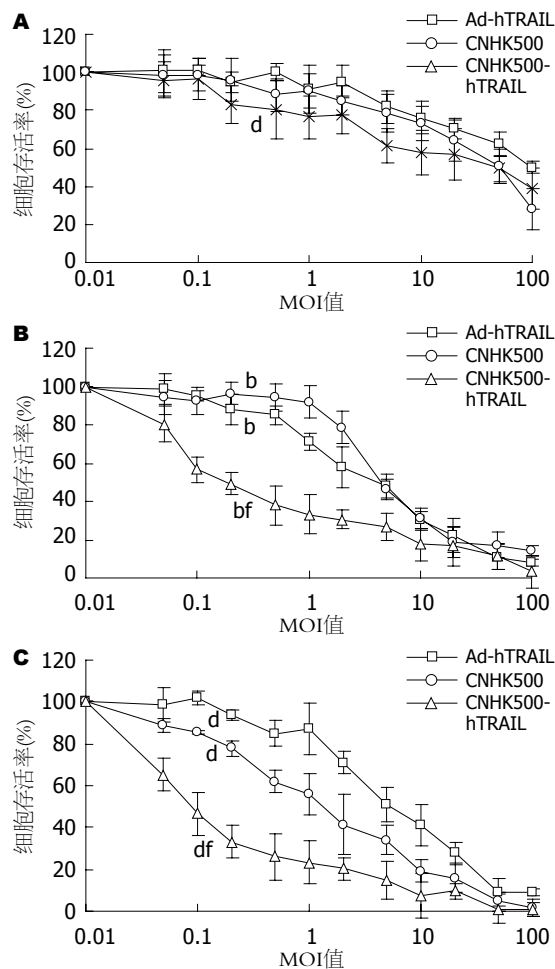


图4 重组病毒对细胞活力的影响。A: MTT WRL-68细胞7 d; B: MTT HepG2细胞7 d; C: MTT Hep3B细胞7 d。^b $P < 0.01$, ^d $P < 0.01$ vs CNHK500或Ad-hTRAIL组; ^f $P < 0.01$ vs WRL-68组。

2.43%、 $32.53 \pm 2.32\%$, 明显高于对照病毒Ad-hTRAIL($11.87 \pm 2.51\%$ 、 $9.77 \pm 2.61\%$)及对照细胞WRL-68($7.31 \pm 1.17\%$)(图5)。

3 讨论

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国常见的一种恶性肿瘤。由于肝癌术后易复发、转移率高等特点, 导致手术疗效难以令人满意^[3], 而现有的非手术治疗措施疗效也不确切, 因而寻求新的肝癌有效辅助治疗手段十分必要。随着现代分子生物学的深入发展, 肿瘤的基因治疗成为极有发展前景的方法, 近年来受到了越来越多的关注^[4]。

TRAIL为一种II型跨膜蛋白, 是TNF超家族的第10个成员, 可通过特异性结合死亡结构域激发和传导凋亡信号, 激活Caspase蛋白酶级联反应, 诱导细胞凋亡^[5]。TRAIL诱导细胞凋亡具有肿瘤或转化细胞特异性, 而且不依赖功能

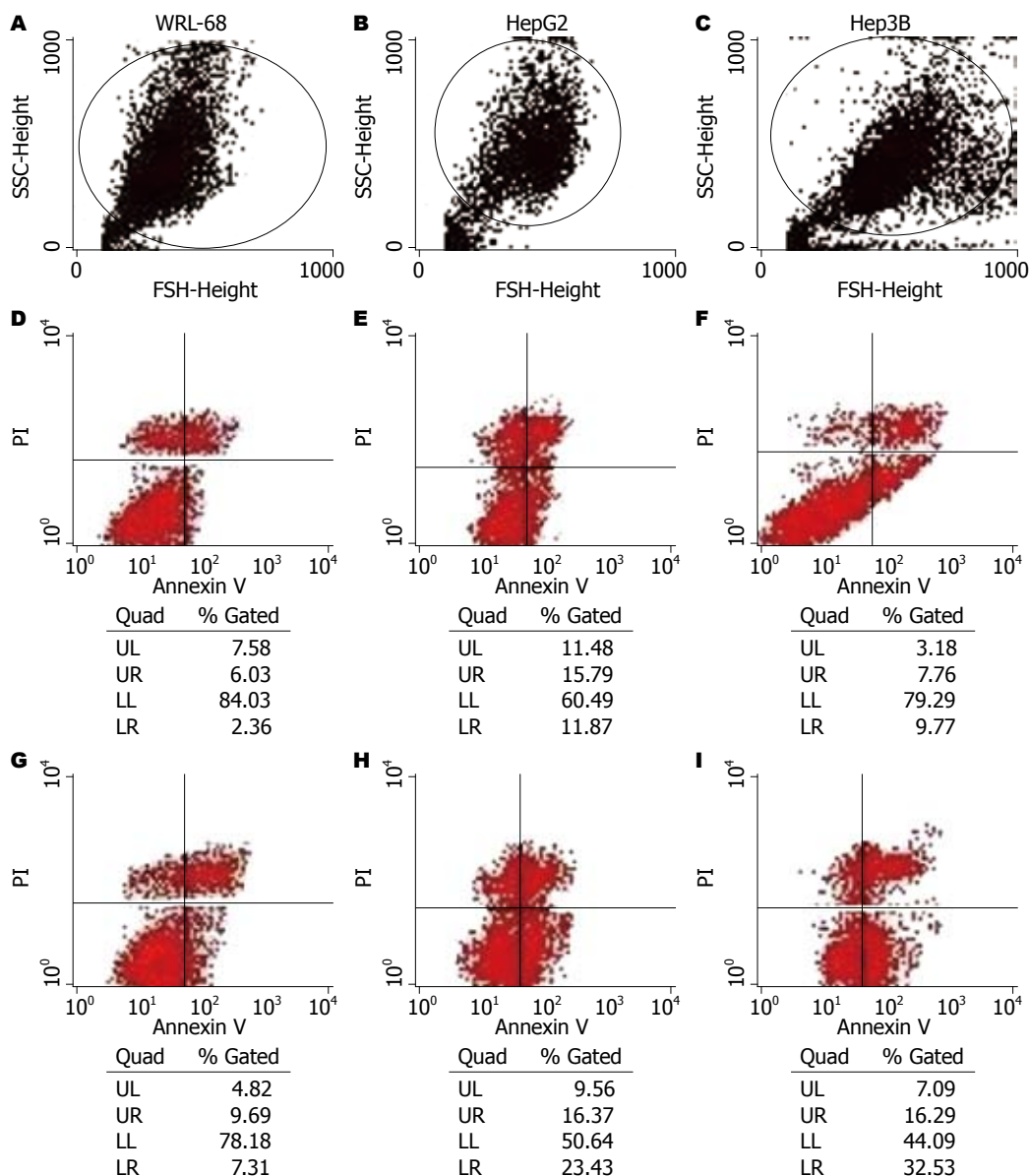


图 5 Annexin V法检测病毒对细胞的凋亡诱导作用. A-C: 空白对照组; D-F: Ad-hTRAIL组; G-I: CNHK500-hTRAIL组.

性P53的存在, 并能够通过旁观者效应杀伤肿瘤细胞, 在肿瘤的免疫监督和抑制转移中也起着重要作用^[6], 肝、肺等多种肿瘤细胞株75%以上都对TRAIL敏感. TRAIL在肿瘤基因治疗领域受到了越来越多的重视^[7-8].

传统肿瘤基因治疗面临的主要问题是缺乏肿瘤靶向性以及目的基因表达量低^[9]. 而肿瘤特异性增殖病毒能选择性地只在肿瘤细胞内复制、增殖, 特异性地杀伤肿瘤细胞; 携带的抗肿瘤基因通过病毒特异性的增殖、复制, 从而在肿瘤细胞内高效表达, 通过两者协同作用, 双重杀伤肿瘤细胞, 进一步提高抗肿瘤疗效、降低潜在的对正常细胞的毒性^[10].

肿瘤特异性增殖型腺病毒CNHK500-

hTRAIL, 其E1A、E1B基因分别由端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)和缺氧反应元件(hypoxia response element, HRE)双重调控. 理论上其只能在端粒酶阳性的实体瘤的微缺氧环境下增殖^[11]. 研究发现, CNHK500-hTRAIL选择性地在端粒酶阳性的肝癌细胞株HepG2、Hep3B中的增殖能力显著, 比在正常肝细胞WRL-68中的增殖能力高出300倍之多; 感染效率以及介导目的基因TRAIL表达的效率均十分理想, 在感染后72 h的HepG2、Hep3B培养上清中, 用ELISA法可以检测到TRAIL蛋白的表达量分别为167.4、173.22 ng/L, 明显高于对照组Ad-hTRAIL. MTT检测发现, CNHK500-hTRAIL在极低MOI值时即可造成对HepG2、Hep3B细胞株的

■同行评价

本文研究病毒载体介导转移TRAIL基因的表达及对肝癌细胞的凋亡的诱导作用,有一定学术价值及潜在应用价值。

大量杀伤,明显强于CNHK500和Ad-hTRAIL,而对人正常肝细胞WRL-68却无明显的杀伤作用。其主要原因在于CNHK500造成的杀伤仅为单纯病毒溶瘤,非增殖型腺病毒Ad-hTRAIL的TRAIL表达量相对较低,而CNHK500-hTRAIL能且仅能在肿瘤细胞HepG2、Hep3B中大量增殖复制并介导跨膜蛋白TRAIL的高效表达,通过病毒与TRAIL协同作用,达到双重杀伤。流式细胞术检测也发现,CNHK500-hTRAIL感染各细胞后,其表达的TRAIL蛋白可显著诱导肝癌细胞凋亡,但对正常细胞的凋亡诱导作用非常弱,这也进一步提示了CNHK500-hTRAIL基因治疗更好的疗效及安全性。

总之,携带TRAIL基因的肿瘤特异性增殖型腺病毒载体对肿瘤细胞的杀伤能力和目的基因的表达,明显优于单纯的病毒载体及传统的非增殖型腺病毒载体,却对正常细胞无明显毒性,在肝细胞癌的治疗方面有着广阔的前景。当然,其在体内的效果还有待于动物实验进一步验证。

4 参考文献

- 1 Kruyt FA. TRAIL and cancer therapy. *Cancer Lett* 2008; 263: 14-25
- 2 Qian QJ, Zhang Q, Wu MC, Peng LH, LI YM. A novel replication-competent adenovirus CNHK500 in the treatment of hepatocellular carcinoma in vitro. *Chin Ger J Clin Oncol* 2004; 4: 70-73
- 3 El-Serag HB, Marrero JA, Rudolph L, Reddy KR. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2008; 134: 1752-1763
- 4 Avila MA, Berasain C, Sangro B, Prieto J. New therapies for hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006; 25: 3866-3884
- 5 Finnberg N, El-Deiry WS. TRAIL death receptors as tumor suppressors and drug targets. *Cell Cycle* 2008; 7: 1525-1528
- 6 Sedger LM, Glaccum MB, Schuh JC, Kanaly ST, Williamson E, Kayagaki N, Yun T, Smolak P, Le T, Goodwin R, Gliniak B. Characterization of the in vivo function of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL/Apo2L, using TRAIL/Apo2L gene-deficient mice. *Eur J Immunol* 2002; 32: 2246-2254
- 7 Jacob D, Schumacher G, Bahra M, Davis J, Zhu HB, Zhang LD, Teraishi F, Neuhaus P, Fang BL. Fiber-modified adenoviral vector expressing the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand gene from the human telomerase reverse transcriptase promoter induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2552-2556
- 8 Dong F, Wang L, Davis JJ, Hu W, Zhang L, Guo W, Teraishi F, Ji L, Fang B. Eliminating established tumor in nu/nu nude mice by a tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand-armed oncolytic adenovirus. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5224-5230
- 9 Liu TC, Kirn D. Gene therapy progress and prospects cancer: oncolytic viruses. *Gene Ther* 2008; 15: 877-884
- 10 Liu XY, Gu JF. Targeting gene-virotherapy of cancer. *Cell Res* 2006; 16: 740
- 11 Zhang Q, Chen G, Peng L, Wang X, Yang Y, Liu C, Shi W, Su C, Wu H, Liu X, Wu M, Qian Q. Increased safety with preserved antitumoral efficacy on hepatocellular carcinoma with dual-regulated oncolytic adenovirus. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6523-6531

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

世界华人消化杂志标点符号用法

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求,本刊论文中的句号都采用黑圆点;数字间的起止号采用“-”字线,并列的汉语词间用顿号分开,而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开,参考文献中作者间一律用逗号分开;表示终了的标点符号,如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半,通常不用于一行之首;而表示开头的标点符号,如括号及书名号的前一半,不宜用于一行之末。标点符号通常占一格,如顿号、逗号、分号、句号等;破折号应占两格;英文连字符只占一个英文字符的宽度,不宜过长,如5-FU。外文字符下划一横线表示用斜体,两横线表示用小写,三横线表示用大写,波纹线表示用黑体。(常务副总编辑:张海宁 2009-01-28)

ABCG2在肝细胞性肝癌组织和肝癌细胞株中的表达及意义

奚忠, 江春平, 丁义涛

奚忠, 江春平, 丁义涛, 南京医科大学附属鼓楼临床医学院
肝胆外科 江苏省南京市 210008

奚忠, 2006级南京医科大学硕士, 主要从事肿瘤干细胞和肝癌
的临床和基础研究.

卫生部科研课题基金资助项目, No. WKJ2005-2-032

江苏南京市卫生局科技发展项目, No. ZKX0410

作者贡献分布: 此课题由江春平与丁义涛设计; 研究过程由奚忠
操作完成; 研究用新试剂及分析工具由奚忠提供; 数据分析由
奚忠与江春平完成; 本论文写作由奚忠完成.

通讯作者: 丁义涛, 210008, 江苏省南京市, 南京大学医学院附
属鼓楼医院肝胆外科. yitaoding@hotmail.com

电话: 025-83304616 传真: 025-83317016

收稿日期: 2008-11-25 修回日期: 2008-12-24

接受日期: 2008-12-29 在线出版日期: 2009-01-28

Expression of stem cell marker ABCG2 and its significance in hepatocellular carcinoma tissue and cell lines

Zhong Xi, Chun-Ping Jiang, Yi-Tao Ding

Zhong Xi, Chun-Ping Jiang, Yi-Tao Ding, Department of
Hepatobiliary Surgery, Affiliated Drum Tower Hospital,
Nanjing Medical University, Nanjing 210008, Jiangsu Prov-
ince, China

Supported by: the Major Programs of Ministry of Health,
No. WKJ2005-2-032; and the Science Foundation of Nan-
jing City, No. ZKX0410.

Correspondence to: Yi-Tao Ding, Department of Hepato-
biliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nan-
jing University Medical School, Nanjing 210008, Jiangsu
Province, China. yitaoding@hotmail.com

Received: 2008-11-25 Revised: 2008-12-24

Accepted: 2008-12-29 Published online: 2009-01-28

Abstract

AIM: To investigate ABCG2 expression and its
significance in hepatocellular carcinoma (HCC)
tissue and HCC cell lines.

METHODS: The expression of ABCG2 and
the distribution of ABCG2-positive cells of
30 HCC cases and 8 cases of paraneoplastic
liver cirrhosis were examined using immuno-
histochemistry SP methods. Dual-fluorescent
immunostaining was used to detect ABCG2
positive cells in two HCC cell lines, and flow
cytometry was used to figure out the percent-
ages of ABCG2-positive cells in the two HCC
cell lines.

RESULTS: The present study confirmed the
predominant localization of ABCG2 transporter
in plasma membrane. Some of ABCG2-positive
tumors showed mixed membranous and cyto-
plasmic staining. ABCG2 expression was detect-
ed in 63.33% (19/30) of HCC and 25% (2/8) of
paraneoplastic liver cirrhosis. ABCG2 expression
was observed both in the two HCC cell lines,
ABCG2 expression in HepG2 was only observed
in the cytoplasm, whereas ABCG2 expression
was observed on the cell membrane in addi-
tion to the cytoplasm in PLC/PRF/5; ABCG2-
positive cells can be detected by flow cytometry
in PLC/PRF/5 ($P < 0.05$), but not in HepG2.

CONCLUSION: The expression of ABCG2 found
in HCC tissue and HCC cell lines may be closely
related to oncogenesis and progress of HCC,
and the ABCG2 may be regarded as a potential
maker for liver cancer stem cells.

Key Words: ATP-binding cassette superfamily G
member2; Liver cancer stem cell; Immunohisto-
chemistry; Immunocytochemistry; Flow cytometry

Xi Z, Jiang CP, Ding YT. Expression of stem cell marker
ABCG2 and its significance in hepatocellular carcinoma
tissue and cell lines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009;
17(3): 247-252

摘要

目的: 探讨干细胞标志物ABCG2在肝细胞性
肝癌组织和肝癌细胞株中表达的意义.

方法: 应用免疫组化SP方法检测ABCG2在30
例肝细胞性肝癌组织和8例癌旁肝硬化组织
中的表达、分布, 并采用细胞免疫荧光技术
检测ABCG2在两种肝癌细胞株HepG2、PLC/
PRF/5中的表达, 采用流式细胞技术测试出两
种细胞株中ABCG2阳性细胞的比例.

结果: 免疫组化中, ABCG2阳性染色定位于癌
细胞胞膜, 部分病例胞质也有分布. 免疫组化
显示ABCG2在肝细胞性肝癌组织和癌旁肝硬
化组织中的表达阳性率分别为63.33%(19/30)
和25%(2/8). ABCG2蛋白在HepG2、PLC/

■背景资料

关于肿瘤的起源
问题一直是研究
难题. 肿瘤干细胞
理论为肿瘤的起
源提供了全新的
理念, 认为肿瘤起
源于肿瘤组织中
少数的具有干细
胞特征的肿瘤干
细胞.

■同行评议者

陈光, 教授, 吉林
大学第一医院消
化器官外科

■研发前沿

肿瘤干细胞理论相继在白血病、脑肿瘤、乳腺癌等一些疾病中被证实,相关肿瘤干细胞也得到了分离和鉴定,相关肿瘤标志物也被确定,而关于肝癌干细胞的分离和鉴定报道很少,相关肿瘤标志物也未找到。

PRF/5这两个肝癌细胞株中均有表达, HepG2中, ABCG2阳性染色定位于细胞胞质中,而在PLC/PRF/5中, ABCG2阳性染色定位于细胞胞质和细胞膜上。PLC/PRF/5细胞株中,通过流式细胞仪能检测出表达ABCG2的细胞($P<0.05$),而在HepG2细胞株中,通过流式细胞仪不能检测出表达ABCG2的细胞。

结论: ABCG2在肝细胞性肝癌的发生发展过程中可能起着非常重要的作用,有可能成为临床治疗肝细胞性肝癌的分子靶标。

关键词: ATP结合转运蛋白G超家族成员2; 肝癌干细胞; 免疫组织化学; 免疫细胞化学; 流式细胞技术

奚忠, 江春平, 丁义涛. ABCG2在肝细胞性肝癌组织和肝癌细胞株中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(3): 247-252
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/247.asp>

0 引言

ABCG2属于ABC转运蛋白家族成员之一,被认为是侧群细胞的表型,一种潜在的干细胞分子标志^[1-2]。目前已经发现部分肿瘤干细胞的标志中包含ABCG2,并且有些研究直接用ABCG2作为干细胞或肿瘤干细胞的标志物来分离或鉴定干细胞或肿瘤干细胞^[3-5]。最新研究表明肝癌干细胞可能也存在于人类肝细胞型肝癌中,而且在肝癌的发生、发展中占有重要作用^[6-7],也有文献表明在肝癌细胞株中确实存在肝癌干细胞^[8],本研究通过组织学和细胞学结合的方式,探讨干细胞标志分子ABCG2在肝细胞性肝癌组织和肝癌细胞株中的表达和分布,阐明肝癌干细胞在肝癌形成过程中的作用,为临床治疗肝细胞性肝癌确定可能的分子靶标。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞株HepG2和PLC/PRF/5(购买自中国科学院上海生命科学院细胞库), H-DMEM培养液(美国Hyclone公司), 胎牛血清(美国Hyclone公司), 胰蛋白酶(美国Hyclone公司), 鼠抗人ABCG2单克隆抗体(克隆号: 5D3, 美国R&D公司产品, 工作浓度1:20), 异硫氰酸标记的兔抗鼠二抗100 μ L(Millipore公司产品, 工作浓度1:50), Hoechst 33258染料(Sigma公司产品, 工作浓度1:1000), 倒置显微镜(Olympus公司), 二氧化碳培养箱(Thermo公司), 超净工作台(苏州净化有限公司), 荧光显微镜(Olympus公司), 流式细胞仪(Thermo公司)。收集南京市鼓楼医院病理

科2006-10/2007-12病例资料完整的30例肝细胞性肝癌和8例癌旁肝硬化手术切除标本(患者手术前都没有接受过化疗或放疗)。经我院病理科均确诊为肝细胞型肝癌。其中男25例, 女5例; 患者年龄32-82(平均年龄60)岁。参照国际TNM分期标准, 分为I、II、III、IV期, 再分为早期(I、II期)19例, 晚期(III、IV期)11例, 组织学显示乙型肝炎后肝硬化17例, 有脉管癌栓11例。肿瘤最大直径1.0-15 cm, ≥ 10 cm者7例, 3-10 cm者18例, ≤ 3 cm者5例。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化染色: 采用SP方法。一抗为鼠抗人ABCG2单克隆抗体(克隆号: 5D3, 美国R&D公司产品, 工作浓度1:100)。主要步骤包括: 常规脱蜡至水, 1 mmol/L、pH6.0柠檬酸微波95 $^{\circ}$ C 20 min, 阻断内源性过氧化物酶、正常羊血清封闭, 一抗4 $^{\circ}$ C过夜; 次日依次加生物素标记的羊抗鼠二抗和Streptavidin-Peroxidase, DAB显色; 苏木素复染, 脱水、透明、固定。试验中同时设立阳性对照和阴性对照。阴性对照: 用PBS代替一抗。阳性对照: 根据抗体说明书, 选用胎盘组织ABCG2染色。结果判定: ABCG2阳性细胞为胞膜棕黄色染色, 癌细胞全部不着色为阴性。

1.2.2 人肝癌细胞株HepG2和PLC/PRF/5的培养: 人肝癌细胞株HepG2和PLC/PRF/5细胞接种于75 mL的培养瓶中, 培养液为90%的H-DMEM, 100 mL/L胎牛血清, 100 kU/L青霉素, 100 mg/L链霉素, 置于37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂环境中培养, 24 h后首次换液去掉未贴壁的悬浮细胞。以后根据细胞生长情况每3天换液, 第6-7天细胞生长占瓶底面积超过90%时, 用2.5 g/L浓度的胰蛋白酶消化, 按照1:2进行传代, 以后重复操作, 传至第五代, 培养过程中倒置相差显微镜下对培养中的细胞进行观察。

1.2.3 人肝癌细胞株HepG2和PLC/PRF/5的免疫细胞化学: 细胞长满后接种于高压消毒处理过的载玻片上, 待细胞处于对数生长期时取出载玻片, PBS清洗5 min \times 3次后, 用40 mL/L多聚甲醛固定10 min, PBS清洗5 min \times 3次后, 0.2% Triton-X100破膜2 min, PBS清洗后加鼠抗人ABCG2单克隆抗体(用含3% BSA的PBS稀释)100 μ L, 4 $^{\circ}$ C孵育, 过夜。同时设立对照组: 用PBS代替一抗。PBS清洗5 min \times 3次后, 加入异硫氰酸标记的兔抗鼠二抗100 μ L, 工作浓度1:50, 4 $^{\circ}$ C孵育30 min。PBS清洗5 min \times 3次。加入Hoechst 33258染料100 μ L, 4 $^{\circ}$ C孵育15 min, PBS清洗5 min \times 3

■相关报道

有报道采用侧群细胞技术来分离实体性肿瘤细胞株中的侧群细胞, 并检测侧群细胞的致瘤性, 从而确定肿瘤干细胞的存在。但是, 侧群细胞分离过程中采用的Hoechst33342染料具有细胞毒性, 不能很好阐明致瘤性的原因。

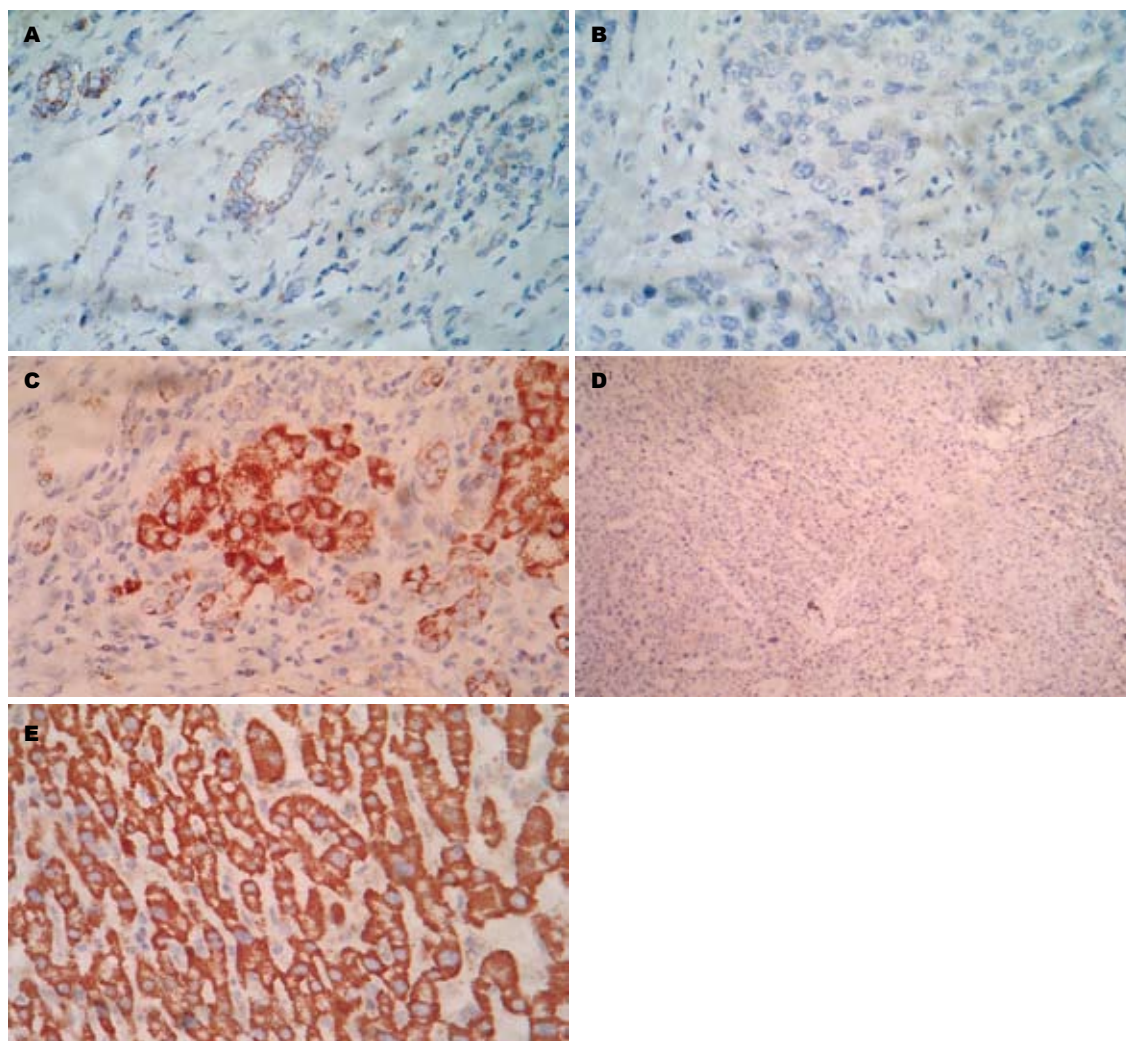


图1 ABCG2的表达(SP染色). A: 癌旁肝硬化组织中的阳性表达($\times 400$); B: 癌旁肝硬化组织阴性对照($\times 400$); C: 肝细胞型肝癌组织中的阳性表达($\times 400$); D: 肝细胞型肝癌组织中的阴性对照($\times 200$); E: 胎盘组织中的强阳性表达($\times 400$).

■创新盘点

本研究首次采用公认的干细胞标志物ABCG2作为肝癌干细胞的潜在标记分子,检测其在肝细胞型肝癌组织和肝癌细胞株中的表达.

次,甘油封片,荧光显微镜下观察、照相.

1.2.4 流式细胞术分选阳性细胞比例: 用2.5 g/L浓度的胰蛋白酶消化下来后,计数细胞达到 10^6 数量级装入Ep管中,1200 r/min离心5 min, PBS清洗5 min $\times 3$ 次,加入一抗:鼠抗人ABCG2 mAb, 4℃过夜.同时设立阴性对照组:用PBS代替一抗. PBS清洗5 min $\times 3$ 次,次日加入异硫氰酸标记的羊抗鼠二抗, 4℃孵育30 min. PBS清洗5 min $\times 3$ 次.上流式细胞仪检测细胞ABCG2阳性率.实验重复4次.

统计学处理 采用SPSS 15.0统计软件进行数据处理.配对资料采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示有显著性差异.

2 结果

2.1 ABCG2表达阳性率和定位 ABCG2在肝细胞性肝癌组织和癌旁肝硬化组织中的表达阳性率分别为63.33%(19/30)和25%(2/8).在癌旁肝硬化

组织中,ABCG2表达在胆小管和Hering小管中(图1A中有些细小的管腔,周围没有结缔组织而是被成熟的肝细胞包绕,提示该组织为Hering小管),而在肝癌组织中,ABCG2则表达在癌细胞的胞膜和胞质中,ABCG2在癌旁肝硬化组织中表达强度比在肝癌组织中弱.不同区域的染色程度差异不明显,阳性产物呈弥散的棕黄色颗粒.阳性对照(胎盘组织)染色的合体滋养层细胞膜和胞质可见ABCG2强阳性染色(图1).

2.2 细胞免疫荧光结果 两种肝癌细胞株都表达ABCG2(阴性对照组都没有观察到绿色荧光染色).在HepG2中,ABCG2主要表达在细胞的胞质中,而在PLC/PRF/5中,ABCG2主要表达在细胞膜上,胞质内也有表达(图2).其中蓝色荧光的为Hochest33258染色,大多细胞都能被染色,绿色荧光的为ABCG2染色.

2.3 细胞流式分选结果 HepG2中,对其采用配对资料的 t 检验,得出 $P = 0.149 > 0.05$.说明这两组数

■应用要点

根据肝癌细胞株中细胞是否表达ABCG2蛋白,将阳性细胞和阴性细胞分离开来,为今后的细胞异体移植研究打下基础,从而确定肝癌干细胞的标志物,为肝癌的临床和基因治疗提供依据.

■名词解释

ABCG2: ATP结合转运蛋白G超家族成员2, 是一种P-糖蛋白, ABCG2在侧群细胞SP中呈现高表达, 被认为参与肿瘤细胞的多药耐药性. ABCG2蛋白被认为是半转运蛋白, 可识别带正负电荷的分子、有机离子和硫酸盐络合物, 主要存在于干细胞, 某些肿瘤细胞和上皮细胞的顶膜. ABCG2主要参与肿瘤干细胞多药抗性的形成.

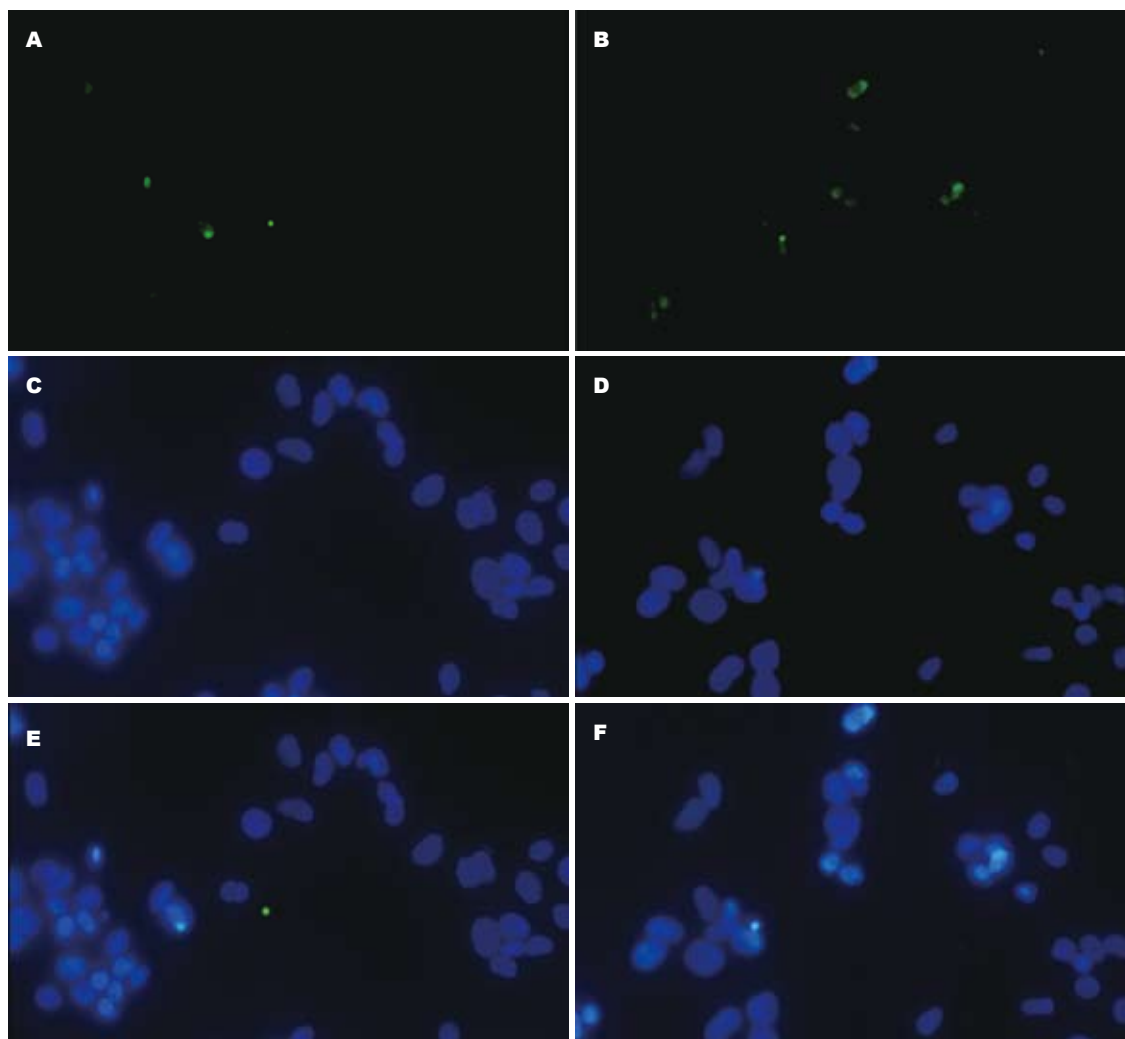


图2 HepG2和PLC/PRF/5细胞中ABCG2的表达($\times 400$). A、C、E: HepG2细胞; B、D、F: PLC/PRF/5细胞; A-B: ABCG2; C-D: Hoechst33258; E-F: 整合.

表1 两种细胞株中, 通过流式细胞仪检测出表达ABCG2的细胞比率 (%)

	HepG2		P值	PLC/PRF/5		P值
	对照组	实验组		对照组	实验组	
I	0.5	1.0	0.149	1.8	22.6	0.008 ^a
II	0.8	4.3		3.0	31.4	
III	0.2	1.0		1.5	42.2	
IV	0.2	0.9		1.5	43.7	

^a $P < 0.05$.

据没有统计学差异. 这表明通过流式细胞仪不能检测出表达ABCG2的细胞. 同样, PLC/PRF/5中, 对其采用配对资料的 t 检验, 得出 $P = 0.008 < 0.05$. 说明这两组数据有统计学差异. 这表明通过流式细胞仪能检测出表达ABCG2的细胞(表1).

3 讨论

关于肿瘤的起源有两种学说: 成熟细胞起源学

说和祖细胞起源学说^[9-10]. 成熟细胞起源学说认为人类肿瘤起源于分化细胞基因突变的不断积累; 而祖细胞起源学说只适用于一些少数的肿瘤, 如畸胎瘤和白血病^[11]. 从肿瘤细胞的增殖观念角度, 有两种模型: 推测模型和等级分化模型. 推测模型认为肿瘤的所有细胞都具有相同的致癌能力, 并且可以像一个新的肿瘤细胞发挥功能作用. 相反的, 等级分化模型则认为: 只有少数细胞或细胞亚群具有明显的增殖能力, 而且可以产生新的肿瘤细胞. 等级分化模型与肿瘤干细胞理论相符, 也就是说肿瘤干细胞可能是致癌细胞, 在肿瘤细胞的谱系中占有重要地位^[12-13]. 最新的干细胞研究认为: 祖细胞起源学说和等级分化模型可以应用在实体肿瘤上. 肿瘤干细胞可能不仅仅存在于白血病, 还可能存在于实体肿瘤, 如脑肿瘤和乳腺癌^[14-16].

1997年, Goodell *et al*^[17]开创了一个新的方法来证实成人干细胞存在. 当骨髓来源的细

胞与Hoechst33342染料共同孵育, 并通过流式细胞仪检测时, 发现有一小部分细胞不能够被Hoechst33342染料染色, 从而被证实为侧群(side population, SP)细胞. SP细胞技术被用来检测正常组织中的干细胞和肿瘤组织中的肿瘤干细胞^[18-19]. 肿瘤干细胞与肿瘤细胞在形态上没有差异, 肿瘤干细胞只是一个功能学概念, 体内致瘤性是鉴定肿瘤干细胞的重要依据. 通过侧群细胞的研究, 可以在肿瘤细胞株中将SP细胞与非SP细胞分选开来. 分选出来的SP细胞则可以用来检测他们是否有肿瘤干细胞特性: 体内高效的致瘤性. 但是, Hoechst33342染料具有细胞毒性, SP细胞因为细胞膜上有ATP结合盒膜转运蛋白保护而不受Hoechst33342染料的毒性作用, 但是非SP细胞因为细胞膜上没有保护性蛋白, 所以不能存活^[20]. 那么, SP细胞的致瘤性究竟是肿瘤干细胞的内在致瘤性, 还是由于人为的Hoechst33342染料的毒性作用, 就不得而知了. 这样的话, 以是否可以泵出Hoechst33342染料来用于肿瘤干细胞的鉴定是不合理的. 然而, ABCG2在细胞表面的表达可能可以作为一个肝癌干细胞的表面标志物来研究^[21].

ABCG2属于ABC转运蛋白家族成员之一, 被认为是侧群细胞的表型, 一种潜在的干细胞分子标记, 本实验通过对30例肝细胞型肝癌组织和8例癌旁肝硬化组织免疫组织化学的实验研究发现, ABCG2在癌旁肝硬化组织和肝细胞型肝癌组织中都有表达, 且肝细胞型肝癌组织中的阳性率明显高于肝硬化组织. 在癌旁肝硬化组织中, ABCG2表达在胆小管和Hering小管中, 而在肝癌组织中, ABCG2则表达在癌细胞的胞膜和胞质中. 这表明ABCG2⁺细胞在从癌旁肝硬化组织向肝癌组织演变的过程中是一直存在的. 现在公认的肝癌干细胞可能就是起源于正常组织肝干细胞, 这些细胞主要位于胚胎肝脏或成年肝脏的胆管末端Hering小管中^[22], 而本实验的结果表明Hering小管中表达ABCG2的肝干细胞可能就是肝癌干细胞. ABCG2⁺细胞具有很多干细胞或者祖细胞的特性, 例如自我更新能力, 高效的增殖能力, 以及能够产生非干细胞后代等. ABCG2⁺细胞在癌旁肝硬化组织和肝细胞型肝癌组织中都存在, 说明在癌细胞的谱系中占有重要位置, 可能在肿瘤细胞的扩增中发挥重要作用. 在该研究中, 鉴于ABCG2在癌旁肝硬化和肝癌中的阳性表达, 表明祖细胞起源学说和等级分化模型适用于人类肝细胞型肝癌.

在本研究中, 通过流式细胞仪不能从HepG2细胞株中检测出表达ABCG2的细胞, 而在PLC/PRF/5细胞株中, 可以检测出表达ABCG2的细胞. 但是对于HepG2细胞株, 通过细胞免疫荧光检测, 确实可以观察到表达ABCG2阳性的细胞. 这一问题可能与ABCG2在不同的细胞株中的细胞定位有关^[21], 因为流式细胞仪只能检测出表达细胞膜上的蛋白, 细胞膜的内蛋白因为没有作破膜处理, 一抗未能与其结合, 从而检测不出. ABCG2定位在HepG2的细胞胞质内, 在细胞膜上不表达, 通过流式细胞仪无法检测, 但是ABCG2在PLC/PRF/5细胞中, 定位不仅在细胞胞质内, 在细胞的胞膜上也有表达, 所以通过流式细胞仪可以检测出表达ABCG2的细胞, 本实验通过流式细胞仪检测出在PLC/PRF/5中ABCG2阳性细胞比率平均值为35.0%, 但是根据肿瘤干细胞理论, 肿瘤干细胞的数量只有占一小部分, 分析其原应可能与实验仪器误差有关, 还有可能与实验当时细胞的增殖状态有关.

总之, 通过本研究可以确定干细胞标记分子ABCG2在癌旁肝硬化和肝癌组织中都有表达, 而且在肝癌细胞株中也可以筛选出表达ABCG2阳性的细胞, 我们可以得出干细胞标记分子ABCG2可能是肝癌干细胞的标记分子, 是否可以单独作为特异性的标记分子还需要进一步的研究证明. 例如, 体内致瘤性是筛选和鉴定肿瘤干细胞的重要手段, 建立在本实验的基础上, 可以在肝癌细胞株PLC/PRF/5中分选出ABCG2阳性的细胞, 以阴性细胞作为对照, 同时注入裸鼠体内, 观察其致瘤性和致瘤能力的差异, 从而确定肝癌干细胞特异性的标志分子.

4 参考文献

- 1 Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 1996; 183: 1797-1806
- 2 Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 2001; 7: 1028-1034
- 3 Seigel GM, Campbell LM, Narayan M, Gonzalez-Fernandez F. Cancer stem cell characteristics in retinoblastoma. *Mol Vis* 2005; 11: 729-737
- 4 Olempska M, Eisenach PA, Ammerpohl O, Ungefroren H, Fandrich F, Kalthoff H. Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6: 92-97
- 5 Wang J, Guo LP, Chen LZ, Zeng YX, Lu SH.

■同行评价

本研究设计合理, 采用技术手段先进, 所得结论符合祖细胞起源学说和等级分化模型学说, 有较好的学术价值.

- Identification of cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line. *Cancer Res* 2007; 67: 3716-3724
- 6 Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, Tanaka F, Mimori K, Barnard GF, Mori M. Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. *Stem Cells* 2006; 24: 506-513
- 7 Chiba T, Kita K, Zheng YW, Yokosuka O, Saisho H, Iwama A, Nakauchi H, Taniguchi H. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology* 2006; 44: 240-251
- 8 Yang ZF, Ngai P, Ho DW, Yu WC, Ng MN, Lau CK, Li ML, Tam KH, Lam CT, Poon RT, Fan ST. Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer. *Hepatology* 2008; 47: 919-928
- 9 Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-111
- 10 Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA. Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 425-436
- 11 Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3: 730-737
- 12 Hope KJ, Jin L, Dick JE. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol* 2004; 5: 738-743
- 13 Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* 2004; 432: 324-331
- 14 Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, Goodell MA, Brenner MK. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 14228-14233
- 15 Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, Kornblum HI. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 15178-15183
- 16 Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; 432: 396-401
- 17 Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, Marks DF, DeMaria M, Paradis G, Grupp SA, Sieff CA, Mulligan RC, Johnson RP. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med* 1997; 3: 1337-1345
- 18 Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001; 107: 1395-1402
- 19 Welm BE, Tepera SB, Venezia T, Graubert TA, Rosen JM, Goodell MA. Sca-1(pos) cells in the mouse mammary gland represent an enriched progenitor cell population. *Dev Biol* 2002; 245: 42-56
- 20 Hill RP. Identifying cancer stem cells in solid tumors: case not proven. *Cancer Res* 2006; 66: 1891-1895; discussion 1890
- 21 Zen Y, Fujii T, Yoshikawa S, Takamura H, Tani T, Ohta T, Nakanuma Y. Histological and culture studies with respect to ABCG2 expression support the existence of a cancer cell hierarchy in human hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 2007; 170: 1750-1762
- 22 König S, Krause P, Markus PM, Becker H. [Role of stem cells in adult hepatic regeneration] *Chirurg* 2005; 76: 445-452

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

世界华人消化杂志中文摘要要求

本刊讯 本刊中文摘要必须在350字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象、应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度, 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征, 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准, 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 P , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值)。(常务副总编辑: 张海宁 2009-01-28)

参青方对三硝基苯磺酸诱导结肠炎大鼠结肠SP和VIP表达的影响

戴彦成, 唐志鹏, 王臻楠, 张亚利, 李凯, 何新颖

戴彦成, 唐志鹏, 王臻楠, 张亚利, 李凯, 何新颖, 上海中医药大学附属龙华医院消化内科 上海中医药大学脾胃病研究所 上海市 200032

戴彦成, 硕士, 住院医师, 主要从事中医药治疗消化疾病的临床和实验研究。

上海市科学技术委员会科研基金资助项目, No. 06411941

上海市教育委员会重点学科资助项目, No. J50305

作者贡献分布: 此课题由唐志鹏与王臻楠设计; 研究过程由戴彦成、张亚利、李凯及何新颖操作完成; 数据分析由戴彦成完成, 本文写作由戴彦成与唐志鹏完成。

通讯作者: 唐志鹏, 200032, 上海市, 上海中医药大学附属龙华医院消化内科, 上海中医药大学脾胃病研究所。

zhipengtang@sohu.com

电话: 021-64385700-3925

收稿日期: 2008-11-27 修回日期: 2008-12-26

接受日期: 2008-12-29 在线出版日期: 2009-01-28

Effect of Shenqing recipe on the expression of substance P and vasoactive intestine polypeptide in TNBS-induced rat colitis

Yan-Cheng Dai, Zhi-Peng Tang, Zhen-Nan Wang, Ya-Li Zhang, Kai Li, Xin-Ying He

Yan-Cheng Dai, Zhi-Peng Tang, Zhen-Nan Wang, Ya-Li Zhang, Kai Li, Xin-Ying He, Department of Gastroenterology, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine; Institute of Digestive Disease Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

Supported by: the Shanghai Committee of Science and Technology Foundation for Research Discipline Project, No. 06411941; and the Shanghai Leading Academic Discipline Project, No. J50305

Correspondence to: Zhi-Peng Tang, Department of Gastroenterology, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine; Institute of Digestive Diseases, Shanghai 200032, China. zhipengtang@sohu.com
Received: 2008-11-27 Revised: 2008-12-26

Accepted: 2008-12-29 Published online: 2009-01-28

Abstract

AIM: To study the change of intestinal motility in trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced rat colitis and to investigate the mechanism underlying the anti-inflammatory action and regulating the expression of substance P(SP) and vasoactive intestinal Polypeptide (VIP) by Shenqing recipe (SQR).

METHODS: Rats were randomly divided into SQR high dose group, SQR low dose group, 5-ASA group, model I group, model II group and normal group with 10 rats in each group. Rats in model I group were killed on day 3, and rats in the other groups were given medicine on day 3, once a day for 7 days. Rats were killed after 7 days' treatment. Histopathological assessment of the colonic mucosa was performed. MPO, MDA and SOD levels in the colonic mucosa were determined by ultraviolet spectrometer. The expression of neurotransmitters including SP and VIP was detected by immunohistochemical staining.

RESULTS: Compared with the normal group, the colonic mucosal levels of MPO and MDA were increased (2.78 ± 0.26 vs 0.56 ± 0.20 , 15.14 ± 2.02 vs 7.41 ± 1.19 , $P < 0.05$), while the level of SOD was decreased in the model I group (84.15 ± 6.27 vs 176.33 ± 12.06 , $P < 0.05$). Compared with model II group, the colonic mucosa levels of MPO and MDA were markedly decreased (1.03 ± 0.23 , 1.57 ± 0.27 , 1.59 ± 0.12 vs 2.03 ± 0.33 ; 8.30 ± 1.27 , 10.09 ± 1.09 , 10.46 ± 1.37 vs 14.38 ± 1.84 , $P < 0.05$), and the level of SOD was increased in the SQR high dose group, SQR low dose group and 5-ASA group (190.17 ± 7.71 , 178.90 ± 8.59 , 176.13 ± 9.50 vs 107.09 ± 6.37 , $P < 0.05$). Compared with the normal group, the expression of VIP and SP of the colonic mucosal was decreased in model I group (42608.00 ± 4823.37 vs 461570.00 ± 18227.7 ; 50801.90 ± 7698.09 vs 607333.90 ± 34166.35 , $P < 0.05$). After treatment, compared with the model II group, the expressions of VIP and SP were up-regulated in SQR high dose group, SQR low dose group and 5-ASA group (302253.10 ± 11484.92 , 171014.7 ± 21993.34 , 158355.10 ± 13855.66 vs 77260.26 ± 9375.49 ; 419171.36 ± 23267.98 , 279572.17 ± 26645.82 , 282438.50 ± 13236.13 vs 111838.85 ± 9698.09 , all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Our data indicate Shenqing recipe regulates the intestinal motility of SQR possibly through up-regulating the expressions

■背景资料

肠道动力学异常与溃疡性结肠炎(UC)的发病关系得到医学界的重视,并逐渐成为UC发病机制研究的热点,而P物质(SP)、血管活性肠肽(VIP)这两种主要的肽能神经递质在胃肠道电生理和动力发生以及动力障碍上具有重要作用。

■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室

■研发前沿

UC是临床常见难治性疾病,目前西医治疗存在疗效欠佳、复发率高、副作用大及价格昂贵问题。中医药治疗本病具有优势。参青方(青黛、参三七、一见喜等)是口服结肠靶向制剂参青肠溶片的原料药,具有清热解毒化湿,凉血化瘀止血,祛腐生新愈疡之功,持续应用能有效防止溃疡性结肠炎复发,是中药治疗该病的有效方剂。

of VIP and SP.

Key Words: Shenqing recipe; Trinitrobenzene sulfonic acid; Colitis; Intestinal motility; Substance P; Vasoactive intestinal polypeptide

Dai YC, Tang ZP, Wang ZN, Zhang YL, Li K, He XY. Effect of Shenqing recipe on the expression of substance P and vasoactive intestine polypeptide in TNBS-induced rat colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(3): 253-258

摘要

目的: 探讨三硝基苯磺酸(TNBS)诱导结肠炎大肠道动力学异常的发病机制,研究参青方消炎愈溃,以及调节结肠神经递质P物质(SP)、血管活性肠肽(VIP)的作用机制。

方法: 用TNBS复制实验性大鼠结肠炎模型,随机分为参青方高剂量组、参青方低剂量组、美沙拉嗪组、模型I组、模型II组及正常组,每组各10只。其中模型I组于造模3 d时处死,其余5组均在3 d开始给药,每日1次,连续给药7 d时处死。取大鼠结肠病变部位标本,检测结肠组织中超氧化物歧化酶(SOD)、髓过氧化物酶(MPO)及丙二醛(MDA)含量;免疫组化染色法检测SP和VIP的表达。

结果: 模型I组结肠黏膜MPO、MDA含量比正常组增加(2.78 ± 0.26 vs 0.56 ± 0.20 , 15.14 ± 2.02 vs 7.41 ± 1.19 , 均 $P < 0.05$), SOD含量减少(84.15 ± 6.27 vs 176.33 ± 12.06 , $P < 0.05$);与模型II组比较,参青方高剂量组、参青方低剂量组和美沙拉嗪组MPO、MDA含量明显减少(1.03 ± 0.23 , 1.57 ± 0.27 , 1.59 ± 0.12 vs 2.03 ± 0.33 ; 8.30 ± 1.27 , 10.09 ± 1.09 , 10.46 ± 1.37 vs 14.38 ± 1.84 , 均 $P < 0.05$), SOD含量增加(190.17 ± 7.71 , 178.90 ± 8.59 , 176.13 ± 9.50 vs 107.09 ± 6.37 , 均 $P < 0.05$)。正常组大鼠结肠组织可见VIP、SP阳性表达,与正常组比较,模型I组大鼠结肠组织SP、VIP表达减少($42\ 608.00 \pm 4823.37$ vs $461\ 570.00 \pm 18\ 227.7$; $50\ 801.90 \pm 7698.09$ vs $607\ 333.90 \pm 34\ 166.35$, 均 $P < 0.05$),经治疗后,参青方高剂量组、参青方低剂量组和美沙拉嗪组SP、VIP表达上调($302\ 253.10 \pm 11\ 484.92$, $171\ 014.7 \pm 21\ 993.34$, $158\ 355.10 \pm 13\ 855.66$ vs $77\ 260.26 \pm 9375.49$; $419\ 171.36 \pm 23\ 267.98$, $279\ 572.17 \pm 26\ 645.82$, $282\ 438.50 \pm 13\ 236.13$ vs $111\ 838.85 \pm 9698.09$, 均 $P < 0.05$)。

结论: 参青方能够上调结肠VIP和SP表达,因而具有调节肠道动力学的作用。

关键词: 参青方; 三硝基苯磺酸; 结肠炎; 肠道动力学; P物质; 血管活性肠肽

戴彦成, 唐志鹏, 王臻楠, 张亚利, 李凯, 何新颖. 参青方对三硝基苯磺酸诱导结肠炎大鼠结肠SP和VIP表达的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17(3): 253-258

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/253.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC), 是以腹痛、腹泻、黏液脓血便、里急后重等为主要症状, 以直、结肠黏膜及黏膜下层炎症和溃疡形成为病理特点的一种慢性非特异性消化系统疾病。大多研究侧重于异常免疫应答、炎症因子等免疫发病机制为主的层面。近年来, 肠道动力学与溃疡性结肠炎的发病关系得到医学界的重视, 并逐渐成为UC发病机制研究的热点^[1]。本文对三硝基苯磺酸(trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS)诱导结肠炎大鼠结肠P物质(substance P, SP)、血管活性肠肽(vasoactive intestinal polypeptide, VIP)2种主要的肽能神经递质进行了研究, 探讨其调节肠道动力作用的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂清洁级健康SD大鼠60只, 体质量180-200 g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。随机分为6组, 即正常组、模型I组、模型II组、美沙拉嗪组、参青方低剂量组、参青方高剂量组, 每组10只。参青方由青黛、参三七、地榆等组成, 由上海家化医药科技有限公司提供。美沙拉嗪肠溶片(mesalazine, -aminosalicylic acid, 5-ASA), 商品名惠迪, 由佳木斯鹿铃制药有限责任公司生产。2, 4, 6-三硝基苯磺酸(TNBS)为美国Sigma公司产品。兔抗大鼠VIP多克隆抗体, 购自美国Santa Cruz公司。兔抗大鼠SP多克隆抗体, 购自英国ABCAM公司。髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malonaldehyde, MDA)测试盒均为南京建成生物工程研究所产品。

1.2 方法

1.2.1 造模: 除正常组大鼠之外, 其余动物参考文献制备TNBS诱导结肠炎大鼠模型^[2]。造模前将大鼠禁食不禁水24 h后, ip氯胺酮2 mL/kg麻醉大鼠, 用大鼠直灌胃针从肛门插入肠道深约8 cm, 向每只大鼠结肠内注入100 mg/kg浓度TNBS原液0.4 mL+500 mL/L乙醇溶液0.25 mL, 然后注入

表 1 各组大鼠结肠组织MPO、SOD和MDA水平 (mean ± SD, $n = 6$)

分组	MPO(U/g)	MDA(nmol/mg prot)	SOD(U/mg prot)
正常组	0.56 ± 0.20	7.41 ± 1.19	176.33 ± 12.06
模型 I 组	2.78 ± 0.26 ^a	15.14 ± 2.02 ^a	84.15 ± 6.27 ^a
模型 II 组	2.03 ± 0.33 ^a	14.38 ± 1.84 ^a	107.09 ± 6.37 ^a
美沙拉嗪组	1.59 ± 0.12 ^a	10.46 ± 1.37 ^a	176.13 ± 9.50 ^a
参青方低剂量组	1.57 ± 0.27 ^a	10.09 ± 1.09 ^a	178.90 ± 8.59 ^a
参青方高剂量组	1.03 ± 0.23 ^{ab}	8.30 ± 1.27 ^{ab}	190.17 ± 7.71 ^{ab}

^a $P < 0.05$ vs 正常组; ^a $P < 0.05$ vs 参青方低剂量组; ^a $P < 0.05$ vs 模型 II 组.

约0.3 mL空气,并用夹子夹住大鼠肛门约2 h.造模后大鼠归笼,自然清醒,自由饮食.

1.2.2 给药:于造模后3 d开始,各组大鼠经肛门给药.配置5 g/L的羧甲基纤维素钠(sodium carboxymethylcellulose, CMC-Na)溶液.各组给药剂量及浓度(W/V)如下:美沙拉嗪组:美沙拉嗪肠溶片(5-ASA)临床成人用量为50 mg/(kg·d),大鼠给药剂量则按600 mg/(kg·d),配成溶液浓度为60 g/L,用CMC-Na溶液溶解,下同.参青方原处方临床成人用量为45.2 g原料药每天,按成人质量60 kg计算,即每天原料药0.753 g/kg.参青方低剂量组:剂量为1.2 g/(kg·d),配成溶液浓度为120 g/L.参青方高剂量组:剂量为2.4 g/(kg·d),配成溶液浓度为240 g/L.给药体积为1 mL/100 g体重,经肛门给药每天1次,连续7 d.正常组和模型 II 组经肛门给予等体积的5 g/L CMC-Na.

1.2.3 标本采集:模型 I 组于3 d,其余各组大鼠于给药7 d(即造模处理10 d)后取材.分离结肠,沿肠系膜纵轴剪开肠腔,剪取距肛门8 cm左右病变的结肠段,纵向剖开冰生理盐水冲洗干净后平展于过滤纸上,一部分结肠组织经40 g/L的中性甲醛溶液固定后,常规脱水、浸蜡、透明、包埋,4 μm厚度切片,分别行常规HE染色和免疫组化染色.其余部分结肠组织迅速置于液氮中,然后转入-80℃冰箱保存,留待行检测MPO、MDA、SOD的含量检测.

1.2.4 结肠组织病理形态学观察:切片HE染色后以Olympus显微镜观察并拍照.

1.2.5 结肠组织MPO、SOD和MDA水平的测定:测定方法按MPO、SOD和MDA试剂盒说明书操作.

1.2.6 免疫组化检测:采用EnVision免疫组化染色法(两步法),操作过程按照试剂盒说明书进行,兔抗大鼠SP、VIP多克隆抗体稀释倍数为1:100.每张切片分析3个视野,采用IMS细胞图

像分析系统(上海申腾信息技术有限公司)分析切片免疫组化图像中阳性区域面积和吸光度值(A),并计算免疫组化指数(HIC-I).免疫组化指数=阳性面积(Area+)×A,从而描述或反应样本的阳性情况.

统计学处理 所有计量资料的数据均以mean±SD表示,各组数据进行正态检验及方差齐性检验,采用SPSS11.5统计软件进行单因素方差分析(analytic of variance, ANOVA)和LSD-*t*(least significant difference-*t*)检验进行组间比较, $P < 0.05$ 为具有统计学意义.

2 结果

2.1 光镜下结肠组织病理学改变 正常组大鼠结肠黏膜上皮完整、连续,细胞与腺体排列规则,黏膜、固有层内血管和纤维间质正常,肌层无异常;模型 I 组大鼠结肠黏膜出现广泛坏死、糜烂、腺体结构紊乱,可见溃疡及隐窝脓肿形成,个别溃疡深达黏膜下层甚至肌层,炎症细胞浸润全层,并可见到淋巴滤泡及巨噬细胞.模型 II 组仍有黏膜层糜烂,黏膜及黏膜下层炎症细胞浸润较前有所好转,溃疡底部已见肉芽组织增生,部分糜烂黏膜表面已有上皮移行修复迹象.参青方低剂量组和美沙拉嗪组可见程度不同的黏膜上皮移行修复,肉芽组织增生,固有层中腺体呈管状增粗,可见散在淋巴细胞及巨噬细胞.参青方高剂量组黏膜下层和肌层轻度水肿,炎症细胞减少,并见肉芽组织参与修补,多数表面已出现上皮修复,黏膜腺体恢复接近正常(图1).

2.2 结肠组织MPO、SOD和MDA水平 与正常组比较,模型 I 组及模型 II 组大鼠病变结肠组织MPO、MDA含量均明显升高,SOD含量均明显减少,差异有显著性意义($P < 0.05$);实验结束时,与模型 II 组比较,参青方高剂量组、参青方低剂量组和美沙拉嗪组的MPO、MDA含量均显

■相关报道

Kimura *et al*研究指出,活动性UC患者的VIP神经元和SP神经元均减少.特别是在脓肿周围,VIP神经原几乎是缺如的,而在其未被累及的黏膜中分部则没有改变.

■创新盘点

本文采用免疫组化染色法检测大鼠结肠病变部位SP、VIP的表达,结果提示参青方能够上调结肠VIP和SP表达,因而具有调节肠道动力学的作用。

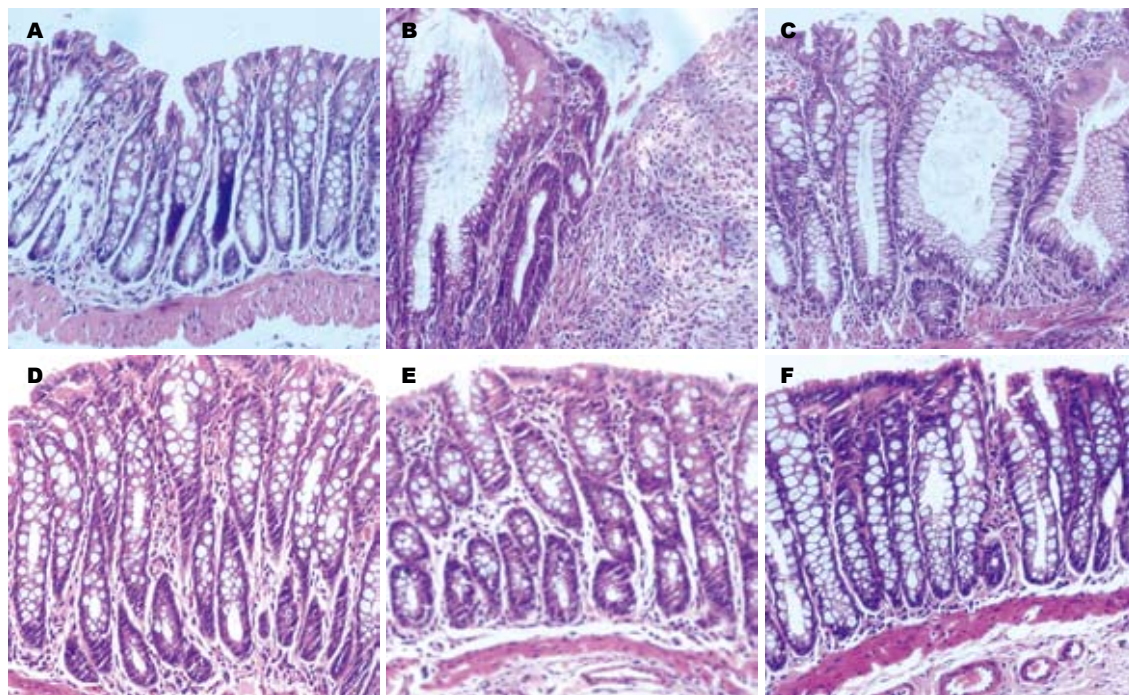


图1 大鼠结肠黏膜组织病理学改变(HE × 200). A: 正常组; B: 模型 I 组; C: 模型 II 组; D: 美沙拉嗪组; E: 参青方低剂量组; F: 参青方高剂量组。

表2 各组大鼠结肠组织SP、VIP免疫组化指数比较 (mean ± SD)

分组	n	SP(HIC-I)	VIP(HIC-I)
正常组	10	461 570.00 ± 18 227.7	607 333.90 ± 34 166.35
模型 I 组	10	42 608.00 ± 4823.37 ^a	50 801.90 ± 7698.09 ^a
模型 II 组	9	77 260.26 ± 9375.49 ^a	111 838.85 ± 9698.09 ^a
美沙拉嗪组	10	158 355.10 ± 13 855.66 ^a	282 438.50 ± 13 236.13 ^a
参青方低剂量组	9	171 014.7 ± 21 993.34 ^a	279 572.17 ± 26 645.82 ^a
参青方高剂量组	10	302 253.10 ± 11 484.92 ^{ab}	419 171.36 ± 23 267.98 ^{ab}

^a $P < 0.05$ vs 正常组; ^a $P < 0.05$ vs 参青方低剂量组; ^a $P < 0.05$ vs 模型 II 组。模型 I 组和参青方低剂量组各死亡1只大鼠, 对其进行解剖后均可见到明显的结肠粘连现象, 统计时去除。

著减少, SOD含量均显著增加($P < 0.05$); 但参青方低剂量组与美沙拉嗪组比较, 两者差异无显著性意义($P > 0.05$, 表1)。

2.3 结肠组织SP、VIP的免疫组化染色 免疫组化染色显示: SP、VIP阳性产物为棕黄色或棕褐色, 分布于正常组大鼠肠道黏膜层、黏膜下层、肌层; 而在结肠炎大鼠的再生黏膜腺体、溃疡边缘腺体及溃疡底部肉芽组织中表达明显减少。通过分析免疫组化指数表明: 与正常组大鼠比较, 模型 I 组大鼠结肠组织VIP、SP表达明显减少, 差异有显著性意义($P < 0.05$); 实验结束时, 与模型 II 组比较, 参青方高剂量组、参青方低剂量组和美沙拉嗪组结肠组织VIP、SP表达均显著增加($P < 0.05$); 参青方高剂量组结肠组织

VIP、SP表达高于参青方低剂量组和美沙拉嗪组($P < 0.05$); 但参青方低剂量组与美沙拉嗪组比较, 两者差异无显著性意义($P > 0.05$, 表2)。

3 讨论

UC的发病率和患病率在我国有明显增加趋势^[3], 其发病机制尚在研究中。中性粒细胞、炎性介质是导致UC溃疡、糜烂的最直接因素。MPO是中性粒细胞中的一种酶, 在单核和巨噬细胞中也有少量存在, 故其含量的增高可以反映中性粒细胞在某一组织中的增高, 间接反映炎症在组织中的存在。因此, 凡是存在中性粒细胞浸润的组织都可以通过MPO活性测定来决定细胞浸润程度。对于他的检测能较好地反映本病急性

炎症期(致炎后1 wk内)中性粒细胞浸润情况, 作为评价本病的急慢性病理改变和炎症程度具有重要意义^[4]. 一些学者报道认为氧自由基(oxygen free radicals, OFR)在UC发病过程中起重要作用^[5]. 当OFR形成过量或抗氧化系统削弱, OFR可引起机体一系列损伤, 其中最重要的是触发细胞膜上的多不饱和脂肪酸发生脂质过氧化的链式反应, 产生MDA等脂质过氧化物, 使组织损害进一步加重^[6]. 测定MDA含量不仅可间接反映OFR生成的多少, 同时也是OFR触发生物膜脂质过氧化反映的直接证据和膜结构受损程度的指标^[7]. 而SOD是体内最重要的自由基-超氧阴离子自由基的天然清除剂, 可以保护细胞免受损伤. 检测SOD含量可以间接了解自由基在体内的状况和机体清除氧自由基的能力^[8].

肠肽能神经递质包括VIP、SP等. 他们能有效调节肠道免疫活性, 与UC的发病机制有一定联系. VIP是一种含28个氨基酸残基的碱基多肽, 在整个消化系肌间丛分布着VIP免疫反应阳性胞体与纤维, 其主要作用是舒张胃肠平滑肌、舒张血管和刺激腺体分泌. ICC与VIP神经元连接紧密, 其细胞膜上发现有VIP-1和VIP-2受体. SP为含11个氨基酸残基的直链多肽, 分布人体全身, 以胃肠道和中枢神经系统浓度最高. SP为胃肠感觉和运动神经元的兴奋性递质, 其生理作用为强烈促进消化系平滑肌收缩, 刺激小肠、结肠黏膜分泌水和电解质等.

以前研究已证实在炎症性肠病累及的肠段中肠神经肽含量及其神经分布均有显著的变化, 而这些改变都与病变结肠腺体和血管的固有层的改变相关. Kimura *et al*^[9]研究指出, 活动性UC患者的VIP神经元和SP神经元均减少. 特别是在脓肿周围, VIP神经原几乎是缺如的, 而在其未被累及的黏膜中分部则没有改变. Surrenti *et al*^[10]测定了中度及重度UC患者结肠直肠黏膜中VIP的含量, 发现他明显减少, 而且VIP的减少与黏膜炎症程度显著相关. Surrenti *et al*推测, VIP的下降是一个继发现象, 即继发于黏膜的炎症损伤. Delgado *et al*^[11]研究发现VIP能阻止诱导型一氧化氮合酶(iNOS)在巨噬细胞的转录, 而已有实验发现, 在活动性炎症性肠病, 结肠黏膜中NO产生过多可加重黏膜损伤, 结肠黏膜中iNOS活性增加与炎症程度相关, 由此推测VIP的下降也可能通过此途径参与了黏膜的炎症反应. Törnblom *et al*^[12]研究发现: UC患者的ENS由胆碱能神经节变为SP神经节, 这一改变可能是UC肠道动力学

改变的神经基础. Vento *et al*^[13]在研究了UC患者中SP与生长相关蛋白243(GAP243)关系后发现, UC患者中GAP243没有变化, 因为GAP243是与神经再生相关的, 可以反映神经再生的发生, 由此推断UC患者SP的升高与肠神经元的再生没有明显关系, 亦即UC中没有明显的肠神经元再生发生, 而SP的升高可能与SP的合成增多有关, 过多的SP合成造成SP反应性神经纤维变得明显, 这也解释了很多研究发现的UC患者中SP反应性神经纤维明显增多的结论. 也有研究^[14]得出在严重UC患者肠道SP含量是下降的, 其机制可能与血管活性肠肽下降机制类似, 由于疾病严重期造成的黏膜神经受到很大破坏有关.

本实验结果表明: 参青方治疗溃疡性结肠炎的机制之一可能是降低结肠组织MPO含量, 增加肠道组织黏膜SOD含量, 清除氧自由基从而改善肠道黏膜损害. 在TNBS诱导大鼠结肠炎模型中, 黏膜的神经元分布改变伴随着黏膜炎症损害. 由于神经肽是重要的免疫调节因子, 其改变可能引起结肠黏膜免疫功能的异常, 从而导致结肠黏膜损害及肠道动力学改变. 参青方可能通过消炎愈溃, 修复受损结肠黏膜, 改善病变部位神经递质VIP和SP表达, 从而调节肠动力.

参青方(青黛、参三七、一见喜等)是口服结肠靶向制剂参青肠溶片的原料药, 是建立在龙华医院自制剂型清肠栓的良好疗效基础上, 继续以清热化湿、活血止血立法, 改进药物组成配方, 研制中药口服pH依赖性结肠靶向定位释放的新剂型. 他在回盲部崩解释放, 直接作用于靶器官, 既体现和提升了中医药治疗溃疡性结肠炎的简、便、廉、验特色, 又富有创新性, 具有良好的开发和产业化前景. 本实验对参青方调节UC肠道动力学的机制进行初步研究, 为中医药治疗UC提供了新的思路和方法.

4 参考文献

- 1 戴彦成, 唐志鹏, 李凯, 王臻楠. 溃疡性结肠炎中肠道动力学研究进展. 世界华人消化杂志 2007; 15: 721-724
- 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 江学良, 崔惠斐. 中国溃疡性结肠炎10 218例的特点. 世界华人消化杂志 2001; 9: 869-873
- 4 Depoortere I, Van Assche G, Thijs T, Geboes K, Peeters TL. Differential changes in ACh-, motilin-, substance P-, and K(+)-induced contractility in rabbit colitis. *Am J Physiol* 1999; 277: G61-G68
- 5 Simmonds NJ, Rampton DS. Inflammatory bowel disease—a radical view. *Gut* 1993; 34: 865-868
- 6 朱炳喜, 吕愈敏. 氧自由基在溃疡性结肠炎发病机制

■应用要点

本文对参青方调节UC肠道动力学的机制进行初步研究, 为中医药治疗UC提供了新的思路和方法.

■同行评价

本文设计合理, 结果可信, 有较好的科学意义.

- 7 中的研究. 中华消化内镜杂志 1997; 14: 111-112
- 8 Sedghi S, Keshavarzian A, Klamut M, Eiznhamer D, Zarling EJ. Elevated breath ethane levels in active ulcerative colitis: evidence for excessive lipid peroxidation. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 2217-2221
- 9 朱峰, 钱家鸣, 潘国宗. 细胞免疫反应性炎症性肠病动物模型的建立. 中国医学科学院学报 1998; 20: 271-278
- 10 Kimura M, Masuda T, Hiwatashi N, Toyota T, Nagura H. Changes in neuropeptide-containing nerves in human colonic mucosa with inflammatory bowel disease. *Pathol Int* 1994; 44: 624-634
- 11 Surrenti C, Renzi D, Garcea MR, Surrenti E, Salvadori G. Colonic vasoactive intestinal polypeptide in ulcerative colitis. *J Physiol Paris* 1993; 87: 307-311
- 12 Delgado M, Munoz-Elias EJ, Gomariz RP, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevent inducible nitric oxide synthase transcription in macrophages by inhibiting NF-kappa B and IFN regulatory factor 1 activation. *J Immunol* 1999; 162: 4685-4696
- 13 Törnblom H, Lindberg G, Nyberg B, Veress B. Full-thickness biopsy of the jejunum reveals inflammation and enteric neuropathy in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2002; 123: 1972-1979
- 14 Vento P, Kiviluoto T, Keränen U, Järvinen HJ, Kivilaakso E, Soinila S. Quantitative comparison of growth-associated protein-43 and substance P in ulcerative colitis. *J Histochem Cytochem* 2001; 49: 749-758
- 15 Renzi D, Mantellini P, Calabrò A, Panerai C, Amorosi A, Paladini I, Salvadori G, Garcea MR, Surrenti C. Substance P and vasoactive intestinal polypeptide but not calcitonin gene-related peptide concentrations are reduced in patients with moderate and severe ulcerative colitis. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1998; 30: 62-70

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

世界华人消化杂志名词术语标准

本刊讯 本刊名词术语一律标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称. 医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文. 公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD₅₀, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写. (常务副总编辑: 张海宁 2009-01-28)

酸性成纤维细胞生长因子片段脑室内及皮下注射对大鼠夜间摄食的影响

赵艳军, 李学良, 林琳, 栗生修司, 大村裕

赵艳军, 李学良, 林琳, 南京医科大学第一附属医院消化科
江苏省南京市 210029
栗生修司, 日本九州工业大学大学院生命体工学研究科脑情报专攻 北九州 808-0196
大村裕, 日本九州大学医学部统合生理学教室 福岡 812-8582
赵艳军, 硕士, 主治医师, 主要从事功能性胃肠病及胃肠动力性疾病的
研究和消化系早期肿瘤的内镜下诊治的研究。
江苏省卫生厅卫生科技发展项目, No. H200607
作者贡献分布: 此课题由李学良、赵艳军、林琳、栗生修司及大村裕共同设计; 研究过程、资料查找、数据统计、论文写作均由赵艳军和李学良完成; 论文定稿由李学良完成。
通讯作者: 李学良, 210029, 江苏省南京市, 南京医科大学第一附属医院消化科, ligakur@yahoo.com.cn
电话: 025-83718836-6542 传真: 025-83780711
收稿日期: 2008-11-14 修回日期: 2008-12-22
接受日期: 2008-12-29 在线出版日期: 2009-01-28

Effects of acidic fibroblast growth factor fragments on nocturnal feeding in rats by intracerebroventricular and hypodermic injection

Yan-Jun Zhao, Xue-Liang Li, Lin Lin, Shouji Aou, Yutaka Oomura

Yan-Jun Zhao, Xue-Liang Li, Lin Lin, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Shouji Aou, Department of Brain Science and Engineering Kyushu Institute of Technology, Kitakyushu 808-0196, Japan
Yutaka Oomura, Department of Integrative Physiology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University 60, Fukuoka, 812-8582, Japan
Supported by: the Health and Science Foundation of Health Department of Jiangsu Province, No. H200607
Correspondence to: Professor Xue-Liang Li, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. ligakur@yahoo.com.cn
Received: 2008-11-14 Revised: 2008-12-22
Accepted: 2008-12-29 Published online: 2009-01-28

Abstract

AIM: To investigate the active region of aFGF responsible for food intake by calculating nocturnal food consumption to examine the efficacy of peripheral administration of the active fragments.

METHODS: For intracerebroventricular infusion,

a guide cannula made of stainless steel tubing was fixed into the third cerebral ventricle one week before the experiments. Under no anesthesia seven synthesized aFGF fragments aFGF-(1-15), [D-Trp⁶]-aFGF-(1-15), [desaminoPhe¹.D-Trp⁶]-aFGF-(1-15), [desaminoPhe¹.Lys(ε-myristyl)¹⁶]-aFGF-(1-16), [Lys(ε-myristyl)¹⁶]-aFGF-(1-16), [D-Trp⁶.Lys(ε-myristyl)¹⁶]-aFGF-(1-16) and [Ala¹⁶] aFGF-(1-29) were injected into the third ventricle of rats during the period from 18:30 to 19:00. Powdered food in the animal food boxes were weighed at 19:00, 22:00, and 7:00 for calculating food consumption by rats in 3 hours and 12 hours. Then the two active aFGF fragments aFGF-(1-15) and [Ala¹⁶] aFGF-(1-29) were injected into the subcutaneous tissue of rats during the period from 18:30 to 19:00, to calculate nocturnal food consumption.

RESULTS: For intracerebroventricular infusion, aFGF-(1-15) (per rat 200 ng) had no effect on the feeding, while aFGF-(1-15) (per rat 400 ng) suppressed the food intake (3 h: 3.0 ± 0.2 vs 2.1 ± 0.2 ; 12 h: 18.5 ± 0.5 vs 16.1 ± 0.5 , both $P < 0.01$). As for [Ala¹⁶] aFGF-(1-29), not only per rat 200 ng (3 h: 4.9 ± 0.2 vs 3.4 ± 0.2 ; 12 h: 19.3 ± 1.2 vs 17.3 ± 1.1 , both $P < 0.01$) but also per rat 400 ng (3 h: 3.6 ± 0.1 vs 1.6 ± 0.2 ; 12 h: 19.9 ± 0.8 vs 16.4 ± 1.6 , both $P < 0.01$) suppressed the food intake. Other five aFGF fragments had no effect on the feeding in the dose of per rat 200 ng and per rat 400 ng. For hypodermic injection, [Ala¹⁶] aFGF-(1-29) (300 μg/kg) suppressed the food intake (3 h: 3.9 ± 0.2 vs 2.1 ± 0.3 ; 12 h: 19.8 ± 0.5 vs 11.2 ± 0.8 , both $P < 0.01$), while others had no effect.

CONCLUSION: These findings suggest the amino-terminal portion of aFGF is active in food intake suppression. The replacement of cysteine residue by alanine is important in some amino-terminal aFGF fragments. Other aFGF fragments, in which glycine at position 6 was replaced with D-tryptophane, phenylalanine at position 1 with desaminoPhe, and cysteine at position 16 with Lys(ε-myristyl) has no effect on nocturnal feeding in rats. Peripheral administration,

■背景资料

研究已经清楚酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)与各种由中胚层发生来的细胞的分化和增殖密切相关, 同时他们在中枢神经系统及外周的其他作用也非常引人注目, 包括神经元的损伤保护、抑制摄食、在缺血等情况下对心肝肾等重要脏器细胞的保护作用 and 抗衰老, 增强记忆等。aFGF的众多的生物活性, 展现了该物质是一个具有广泛临床开发使用前景的生物活性因子。

■同行评议者

刘海林, 主任医师, 上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科

■ 研发前沿

aFGF具有广泛的生物活性,有望开发成药物用于临床,但aFGF分子量较大,合成复杂,易产生不良反应。故目前希望寻找其具有生物活性的分子片段来取代整个分子用于开发使用。但关于其分子中有效的生物活性部位的不明点还很多。aFGF的氨基酸序列与其特异的生物活性相关,但其详细的构造-活性相互关系还不清楚。

tion of one fragment is also effective on nocturnal feeding in rats.

Key Words: Acidic fibroblast growth factor fragments; Intracerebroventricular injection; Hypodermic injection; Rat; Nocturnal feeding

Zhao YJ, Li XL, Lin L, Aou S, Oomura Y. Effects of acidic fibroblast growth factor fragments on nocturnal feeding in rats by intracerebroventricular and hypodermic injection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(3): 259-264

摘要

目的:测定大鼠摄食量的变化来鉴定aFGF分子中具有调节摄食行为的活性部位,并进一步经皮下注射有活性的片段,观察对大鼠夜间摄食的影响,以此确定该活性片段外周给药的有效性。

方法:将设计好的七种aFGF分子片段aFGF-(1-15), [D-Trp⁶]-aFGF-(1-15), [desaminoPhe¹.D-Trp⁶]-aFGF-(1-15), [desaminoPhe¹.Lys(ε-myristyl)¹⁶]-aFGF-(1-16), [Lys(ε-myristyl)¹⁶]-aFGF-(1-16), [D-Trp⁶.Lys(ε-myristyl)¹⁶]-aFGF-(1-16)及[Ala¹⁶]aFGF-(1-29),在无麻醉下于18:30-19:00从第三脑室留置的不锈钢导管微量注射,然后在19:00, 22:00及07:00的时间点测定饲料箱内粉末饲料,分别计算3 h(19:00-22:00)及12 h(19:00-7:00)的摄食量。然后将发现具有生物活性的aFGF-(1-15)及[Ala¹⁶]aFGF-(1-29)两个片段经皮下注射给药,测定夜间摄食量。

结果:aFGF-(1-15)以每只大鼠200 ng脑室内给与后对摄食没有影响,以每只大鼠400 ng脑室内给与后减少了大鼠的夜间摄食量(3 h: 3.0 ± 0.2 vs 2.1 ± 0.2 ; 12 h: 18.5 ± 0.5 vs 16.1 ± 0.5 , $P < 0.01$); [Ala¹⁶]aFGF-(1-29)经脑室内投与,无论是在每只大鼠200 ng(3 h: 4.9 ± 0.2 vs 3.4 ± 0.2 ; 12 h: 19.3 ± 1.2 vs 17.3 ± 1.1 , $P < 0.01$); 还是每只大鼠400 ng给药均减少了大鼠的夜间摄食量(3 h: 3.6 ± 0.1 vs 1.6 ± 0.2 ; 12 h: 19.9 ± 0.8 vs 16.4 ± 1.6 , $P < 0.01$),并且与aFGF-(1-15)相比, [Ala¹⁶]aFGF-(1-29)抑制摄食作用更明显;其余五种aFGF片段脑室内注射无论每只大鼠200 ng还是在每只大鼠400 ng,对大鼠夜间摄食均没有影响。aFGF-(1-15)和[Ala¹⁶]aFGF-(1-29)以80、100、300 μg/kg大鼠皮下注射,其中仅[Ala¹⁶]aFGF-(1-29), 300 μg/kg皮下注射减少了大鼠的夜间摄食量(3 h: 3.9 ± 0.2 vs 2.1 ± 0.3 ; 12 h: 19.8 ± 0.5 vs 11.2 ± 0.8 , $P < 0.01$),其余种类和剂量对大鼠夜间摄食均没有影响。

结论:aFGF氨基酸序列的N末端及用丙氨酸代替aFGF氨基末端中半胱氨酸残基对摄食调节发挥重要作用。而第6位甘氨酸被右旋-色氨酸替代,第1位苯丙氨酸去氨基,第16位半胱氨酸被赖氨酸(ε-十四烷基)所代替,均没有摄食调节活性。部分活性片段外周给药同样可以发挥其生物活性。

关键词:酸性成纤维细胞生长因子片段; 脑室内注射; 皮下注射; 大鼠; 夜间摄食

赵艳军, 李学良, 林琳, 栗生修司, 大村裕. 酸性成纤维细胞生长因子片段脑室内及皮下注射对大鼠夜间摄食的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17(3): 259-264

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/259.asp>

0 引言

成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)于1974年在牛脑和脑垂体中被发现, FGF家族的每个成员都有一个140个氨基酸的中轴,该中轴在不同的成员间有高度的同源性,中轴折叠成12条逆向平行的β链,他们又形成圆柱状的结构,两端由更多变的氨基末端和羧基末端封闭。在这些FGF家族当中被研究最多的要数有140个和146个氨基酸序列组成的aFGF及bFGF,分子质量约为16 000 Da,两者具有55%的同源性^[1]。已经清楚aFGF及bFGF与各种由中胚层发生来的细胞的分化和增殖密切相关,他们在中枢神经系统的作用非常引人注目,但是关于其有效的生物活性部位的不明点还很多。关于aFGF,最初由Thomas于1984年从牛脑中分离纯化得到,研究已经发现,其N末端的1-15片段与全分子同样对海马神经元的长期增强(long-term potentiation, LTP)具有促进作用^[2],该发现反映了aFGF的氨基酸序列与其特异的生物活性相关,但其详细的构造-活性相互关系还不清楚。本研究是在大鼠的第三脑室投与七种aFGF片段,以此鉴定aFGF具有调节摄食行为的活性部位,并进一步经sc有活性的片段,通过观察对大鼠夜间摄食的影响来研究该活性片段外周给药的有效性,为开发该物质的临床应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Wistar大鼠162只,体质量250-300 g,在明暗各12 h(07:00-19:00)周期, $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 的室温环境,1个笼中饲养1只。饲料(研成碎沫状)和水18:30-19:00时间以外自由给予。大鼠及饲料购自河北医科大学实验动物中心。大鼠脑立体定位

仪为淮北正华生物仪器设备有限公司产品, 微量注射器为上海光正医疗仪器有限公司产品, aFGF片段由日本大阪肽研究所协助合成。

1.2 方法

1.2.1 第三脑室置管术: 在戊巴比妥钠麻醉下(40 mg/kg, 腹腔内注射), 将大鼠固定在脑立体定位仪上, 根据大鼠脑图^[3], 从十字缝后方0.2 mm, 深7.5-8.0 mm, 在正中位颅盖骨上打开直径约2 mm的洞, 以不锈钢导管插入(长18.0 mm, 外径0.64 mm, 内径0.39 mm)留置; 用带聚乙烯帽的不锈钢制导丝(长17 mm, 直径0.33 mm), 插入已经置入的不锈钢导管内用以封闭导管。另外用两个不锈钢制的螺钉固定在置入导管两侧的头骨上, 用牙科黏合剂与导管固定。手术后动物自由恢复1 wk。

1.2.2 药物: 为了寻找生物活性最强的N端的aFGF片段, 本实验设计了以下七种aFGF片段: (1)aFGF-(1-15): aFGF的1-15片段; (2)[D-Trp⁶]-aFGF-(1-15): 将aFGF-(1-15)片段中的第6位甘氨酸以右旋-色氨酸替换; (3)[desaminoPhe¹.D-Trp⁶]-aFGF-(1-15): 将aFGF-(1-15)片段中第1位苯丙氨酸去氨基, 第6位甘氨酸以右旋-色氨酸替换; (4)[desaminoPhe¹.Lys(ε-myristyl)¹⁶]-aFGF-(1-15): 将aFGF-(1-15)片段中第1位苯丙氨酸去氨基, 第16位半胱氨酸以赖氨酸(ε-十四烷基)替换; (5)[desaminoPhe¹.Lys(ε-myristyl)¹⁶]-aFGF-(1-16): 将aFGF-(1-16)片段中第1位苯丙氨酸去氨基, 第16位半胱氨酸以赖氨酸(ε-十四烷基)替换; (6)[D-Trp⁶.Lys(ε-myristyl)¹⁶]-aFGF-(1-16): 将aFGF-(1-16)片段中的第6位甘氨酸以右旋-色氨酸替换, 第16位半胱氨酸以赖氨酸(ε-十四烷基)替换; (7)[Ala¹⁶]-aFGF-(1-29): 将aFGF-(1-29)片段中的第16位半胱氨酸残基用丙氨酸替换, 所有片段均委托日本大阪肽研究所合成。aFGF片段均溶于含1 g/L牛血清白蛋白的人工脑脊液中。

1.2.3 分组及给药: 将大鼠随机分为对照组和aFGF片段组。在脑室内注射时, 将全部aFGF片段设每只大鼠200、400 ng两个剂量组, 皮下注射时, 设80、100、300 μg/kg三个剂量组。分别 $n=6$, 对照组用同样操作方法, 脑室内注入等量10 μL生理盐水或sc 0.2 mL等量生理盐水。

1.2.4 药物投予方法及摄食量测定: 脑室内注射前, 连续测定3 d的摄食量, 在确认安定基础摄食量的状况下, 在无麻醉下18:30-19:00从第三脑室或sc给与aFGF片段。脑室内给药时, 聚乙

烯管(长30 mm)的一端与注射用插管相连, 另一端装上微量注射器。在注入药物前拔掉带聚乙烯帽的不锈钢制导丝, 将注射用插管插入置入第三脑室的不锈钢导管内, 将10 μL溶液用微量注射器缓慢注入, 注射时间不少于10 min。然后在19:00, 22:00及07:00的时间点测定饲料箱内粉末饲料, 分别计算3 h(19:00-22:00)及12 h(19:00-7:00)的摄食量。

1.2.5 脑室内注射组织学监测: 实验结束后, 用过量的戊巴比妥钠深麻醉大鼠, 20 g/L的美蓝溶液溶于0.5 mL生理盐水中, 用与前述注射药物同样的方法注入第三脑室内。然后用40 g/L的中性甲醛溶液(100 mL), 经左心室灌流后, 取出脑组织, 再在40 g/L的中性甲醛溶液中固定1 d以上, 作前额断面的连续冰冻切片(50 μm), 在显微镜下确认插入管头端的位置。并同时满足: (1)药物投与前除去带聚乙烯帽的不锈钢制导丝时, 脑脊液由置入第三脑室的不锈钢导管溢出; (2)20 g/L的美蓝溶液注入后脑室的全部内壁均染色; (3)脑内无明显的出血或炎症。满足以上三个标准的大鼠的数据作为有效数据, 不合格的予以剔除。

统计学处理 所有的测定值均以mean±SD表示, 统计学方法采用配对 t 检验和方差分析, $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 aFGF-(1-15)和[Ala¹⁶]-aFGF-(1-29)脑室内给药对于大鼠夜间摄食的影响 在全部aFGF片段中, aFGF-(1-15)以每只大鼠200 ng($n=6$)脑室内给予后对摄食没有影响; 而给与每只大鼠400 ng脑室内注射后, 3 h及12 h摄食量均明显减少, 与给药的前1 d相比, 其摄食量分别从 3.0 ± 0.2 g减少为 2.1 ± 0.2 g($P<0.01$, $n=6$)和 18.5 ± 0.5 g减少为 16.1 ± 0.5 g($P<0.01$, $n=6$)(图1A)。[Ala¹⁶]-aFGF-(1-29)组在每只大鼠200 ng脑室内给药后, 最初3 h的平均摄食量从 4.9 ± 0.2 g减少为 3.4 ± 0.2 g($P<0.01$, $n=6$), 12 h平均摄食量从 19.3 ± 1.2 g减少为 17.3 ± 1.1 g($P<0.01$, $n=6$); 在每只大鼠400 ng给药后, 最初3 h的平均摄食量从 3.6 ± 0.1 g减少为 1.6 ± 0.2 g($P<0.01$, $n=6$), 12 h平均摄食量从 19.9 ± 0.8 g减少为 16.4 ± 1.6 g($P<0.01$, $n=6$)(图1B)。对照组脑室内注射等量生理盐水对大鼠夜间摄食没有影响($n=6$)。

2.2 脑室内给药对于大鼠夜间摄食的影响 无论是在每只大鼠200 ng给药, 还是在每只大鼠400 ng给药, [D-Trp⁶]-aFGF-(1-15), [desaminoPhe¹.

■创新盘点

本研究中首次设计了七种aFGF片段, 采用中枢给药方式, 通过测定其对大鼠摄食量的影响来鉴定aFGF分子中的活性部位, 发现了与aFGF大分子具有同样或相近生物活性的N端的aFGF片段, 同时进一步证明了部分活性片段外周给药同样可以发挥其生物学活性, 并对其活性-构造关系进行了初步的阐述, 为进一步研究开发aFGF的临床应用奠定了良好的基础。

■应用要点

本研究发现部分aFGF片段具有与aFGF大分子相同或相近的生物活性, 由于其分子结构较aFGF简单, 分子量小, 更容易合成, 成本更低; 在给予生物体用药时更易被吸收利用、不良反应大大减少, 具有较好的临床应用前景。

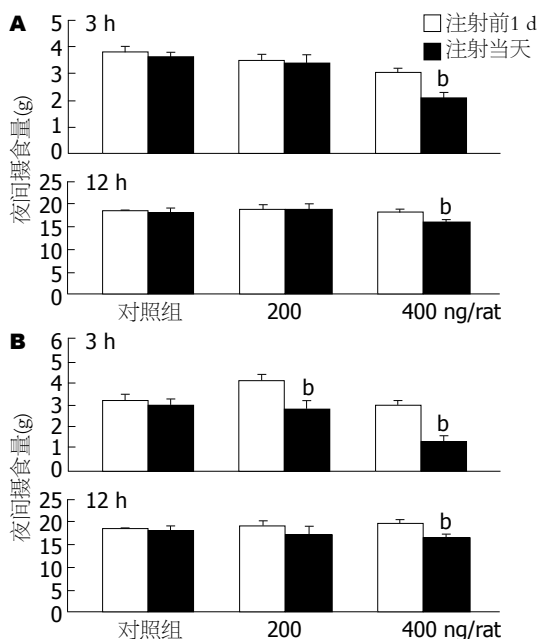


图1 脑室内给药对于大鼠夜间摄食的影响。A: aFGF-(1-15); B: [Ala¹⁶]-aFGF-(1-29). ^b $P < 0.01$ vs 注射前1 d.

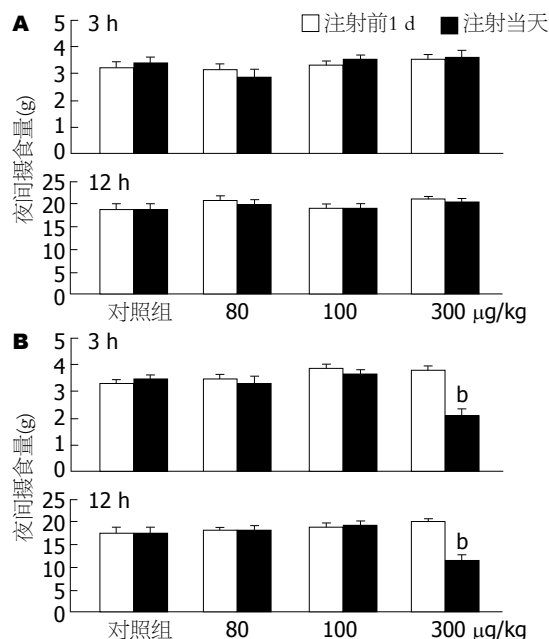


图2 皮下注射给药对于大鼠夜间摄食的影响。A: aFGF-(1-15); B: [Ala¹⁶]-aFGF-(1-29). ^b $P < 0.01$ vs 注射前1 d.

D-Trp⁶]-aFGF-(1-15), [desaminoPhe¹.Lys(ε-myristyl)¹⁶]-aFGF-(1-16), [Lys(ε-myristyl)¹⁶]-aFGF-(1-16), [D-Trp⁶.Lys(ε-myristyl)¹⁶]-aFGF-(1-16)这5种aFGF片段脑室内给药对摄食均没有影响(表1)。

2.3 aFGF-(1-15)和[Ala¹⁶]-aFGF-(1-29)皮下注射给药对于大鼠夜间摄食的影响 为将来开发该细胞因子片段的临床应用奠定基础, 将aFGF-(1-15)和[Ala¹⁶]-aFGF-(1-29)采用皮下注射的方式给药, 来观察他们对于大鼠夜间摄食的影响。两种细胞因子片段无论是80 µg/kg还是100 µg/kg皮下注射给药, 对于大鼠3 h的摄食量和12 h的摄食量均没有影响($n = 6$); 而加大给药剂量, 在300 µg/kg给药浓度下, 与前1 d相比, aFGF-(1-15)组对大鼠的夜间摄食依然没有影响($n = 6$)(图2A); [Ala¹⁶]-aFGF-(1-29)组最初3 h的平均摄食量从 3.9 ± 0.2 g减少为 2.1 ± 0.3 g($P < 0.01$, $n = 6$), 12 h平均摄食量从 19.8 ± 0.5 g减少为 11.2 ± 0.8 g($P < 0.01$, $n = 6$)(图2B)。对照组sc等量生理盐水对大鼠夜间摄食没有影响($n = 6$)。

2.4 [Ala¹⁶]-aFGF-(1-29)与aFGF-(1-15)对于大鼠夜间摄食作用比较 分别计算相同脑室给药剂量下, aFGF-(1-15)与[Ala¹⁶]-aFGF-(1-29)以及对照组前一日与给药当日3、12 h摄食量的差值, 采用方差分析进行组间比较。aFGF-(1-15), [Ala¹⁶]-aFGF-(1-29)与对照组比较, 均有统计学意义($P < 0.01$)。在每只大鼠400 ng给药剂量,

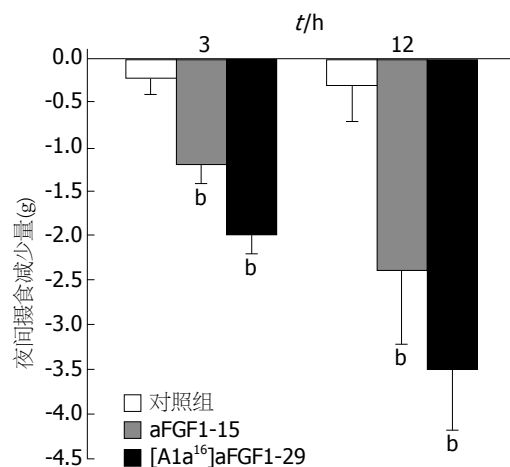


图3 [Ala¹⁶]-aFGF-(1-29)与aFGF-(1-15)脑室内给药(每只大鼠400 ng)对大鼠夜间摄食作用比较。^b $P < 0.01$ vs 对照组。

aFGF-(1-15)前1 d与给药当日3 h摄食量的差值为 0.9 ± 0.3 g, [Ala¹⁶]-aFGF-(1-29)为 2.0 ± 0.2 g, 两组比较 $P < 0.01$; 再比较两种片段前一日与给药当日12 h摄食量的差值 2.4 ± 0.7 g和 3.5 ± 0.8 g, $P < 0.01$ (图3)。

3 讨论

研究已经发现, 酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)除具有促进成纤维细胞生长作用外, 尚有很多中枢及外周的生理活性。包括(1)作用于下丘脑的摄食中枢调节摄食^[4-5]; (2)通过中枢和外周作用调节交感神经活动^[5-6]; (3)在缺血等应激状态

表 1 五种aFGF片段脑室内注射(ng/rat)对大鼠夜间摄食(g)的影响

时间	A		B		C		D		E	
	200	400	200	400	200	400	200	400	200	400
3 h										
前1 d	3.6±0.2	3.3±0.4	4.6±0.3	3.6±0.2	3.1±0.2	3.8±0.2	4.4±0.1	3.4±0.3	3.9±0.4	3.2±0.3
当天	3.5±0.1	3.4±0.2	4.8±0.2	3.5±0.1	3.3±0.2	4.0±0.1	4.2±0.2	3.7±0.2	4.0±0.1	3.5±0.2
12 h										
前1 d	19.4±0.5	18.6±0.6	19.0±0.7	18.7±0.3	17.9±0.8	19.5±0.7	19.3±0.8	18.1±0.9	18.5±1.1	17.8±1.0
当天	18.8±0.7	18.9±0.4	19.8±0.9	18.3±0.5	18.5±1.0	19.8±0.5	18.7±0.7	18.8±0.6	17.9±0.7	18.5±0.6

A: [D-Trp⁶]-aFGF-(1-15); B: [desaminoPhe¹.D-Trp⁶]-aFGF-(1-15); C: [desaminoPhe¹.Lys(ε-myristyl)¹⁶]-aFGF-(1-16); D: [Lys(ε-myristyl)¹⁶]-aFGF-(1-16); E: [D-Trp⁶.Lys(ε-myristyl)¹⁶]-aFGF-(1-16).

下,使组织细胞减少或免受伤害,并促进损伤后细胞再生等功能^[7-9]。但aFGF分子质量较大,合成复杂,价格昂贵,且易产生不良反应,这些限制了其临床应用前景。为了寻找具有同样生物活性的N端的aFGF片段,在本研究中设计了7种aFGF片段,通过给大鼠脑室内注射后测定摄食量变化的方法了解其生物活性。在发现了aFGF活性片段后,为了将来可能开发该细胞因子片段作为临床应用,进一步采用皮下注射的方式来观察aFGF-(1-15)和[Ala¹⁶]aFGF-(1-29)两种有活性的细胞因子片段对于大鼠夜间摄食的影响。

Sasaki *et al*^[10]的研究显示,aFGF的C端aFGF-(114-140)没有摄食抑制活性,N端aFGF-(1-15)抑制大鼠的夜间摄食,但在相同摩尔浓度下,其效果只有aFGF的1/200;相反,更长的N端片段aFGF-(1-20)和aFGF-(1-29),对大鼠的夜间摄食没有影响。本研究显示把aFGF N端aFGF-(1-15)(每只大鼠200 ng)在脑室内投与后,对大鼠的夜间摄食没有影响;而把aFGF-(1-15)(每只大鼠400 ng)在脑室内投与后,大鼠的3 h摄食量12 h摄食量均减少了,与Sasaki *et al*的实验结果一致。上述结果显示,aFGF氨基末端aFGF-(1-15)可能是具有抑制大鼠夜间摄食活性的细胞因子片段。有研究结果^[11]显示aFGF的第7-13位氨基酸序列NYKKPKL为核转运序列,我们设想aFGF-(1-15)具有抑制摄食活性可能与该结构相关。

aFGF有两个保守的半胱氨酸残基,分别位于第16位和第83位,这个半胱氨酸残基参与形成分子间二硫键,从而造成构象的改变^[10]。人型的aFGF,由于形成了二硫键,导致对于Balb/c 3T3细胞的促分裂作用消失^[12]。这提示更长的N端片段aFGF-(1-20)和aFGF-(1-29),对大鼠的夜间摄食没有影响的原因可能是第16位的半胱氨

酸残基的影响。因为考虑到分子间二硫键的形成,我们用丙氨酸代替16位的半胱氨酸残基,这是考虑到两种氨基酸均为一氨基一羧基结构,在结构上接近,等电点也相对接近,加之丙氨酸为小分子氨基酸,对肽的空间结构影响不大。结果[Ala¹⁶]-aFGF(1-29)经脑室内投与,无论是在每只大鼠200ng还是在每只大鼠400 ng均减少了大鼠的夜间摄食量。且与aFGF-(1-15)相比,无论是3 h还是12 h,[Ala¹⁶]-aFGF(1-29)抑制大鼠的夜间摄食作用更明显。该结果证实了我们的设想即用其他氨基酸残基代替aFGF片段中易参与形成分子间二硫键的第16位的半胱氨酸残基,比如丙氨酸,避免了可能的二硫键形成,从而使得该分子片段显示了其生物活性。如前所述,根据Sasaki *et al*的研究结果,aFGF-(1-15)的作用效果为其全氨基酸分子的1/200,我们设想可能aFGF的生物活性强度与其分子中氨基酸数量在一定程度上存在正比例关系,且[Ala¹⁶]-aFGF(1-29)片段较长,可能含有肝素结合的基本位点,而肝素是一类糖胺聚糖,可增加aFGF的稳定性,防止aFGF被热、极端pH变性及蛋白酶水解。所以在本研究中29个氨基酸的片段较15个氨基酸的片段显示了更强的摄食抑制作用。

为了寻找摄食抑制作用更强的N端的aFGF片段,并提高其生物利用度,增加其稳定性,防止其被代谢,我们将第1位苯丙氨酸去氨基,第6位非极性疏水甘氨酸被极性中性氨基酸右旋-色氨酸替代,第16位半胱氨酸被赖氨酸所替代,并将赖氨酸以ε-十四烷基进行化学修饰,使其无碱性,共合成五种aFGF片段,采用脑室给药进行观察,发现对大鼠的夜间摄食均没有影响,提示这些分子结构的改变所形成的新的aFGF分子片段并没有生物活性。分析原因可能是第1位苯丙氨

■名词解释

1 成纤维细胞生长因子:是一个蛋白质家族,因其对BALB/c3T3等成纤维细胞有强烈的增殖作用而得名。现发现至少已有23个成员,即FGF1-FGF23,在这些FGF家族当中被研究最多的要数有140个和146个氨基酸序列组成的aFGF及bFGF,两者具有55%的同源性。

2 酸性成纤维细胞生长因子:是FGF家族中的重要成员。由Thomas于1984年从牛脑中分离纯化得到。aFGF可促进组织细胞分裂、增殖,还具有在缺血再灌注等应急状态下对神经元、心脏、肾脏等重要器官的损伤保护和修复作用。

■同行评价

本文内容新颖, 设计合理, 结果可靠, 学术价值较好.

酸去氨基而变成酸性, 导致等电点变低; 第6位甘氨酸被右旋-色氨酸替代, 色氨酸有杂环, 为大分子氨基酸, 易造成肽的空间结构错位, 加之右旋-色氨酸为非天然氨基酸没有活性, 从而造成合成的分子片段没有生物活性; 第16位半胱氨酸被赖氨酸(ϵ -十四烷基)所替代, 可能是所带侧链 ϵ -十四烷基, 影响末端羧基发挥作用, 从而影响了其生物学活性作用. 这说明aFGF分子结构和其生物活性之间存在着相当复杂的关系, 仍有很多未知的问题需要进一步研究.

进一步的皮下注射给药[Ala¹⁶]-aFGF(1-29)同样抑制了大鼠的夜间摄食, Cuevas *et al*^[13]的研究结果显示, aFGF外周给药可以透过血脑屏障对缺血所致的大鼠海马神经元损伤起保护作用. 我们的结果提示aFGF片段外周给药起到与中枢给药同样的生理作用. 在此过程中, aFGF片段是否通过未知的外周机制影响了摄食, 目前尚没有证据. 而aFGF-(1-15)皮下注射对大鼠的夜间摄食却没有影响, 可能由于他的作用较[Ala¹⁶]-aFGF-(1-29)弱, 而我们使用的剂量没有达到足够大有关.

总之, 本研究显示, aFGF氨基酸序列的N末端及用丙氨酸代替aFGF氨基末端中半胱氨酸残基所形成的新的aFGF片段具有摄食调节生物活性, 且部分新的活性片段外周给药同样可以发挥其生物学活性. 这些结果为进一步开发aFGF的临床应用展现了一个良好的前景.

4 参考文献

- 1 Baird A, Walicke PA. Fibroblast growth factors. *Br Med Bull* 1989; 45: 438-452
- 2 Sasaki K, Oomura Y, Figueroa A, Morita N, Yanaihara N. An amino-terminal fragment peptide of acidic fibroblast growth factor modulates synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Brain Res Bull* 1995; 38: 185-191
- 3 Schober W. The rat cortex in stereotaxic coordinates. *J Hirnforsch* 1986; 27: 121-143
- 4 Hanai K, Oomura Y, Kai Y, Nishikawa K, Shimizu N, Morita H, Plata-Salamán CR. Central action of acidic fibroblast growth factor in feeding regulation. *Am J Physiol* 1989; 256: R217-R223
- 5 Oomura Y. Acidic fibroblast growth factor, a satiety substance, with diverse physiological significance. *NeuroImmune Biology* 2008; 6: 199-211
- 6 Matsumoto I, Oomura Y, Nijima A, Sasaki K, Aikawa T. Acidic fibroblast growth factor activates hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in rats. *Am J Physiol* 1998; 274: R503-R509
- 7 Lee LM, Huang MC, Chuang TY, Lee LS, Cheng H, Lee IH. Acidic FGF enhances functional regeneration of adult dorsal roots. *Life Sci* 2004; 74: 1937-1943
- 8 Luginbuehl V, Meinel L, Merkle HP, Gander B. Localized delivery of growth factors for bone repair. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 58: 197-208
- 9 Lee YS, Sindhu RK, Lin CY, Ehdiaie A, Lin VW, Vaziri ND. Effects of nerve graft on nitric oxide synthase, NAD(P)H oxidase, and antioxidant enzymes in chronic spinal cord injury. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 330-339
- 10 Sasaki K, Li AJ, Oomura Y, Muto T, Hanai K, Tooyama I, Kimura H, Yanaihara N, Yagi H, Hori T. Effects of fibroblast growth factors and related peptides on food intake by rats. *Physiol Behav* 1994; 56: 211-218
- 11 Imamura T, Engleka K, Zhan X, Tokita Y, Forough R, Roeder D, Jackson A, Maier JA, Hla T, Maciag T. Recovery of mitogenic activity of a growth factor mutant with a nuclear translocation sequence. *Science* 1990; 249: 1567-1570
- 12 Hatai M, Hashi H, Mogi A, Soga H, Yokota J, Yaoi Y. Stimulation of tyrosine- and serine-phosphorylation of focal adhesion kinase in mouse 3T3 cells by fibronectin and fibroblast growth factor. *FEBS Lett* 1994; 350: 113-116
- 13 Cuevas P, Carceller F, Muñoz-Willery I, Giménez-Gallego G. Intravenous fibroblast growth factor penetrates the blood-brain barrier and protects hippocampal neurons against ischemia-reperfusion injury. *Surg Neurol* 1998; 49: 77-83; discussion 83-84

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

世界华人消化杂志栏目设置

本刊讯 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确. (常务副总编辑: 张海宁 2009-01-28)

肝癌组织核转录因子- κ B表达与HBV复制及其临床病理学特征

王以浪, 姚登福, 吴玮, 于洪波, 赛文莉, 钱静, 李姗姗, 卞银珠

王以浪, 姚登福, 吴玮, 于洪波, 赛文莉, 钱静, 李姗姗, 卞银珠, 南通大学附属医院临床医学研究中心 江苏省南通市 226001

王以浪, 硕士, 主要从事肿瘤早期诊断及分子机制研究。

江苏省卫生科技基金资助项目, No. H200727

江苏省“六大人才高峰”基金资助项目, No. 06-B-063

作者贡献分布: 王以浪与姚登福对此文所作贡献均等; 此课题由王以浪, 姚登福, 吴玮及于洪波设计; 研究过程由王以浪, 吴玮, 于洪波, 赛文莉, 钱静, 李姗姗及卞银珠操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由姚登福提供; 数据分析由王以浪, 姚登福, 吴玮及于洪波完成; 本论文由姚登福, 王以浪及吴玮完成。

通讯作者: 姚登福, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院临床医学研究中心. yaodf@ahnmc.com

电话: 0513-85052254 传真: 0513-85052523

收稿日期: 2008-12-22 修回日期: 2009-01-03

接受日期: 2009-01-05 在线出版日期: 2009-01-28

Nuclear-transcription factor- κ B expression and HBV replication and their clinicopathological features in hepatocellular carcinoma

Yi-Lang Wang, Deng-Fu Yao, Wei Wu, Hong-Bo Yu, Wen-Li Sai, Jing Qian, Shan-Shan Li, Yin-Zhu Bian

Yi-Lang Wang, Deng-Fu Yao, Wei Wu, Hong-Bo Yu, Wen-Li Sai, Jing Qian, Shan-Shan Li, Yin-Zhu Bian, Research Center of Clinical Medicine, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Supported by: the Project of Medical Science from Health Department of Jiangsu Province, No. H200727; and the Project of Elitist Peak in Six Fields of Jiangsu Province, No. 06-B-063

Correspondence to: Professor Deng-Fu Yao, Research Center of Clinical Medicine, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. yaodf@ahnmc.com

Received: 2008-12-22 Revised: 2009-01-03

Accepted: 2009-01-05 Published online: 2009-01-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of nuclear-transcription factor- κ B (NF- κ B) in different tissues of hepatocellular carcinoma (HCC) and its correlation with the clinicopathological features of HCC.

METHODS: Immunohistochemistry was used to detect NF- κ B expression in 35 HCC tissues and in their corresponding non-cancerous tissues.

Liver HBV-DNA was detected by in situ molecular hybridization technique. The relationship between NF- κ B expression and HBV replication, and clinical pathological characteristics was analyzed. Fisher's exact test was used to analyze the numeration data, and rank sum test was used to analyze the ranked data.

RESULTS: The positive NF- κ B material was brown granule-like stained substance, the NF- κ B with dot-nest-like staining was localized in nucleus and cytoplasm in HCC, and only in cytoplasm in its surrounding tissues. Its expression in HCC was well-distributed and stronger than its surrounding tissues. The incidence of NF- κ B positive expression was 100% in HCC tissues, and 68.6% in its surrounding tissues, respectively. Significant difference was found between the two groups (Fisher's exact = 0.000). No positive relationship presented itself between NF- κ B expression and histological differentiation grading, the number of tumor, the size of tumor or the level of AFP and ALT. The expression level of NF- κ B was significantly higher in HBV-DNA-positive HCC group than that in HBV-DNA-negative ones ($t = 4.7347$, $P = 0.000$).

CONCLUSION: The overexpression of hepatic NF- κ B was closely associated with the occurrence and development of HCC, and it could be a marker for early diagnosis and prognosis of HCC.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Nuclear-transcription factor- κ B; Immunohistochemistry

Wang YL, Yao DF, Wu W, Yu HB, Sai WL, Qian J, Li SS, Bian YZ. Nuclear-transcription factor- κ B expression and HBV replication and their clinicopathological features in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(3): 265-269

摘要

目的: 探讨核转录因子(NF)- κ B在HBV相关肝癌组织中的表达及其临床病理学关系。

方法: 采用免疫组织化学方法, 分别检测35例

■背景资料

HCC是全球最常见的恶性肿瘤之一, 每年有50余万新发病例, 其中一半在中国。HCC发生发展具多病因、多中心和多阶段特征, 肝炎病毒感染引起肝脏慢性炎症是其主要发病背景。

■同行评议者

谭学瑞, 教授, 汕头大学医学院第一附属医院院长室

■研究前沿

NF- κ B是一种具有广泛生物活性的核转录因子,作为细胞内信号传递的一个枢纽参与了多种肿瘤的形成,在慢性炎症所致的HCC中起了桥梁作用,NF- κ B信号通路近年来已成为HCC防治的研究热点.

肝癌灶组及其自身对照的非癌组NF- κ B的表达;以生物素标记的HBV DNA探针检测肝癌组织中HBV DNA,并分析NF- κ B表达与HBV复制及其临床病理学特征之间的关系.计数资料用Fisher确切概率法处理,等级资料用秩和检验处理.

结果: NF- κ B阳性表达物呈棕黄色颗粒状染色,癌组织中NF- κ B呈点灶状表达,定位于胞质和细胞核;而癌周组织NF- κ B主要在胞质表达,细胞核未见阳性表达.癌组织NF- κ B表达强度明显高于癌周组织;癌组织NF- κ B表达阳性率为100%,癌周组织为68.6%,二者差异显著(Fisher's exact = 0.000).肝癌组织中NF- κ B的表达强度与肿瘤分化程度、肿瘤数目、肿瘤直径等临床病理学特征无关. HBV DNA阳性肝癌组织中NF- κ B比浓度显著高于HBV DNA阴性组($t = 4.7347, P = 0.0000$).

结论: 肝癌组织NF- κ B过表达与HBV相关肝癌的发生、发展密切相关,可作为肝癌早期诊断及预后判断的标志.

关键词: 肝细胞癌;核转录因子- κ B;免疫组织化学

王以浪,姚登福,吴玮,于洪波,赛文莉,钱静,李姗姗,卞银珠.肝癌组织核转录因子- κ B表达与HBV复制及其临床病理学特征.世界华人消化杂志 2009; 17(3): 265-269

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/265.asp>

0 引言

核转录因子- κ B(nuclear-transcription factor- κ B, NF- κ B)是首先在B细胞中发现的一种能与免疫球蛋白 κ 轻链增强子B区特异性结合的蛋白因子,后证实其广泛存在于真核细胞内,能与多种细胞基因启动子或增强子特定位点结合而促进基因转录、表达^[1].持续肝炎病毒感染导致肝脏慢性炎症是原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的主要发病背景,炎症介质和病毒癌基因可使NF- κ B异常活化,活化的NF- κ B进入细胞核内调节靶基因表达,抑制肝细胞凋亡,促进肝细胞转化,在肝细胞炎症与癌变间起桥梁作用^[2].肝癌组织中NF- κ B高表达,其参与癌症的启动、发生及发展过程,但肝癌中NF- κ B表达临床病理学特征尚不清楚^[3].本研究按自身配对法留取肝癌术后癌灶和癌周组织,分析了组织中NF- κ B表达、胞内分布与HBV DNA复制及其临床病理特征.

1 材料和方法

1.1 材料 于2005-2008年按自身配对法收取南通

大学附属医院原发性肝癌患者(男49例,女16例)术后新鲜肝脏组织,分别留取肝癌切除后的癌灶组织、癌周组织(距癌灶边缘5 cm)各35份(每份约200 mg),除部分作组织病理学检查外,其余组织置-85℃保存备用.35份标本中肝癌肿块直径 ≥ 5 cm有7例, < 5 cm有28例(其中 < 3.0 cm肝癌17例),肝癌患者年龄范围在35-69岁,平均年龄 50.9 ± 9.8 岁.标本经组织病理学(HE染色)证实其类型均为肝细胞肝癌,其中高分化、中分化和低分化分别为7例、22例及6例;肿瘤单发者30例, ≥ 2 个者5例.所有病例均有完整随访资料,按全国肝癌防治协作组制定的标准核实诊断.

1.2 方法

1.2.1 肝组织匀浆制备和核蛋白提取:取新鲜肝组织50 mg,剪成碎片置于经高压灭菌的匀浆器中,按细胞核蛋白与细胞质蛋白抽提试剂(碧云天生物技术有限公司)使用说明进行核蛋白提取.方法主要为:加入适当量的组织匀浆液(由细胞质蛋白抽提试剂A、B和PMSF按一定比例配制而成),冰浴中充分匀浆,离心后移去上清(部分浆蛋白),再加入含有PMSF的细胞质蛋白抽提试剂A,震荡和冰浴后加入试剂B,再次震荡冰浴,离心后移上清(浆蛋白),此时加入含有PMSF的核蛋白提取试剂,经反复震荡冰浴30 min后,离心吸取上清(即核蛋白),置于-85℃冰箱保存备用.

1.2.2 肝组织总RNA制备:取新鲜肝组织50 mg,剪成碎片于RNA later液中,4℃过夜去除上层液体,置于经0.1% DEPC水处理的匀浆器中,加入TRIzol试剂(Gibco, USA)2 mL,冰上匀浆肝组织后,吸1.5 mL匀浆液至离心管中,室温静置3-5 min;加入氯仿,激烈振荡混匀;于4℃ 12000 r/min,离心15 min;小心吸出上层水相于另一离心管中,加入异丙醇;-20℃沉淀30 min;4℃ 12000 r/min,离心10 min;小心弃上清;沉淀中加入750 mL/L乙醇,4℃ 12000 r/min,离心10 min;重复洗涤1次;去上清,稍微晾干,加入适当体积(30 μ L)无核酸酶水,充分溶解.在UV2201型紫外分光光度计上测定 A_{260} 和 A_{280} 值,比率在1.9-2.1之间.

1.2.3 肝组织NF- κ B定量方法:肝组织核蛋白以BCA法测定.NF- κ B活性测定按Trans AM(Active Motif提供)说明书进行.其方法:每孔加结合缓冲液30 μ L和10 μ L细胞核蛋白提取液,并加细胞溶解液(CLB)20 μ L.阳性对照孔中加2.5 μ g Jurkat核提取物并稀释到20 μ L CLB中,空白孔中加

■相关报道

Beg et al报道HBV X基因编码的X蛋白与NF- κ B在细胞内定位有关,其激活肝细胞中NF- κ B信号途径的上游激酶,通过激酶的级联反应,使I κ B α 磷酸化并降解,细胞质中解离的NF- κ B移位入核内使转录功能,X蛋白对NF- κ B的激活可能是HBV感染诱发HCC的主要原因之一.

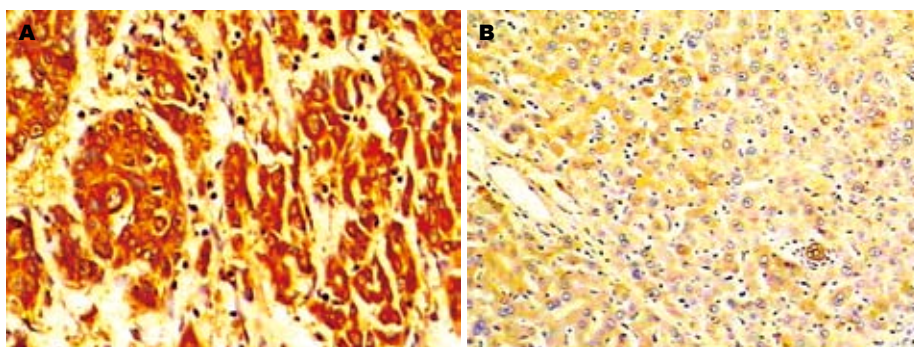


图1 肝组织NF- κ B表达(SP \times 200). A: 肝癌; B: 癌周.

■创新盘点

对于NF- κ B在HCC形成中的作用机制多集中在细胞水平, 本实验研究了NF- κ B在人肝癌组织中表达特点、细胞内分布、与肝癌相关临床病理特征以及HBV DNA复制关系, 尚少见报道.

CLB液20 μ L. 标准孔中依次加20 μ L重组蛋白P50或P65, 封板后置于震荡培养箱中室温孵育1 h. 每孔以洗涤液200 μ L洗3次. 然后加入100 μ L稀释的NF- κ B抗体, 封板后置室温孵育1 h, 再以洗涤液200 μ L洗3次. 每孔加100 μ L HRP结合的抗体, 封板后置室温震荡1 h, 以洗涤液200 μ L洗4次. 每孔加100 μ L显色剂, 室温置2-10 min, 加终止液100 μ L, 于450 nm处测定其吸光度值(A_{450}), 根据标准曲线计算出蛋白浓度.

1.2.4 肝组织HBV DNA检测: 取肝癌的癌灶及癌旁组织, 经40 g/L中性甲醛固定, 石蜡包埋, 组织切片, 脱蜡水化, 蒸馏水冲洗, 37 $^{\circ}$ C烘干, 蛋白酶K(20 mg/L)室温下消化30 min, 脱水, 37 $^{\circ}$ C烘干, 加生物素标记的HBV DNA探针, 加盖玻片, 加热(95 $^{\circ}$ C)10 min(变性), 37 $^{\circ}$ C过夜, 加蛋白阻断液, 37 $^{\circ}$ C 5 min, 滴加羊抗鼠生物素IgG, 37 $^{\circ}$ C 20 min, 37 $^{\circ}$ C的增强洗液冲洗, 甩干; 加羊抗鼠IgG, 37 $^{\circ}$ C 20 min, 37 $^{\circ}$ C的增强洗液中洗, 甩干; 加入碱性磷酸酶标记的结合物(SAP), 37 $^{\circ}$ C 20 min, 37 $^{\circ}$ C的增强洗液冲洗, 甩干; 加入BCIP/NBT染色, 蒸馏水冲洗, 复染封片.

1.2.5 免疫组织化学分析NF- κ B(SP法): 兔抗人NF- κ B多克隆抗体及S-P免疫组化试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司. 新鲜肝组织以40 g/L中性甲醛固定, 石蜡包埋, 制成厚度4 μ m的组织切片. 按常规脱蜡、水化; 双氧水阻断内源性过氧化物酶; 高压加热法修复抗原; 正常动物血清封闭非特异性结合; 滴加NF- κ B抗体, 4 $^{\circ}$ C过夜, 磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗; 滴加生物素标记的第二抗体, 室温孵育10 min, PBS漂洗; 滴加链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶, 室温10 min, PBS冲洗; 滴加新鲜配制的四盐酸二氨基联苯胺(DAB)溶液, 显色, 水洗; 复染. 透明、封片. Olympus BX 50光学显微镜观察、摄像. 以0.01 mol/L PBS液(pH = 7.5)分别替代一抗、二抗和SP试剂作阴性对照, 已知表达NF- κ B的肝癌组织作阳性对照. NF- κ B表达强度, 以阳性细胞数

$\geq 10\%$ 作为阳性判断标准, 进而根据阳性细胞百分率分为NF- κ B表达弱阳性(+): 阳性细胞数为10%-25%; NF- κ B表达阳性(++): 阳性细胞数为26%-75%; NF- κ B表达强阳性(+++): 阳性细胞数 $> 75\%$.

统计学处理 人肝癌组织分为癌灶组与自身对照的癌周组进行比较. 以Stata7.0统计软件进行分析, 计数资料用Fisher确切概率法分析和处理, 等级资料用秩和检验分析和处理, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性.

2 结果

2.1 肝癌组织中NF- κ B表达与定量分析 肝癌及癌周组织中NF- κ B阳性表达呈棕黄色. 癌组织NF- κ B表达呈巢状分布, 深染, 胞质和胞核均阳性; 而对应的癌周组织NF- κ B表达主要定位于胞质, 胞核无明显阳性着色(图1). 癌组织中NF- κ B全数表达, 且强度明显高于癌周组织. 肝癌组与癌周组间, 其表达阳性率(Fisher's exact = 0.000)和表达强度($U = 4.373$, $P < 0.01$)均存在明显差异. 肝癌组的肝NF- κ B浓度为 69.3 ± 40.2 ng/g肝组织, 癌周组为 21.0 ± 17.2 ng/g肝组织, 肝癌组比癌周组大约高3倍($t = 6.04$, $P < 0.01$).

2.2 肝癌组织NF- κ B表达的病理学特征分析 肝癌组织中NF- κ B表达的病理学特征分析见表1. 癌组织NF- κ B全数阳性, 其强度与肿瘤的分化程度、数目和大小、AFP以及ALT水平间的关系经秩和检验均未见明显的统计学差异.

2.3 癌旁组织NF- κ B表达的病理学特征分析 癌旁组织NF- κ B表达与癌灶组织相比, 表达强度低, 有近1/3组织中未见阳性表达(表2). 癌旁组织中NF- κ B阳性率为68.6%(24/35), 其表达阳性率和表达强度与分化程度、肿瘤数目与直径、AFP及ALT水平间, 经确切概率法和秩和检验分析同样未见明显的统计学差异.

2.4 肝癌组织NF- κ B表达与HBV复制关系 肝癌组织HBV复制与NF- κ B表达关系分析见表3. 肝

■应用要点

NF- κ B信号通路是HCC形成机制中的重要一环,可以成为HCC基因治疗的有力靶点。

表 1 肝癌组织中NF- κ B表达的病理学特征分析

分组	n	NF- κ B表达 阳性(%)	NF- κ B表达强度				U值	P值
			-	+	++	+++		
分化程度								
高	7	7(100)	0	0	2	5		
中	22	22(100)	0	4	8	10	0.403	>0.05 ^a
低	6	6(100)	0	0	3	3	0.571	>0.05 ^a
肿瘤数目								
单发	30	30(100)	0	4	12	14		
多发	5	5(100)	0	0	1	4	1.251	>0.05
肿瘤直径(cm)								
>5	7	7(100)	0	2	1	4		
<5	28	28(100)	0	2	12	14	0.144	>0.05
AFP(μ g/L)								
>400	12	12(100)	0	1	5	6		
<400	23	23(100)	0	3	8	12	0.000	>0.05
ALT(U/L)								
>50	11	11(100)	0	1	3	7		
<50	24	24(100)	0	3	10	11	0.798	>0.05

^a与高分化组比较。表 2 肝癌癌旁组织中NF- κ B表达的病理学特征分析

分组	n	NF- κ B表达 阳性(%)	Fisher值	NF- κ B表达强度				U值	P值
				-	+	++	+++		
分化程度									
高	7	7(100)		0	4	3	0		
中	22	14(63.6)	0.045	8	3	7	4	0.204	>0.05 ^a
低	6	3(50.0)	0.155	3	1	2	0	0.819	>0.05 ^a
肿瘤数目									
单发	30	20(66.7)		10	6	10	4		
多发	5	4(80.0)	0.774	1	2	2	0	0.024	>0.05
肿瘤直径(cm)									
>5	7	4(57.1)		3	2	1	1		
<5	28	20(71.4)	0.651	8	6	11	3	0.722	>0.05
AFP(μ g/L)									
>400	12	9(75.0)		3	3	6	1		
<400	23	15(69.6)	0.424	8	4	7	3	1.044	>0.05
ALT(U/L)									
>50	11	9(81.8)		2	4	5	0		
<50	24	15(62.5)	0.230	9	3	8	4	0.018	>0.05

^a与高分化组比较。表 3 肝癌组织HBV复制与NF- κ B表达关系分析

分组	n	NF- κ B比浓度 mean \pm SD(ng/g肝)	表达强度				U值	P值
			-	+	++	+++		
HBV DNA阳性	23	89.3 \pm 52.8 ^a	0	0	5	18	4.080	<0.01
HBV DNA阴性	12	31.3 \pm 18.6	0	4	8	0		

 $t = 4.7347$, ^a $P = 0.0000$ vs HBV DNA阴性组。

癌组织中均有NF- κ B表达,但在HBV DNA阳性组和阴性组间,癌组织NF- κ B比浓度(ng/g肝)明显高于癌周组织;NF- κ B表达强度也存在明显差异,癌组织显著增强。HBV DNA阳性组23例中,其表达强度均在中等阳性表达以上,其中强阳性表达为主(78.3%);HBV DNA阴性组12例阳性中,其表达强度以中等阳性表达为主,未见强阳性表达病例。

3 讨论

NF- κ B是一种具有广泛生物活性的核转录因子,作为细胞内信号传递的一个枢纽参与多种生理过程的调控,其表达异常会导致机体的多种病理改变。当细胞处于静息状态时,NF- κ B主要位于胞质中,与NF- κ B抑制蛋白(I κ B)家族成员结合,形成无活性的三聚体。当其受到细胞因子、有丝分裂原、病毒等刺激后,I κ B α 通过磷酸化、泛素化降解,使NF- κ B的核定位信号暴露,

引导NF- κ B进入到细胞核内,活化的NF- κ B与靶基因顺式调节元件上的 κ B位点上特异序列结合而诱导相关基因的转录,进而发挥抑制细胞凋亡、诱导细胞恶性转化、促进肿瘤侵袭转移和对化学药物耐药等作用^[4]。本研究分析了人HCC及配对癌周组织中NF- κ B的表达特点、胞内定位、比浓度及临床病理特征。

HCC发生发展具多病因、多中心和多阶段特征^[5]。我国HCC患者中90%伴HBV感染,HBV或HCV持续感染,引起肝细胞长期慢性炎症,使肝脏损伤和肝硬化,而易罹患HCC^[6-8]。研究表明炎症相关性HCC形成过程中涉及多种基因表达改变、众多信号通路异常激活,NF- κ B信号通路是其中重要一环^[9-13]。其上调炎症反应介质如TNF- α ,化学因子和白介素的表达,而炎症介质和化学因子又可以进一步激活NF- κ B,形成正反馈放大机制,进而选择性促进癌前病变细胞的存活,致使肝细胞基因损伤不断积累而向恶性

表型转化^[14-15]。研究发现NF- κ B表达阳性率在癌组织明显高于癌周组织, 且阳性强度亦明显高于癌周组织; 肝癌细胞中NF- κ B的mRNA表达量明显比正常肝细胞高, 表明NF- κ B与HCC形成密切相关。

HBV的X基因编码的X蛋白在HBV相关HCC的形成过程中起了重要作用^[16-18]。有研究报道X蛋白与NF- κ B在细胞内定位有关, X蛋白对NF- κ B的激活可能是HBV感染诱发HCC的主要原因之一^[19]。本研究对HBV相关HCC的NF- κ B表达定位分析发现, NF- κ B在HCC的胞核内有点灶状阳性表达, 而癌周组织未发现胞核内表达, 提示NF- κ B是被激活后进入胞核内发挥其转录活性, 从而参与HCC的发生发展。HBV DNA是病毒复制和传染性的直接标志, 其测定为判断HBV复制、传染性大小、抗病毒药物疗效、病情变化和预后、调整抗病毒药物剂量、确定疗程提供可靠依据。在本组资料中NF- κ B表达在HBV DNA阳性与阴性组间差别十分明显, 提示HBV复制与NF- κ B表达明显相关。在与HBsAg之间, 显示HBsAg阳性病例癌组织与癌周组织NF- κ B强度均有高于HBsAg阴性病例趋势, 但在统计学上未见有明显差异。

对照临床资料分析发现在HCC中NF- κ B阳性及强度与分化程度、肿瘤数目和大小以及患者AFP和ALT水平间均未见统计学差异, 提示NF- κ B异常激活可能是HCC形成的早期分子事件, 这有助于HCC的早期诊断、治疗。对诱导大鼠肝癌模型研究也观察到NF- κ B在诱癌早期即有过表达, 且随着肝细胞变性、癌前病变和癌变表达逐渐增强。用NF- κ B抑制剂喂饲大鼠后, NF- κ B表达明显下调, 且肝脏病变程度明显变轻。

总之, NF- κ B信号通路异常激活与HBV相关性HCC形成密切相关, 靶向NF- κ B信号通路的基因治疗可在多途径、多位点阻止HCC的发生、发展及进展。

4 参考文献

- Karin M. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. *Nature* 2006; 441: 431-436
- Li Q, Withoff S, Verma IM. Inflammation-associated cancer: NF- κ B is the lynchpin. *Trends Immunol* 2005; 26: 318-325
- 姚登福, 苏小琴. 肝细胞核因子- κ B异常激活与肝细胞癌变. *中华肝脏病杂志* 2006; 14: 539-540
- Moynagh PN. The NF- κ B pathway. *J Cell Sci* 2005; 118: 4589-4592
- Peto J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* 2001; 411: 390-395
- Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2002; 31: 339-346
- Raza SA, Clifford GM, Franceschi S. Worldwide variation in the relative importance of hepatitis B and hepatitis C viruses in hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Br J Cancer* 2007; 96: 1127-1134
- Orito E, Mizokami M. Hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma in Japan. *Intervirology* 2003; 46: 408-412
- Yao D, Jiang D, Huang Z, Lu J, Tao Q, Yu Z, Meng X. Abnormal expression of hepatoma specific gamma-glutamyl transferase and alteration of gamma-glutamyl transferase gene methylation status in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2000; 88: 761-769
- Yao DF, Wu XH, Zhu Y, Shi GS, Dong ZZ, Yao DB, Wu W, Qiu LW, Meng XY. Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor, microvascular density and their clinicopathologic features in human hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 220-226
- Dong ZZ, Yao DF, Yao DB, Wu XH, Wu W, Qiu LW, Jiang DR, Zhu JH, Meng XY. Expression and alteration of insulin-like growth factor II-messenger RNA in hepatoma tissues and peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4655-4660
- 姚登福, 顾文静, 李月明. 肝细胞癌变过程中相关生长因子的表达与动态变化. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2570-2575
- 宗蕾, 姚登福, 吴玮, 邱历伟, 吴信华. Bcl-2在肝细胞癌变过程中凋亡抑制作用的动态分析. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2279-2283
- 董志珍, 姚登福, 苏小琴, 姚敏, 吴信华, 邱历伟, 吴玮. 肝癌形成过程中基因表达谱及转录核因子- κ B动态改变. *胃肠病学和肝病杂志* 2007; 16: 580-584
- Karin M, Greten FR. NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 749-759
- Kim DG. Differentially expressed genes associated with hepatitis B virus HBx and MHBs protein function in hepatocellular carcinoma. *Methods Mol Biol* 2006; 317: 141-155
- Zhang X, Zhang H, Ye L. Effects of hepatitis B virus X protein on the development of liver cancer. *J Lab Clin Med* 2006; 147: 58-66
- Chan DW, Ng IO. Knock-down of hepatitis B virus X protein reduces the tumorigenicity of hepatocellular carcinoma cells. *J Pathol* 2006; 208: 372-380
- Wang T, Wang Y, Wu MC, Guan XY, Yin ZF. Activating mechanism of transcription NF- κ B regulated by hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 356-360

■同行评价

本文立题明确, 方法可靠, 层次清晰, 讨论简洁且重点突出切题, 具有较好的科学价值。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

Aurora-B在肝癌组织中的表达及其意义

单人锋, 周福庆, 吴波, 肖国胜, 饶雪峰, 彭贵主

■背景资料

改变染色体的数量(整倍体)是人类恶性肿瘤发生的主要原因, 有丝分裂过程控制的错误可导致细胞非整倍体的产生, 在恶性肿瘤发展中起促进作用, 近年来研究显示, Aurora-B可广泛表达于人类各种肿瘤, 包括食管癌、胃癌、膀胱癌、结肠癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌等, 但目前国内未见Aurora-B在肝癌中表达与预后关系的报道。

单人锋, 周福庆, 吴波, 肖国胜, 饶雪峰, 彭贵主, 南昌大学第一附属医院肝胆外科-移植科 江西省南昌市 330006

单人锋, 主治医师, 硕士, 主要从事肝脏疾病与门脉高压症的临床与基础研究。

作者贡献分布: 单人锋对此文作出主要贡献; 此课题由单人锋, 周福庆, 吴波, 肖国胜, 饶雪峰及彭贵主设计; 研究过程单人锋操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由单人锋提供; 数据分析由单人锋, 周福庆及吴波完成, 本论文写作由单人锋完成。

通讯作者: 单人锋, 330006, 江西省南昌市, 江西南昌大学第一附属医院肝胆外科-移植科. shanrenfeng1978@sina.com

收稿日期: 2008-09-27 修回日期: 2008-12-14

接受日期: 2008-12-22 在线出版日期: 2009-01-28

Expression of Aurora-B in hepatocarcinoma and its clinical significance

Ren-Feng Shan, Fu-Qing Zhou, Bo Wu, Guo-Shen Xiao, Xue-Feng Rao, Gui-Zhu Peng

Ren-Feng Shan, Fu-Qing Zhou, Bo Wu, Guo-Shen Xiao, Xue-Feng Rao, Gui-Zhu Peng, Department of Liver-kidney Surgery & Transplantation Center, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Ren-Feng Shan, Department of Liver-kidney Surgery & Transplantation Center, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. shanrenfeng1978@sina.com

Received: 2008-09-27 Revised: 2008-12-14

Accepted: 2008-12-22 Published online: 2009-01-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of Aurora-B in hepatocarcinoma and to assess its possibility as a new indicator for hepatocarcinoma prognosis.

METHODS: Samples from 80 pathologically confirmed HCC patients were analyzed for Aurora-B expression using immunohistochemistry. The relationship between Aurora-B expression and clinical data including staging, gender, clinical stage, and prognosis were analyzed.

RESULTS: The Aurora-B expression rate was 68.8%. Significant difference was detected between Aurora-B expression and clinical staging, tumor size, tumor in complicated with portal tumor thrombus ($\chi^2 = 99.9669, 20.8185, 28.5214$, all $P < 0.05$). For 80 patients undergoing hepatectomy, Aurora-B expression was significantly related to 1-year, 2-year recurrent rate and sur-

vival rate ($\chi^2 = 5.7702, 5.4257$, all $P < 0.05$; $\chi^2 = 11.8787, 10.4497$, all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Aurora-B is expressed at a high level in hepatocarcinoma. Its expression may be associated with the tumor stage and the prognosis of hepatocarcinoma patients.

Key Words: Hepatocarcinoma; Aurora-B; Prognosis

Shan RF, Zhou FQ, Wu B, Xiao GS, Rao XF, Peng GZ. Expression of Aurora-B in hepatocarcinoma and its clinical significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(3): 270-272

摘要

目的: 了解基因Aurora-B在肝癌中的表达及其作为预测肝癌预后的新指标的可能性。

方法: 收集2001-2007年我院初治的肝癌患者标本80例, 病理证实均为肝细胞癌。用免疫组化法检测患者标本中Aurora-B的表达, 分析Aurora-B的表达与肝癌患者年龄、性别、临床分期等的关系及其与预后的关系。

结果: Aurora-B在肝癌标本中的表达率为68.8%; 临床分期、肿瘤大小、肿瘤合并门静脉癌栓与Aurora-B表达阳性率的差异有统计学意义($\chi^2 = 99.9669, 20.8185, 28.5214$, 均 $P < 0.05$)。80例根治性肝癌切除的病例中, Aurora-B表达与肝细胞癌1, 2年复发率和生存率之间有关($\chi^2 = 5.7702, 5.4257$, 均 $P < 0.05$; $\chi^2 = 11.8787, 10.4497$, 均 $P < 0.05$)。

结论: Aurora-B在肝癌组织中有一定程度表达, 其表达与肝癌临床分期及预后相关。

关键词: 肝癌; Aurora-B; 预后

单人锋, 周福庆, 吴波, 肖国胜, 饶雪峰, 彭贵主. Aurora-B在肝癌组织中的表达及其意义. *世界华人消化杂志* 2009; 17(3): 270-272

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/270.asp>

0 引言

Aurora-B是一种中心体上的功能性激酶, 属于

■同行评议者

宋振顺, 教授, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科

Aurora激酶家族成员, 已被证明是一种癌蛋白。近年来研究显示, Aurora-B可广泛表达于人类各种肿瘤, 包括食管癌、胃癌、膀胱癌、结肠癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌等^[1-4], 但目前国内未见Aurora-B在肝癌中表达与预后关系的报道。本文探讨Aurora-B在肝癌中的表达情况, 结合随访资料, 了解其作为肝癌预后预测的新指标及肝癌治疗的分子靶点的可能性。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2001-2007年我院初治的肝癌患者标本共80例, 病理证实均为肝细胞癌。其中男64例, 女16例; 年龄27-67(中位年龄43)岁。临床分期按UICC(1997)分期, I期7例, II期18例, III期50例, IV期5例; 均采用肝癌切除术+术中经肝动脉化疗导管植入术, 术后给予四次预防性化疗, 患者随访10-66 mo, 中位随访时间为36.6 mo。另取癌旁1 cm的病理标本30例作为对照。

1.2 方法 标本用40 g/L甲醛溶液固定, 常规石蜡病理切片, 脱蜡水化, 用高温高压进行抗原修复, PBS漂洗2 min, 置入30 mL/L H₂O₂ 10 min, PBS漂洗5min, 共3次, 正常血清37℃孵育15 min, 加入一抗(Aurora-B, Santa Cruzs产品, 1/200)4℃冰箱孵育过夜, 用PBS漂洗5 min, 共3次, 加入二抗37℃孵育60 min, PBS漂洗5 min, 共3次, DAB显色, 苏木精复染细胞核, 中性树胶封片。结果判断: 镜下观察胞核出现棕黄色颗粒的肿瘤细胞数>30%为阳性。

统计学处理 结果用SPSS11.0进行统计分析, Aurora-B表达与临床病理参数的关系及生存率和复发率采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 Aurora-B在肝癌及癌旁组织中的表达 80例肝癌中55例Aurora-B表达阳性, 阳性率为68.8%; 30例肝癌旁组织2例Aurora-B表达阳性, 阳性率为6.67%($\chi^2=97.6885, P<0.001$, 图1)。

2.2 Aurora-B表达与临床病理参数的关系 临床分期、肿瘤大小、肿瘤合并门静脉癌栓与Aurora-B表达阳性率的差异有统计学意义($P<0.05$), 未发现Aurora-B表达阳性率与年龄、性别、AFP水平有关(表1)。

2.3 Aurora-B表达与肝细胞癌的复发率和生存率之间关系 80例根治性肝癌切除的病例中, Aurora-B表达与肝细胞癌复发率之间有关, Aurora-B表达阳性的患者术后1, 2年的复发率

表 1 Aurora-B表达与临床参数关系 (%)

分组	Aurora-B		χ^2	P
	表达	不表达		
年龄(岁)			0.05667	>0.05
≥40	45	21		
<40	10	4		
性别			0.40299	>0.05
男	45	19		
女	10	6		
AFP水平(μg/L)			0.02518	>0.05
升高	47	21		
正常	8	4		
合并门静脉癌栓	27	3	99.9669	<0.05
无门静脉癌栓	3	47		
肿瘤大小(cm)			20.8185	<0.05
>5	45	10		
<5	10	15		
肝癌分期			28.5214	<0.05
I期	2	5		
II期	5	13		
III期	43	7		
IV期	5	0		

较表达阴性的患者明显升高(45.4% vs 16%, $\chi^2=5.7702, 72.7\% \text{ vs } 32\%, \chi^2=11.8787$, 均 $P<0.05$)。80例中Aurora-B的表达与肝细胞癌生存率之间存在密切关系。Aurora-B表达阳性的患者1年和2年的生存率较表达阴性的患者明显降低(76.3% vs 100%, $\chi^2=5.4257, 45.4\% \text{ vs } 84\%, \chi^2=10.4497$, 均 $P<0.05$)。

3 讨论

哺乳动物细胞Aurora-B激酶家族迄今发现有3个成员: Aurora-A, Aurora-B及Aurora-C。其中Aurora-B又称为染色质过客蛋白激酶, 是一种有丝分裂所必需的蛋白, 决定着细胞染色体的分离和胞质分裂。改变染色体的数量(整倍体)是人类恶性肿瘤发生的主要原因, 有丝分裂过程控制的错误可导致细胞非整倍体的产生, 在恶性肿瘤发展中起促进作用^[5-8]。

目前认为人类一些恶性肿瘤如: 子宫内膜癌、肺癌、鼻咽癌等均与Aurora-B在组织中过度表达有关系^[8-12], 但国内尚无关于肝癌方面的研究。该项研究结合临床分析了Aurora-B在肝癌中的表达情况, 并对其与肝癌的预后及相关临床参数进行了分析。结果显示Aurora-B在肝癌组织中的表达阳性率较癌旁组织中的表达阳性

■名词解释

Aurora-B: 又称为染色质过客蛋白激酶, 是一种有丝分裂所必需的蛋白, 决定着细胞染色体的分离和胞质分裂。

■同行评价

本文选题尚可, 写作流畅, 参考文献引用较新, 但学术价值一般.

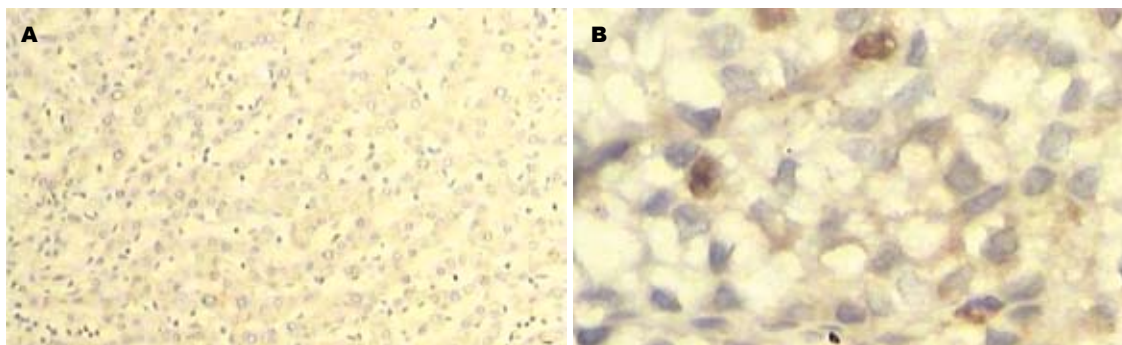


图1 肝组织Aurora-B的表达. A: 癌旁正常肝组织($\times 200$); B: 原发性肝癌组织($\times 400$).

率明显增高, 说明肝癌组织中Aurora-B表达更为活跃. 临床分期、肿瘤大小、肿瘤合并门静脉癌栓与Aurora-B表达阳性率的差异有统计学意义($P < 0.05$), 未发现Aurora-B表达阳性率与年龄、性别、AFP水平有关, 说明在越晚期的肝癌中Aurora-B表达越活跃, Aurora-B的表达能初步反映肿瘤的早晚程度. 在随访的研究中我们发现Aurora-B与肝癌的复发率及生存率存在一定关系, Aurora-B表达阳性的肝癌患者肿瘤的复发率较阴性为高, 而生存率则恰恰相反, 可能是分期影响预后. 只能说明表达强弱与预后相关.

通过研究我们初步推断, Aurora-B的检测可以作为肝癌的初步筛选指标, 并对于临床分期及术后患者预后的判断有一定的帮助, 但该指标的量化工作还需进一步研究.

4 参考文献

- 1 Macarulla T, Ramos FJ, Tabernero J. Aurora kinase family: a new target for anticancer drug. *Recent Patents Anticancer Drug Discov* 2008; 3: 114-122
- 2 Katayama H, Brinkley WR, Sen S. The Aurora kinases: role in cell transformation and tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev* 2003; 22: 451-464
- 3 Fu J, Bian M, Jiang Q, Zhang C. Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol Cancer Res* 2007; 5: 1-10
- 4 Li JJ, Li SA. Mitotic kinases: the key to duplication, segregation, and cytokinesis errors, chromosomal instability, and oncogenesis. *Pharmacol Ther* 2006; 111: 974-984
- 5 Venoux M, Basbous J, Berthenet C, Prigent C, Fernandez A, Lamb NJ, Rouquier S. ASAP is a novel substrate of the oncogenic mitotic kinase Aurora-A: phosphorylation on Ser625 is essential to spindle formation and mitosis. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 215-224
- 6 Naruganahalli KS, Lakshmanan M, Dastidar SG, Ray A. Therapeutic potential of Aurora kinase inhibitors in cancer. *Curr Opin Investig Drugs* 2006; 7: 1044-1051
- 7 Katzel JA, Mazumder A, Jagannath S, Vesole DH. Engraftment syndrome after hematopoietic stem cell transplantation in multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma* 2006; 7: 151
- 8 Warner SL, Bearss DJ, Han H, Von Hoff DD. Targeting Aurora-2 kinase in cancer. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 589-595
- 9 Mountzios G, Terpos E, Dimopoulos MA. Aurora kinases as targets for cancer therapy. *Cancer Treat Rev* 2008; 34: 175-182
- 10 Mortlock A, Keen NJ, Jung FH, Heron NM, Foote KM, Wilkinson R, Green S. Progress in the development of selective inhibitors of Aurora kinases. *Curr Top Med Chem* 2005; 5: 199-213
- 11 Farmer JP, Lamba M, Lamba WR, Jordan DR, Gilberg S, Sengar DP, Bence-Bruckler I, Burns BF. Lymphoproliferative lesions of the lacrimal gland: clinicopathological, immunohistochemical and molecular genetic analysis. *Can J Ophthalmol* 2005; 40: 151-160
- 12 Ducat D, Zheng Y. Aurora kinases in spindle assembly and chromosome segregation. *Exp Cell Res* 2004; 301: 60-67

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

维生素D受体基因多态性与酒精性肝病的相关性

孙平, 王沁

孙平, 王沁, 兰州大学第一医院消化科 甘肃省兰州市 730000
孙平, 兰州大学硕士在读, 研究方向为酒精性肝病的分子机制及防治研究。

甘肃省科技攻关资助项目, No. 2GS054-A43-014-26

作者贡献分布: 孙平与王沁对此文所做贡献均等; 此课题由孙平及王沁设计; 研究过程由孙平与王沁操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由王沁提供; 数据分析由孙平与王沁共同完成; 本文写作由孙平与王沁完成。

通讯作者: 王沁, 730000, 甘肃省兰州市, 兰州大学第一医院消化科, chencp@lzu.edu.cn

电话: 0931-8625200-6205

收稿日期: 2008-11-04 修回日期: 2008-12-12

接受日期: 2008-12-15 在线出版日期: 2009-01-28

Relationship between vitamin D receptor gene polymorphisms and alcoholic liver disease

Ping Sun, Qin Wang

Ping Sun, Qin Wang, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Supported by: the Key Technologies Research and Development Program of Gansu Province, No. 2GS054-A43-014-26

Correspondence to: Qin Wang, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. chencp@lzu.edu.cn

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

Accepted: 2008-12-15 Published online: 2009-01-28

Abstract

AIM: To investigate the relationship between vitamin D receptor gene polymorphism and susceptibility to alcoholic liver disease (ALD).

METHODS: The Semi-nested PCR-restriction fragment length polymorphism (semi-nested PCR-RFLP) technology was used to analyze 50 ALD patients and 72 healthy controls. Comparison was made between the two groups in genotype frequencies, allele frequencies, and finally a correlation analysis was performed.

RESULTS: We found three genotypes in the case group and control group, that is, BB, Bb and bb. The bb genotype frequency and b allele frequency were significantly higher in case group than in control group ($\chi^2 = 7.16$, $P = 0.028$, $OR = 2.698$, 95% CI: 1.167-6.235; $\chi^2 = 11.64$, $P = 0.001$, $OR = 3.071$, 95% CI: 1.583-3.958). Multi-

factor unconditional Logistic regression analysis showed cases carrying bb genotype were more likely to develop into the ALD, indicating that bb genotype might be a genetic risk factor in ALD ($OR = 2.272$, OR 95% CI: 0.971-5.318).

CONCLUSION: The vitamin D receptor gene *Bsm* I site polymorphism is strongly associated with the ALD, and bb genotype may be a risk factor for development ALD.

Key Words: Semi-nested PCR-restriction fragment length polymorphism; Alcoholic liver disease; Polymorphisms; Vitamin D receptor

Sun P, Wang Q. Relationship between vitamin D receptor gene polymorphisms and alcoholic liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(3): 273-278

摘要

目的: 探讨维生素D受体(vitamin D receptor, VDR)基因多态性与酒精性肝病易感性之间的关系。

方法: 采用半巢式聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(semi-nested PCR-RFLP)技术检测50例酒精性肝病患者和72例健康志愿者VDR多态性的基因型, 并比较甘肃汉族人群和酒精性肝病患者之间VDR基因多态性、基因型频率、等位基因频率的差异与酒精性肝病相关性的分析。

结果: 共检出3种VDR基因型, 即BB、Bb、bb。病例组bb基因型频率显著高于对照组($\chi^2 = 7.16$, $P = 0.028$, $OR = 2.698$, 95% CI: 1.167-6.235); b等位基因的频率病例组显著高于对照组($\chi^2 = 11.64$, $P = 0.001$, $OR = 3.071$, 95% CI: 1.583-3.958)。通过多因素非条件Logistic回归模型, 发现携带bb基因型的个体暴露于酒精后容易发展成酒精性肝病, bb基因型可能是酒精性肝病发生的一种易患因素($OR = 2.272$, OR 95% CI: 0.971-5.318)。

结论: 维生素D受体基因*Bsm* I 酶切位点基因型与酒精性肝病之间存在相关性, bb基因型可能是酒精性肝病发生的一种易患基因。

■背景资料

长期过量饮酒可以引起酒精性肝病。酒精性肝病在西方国家是导致肝硬化的最主要原因, 在我国是继病毒之后导致肝损伤的第二大原因。其发病机制尚不清楚, 可能与酒精代谢产物对肝脏的毒性作用、氧化应激、免疫反应、异常的甲硫氨酸循环、内毒素血症、基因多态性、病毒的协同作用有关。因此对于酒精性肝病发病机制的研究具有非常重要的现实意义。

■同行评议者

迟宝荣, 教授, 吉林大学第一医院消化内科; 倪润洲, 教授, 南通大学附属医院消化内科

■研究前沿

对VDR基因多态性的研究最早主要在代谢性疾病研究领域,目前对VDR基因多态性的研究已经拓展到许多疾病研究领域。对肝病的研究主要集中在乙型肝炎研究领域,并已取得一些成果,最新报道认为VDR基因多态性与炎症性肠病和乳腺癌之间存在密切关系。

关键词: 半巢式PCR-RFLP; 维生素D受体; 多态性; 酒精性肝病

孙平, 王沁. 维生素D受体基因多态性与酒精性肝病的相关性. 世界华人消化杂志 2009; 17(3): 273-278

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/273.asp>

0 引言

酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)是由于长期饮酒导致的肝损害,表现为3种形式,分别为酒精性脂肪肝、酒精性肝炎、酒精性肝硬化。ALD在西方国家是导致肝硬化的最主要原因。近年来,我国ALD的发病率也呈逐年上升趋势,酒精已成为继病毒之后导致肝损伤的第二大原因^[1]。目前尚不清楚其确切的发病机制,可能与酒精代谢产物对肝脏的毒性作用、氧化应激、免疫反应、内毒素血症、基因多态性,病毒的协同作用有关^[2]。研究发现VDR基因多态性与多种疾病有关,而且与肝病之间也存在相关性^[3-8]。由于VDR基因存在多态性可影响与维生素D在体内的活性形式1, 25-(OH)₂D₃发挥免疫调节作用^[3,5,7],我们通过对VDR基因多态性的研究,发现VDR基因多态性与ALD之间存在相关性。

1 材料和方法

1.1 材料 2007-07/2008-05在兰州大学第一医院消化科住院或门诊就诊的酒精性肝病患者50例(病例组),以及在兰州大学第一医院体检中心体检的健康志愿者72例(对照组)。研究对象为长期居住在本地且无血缘关系的汉族人。研究对象行肝功、血脂、肝纤维化4项、肝炎病毒学指标、肝脏B超等相关检查。病例组:50例,平均年龄45±6.41岁,诊断标准依据中华医学会肝病学会分会脂肪肝和酒精性肝病学会2006-02修订的《酒精性肝病诊疗指南》^[9],并排除其他肝病。对照组:72例,平均年龄49±5.22岁,均为参加体检的健康志愿者。上海生工UNIO-10柱式血液基因组抽提试剂盒,上海生工UNIO-10柱式PCR产物回收试剂盒;大连宝生物(日本TaKaRa)DL2000型DNA分子质量Marker,大连宝生物(日本TaKaRa)PCR扩增试剂盒;美国NEB(Newland Biolabs, NEB)公司限制性内切酶*Bsm* I;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 采血: 清晨采静脉血2 mL,收集于EDTA抗凝管中, -80℃冰箱中冻存。

1.2.2 基因组DNA提取: 采用上海生工UNIO-10柱式血液基因组抽提试剂盒提取血样中基因组DNA。

1.2.3 半巢式PCR引物: 根据PubMed中VDR基因的全序列(注册号AB002168),参考相关文献设计VDR基因*Bsm* I位点半巢式PCR引物^[8,10],由上海生工合成引物。引物序列如下:上游引物P1, 5'-CAA CCA AGA CTA CAA GTA CCG CGT CAG TGA-3',下游引物P2, 5'-TGG CGG CAG CGG ATG TAC GTC TGC-3',下游引物P3, 5'-AAC CAG CGG AAG AGG TCA AGG G-3'。

1.2.4 半巢式PCR反应: 半巢式PCR外扩增。按照下列成份在冰上配置反应体系, 10×PCR缓冲液5 μL(含有MgCl₂), dNTPs混合液4 μL, 引物P1、P2各1 μL, TaKaRa Taq酶1 μL(5 U/μL), 基因组DNA 1 μL, 去离子水37 μL, 总反应体系50 μL。将上述反应体系置PCR扩增仪,按下列程序进行半巢式PCR外扩增, 94℃预变性5 min, 94℃变性30 s、66℃退火1 min、72℃延伸2 min、32个循环, 72℃再延伸7 min。取5 μL PCR产物用15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙啶染色,以DNA分子质量Marker为参照,紫外灯下观察扩增结果,扩增产物1850 bp。半巢式PCR内扩增。取外扩增产物1 μL,按照1:100稀释后,取稀释后的PCR产物1 μL加入事先配置好的反应体系中, 10×PCR缓冲液5 μL(含有MgCl₂), dNTPs混合液4 μL, 引物P1、P3各1 μL, TaKaRa Taq酶1 μL(5 U/μL), 去离子水37 μL, 总反应体系50 μL。将上述反应体系混匀后置PCR扩增仪,按下列程序进行半巢式PCR内扩增: 94℃预变性5 min, 94℃变性30 s、60℃退火1 min、72℃延伸1 min、35个循环, 72℃再延伸5 min。取5 μL PCR产物用20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙啶染色,以DNA分子质量Marker为参照,紫外灯下观察扩增结果,扩增产物825 bp。

1.2.5 PCR扩增产物的回收: 采用上海生工UNIO-10柱式PCR产物回收试剂盒,对825 bp扩增产物进行回收。

1.2.6 限制性片段长度多态性分析(RFLP): 对PCR回收产物进行RFLP分析,反应体系如下:向一只灭菌的PCR反应管中依次加入下列试剂,灭菌双蒸水12.5 μL, 10×*Bsm* I缓冲液2 μL, 825 bp回收产物5 μL, NEB的限制性内切酶*Bsm* I 0.5 μL(10 U/μL),酶切反应体系共20 μL,

表 1 VDR基因型分布 $n(\%)$

分组	n	基因型			
		BB	Bb	bb	BB+Bb
病例组	50	4(8.0)	6(12.0)	40(80.0)	10(10.0)
对照组	72	19(26.4)	10(13.9)	43(59.7)	29(40.3)
合计	122	23(18.9)	16(13.1)	83(68.0)	39(32.0)
OR		31.667	1.550	2.698	0.371
95% CI		7.983–125.618	0.516–4.657	1.167–6.235	0.160–0.857
P	0.028	0.001	0.435	0.020	0.018

基因型频率 $\chi^2 = 7.16, q = 2, P = 0.028, <0.05$.

表 2 等位基因分布 $n(\%)$

分组	等位基因		OR	95% CI	Pearson列联系数
	b	B			
病例组	86(86.0)	14(14.0)	3.071	1.583–3.958	0.213
对照组	96(66.7)	48(33.3)			
合计	182(74.6)	72(25.4)			

等位基因 $\chi^2 = 11.64, q = 1, P = 0.001, <0.05$.

65℃水浴16 h. 取酶切产物5 μ L, 用20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙啶染色, 以DNA分子质量Marker为参照, 用凝胶成像分析系统判断基因型. VDR基因型判断标准参照相关文献^[11]: 缺乏相应酶切位点为BB型(825 bp), 杂合子为Bb型(825 bp, 175 bp, 650 bp), 存在相应酶切位点为bb型(175 bp, 650 bp).

统计学处理 数据处理采用 $R \times C$ 表 χ^2 检验. 由SPSS11.0统计软件计算基因型频率、等位基因频率, 进行遗传学Hardy-Weinberg平衡检验, $P < 0.05$ 有统计学意义, 最后进行多因素非条件Logistic回归分析.

2 结果

2.1 基因型 病例组和对照组VDR基因型分布、等位基因分布, 两者相比较, 病例组bb基因型频率显著高于对照组, b等位基因频率病例组显著高于对照组, 以上结果 $P < 0.05$, 有统计学意义(表1-2, 图1-2).

2.2 遗传学Hardy-Weinberg平衡检验 对病例组和对照组的VDR基因型分布进行遗传学平衡检验, 结果符合Hardy-Weinberg遗传平衡定律.

2.3 多因素非条件Logistic回归 通过建立多因素非条件Logistic回归模型, 筛选与ALD有关的危险因素, $P < 0.05$, 有统计学意义. 最后进入回归模

■ 相关报道

目前研究发现, *Fok I* 位点与自身免疫性肝炎存在相关性, *Bsm I* 位点与原发性胆汁性肝硬化存在相关性, *Taq I* 和 *Fok I* 位点多态性与HBV感染结局存在相关性, *Apa I* 位点多态性与肝纤维化存在相关性.

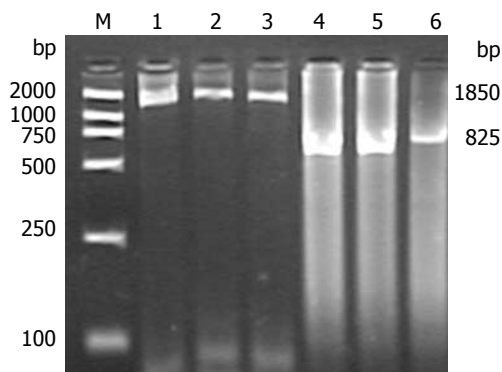


图 1 VDR基因半巢式PCR产物电泳图. M: DNA Marker; 1-3: 半巢式PCR外扩增产物; 4-6: 半巢式PCR内扩增产物.

型的危险因素有3个, 他们分别为饮酒状况、基因型、ALT(表3-4).

3 讨论

人类的VDR基因定位于12q13, mRNA全长4791 bp; 由9个外显子和8个内含子组成. 外显子 I 位于5'端非编码区, 分为 I A、I B、I C; 外显子 II -外显子 IX 是真正编码VDR结构的外显子. 外显子 II 和外显子 III 编码DNA结合结构域, 外显子 IV -IX 编码配体结合结构域. 用限制性内切酶 *Bsm I*、*Apa I*、*Taq I*、*Fok I* 对VDR基因进行基因多态性研究, 发现VDR基因存在4种限制性内切酶切割位点, *Bsm I* 切割位点位于第VIII内

■应用要点

通过对VDR基因多态性与酒精性肝病相关性的研究, 希望能为酒精性肝病防治工作提供一些分子生物学依据.

表 3 多因素非条件Logistic回归模型中各因素的赋值方式

研究因素	变量	赋值
年龄(岁)	X1	<45 = 1, 45-54 = 2, 55-64 = 3, >65 = 4
性别	X2	女 = 0, 男 = 1
饮酒状况	X3	不饮酒 = 0, 饮酒 = 1
基因型	X4	Bb = 0, BB = 1, bb = 2
ALT	X5	<50 U/L = 0, >50 U/L = 1
AST	X6	<50 U/L = 0, >50 U/L = 1
ALT/AST	X7	<1 = 0, >1 = 1
总胆红素	X8	3.4-17.1 $\mu\text{mol/L}$ = 0, >17.1 $\mu\text{mol/L}$ = 1
结合胆红素	X9	0-6.8 $\mu\text{mol/L}$ = 0, >6.8 $\mu\text{mol/L}$ = 1
非结合胆红素	X10	1.7-17.1 $\mu\text{mol/L}$ = 0, >17.1 $\mu\text{mol/L}$ = 1,
CHOL	X11	3.60-5.70 mmol/L = 0, >5.70 mmol/L = 1
TG	X12	0.80-1.80 mmol/L = 0, >1.80 mmol/L = 1
HDL	X13	0.80-1.08 mmol/L = 0, >1.08 mmol/L = 1
LDL	X14	1.55-3.70 mmol/L = 0, >3.70 mmol/L = 1
透明质酸(HA)	X15	50.0-120.0 $\mu\text{g/L}$ = 0, >120.0 $\mu\text{g/L}$ = 1
层黏蛋白(LN)	X16	90.0-133.0 $\mu\text{g/L}$ = 0, >133.0 $\mu\text{g/L}$ = 1
人型前胶原(Hac III)	X17	<120.0 $\mu\text{g/L}$ = 0, >120.0 $\mu\text{g/L}$ = 1
IV型胶原(IV.C)	X18	<84.7 $\mu\text{g/mL}$ = 0, >84.7 $\mu\text{g/mL}$ = 1
结合胆酸(SCG)	X19	<290.0 $\mu\text{g/mL}$ = 0, >290.0 $\mu\text{g/mL}$ = 1
是否患酒精性肝病	Y	对照 = 0, 患者 = 1

表 4 进入方程中的自变量及有关参数的估计值

入选变量	回归系数b	标准误S _b	Wald X ²	P	OR	95% CI For OR	
						Lower	Upper
X3	9.613	29.010	0.110	0.740	14964.120	0.000	7.4E+28
X4	0.821	0.434	3.580	0.058	2.272	0.971	5.318
X5	3.649	1.085	11.319	0.001	38.439	4.587	322.120
常数项	-11.487	29.018	0.157	0.692	0.000		

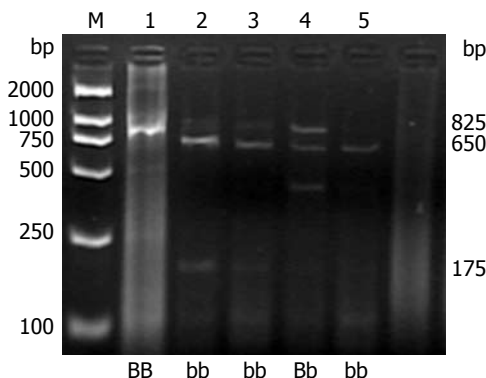


图 2 VDR基因半巢式PCR产物酶切电泳图. M: DNA Marker; 1: BB基因型; 2, 3, 5: bb基因型; 4: Bb基因型.

含子内^[12]. 目前研究发现VDR基因多态性与许多疾病之间存在相关性. 对原发性胆汁性肝硬化和自身免疫性肝炎的研究, 发现Fok I 位点多态性

与自身免疫性肝炎存在相关性, Bsm I 位点多态性与原发性胆汁性肝硬化存在相关性^[8,11]; 对乙型病毒性肝炎研究发现, VDR基因Taq I 和Fok I 位点多态性与HBV感染结局存在相关性^[13]; Apa I 位点多态性与肝纤维化存在相关性^[14]. VDR基因多态性可能是通过影响VDR的mRNA的表达与稳定, 造成VDR数量或活性的差异, 从而改变了其与1, 25-(OH)₂D₃的亲合力、结合DNA的能力及转录激活能力^[11]. 对结核病和乙型病毒性肝炎研究也发现, VDR基因多态性可以影响免疫反应的强度与类型^[15-16].

维生素D在体内的活性形式是1, 25-(OH)₂D₃, 以前认为其主要调节钙、磷代谢, 现在认为1, 25-(OH)₂D₃和它的类似物还具有抗细胞增殖、诱导细胞分化、免疫调节等功能. 其能

激活单核细胞和巨噬细胞, 抑制淋巴细胞的增殖, 抑制树突状细胞分化为抗原呈递细胞; 其可以减少细胞因子IL-1、IL-2、IL-6、IL-12、INF- γ 、TNF- α 和TNF- β 的产生; 除此之外, 其还具有神经保护作用, 可以诱导产生神经生长因子^[8,11]。1, 25-(OH)₂D₃通过以下机制发挥作用: 其与VDR结合形成激素-受体复合物, 该复合物与VDR基因上的激素反应元件结合, 再通过与其它调节因子相互作用, 从而对VDR基因的表达进行调控, 发挥免疫调节功能^[8,17]。VDR基因存在多态性可能影响1, 25-(OH)₂D₃的发挥免疫调节作用, 并由此诱发或加重某些免疫性疾病^[18]。

基因和环境因素共同决定了酒精性肝病的发生, 酒精性肝病具有遗传易感性。与酒精代谢有关的乙醇脱氢酶(ADH)和乙醛脱氢酶(ALDH)基因多态性决定了东方人对酒精性肝病的遗传易感性, 细胞色素P4502E1(CYP2E1)基因多态性决定了氧化应激的程度, 内毒素受体基因多态性影响了炎性细胞因子的释放, TNF- α 和IL-10基因多态性影响了他们对肝脏的作用效果^[2]。

酒精性肝病发生与免疫反应和炎性细胞因子产生有关, 与酒精性肝病有关的炎性细胞因子主要包括IL-1、IL-6、TNF- α 和TGF- β 等^[2]。本研究结果显示VDR基因Bsm I 位点多态性与酒精性肝病之间存在相关性, 病例组的bb基因型频率和b等位基因频率显著高于对照组, 有统计学意义($P < 0.05$)。通过建立多因素非条件Logistic回归模型, 采用逐步回归的方法, 剔除一些变量后, 最后进入回归方程的变量有3个, 分别是饮酒状况、基因型和ALT, 我们发现bb基因型是和酒精性肝病发生相关的一种易患基因($OR = 2.272$, OR 95% CI: 0.971-5.318); 本研究结果提示bb基因型个体在酒精性肝病患者中所占比例较高, 与Fan *et al*^[8]的研究结果较接近, 可能该基因型的个体暴露于酒精后容易发展酒精性肝病。原因可能是VDR基因多态性可以影响与1, 25-(OH)₂D₃结合发挥免疫调节作用^[8]; 同时也可以影响免疫反应的强度和类型、影响炎性细胞因子的产生^[13,16,19]; Vogel *et al*认为虽然Bsm I 位点在第VIII内含子, 但是通过干扰mRNA转录的结合位点, 或者改变内在的调节元件, 他可能影响VDR基因表达, 影响1, 25-(OH)₂D₃发挥免疫调节作用^[11]。本研究采用了半巢式PCR-RFLP技术, 与以往的检测技术相比, 提高了检测的敏感性和

特异性, 减少了假阳性; 与以往的基因多态性研究相比, 用半巢式PCR技术可以提高基因型分析的准确性与可靠性^[20]。

4 参考文献

- 1 厉有名. 中国酒精性肝病的研究现状. 现代消化及介入诊疗 2007; 12: 235-236
- 2 Day CP. Genes or environment to determine alcoholic liver disease and non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2006; 26: 1021-1028
- 3 Shimada A, Kanazawa Y, Motohashi Y, Yamada S, Maruyama T, Ikegami H, Awata T, Kawasaki E, Kobayashi T, Nakanishi K, Kawabata Y, Kurihara S, Uga M, Tanaka S. Evidence for association between vitamin D receptor BsmI polymorphism and type 1 diabetes in Japanese. *J Autoimmun* 2008; 30: 207-211
- 4 Gunes S, Sumer AP, Keles GC, Kara N, Koprulu H, Bagci H, Bek Y. Analysis of vitamin D receptor gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis. *Indian J Med Res* 2008; 127: 58-64
- 5 Chen RH, Chang CT, Chen HY, Chen WC, Tsai CH, Tsai FJ. Association between vitamin-D receptor gene FokI polymorphism and Graves' disease among Taiwanese Chinese. *J Clin Lab Anal* 2007; 21: 173-177
- 6 Naito M, Miyaki K, Naito T, Zhang L, Hoshi K, Hara A, Masaki K, Tohyama S, Muramatsu M, Hamajima N, Nakayama T. Association between vitamin D receptor gene haplotypes and chronic periodontitis among Japanese men. *Int J Med Sci* 2007; 4: 216-222
- 7 Carlberg C, Seuter S. The vitamin D receptor. *Dermatol Clin* 2007; 25: 515-523, viii
- 8 Fan L, Tu X, Zhu Y, Zhou L, Pfeiffer T, Feltens R, Stoecker W, Zhong R. Genetic association of vitamin D receptor polymorphisms with autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis in the Chinese. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 249-255
- 9 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组. 酒精性肝病诊疗指南. 中华肝脏病杂志 2006; 14: 164-165
- 10 张红红, 陶国枢, 高宇红, 刘建伟, 吴青, 牟小芬, 胡亚卓, 陈瑞英, 冷兴文. 我国四种民族维生素D受体基因多态性分布的研究. 中国骨质疏松杂志 2006; 12: 1-3
- 11 Vogel A, Strassburg CP, Manns MP. Genetic association of vitamin D receptor polymorphisms with primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2002; 35: 126-131
- 12 Zmuda JM, Cauley JA, Ferrell RE. Molecular epidemiology of vitamin D receptor gene variants. *Epidemiol Rev* 2000; 22: 203-217
- 13 李俊红, 李洪权, 李卓, 刘英, 高冀荣, 曾宪嘉, 勾春燕, 朱席林, 郭新会, 潘利, 李辉. 维生素D受体基因Taq I、Fok I 单核苷酸多态与HBV感染结局关联探讨. 中华医学杂志 2006; 86: 1952-1956
- 14 李骥, 董培红, 金益辉, 卢明芹, 潘发奋, 王帮松, 陈永平. 维生素D受体基因多态性与肝纤维化关系初步研究. 浙江医学 2006; 28: 426-434
- 15 李俊红, 陈冬梅, 李卓, 刘英, 高冀荣, 曾宪嘉, 钟崇芳, 朱席林, 勾春燕, 潘利, 单晶, 郭新会, 李辉. 维生素D受体基因多态性与乙型肝炎病毒感染的关联研究. 中华医学遗传学杂志 2006; 23: 402-405
- 16 单晶, 王璐, 李卓, 刘英, 高冀蓉, 庞艳雷, 李俊红, 庞福

■同行评价

本文采用半巢式PCR-RFLP技术分析维生素D受体基因多态性与酒精性肝病相关性, 文题较准确反映了研究工作的科学问题和特定内容, 国内对维生素D受体基因多态性与酒精性肝病相关性报道较少, 技术路线较为清晰可行, 研究结果明确. 文章的科学性、创新性和可读性较好地反映我国胃肠病学基础研究的先进水平。

- 民, 郭新会, 池洪治, 张长庚, 李辉. 维生素D受体基因多态性与乙型肝炎阳性者家庭聚集性关系. 中国医学科学院学报 2006; 28: 148-153
- 17 van Etten E, Mathieu C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 97: 93-101
- 18 范列英, 仲人前, 屠小卿, 朱烨, 弓长丽, 周琳, 赵智贤, Ralph Feltens, Thomas Pfeiffer. 维生素D受体基因多态性与中国人自身免疫肝病相关性研究. 中华医学杂志 2003; 83: 1852-1855
- 19 García D, Angel B, Carrasco E, Albala C, Santos JL, Pérez-Bravo F. VDR polymorphisms influence the immune response in type 1 diabetic children from Santiago, Chile. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; 77: 134-140
- 20 蒋磊, 覃扬, 孙芝琳, 孙泽芳, 王锦红, 杨鲁川. 限制性内切酶结合半巢式Pcr法检测人肝癌P16抑癌基因启动子区甲基化研究. 四川大学学报(医学版) 2007; 38: 53-56

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

世界华人消化杂志计量单位标准

本刊讯 本刊计量单位采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 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. (常务副总编辑: 张海宁 2009-01-28)

基于细胞形态学定量参数的良恶性胸/腹水鉴别诊断模型

袁帅, 张焜和, 肖波, 陈江, 祝金泉, 朱萱, 吕农华

袁帅, 广东省南方医科大学附属小榄医院消化科 广东省中山市 528415

张焜和, 肖波, 陈江, 祝金泉, 朱萱, 吕农华, 南昌大学第一附属医院 江西省消化疾病研究重点实验室 江西省南昌市 330006

袁帅, 硕士, 主治医师, 主要从事消化系统疾病临床和基础研究。江西省主要学科学术与技术带头人计划资助项目, No. 030002
作者贡献分布: 此课题由张焜和, 祝金泉, 朱萱, 吕农华及袁帅设计; 标本收集由张焜和, 袁帅及肖波完成; 研究过程由袁帅, 张焜和及陈江完成; 数据分析由袁帅与张焜和完成; 论文写作由袁帅与张焜和完成。

通讯作者: 张焜和, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第一附属医院消化内科。yfyzkh@sina.com

电话: 0791-8692507 传真: 0791-8623153

收稿日期: 2008-12-05 修回日期: 2008-12-25

接受日期: 2009-01-05 在线出版日期: 2009-01-28

A differential diagnostic model based on the morphological parameters of exfoliated cells for differentiating malignant pleural and peritoneal effusions from the benigns

Shuai Yuan, Kun-He Zhang, Bo Xiao, Jiang Chen, Jin-Quan Zhu, Xuan Zhu, Nong-Hua Lv

Shuai Yuan, Department of Gastroenterology, Xiaolan Hospital Affiliated to Nanfang Medical University, Zhongshan 528415, Guangdong Province, China

Kun-He Zhang, Bo Xiao, Jiang Chen, Jin-Quan Zhu, Xuan Zhu, Nong-Hua Lv, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University; Jiangxi Key Laboratory for Digestive Diseases, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Supported by: the Training Program for Science and Technology Leaders of Main Disciplines in Jiangxi Province, No. 030002

Correspondence to: Kun-He Zhang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. yfyzkh@sina.com

Received: 2008-12-05 Revised: 2008-12-25

Accepted: 2009-01-05 Published online: 2009-01-28

Abstract

AIM: To establish a mathematical model based on the morphological parameters of exfoliated cells in pleural and peritoneal effusions and to evaluate their diagnostic values in differentiating malignant from the benign pleural and peritoneal effusions.

METHODS: Nine morphological cellular param-

eters (area, perimeter, equivalent diameter, max-axis, min-axis, max-axis/min-axis ratio, form factor, cycle degree, atypical index) were measured using a pathological image analysis system on cell smears from 61 patients with benign or malignant pleural or peritoneal effusions, and the coefficients of variation (CV) of above parameters were calculated. Discriminate functions, diagnostic models, were established with different groups of parameters by stepwise discriminatory analysis, in which the cytological result of each specimen was taken as the dependent variable and the morphological parameters as independent variables, and their diagnostic performances for malignant effusions were calculated.

RESULTS: Two parameters, equivalent diameter and max-axis, entered the model based on cellular morphological parameters. Seven CVs of all parameters except for perimeter and cycle degree entered the model based on the CVs. Three parameters, area, min-axis and CV of min-axis, entered the model based on all those parameters. The sensitivities of above three models for diagnosing malignant effusions were 72.7%, 90.9% and 97.0%, respectively; the specificities were 100.0%, 92.9% and 92.9%, respectively, and the accuracies were 85.2%, 91.8% and 95.1%, respectively.

CONCLUSION: Simple models could be established based on the cellular morphological parameters and their coefficients of variation, and they are valuable in differentiating malignant from benign pleural and peritoneal effusions.

Key Words: Pleural effusion; Ascites; Tumor metastasis; Differential diagnosis; Diagnostic model

Yuan S, Zhang KH, Xiao B, Chen J, Zhu JQ, Zhu X, Lv NH. A differential diagnostic model based on the morphological parameters of exfoliated cells for differentiating malignant pleural and peritoneal effusions from the benigns. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(3): 279-283

摘要

目的: 探讨以脱落细胞形态学定量参数及其变异系数建立数学诊断模型对良恶性胸/腹水

■背景资料

胸水或腹水是临床常见病症, 按病因可分为两大类, 即由良性疾病引起的良性胸/腹水和由恶性肿瘤胸/腹膜转移引起的恶性胸/腹水。正确鉴别两类不同性质的胸/腹水是此类患者临床诊疗中的首要问题。

■同行评议者

金瑞, 教授, 首都医科大学附属北京佑安医院消化科

■研发前沿

尽管脱落细胞学检查鉴别良恶性胸/腹水的敏感性低,要求检查者经验丰富,但仍是诊断金标准,有关的诊断新技术研究主要是围绕克服细胞学检查的缺陷而展开,如免疫细胞化学染色、肿瘤标志物测定、细胞形态学定量分析等。

的鉴别诊断价值。

方法:应用病理显微图像分析系统采集61例良恶性胸/腹水脱落细胞涂片的细胞面积、周长、等效直径、长径、短径、长短径比、形状因子、圆形度、异形指数等9项形态学参数,计算各参数的变异系数。以各参数为自变量,以细胞学诊断结果为因变量,采用逐步判别法分别建立基于不同类型参数的诊断模型,并评价各模型对恶性胸/腹水的诊断价值。

结果:等效直径和长径2项参数进入基于细胞形态学参数的诊断模型;除周长和圆形度两项参数的变异系数外其余7项参数的变异系数进入基于各参数变异系数的诊断模型;面积、短径和短径变异系数3项参数进入基于全部参数的诊断模型。上述3个诊断模型诊断恶性积液的敏感度分别为72.7%、90.9%和97.0%,特异度分别为100.0%、92.9%和92.9%,准确度分别为85.2%、91.8%和95.1%。

结论:以细胞学形态学参数及其变异系数可建立起简便的数学模型,对胸/腹水良恶性质的鉴别诊断具有良好的价值。

关键词:胸水;腹水;肿瘤转移;鉴别诊断;数学模型

袁帅, 张焜和, 肖波, 陈江, 祝金泉, 朱莹, 吕农华. 基于细胞形态学定量参数的良恶性胸/腹水鉴别诊断模型. 世界华人消化杂志 2009; 17(3): 279-283

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/279.asp>

0 引言

脱落细胞学检查是目前诊断恶性胸/腹水的基本方法,但其敏感性只有50%左右,且有一定的假阳性^[1-2]。细胞学诊断还需要检查者有丰富的经验,在较基层医院难以有效地开展,因此人们一直在寻找细胞学辅助诊断新方法^[3-7]。近年来病理显微图像分析技术的发展和应用于细胞学诊断从主观定性向客观定量发展开辟了新途径^[8],并已应用于浆膜腔积液的脱落细胞分析^[9]。Antonangelo *et al*^[10]以胸水脱落细胞的5项形态学指标和核仁蛋白嗜银染色(AgNOR)特点建立判别函数,对判别胸水的良恶性质有较好的诊断价值。本研究尝试单纯使用脱落细胞形态学参数建立数学诊断模型,是否能获得良好的良恶性胸/腹水鉴别诊断效果。

1 材料和方法

1.1 材料 南昌大学第一附属医院和韶关市第一人民医院2003-2006年具有胸/腹水的住院患者61

例。抽取胸/腹水100 mL左右,常规离心,取细胞沉淀涂片数张,950 mL/L乙醇固定,并进行苏木精-伊红(HE)染色,由南昌大学第一附属医院细胞室专家读片,作出细胞学诊断。根据细胞学诊断结果分为良性积液和恶性积液。同时收集临床资料,作出病因诊断。

1.2 方法 使用HMIAS-2000高清晰度彩色医学图文分析系统(武汉千屏影像技术有限责任公司)采集细胞涂片的显微图像,然后应用该系统的细胞测量功能进行细胞分割和各项参数测量。具体步骤简述如下:选择细胞分布较均匀、细胞边界清晰的视野采集4-10幅400倍图片,保证有核细胞200个以上。应用该系统的细胞测量功能对图片中的有核细胞进行自动分割,必要时辅以手工分割。对分割出的单个细胞进行各种形态学参数自动测量。采集的细胞形态学参数如下:(1)面积;(2)周长;(3)等效直径;(4)长径;(5)短径;(6)长短径比;(7)形状因子;(8)圆形度;(9)异形指数。

统计学处理 良性与恶性标本间细胞形态学参数比较采用 t 检验, $P<0.05$ 有统计学意义。以上述细胞形态学参数、细胞形态学参数的变异系数或全部的两类参数为自变量,以人工细胞学诊断结果为因变量(恶性为1,良性为2),分别进行逐步判别分析,求出判别函数即为标本性质诊断模型,并作数据组内回代检验模型的诊断效率。诊断效率以敏感度、特异度、准确度、预测值和似然比表示。具体计算使用SPSS13.0软件完成。

2 结果

2.1 临床资料 本组病例临床诊断和胸/腹水脱落细胞学诊断明确,共61例,其中良性组28例,恶性组33例。胸水43例,腹水18例,男32例,女29例,年龄16-86(平均 56.0 ± 18.4)岁。良性胸/腹水的病因主要为结核性胸/腹膜炎、肝硬化,恶性胸/腹水的主要病因为肺癌、卵巢癌和原发肿瘤灶不明(表1)。

2.2 良性与恶性标本细胞形态学参数及其变异

2.2.1 良性与恶性标本细胞形态学测定结果:所测定的9项细胞形态学参数见表2。恶性标本脱落细胞各项参数均值除圆形度外均比良性标本大,各参数在两组间的差异均有统计学意义。

2.2.2 良性与恶性标本脱落细胞形态学参数的变异程度:为评价良性与恶性标本细胞形态学参数的变异程度,对以上参数的变异系数(CV)

■相关报道

Antonangelo *et al*以胸水脱落细胞的5项形态学指标和核仁蛋白嗜银染色(AgNOR)特点建立判别函数,对判别胸水的良恶性质有较好的诊断价值,唯指标较复杂,除有形态学指标外,还涉及核仁蛋白嗜银染色,临床应用有一定限制。

表 1 61例胸/腹水患者的病因诊断

分组	病因诊断	n
良性组	结核性胸膜炎	12
	结核性腹膜炎	4
	肝硬化(失代偿期)	6
	心源性胸水(肺心病、心包炎)	2
	急性胰腺炎	2
	胆汁性腹膜炎	1
	肾病综合征	1
		28
恶性组	肺癌	21
	卵巢癌	3
	胃/贲门癌	2
	乳腺癌	2
	腹腔转移癌(原发灶不明)	3
	胸腔转移癌(原发灶不明)	2
		33
		61

表 2 良性与恶性胸/腹水标本脱落细胞形态学参数测定结果比较

参数	良性标本(n = 28)	恶性标本(n = 33)	P值
面积(μm^2)	28.00 ± 13.18	152.02 ± 95.01	0.000
周长(μm)	18.01 ± 3.58	35.55 ± 12.85	0.000
等效直径(μm)	5.56 ± 1.06	10.74 ± 3.79	0.000
长径(μm)	5.90 ± 1.19	11.49 ± 4.14	0.000
短径(μm)	5.27 ± 0.95	10.05 ± 3.51	0.000
长短比	1.11 ± 0.03	1.14 ± 0.04	0.033
形状因子	1.06 ± 0.02	1.08 ± 0.03	0.000
圆形度	0.94 ± 0.02	0.92 ± 0.02	0.000
异形指数	3.64 ± 0.03	3.69 ± 0.04	0.000

进行了计算与统计, 结果显示恶性标本各参数变异程度均较良性标本大(表3), 其中面积、周长、等效直径、长径、短径5个参数两组间差异有统计学意义。

2.3 标本良恶性诊断模型及其判别准确率

2.3.1 以细胞形态学参数建立诊断模型: 在以逐步判别法建立判别函数的过程中, 脱落细胞的9项形态学参数中只有等效直径和长径进入判别函数 Y_1 : $Y_1 = -3.057 + 1.534 \times \text{等效直径} - 1.095 \times \text{长径}$ 。将数据回代于判别函数 Y_1 , 28例良性积液均判别准确(100%), 33例恶性积液有24例判别准确(72.7%), 总的诊断符合率为85.2%。

2.3.2 以细胞形态学参数的变异系数建立诊断模型: 在以逐步判别法建立判别函数的过程中, 脱落细胞9项形态学参数的变异系数中有7项(面积 V 、等效直径 V 、长径 V 、短径 V 、长短比 V 、形状因子 V 、异形指数 V)进入判别函数 Y_2 : $Y_2 =$

表 3 良性与恶性胸/腹水标本脱落细胞形态学参数变异系数比较 (mean ± SD)

指标	变异系数		P值
	良性标本(n = 28)	恶性标本(n = 33)	
面积	0.81 ± 0.47	1.88 ± 0.81	0.000
周长	0.29 ± 0.14	0.77 ± 0.25	0.000
等效直径	0.28 ± 0.14	0.74 ± 0.24	0.000
长径	0.29 ± 0.14	0.74 ± 0.22	0.000
短径	0.28 ± 0.13	0.73 ± 0.21	0.000
长短比	0.09 ± 0.06	0.13 ± 0.13	0.170
形状因子	0.03 ± 0.03	0.08 ± 0.24	0.272
圆形度	0.03 ± 0.01	0.08 ± 0.23	0.259
异形指数	0.02 ± 0.01	0.06 ± 0.24	0.315

$-3.941 - 0.576 \times \text{面积} - 6.099 \times \text{等效直径} - 5.808 \times \text{长径} + 19.930 \times \text{短径} + 16.645 \times \text{长短比} - 35.437 \times \text{形状因子} + 25.124 \times \text{异形指数}$ 。将数据回代于诊断模型 Y_2 , 28例良性积液有26例判别准确(92.9%), 33例恶性积液有30例判别准确(90.9%), 总的诊断符合率为91.8%。

2.3.3 以细胞形态学参数及其变异系数建立诊断模型: 在以逐步判别法建立判别函数的过程中, 有面积、短径和短径 V 进入判别函数 Y_3 : $Y_3 = -7.597 - 0.019 \times \text{面积} + 0.780 \times \text{短径} + 6.376 \times \text{短径}V$ 。将数据回代于诊断模型 Y_3 , 28例良性积液有26例判别准确(92.9%), 33例恶性积液中32例判断准确(97.0%), 总的诊断符合率为95.1%。

2.4 数学模型对恶性胸/腹水的诊断价值 3个数学模型对恶性胸/腹水的诊断价值见表4。以数据回代于3个模型的计算值分别作ROC曲线图(图1), 曲线下面积分别为0.958(95%CI: 0.907-1.009, $P = 0.000$)、0.982(95%CI: 0.957-1.006, $P = 0.000$)和0.995(95%CI: 0.984-1.006, $P = 0.000$)。

3 讨论

细胞形状、大小和大小不一反映细胞异型性的主要指标。恶性标本由于癌细胞的形态特点与正常细胞的差异性, 可导致脱落细胞的整体形态特点与良性标本不同。本研究中9项细胞形态学参数, 在良性与恶性胸/腹水标本中差异均有显著性意义, 提示各项参数从不同的角度反映细胞大小和形状特点。以各细胞形态学参数建立的诊断模型 Y_1 有较好的诊断效率, 诊断恶性积液的特异度达100%, 唯敏感度较低, 只有72.7%, 准确率为85.2%。

以脱落细胞涂片中有核细胞的形态学参数均值为变量建立的诊断模型 Y_1 , 主要反映了细

■创新盘点

本模型的建立只使用了细胞形态学指标, 不涉及胞核指标(胞核分割较细胞分割难度大, 效果差), 还应用了形态学参数的变异系数(反映同一标本不同细胞间的变异程度), 因而模型更为简便实用和有效。

■应用要点

本模型的判读结果与细胞学专家的诊断结果一致性达95%,在没有细胞学诊断专业人员的单位可以试用本模型辅助临床诊断,细胞学诊断专业人员可验证本模型的辅助诊断作用。

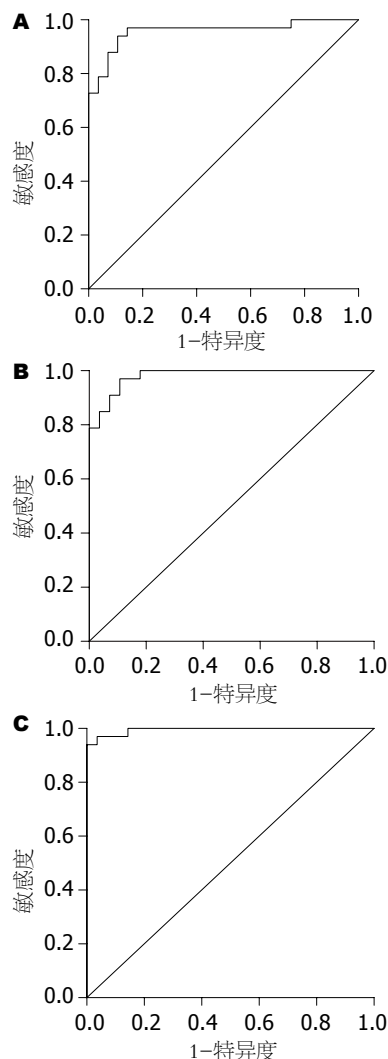
表 4 诊断模型对恶性胸/腹水的诊断价值

指标	诊断模型		
	Y ₁	Y ₂	Y ₃
敏感度(%)	72.7	90.9	97.0
特异度(%)	100.0	92.9	92.9
准确度(%)	85.2	91.8	95.1
阳性预测值(%)	100.0	93.8	94.1
阴性预测值(%)	75.7	89.7	96.3
阳性似然比	—	12.73	13.58
阴性似然比	0.27	0.10	0.03

细胞的形状和大小,对于细胞大小不一这一恶性标本的信息未充分利用。为此,本研究计算了各形态学参数的变异系数,发现恶性标本各项参数的变异度均较良性标本大,且反映恶性标本细胞大小的参数较反映形态特征的参数变异度更大。以形态学参数的变异系数建立的诊断模型Y₂,获得了较Y₁更好的诊断效率,敏感度、特异度和准确率均达到90%以上,准确率提高了5%左右。且进入模型的参数较多,提示参数间的共线性关系较弱,多数参数有相对独立的诊断价值。

综合考虑形态学参数及其变异程度,以全部的两组数据建立数学模型Y₃,诊断效率进一步提高,对恶性积液的诊断特异度、敏感度和准确率分别达到97.0%、92.9%和95.1%,ROC曲线下面积高达0.995,95%可信限范围窄小(0.984-1.006)。进入模型的指标只有3项(细胞面积、细胞短径和细胞短径的变异系数),非常简便,实用价值大。

Athanassiadou *et al*^[11]用计算机图像分析系统对104例渗出液的细胞学涂片分析,发现恶性组的核长轴长度和核面积两个参数与良性组有显著差异;徐炜^[12]发现脱落细胞的面积、周长、最大和最小直径、形状因子、核浆比等6项形态学参数在82例良性与恶性胸/腹水组间差异有显著性意义。但相关研究多是在剔除胸/腹水中的淋巴细胞而得出的结论,存在人为选择细胞进行分析的主观因素。本研究对所采集的图像视野内所有有核细胞进行形态学定量测定,更为客观地反映了标本脱落细胞的形态学特点。另外,多数研究涉及到胞核的形态学参数,尽管后者可有一定的诊断价值,但我们在实际操作中发现,软件的核分割效果比细胞分割差,常需要辅以手工分割,实际应用和准确性都有所限制。因此,本研究仅以自动分割效果良好的细胞

图 1 模型诊断恶性胸/腹水的ROC曲线图。A: Y₁; B: Y₂; C: Y₃。

形态学参数建立模型,便于实用。

随着计算机辅助诊断技术和数据挖掘技术的临床应用不断深入^[13-14],定量诊断和自动化诊断成为诊断学的重要发展趋势,也为胸/腹水的鉴别诊断开辟了新的途径^[15-16]。本研究应用胸/腹水脱落细胞的2项形态学原始参数和1项衍生参数,建立起简便的数学诊断模型,获得了良好的效果,尽管例数较少,其实用价值有待更多样本验证,但已显示良好的前景,值得进一步研究。

4 参考文献

- Oyafuso MS, Longatto Filho A, Bortolan J, Rahal P, Bisi H, Lombardo V. Cytological diagnosis of serous effusions in a cancer hospital in Brazil. *Pathologica* 1996; 88: 128-131
- Metzgeroth G, Kuhn C, Schultheis B, Hehlmann R, Hastka J. Diagnostic accuracy of cytology and immunocytology in carcinomatous effusions. *Cytopathology* 2008; 19: 205-211
- Motherby H, Pomjanski N, Kube M, Boros A, Heiden T, Tribukait B, Böcking A. Diagnostic DNA-flow- vs. -image-cytometry in effusion cytology. *Anal Cell Pathol* 2002; 24: 5-15
- 张焜和, 付曲波, 操凤, 祝金泉, 陈江, 吕农华, 朱莹, 王

- 崇文. 浆膜腔积液端粒酶逆转录酶mRNA检测及其意义. 中华消化杂志 2005; 25: 116-118
- 5 He DN, Zhu HS, Zhang KH, Jin WJ, Zhu WM, Li N, Li JS. E-cadherin and calretinin as immunocytochemical markers to differentiate malignant from benign serous effusions. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2406-2408
- 6 Pereira TC, Saad RS, Liu Y, Silverman JF. The diagnosis of malignancy in effusion cytology: a pattern recognition approach. *Adv Anat Pathol* 2006; 13: 174-184
- 7 Zhang KH, Cao F, Fu QB, Zhu JQ, Chen J, Lv NH. Detection of mRNAs of GA733 genes by RT-PCR in exfoliated cells of pleural and peritoneal effusions and its clinical values. *Intern Med* 2007; 46: 1489-1494
- 8 陈蔚, 龚一鸣, 许亚勇. 细胞低温显微图像的计算机处理及定量分析. 生物医学工程学杂志 1991; 8: 67-70
- 9 彭善友, 黎辉, 汪艳, 王则胜. 胸腹水中腺癌细胞的图像分析研究. 湖北医科大学学报 1999; 20: 19-20
- 10 Antonangelo L, Saldiva PH, Amaro Júnior E, Capelozzi VL. Capelozzi VL. Utility of computerized morphometry combined with AgNOR staining in distinguishing benign from malignant pleural effusions. *Anal Quant Cytol Histol* 1994; 16: 247-252
- 11 Athanassiadou P, Kavantzias N, Davaris P, Gonidi M, Liossi A, Nakopoulou L, Petrakakou E, Athanassiades P. Diagnostic approach of effusion cytology using computerized image analysis. *J Exp Clin Cancer Res* 2002; 21: 49-56
- 12 徐炜. 形态定量分析在胸腔积液诊断中的应用价值. 诊断病理学杂志 2002; 9: 311-312
- 13 陈明. 医学数据挖掘综述. 医学信息 2008; 21: 19-21
- 14 曹厚德. 我国自主研发的三项计算机辅助诊断(CAD)软件先后通过国家认证. 中国医疗器械杂志 2008; 32: 309
- 15 Neves DD, Dias RM, Cunha AJ. Predictive model for the diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Braz J Infect Dis* 2007; 11: 83-88
- 16 Esquerda A, Trujillano J, López de Ullibarri I, Bielsa S, Madroño AB, Porcel JM. Classification tree analysis for the discrimination of pleural exudates and transudates. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 82-87

■同行评价

本文具有一定的创新性, 技术路线合理, 数据可靠, 逻辑性强, 具有一定的实用价值。

编辑 史景红 电编 吴鹏联

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

• 消息 •

世界华人消化杂志参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在“Pang *et al*”的右上角注角码; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注角码. 如马连生^[1]报告……, 潘伯荣 *et al*^[2-5]认为……; PCR方法敏感性高^[6-7]. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed, 《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献, 包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和 *World Journal of Gastroenterology*(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>). 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页. (常务副总编辑: 张海宁 2009-01-28)

基于蛋白质组学技术的肝癌实验诊断研究进展

廖剑, 殷正丰

■背景资料

蛋白质组学技术的飞速发展, 为疾病的早期诊断开拓了一条全新的道路。在将最新的蛋白质组学技术应用于肝癌的研究过程中, 研究者们发现并鉴定了一批潜在标志物, 并且建立了新的诊断模式, 推动了肝癌早期诊断的发展。

廖剑, 殷正丰, 中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院分子肿瘤实验室 上海市 200438

国家自然科学基金资助项目, No. 30672002

作者贡献分布: 本文写作由廖剑完成; 殷正丰审校、修改、定稿。
通讯作者: 殷正丰, 200438, 上海市长海路225号, 中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院分子肿瘤实验室。

yinzfk@yahoo.com.cn

电话: 021-25070859 传真: 021-25070859

收稿日期: 2008-11-22 修回日期: 2008-12-24

接受日期: 2008-12-29 在线出版日期: 2009-01-28

Progress in proteomics-based diagnosis of hepatocellular carcinoma

Jian Liao, Zheng-Feng Yin

Jian Liao, Zheng-Feng Yin, Department of Molecular Oncology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200438, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30672002

Correspondence to: Zheng-Feng Yin, Department of Molecular Oncology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, 225 Changhai Road, Shanghai 200438, China. yinzfk@yahoo.com.cn

Received: 2008-11-22 Revised: 2008-12-24

Accepted: 2008-12-29 Published online: 2009-01-28

Abstract

Over the years, the research for new biomarkers of hepatocellular carcinoma has been slow. Proteomics technology, mainly including two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry, has provided a very good platform for finding new biomarkers of hepatocellular carcinoma and sped up the study of laboratory diagnosis in hepatocellular carcinoma. This paper reviewed the recent progress in the laboratory diagnosis of hepatocellular carcinoma based on proteomics technology.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Laboratory diagnosis; Proteomics

Liao J, Yin ZF. Progress in proteomics-based diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(3): 284-287

摘要

多年来, 寻找新的肝癌标志物的研究一直进展缓慢。以双向电泳、新型质谱分析为主的蛋白质组学方法为寻找肝癌标志物提供了良好的技术平台, 促进了肝癌实验诊断研究的快速发展。本文综述了近年来基于蛋白质组学技术的肝癌实验诊断临床研究的主要进展。

关键词: 肝癌; 实验诊断; 蛋白质组学

廖剑, 殷正丰. 基于蛋白质组学技术的肝癌实验诊断研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(3): 284-287

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/284.asp>

0 引言

肿瘤通常被认为是基因性疾病, 也被认为是一种蛋白质组疾病。肿瘤蛋白质组学包括对正常组织与疾病组织(从癌前病变到肿瘤)之间差异表达蛋白质的鉴定和定量分析。一个正常细胞在转变为肿瘤的过程中, 细胞内蛋白质表达谱会发生一系列显著变化。就肝癌而言, 蛋白质组学研究可以整体、动态、定量地研究肝癌发生过程中蛋白质种类、数量的改变, 不仅有助于进一步揭示肝癌的发病机制, 而且可鉴别出使正常细胞转化为癌细胞的蛋白质, 进而开发出检测这些肝癌标志物的实验技术, 以帮助诊断早期肝癌, 从而实现肝癌诊断方面的实质性突破。目前, 以双向电泳、质谱分析为主的蛋白质组学方法为肝癌实验诊断研究提供了良好的技术平台。

1 肝癌实验诊断相关双向电泳分析

1.1 肝癌细胞系双向电泳分析 Ding *et al*^[1]应用双向电泳技术比较了肝癌高转移细胞株MHCC97-H与低转移细胞株MHCC97-L的蛋白表达情况, 共发现56个差异表达的蛋白质点。其中4个蛋白质点仅在MHCC97-H中表达。通过质谱鉴定, 发现丙酮酸激酶M2等6种蛋白在MHCC97-H细胞中表达增加, 而锰超氧化物歧化酶等7种蛋白表达降低。其中多数蛋白质分子

■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

已报道与肿瘤转移相关, 因此认为他们也可能与肝癌转移有关。

1.2 肝癌组织双向电泳分析 Sun *et al*^[12]收集了12例乙肝病毒相关性肝癌组织和配对癌旁组织, 经双向荧光电泳分离, 共得到219个表达差异蛋白点。其中肝癌组织中61个蛋白点表达上调, 158个蛋白点表达下调。应用质谱分析, 共鉴定71个分子, 建立了一个肝癌相关差异蛋白质库, 其中Hsp70/Hsp90-organizing protein和不均一核内糖核蛋白C1/C2从未报道过与肝癌相关。随后的Western blot和免疫组化检测结果表明, 这两个蛋白在70例肝癌组织中均有表达, 而对应的癌旁组织中几乎无表达。提示其具有作为肝癌标志物的潜在可能性。Yi *et al*^[13]收集了103例乙肝病毒相关性肝癌组织和配对癌旁组织以及16例正常肝组织, 应用双向电泳技术分离样本蛋白, 通过数据分析和质谱鉴定, 发现肝癌组织中HSPA9基因编码的致死蛋白(mortalin)表达明显上调。进一步研究发现, 与35例术后1年未复发的肝癌患者相比, 68例术后早期复发肝癌患者的致死蛋白表达量明显增高。另外发现, 肝癌高转移细胞株中致死蛋白表达量也明显增高, 并且致死蛋白与临床肝癌的恶化和侵袭转移相关。因此认为致死蛋白可以作为监测肝癌早期复发的一个候选标志物。Takashima *et al*^[14]采用双向电泳技术将15例肝癌组织和癌旁组织以及5例正常肝组织的蛋白进行分离, 用自体血清进行免疫印迹反应, 通过比对, 发现肝癌组织中有4个蛋白点表达上调。进一步鉴定后, 发现抗锰超氧化物歧化酶、热休克蛋白70和过氧化物还原酶的自身抗体在肝癌患者血清中具有明显的免疫反应, 因此认为是肝癌特异性抗体, 具有作为肝癌诊断标志物的潜能。

1.3 肝癌血清双向电泳分析 Feng *et al*^[15]将20例乙肝病毒相关性肝癌患者, 20例乙肝病毒感染者和20例健康志愿者的血清分别混合后, 先除去血清白蛋白和免疫球蛋白, 然后通过双向电泳分离和质谱鉴定, 共发现热休克蛋白27、甲胎蛋白等8种蛋白在3组中存在明显的表达差异。应用Western blot进一步验证, 发现90%肝癌患者和2例乙肝病毒感染者血清中表达热休克蛋白27, 而健康者血清中均没有表达。故认为该蛋白可作为肝癌诊断的一个候选血清标志物。Block *et al*^[16]用早獭建立肝癌模型, 在凝集素富集糖蛋白后, 应用双向电泳技术从肝癌早獭血清中分离出一组高度岩藻糖基化糖蛋白, 并进行了质

谱鉴定。随后对其中的高尔基蛋白73(GP73)进行Western blot验证, 发现与乙型肝炎患者相比, 肝癌患者血清GP73表达量差异没有统计学意义, 但是肝癌患者血清岩藻糖基化GP73表达量明显增高, 表明岩藻糖基化GP73具有作为肝癌诊断标志物的潜在可能。

2 肝癌实验诊断相关质谱分析

2.1 固体芯片飞行时间质谱技术的应用

2.1.1 固体芯片飞行时间质谱技术: 美国Ciphergen公司提供的蛋白质芯片技术是随着蛋白质组学兴起而出现的一种可能比较适合于临床应用的新技术。该技术又称表面增强激光解吸/电离飞行时间质谱技术(SELDI-TOF-MS), 集蛋白质芯片、质谱分析技术和生物信息软件于一体。作为蛋白质组学研究的一个强有力工具, SELDI-TOF-MS已被用来研究肝炎、肝硬化和肝癌的蛋白指纹图谱, 通过不同组间的蛋白表达差异来建立疾病诊断模型。显然, 同时对一组与肝癌相关的蛋白进行分析比对, 诊断的灵敏度和特异性必然高于目前以单一标志物为依据或者少数几个标志物联合检测的诊断方法。

2.1.2 肝癌血清固体芯片飞行时间质谱分析: Paradis *et al*^[17]收集了82例肝硬化患者血清, 其中44例伴有肝癌, 38例排除肝癌。将这些标本分别随机分为建模组和验证组, 其中建模组血清通过SELDI-TOF-MS技术建立了由6个差异蛋白表达峰组成的蛋白表达图谱模型。用验证组血清验证该模型的灵敏度和特异性, 分别达到92.5%和90%。其中表达差异最大的一个峰(8900 Da)经双向电泳分离和质谱鉴定, 确认为玻璃粘连蛋白C端的一个片段, 可用来作为诊断肝癌的一个潜在标志物。Schwegler *et al*^[18]收集39例健康者、36例未肝硬化肝病、38例肝硬化和57例肝癌患者血清, 采用铜离子螯合的亲合芯片, 通过SELDI-TOF-MS技术建立了一个以38个不同蛋白组成的图谱模型。利用该模型进行盲法检测, 鉴别丙型肝炎病毒相关疾病如慢性丙型肝炎、丙型肝炎肝硬化或者丙肝病毒相关性肝癌和健康者, 其灵敏度和特异性可达74%-95%; 而采用该模型区别慢性丙型肝炎和丙肝病毒相关性肝癌的灵敏度可达61%, 特异性达76%。如果该诊断模型和AFP、异常凝血酶原和GP73联用, 则将灵敏度和特异性分别提高到75%和92%。并且该模型可将肝癌从肝病患者在肝硬化之前或者发生肝硬化之时就检测出来, 特别是丙肝病毒

■研发前沿

基于蛋白质芯片技术建立的蛋白指纹图谱诊断模型可以在同一个芯片上同时检测临床标本中的一组蛋白, 且过程简单, 分析迅速, 是很有前途的诊断新方法。但是, 蛋白质芯片技术的诸多弊端, 例如重复性差、不同研究者研究结果不一致等, 又限制了蛋白质组学技术在临床上的应用。

■相关报道

国外对基于蛋白质组学的肝癌实验诊断的研究已取得长足的进步。通过双向电泳技术和质谱技术分离鉴定了一批肝癌的潜在标志物, 并通过飞行时间质谱技术建立了蛋白指纹图谱诊断模型, 大大提高了肝癌诊断的灵敏度和特异性。

■应用要点

通过对多种方法在肝癌蛋白质组学研究中的运用,发现他们各有利弊.因此可将多种蛋白质组学技术联合应用,取长补短,必能发挥各自优势,大大提高肝癌早期诊断的特异性和灵敏度.

相关肝病. Kanmura *et al*^[9]收集了77例丙型肝炎病毒相关的慢性肝病和64例肝癌血清,分别随机分为2组,其中一组35例为肝癌,44例为其他肝病;另一组29例为肝癌,33例为其他肝病.选用第一组血清通过SELDI-TOF-MS建立了由6个差异蛋白表达峰组成的蛋白表达图谱诊断模型.用第二组血清验证该模型的灵敏度和特异性,分别为83%和76%.同时收集了7例肝癌在诊断为肝癌前1年的血清和5例未发生肝癌肝病3年前的血清,用该模型进行检测,7例肝癌患者有6例阳性,而5例肝病全部为阴性.表明该模型对慢性丙型肝炎病毒感染者进行肝癌的早期检测和预测具有显著的意义. Zinkin *et al*^[10]应用SELDI-TOF-MS对41例丙型肝炎病毒相关性肝癌和51例丙型肝炎相关性肝硬化患者血清进行分组检测,建立了由一个11个蛋白表达峰组成的诊断模型,用于肝癌诊断的灵敏度为79%,特异性为86%.将8例小于2 cm的肝癌患者血清用于验证,结果验证出7例,而AFP、AFP异质体和异常凝血酶原只分别鉴定出3例、1例和1例,说明该模型对于肝癌的诊断比传统的肝癌标志物更加准确. Poon *et al*^[11]收集了38例肝癌和20例其他慢性肝病血清,选用WCX2和IMAC3芯片,应用SELDI-TOF-MS建立了鉴别慢性肝病的肝癌指纹图谱模型,其灵敏度和特异性分别为92%和90%. Ward *et al*^[12]应用SELDI-TOF-MS技术研究了肝癌患者癌前、患癌和治疗后的血清,发现癌前和患癌的血清中有数个明显的差异表达蛋白峰,但在治疗后并没有消失,说明这些蛋白表达量的变化与肿瘤有无并无多大关联,而主要与肝病的进展和癌前期的病变相关.经分离鉴定,得到一个差异表达蛋白为 $\beta 2$ 微球蛋白,认为可作为判断肝病进展和癌前期病变的候选标志物.

2.1.3 固体芯片飞行时间质谱技术存在的问题:随着SELDI-TOF-MS技术逐渐应用于临床,发现这项技术存在一些问题尚待解决和完善,如不能在线鉴定差异蛋白;图谱中的峰高和蛋白质浓度之间并非都是线性关系;由于检测过程中涉及因素较多,控制又未标准化,同一疾病的特征性波峰在不同研究者之间重现性差.因此,SELDI-TOF-MS作为快速诊断、发现并鉴定肿瘤标志物的手段应用于临床,在准确性、稳定性和重复性等方面还需要进一步提高.

2.2 肝癌血清液体芯片飞行时间质谱分析 近年来出现了一项可与SELDI-TOF-MS竞争的新的质谱技术,即布鲁克公司提供的液体芯片飞行

时间质谱技术(CLINPROT MALDI-TOF-MS, 又称CLINPROT系统),其准确性、稳定性、灵敏性和重复性等可能更胜一筹.与SELDI-TOF-MS相比,CLINPROT系统最大的特点是用液体芯片技术取代固体芯片技术,即先在液态中用某种磁珠捕获特定的蛋白.由于捕获的低丰度蛋白或多肽种类多,保证了检测的准确性和灵敏度,同时纳米磁珠巨大的表面积使蛋白的捕获具有良好的重现性.该系统另一个独特的优势是二次质谱技术,可以在寻找生物标志物的同时进一步在线直接鉴定单个候选标志物.总之,CLINPROT系统允许科研人员使用单一、易于应用的集成系统检测蛋白质表达谱、发现蛋白质组指纹以及识别蛋白质. Goldman *et al*^[13]收集了78例丙肝病毒相关性肝癌血清和72例非肝癌血清,应用磁珠富集小分子量蛋白,通过MALDI-TOF-MS建立了一个由6个差异表达蛋白峰构成的诊断模型,对50例验证组血清进行盲法检测的灵敏度达100%,特异性达91%.其中2个显著差异蛋白峰经过在线质谱鉴定,确认为补体C3和C4的片段,认为可作为肝癌的候选标志物.

3 其他蛋白质组学技术的应用

随着液相色谱-质谱联用(LC-MS)技术、激光捕获微切割(LCM)、差异凝胶电泳(2D-DIGE)和同位素标记亲和标签技术(ICAT)等生物新技术的相继出现,蛋白质组学技术得到不断完善,并进一步推动肝癌实验诊断研究的深入发展.而目前越来越倾向于多种方法联合应用于肝癌的蛋白质组学研究.

Li *et al*^[14]联合应用激光捕获显微切割、同位素亲和标记和二维液相色谱-质谱联用等三种技术,对肝癌和非肝癌组织的细胞进行差异蛋白质组分析,定性鉴定了644种蛋白质,包括定量鉴定了261种蛋白质,其中149种蛋白质表达量有2倍以上的差异.这些结果为进一步发现新的肝癌标志物奠定了扎实的基础. Lee *et al*^[15]应用差异凝胶双向电泳技术和液相色谱-质谱联用技术,从人肝癌组织中分离并鉴定了30个具有明显表达差异的蛋白(与癌旁肝组织比较),其中16个蛋白表达上调,14个蛋白表达下调.进一步研究表明,14-3-3 γ 蛋白(14-3-3 gamma protein)表达显著增加,可作为肝癌标志物. Lee *et al*^[16]随后应用SELDI-TOF-MS对55例丙型肝炎病毒相关性肝癌、48例慢性丙型肝炎以及9例健康者血

清进行测定, 找到一个表达显著差异的蛋白峰, 分子质量为8900 Da, 通过双向电泳技术和二维液相色谱-质谱联用技术分离鉴定该蛋白为补体蛋白C3a。进一步分析表明, 补体C3a水平与丙氨酸转氨酶、肿瘤大小等参数之间均无显著相关性。

4 结论

近年来, 应用蛋白质组学技术已发现并鉴定了一批潜在的肝癌标志物。但是, 随之而产生的另一个困扰则是如何选择合适的肝癌标志物进行联合诊断, 以及如何形成多种标志物检测结果的有效报告。这无疑需要大量的临床验证以及统计学分析处理, 过程繁琐、复杂。基于蛋白质芯片技术建立的蛋白指纹图谱诊断模型可以在同一个芯片上同时检测临床标本中的一组蛋白, 且过程简单, 分析迅速, 则能很好地解决这个问题。但是, 蛋白质芯片技术的诸多弊端, 例如重复性差、不同研究者研究结果不一致等, 又限制了蛋白质组学技术在临床上的应用。因此, 技术进步仍是今后肝癌实验诊断研究的一个重点, 一方面需要将现有的技术方法不断完善, 综合运用, 取长补短; 另一方面则需要进一步丰富和发展新的蛋白质组学技术, 提高其可重复性和稳定性。

5 参考文献

- Ding SJ, Li Y, Shao XX, Zhou H, Zeng R, Tang ZY, Xia QC. Proteome analysis of hepatocellular carcinoma cell strains, MHCC97-H and MHCC97-L, with different metastasis potentials. *Proteomics* 2004; 4: 982-994
- Sun W, Xing B, Sun Y, Du X, Lu M, Hao C, Lu Z, Mi W, Wu S, Wei H, Gao X, Zhu Y, Jiang Y, Qian X, He F. Proteome analysis of hepatocellular carcinoma by two-dimensional difference gel electrophoresis: novel protein markers in hepatocellular carcinoma tissues. *Mol Cell Proteomics* 2007; 6: 1798-1808
- Yi X, Luk JM, Lee NP, Peng J, Leng X, Guan XY, Lau GK, Beretta L, Fan ST. Association of mortalin (HSPA9) with liver cancer metastasis and prediction for early tumor recurrence. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7: 315-325
- Takashima M, Kuramitsu Y, Yokoyama Y, Iizuka N, Harada T, Fujimoto M, Sakaida I, Okita K, Oka M, Nakamura K. Proteomic analysis of autoantibodies in patients with hepatocellular carcinoma. *Proteomics* 2006; 6: 3894-3900
- Feng JT, Liu YK, Song HY, Dai Z, Qin LX, Almofti MR, Fang CY, Lu HJ, Yang PY, Tang ZY. Heat-shock protein 27: a potential biomarker for hepatocellular carcinoma identified by serum proteome analysis. *Proteomics* 2005; 5: 4581-4588
- Block TM, Comunale MA, Lowman M, Steel LF, Romano PR, Fimmel C, Tennant BC, London WT, Evans AA, Blumberg BS, Dwek RA, Mattu TS, Mehta AS. Use of targeted glycoproteomics to identify serum glycoproteins that correlate with liver cancer in woodchucks and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 779-784
- Paradis V, Degos F, Dargère D, Pham N, Belghiti J, Degott C, Janeau JL, Bezeaud A, Delforge D, Cubizolles M, Laurendeau I, Bedossa P. Identification of a new marker of hepatocellular carcinoma by serum protein profiling of patients with chronic liver diseases. *Hepatology* 2005; 41: 40-47
- Schwegler EE, Cazares L, Steel LF, Adam BL, Johnson DA, Semmes OJ, Block TM, Marrero JA, Drake RR. SELDI-TOF MS profiling of serum for detection of the progression of chronic hepatitis C to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005; 41: 634-642
- Kanmura S, Uto H, Kusumoto K, Ishida Y, Hasuike S, Nagata K, Hayashi K, Ido A, Stuver SO, Tsubouchi H. Early diagnostic potential for hepatocellular carcinoma using the SELDI ProteinChip system. *Hepatology* 2007; 45: 948-956
- Zinkin NT, Grall F, Bhaskar K, Otu HH, Spentzos D, Kalmowitz B, Wells M, Guerrero M, Asara JM, Libermann TA, Afdhal NH. Serum proteomics and biomarkers in hepatocellular carcinoma and chronic liver disease. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 470-477
- Poon TC, Yip TT, Chan AT, Yip C, Yip V, Mok TS, Lee CC, Leung TW, Ho SK, Johnson PJ. Comprehensive proteomic profiling identifies serum proteomic signatures for detection of hepatocellular carcinoma and its subtypes. *Clin Chem* 2003; 49: 752-760
- Ward DG, Cheng Y, N'Kontchou G, Thar TT, Barget N, Wei W, Billingham LJ, Martin A, Beaugrand M, Johnson PJ. Changes in the serum proteome associated with the development of hepatocellular carcinoma in hepatitis C-related cirrhosis. *Br J Cancer* 2006; 94: 287-292
- Goldman R, Ransom HW, Abdel-Hamid M, Goldman L, Wang A, Varghese RS, An Y, Loffredo CA, Drake SK, Eissa SA, Gouda I, Ezzat S, Moiseiwitsch FS. Candidate markers for the detection of hepatocellular carcinoma in low-molecular weight fraction of serum. *Carcinogenesis* 2007; 28: 2149-2153
- Li C, Hong Y, Tan YX, Zhou H, Ai JH, Li SJ, Zhang L, Xia QC, Wu JR, Wang HY, Zeng R. Accurate qualitative and quantitative proteomic analysis of clinical hepatocellular carcinoma using laser capture microdissection coupled with isotope-coded affinity tag and two-dimensional liquid chromatography mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3: 399-409
- Lee IN, Chen CH, Sheu JC, Lee HS, Huang GT, Yu CY, Lu FJ, Chow LP. Identification of human hepatocellular carcinoma-related biomarkers by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *J Proteome Res* 2005; 4: 2062-2069
- Lee IN, Chen CH, Sheu JC, Lee HS, Huang GT, Chen DS, Yu CY, Wen CL, Lu FJ, Chow LP. Identification of complement C3a as a candidate biomarker in human chronic hepatitis C and HCV-related hepatocellular carcinoma using a proteomics approach. *Proteomics* 2006; 6: 2865-2873

■同行评价

本文有较好的创新性, 国内同类型文章较少, 全文资料丰富, 写作详尽, 结构清楚, 条理清晰, 有较好的学术价值和应用价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

磁共振弥散成像在肝纤维化中的研究进展

胡兴荣, 陈军

■背景资料

肝纤维化的早期诊断和治疗, 对于慢性肝病的诊治有重要价值。肝组织活检可以直接获得病理学诊断, 是临床上的金标准, 但由于其属创伤性检查, 应用价值受到限制。非创伤性的评价肝纤维化的方法已成为世界肝脏病学研究中的一个焦点问题。磁共振弥散成像作为功能成像的新技术, 是唯一能在活体检测组织内水分子扩散运动的无创影像检查技术, 能在宏观成像中反映活体组织中水分子微观扩散运动。

■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

胡兴荣, 湖北省恩施州中心医院影像科 湖北省恩施市 445000

陈军, 武汉大学人民医院放射科 湖北省武汉市 430060

作者贡献分布: 本综述写作由胡兴荣完成, 审校由陈军完成。

通讯作者: 陈军, 430060, 湖北省武汉市武昌区解放路238号, 武汉大学人民医院放射科. lily_chenjun82@yahoo.com.cn
电话: 027-88041911-8515

收稿日期: 2008-10-28 修回日期: 2008-12-10

接受日期: 2008-12-15 在线出版日期: 2009-01-28

Progress in magnetic resonance diffusion-weighted imaging in liver fibrosis

Xing-Rong Hu, Jun Chen

Xing-Rong Hu, Department of Imaging Medicine, Enshi Prefecture Central Hospital, Enshi 445000, Hubei Province, China
Jun Chen, Department of Radiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Correspondence to: Jun Chen, Department of Radiology, Renmin Hospital of Wuhan University, 238 Jiefang Road, Wuchang District, Wuhan 430060, Hubei Province, China. lily_chenjun82@yahoo.com.cn

Received: 2008-10-28 Revised: 2008-12-10

Accepted: 2008-12-15 Published online: 2009-01-28

Abstract

With an increasing number of patients with chronic liver diseases in china, evaluation of liver fibrosis and cirrhosis has become one of the current research focal points under investigation. For a long time, liver biopsy remains the gold standard for diagnosis of liver fibrosis, but it is a traumatic and somewhat blind examination to a certain extent. Neither more sensitive indicators nor specific ones have been found in both serum of hepatic fibrosis and conventional imaging methods in the study of liver fibrosis. Recently, the diffusion magnetic resonance imaging sheds some light on diagnosing hepatic fibrosis. Evaluating severity of hepatic fibrosis in chronic liver disease with magnetic resonance diffusion-weighted imaging was summarized in the present paper.

Key Words: Liver fibrosis; Magnetic resonance imaging; Diffusion weighted imaging

Hu XR, Chen J. Progress in magnetic resonance diffusion-weighted imaging in liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(3): 288-292

摘要

我国慢性肝病患者在逐年增多, 评价患者肝纤维化及肝硬化的严重程度是当前研究的热点之一。长期以来, 临床多以肝活检组织病理学检查作为诊断肝纤维化的金标准, 但其有一定的创伤性及盲目性。血清肝纤维化指标和常规影像学方法在肝纤维化的研究中未发现较敏感和特异性的指标, 而近年磁共振弥散成像为肝纤维化的诊断带来了曙光。本文就磁共振扩散加权成像在评价慢性肝病肝纤维化的严重程度中的应用现状予以综述。

关键词: 肝纤维化; 磁共振成像; 弥散加权成像

胡兴荣, 陈军. 磁共振弥散成像在肝纤维化中的研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(3): 288-292

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/288.asp>

0 引言

肝纤维化是指在各种慢性肝病时, 肝细胞发生持续、反复的坏死和炎症刺激, 导致机体发生修复反应, 表现为肝内纤维结缔组织的异常增生与沉积, 是慢性肝病的重要病理特征。在各种慢性肝病进展中由于肝内纤维生成与降解失衡, 致使过多的胶原在肝内沉积, 常伴有炎症并可发展为肝硬化甚至肝癌。大量临床研究表明, 因为体内存在纤维降解过程, 肝纤维化是可以减轻和逆转的, 但发展至肝硬化则再不可逆性, 如能阻断、减轻乃至逆转肝纤维化, 就能在很大程度上改善肝病的预后。因此, 肝纤维化的早期诊断和治疗, 对于慢性肝病的诊治有重要价值。肝组织活检可以直接获得病理学诊断, 是临床上的金标准, 但由于其属创伤性检查, 加之无法反映肝脏病变的全貌, 使其应用价值受到限制。非创伤性的评价肝纤维化的方法已成为世界肝脏病学研究中的一个焦点问题。磁共振弥散成像(diffusion weighted imaging, DWI)作为功能成像的新技术, 是唯一能在活体检测组织内水分子扩散运动的无创影像检查技术, 能在宏观成像中反映活体组织中水分子微观扩散运动。以往DWI主要集中应

用于神经放射学领域并且显示出巨大的临床应用价值^[1-2]。随着快速成像技术的迅速发展, DWI已逐步应用到全身其他系统和器官^[3-6], 特别是近年来在肝脏的研究应用日益增多。本文就DWI成像原理及方法、在肝纤维化中的研究现状、存在问题及应用前景进行综述。

1 DWI基本原理

弥散是指组织中水分子的不规则随机运动, 即布朗(Brownian)运动, 他是DWI的基础。在梯度磁场下, 弥散运动分子中的质子依磁场梯度随机移动, 以不同频率自旋, 以致质子回波时不能再聚焦, 产生不一致的相位位移, 导致信号衰减, 从而构成磁共振弥散图像的对比^[7-9]。因此, 通过对成像序列的设计, 即在常规自旋回波(SE)T2加权序列的180度脉冲两侧对称地施加一对大小相等、方向相反的弥散敏感梯度脉冲(DSGP), 对于静止的水分子, 第一个梯度脉冲所致的质子自旋去相位会被第二个梯度脉冲完全再聚合, 信号强度不受影响; 而运动的水分子, 在施加的梯度磁场方向会产生相位离散, 即使弥散效应微弱, 在第二个梯度脉冲时MR信号也不能完全再聚合, 从而导致信号强度随弥散时相而衰减, 至此, 不同的弥散强度以不同信号强度的方式被显示出来, 形成组织对比, 产生弥散图像。DWI图像实为组织形态与运动状态的结合图像^[10-11], 以突出水分子的弥散效应作为图像对比的一种成像方法。DWI中组织信号强度主要与组织中水分子的自由度及施加的弥散敏感梯度(b)有关, 水分子运动越自由(弥散快), b值越大, 相位离散越重, 信号降低越明显。

弥散成像反映的是分子运动, 对运动有极高的敏感性, 成像质量不仅受微循环因素(如体液流动、细胞的渗透性和温度、毛细血管灌注、细胞膜通透性的方向等)影响, 也受宏观因素, 如各种生理活动的影响, 因此, 所得信号变化不能完全反映真正的弥散系数。实际工作中常用表观弥散系数(apparent diffusion coefficient, ADC)来代替真正的弥散系数(diffusion coefficient, DC)^[12]。通过不同b值的两个以上的弥散加权像, 我们可以计算出组织的ADC。通过ADC值的测量, 组织分子的运动状态就可通过量化指标进行反映。一般认为其内水分子运动相对自由的结构, 即弥散速度快的组织具有较高的ADC值。在弥散加权图像上, ADC值越高, 信号越低; ADC值越小, 信号越高。而在ADC图上则相反, ADC值越高, 信号越高; ADC值越小, 信号越低。纯水中水分子的弥

散运动充分自由, 而在活体组织中, 生物膜及体液中的大分子将限制水分子的运动。不同的组织结构和分子环境对水分子运动的限制程度不同, DWI通过检测组织内水分子的运动状态来反映组织的结构特点, 病变组织与正常组织的水分子的离散程度不同, 其信号降低的程度与正常组织之间形成差别, 从而发现病变^[7,13]。

2 肝脏DWI技术及参数选择

2.1 肝脏DWI扫描技术 DWI对运动极为敏感, 患者的位置移动、呼吸、心跳、肠蠕动等生理活动均严重影响成像质量, 常规SE-DWI序列成像时间长, 在肝脏的临床应用受到限制。近年来单次触发、呼吸门控、心电门控, 特别是平面回波成像(echo planar imaging, EPI)等新技术的应用克服了上述不足, 使DWI在上腹部, 特别是在肝脏应用越来越广泛。

单次触发自旋回波平面回波成像(single-shot spin-echo echo-planar imaging, SS-SE-EPI)是肝脏DWI最常用的序列, SS-SE-EPI序列通常需加入脂肪抑制序列如短时间翻转恢复(short time inversion recovery, STIR)、化学位移法(chemical shift selection, CHESS)来提高成像的信噪比。其在90度脉冲后的180度脉冲两侧加上不同b值的敏感梯度, 最后以EPI方式读取信号, 成像速度极快、切层效率极高, 在数十毫秒内完成图像的信号采集, 基本上可以冻结上述多数生理活动, 减轻或消除他们对DWI信号的影响, 是目前肝脏最常用的弥散加权成像方式。近来出现的一种并行采集敏感性编码(sensitivity encoding, SENSE)技术^[14], 在不增加任何梯度成本的同时提高梯度系统的有效切换率, 避免了过高的场强和梯度切换对患者的生物电(心电、脑电、神经刺激等)的干扰, 在缩短数倍扫描时间的同时, 提高图像信噪比、空间分辨率和时间分辨率, 可以进行超快速的高分辨弥散成像。通过一次屏气获得腹部所有器官的ADC图, 所得图像质量和分辨率高^[15-16], 结合SENSE技术的DWI成像, 能缩短采集时间、减少伪影。

2.2 肝脏DWI参数选择 b值是DWI的重要参数之一, b值的高低与成像的时间、质量, 以及ADC值测量密切相关。正常肝实质和肝病变有特异性的DC值(如肝为 $0.72 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$)^[12], 通常DWI所得的ADC值较他们的DC值明显高, 表明了体内其他形式的微运动对ADC值的影响, 其中以毛细血管的微灌注影响最大。在DWI中, b值越小, ADC值越大, 表明微灌注的影响越

■相关报道

以往DWI主要集中应用于神经放射学领域并且显示出巨大的临床应用价值。随着快速成像技术的迅速发展, DWI已逐步应用到全身其他系统和器官, 特别是近年来在肝脏的研究应用日益增多。

■应用要点

随着高场MRI弥散成像最新序列的优化,DWI就会更加敏感,ADC值也更加精确,量化分析数据更准确.

大;使用大b值时,灌注的影响会被大的梯度抵消,ADC值接近DC值,能真实地反映组织内水分子的扩散运动^[12,15-17].然而,随着b值的增大各种伪影增多,图像易变形,信噪比下降,可严重影响图像质量,使小病变容易漏诊.为了尽量减少灌注的影响,使得到的ADC值反映真正的弥散,同时又保证图像质量,b值的选择就相当重要.Ichikawa *et al*^[8]采用b值1.6 s/mm²、55 s/mm²成像得到肝脏的ADC值高于纯水的ADC值,而物理学试验证明与其他组织比较纯水的扩散系数最大,可见低b值DWI不能真实反映组织扩散系数(D)值.Yamada *et al*^[12]认为采用低b值测定ADC值融合了部分微循环的血流灌注的影响.高b值使TE增加,成像时间延长,对于肝脏短T2组织信号衰减明显,图像信噪比及对比噪声比减低,磁敏感伪影增加,导致图像变形.但高b值DWI对运动慢的水分子信号敏感,能很好反映组织的扩散特性,减小T2的穿透效应,ADC值较稳定、变异小,所测的ADC值接近组织的真实D值.体部DWI所用的b值范围变化较大,在0.01-1300 s/mm²不等^[18],各种文献报道使用的b值不统一,肝脏ADC值各不相同.目前国内外研究表明,高b值选择在300-800 s/mm²时,图像质量清晰,组织扩散特性好,ADC值准确.国内沈文^[19]、尚全良 *et al*^[20] b值用500 s/mm²时能得到较稳定的DWI图像.

DWI只能检测施加了弥散敏感梯度场方向上的水分子扩散运动.在中枢神经系统中脑白质内水分子的弥散是各向异性的,沿髓鞘走行方向的弥散大于垂直于髓鞘走行方向的弥散^[21-22].肝脏DWI常利用横断面图像上进行,扩散敏感梯度场可施加在X、Y、Z 3个方向上^[23].肝脏的弥散是各向同性还是各向异性决定b值的取向,Taouli *et al*^[24]对正常及病变肝实质的弥散方向进行研究,认为肝实质的弥散是各向同性的,可能与肝脏随机的组织结构有关,认为多方向的弥散梯度在肝弥散研究的设计中是不必要的.

呼吸运动影响肝脏DWI图像质量,导致ADC值测量不准确,而EPI序列不能完全消除呼吸运动伪影,文献报道都是通过扫描时患者屏气来消除这些伪影的影响,缩短扫描时间(主要是缩短TR)让患者能够耐受.尚全良 *et al*^[20]在肝脏DWI技术探讨中发现,TR为10 000 ms时,扫描时间为40 s,TR每缩短2000 ms,扫描时间减少8 s,当TR减至4000 ms时,扫描时间为16 s,完全可满足全肝脏扫描的需要,并且对ADC值及图像信

噪比均无明显的影响.因此,一般情况良好的大多数患者,都能耐受在检查时完全屏气时间多为15-20 s.

Aubé *et al*^[25]认为在评价弥漫性肝疾病时,对空间分辨率并无强制性要求,使用长的TR和大体素可以增加信号强度,可将其作为理想的信号采集需要.在他的研究中分别用3500 ms和5000 ms的TR值对肝纤维化进行分析,发现使用长的TR值(5000 ms)计算出的正常肝与硬化肝的ADC值差别更大.

3 DWI在肝纤维化中的研究现状

肝组织内胶原纤维的增生是肝硬化的主要病理变化,可以反映肝硬化和肝功能损害的严重程度.但临床却缺乏对活体内肝组织的纤维化作出定量分析的方法.DWI使MR信号与组织内氢质子或水分子不连贯的微观运动相联系,从微观水平为病变的诊断和鉴别诊断提供信息,目前DWI在肝脏主要应用于肝脏局灶性病变的诊断和鉴别诊断中^[7,12,24].同样,纤维化患者肝实质内含水量的变化可以通过DWI进行测量.肝纤维化的主要成分是胶原,这种分子的质子不丰富并且紧密结合,将限制组织内的水分子运动,因此,理论上,与正常肝实质比较,在肝纤维化中弥散应该减少、ADC值下降.如果DWI能准确反映肝内纤维增生程度,将会给临床评价肝纤维化和潜在的肝功能损害寻找到一种简便、无创的功能成像方法^[13,18,25].

肝纤维化及肝硬化对ADC值的影响近年来已有一些文献报道,但结果存在争议.多数学者认为纤维化及硬化肝组织中水分子弥散下降,ADC值小于正常肝脏^[7,13,16,19,24,26],Amano *et al*^[13]、Koinuma *et al*^[18]、Aubé *et al*^[25]、Ichikawa *et al*^[8]的结果还表明两者之间的差异有统计学意义,认为ADC值下降与肝内纤维增生限制了水分子的Brown运动有关.Yamada *et al*^[12]对真正弥散系数D的测量也显示,肝硬化D值为 $0.67 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$,较正常肝($0.76 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$)轻度下降,但并无统计学意义.Koinuma *et al*^[17]、Aubé *et al*^[25]、Yamashita *et al*^[9]利用DWI对肝纤维化和肝硬化的初步研究发现,ADC值与肝纤维化血清学标记物、病理肝纤维化评分和反映肝功能严重程度的Child-Pugh评分间有明显相关性,认为ADC值的测量可在一定程度上反映肝纤维化的严重程度,对于评价肝脏纤维化分期有帮助.但也有学者得出相反的结论,他们认为DWI只有在肝硬化程度较高时才能反映出

ADC的变化. 如Annet *et al*^[26]研究认为肝纤维化并不能用DWI水分子受限来评估. Boulanger *et al*^[5]研究发现ADC值与肝炎及肝纤维化分级之间并无明显相关性. 但他们研究使用的b值较小(50-295 s/mm²之间), 可能并不能准确反映肝的纤维化改变. 国内杨正汉 *et al*^[17,27]对肝硬化患者及犬不均匀性肝硬化模型进行DWI的研究认为, 肝硬化的ADC值下降虽与肝内纤维化有关, 但其机制可能不是纤维增生限制了水分子的热运动, 而可能是增生的纤维破坏了微循环, 造成肝实质血流灌注下降所致, 因此认为需对ADC值对肝硬化的诊断价值进行重新评价.

4 结论

DWI在肝脏纤维化肝硬化的应用处于初级阶段, 目前仍存在许多问题等待解决: 由于应用的MR仪场强及机型差异较大, 研究所选b值不统一, 变化范围广, 使所得肝脏及其病变的ADC值差异很大, 影响比较; ADC值与肝纤维化标记物之间的相关性研究较少, 缺乏对肝纤维化程度进行定量评价的研究; 研究样本数较少, 限制了结果统计的能力; 与肝纤维化相关或相伴的其他组织病理过程(如铁的沉积、炎症反应、脂肪浸润等)可能干扰质子弥散, 从而影响ADC值, 目前还缺乏对ADC值与其他组织病理过程之间的相关性研究^[25]; EPI序列的固有特点易使图像产生一些伪影, 影响图像质量. 但是, EPI技术是近年来MRI硬件和软件发展的结果, 也是目前速度最快的EPI信号采集方式^[28]. 弥散加权成像作为一种功能性成像方法, 与EPI技术相结合, 使我们对于肝脏病变的研究从单纯形态学分析转为量化分析与形态学分析相结合的领域. 目前在高场强MR机上, 最新的序列可同时进行3-4种b值, 8个方向弥散成像, b值可达10000以上, 这样DWI就会更加敏感, ADC值也更加精确, 量化分析数据也更准确^[29]. 因而我们相信磁共振平面回波弥散加权成像在未来能够更准确、细致地在分子运动水平上更好地表达肝脏组织和病灶的功能状态, 有望在实际临床工作中得到广泛的应用.

随着更高性能MR机的应用及EPI等超快速成像技术的进一步完善, DWI将以其无损伤性和良好的空间分辨率, 以及能无创性反应肝实质及其病变的ADC特性, 在临床得到更广泛的应用. 使用更大样本量及能准确定量肝纤维化的参考指标对ADC值与肝纤维化程度行进一步研

究, 将会使DWI在肝纤维化的诊断和程度判定方面有更加科学合理的评价.

5 参考文献

- 1 Yoshikawa K, Nakata Y, Yamada K, Nakagawa M. Early pathological changes in the parkinsonian brain demonstrated by diffusion tensor MRI. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75: 481-484
- 2 Eastwood JD, Lev MH, Wintermark M, Fitzek C, Barboriak DP, Delong DM, Lee TY, Azhari T, Herzau M, Chilukuri VR, Provenzale JM. Correlation of early dynamic CT perfusion imaging with whole-brain MR diffusion and perfusion imaging in acute hemispheric stroke. *AJNR Am J Neuroradiol* 2003; 24: 1869-1875
- 3 Guo Y, Cai YQ, Cai ZL, Gao YG, An NY, Ma L, Mahankali S, Gao JH. Differentiation of clinically benign and malignant breast lesions using diffusion-weighted imaging. *J Magn Reson Imaging* 2002; 16: 172-178
- 4 Sinha S, Sinha U. In vivo diffusion tensor imaging of the human prostate. *Magn Reson Med* 2004; 52: 530-537
- 5 Boulanger Y, Amara M, Lepanto L, Beaudoin G, Nguyen BN, Allaire G, Poliquin M, Nicolet V. Diffusion-weighted MR imaging of the liver of hepatitis C patients. *NMR Biomed* 2003; 16: 132-136
- 6 Moteki T, Ishizaka H. Diffusion-weighted EPI of cystic ovarian lesions: evaluation of cystic contents using apparent diffusion coefficients. *J Magn Reson Imaging* 2000; 12: 1014-1019
- 7 Namimoto T, Yamashita Y, Sumi S, Tang Y, Takahashi M. Focal liver masses: characterization with diffusion-weighted echo-planar MR imaging. *Radiology* 1997; 204: 739-744
- 8 Ichikawa T, Haradome H, Hachiya J, Nitatori T, Araki T. Diffusion-weighted MR imaging with a single-shot echoplanar sequence: detection and characterization of focal hepatic lesions. *AJR Am J Roentgenol* 1998; 170: 397-402
- 9 Yamashita Y, Tang Y, Takahashi M. Ultrafast MR imaging of the abdomen: echo planar imaging and diffusion-weighted imaging. *J Magn Reson Imaging* 1998; 8: 367-374
- 10 Gray L, MacFall J. Overview of diffusion imaging. *Magn Reson Imaging Clin N Am* 1998; 6: 125-138
- 11 Müller M, Prasad P, Siewert B, Nissenbaum MA, Raptopoulos V, Edelman RR. Abdominal diffusion mapping with use of a whole-body echo-planar system. *Radiology* 1994; 190: 475-478
- 12 Yamada I, Aung W, Himeno Y, Nakagawa T, Shibuya H. Diffusion coefficients in abdominal organs and hepatic lesions: evaluation with intravoxel incoherent motion echo-planar MR imaging. *Radiology* 1999; 210: 617-623
- 13 Amano Y, Kumazaki T, Ishihara M. Single-shot diffusion-weighted echo-planar imaging of normal and cirrhotic livers using a phased-array multicoil. *Acta Radiol* 1998; 39: 440-442
- 14 Hori M, Ichikawa T, Sou H, Tsukamoto T, Kitamura T, Okubo T, Araki T, Amemiya Y, Okamoto E, Obara M. [Improving diffusion-weighted imaging of liver with SENSE technique: a preliminary study] *Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi* 2003; 63: 177-179
- 15 Chow LC, Bammer R, Moseley ME, Sommer FG. Single breath-hold diffusion-weighted imaging

■同行评价

本文文献复习全面, 逻辑思维顺畅, 但对归纳总结尚需提高.

- of the abdomen. *J Magn Reson Imaging* 2003; 18: 377-382
- 16 Ichikawa T, Haradome H, Hachiya J, Nitatori T, Araki T. Diffusion-weighted MR imaging with single-shot echo-planar imaging in the upper abdomen: preliminary clinical experience in 61 patients. *Abdom Imaging* 1999; 24: 456-461
- 17 杨正汉, 谢敬霞, 章跃武, 胡碧芳. 肝硬化的磁共振扩散加权成像研究. *中国医学影像技术* 2002; 18: 907-909
- 18 Koinuma M, Ohashi I, Hanafusa K, Shibuya H. Apparent diffusion coefficient measurements with diffusion-weighted magnetic resonance imaging for evaluation of hepatic fibrosis. *J Magn Reson Imaging* 2005; 22: 80-85
- 19 沈文, 尹建忠, 张龙江, 王鹏辉, 祁吉. 肝纤维化和肝硬化的MR扩散成像及与病理对照、CT灌注参数的相关性研究. *临床放射学杂志* 2007; 26: 1000-1004
- 20 尚全良, 肖恩华, 贺忠, 谭利华, 司徒卫军, 白未了, 袁术文, 杜万平. GE Signa Twinspeed 1.5 T磁共振肝脏扩散加权成像的技术探讨. *中国医学影像技术* 2004; 20: 1515-1518
- 21 Poustchi-Amin M, Mirowitz SA, Brown JJ, McKinstry RC, Li T. Principles and applications of echo-planar imaging: a review for the general radiologist. *Radiographics* 2001; 21: 767-779
- 22 Takahashi M, Ono J, Harada K, Maeda M, Hackney DB. Diffusional anisotropy in cranial nerves with maturation: quantitative evaluation with diffusion MR imaging in rats. *Radiology* 2000; 216: 881-885
- 23 杨正汉, 谢敬霞. 水分子扩散加权磁共振成像在肝脏的临床应用. *中华放射学杂志* 1999; 33: 684-688
- 24 Taouli B, Vilgrain V, Dumont E, Daire JL, Fan B, Menu Y. Evaluation of liver diffusion isotropy and characterization of focal hepatic lesions with two single-shot echo-planar MR imaging sequences: prospective study in 66 patients. *Radiology* 2003; 226: 71-78
- 25 Aubé C, Racineux PX, Lebigot J, Oberti F, Croquet V, Argaud C, Calès P, Caron C. [Diagnosis and quantification of hepatic fibrosis with diffusion weighted MR imaging: preliminary results] *J Radiol* 2004; 85: 301-306
- 26 Annet L, Peeters F, Abarca-Quinones J, Leclercq I, Moulin P, Van Beers BE. Assessment of diffusion-weighted MR imaging in liver fibrosis. *J Magn Reson Imaging* 2007; 25: 122-128
- 27 杨正汉, 谢敬霞, 胡碧芳, 章跃武, 周诚. 肝硬化组织表面扩散系数改变及其可能机制的实验研究. *中国医学影像技术* 2002; 18: 849-851
- 28 Keogan MT, Edelman RR. Technologic advances in abdominal MR imaging. *Radiology* 2001; 220: 310-320
- 29 Hunsche S, Moseley ME, Stoeter P, Hedehus M. Diffusion-tensor MR imaging at 1.5 and 3.0 T: initial observations. *Radiology* 2001; 221: 550-556

编辑 史景红 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

世界华人消化杂志作者署名要求

本刊讯 本刊论文署名作者不宜过多, 一般不超过8人, 主要应限于参加研究工作并能解答文章有关问题、能对文稿内容负责者, 对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中。作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格)。《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献。第一方面是直接参与, 包括: (1)酝酿和设计实验; (2)采集数据; (3)分析/解释数据。第二方面是文章撰写, 包括: (1)起草文章; (2)对文章的知识性内容作批评性审阅。第三方面是工作支持, 包括: (1)统计分析; (2)获取研究经费; (3)行政、技术或材料支持; (4)指导; (5)支持性贡献。每个人必须在第一至第三方面至少具备一条, 才能成为文章的署名作者。《世界华人消化杂志》不设置共同第一作者和共同通信作者。(常务副总编辑: 张海宁 2009-01-28)

SC结构、功能及其临床研究进展

付金龙, 刘沛

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

辽宁省教育厅攻关计划资助课题, No. 05L466

作者贡献分布: 本文写作由付金龙完成; 刘沛审核。

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

电话: 024-83283091

收稿日期: 2008-12-04 修回日期: 2009-01-04

接受日期: 2009-01-05 在线出版日期: 2009-01-28

Clinical research progress in secretory component structure and function

Jin-Long Fu, Pei Liu

Jin-Long Fu, Pei Liu, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by: the Liaoning Provincial Department of Education-funded Research Program, No. 05L466

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

Received: 2008-12-04 Revised: 2009-01-04

Accepted: 2009-01-05 Published online: 2009-01-28

Abstract

SIgA, which consists of 2 monomer IgA, 1 molecular chain J and a molecular secretory component (SC), plays a critical role and is considered as the first-line defense in the mucosal immunity. As an important part of SIgA, SC is the extracellular cleaved ectodomain of polymeric immunoglobulin receptor (pIgR). SC plays an important role in the formation and transportation of SIgA and SC could also protect the hinge area of SIgA and enhance its anti-infective activity. Therefore, the SC has attracted increasing attention from researchers and great progress has been recently made in its structure and function.

Key Words: Polymeric immunoglobulin receptor; SIgA; Secretory component

Fu JL, Liu P. Clinical research progress in secretory component structure and function. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(3): 293-298

摘要

分泌型免疫球蛋白A(SIgA)被认为是免疫防御中的第一道防线在黏膜免疫中发挥至关重要的作用,由2个单体IgA、1分子J链和1分子分泌成分(SC)组成。SC是多聚免疫球蛋白受体(pIgR)的胞外段部分,作为SIgA的重要组成部分,不仅在SIgA的转运、形成中发挥重要作用,而且可以保护SIgA的铰链区及增强其抗感染活性。因此关于SC的研究日益受到学者们的青睐,近年来有关SC的结构、功能及其在临床中的研究已经取得较大进展。

关键词: 多聚免疫球蛋白受体; 分泌型免疫球蛋白A; 分泌成分

付金龙, 刘沛. SC结构、功能及其临床研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17(3): 293-298

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/293.asp>

0 引言

分泌成分(secretory component, SC)又称分泌片(secretory piece)是多聚免疫球蛋白受体(pIgR)的胞外段部分,由黏膜上皮细胞及外分泌腺上皮细胞合成,主要负责将固有层活化淋巴细胞产生的IgA通过上皮细胞转运分泌至腔隙表面,同IgA、J链共同构成黏膜免疫的第一防线SIgA,阻止肠腔中的病毒、细菌、毒素和外来异物等有害物质对肠黏膜的入侵。另外未与分泌性抗体结合的游离SC也可以直接参与机体的非特异性免疫防御,阻止腹泻与感染的发生。本文就SC的结构、功能及其临床研究进展作一综述。

1 SC结构与功能

SC是pIgR从细胞膜上脱落下来的片段,分子质量为 M_r 80,由549-558个氨基酸组成的肽链,含有较多的糖基(约20%),分为5个包含100-110个氨基酸的免疫球蛋白样结构域(D1-D5),与免疫球蛋白超家族的5个可变区有同源性。Prinsloo *et al*^[1]发现纯化的重组人游离分泌片(rSC)结构与天然SC相似,与IgM结合的解离平衡常数为 4.6×10^{-8} M, rSC的建立为进一步阐明SC的结构

■背景资料

SC是多聚免疫球蛋白受体(pIgR)的胞外段部分,由黏膜及外分泌腺上皮细胞合成,主要分布在黏膜上皮细胞基底侧(如消化系,呼吸道,泌尿道)和乳腺,黏液腺及泪腺的腺上皮细胞下面,其基本功能包括介导细胞内多聚免疫球蛋白的转运和参与SIgA的形成等。近年研究证实SC与肠道、呼吸道感染及一些危重病等密切相关。因而揭示SC结构、功能及其临床研究,必将给新药、疫苗的研发以及临床防治SC表达异常的疾病带来广阔的前景。

■同行评议者

彭曦, 副研究员, 重庆市西南医院烧伤研究所

■研发前沿

SC对于维持正常肠道黏膜免疫具有重要作用, 如何通过调节肠道SC的表达从而改善病理状态下肠道黏膜免疫日益受到人们的重视。

提供了一个良好的平台。随着科学技术的进步及对SC研究的深入, 人们对SC的三维结构有了进一步认识, 游离SC的三维结构有一个令人意想不到的紧密结构, 他的螺旋半径为3.53-3.63 nm, 长度为12.5 nm, 沉降系数为4.0 s, SC的空间结构存在一个J型弯曲, 在D3与D4区域之间形成反折, 使得D4, D5区域反折回来与D2, D3区域相对应^[2], SC的D5区域Cys467可与IgA的 α_1 链CH₂区的Cys311通过二硫键结合。

目前关于SC功能的研究也已取得可喜的进展, Braathen *et al*^[3]发现两栖类、鸟类、哺乳类之间pIgR与J链结合位点高度保守, 两栖类动物的pIgR也能与人pIgA区域结合, 暗示第一线的免疫防御机制在动物进化发展过程中具有重要意义。大量的研究认为SC参与多聚免疫球蛋白的转运、SIgA及SIgM的形成、直接参与非特异性免疫防御阻止感染的发生, SC主要的功能是介导细胞内多聚免疫球蛋白的转运和参与SIgA的形成。研究证实SC可以将黏膜上皮细胞下及固有层内的dIgA-pIgR/pIgM-pIgR复合物转运到腔隙表面, 而哺乳动物中这种跨细胞转运的机制与664位点的丝氨酸磷酸化有关。最近发现, 如哺乳动物的呼吸道、胃肠道、泌尿道一样, 在硬骨鱼、河豚的皮肤中pIgR同样可以转运四聚体IgM进入皮肤黏膜中^[4-5]。Gupta *et al*^[6]利用可与PIgR结合的不同抗体发现其转运情况有所差异, 作者认为与PIgR不同的结合位点结合, 可能是造成转运方式不同的原因。SC与dIgA, J链结合后共同形成SIgA, SC可以封闭抗体的铰链区, 因抗体铰链区是最易被蛋白酶消化的区域, 故SC的结合可以保护抗体使其免遭蛋白酶的降解, 从而确保SIgA在黏膜免疫防御中发挥重要作用^[7]。还有研究表明, 在黏膜表面的感染中, SC增强了SIgA的最佳保护作用, 在呼吸道感染的小鼠模型中, pIgA与重组SC结合之后, 其保护作用有所提高, 并且这种作用的发挥与保护了抗体分子的氨基酸残基有关^[8]。

2 SC中各种糖链的作用

SC分子中包含有各种多聚糖链, 糖基占15%-24%, 有7个N-糖基化位点^[9], 并都位于SC结构的一侧^[2], 这些多聚糖链具有细菌复合物潜在的结合位点。研究发现SC能够结合艰难梭状芽孢杆菌毒素A, 并能保护肠Coca-2细胞避免被毒素损伤, 维持Coca-2细胞的跨上皮电阻(TER)及完整性, 还可以结合致病性大肠杆菌, 抑制其在

HEp-2细胞中的传染性, 这些作用都与SC含有的糖链呈剂量依赖性^[9]。衣霉素可以阻碍内质网中的N-糖基化的发生, 研究发现经衣霉素处理的细胞释放入细胞上清液中的pIgR量明显低于未处理组^[10]。免疫共沉淀研究发现非糖基化的pIgR仍能与pIgA形成复合物, 但SIgA锚定在黏膜上的能力消失^[11]。均表明SC中各种糖链在SC运输、释放及SIgA在黏膜上正确定位中可能发挥重要作用^[8]。

3 SC的形成

PIgR由黏膜及外分泌腺上皮细胞合成, 主要分布在黏膜上皮细胞基底侧(如消化系, 呼吸道, 泌尿道)和乳腺, 黏液腺及泪腺的腺上皮细胞下面。正常情况下, 多聚免疫球蛋白在分泌上皮细胞的基底外侧形成plgA-plgR/pIgM-pIgR复合物, 然后通过内吞作用和转吞作用被运输到固有层, 此后plgA-plgR/pIgM-pIgR复合物在表面顶端蛋白水解酶作用下裂解pIgR被释放。在此过程中, pIgR胞外段从细胞膜上切割、脱落形成可溶性分泌片(SC), 而PIgR的C端跨膜部分和胞内部分则在上皮细胞内降解, 与dIgA/pIgR配体结合的分别形成SIgA/SIgM, 而没有与配体结合的即称为游离SC^[12]。

4 构成SIgA及其功能

黏膜免疫的一个重要特征就是产生分泌型抗体。SIgA是20世纪60年代由Tomasi *et al*首先发现存在于外分泌液中的一种抗体, 典型的结构是由2个单体IgA、1分子J链和1分子SC组成的复合体, 其分子式为 $(\alpha_2L_2)_2J_1SC_1$ 。SC以非共价键方式连接两个IgA单体分子, 并与J链共同组成SIgA, 既能守卫上皮细胞免遭微生物的入侵, 还可以作为固有层的“污水泵”, 将与IgA结合的抗原或微生物转运穿过上皮返回肠腔进行排泄。SIgA作为黏膜免疫系统的效应分子在呼吸道、胃肠道和泌尿生殖道的黏膜抗感染中发挥重要作用, SIgA是相对非炎性物质, 其主要功能及抗感染可能的机制是: (1)直接作用于细菌表位, 封闭细菌表面与肠上皮细胞结合的特异性位点, 降低细菌毒力及或使其丧失黏附能力; (2)与病原微生物结合形成免疫复合物, 可刺激消化系黏膜的杯状“冲洗”黏膜上皮, 利于机体清除; (3)中和病毒、毒素、酶和其他生物活性抗原使其失去活性; (4)调理黏膜多形核白细胞(PMN)和吞噬细胞的吞噬功能及结合抗原形成免疫复合物有利于吞噬清除; (5)与补体和溶菌酶共同作用溶

解细菌; (6)介导抗体依赖细胞介导性细胞毒性(ADCC)作用, 通过ADCC杀灭病原微生物。

5 游离SC的作用

到目前为止, 已经有很多研究证实游离SC(FSC)可以直接参与机体的非特异性免疫防御, 阻止腹泻与感染的发生。肠致病性大肠杆菌(EPEC)是造成发展中国家婴幼儿腹泻及死亡的重要病原体, 研究发现, 游离SC可以抑制EPEC对HeLa细胞的侵袭与黏附^[13], 而Bessler *et al*^[14]发现游离SC可以和细菌的表面蛋白相互作用抑制鼠伤寒沙门氏菌对HeLa细胞的侵袭与黏附。另外也有研究报道, 游离SC阻止艰难梭状芽孢杆菌的黏附及结合其毒素避免感染的发生^[9]。即使在新生儿唾液中, SIgA、游离SC就可以被检测到^[15], 研究发现人乳中的成分如游离SC及乳铁蛋白能够与福氏及宋氏志贺菌结合阻止新生儿痢疾的发生^[16]。

6 SC与疾病的研究

6.1 SC与呼吸道疾病 SIgA水平低下的新生儿易患呼吸道, 消化系感染。Pilette *et al*^[17]报道在严重慢性阻塞型肺气肿(COPD)的患者, 大气道及小气道上皮细胞SC的表达水平均明显降低, 并分别与中性粒细胞浸润及气流阻塞有关。进一步在体外进行研究发现, 多形核白细胞(PMN)的丝氨酸蛋白酶可以降解PIgR/SC, 但激活的PMN却能通过核因子NF- κ B及P38丝裂原活化蛋白激酶(P38MAPK)途径增加支气管上皮细胞PIgR/SC的表达^[18]。也有学者报道因缺乏SIgA, 不能中和或制止过敏原的吸收, 易发生哮喘, 15-脂氧酶-1在哮喘患者气道中表达增加, 而在哮喘中诱导15-脂氧酶-1产生增加可能是导致变应性致敏及诱发起道炎症的重要原因, 其机制很可能是通过抑制了第一线黏膜免疫的SIgA水平而产生的^[19]。

IL-8是中性粒细胞的趋化因子, 研究证实SC能够结合气道IL-8使其功能失活^[20]。近来研究发现, 人游离SC, 结合SC均具有与肺炎链球菌表面分泌型免疫球蛋白A结合蛋白(SpsA)结合的特性, 并依赖于人SC的D3、D4区域与位于SpsA第198位及203位氨基酸之间六肽模序结构相结合, 但在体外实验中, 小鼠、大鼠及兔子的SC却不能与肺炎链球菌SpsA相结合^[21-22]。研究发现C9A噬菌体包含一段特殊的肽序列, 既能与游离分泌片结合也能与结合免疫球蛋白的分泌片结合, 能够利用pIgR进行跨细胞转运而不影响分

泌型免疫球蛋白的生成, 但可以竞争SpsA与SC结合位点的结合^[23]。囊性纤维化(cystic fibrosis, CF)是一种侵犯多脏器的遗传性疾病, 肺和消化系为主要的受累脏器。Marshall *et al*^[24]研究发现, CF患者痰中SC水平比正常者及哮喘患者高, 但其结构及功能存在缺陷, 并且研究发现, 在pIgR基因敲出小鼠比正常鼠更容易受到分歧杆菌感染^[25]。

6.2 SC与肠道感染 肠道是人体最大的毒素及细菌储存库, 人体的肠腔不断与细菌、病毒、毒素和外来异物等接触, 为了阻止有害物质入侵肠道, 被认为是黏膜免疫核心的SIgA发挥了重要作用, 近年来随着对SIgA的研究深入, SC在肠道的研究已经进入一个新的阶段。贾第鞭毛虫是引起腹泻的一种常见寄生虫, SC能明显抵抗贾第鞭毛虫感染^[26], 近来报道SC也可以抵御十二指肠钩虫感染^[27], 并且是抵抗EPEC, 梭状芽孢杆菌和溶组织阿米巴病原体的重要防御素, 对阻止呼吸病毒侵袭也起关键作用^[9,13,28]。

溶组织内阿米巴滋养体可以产生大量半胱氨酸蛋白酶, 被认为是其导致肠道炎症的重要致病因子之一, 可以降解SIgA₁、SIgA₂, 结合SC, 游离SC的水平, 而分泌型IgA₂抵御溶组织阿米巴滋养体的能力比分泌型IgA₁更强, 更能在此疾病中发挥对肠黏膜的保护作用^[29]。Almogren *et al*^[30]也报道SC与IgA的结合方式在SIgA₁与SIgA₂之间可能不像我们以前认为的那么相似。特定基因敲除技术的发明为人们验证某种基因表达的蛋白质功能提供另一种新的方法。研究证实^[31], pIgR基因敲除小鼠肠内的细菌更容易易位到肠系膜淋巴结内, 由于缺乏转运, 血清SIgA的水平明显升高。Wijburg *et al*^[32]也报道PIgR基因敲除小鼠比正常鼠更容易感染鼠伤寒沙门氏菌。

6.3 SC与其他疾病 在出血性休克^[33], 严重烧伤^[34]及蛋白营养缺乏^[35]等一些危重疾病中, 肠黏膜免疫功能低下, 肠SIgA的水平明显下降。在胆道阻塞性疾病中, 分泌型IgA的转运受到阻碍, 则在小肠上部内分泌型IgA的水平降低, 而在肝转移癌症时血清IgA的水平上升。由此可见, 血清中的IgA多聚体通过肝胆系统进入小肠上部将使此处IgA的总量增加, 增强局部免疫防御机制。在一些肝脏疾病如酒精性肝硬化的情况下, 肠SIgA及SC的表达水平均明显降低^[36]。而SC表达缺乏的小鼠外分泌腺中SIgA的水平明显减少, 位于眼下的哈德(氏)泪腺是禽特有的免疫器官, 分泌特异性抗体, 在上呼吸道免疫方面具有重

■ 相关报道

国外对SC的基因及蛋白结构的研究已较为深入, 有关其参与机体抵抗感染的研究较多。对pIgR基因敲除小鼠进行研究, 发现比正常鼠更容易受到细菌感染。

■创新盘点

本文全面阐述了SC的结构与生理功能及其临床研究进展,较为集中地阐明了SC的结构功能及与一些消化系及呼吸道疾病的关系。

要作用,用携带禽流感病毒(AI)血凝素5基因的腺病毒(Ad5)通过眼睛途径免疫动物,检测泪液及血清IgA水平及哈德(氏)泪腺中的pIgR mRNA水平,研究发现哈德(氏)泪腺能够产生强烈的针对AI的黏膜及系统免疫反应^[37]。也有学者证明,SIgA和SC在泌尿系统及黏膜嗜酸性粒细胞增多疾病中发挥重要作用^[38-39]。但研究也同时发现一些病原微生物发展出借助宿主pIgR,侵袭宿主上皮的功能,如2-型单纯疱疹病毒及EB病毒等。

7 SC的调节

由于每分子SIgA的转运都需要消耗一分子的SC,因此,调节SC的表达对于维持肠黏膜SIgA的稳定发挥黏膜防御功能具有重要作用^[40]。人pIgR基因位于1q31-32,包含11个外显子和10个内含子,启动子区有干扰素调节因子-1(IRF-1),干扰素效应元件(ISRE), AP-1, NF- κ B及类固醇激素等结合位点,其转录诱导因子的结合位点在5'端,位于第1外显子和第1内含子中。研究者利用点突变技术发现,人pIgR基因的第71位氨基酸和小鼠pIgR基因的第74位氨基酸处有一个E-box序列,该序列对于基因的转录激活是必需的^[41]。研究发现饮食中添加一些特殊成分与pIgR基因的表达变化存在相关,食物中添加果糖寡聚体能明显上调pIgR基因的表达^[42]。体外培养细胞发现,牛乳腺上皮细胞经脂多糖(LPS)处理后,pIgR mRNA的表达在处理3 h增加而6 h恢复到正常水平^[43]。糖皮质激素能够明显上调大鼠小肠pIgR mRNA及肠上皮细胞IEC-6 pIgR mRNA的表达,并且糖皮质激素-DNA反应元件位于紧靠pIgR基因5'-上游区域,但因为糖皮质激素同时可以抑制几种炎症因子如TNF- α , IFN- γ 和IL-4等的合成,而这些炎症因子却可以上调pIgR基因的表达。因此糖皮质激素在pIgR基因合成调节中所扮演的最终角色可能更为复杂^[44]。

Pal *et al*^[45]报道呼吸病毒能够促进肠上皮细胞HT-29细胞pIgR mRNA及蛋白的表达,而这种作用可能与其激活NF- κ B有关,并且在抑制钙蛋白酶后,这种作用消失。pIgR mRNA在IFN- γ , TNF- α , IL-1 β 和IL-4等一些细胞因子作用下表达增加^[40,46-48]。Cox *et al*^[40]研究发现,颌下腺细胞HSG及结肠上皮细胞HT-29在经过IFN- γ , IL-4单独或同时处理48 h之后,pIgR mRNA的表达水平明显升高。而最近这些细胞因子如何调控pIgR基因的表达才被阐明,pIgR基因存在3个干扰素效应元件,两个在5'侧,一个在第一个外显子区,

位于pIgR基因启动子的第一个外显子区域存在一个干扰素效应元件(ISRE),作为干扰素的结合位点,通过产生干扰素调节因子-1(IRF-1)上调pIgR基因的表达,除过这一通路以外,TNF- α 还可以通过NF- κ B在5'端的结合位点和人pIgR基因启动子的第一个内含子结合促进pIgR mRNA的表达^[49]。近来研究报道了IL-4上调pIgR基因的表达可能与一系列转导及激活位于第一内含子的信号转导和转录激活因子6(STAT₆)位点有关^[50]。IL-1 β 上调pIgR基因的表达的信号通路到目前研究还没有被证实,但考虑很可能与TNF- α 诱导pIgR基因表达增加的通路比较相似^[51]。在人类结肠癌细胞系Caco-2中与pIgR基因启动子中的E-box主要的结合蛋白已经鉴定出来是一个异源二聚体:上游刺激因子1(USF₁)和上游刺激因子2(USF₂)^[52],USF₁,USF₂与E-box结合后均可上调pIgR基因的转录^[41]。有研究者认为pIgR基因的转录调控受多种转录因子的相互协同参与,在炎症和免疫反应中,一些基本的调节因子如USF₁,USF₂等与可诱导的因子如IRF-1,NF- κ B和STAT₆等相互作用共同上调pIgR基因的转录^[41]。双链RNA(dsRNA)是Toll样蛋白受体3(TLR₃)的配体,LPS是TLR₄的配体,研究发现dsRNA而非LPS可以提高人肠上皮细胞HT-29的TLR₃ mRNA及TLR₄ mRNA水平,而后通过NF- κ B途径提高pIgR mRNA的表达^[53]。

8 结论

随着近年来人们对黏膜免疫损伤在疾病过程中所扮演的角色进一步认识,SIgA的作用被凸现出来,已成为黏膜免疫领域的一个焦点。作为SIgA的重要组成部分,SC参与多重分子机制使他们在黏膜免疫中起着举足轻重的作用。另外SC独特的结构及生物化学特性使得其能够单独而出色地行使其功能。尽管目前,有关SC结构、功能、表达调节及其与临床疾病关系的研究已取得较大的进展,但迄今为止,有关SC在疾病演变过程中所起的作用,受影响的机制及其调控的网络还知之甚少,相信随着人们对SC结构、生物学功能及其临床研究的进一步揭示,必将给新药、疫苗的研发以及临床防治SC表达异常的疾病带来广阔的前景。

9 参考文献

- 1 Prinsloo E, Oosthuizen V, Muramoto K, Naude RJ. In vitro refolding of recombinant human free secretory component using equilibrium gradient

- dialysis. *Protein Expr Purif* 2006; 47: 179-185
- 2 Bonner A, Perrier C, Corthésy B, Perkins SJ. Solution structure of human secretory component and implications for biological function. *J Biol Chem* 2007; 282: 16969-16980
- 3 Braathen R, Hohman VS, Brandtzaeg P, Johansen FE. Secretory antibody formation: conserved binding interactions between J chain and polymeric Ig receptor from humans and amphibians. *J Immunol* 2007; 178: 1589-1597
- 4 Hamuro K, Suetake H, Saha NR, Kikuchi K, Suzuki Y. A teleost polymeric Ig receptor exhibiting two Ig-like domains transports tetrameric IgM into the skin. *J Immunol* 2007; 178: 5682-5689
- 5 Rombout JH, van der Tuin SJ, Yang G, Schopman N, Mroczek A, Hermesen T, Taverne-Thiele JJ. Expression of the polymeric Immunoglobulin Receptor (pIgR) in mucosal tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellfish Immunol* 2008; 24: 620-628
- 6 Gupta S, Heacock M, Perez A, Davis PB. Antibodies to the polymeric immunoglobulin receptor with different binding and trafficking patterns. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 33: 363-370
- 7 Brandtzaeg P. Role of secretory antibodies in the defence against infections. *Int J Med Microbiol* 2003; 293: 3-15
- 8 Phalipon A, Cardona A, Kraehenbuhl JP, Edelman L, Sansonetti PJ, Corthésy B. Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo. *Immunity* 2002; 17: 107-115
- 9 Perrier C, Sprenger N, Corthésy B. Glycans on secretory component participate in innate protection against mucosal pathogens. *J Biol Chem* 2006; 281: 14280-14287
- 10 Matsumoto N, Asano M, Ogura Y, Takenouchi-Ohkubo N, Chihaya H, Chung-Hsing W, Ishikawa K, Zhu L, Moro I. Release of non-glycosylated polymeric immunoglobulin receptor protein. *Scand J Immunol* 2003; 58: 471-476
- 11 Tajima M. A new assay system for detection of polymeric immunoglobulin A-polymeric immunoglobulin receptor binding. *J Oral Sci* 2000; 42: 27-31
- 12 Ackermann LW, Denning GM. Nuclear factor-kappaB contributes to interleukin-4- and interferon-dependent polymeric immunoglobulin receptor expression in human intestinal epithelial cells. *Immunology* 2004; 111: 75-85
- 13 de Araújo AN, Giugliano LG. Lactoferrin and free secretory component of human milk inhibit the adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *BMC Microbiol* 2001; 1: 25
- 14 Bessler HC, de Oliveira IR, Giugliano LG. Human milk glycoproteins inhibit the adherence of *Salmonella typhimurium* to HeLa cells. *Microbiol Immunol* 2006; 50: 877-882
- 15 Seidel BM, Schubert S, Schulze B, Borte M. Secretory IgA, free secretory component and IgD in saliva of newborn infants. *Early Hum Dev* 2001; 62: 159-164
- 16 Willer Eda M, Lima Rde L, Giugliano LG. In vitro adhesion and invasion inhibition of *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* clinical strains by human milk proteins. *BMC Microbiol* 2004; 4: 18
- 17 Pilette C, Godding V, Kiss R, Delos M, Verbeke E, Decaestecker C, De Paepe K, Vaerman JP, Decramer M, Sibille Y. Reduced epithelial expression of secretory component in small airways correlates with airflow obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 185-194
- 18 Pilette C, Ouadrhiri Y, Dimanche F, Vaerman JP, Sibille Y. Secretory component is cleaved by neutrophil serine proteinases but its epithelial production is increased by neutrophils through NF-kappa B- and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanisms. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28: 485-498
- 19 Hajek AR, Lindley AR, Favoreto S Jr, Carter R, Schleimer RP, Kuperman DA. 12/15-Lipoxygenase deficiency protects mice from allergic airways inflammation and increases secretory IgA levels. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 633-639.e3
- 20 Marshall LJ, Perks B, Ferkol T, Shute JK. IL-8 released constitutively by primary bronchial epithelial cells in culture forms an inactive complex with secretory component. *J Immunol* 2001; 167: 2816-2823
- 21 Elm C, Rohde M, Vaerman JP, Chhatwal GS, Hammerschmidt S. Characterization of the interaction of the pneumococcal surface protein SpsA with the human polymeric immunoglobulin receptor (hPIgR). *Indian J Med Res* 2004; 119 Suppl: 61-65
- 22 Elm C, Braathen R, Bergmann S, Frank R, Vaerman JP, Kaetzel CS, Chhatwal GS, Johansen FE, Hammerschmidt S. Ectodomains 3 and 4 of human polymeric Immunoglobulin receptor (hPIgR) mediate invasion of *Streptococcus pneumoniae* into the epithelium. *J Biol Chem* 2004; 279: 6296-6304
- 23 Braathen R, Sandvik A, Berntzen G, Hammerschmidt S, Fleckenstein B, Sandlie I, Brandtzaeg P, Johansen FE, Lauvrak V. Identification of a polymeric Ig receptor binding phage-displayed peptide that exploits epithelial transcytosis without dimeric IgA competition. *J Biol Chem* 2006; 281: 7075-7081
- 24 Marshall LJ, Perks B, Bodey K, Suri R, Bush A, Shute JK. Free secretory component from cystic fibrosis sputa displays the cystic fibrosis glycosylation phenotype. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 399-406
- 25 Tjärnlund A, Rodríguez A, Cardona PJ, Guirado E, Ivanyi J, Singh M, Troye-Blomberg M, Fernández C. Polymeric IgR knockout mice are more susceptible to mycobacterial infections in the respiratory tract than wild-type mice. *Int Immunol* 2006; 18: 807-816
- 26 Davids BJ, Palm JE, Housley MP, Smith JR, Andersen YS, Martin MG, Hendrickson BA, Johansen FE, Svärd SG, Gillin FD, Eckmann L. Polymeric immunoglobulin receptor in intestinal immune defense against the lumen-dwelling protozoan parasite *Giardia*. *J Immunol* 2006; 177: 6281-6290
- 27 Mulvenna J, Hamilton B, Nagaraj SH, Smyth D, Loukas A, Gorman JJ. Proteomics Analysis of the Excretory/Secretory Component of the Blood-feeding Stage of the Hookworm, *Ancylostoma caninum*. *Mol Cell Proteomics* 2009; 8: 109-121
- 28 Abd-Alla MD, Jackson TF, Rogers T, Reddy S, Ravdin JI. Mucosal immunity to asymptomatic *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection is associated with a peak intestinal anti-lectin immunoglobulin A antibody response. *Infect Immun* 2006; 74: 3897-3903
- 29 Garcia-Nieto RM, Rico-Mata R, Arias-Negrete S,

■应用要点

由于SC是SIgA的重要组成部分,在黏膜免疫屏障受到损伤时,表达明显减少,因此SC的表达变化可作为一个特异黏膜免疫损伤的标志物,将来可成为防治肠道免疫损伤的重要靶点。

■同行评价

本文综述全面, 语言流畅, 层次分明, 有一定的参考价值, 但创新性一般。

- Avila EE. Degradation of human secretory IgA1 and IgA2 by *Entamoeba histolytica* surface-associated proteolytic activity. *Parasitol Int* 2008; 57: 417-423
- 30 Almogren A, Senior BW, Kerr MA. A comparison of the binding of secretory component to immunoglobulin A (IgA) in human colostral S-IgA1 and S-IgA2. *Immunology* 2007; 120: 273-280
- 31 Sait LC, Galic M, Price JD, Simpfendorfer KR, Diavatopoulos DA, Uren TK, Janssen PH, Wijburg OL, Strugnell RA. Secretory antibodies reduce systemic antibody responses against the gastrointestinal commensal flora. *Int Immunol* 2007; 19: 257-265
- 32 Wijburg OL, Uren TK, Simpfendorfer K, Johansen FE, Brandtzaeg P, Strugnell RA. Innate secretory antibodies protect against natural *Salmonella typhimurium* infection. *J Exp Med* 2006; 203: 21-26
- 33 Saini MS, Diebel LN, Liberati DM, Albaran RG, Dulchavsky SA. Hemorrhagic shock impairs mucosal immunity to gut-derived antigens. *Am Surg* 1999; 65: 637-642
- 34 Wang Z, Xiao G, Yao Y, Guo S, Lu K, Sheng Z. The role of bifidobacteria in gut barrier function after thermal injury in rats. *J Trauma* 2006; 61: 650-657
- 35 Amaral JF, Foschetti DA, Assis FA, Menezes JS, Vaz NM, Faria AM. Immunoglobulin production is impaired in protein-deprived mice and can be restored by dietary protein supplementation. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39: 1581-1586
- 36 Pelletier G, Briantais MJ, Buffet C, Pillot J, Etienne JP. Serum and intestinal secretory IgA in alcoholic cirrhosis of the liver. *Gut* 1982; 23: 475-480
- 37 van Ginkel FW, Tang DC, Gulley SL, Toro H. Induction of mucosal immunity in the avian Harderian gland with a replication-deficient Ad5 vector expressing avian influenza H5 hemagglutinin. *Dev Comp Immunol* 2008 Sep 4. [Epub ahead of print]
- 38 Motegi Y, Kita H, Kato M, Morikawa A. Role of secretory IgA, secretory component, and eosinophils in mucosal inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 122 Suppl 1: 25-27
- 39 Moldoveanu Z, Huang WQ, Kulhavy R, Pate MS, Mestecky J. Human male genital tract secretions: both mucosal and systemic immune compartments contribute to the humoral immunity. *J Immunol* 2005; 175: 4127-4136
- 40 Cox SW, Ebersole LE, Carpenter GH, Proctor GB. Effects of autonomic agonists and immunomodulatory cytokines on polymeric immunoglobulin receptor expression by cultured rat and human salivary and colonic cell lines. *Arch Oral Biol* 2007; 52: 411-416
- 41 Hempen PM, Phillips KM, Conway PS, Sandoval KH, Schneeman TA, Wu HJ, Kaetzel CS. Transcriptional regulation of the human polymeric Ig receptor gene: analysis of basal promoter elements. *J Immunol* 2002; 169: 1912-1921
- 42 Nakamura Y, Nosaka S, Suzuki M, Nagafuchi S, Takahashi T, Yajima T, Takenouchi-Ohkubo N, Iwase T, Moro I. Dietary fructooligosaccharides up-regulate immunoglobulin A response and polymeric immunoglobulin receptor expression in intestines of infant mice. *Clin Exp Immunol* 2004; 137: 52-58
- 43 Rabot A, Wellnitz O, Meyer HH, Bruckmaier RM. Use and relevance of a bovine mammary gland explant model to study infection responses in bovine mammary tissue. *J Dairy Res* 2007; 74: 93-99
- 44 Li TW, Wang J, Lam JT, Gutierrez EM, Solorzano-Vargus RS, Tsai HV, Martin MG. Transcriptional control of the murine polymeric IgA receptor promoter by glucocorticoids. *Am J Physiol* 1999; 276: G1425-G1434
- 45 Pal K, Kaetzel CS, Brundage K, Cunningham CA, Cuff CF. Regulation of polymeric immunoglobulin receptor expression by reovirus. *J Gen Virol* 2005; 86: 2347-2357
- 46 Rincheval-Arnold A, Belair L, Cencic A, Djiane J. Up-regulation of polymeric immunoglobulin receptor mRNA in mammary epithelial cells by IFN-gamma. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 194: 95-105
- 47 Liu DY, Wang XL, Liu P. Tumor necrosis factor-alpha upregulates the expression of immunoglobulin secretory component. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2007; 17: 101-106
- 48 Schjerven H, Brandtzaeg P, Johansen FE. Hepatocyte NF-1 and STAT6 cooperate with additional DNA-binding factors to activate transcription of the human polymeric Ig receptor gene in response to IL-4. *J Immunol* 2003; 170: 6048-6056
- 49 Schjerven H, Brandtzaeg P, Johansen FE. A novel NF-kappa B/Rel site in intron 1 cooperates with proximal promoter elements to mediate TNF-alpha-induced transcription of the human polymeric Ig receptor. *J Immunol* 2001; 167: 6412-6420
- 50 Schjerven H, Brandtzaeg P, Johansen FE. Mechanism of IL-4-mediated up-regulation of the polymeric Ig receptor: role of STAT6 in cell type-specific delayed transcriptional response. *J Immunol* 2000; 165: 3898-3906
- 51 Hempen PM, Phillips KM, Conway PS, Sandoval KH, Schneeman TA, Wu HJ, Kaetzel CS. Transcriptional regulation of the human polymeric Ig receptor gene: analysis of basal promoter elements. *J Immunol* 2002; 169: 1912-1921
- 52 Bruno ME, West RB, Schneeman TA, Bresnick EH, Kaetzel CS. Upstream stimulatory factor but not c-Myc enhances transcription of the human polymeric immunoglobulin receptor gene. *Mol Immunol* 2004; 40: 695-708
- 53 Schneeman TA, Bruno ME, Schjerven H, Johansen FE, Chady L, Kaetzel CS. Regulation of the polymeric Ig receptor by signaling through TLRs 3 and 4: linking innate and adaptive immune responses. *J Immunol* 2005; 175: 376-384

编辑 史景红 电编 何基才

疏肝理气法对夹尾应激大鼠行为学及胃组织学的影响

凌江红, 张钰琴, 梁纲, 韦连明, 陈业强, 刘耀利, 李勇杰

凌江红, 张钰琴, 韦连明, 陈业强, 广西医科大学第一附属医院中医科 广西壮族自治区南宁市 530021

梁纲, 广西医科大学病理生理学教研室 广西壮族自治区南宁市 530021

刘耀利, 李勇杰, 广西医科大学临床医学本科04级 广西壮族自治区南宁市 530021

广西自然科学基金资助项目, No. 桂科青0447039

作者贡献分布: 凌江红做主要贡献, 其他作者贡献大小按署名先后顺序排列。此课题由凌江红与陈业强设计; 凌江红为课题负责人, 实验研究过程由梁纲指导, 张钰琴, 梁纲, 韦连明, 刘耀利与李勇杰共同操作完成; 研究所用试剂由凌江红提供, 数据分析及论文写作由凌江红完成。

通讯作者: 凌江红, 530021, 广西壮族自治区南宁市双拥路6号, 广西医科大学第一附属医院中医科。ling_jianghong@sina.com
电话: 0771-5356515

收稿日期: 2008-10-29 修回日期: 2008-12-10

接受日期: 2008-12-15 在线出版日期: 2009-01-28

Effect of soothing the liver and regulating method on behavior and gastric histology in rats

Jiang-Hong Ling, Yu-Qin Zhang, Gang Liang,
Lian-Ming Wei, Ye-Qiang Chen, Yao-Li Liu, Yong-Jie Li

Jiang-Hong Ling, Yu-Qin Zhang, Lian-Ming Wei, Ye-Qiang Chen, Department of Traditional Chinese Medicine, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Gang Liang, Department of Pathophysiology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Yao-Li Liu, Yong-Jie Li, Undergraduate Students of Clinical Medicine, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: the Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 0447039

Correspondence to: Jiang-Hong Ling, Department of Traditional Chinese Medicine, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. ling_jianghong@sina.com

Received: 2008-10-29 Revised: 2008-12-10

Accepted: 2008-12-15 Published online: 2009-01-28

Abstract

AIM: To explore the effects of soothing the liver and regulating method on behavior and gastric tissue of stressed rats induced by constantly squeezing their tails.

METHODS: Thirty rats were randomly divided into control group, model group and Chaihu Shugansan group ($n = 10$). The animal model of

stressed was established by constantly squeezing their tails for 4 wk. Mean while saline, Chaihu Shugansan decoction were administered respectively to three groups by gavage. The animal's general situation and amount of food and water intake were observed daily, body weight was measured weekly, and histopathological tests of stomach were performed four weeks later.

RESULTS: Rats in model group showed marginalization, pad batch, decline in excitement, activity and fight, getting sluggish, blunted in responsiveness, loose and withered hair. The above manifestations in Chaihu Shugansan decoction were not so marked compared with model group. The amount of food and water intake was less in model group than control group (the fourth wk: 22.0 ± 1.51 vs 25.70 ± 1.4 , 10.33 ± 0.84 vs 11.29 ± 0.29 , both $P < 0.05$), while the amount of food and water intake was more in Chaihu Shugansan group than model group (the fourth wk: 24.27 ± 2.3 vs 22.0 ± 1.51 , 11.71 ± 1.26 vs 10.33 ± 0.84 , $P < 0.05$). Weight gain was significantly slower in model group than control group ($P < 0.05$), but weight gain was greater in Chaihu Shugansan group than model group, but no significance difference was observed.

CONCLUSION: The method of soothing the liver and regulating method not only alleviates depression, poor appetites and antagonized the weight loss, but also improves histology of stomach. It has certain both physical and mental effects against psychological stress.

Key Words: Soothing the liver and regulating method; Stress; Rats; Behavior; Gastric histology

Ling JH, Zhang YQ, Liang G, Wei LM, Chen YQ, Liu YL, Li YJ. Effect of soothing the liver and regulating method on behavior and gastric histology in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(3): 299-302

摘要

目的: 观察疏肝理气法对夹尾应激大鼠行为学及胃组织学的影响。

方法: 30只大鼠随机分为正常组、模型组、

■背景资料

应激与胃肠道身心疾病起病及症状的发生密切相关, 在中医学属于情志致病范畴, 临床上疏肝理气法治疗胃肠道身心疾病具有较好的疗效, 但其作用机制尚不清楚。

■同行评议者

刘绍能, 主任医师, 中国中医科学院广安门医院消化科

■研发前沿

疏肝理气法治疗胃肠道心身疾病的机制尚不清楚,可能与其对抗应激所致的躯体性的和心理性的双重影响而发挥“心身同治”作用有关。

柴胡疏肝散组,每组10只,对后二组大鼠进行夹尾激惹刺激持续4wk,并分别给予生理盐水、柴胡疏肝散水煎剂灌胃,每日观察其一般情况,进行饮食饮水量的测定,每周进行体质量的测定,4wk后观察大鼠胃大体情况及进行组织学检查。

结果:夹尾激惹刺激大鼠4 wk,模型组出现了靠边、扎堆状,兴奋性及活跃程度下降,打斗减弱,活动相对迟缓、反应迟钝,毛发蓬松枯黄、不顺等现象,而柴胡疏肝散组上述表现则较不显著。模型组大鼠饮水量、食量较正常对照组显著减低(第4周: 22.0 ± 1.51 vs 25.70 ± 1.4 , 10.33 ± 0.84 vs 11.29 ± 0.29 , 均 $P < 0.05$),柴胡疏肝散组大鼠饮水量、食量较模型组显著增加(第4周: 24.27 ± 2.3 vs 22.0 ± 1.51 , 11.71 ± 1.26 vs 10.33 ± 0.84 , 均 $P < 0.05$)。模型组大鼠体质量增长显著低于正常对照组($P < 0.05$),柴胡疏肝散组大鼠体质量增长较模型组增加,但无显著性差别。

结论:疏肝理气法能减轻长期夹尾应激大鼠抑郁、饮水量减低、体质量增长缓慢等情况,并改善胃组织学,具有一定的“身心同治”的抗应激作用。

关键词:疏肝理气; 应激; 大鼠; 行为学; 胃组织学

凌江红, 张钰琴, 梁纲, 韦连明, 陈业强, 刘耀利, 李勇杰. 疏肝理气法对夹尾应激大鼠行为学及胃组织学的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(3): 299-302

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/299.asp>

0 引言

应激是一种常见的机体对紧急事件的反应状态,常可导致胃损伤和运动障碍,与胃肠道心身疾病起病及症状的发生密切相关^[1]。应激损伤属于中医病因学中的情志致病范畴,情志内伤最易伤肝,导致肝失疏泄而出现肝气郁结病证,进一步发展为肝郁脾虚或肝胃不和等,出现胃肠道症状,临床上,疏肝理气法为主治疗慢性胃肠病具有较好的疗效,但其作用机制尚不清楚。本实验以夹尾激惹刺激法制作大鼠应激模型,观察柴胡疏肝散对其行为学及胃组织学的影响,为疏肝理气法治疗胃肠道心身疾病提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级8周龄♀Wistar大鼠30只,体质量190-200 g(广西医科大学实验动物中心提供)。大鼠随机分成正常对照组、模型组、柴胡疏肝散组,每组10只。除正常对照组外,其余各组参照文

献[2]加以改进,采用夹尾激惹刺激法制造大鼠应激模型,方法是束缚布包止血钳夹标记鼠尾,立即放开,每次30 min,每天2次,持续4 wk。

经典原方柴胡疏肝散由柴胡、白芍、枳壳、川芎、香附、甘草组成,将以上药物按成人(60 kg/人)临床用药量的10倍,按1:5容积比,用蒸馏水浸泡30 min,煎煮两次(30 min/次)后,过滤,去渣取汁,合并滤液加热蒸发,制成1.41 kg/L水煎浓缩液(含生药1.41 kg/L),4℃保存待用。

1.2 方法

1.2.1 给药方法:30只大鼠适应性喂养1 wk后,于造模第1天开始灌胃,正常对照组和模型组分别予生理盐水灌喂(1.5 mL/100 g体质量),柴胡疏肝散组予柴胡疏肝散水煎液灌胃,每次1.5 mL/100 g,早晚各1次。共喂药4 wk。

1.2.2 行为学观察:(1)一般情况:通过动物的皮肤毛发、胡须、情绪反应、行为状态、兴奋程度、活跃状况、睡眠等进行一般情况的观察。(2)饮水量及食量测定:采用饮水(食)量差值测定法,每天上午8:00给一定量的水(量筒测量)和食(天平称量),于次晨8:00测量剩余量,两者差值与大鼠数目的比值,即为每只大鼠每日饮水(进食)量。(3)体质量测定:于实验前和第7、14、21、28 d测量每只大鼠体质量,每只大鼠每周测值减其实验前测值,即为每只大鼠体质量增长值。

1.2.3 组织学观察:实验后4 wk即第28 d,处死大鼠,剖腹留取胃,打开胃腔观察大体病理改变,取胃组织,常规HE染色,光镜观察组织学改变。

统计学处理 所有数据均经SPSS13.0软件处理并以mean±SD表示,采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 夹尾刺激的第1-2周,实验动物活跃多动、较兴奋、易怒引发相互间的厮打、尖叫,第3周上述表现更为强烈,模型组较柴胡疏肝散组明显。第3.5周及第4周,模型组出现了靠边、扎堆状,兴奋性及活跃程度下降,打斗减弱,活动相对迟缓、反应迟钝,毛发蓬松枯黄、不顺,而柴胡疏肝散组上述表现则较不显著。

2.2 大鼠饮水量、食量变化、体质量增长情况比较 应激的早期第1周模型组大鼠饮水量较正常对照组显著增加($P < 0.01$),柴胡疏肝散组大鼠饮水量较模型组显著减低($P < 0.01$),后期至第4周,模型组大鼠饮水量较正常对照组显著减低($P < 0.05$),柴胡疏肝散组大鼠饮水量较模型组显著增加($P < 0.05$,表1)。至第4周,模型组大鼠食量较正常对

■创新盘点

该研究发现柴胡疏肝散水煎剂能减轻长期夹尾应激大鼠抑郁、饮水量减低、体质量增长缓慢等情况,并改善胃黏膜糜烂和炎症反应,提示疏肝理气法具有一定的“身心同治”的抗应激作用。

表 1 三组大鼠饮水量变化情况 (mean \pm SD, mL/d, $n = 10$)

分组	实验前	第1周	第2周	第3周	第4周
正常对照组	22.80 \pm 2.00	23.89 \pm 1.50	25.43 \pm 2.51	26.29 \pm 2.25	25.70 \pm 1.40
模型组	23.94 \pm 1.73	28.56 \pm 1.90 ^b	25.40 \pm 1.64	25.39 \pm 1.01	22.00 \pm 1.51 ^b
柴胡疏肝散组	24.10 \pm 2.78	26.29 \pm 1.29 ^d	25.41 \pm 1.07	27.43 \pm 3.79	24.27 \pm 2.30 ^c

^b $P < 0.01$ vs 正常对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 模型组.表 2 三组大鼠食量变化 (mean \pm SD, g/d, $n = 10$)

分组	实验前	第1周	第2周	第3周	第4周
正常对照组	11.72 \pm 1.45	11.71 \pm 0.72	11.22 \pm 1.14	11.45 \pm 0.96	11.29 \pm 0.29
模型组	11.69 \pm 1.44	12.05 \pm 0.97	11.64 \pm 1.54	11.03 \pm 1.45	10.33 \pm 0.84 ^a
柴胡疏肝散组	11.20 \pm 2.66	11.86 \pm 0.54	11.47 \pm 1.17	12.39 \pm 1.01	11.71 \pm 1.26 ^c

^a $P < 0.05$ vs 正常对照组; ^c $P < 0.05$ vs 模型组.表 3 三组大鼠体重质量增长情况 (mean \pm SD, g, $n = 10$)

分组	第1周	第2周	第3周	第4周
正常对照组	4.76 \pm 5.96	7.4 \pm 7.16	11.8 \pm 5.07	14.2 \pm 5.62
模型组	3.26 \pm 9.88	6.4 \pm 9.84	7.7 \pm 7.78	8.5 \pm 6.36 ^a
柴胡疏肝散组	4.57 \pm 12.39	7.2 \pm 13.2	10.4 \pm 10.02	12.4 \pm 10.38

^a $P < 0.05$ vs 正常对照组.

照组显著减低($P < 0.05$), 柴胡疏肝散组大鼠食量较模型组显著增加($P < 0.05$, 表2). 模型组大鼠体重质量增长较缓慢, 第4周时模型组大鼠体重质量增长显著低于正常组($P < 0.05$), 柴胡疏肝散组大鼠体重质量增长较模型组增加, 但无显著性差别(表3).

2.3 组织学大体观察 正常对照组胃黏膜无明显潮红、肿胀、糜烂等病变. 模型组大鼠胃残留饮食物较多, 几乎均可见数个针尖样大小的糜烂点, 柴胡疏肝散组亦可见残留饮食物、糜烂, 但数量、程度均较模型组轻.

光镜检查: 正常对照组大鼠胃黏膜有轻度淋巴细胞浸润; 模型组大鼠胃黏膜固有层均有轻、中度淋巴细胞、嗜酸性细胞浸润, 黏液分泌亢进, 部分腺体扩张, 胃小凹中有大量浆液, 黏膜下层组织疏松水肿, 胃肌层无明显病理改变, 柴胡疏肝散组亦可见黏膜轻度炎症反应, 部分也存在黏液分泌亢进现象, 但程度较模型组为轻(图1).

3 讨论

强烈的或持续的生理应激与心理应激可以致病, 已成为公认的事实. 消化系统易受内外环境刺激及情绪的影响, 是心身相关最敏感的器官, 消

化系统心身疾病的病种和发病率居内科心身疾病的首位, 但遗憾的是针对性的身心同治原则在临床工作中依然未得到足够的重视.

应激的本质就是对外界刺激的适应过程^[3]. 有学者^[4-5]认为祖国医学中, 肝是人体的应激反应调节中枢, 肝主疏泄的功能可维持和促进全身气血的正常运行, 调适各脏器对应激的反应, 肝藏血、调节血量的功能可改善微循环, 促使全身血液在应激状态下重新分布. 可见肝主疏泄的功能也就类似于应激过程中的“调适”作用. 《玉机微义》讲: “脏气不平, 胜乘相因为病, 怒伤肝, 肝克脾, 脾气不正, 必胀于胃, 名曰胜克”. 沈金鳌曰: “胃病, 惟肝气相乘为尤甚”. 肝失疏泄必然影响脾胃气机的升降出入, 导致呃逆暖气、脘腹胀满疼痛、泄泻或便秘等症. 这与临床所见消化系心身疾病高发病率是一致的. 可以认为肝失疏泄为消化系心身疾病的本源, 疏肝理气法即为身心同治之法.

本研究采用长期夹大鼠尾部诱导大鼠应激反应, 通过躯体刺激的方式来诱导并实现心理性应激, 最终形成相应的病理变化. 结果发现, 应激大鼠的胃黏膜均出现不同程度的糜烂和炎

■应用要点

应激与胃肠道心身疾病起病及症状的发生密切相关, 疏肝理气法的“身心同治”的抗应激作用, 为疏肝理气法广泛应用于功能性胃肠病的治疗提供了依据.

■名词解释

身心同治: 中医学认为形(形态、形体、身体、体质)与神(神志、神明、神识)是不可分割的统一体, 他们是相互联系, 相互影响. 健康和疾病都是心理现象和生理现象共同作用的结果. 因此, 诊断、治疗、护理、宜忌、预防是因人、因时、因地制宜的, 既要看到脏腑功能, 又要看到七情活动.

■同行评价

本研究设计合理,论据充足,结果可靠,具有一定的科学性、创新性和可读性。

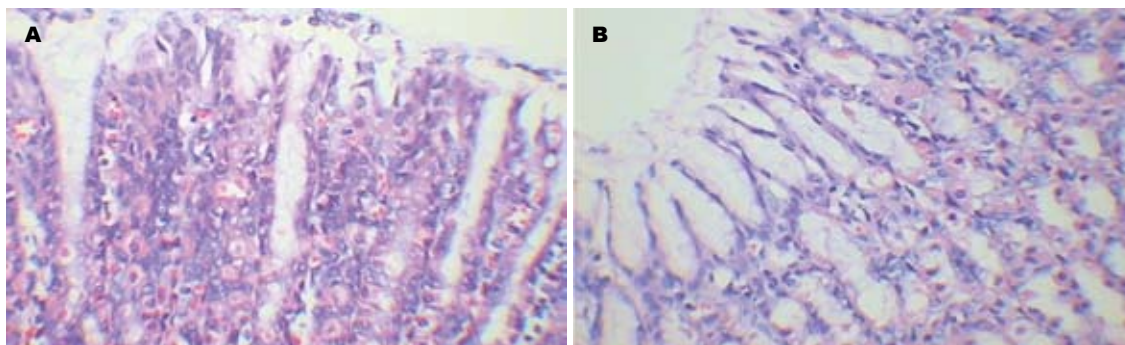


图1 大鼠胃组织学变化. A: 模型组; B: 柴胡疏肝散组.

症反应,提示夹尾对大鼠是一种有效的应激源.本实验的研究结果还表明,夹尾应激大鼠皮毛疏松无光泽,性情暴躁,易怒嘶咬,继而抑郁达到了“怒伤肝、久则郁”的效果,符合肝郁证的动物模型^[6].本研究以柴胡疏肝散为载体,研究疏肝理气法的抗应激作用.结果发现柴胡疏肝散既有调节应激后大鼠的郁怒和胃潴留增多、饮水量和食量减少、体质量增长缓慢等情绪状态和行为,同时也具有减轻胃黏膜糜烂和炎症等的胃黏膜保护作用,说明疏肝理气法能增强大鼠抗应激的能力,具有标本同治、身心兼顾的效用,与文献一致^[7].

本实验通过观察疏肝理气法对夹尾应激大鼠行为学及胃组织学影响的情况,揭示了应激在疾病尤其是慢性胃肠道疾病如胃炎、消化性溃疡、功能性胃肠病等发生中的重要作用,同时也揭示了中医疏肝理气法“身心同治”治疗作用.这为疏肝理气法治疗消化系身心疾病提供了理论依据,在社会竞争日趋激烈、人们承受的精神压力日趋增大以及由此所引起的疾病在人类疾病谱中所占的地位日趋重要的当今社会,具有重要的现实意义.脑肠肽是指存在于胃肠道内分泌细胞、肠道神经系统及中枢神经系统的肽类激素,他们作为神经肽或神经内分泌或神经旁分泌物质,调节着胃肠运动、分泌吸收等复杂的功能,并与情绪有关.中医“肝主疏泄”的功能既与机体情志活动关系密切,又能助脾胃运化.中医肝主疏泄理论与西医脑肠肽理论有着异曲同工,殊途同归之路,均注重有机整体,相互关照,中医“肝主疏泄”的功能可能是调节脑肠肽的核心^[8-9].已有不少研究证明,各种应激可引起体内脑肠肽含量和功能的变化^[10-15].那么,疏肝理气法“身心同治”的抗应激作用又是否与调节

脑肠肽有关?这是值得今后进一步研究的课题.

4 参考文献

- Bennett EJ, Piesse C, Palmer K, Badcock CA, Tennant CC, Kellow JE. Functional gastrointestinal disorders: psychological, social, and somatic features. *Gut* 1998; 42: 414-420
- 黄保民, 王希浩, 张关亭. 舒肝方对心理应激肝郁大鼠神经生殖内分泌的作用. *中成药* 2006; 28: 222-224
- 沈渔邻. 精神病学. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 83
- 李峰, 杨维益, 梁嵘, 刘小兰, 瞿德. 从中医学看肝脏调节应激反应的作用. *北京中医药大学学报* 1998; 21: 21-23
- 吴先哲. 论心理应激与肝失疏泄的辨证关系. *时珍国医国药杂志* 2004; 15: 445-447
- 任路, 李浩. 关于肝郁证动物模型研究现状及存在问题的思考. *中医药学报* 2006; 34: 44-46
- 吴先哲. 柴胡疏肝散对心理应激大鼠行为学的影响. *中国试验方剂学杂志* 2006; 12: 38
- 凌江红. 肝主疏泄与脑肠肽的相关性. *中国中西医结合消化杂志* 2003; 11: 233-234
- 陈业强, 凌江红. 从脑肠肽进行肝郁证与功能性消化不良病证结合研究的思路. *中医杂志* 2006; 47: 784-785
- Smith A, Barclay C, Quaba A, Sedowofia K, Stephen R, Thompson M, Watson A, McIntosh N. The bigger the burn, the greater the stress. *Burns* 1997; 23: 291-294
- Jonsson BH, Uvnäs-Moberg K, Theorell T, Gotthard R. Gastrin, cholecystokinin, and somatostatin in a laboratory experiment of patients with functional dyspepsia. *Psychosom Med* 1998; 60: 331-337
- 曹曙光, 夏宣平, 王文星, 郑君杰, 薛战雄. 心理应激对小鼠小肠运动及血浆、小肠组织中生长抑素和P物质的影响. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 967-970
- 范群铭, 李兆申, 徐正梅, 黄文, 程传苗. 军演应激状态对官兵部分生理生化的影响. *解放军医学杂志* 2007; 32: 191-192
- 张庆光, 张雷, 李贤珍. 兔创伤应激与胆汁流量及胆囊收缩素、胃泌素、促胰液素分泌的关系. *中华急诊医学杂志* 2006; 15: 419-421
- Zhang H, Han T, Sun LN, Huang BK, Chen YF, Zheng HC, Qin LP. Regulative effects of essential oil from *Atractylodes lancea* on delayed gastric emptying in stress-induced rats. *Phytomedicine* 2008; 15: 602-611

编辑 史景红 电编 吴鹏朕

小鼠胃白念珠菌感染动物模型的建立

马耀辉, 王刚生, 邓洁华, 张晓光, 王爱学, 四荣联

马耀辉, 王刚生, 邓洁华, 张晓光, 王爱学, 四荣联, 河北医科大学第二医院 河北省石家庄市 050000

作者贡献分布: 马耀辉与邓洁华对此文所作贡献均等; 此课题由马耀辉, 王刚生, 四荣联, 邓洁华及张晓光设计; 研究过程由马耀辉, 邓洁华, 张晓光及王爱学操作完成; 数据分析由马耀辉, 邓洁华, 张晓光完成; 本论文写作由马耀辉, 邓洁华, 张晓光完成。

通讯作者: 马耀辉, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学第二医院皮肤科. myhui@hb2h.com

电话: 0311-66002738

收稿日期: 2008-11-15 修回日期: 2008-12-24

接受日期: 2008-12-29 在线出版日期: 2009-01-28

Establishment of a mouse model of stomach infection with *candida albicans*

Yao-Hui Ma, Gang-Sheng Wang, Jie-Hua Deng, Xiao-Guang Zhang, Ai-Xue Wang, Rong-Lian Si

Yao-Hui Ma, Gang-Sheng Wang, Jie-Hua Deng, Xiao-Guang Zhang, Ai-Xue Wang, Rong-Lian Si, Department of Dermatology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China
Correspondence to: Yao-Hui Ma, Department of Dermatology, the Second Hospital of Hebei Medical University, 215 Heping Western Road, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. myhui@hb2h.com

Received: 2008-11-15 Revised: 2008-12-24

Accepted: 2008-12-29 Published online: 2009-01-28

Abstract

AIM: To establish a mouse model of stomach with *candida albicans* infection on hyp immunity and ulceric mouse.

METHODS: Kunming mice were randomly divided into 3 groups. Mice in control group were given 0.5 mL 5.5×10^{12} *candida albicans* suspension by gastric intubation; mice in control group II were given cyclophosphamide (40 g/L) through intraperitoneal injection by 0.02 mL per gram (weight) and lavaged with 0.5 mL 3 g/L glacial acetic acid; mice in model group were first lavaged in the same way as control group II, then 2 hours later, were given intragastric administration with 0.5 mL 5.5×10^{12} *candida albicans* suspension. On day 10, microscopic and histopathological examination were performed on stomach tissue of mice. Positive fungi under microscopy were all cultivated with CHRO-Magar, and observed.

RESULTS: *Monilia sporus*, blastospore, pseudohypha and a bulk of hypha in stomach were observed in model group. The differences in positive rates upon microscopic and histopathological examination between model group and control group I were significant ($\chi^2 = 40.763, 40.526$, both $P < 0.01$). There was also significant difference in positive rate between model group and control group II ($\chi^2 = 58.964, 44.074$, both $P < 0.01$).

CONCLUSION: By inhibiting immunity and inducing peptic ulcer, we can establish a mouse model of stomach with *candida albicans* infection.

Key Words: *Candida albicans*; Stomach; Ulcer; Mice; Animal model

Ma YH, Wang GS, Deng JH, Zhang XG, Wang AX, Si RL. Establishment of a mouse model of stomach infection with *candida albicans*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(3): 303-306

摘要

目的: 通过降低小鼠免疫力并给小鼠胃肠道造成溃疡, 建立小鼠胃白念珠菌感染动物模型。

方法: 昆明小鼠110只随机分成3组。对照组 I 给予浓度 5.5×10^{12} 白念珠菌悬液 0.5 mL 灌胃; 对照组 II 腹腔内注射浓度 40 g/L 的环磷酰胺溶液 0.02 mL/g 体质量, 并用 3 g/L 冰醋酸溶液 0.5 mL 灌胃; 模型组用对照 II 组方法灌胃, 2 h 后给予浓度 5.5×10^{12} 白念珠菌悬液 0.5 mL 灌胃。于第 10 天取小鼠胃组织行真菌镜检、组织病理检查, 同时取所有真菌镜检阳性胃组织经念珠菌显色培养基培养, 观察菌落。

结果: 模型组小鼠胃组织内发现念珠菌孢子、芽生孢子、假菌丝及大量成团菌丝。模型组与对照组 I 真菌镜检及组织病理 HE 染色阳性率比较有显著性差异 ($\chi^2 = 40.763, 40.526$, 均 $P < 0.01$), 与对照组 II 比较也有显著性差异 ($\chi^2 = 58.964, 44.074$, 均 $P < 0.01$)。

结论: 通过降低小鼠免疫力并造成胃溃疡, 应用白念珠菌感染可以建立小鼠胃白念珠菌感染动物模型。

背景资料

念珠菌感染在院内感染真菌中占首位, 肠道念珠菌感染仅次于下呼吸道占第 2 位, 以白念珠菌最多。由于临床上高效安全的抗真菌药物数目较少, 因此念珠菌感染常呈致死病因。

同行评议者

阴赅宏, 研究员, 首都医科大学附属北京友谊医院感染暨急救医学科; 吴建国, 教授, 武汉大学生命科学学院病毒学国家重点实验室

■研发前沿

念珠菌耐药日渐增多, 抗真菌药物数目较少, 且无良好的动物模型.

关键词: 白念珠菌; 胃; 溃疡; 小鼠; 动物模型

马耀辉, 王刚生, 邓洁华, 张晓光, 王爱学, 四荣联. 小鼠胃白念珠菌感染动物模型的建立. 世界华人消化杂志 2009; 17(3): 303-306

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/303.asp>

0 引言

念珠菌广泛分布于自然界, 寄生于正常人皮肤、口腔、肠道、阴道等处, 以消化系带菌率最高, 约占正常人的30%-50%, 在人体免疫力低下时, 正常寄生状态的念珠菌大量繁殖并侵入黏膜引起消化系念珠菌病, 偶自黏膜侵入血液引起系统播散性念珠菌病. 白念珠菌由寄生菌转变为致病菌, 并引发黏膜念珠菌病, 导致系统播散, 其发病原因考虑与机体免疫力低下, 黏膜受损、白念珠菌定殖数量等有关. 制作小鼠胃肠道白念珠菌感染动物模型, 可对以上分析提供客观依据并有助于新药研发等.

1 材料和方法

1.1 材料 普通级昆明小鼠110只, 体质量约25 g, 雌雄各半, 购买于河北医科大学实验动物中心. 白念珠菌来自河北医科大学第二医院皮肤性病科真菌室.

1.2 方法

1.2.1 白念珠菌菌悬液制备: 取白念珠菌, 经念珠菌显色培养基培养鉴定的白念珠菌大量接种于沙氏培养基上(葡萄糖40 g/L, 蛋白胨10 g/L, 琼脂15 g/L加蒸馏水), 在37℃恒温培养箱中培养72 h. 将培养基表面的白念珠菌菌落溶于少量9 g/L氯化钠溶液中并逐渐稀释成浓度为 5.5×10^{12} 的白念珠菌菌悬液(血细胞计数板计数).

1.2.2 动物分组及处理: 实验小鼠随机分为三组, 对照组 I 30只, 对照组 II 40只, 模型组40只. 对照组 I 用浓度 5.5×10^{12} 白念珠菌菌悬液0.5 mL给小鼠ig, 然后在标准饲养条件下喂养. 对照组 II 用40 g/L环磷酸胺溶液0.02 mL/g体质量, 给小鼠腹腔内注射, 并立即用3 g/L冰醋酸溶液0.5 mL以对照组 I 方法ig, 然后在标准饲养条件下喂养. 模型组以对照组 II 方法ig 2 h后给予浓度 5.5×10^{12} 白念珠菌菌悬液0.5 mL ig, 然后在标准饲养条件下喂养.

1.2.3 小鼠胃溃疡观察及胃取材: 2 h随机取对照组 II 小鼠3只, 断颈处死, 观察胃外观, 沿胃大弯剪开胃壁清理食糜观察胃黏膜, 并分别剪取溃疡处约0.5 cm×0.5 cm胃壁, 无菌生理盐水冲洗

后, 置于40 g/L甲醛溶液中固定.

1.2.4 实验小鼠胃外观、真菌镜检及胃取材: 第10天取对照组 I、对照组 II、模型组存活小鼠分别为30、34、36只, 按照以上方法解剖小鼠, 观察胃外观、黏膜. 并取约大米粒大小胃组织置于含1滴100 g/L KHO溶液的载玻片上, 放入60℃电热恒温水浴箱中溶解10 min, 取出盖上盖玻片轻压并用吸水纸吸干. 置于普通光学显微镜下寻找孢子及菌丝. 同时分别剪取约0.5 cm×0.5 cm胃壁, 无菌生理盐水冲洗后, 置于40 g/L甲醛溶液中固定. 同时取所有真菌镜检阳性胃组织经念珠菌显色培养基30℃培养48 h, 观察菌落. 所有胃组织取材行HE染色.

统计学处理 胃组织真菌镜检或HE染色中发现菌丝为阳性, 分别记录对照组 I、对照组 II、模型组真菌镜检、组织HE染色阳性数, 用模型组与对照组 I、对照组 II的阳性率进行比较, 用SPSS10.0统计软件进行 χ^2 检验, $\alpha = 0.01$.

2 结果

2.1 小鼠胃溃疡形成 对照组 II 灌胃后2 h小鼠胃体血管扩张、充血, 剖开胃壁见胃内大量褐黄色食糜, 清理食糜后见胃黏膜溃疡水肿(图1A). 胃组织HE染色见胃黏膜细胞内、细胞间水肿, 部份组织缺损形成溃疡(图1B).

2.2 3组小鼠第10天胃肉眼观 对照组 I 胃外观及黏膜与正常小鼠无明显差异, 对照组 II 及模型组均见胃体缩小, 塌陷, 光泽差, 胃黏膜见水肿, 溃疡. 真菌镜检, 对照组 I 有4只小鼠胃组织真菌镜检见少量菌丝; 对照组 II 小鼠胃组织真菌镜检均未见孢子及菌丝; 模型组有33只小鼠胃组织真菌镜检发现念珠菌孢子、芽生孢子、假菌丝及大量成团菌丝(图2A).

2.3 胃组织HE染色结果 对照组 I、II 小鼠胃组织病理HE染色均未见孢子及菌丝. 模型组真菌镜检阴性的3只小鼠胃的组织病理HE染色未见孢子及菌丝, 胃组织真菌镜检阳性小鼠中, 有28只在胃黏膜表面脓疡中及黏膜浅层见大量芽生孢子、假菌丝及菌丝(图2B). 对照组 II 及模型组组织病理HE染色均发现胃黏膜组织水肿, 部份结构紊乱及坏死.

2.4 念珠菌显色培养基培养结果 所有真菌镜检阳性胃组织经念珠菌显色培养基30℃培养48 h均生长出绿色酵母样菌落. 真菌镜检及HE染色阳性率比较, 模型组与对照组 I 真菌镜检及组织病理HE染色阳性率比较均有差异($\chi^2 = 40.763, 40.526$, 均 $P < 0.01$, 表1). 同样, 模型组与对照组 II 也有统计

■相关报道

黄雪峰 *et al* 通过喂食白念珠菌发现白念珠菌在小鼠肠道定植, 邱琳 *et al* 用冰醋酸致大鼠结肠形成溃疡.

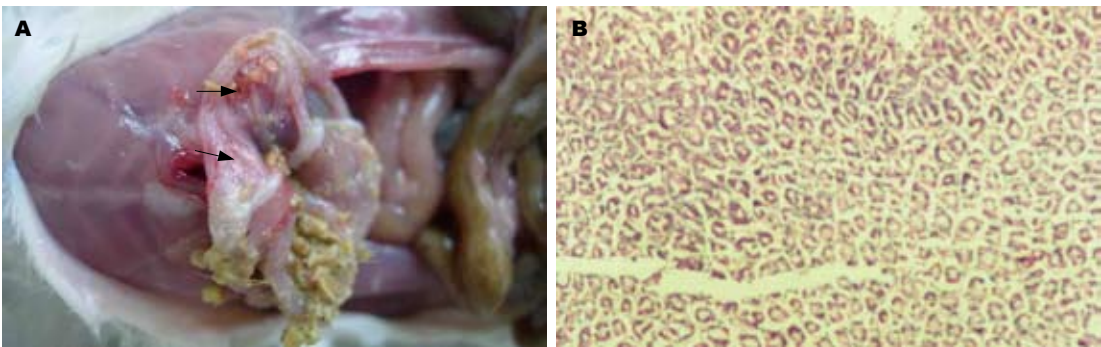


图 1 小鼠胃溃疡形成. A: 胃黏膜溃疡; B: 胃组织HE染色($\times 100$).

■应用要点

建立小鼠肠道白念珠菌感染动物模型, 为进一步研究其感染方式、致病机制、药物筛选及开发奠定基础, 为临床治疗提供依据.

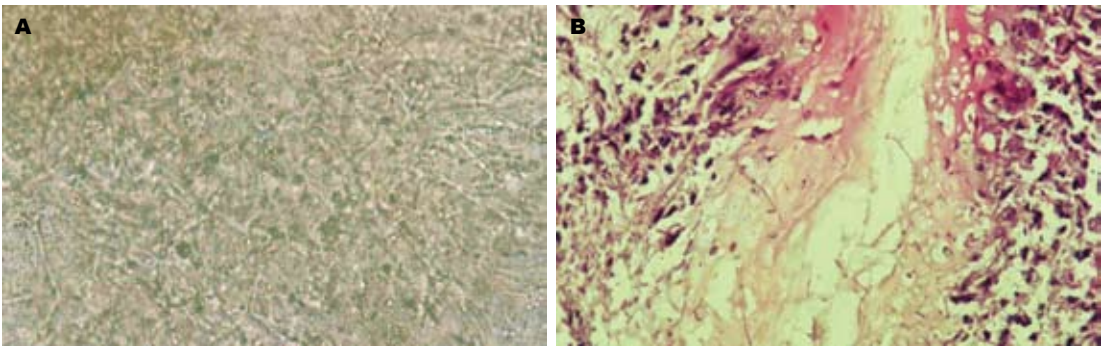


图 2 胃组织真菌镜检(HE $\times 400$). A: 模型组有33只小鼠胃组织真菌镜检发现念珠菌孢子、芽生孢子、假菌丝及大量成团菌丝; B: 胃黏膜表面溃疡中及黏膜浅层见大量芽生孢子、假菌丝及菌丝.

表 1 模型组与对照组 I 真菌镜检及组织病理HE染色阳性率比较 $n(\%)$

分组	真菌镜检		HE染色	
	阳性数	阴性数	阴性数	阳性数
对照组 I	4(13.3) ^b	26(86.7)	30(100.0)	0(0) ^d
模型组	33(91.7)	3(8.3)	8(22.2)	28(77.8)
合计	37(56.1)	29(43.9)	38(57.6)	28(42.4)

$\chi^2 = 40.763$, ^b $P < 0.01$; $\chi^2 = 40.526$, ^d $P < 0.01$ vs 模型组.

学差异($\chi^2 = 58.964$, 44.074 , 均 $P < 0.01$, 表2).

3 讨论

念珠菌广泛分布于自然界. 正常人体的皮肤、口腔、肠道、肛门及阴道等处均可分离出本菌, 其中以消化系(口腔和肠道)带菌率最高, 约占正常人的30%-50%, 这是念珠菌病内源获得性感染的根源^[1]. 在所有念珠菌感染中以白念珠菌最多^[2]. 当机体抵抗力或免疫力降低时, 尤其细胞免疫功能降低时, 引起真菌感染^[3]. 高凡 *et al*^[4]给正常小鼠腹腔内注射50 mg/kg的环磷酸胺(CP)隔日连续腹腔注射4-5次, 小鼠自然杀伤细胞细胞活性出现显著下降, 血清白介素2及肿瘤坏死因子均出现显著下降, 抗体生成细胞功能显著下降.

表 2 模型组与对照组 II 真菌镜检及组织病理HE染色阳性率比较 $n(\%)$

分组	真菌镜检		HE染色	
	阳性数	阴性数	阴性数	阳性数
对照组 II	0(0) ^b	34(100.0)	34(100.0)	0(0) ^d
模型组	33(91.7)	3(8.3)	8(22.2)	28(77.8)
合计	33(47.1)	37(52.9)	42(60.0)	28(40.0)

$\chi^2 = 58.964$, ^b $P < 0.01$; $\chi^2 = 44.074$, ^d $P < 0.01$ vs 模型组.

黏附于胃肠道的白念珠菌孢子在一定条件下转变为致病状态的菌丝, 从而引起胃肠道白念珠菌感染, 也会受到胃肠道局部抵抗力的干扰. 消化系黏膜组织不仅是一种机械性的屏障, 同时也因其所特有的免疫系统保护机体, 起着防御疾病的重要作用. 本研究对照组 I 小鼠在自然状态下给予白念珠菌灌胃, 在第10天有4只小鼠胃组织真菌镜检见少量白念珠菌菌丝, 但未发现胃组织学上的损害, 说明小鼠胃肠道的天然屏障、非特异性及特异性防御系统对白念珠菌的生长繁殖有抵御作用. 之前多项研究发现小鼠胃肠道白念珠菌定植, 但未发现其菌丝相, 也证明了这一点^[5-14].

黏膜局部受损, 创面水肿, 黏膜屏障完整性

■同行评价

本研究首次建立了免疫抑制小鼠胃白念珠菌感染的动物模型,具有一定的科学价值。

受损有利于真菌生长^[15]。本研究用3 g/L冰醋酸溶液0.5 mL给小鼠灌胃,2 h后发现胃黏膜溃疡水肿,胃组织HE染色见胃黏膜细胞内、细胞间水肿,部分组织缺损形成溃疡。在这种条件下灌胃白念珠菌悬液,白念珠菌侵入黏膜的机会大大提高,本研究的结果在模型组小鼠胃组织见大量芽生孢子、假菌丝及菌丝验证了以上情况。

本研究模型组小鼠33只胃组织真菌镜检发现念珠菌孢子、芽生孢子、假菌丝及大量成团菌丝,28只胃组织HE染色可见胃黏膜表面脓疡中及黏膜浅层见大量芽生孢子、假菌丝及菌丝。模型组与对照组I、对照组II的真菌镜检、组织HE染色阳性率比较有显著统计学差异,说明模型组比对照组I、对照组II小鼠胃白念珠菌感染率明显增高,可用于建立小鼠胃白念珠菌感染动物模型。

本研究提示免疫力低下及消化系溃疡给定植于胃的白念珠菌以大量繁殖和侵入胃黏膜创造了条件,使白念珠菌由孢子相转变为菌丝相,引起胃黏膜念珠菌感染。证明了免疫力低下及胃溃疡为胃白念珠菌感染的易感因素,为临床上免疫力低下患者及胃溃疡患者易出现消化系念珠菌病提供了实验室依据,为进一步研究其感染方式、致病机制、药物筛选及开发奠定基础,为临床治疗提供依据。本研究中对对照组II及模型组持续胃溃疡、水肿外观无明显差异,因此白念珠菌在胃损害中有无加重损害程度及对胃损害的愈合有无不良影响,有待进一步证实。

4 参考文献

1 张学军,刘维达,何春涤.现代皮肤病学基础.第1版.

北京:人民卫生出版社,2001:946

- 2 杨国亮,王侠生.现代皮肤病学.第1版.上海:上海医科大学出版社,1996:193
- 3 陈世平.真菌感染学.第1版.沈阳:辽宁科学技术出版社,2000:4
- 4 高凡,钱嘉林,刘长喜,严卫星.环磷酸胺对小鼠免疫抑制的动物模型建立.环境与职业医学 2004; 21: 314-318
- 5 陈必兴.胃肠道白念珠菌顽固性感染的小鼠-抗真菌治疗的模型.国外医药·抗生素分册 1983; 4: 158-159
- 6 Field LH, Pope LM, Cole GT, Guentzel MN, Berry LJ. Persistence and spread of *Candida albicans* after intragastric inoculation of infant mice. *Infect Immun* 1981; 31: 783-791
- 7 常山,查晓霞,陆声,陈军,张雅萍. IgY与双歧杆菌防治小鼠白色念珠菌感染的研究.第三军医大学学报 2003; 25: 294-297
- 8 白晓东,刘贤华,全青英,张韶峰.肠道白色念珠菌易位体内机制的研究.中华医院感染学杂志 2004; 14: 975-978
- 9 黄雪峰,袁静,魏泓.抗生素诱导SPF级BALB/c小鼠胃肠道白念珠菌定植模型.世界华人消化杂志 2006; 14: 1161-1166
- 10 Algin C, Sahin A, Kiraz N, Sahintürk V, Ihtiyar E. Effectiveness of bombesin and *Saccharomyces boulardii* against the translocation of *Candida albicans* in the digestive tract in immunosuppressed rats. *Surg Today* 2005; 35: 869-873
- 11 Sandovsky-Losica H, Barr-Nea L, Segal E. Fatal systemic candidiasis of gastrointestinal origin: an experimental model in mice compromised by anticancer treatment. *J Med Vet Mycol* 1992; 30: 219-231
- 12 许川山,孙华明,薛国文,冷泰俊.⁶⁰Co γ 射线全身照射后小鼠肠道内白念珠菌定植的实验观察.第三军医大学学报 2002; 24: 230-232
- 13 Mellado E, Cuenca-Estrella M, Regadera J, González M, Díaz-Guerra TM, Rodríguez-Tudela JL. Sustained gastrointestinal colonization and systemic dissemination by *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis* in adult mice. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 38: 21-28
- 14 Scott BB, Jenkins D. Gastro-oesophageal candidiasis. *Gut* 1982; 23: 137-139
- 15 潘国宗,曹世植.现代胃肠病学.第1版.北京:科学出版社,1996:83-88

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 WJG 2007 年影响因子 0.745

本刊讯 2007年World Journal of Gastroenterology(WJG)的总被引频次为4431,位居全部1723种中国科技论文统计源期刊的第14位,内科医学类28种期刊的第1位。2007年WJG的影响因子为0.745,内科医学类28种期刊的第10位。即年指标0.163,他引率0.85,引用刊数482种,扩散因子10.88,学科影响指标0.73。(编辑:程剑侠 2009-01-28)

内源性硫化氢在不同时期大鼠肝硬化中的作用

张宁, 郑勇, 王于理, 李睿, 孙侃, 常向云, 陈卫刚, 赵瑾, 李洪安

张宁, 王于理, 新疆石河子大学医学院研究生院 新疆维吾尔自治区石河子市 832002

郑勇, 李睿, 孙侃, 常向云, 陈卫刚, 新疆石河子大学医学院第一附属医院消化内科 新疆维吾尔自治区石河子市 832008

赵瑾, 李洪安, 新疆石河子大学医学院病理科 新疆维吾尔自治区石河子市 832002

作者贡献分布: 张宁与王于理对此文所作贡献均等; 此课题由张宁, 郑勇, 孙侃, 常向云, 陈卫刚, 李睿及赵瑾设计; 研究过程由张宁, 王于理及赵瑾操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由赵瑾与李洪安提供; 数据分析由张宁, 王于理及李睿完成; 本论文写作由张宁与郑勇完成。

通讯作者: 郑勇, 832002, 新疆维吾尔自治区石河子市, 新疆石河子大学医学院第一附属医院消化内科。

znhf77@yahoo.com.cn

电话: 0993-2858876

收稿日期: 2008-11-17 修回日期: 2008-12-22

接受日期: 2008-12-29 在线出版日期: 2009-01-28

Role of endogenous hydrogen sulfide in rats with hepatic cirrhosis at different stages

Ning Zhang, Yong Zheng, Yu-Li Wang, Rui Li, Kan Sun, Xiang-Yun Chang, Wei-Gang Chen, Jin Zhao, Hong-An Li

Ning Zhang, Yu-Li Wang, Postgraduate Research Institute, Medical College of Shihezi University Shihezi 832002, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Yong Zheng, Rui Li, Kan Sun, Xiang-Yun Chang, Wei-Gang Chen, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Shihezi University Medical College, Shihezi 832002, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Jin Zhao, Hong-An Li, Department of Pathology, Shihezi University Medical College, Shihezi 832008, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Correspondence to: Yong Zheng, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Shihezi University, Medical College, Shihezi 832002, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. znhf77@yahoo.com.cn

Received: 2008-11-17 Revised: 2008-12-22

Accepted: 2008-12-29 Published online: 2009-01-28

Abstract

AIM: To observe the changes of cystathionine gamma-lyase/hydrogen sulfide (CSE/H₂S) on the liver of rats with hepatic cirrhosis at different stages, so as to investigate the role H₂S plays in development of hepatic cirrhosis.

METHODS: H₂S density in portal vein blood of model rats with carbon tetrachloride-induced hepatic cirrhosis was measured on the 15th day,

the 30th day and the 52th day, respectively. The expression of CSE and CSEmRNA in liver was measured using immunohistochemistry and RT-PCR.

RESULTS: The blood H₂S density in rats with hepatic cirrhosis was significantly lower in early-stage, the mid-stage, and the later stage group than in control group ($F = 126.208$, $P = 0.000$). H₂S density was on a decline with disease development ($r = -0.777$, $P < 0.05$). The Grey of liver CSE with hepatic cirrhosis at different stages were lower than the control ($F = 156.04$, $P = 0.000$). The expression of protein CSE was enhanced. The expression of CSEmRNA of liver with hepatic cirrhosis at different stages were all higher than control ($F = 23.927$, $P = 0.000$), and the expression increased gradually with the disease development.

CONCLUSION: H₂S system has an important effect which maintains the state of diastolic blood vessels on the occurrence and development in rats with hepatic cirrhosis.

Key Words: Hepatic cirrhosis; Rats; Portal vein; H₂S; Cystathionine gamma-lyase

Zhang N, Zheng Y, Wang YL, Li R, Sun K, Chang XY, Chen WG, Zhao J, Li HA. Role of endogenous hydrogen sulfide in rats with hepatic cirrhosis at different stages. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(3): 307-311

摘要

目的: 观察内源性胱硫醚- γ -裂解酶(cystathionine gamma-lyase, CSE)/硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)(CSE/H₂S)体系在不同时期肝硬化大鼠模型上的变化, 以探讨内源性H₂S在肝硬化发生发展过程中的作用。

方法: 制备四氯化碳诱导的肝硬化大鼠模型, 在第15、30、52天取大鼠门静脉血检测H₂S浓度, 用免疫组化和RT-PCR方法观察肝组织CSE mRNA的表达。

结果: 肝硬化早、中、晚期大鼠门静脉血中H₂S的含量均显著低于正常对照组($F =$

■背景资料

近年实验研究表明, 机体内源性气体信号分子一氧化氮(NO)及一氧化碳(CO)是重要的扩血管物质, 对保持门脉血管的松弛, 尤其是保持肝窦的舒张状态起着及其重要的作用。NO、CO在肝硬化的肝脏血流动力学及门脉高压的发生发展中起着重要作用。内源性硫化氢(H₂S)是继NO、CO之后发现的又一新的内源性气体信号分子。近些年, 国内外研究均发现, 内源性H₂S在肺动脉高压、高血压、感染性休克等心血管系统的发病中起到重要的作用, 但在肝硬化的研究才刚刚起步。

■同行评议者

陈耀凯, 副教授, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所

■研究前沿

H₂S的作用机制目前尚未完全阐明,但已有的研究结果表明,在不需第2信息分子参与的情况下,H₂S很可能是通过开放的K_{ATP}通道而发挥作用。

126.208, $P = 0.000$), 且H₂S浓度随着肝脏病变的加重而逐渐降低($r = -0.777$, $P < 0.05$)。肝硬化不同时期肝组织CSE蛋白的灰阶值均低于正常对照组($F = 156.04$, $P = 0.000$), 表明CSE表达增强。各组CSE mRNA的表达均分别显著高于正常对照组($F = 23.927$, $P = 0.000$), 且随着肝脏病变的加重表达逐渐增加。

结论: H₂S体系在肝硬化发生发展中起着保持血管舒张状态的重要作用。

关键词: 肝硬化; 大鼠; 门静脉; 硫化氢; 胱硫醚- γ -裂解酶

张宁, 郑勇, 王于理, 李睿, 孙侃, 常向云, 陈卫刚, 赵瑾, 李洪安. 内源性硫化氢在不同时期大鼠肝硬化中的作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(3): 307-311

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/307.asp>

0 引言

肝硬化(liver cirrhosis)是一种常见的慢性肝病,可由多种原因引起。肝细胞弥漫性变性坏死,继而出现纤维组织增生和肝细胞结节状再生,这三种改变反复交错进行,结果肝小叶结构和血液循环途径逐渐被改建,使肝变形、变硬而形成肝硬化。本病早期可无明显症状,后期则出现一系列不同程度的门静脉高压和肝功能障碍。近年实验研究表明,机体内源性气体信号分子一氧化氮(NO)及一氧化碳(CO)是重要的扩血管物质,对保持门脉血管的松弛,尤其是保持肝窦的舒张状态起着及其重要的作用^[1]。NO、CO在肝硬化的肝脏血流动力学及门脉高压的发生发展中起着重要作用^[2]。

内源性硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)是继NO、CO之后发现的又一新的内源性气体信号分子,由L-半胱氨酸在胱硫醚- β -合成酶(cystathionine beta-synthase, CBS)、胱硫醚- γ -裂解酶(cystathionine gamma-lyase, CSE)作用下生成,受体内代谢途径的调控^[3],而H₂S对CBS和CSE的活性又具有负反馈调节作用。H₂S具有与NO、CO相似的病理生理学效应^[4],比如抑制平滑肌细胞增殖,舒张血管等。近些年,国内外研究均发现,内源性H₂S在肺动脉高压、高血压、感染性休克等心血管系统的发病中起到重要的作用,但在肝硬化的研究才刚刚起步。本研究复制不同时期肝硬化大鼠模型,分期观察肝硬化大鼠门静脉血中硫化氢的变化,并检测肝组织中CSE的表达,以探讨H₂S在肝硬化发

病过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 实验大鼠91只由新疆自治区疾控中心动物研究所提供,均为同期出生、纯种系、4-5 wk龄的健康♀SD大鼠(SPF),体质量约180-220 g。NaHS为美国Sigma公司产品,醋酸锌、对氨基二甲基苯胺盐酸盐、三氯化铁、三氯醋酸均为国产分析纯;鼠抗兔CSE多克隆抗体及SABC试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;DAB显色剂为DAKO公司产品;RNA提取试剂TRIzol为美国Invitrogen公司产品;M-MLV逆转录酶、Tap酶购自美国Fermentas公司;PCR引物及内参照GAPDH引物均由上海生物工程公司合成,序列如下: CSE-F 5'-AGAATTCTCT CGGGGCAGTT-3', CSE-R 5'-ACTACGTTTGGCGAGCTCAT-3'; GAPDH-F 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3', GAPDH-R 5'-TCCACCACCCTGTTGC TGTA-3'。

1.2 方法

1.2.1 肝硬化动物模型: 采用CCl₄复合因素法建立肝硬化大鼠模型。给实验大鼠(81只)sc 400 mL/L CCl₄棉籽油溶液,首次注射5 mL/kg体质量,后每隔4天注射一次,每次3 mL/kg体质量,共注射11次,200 mL/L乙醇溶液作为唯一饮用液体,给予高脂高胆固醇饲料。随机抽取大鼠(10只)为正常对照组,同期sc生理盐水,剂量同实验组,采用标准饲养方法。根据预实验中肝硬化形成经验,实验组大鼠分3批,每批27只,分别在实验的第15、30、52天将大鼠用乙醚麻醉,剖腹抽取门静脉血,分离获得血浆备检。然后处死大鼠,取大鼠左叶肝组织做HE染色,显微镜下观察,依据严家春 *et al*^[5]的方法病理学确定肝硬化分期。

1.2.2 门静脉血浆H₂S的测定: 采用去蛋白的方法见文献[6]。首先在试管中加入0.5 mL 10 g/L醋酸锌,然后加入0.1 mL血浆标本,振荡混匀,再依次加入0.5 mL 20 mmol/L对氨基二甲基苯胺盐酸盐和0.5 mL 30 mmol/L三氯醋酸,再加入2.5 mL蒸馏水补足体积至5 mL,充分混匀。6000 r/min离心5 min,吸出上清液,用分光光度计在670 nm处检测吸光度。根据H₂S标准曲线计算上清液中H₂S的含量。

1.2.3 免疫组织化学染色方法检测肝组织CSE表达: 石蜡切片常规脱蜡至水; 30 mL/L H₂O₂室温孵育5-10 min,以消除内源性过氧化物酶的活性, PBS浸洗5 min; 热修复抗原20 min; PBS浸洗

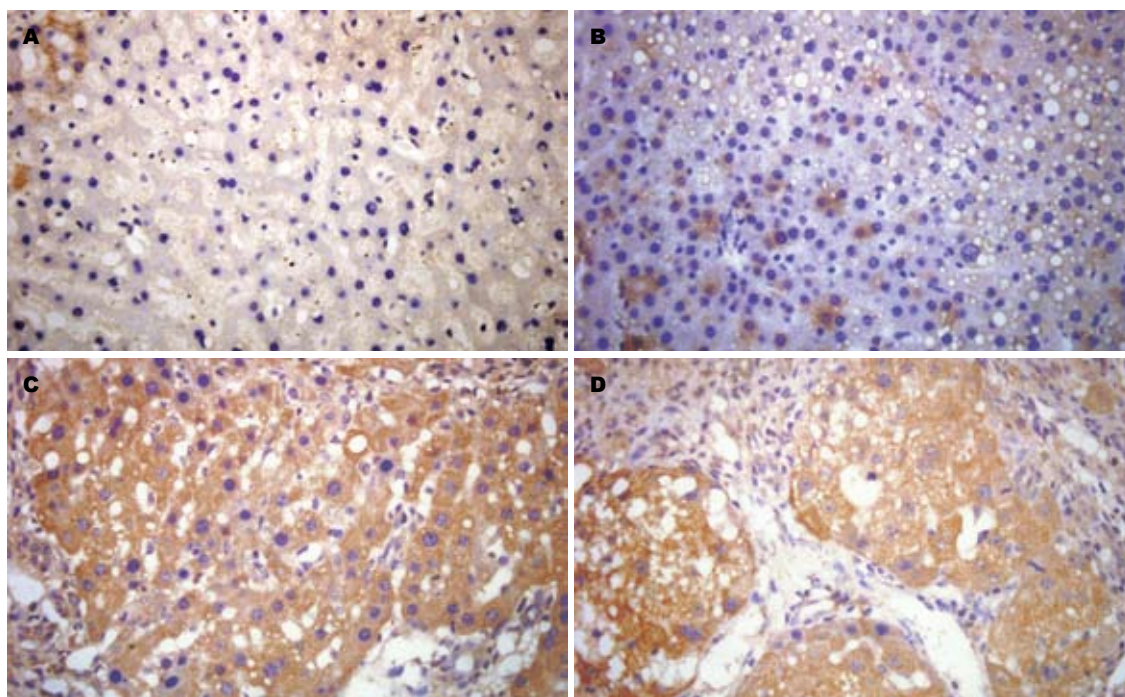


图1 CSE在不同时期肝硬化大鼠肝组织的表达(DAB×100)。A: 正常对照组; B: 肝硬化早期; C: 肝硬化中期; D: 肝硬化晚期。

■ 相关报道

于宏伟 *et al* 在结扎大鼠肝动脉诱发肝细胞病变的实验中发现, 随着肝动脉结扎时间延长, 血清中 H_2S 浓度随结扎时间延长呈现曲线变化, 即肝组织在缺血缺氧初期 H_2S 浓度降低, 当缺血缺氧加重时 H_2S 增加, 而肝细胞出现核溶解或固缩, 肝细胞失去调节和被调节能力时 H_2S 浓度又再次降低。

5 min, 滴加适当比例稀释的一抗(1:100), 4℃过夜。PBS浸洗5 min, 滴加生物素化山羊抗小鼠IgG工作液, 37℃孵育30 min; PBS浸洗5 min, 滴加试剂SABC, 37℃孵育30 min, PBS浸洗5 min。DAB显色, 镜下观察控制时间。蒸馏水充分冲洗, 苏木素轻度复染, 脱水, 透明, 中性树胶封片。阳性部位在胞质处显棕黄色。每例切片在低倍镜下将视野按十字形分为上、下、左、右、中五个区域, 然后在400倍镜视野下应用Olympus-DP70彩色病理图文分析系统, 测定免疫反应阳性产物灰阶值, 灰阶值越低说明表达越强, 反映细胞内蛋白表达量越多, 以灰阶值来进行量化后的统计学分析。

1.2.4 RT-PCR检测肝组织内CSE mRNA的表达: 使用TRIzol法提取肝脏总RNA, 应用10 g/L的琼脂糖凝胶电泳检查RNA的完整性, 并用紫外分光光度仪行RNA浓度及纯度测定, A_{260}/A_{280} 均在1.8-2.0之间说明RNA纯度较高。应用M-MLV逆转录酶, 及Oligod(T)15、dNTPs等将总RNA逆转录为cDNA, 然后进行PCR扩增。CSE的PCR反应条件: 94℃ 2 min; 94℃ 20 s, 54℃ 45 s, 72℃ 45 s, 共35个循环; 72℃延伸7 min。反应结束后, PCR产物用20 g/L的琼脂糖凝胶进行电泳分析, 采用Quantity one凝胶成像分析系统计算各个条带的光密度值, 以CSE/GAPDH比值表示CSE mRNA的相对表达水平。

统计学处理 采用SPSS13.0软件进行统计学

分析, 所有数据以mean±SD表示, 采用方差分析进行组间比较, 并使用独立样本t检验与相关性分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝硬化大鼠模型 根据肝细胞变性与增生情况, 汇管区与小叶间纤维组织增生程度以及假小叶形成等指标将大鼠分别确定为肝硬化早期组21只、中期组22只、晚期组20只、正常对照组10只。

2.2 不同时期肝硬化大鼠门静脉血 H_2S 浓度测定 将数据进行方差分析, 结果显示肝硬化早、中、晚期组大鼠的门静脉血 H_2S 浓度均低于正常对照组, 并且随着肝硬化进程的发展, H_2S 浓度逐渐降低($F=126.208, P=0.000$)。同时行相关分析示门静脉血 H_2S 浓度的降低与肝硬化程度且呈负相关($r=-0.777, P=0.031$), 进一步行组间两两比较(表1)。

2.3 不同时期肝硬化大鼠肝组织中CSE蛋白的表达 肝硬化早、中、晚期组大鼠肝组织CSE蛋白的表达见图1, 灰阶值见表2, 从中可以看出肝硬化各组大鼠肝组织中CSE的灰阶值都显著低于对照组大鼠, 显示CSE的表达增高($F=156.04, P=0.000$)。行相关分析示, CSE蛋白的表达与肝硬化病变程度呈负相关($r=-0.527, P=0.000$)。

2.4 不同时期肝硬化大鼠肝组织中CSE mRNA的表达 肝硬化早、中、晚期肝组织中CSE mRNA

■同行评价

本文研究思想与国内外相关研究设计基本相似,但研究结果也有些新发现,文中表格、图片较为清晰,行文较为流畅,具有一定的学术价值。

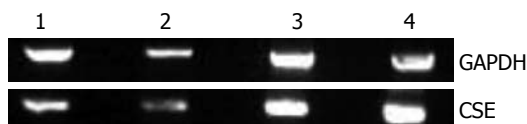


图2 各组大鼠肝组织中CSE mRNA的表达。1: 肝硬化早期; 2: 肝硬化中期; 3: 肝硬化晚期; 4: 正常对照组。

表1 各组大鼠门静脉血浆内源性H₂S的浓度 (mean ± SD, μmol/L)

分组	n	H ₂ S
正常对照组	10	369.73 ± 43.39
肝硬化早期	21	276.29 ± 24.64 ^b
肝硬化中期	22	182.82 ± 36.08 ^{bd}
肝硬化晚期	20	131.94 ± 23.67 ^{bdf}

^bP<0.01 vs 正常对照组; ^dP<0.01 vs 肝硬化早期; ^fP<0.01 vs 肝硬化中期。

的表达量显著高于正常对照组($F = 23.927$, $P = 0.000$), 进一步行组间两两比较均有统计学意义, 且随着肝硬化程度的加重, CSE mRNA的表达显著增加(图2, 表2)。

3 讨论

肝硬化是一种由多种致病因素长期或反复作用于肝脏引起的肝实质弥漫性损害, 使肝细胞变性、坏死、再生, 导致肝小叶和肝血管结构的紊乱, 最终形成假小叶及血管重建, 进一步引起一系列肝功能损害和门静脉高压的临床表现。肝硬化门静脉高压主要与门静脉系统血流受阻以及内脏血流高动力循环有关, 二者均与肝硬化时血管活性物质的代谢紊乱密切相关。内源性H₂S是继NO和CO之后发现的可以导致血管舒张的第3种气体信号分子^[6], 在体内具有重要的生理意义。H₂S作为气体小分子可以自由通过细胞膜, 作用不依赖于相应的质膜受体, 可在CBS、CSE催化下内源性产生, H₂S对CBS和CSE的活性具有负反馈调节作用。H₂S在体内可能有两种存在形式, 一种以气体形式, 另一种可能以硫氢化钠形式存在。NaHS在体内可解离成钠离子和硫氢根离子, 后者与体内可结合生成H₂S, H₂S和硫氢化钠形成动态的平衡, 据报道, 1/3 H₂S在体内以气体分子存在, 2/3以NaHS的形式存在, 这样, 既保证了H₂S在体内的稳定, 而且还不改变内环境的pH值水平^[7]。肝脏是体内H₂S生成的主要部位, 对维持循环血液中H₂S的浓度起到重要作用, 而H₂S在调节正常及肝硬化的微

表2 各组大鼠肝组织中CSE蛋白相对表达量与CSE mRNA相对表达量

分组	n	CSE灰价值	CSE/GAPDH
正常对照组	10	172.85 ± 3.50	0.80 ± 0.08
肝硬化早期	21	166.68 ± 3.78 ^a	0.99 ± 0.23 ^b
肝硬化中期	22	150.94 ± 7.69 ^{ac}	1.16 ± 0.20 ^{bd}
肝硬化晚期	20	134.57 ± 5.28 ^{acf}	1.41 ± 0.29 ^{bdf}

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 正常对照组; ^cP<0.05, ^dP<0.01 vs 肝硬化早期; ^fP<0.01 vs 肝硬化中期。

循环中的作用也已被证实^[8]。H₂S的作用机制目前尚未完全阐明, 但已有的研究表明, 在不需第2信息分子参与的条件下, H₂S很可能是通过开放的K_{ATP}通道而发挥作用^[9]。在血管平滑肌细胞中, H₂S兴奋K_{ATP}通道, 增加K_{ATP}通道的电流, 使细胞膜出现超极化并使电压门控式L-型钙离子通道失活, 进而减少胞内游离钙离子的浓度, 从而导致血管和平滑肌的松弛和扩张。

我们的研究显示: 在大鼠肝硬化早、中、晚期, 门静脉血中H₂S的含量与对照组相比均明显下降, 且随着肝硬化进程的发展, H₂S浓度逐渐降低。肝硬化早、中、晚期组CSE蛋白的表达以及CSE mRNA的表达与对照组相比均明显增加, 且随着肝硬化进程的发展, 表达逐渐增强。目前在肝脏研究中, 关于H₂S的表达并不一致。如于宏伟 *et al*^[10]在结扎大鼠肝动脉诱发肝细胞病变的实验中发现, 随着肝动脉结扎时间延长, 血清中H₂S浓度随结扎时间延长呈现曲线变化, 即肝组织在缺血缺氧初期H₂S浓度降低, 当缺血缺氧加重时H₂S增加, 而肝细胞出现核溶解或固缩, 肝细胞失去调节和被调节能力时H₂S浓度又再次降低。然而对于H₂S在肺纤维化发病机制的研究中, CSE/H₂S也显示了不同的变化: 造模第7天CSE酶活性及血浆H₂S含量一致降低, 第28天时, CSE酶活性恢复至正常, 而H₂S含量明显高于对照组, 但是CSE mRNA的含量均是明显升高^[11]。

我们推测: 在肝硬化时, 肝血管重构使肝组织缺血缺氧, 而内源性H₂S作为气体信号分子首先被消耗, 为维持内环境的稳定, 降低门静脉高压, 减轻血管阻力, 肝组织需要产生更多的内源性H₂S, 可能CSE mRNA的持续高表达在翻译水平促进了CSE蛋白的合成, 进而补充机体对于H₂S的需要, 这种CSE的增加可能是机体的一种自我保护机制。有研究显示, H₂S通过下调凋亡抑制因子Bcl-2及NF-κB水平, 激活效应因子

Caspase-3而促进血管平滑肌细胞凋亡^[12-13];也通过ERK/MAPK通路抑制细胞核增生抗原的表达,增强P21Cip/WAK-1而发挥抑制血管内皮细胞肿胀和平滑肌细胞增殖的作用^[14-18];通过抑制肺小型、中型肌性动脉中I、III型前胶原mRNA和TIMP-1 mRNA表达来降低I、III型胶原蛋白的含量^[19]。同时,H₂S也抑制了弹性蛋白的合成^[20]。凡此种种,H₂S抑制了血管重建,保护了血管。至于CSE mRNA如何被调控,以及CSE/H₂S与其他气体信号分子之间有无相互调节作用,均有待于进一步的研究证实。

总之,内源性CSE/H₂S体系参与了大鼠肝硬化的发病过程,并表现出了对于肝脏血流的重要调节作用,H₂S在肝脏及其他脏器呈现出来的功能可能会在治疗各种机体功能紊乱方面开启一条光明的道路。

4 参考文献

- 1 La Villa G, Gentilini P. Hemodynamic alterations in liver cirrhosis. *Mol Aspects Med* 2008; 29: 112-118
- 2 郑勇, 李睿, 孙侃, 常向云, 周婷, 王吉耀. 肝硬化患者一氧化氮、一氧化碳浓度与门静脉压力的关系. *中华消化杂志* 2006; 26: 424-425
- 3 Geng B, Yang J, Qi Y, Zhao J, Pang Y, Du J, Tang C. H₂S generated by heart in rat and its effects on cardiac function. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313: 362-368
- 4 Hosoki R, Matsuki N, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 237: 527-531
- 5 严家春, 陈文笔, 马勇, 孙新华. 试论肝硬变的组织病理学分期. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 841-844
- 6 Ali MY, Ping CY, Mok YY, Ling L, Whiteman M, Bhatia M, Moore PK. Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide? *Br J Pharmacol* 2006; 149: 625-634
- 7 Chunyu Z, Junbao D, Dingfang B, Hui Y, Xiuying T, Chaoshu T. The regulatory effect of hydrogen sulfide on hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 302: 810-816
- 8 Fiorucci S, Antonelli E, Mencarelli A, Orlandi S, Renga B, Rizzo G, Distrutti E, Shah V, Morelli A. The third gas: H₂S regulates perfusion pressure in both the isolated and perfused normal rat liver and in cirrhosis. *Hepatology* 2005; 42: 539-548
- 9 Dawe GS, Han SP, Bian JS, Moore PK. Hydrogen sulphide in the hypothalamus causes an ATP-sensitive K⁺ channel-dependent decrease in blood pressure in freely moving rats. *Neuroscience* 2008; 152: 169-177
- 10 于宏伟, 邓勇, 樊海宁, 张伟. 结扎大鼠肝动脉血清内源性硫化氢和一氧化氮浓度变化的研究. *青海医学院学报* 2007; 28: 92-95
- 11 李虹, 刘新民, 耿彬, 潘春水, 齐永芬, 吴胜英, 唐朝枢. 新型气体信号分子硫化氢在大鼠肺纤维化发病中的作用. *北京大学学报(医学版)* 2006; 38: 140-145
- 12 Sodha NR, Clements RT, Feng J, Liu Y, Bianchi C, Horvath EM, Szabo C, Sellke FW. The effects of therapeutic sulfide on myocardial apoptosis in response to ischemia-reperfusion injury. *Eur J Cardiothorac Surg* 2008; 33: 906-913
- 13 Oh GS, Pae HO, Lee BS, Kim BN, Kim JM, Kim HR, Jeon SB, Jeon WK, Chae HJ, Chung HT. Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor-kappaB via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Free Radic Biol Med* 2006; 41: 106-119
- 14 de Lima VM, Oliveira CP, Alves VA, Chammas MC, Oliveira EP, Stefano JT, de Mello ES, Cerri GG, Carrilho FJ, Caldwell SH. A rodent model of NASH with cirrhosis, oval cell proliferation and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2008; 49: 1055-1061
- 15 Li X, Du J, Jin H, Tang X, Bu D, Tang C. The regulatory effect of endogenous hydrogen sulfide on pulmonary vascular structure and gasotransmitters in rats with high pulmonary blood flow. *Life Sci* 2007; 81: 841-849
- 16 李晓惠, 杜军保, 唐朝枢. 硫化氢供体对高肺血流性肺动脉高压大鼠肺血管结构及血管活性多肽的影响. *中国医学科学院学报* 2006; 28: 159-163
- 17 Li XH, Du JB, Bu DF, Tang XY, Tang CS. Sodium hydrosulfide alleviated pulmonary vascular structural remodeling induced by high pulmonary blood flow in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27: 971-980
- 18 Jeong SO, Pae HO, Oh GS, Jeong GS, Lee BS, Lee S, Kim du Y, Rhew HY, Lee KM, Chung HT. Hydrogen sulfide potentiates interleukin-1beta-induced nitric oxide production via enhancement of extracellular signal-regulated kinase activation in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 345: 938-944
- 19 Hongfang J, Cong Bailin, Zhao Bin, Zhang Chunyu, Liu Xinmin, Zhou Weijin, Shi Ying, Tang Chaoshu, Junbao D. Effects of hydrogen sulfide on hypoxic pulmonary vascular structural remodeling. *Life Sci* 2006; 78: 1299-1309
- 20 赵斌, 杜军保, 刘新民, 张春雨, 王聪, 王海英. 硫化氢抑制低氧性肺动脉高压大鼠肺动脉弹力蛋白的表达. *中国药理学通报* 2004; 20: 985-988

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

食管破裂的影像学表现

王勇, 邓先波, 江科, 王孝英

■背景资料

由于食管特殊的解剖结构和位置关系, 食管破裂穿孔后如不及时处理, 消化液和微生物可通过食管裂口外溢, 可发生胸腔/腹腔急性化脓性感染、脓毒血症、感染性休克等严重并发症。迅速准确的诊断, 是成功救治的关键。

王勇, 邓先波, 王孝英, 华中科技大学同济医学院附属协和医院放射科 湖北省武汉市 430022

江科, 华中科技大学同济医学院附属协和医院胸外科 湖北省武汉市 430022

作者贡献分布: 课题设计由王勇与王孝英共同完成; 图片收集由邓先波协助完成; 论文写作及修改由王勇、王孝英及江科完成。

通讯作者: 王勇, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院放射科。

yongwangtom@tom.com

电话: 027-62483862

收稿日期: 2008-11-22 修回日期: 2008-12-18

接受日期: 2008-12-22 在线出版日期: 2009-01-28

Imaging presentations of esophageal perforation

Yong Wang, Xian-Bo Deng, Ke Jiang, Xiao-Ying Wang

Yong Wang, Xian-Bo Deng, Xiao-Ying Wang, Department of Radiology, the Affiliated Wuhan Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Ke Jiang, Department of Thoracic Surgery, the Affiliated Wuhan Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Correspondence to: Yong Wang, Department of Radiology, the Affiliated Wuhan Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. yongwangtom@tom.com

Received: 2008-11-22 Revised: 2008-12-18

Accepted: 2008-12-22 Published online: 2009-01-28

Abstract

AIM: To illustrate imaging presentations related to esophageal perforation and their significance for therapeutic decisions.

METHODS: We studied 21 patients with suspected esophageal injury from June 2002 to October 2008 at our hospital. Ten patients underwent standard chest radiography and 2 patients were submitted to cervical plain film, while 11 patients with suspected esophageal perforation were submitted to gastrografin swallow study (7 with iodine and 4 with barium). Nine patients underwent row spiral CT examination (2 with enhancement). Imaging presentations were compared and analyzed.

RESULTS: Chest radiography ($n = 10$) revealed

hydropneumothorax in 4/10 and pleural effusions in 4/10, and pulmonary infection were observed in 3/10; Changes of mediastinum were seen in 7/10 patients, pneumomediastinum in 3 cases, mediastinum widen in 3 cases, and air-fluid level in 1 case. Subcutaneous emphysema in the neck, chest was noted in 4/10. Esophagography ($n = 11$) demonstrated contrast medium extravasation in 9/11, indicating a submucosal contrast medium collection in 4/11, except for 2 cases with negative finding. Enhanced CT scans ($n = 9$) revealed periesophageal air and fluid collections with irregular soft tissue masses in 5/11 patients, thicken wall with typical localization in 4/11, abscess formation in mediastinum or under diaphragm in 4/11. Contrast-enhanced CT ($n = 2$) demonstrated abscess formation with contrast enhancement of the margins.

CONCLUSION: Esophagography and CT examination are the main diagnosis methods for suspected esophageal perforation. CT findings of inflammatory reaction for esophageal perforation are especially important for surgical treatment.

Key Words: Esophagus; Perforation; Radiology; Diagnosis

Wang Y, Deng XB, Jiang K, Wang XY. Imaging presentations of esophageal perforation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(3): 312-315

摘要

目的: 探讨食管破裂的影像学表现及不同影像学检查对于临床治疗的意义。

方法: 搜集2002-06/2008-10我院21例临床诊断食管破裂的临床及影像学资料。其中胸部X线检查10例, 颈椎X线检查2例, 食道造影检查11例(其中碘水造影7例, 钡剂造影4例), 9例患者接受螺旋CT扫描(其中2例增强扫描)。分析患者的综合影像学表现。

结果: 10例胸片, 发现液气胸4例, 胸腔积液4例, 3例合并肺部感染; 7例出现纵隔改变, 其

■同行评议者

肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室

中纵隔气肿3例,纵隔增宽3例,纵隔内气液平面1例;4例出现颈、胸壁皮下气肿。2例颈椎侧位片中,1例提示颈前区软组织增厚,另1例发现颈部含液气平面囊腔。11例食管造影检查中,除2例碘剂造影阴性外,9例均表现造影剂溢出食管外;4例显示黏膜下造影剂积聚。9例CT检查,5例显示破裂区食管周围可见不规则软组织影,内呈气体或液体混杂密度,4例显示食管壁局限不规则增厚,4例显示纵隔或膈下脓肿形成;2例增强CT提示脓肿形成,脓肿壁环行强化。

结论:食管造影检查及CT检查是诊断食管破裂的主要影像学手段,而通过CT观察组织炎性改变对于外科治疗方式的选择尤为重要。

关键词:食管;破裂;放射学;诊断

王勇,邓先波,江科,王孝英.食管破裂的影像学表现.世界华人消化杂志 2009; 17(3): 312-315
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/312.asp>

0 引言

由于食管特殊的解剖结构和位置关系,食管破裂穿孔后如不及时处理,消化液和微生物可通过食管裂口外溢,可发生胸腔/腹腔急性化脓性感染、脓毒血症、感染性休克等严重并发症。尽管外科技术和综合治疗不断进步,病死率仍高达19.7%^[1]。迅速准确的诊断,是成功救治的关键。本文回顾分析21例食管破裂患者的综合影像学表现,探讨食管破裂的影像学表现和各种影像学检查方法的临床应用价值。

1 材料和方法

1.1 材料 搜集我院2002-06/2008-10临床诊断食管破裂的患者资料,共21例。其中,男13例,女8例,年龄2-70(平均年龄45.0)岁。

1.2 方法 21例患者中,胸部X线检查10例,颈椎平片检查2例,食道造影检查11例(碘水造影7例,钡剂造影4例)。9例患者采用Somatom plus 4及Somatom Sensation 16型CT机,行常规胸腹CT扫描,其中2例行增强扫描。对患者的综合影像学表现进行分析。

2 结果

根据食管破裂病因分为5类,自发性食管破裂3例,医源性5例,异物9例,病理性3例(其中食管癌2例,肺癌1例),外伤1例(锐器穿通伤)。根据食管破裂部位分,颈段3例,胸段15例,腹段3例。

10例摄全胸正位片,除1例胸片表现正常外,发现液气胸4例,胸腔积液4例,其中3例合并肺部感染;6例出现纵隔改变,其中纵隔气肿3例,纵隔增宽2例,纵隔内气液平面1例;4例出现颈部、胸腹壁广泛皮下气肿(图1)。2例摄取颈椎侧位片,1例提示颈前区软组织增厚,另1例发现颈部含液气平面囊腔。11例食管造影检查中,除2例碘剂造影阴性外,9例表现造影剂溢出食管外,4例显示黏膜下造影剂积聚(图2)。9例CT检查,5例显示破裂区食管周围不规则软组织块影,内呈气体或液体混杂密度,4例显示食管壁局限不规则增厚(含食管癌1例),其中2例增强检查脓肿壁显著环形强化。2例异物导致食管破裂,CT均清晰显示异物位置、形态(图3-4)。

3 讨论

食管破裂常见病因包括:(1)医源性损伤;(2)自发性食管破裂(Boerhaave综合征);(3)外伤;(4)食管异物,包括腐蚀性食管炎;(5)食管内在疾患,如肿瘤、憩室、贲门失弛缓症和溃疡等。本组病例中仍以食管异物最为常见(9/21),医源性损伤次之(5/21),自发性食管破裂并不少见(3/21),与病理性食管破裂发生数相当(3/21)。值得一提的是,随着胃镜和经食道心脏彩超检查的普及,食管腔内成形术和心脏射频消融术的广泛应用,医源性损伤有逐渐增多的趋势。本组5例中,1例为内镜下曲张静脉凝胶注射引起,2例为食管狭窄球囊扩张术后,另2例有外科相关手术史。

食管破裂典型临床症状包括呕吐、胸痛和皮下气肿,而本组多数食管破裂患者症状体征并不典型,如发热、咳嗽、胸闷、气喘、呕血、吞咽困难,临床误诊率高,易与气胸、胸膜炎、肺部感染、急性心肌梗塞、主动脉夹层、急性胰腺炎等疾病相混淆。本组除2例医源性,1例异物性,1例自发性,1例外伤性食管破裂外,其余16例均为发病48 h后明确诊断。而综合研究表明食管破裂时间超过24 h,手术修补成功率明显降低,治疗周期明显延长,死亡率明显增加^[2]。因而及时准确的诊断是成功治愈的关键。

作为急诊首选影像学检查方法,X线摄影简便快捷,可全面观察呼吸和循环状况。食管破裂X线征象可概括为:(1)纵隔气肿及皮下气肿;(2)纵隔增宽及纵隔内液气平面;(3)胸腔积液;(4)液气胸;(5)肺不张及肺炎。上述征象缺乏特异性,无法明确诊断,且10%以上病例会出现假阴性^[3]。颈椎侧位检查对怀疑颈段食管破裂患者意义较

■创新盘点

本文回顾分析食管破裂的综合影像学表现(应用要点),侧重评价不同检查方法临床应用价值。

■应用要点

食管破裂穿孔病情凶险,临床误诊率高,影像学检查是诊断食管破裂的重要方法。

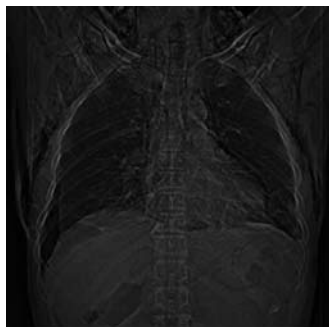


图 1 自发性食管破裂, 气胸, 纵隔气肿, 左侧胸腔积液及颈胸壁广泛皮下气肿。



图 2 医源性食管破裂, 钡剂造影显示食管下端造影剂外溢。

大, 本组2例颈段食管破裂患者行颈椎侧位检查均有阳性发现, 颈前软组织肿胀或咽后间隙增宽均提示脓肿形成。

食管造影检查是目前临床确诊的主要手段, 可明确食管裂口的部位, 但常无法准确显示破裂穿孔的大小范围。碘水造影由于吸收迅速, 不会加重纵隔或腹膜炎症反应, 对于重症患者, 不会产生误吸窒息危险而较钡剂造影使用更为广泛。但碘密度低, 排空迅速, 黏膜涂布差, 显影质量不如钡剂。本组中2例碘水造影未发现食管破裂, 1例重复行钡剂造影发现, 1例经CT扫描确诊。文献报道, 约25%-50%食管破裂病例, 碘水造影无法确诊或呈阴性结果^[4]; 而使用钡剂造影即使少量钡剂溢入纵隔亦不会产生严重不良后果^[5], 因而对于临床高度怀疑而碘水造影无法确定的食道破裂患者, 可考虑重复行钡剂造影。

食管破裂穿孔时, CT典型表现为破裂区食管周围可见不规则软组织块影, 内见气体或液体积聚; 局部食管管壁不规则增厚^[6]。与食道造影检查相比, CT空间和密度分辨率高, 对于脂肪间隙中的小气泡和包裹积液内的少量气体, CT不宜遗漏病变, 延误诊断; 对于管腔外液体、血肿或脓肿鉴别, CT更具有无可比拟的优势。此外CT可清晰显示食管周围、纵隔及胸腔积液性质及范围, 是否合并肺部感染或胸膜增厚, 是否脓肿形成, 指导临床合理选择手术或综合治疗方案。

根据不同食管破裂部位, 起源及病因, 应选择不同检查方法。怀疑食管异物引起食管破裂, 应首选CT检查。因为CT对食管异物敏感性和特

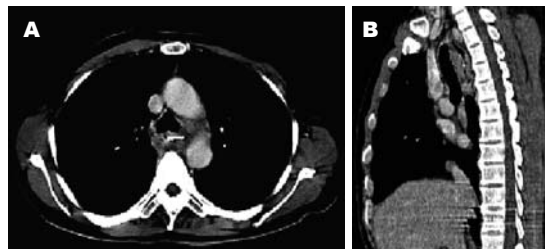


图 3 食管异物致食管破裂CT. A: 食管异物致食管破裂, 食管周围软组织密度, 内含气体低密度影, 食管异物(鱼刺)清晰显示; B: CT矢状位重建显示食管壁局限不规则增厚。

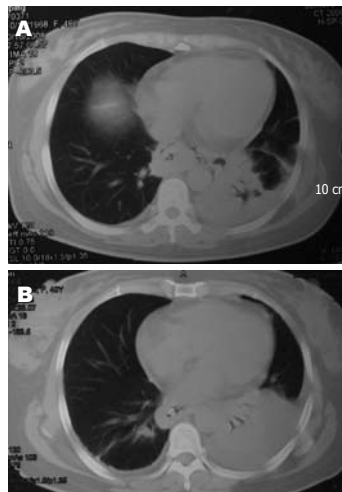


图 4 医源性食管破裂CT. A: 食管周围软组织密度影, 周边可见簇状分布小气泡, 伴有左侧胸腔积液及左下肺不张; B: 保守治疗后1 wk复查, 气体密度影消失, 左下肺不张及左侧胸腔积液范围增加。食管内可见胃肠减压管影。

异性高^[7], 可清晰显示异物位置、形态、大小; 此外通过多平面重组技术可同时获得横轴位、冠状位、矢状位影像, 判断异物与气管、血管毗邻关系。本组中1例尖锐异物穿通主动脉弓形成囊状动脉瘤通过CT多平面重组技术发现, 为临床治疗提供帮助。而对于术后或外伤患者, 胸腔外气体、液体积聚则无法判断食管破裂是否最近发生或持续存在, 此类患者应选择食管造影检查。

食管破裂为临床急症, 及时准确的诊断是成功救治的关键, 需结合临床病史, 根据穿孔病因、部位、类型, 选择CT或食管造影检查。CT扫描对于炎症反应程度评估, 指导临床治疗意义重大。

4 参考文献

- 1 Huber-Lang M, Henne-Bruns D, Schmitz B, Wuerl P. Esophageal perforation: principles of diagnosis and surgical management. *Surg Today* 2006; 36: 332-340
- 2 Eroğlu A, Can Kürkcüoğlu I, Karaoganoğlu N, Tekinbaş C, Yılmaz Ö, Başoğlu M. Esophageal perforation: the importance of early diagnosis and primary repair. *Dis Esophagus* 2004; 17: 91-94
- 3 Han SY, McElvein RB, Aldrete JS, Tishler JM. Perforation of the esophagus: correlation of site and cause with plain film findings. *AJR Am J Roentgenol* 1985; 145: 537-540
- 4 Rubesin SE, Levine MS. Radiologic diagnosis of

- gastrointestinal perforation. *Radiol Clin North Am* 2003; 41: 1095-1115, v
- 5 Buecker A, Wein BB, Neuerburg JM, Guenther RW. Esophageal perforation: comparison of use of aqueous and barium-containing contrast media. *Radiology* 1997; 202: 683-686
- 6 de Lutio di Castelguidone E, Merola S, Pinto A, Raissaki M, Gagliardi N, Romano L. Esophageal injuries: spectrum of multidetector row CT findings. *Eur J Radiol* 2006; 59: 344-348
- 7 Marco De Lucas E, Sádaba P, Lastra García-Barón P, Ruiz-Delgado ML, González Sánchez F, Ortiz A, Pagola MA. Value of helical computed tomography in the management of upper esophageal foreign bodies. *Acta Radiol* 2004; 45: 369-374

■同行评价

本文对比分析了食管破裂的不同影像学检查表现, 有一定临床价值。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

世界华人消化杂志修回稿须知

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。(常务副总编辑: 张海宁 2009-01-28)

骶骨胃肠间质瘤的临床病理学特点、克隆性及*c-kit*基因突变分析

巩丽, 赵建业, 李艳红, 张力, 韩秀娟, 刘小艳, 朱少君, 张伟

■背景资料

GIST是胃肠道常见的一种间叶性肿瘤。GIST大部分来自于胃(39%)、小肠(32%)和大肠(15%),极少数发生于胃肠外。本文就1例发生于骶骨GIST的罕见病例,探讨其组织病理学特点和*c-kit*基因突变情况,以期能够为病理医生在诊断发生于骨且其他免疫学表型特征不明显的梭形细胞肿瘤时提供一定的理论依据。同时,对其进行了克隆性检测,以进一步证明其肿瘤性本质。

巩丽, 赵建业, 张力, 韩秀娟, 刘小艳, 朱少君, 张伟, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院病理科 陕西省西安市 710038

李艳红, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院妇产科 陕西省西安市 710038

国家自然科学基金资助项目, No. 30171052

作者贡献分布: 此课题由巩丽及张伟设计; 研究过程由巩丽, 赵建业, 李艳红, 张力, 韩秀娟, 刘小艳, 朱少君操作完成; 数据分析由巩丽, 赵建业及张伟完成; 本论文写作由巩丽完成。

通讯作者: 张伟, 710038, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院病理科. zhwllyh@fmmu.edu.cn

电话: 029-84777467

收稿日期: 2008-11-19 修回日期: 2008-12-03

接受日期: 2008-12-08 在线出版日期: 2009-01-28

Clinicopathological observation, clonal status and *c-kit* gene mutation of gastrointestinal stromal tumor in sacrum

Li Gong, Jian-Ye Zhao, Yan-Hong Li, Li Zhang, Xiu-Juan Han, Xiao-Yan Liu, Shao-Jun Zhu, Wei Zhang

Li Gong, Jian-Ye Zhao, Li Zhang, Xiu-Juan Han, Xiao-Yan Liu, Shao-Jun Zhu, Wei Zhang, Department of Pathology, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University of the Chinese PLA, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China

Yan-Hong Li, Department of Gynecology and Obstetrics, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University of the Chinese PLA, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30171052

Correspondence to: Dr. Wei Zhang, Department of Pathology, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University Chinese PLA, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China. zhwllyh@fmmu.edu.cn

Received: 2008-11-19 Revised: 2008-12-03

Accepted: 2008-12-08 Published online: 2009-01-28

Abstract

AIM: To elucidate the clinicopathological features, *c-kit* gene mutation and clonal status of gastrointestinal stromal tumor that occurs in sacrum.

METHODS: After the sample was confirmed by histopathology and immunohistochemistry, genomic DNA was isolated from the lesions and the surrounding fibrous connective tissue

as control. Then, direct PCR sequencing was used to investigate the mutation status of *c-kit* gene exons 9, 11, 13, 17. Moreover, a clonality assay was examined based on X-chromosomal inactivation mosaicism in female somatic tissues and polymorphism of phosphoglycerate kinase (PGK) and androgen receptor (AR) genes.

RESULTS: Microscopically, the sample showed typical histological characteristics. Lesions were composed of spindle cells arranged in cords, knit and whirlpool patterns. The cytoplasm of tumor cells was abundant, and the nuclei were stafflike or fusiform. Mitosis figure was rare. Immunohistochemically, the tumor cells showed positive reactions for CD117 and CD34. On mutation analysis, the *c-kit* gene mutation was found in exon 11. The result of clonal analysis demonstrated that GIST was monoclonal.

CONCLUSION: GIST is a neoplastic lesion. It is very rare that GIST occurs in sacrum. It is difficult to differentiate from other spindle cell tumors, so it should be diagnosed by immunohistochemistry, and confirmed by the examination of *c-kit* gene amplification and sequencing.

Key Words: Gastrointestinal stromal tumor; Sacrum; *C-kit*; Clonality

Gong L, Zhao JY, Li YH, Zhang L, Han XJ, Liu XY, Zhu SJ, Zhang W. Clinicopathological observation, clonal status and *c-kit* gene mutation of gastrointestinal stromal tumor in sacrum. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(3): 316-320

摘要

目的: 探讨发生于骶骨的胃肠间质瘤(gastrointestinal stromal tumor, GIST)的临床病理学特点、*c-kit*基因突变情况及克隆性。

方法: 手术切除标本经常规HE染色和免疫组化染色观察确诊后,应用显微切割技术分离病变及病变周围纤维结缔组织,提取基因组DNA,再进行*c-kit*基因外显子9、11、

■同行评议者

田晓峰, 教授, 大连医科大学附属第二医院普外科

13和17的PCR扩增和测序。同时利用女性X染色体失活的嵌合性和磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase, PGK)和雄激素受体(androgen receptor, AR)基因位点的多态性进行克隆性检测。

结果: 光镜下瘤细胞主要为梭形, 呈束状、编织状或旋涡状排列; 胞质丰富, 嗜酸性或中性; 细胞核杆状或长梭形, 核分裂像罕见。免疫组化标记瘤细胞表达CD117和CD34强阳性。PCR产物直接测序检测揭示*c-kit*基因外显子11有突变发生, 而外显子9、13和17均无突变。克隆性检测结果示GIST为单克隆性病变。

结论: GIST是肿瘤性病变; 发生于骶骨的GIST的诊断需要通过免疫组化来确诊, 并行*c-kit*基因扩增的检测以及测序进一步证实。

关键词: 胃肠间质瘤; 骶骨; *c-kit*基因; 克隆性

巩丽, 赵建业, 李艳红, 张力, 韩秀娟, 刘小艳, 朱少君, 张伟. 骶骨胃肠间质瘤的临床病理学特点、克隆性及*c-kit*基因突变分析. 世界华人消化杂志 2009; 17(3): 316-320
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/316.asp>

0 引言

胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumors, GIST)是胃肠道最常见的间叶源性肿瘤, 起源于表达*c-kit*(CD117)的Cajal间质细胞^[1], 被认为是一种胃肠道原发性、非上皮性、非淋巴性、非平滑肌和非神经鞘瘤的肿瘤。其中, 胃(60%-70%)、小肠(20%-25%)、直肠和食管约5%, 极少部分见于十二指肠甚至腹腔内的网膜、肠系膜^[2]。但发生于骨的GIST极其罕见, 我们查阅PubMed数据库和中国学术期刊全文数据库, 仅有1例发生于骶区的GIST转移至脑的报道^[3]。因此, 我们就1例发生于骶骨GIST的罕见病例, 探讨其组织病理学特点和*c-kit*基因突变情况, 以期能够为病理医生在诊断发生于骨且其他免疫学表型特征不明显的梭形细胞肿瘤时提供一定的理论依据。同时, 对其进行了克隆性检测, 以进一步证明其肿瘤性本质。

1 材料和方法

1.1 材料 患者, 女, 50岁。左下肢疼痛3 mo, 大便困难1 mo。患者于3 mo前无明显诱因自感左下肢疼痛, 不伴有肿胀、麻木, 无活动受限。至当地医院就诊, 诊断为“腰椎间盘突出症”。给予对症治疗(具体不详), 症状无明显缓解。后左下肢疼痛反

复发作。1 mo前无明显诱因出现大便困难, 无便血、肛周疼痛, 服用“番泻叶”后缓解。现再次出现大便困难, 为求进一步诊治, 遂来我院就诊。X线示: 骶骨病变。并行CT检查。专科查体: 骶尾部无明显压痛及扣击痛, 局部无包块, 浅静脉怒张, 皮温正常。左小腿外侧及左足背浅感觉减退, 双下肢肌力正常, 会阴部浅感觉尚可。术中所见: S1椎体有软组织包块, 质软, 色暗红。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学: 应用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶(SP)试剂盒(KIT9730, 福州迈新生物技术开发有限公司), 按厂家说明书进行。所用第一抗体包括针对CD34、结蛋白(Desmin)、神经特异性烯醇化酶(NSE)、神经纤维(NF)的鼠抗人mAb和CD117、S-100蛋白、平滑肌肌动蛋白(SM-actin)及HMB45的兔抗人多克隆抗体以及波形蛋白(vimentin)的鼠抗猪mAb。以上试剂均购自迈新公司。

1.2.2 激光显微切割和DNA提取: 所送标本石蜡包埋后制备10 μm切片8张, 黏附在激光纤维切割仪专用的切片上, 并将组织裱在有膜的一面。HE染色后, 将切片(表有组织的一面朝下)固定在显微镜下并确定好所需要的病变, 即可进行切割, 切割的样本通过重力作用会自动落入选择好的收集管。同时, 取肿瘤周围软组织作为参照样本, 然后再利用QIAamp DNA提取试剂盒(Qiagen GmbH, Germany)按照说明书提取基因组DNA。

1.2.3 PCR扩增和测序: 选择*c-kit*基因外显子9、11、13和17的寡核苷酸引物用于PCR扩增, 序列见表1。PCR循环参数: 95℃预变性2 min, 95℃变性30 s, 退火40 s, 72℃延伸30 s, 共35次, 最后72℃延伸5 min。PCR产物送上海生物工程有限公司纯化并测序。

1.2.4 克隆性检测: 磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase, PGK)和雄激素受体(androgen receptor, AR)位点的克隆性检测参照以前的方法进行^[4]。即PGK基因多态性表现为在甲基化位点下游有一个可以被*Bst* XI识别的单核苷酸多态性位点, 可经琼脂糖凝胶电泳显示^[5]。AR基因多态性表现为其第一外显子的CAG串联重复序列(short-tandem repeat, STR)的长度不同, 即(CAG)_n的*n*值有差别(11-31), 通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳显示^[6]。具有多态性位点的女性个体中正常和多克隆增生的组织显示两条带, 而肿瘤性病变仅显示1条带或以1条带为主^[7]。电

■创新盘点

本文报道了1例罕见部位的GIST, 并且利用免疫组化染色技术、*c-kit*基因的扩增以及突变位点的检测进一步证实了GIST的诊断, 同时分析了其克隆性, 明确了其性质。

■应用要点

GIST的分子靶向治疗药物是格列卫, 罕见部位GIST的明确诊断有助于患者得到及时有效的治疗, 对于挽救患者的生命和提高生活质量具有重要的意义。

表 1 *c-kit*基因寡核苷酸引物序列、PCR产物大小和退火温度

<i>c-kit</i> 外显子	序列(5'-3')	PCR产物大小(bp)	退火温度(°C)
9(F)	5'-TCC TAG AGT AAG CCA GGG CTT T-3'	283	56
9(R)	5'-TGG TAG ACA GAG CCT AAA CAT CC-3'		
11(F)	5'-CTG AGA CAA TAA TTA TTA AAA GGT GA-3'	227	60
11(R)	5'-TTA TGT GTA CCC AAA AAG GTG ACA-3'		
13(F)	5'-GCT TGA CAT CAG TTT GCC AG-3'	193	60
13(R)	5'-AAA GGC AGC TTG GAC ACG GCT TTA-3'		
17(F)	5'-TAC AAG TTA AAA TGA ATT TAA ATG GT-3'	228	56
17(R)	5'-AAG TTG AAA CTA AAA ATC CTT TGC-3'		



图 1 患者CT检查.

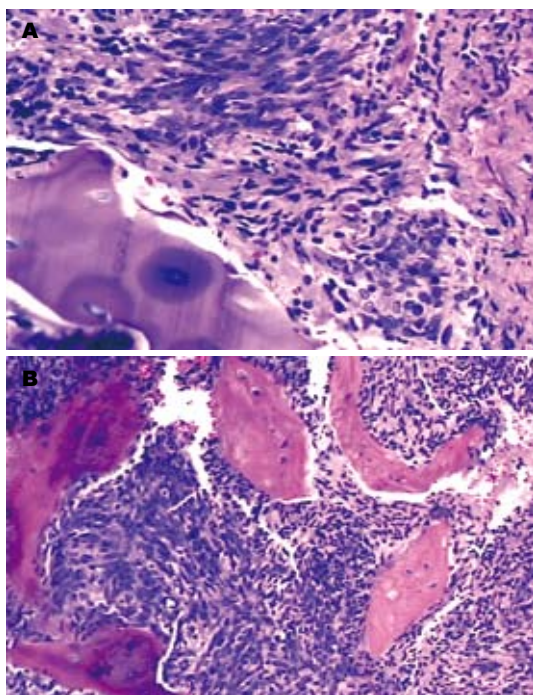


图 2 在光镜下骶骨胃肠间质瘤的临床病理学特点.

泳结果观察分别用UVP凝胶分析系统(UVP, Cambridge, UK)和光学照相记录数据, 用相应软件(LabWorksTM, UVP)比较*Hpa* II或*Hha* I消化前后一对等位基因扩增产物的强度差异, 其中1条带可比强度减弱达50%以上时才被认为有意义, 即X染色体失活嵌合性丢失^[8].

2 结果

2.1 患者CT检查结果 CT示骶1椎体一类圆形低密度影, 境界相对清楚(图1).

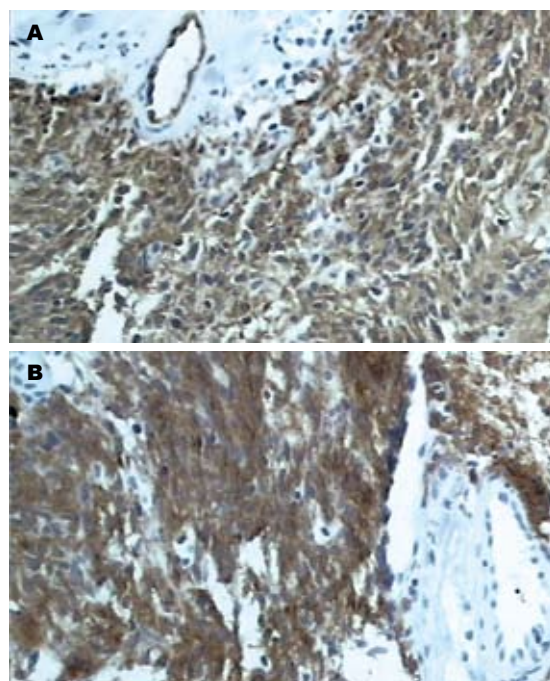


图 3 免疫组化标记瘤细胞表达. A: CD34; B: CD117.

2.2 病理学观察 灰红、灰白不规则组织一堆. 总体积4 cm×2.5 cm×0.5 cm, 切面灰白, 质中. 光镜下瘤细胞主要为梭形, 呈束状、编织状或漩涡状排列, 胞质丰富, 嗜酸性或中性; 细胞核杆状或长梭形, 核分裂像少见(图2). 免疫组化标记瘤细胞表达CD34(图3A)、CD117(图3B)和Vimentin, 不表达Desmin、SM-actin、SC-actin、NSE、NF、HMB45和S-100.

2.3 *c-kit*基因外显子9、11、13和17的PCR扩增和突变的检测 *c-kit*基因外显子9、11、13和17 PCR产物经2 g/L琼脂糖电泳结果显示, 在283 bp、227 bp、193 bp和228 bp处均有1条带(图4), 进一步证实了病变为GIST的诊断. 另外, 除*c-kit*基因外显子11经PCR直接测序检测揭示有突变外, 即103 bp处开始有12 bp(AAC AAC CTT CCA)的缺失, 余外显子9、13和17均无突变.

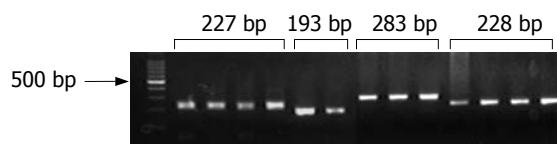


图 4 c-kit基因的琼脂糖电泳结果.

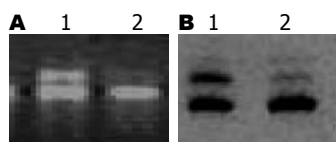


图 5 PGK和AR基因位点的凝胶电泳图. 1: 酶切前; 2: 酶切后; A: PGK基因; B: AR.

2.4 克隆性检测 所有检测组织在PGK和AR位点的凝胶电泳图上均表现为2条带, 有多态性. 其中肿瘤组织经限制性内切酶Hpa II和Hha I酶切后上带均消失, 只保留下带(图5), 均显示出X染色体失活嵌合性丢失, 证明为肿瘤性病变. 而周围纤维结缔组织在酶切前后两条带密度无明显改变. 这表明, 所有肿瘤组织均为单克隆性病变.

3 讨论

GIST是胃肠道常见的一种间叶性肿瘤. 国外文献报道每年发病约为10-20/100万, 多发生在40岁以上, 儿童罕见, 男女之比为3:1^[2]. GIST大部分来自于胃(39%)、小肠(32%)和大肠(15%), 极少数发生于胃肠外. 而发生于骨的更为罕见, 仅有1例发生于骶区的GIST转移至脑的报道^[3].

GIST的诊断主要依赖于组织病理学和免疫组化表型, 其中最主要的免疫组化特点就是肿瘤细胞CD117和CD34染色阳性. 根据文献报道, 大约90%-95%的GIST表达CD117, 60%-70%的GISTs表达CD34, 30%-40%的GIST表达SM-actin, 而只有5%的GISTs表达S-100蛋白^[9]. 当然, vimentin总是阳性的. 通过这些免疫组化特点, 即可与其他间叶性肿瘤, 如雪旺氏细胞瘤或平滑肌瘤相鉴别. 我们对此例也进行了详细的组织病理学观察和免疫组织化学染色, 除了具有典型的形态学特点外, 其肿瘤细胞还强表达CD117和CD34. 另外, 为了进一步证实病变的确为GIST, 我们还进行了c-kit基因四个外显子的扩增和突变的检测, 结果基因扩增及4个外显子的测序均成功, 所以上述的工作足以证明我们诊断的正确性. 关键的问题是他是原发的还是继发的. 当然, GIST发生于骨时, 应首先考虑胃肠道转移性或侵袭至骨. 此例经我们确诊后, 临床便进行了一系列全面的检查, 包括实质脏器的CT和MRI检查, 尤其是消化系统的电子内镜检查, 结果均未发现病灶. 那么, 是原发病灶消

失了还是骨原发的呢? 如果是原发的, 其起源又作何解释呢? 这都值得我们进一步探讨.

克隆性增生是多数肿瘤性病变的特征^[10], 通过克隆性分析技术, 即可判断一个病变的性质. PGK和AR位点的克隆性检测是基于女性体细胞组织的X染色体失活嵌合性, 即所有女性体细胞的2条X染色体中的一条在胚胎发育早期必须通过永久甲基化而随机灭活, 另一条保持遗传活性^[11]. PGK基因多态性表现为在甲基化位点下游有一个可以被Bst XI识别的单核苷酸多态性位点, 酶切后可经琼脂糖凝胶电泳显示^[5]. AR基因多态性表现为其第一外显子的CAG短串联重复序列(short-tandem repeat STR)的长度不同, 即重复次数有差别($n = 11-31$), 可通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳显示^[6]. 具有多态性位点的女性个体中正常组织以及反应性增生的组织都属于多克隆性细胞构成, 显示两条带. 而肿瘤性(单克隆)病变仅显示一条带或以一条带为主^[7].

GIST是近年提出的一种间叶性肿瘤, 关于其克隆起源, 文献上未见报道. 我们曾对1例发生于腹膜的多发性GIST进行了克隆性分析, 结果证明, GIST属于单克隆性, 多发性胃肠间质瘤起源相同, 即起源于同一个细胞^[12]. 此例克隆性检测结果与其一致, 从而进一步证实了其肿瘤性本质.

4 参考文献

- 1 Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, Miettinen M, O'Leary TJ, Remotti H, Rubin BP, Shmookler B, Sobin LH, Weiss SW. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Hum Pathol* 2002; 33: 459-465
- 2 Resorlu B, Baltaci S, Resorlu M, Kankaya D, Savas B. Coexistence of papillary renal cell carcinoma and gastrointestinal stromal tumor in a case. *Turk J Gastroenterol* 2007; 18: 47-49
- 3 Kaku S, Tanaka T, Ohtuka T, Seki K, Sawauchi S, Numoto RT, Murakami S, Komine K, Abe T. Perisacral gastrointestinal stromal tumor with intracranial metastasis. Case report. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2006; 46: 254-257
- 4 Gong L, Zhang W, Li YH, Li G, Zhu SJ, Tong X, Zhang YQ, Li HT, Su Q. [Fibrous dysplasia: molecular clonality analysis of 21 cases] *Zhonghua Binglixue Zazhi* 2007; 36: 592-595
- 5 Gilliland DG, Blanchard KL, Levy J, Perrin S, Bunn HF. Clonality in myeloproliferative disorders: analysis by means of the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 6848-6852
- 6 Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 1992; 51:

同行评价

本文书写规范, 层次清楚, 逻辑性强, 符合科学论文要求. 文章内容针对间质瘤性质进行了病理学特性的深入检测, 方法先进, 所得结果清晰, 图片清楚, 有较好的临床指导意义.

- 1229-1239
- 7 苏勤, 刘茜, 王淑芳. 基于X染色体基因多态性的克隆性分析技术及其应用. 中华病理学杂志 2002; 31: 162-164
- 8 王淑芳, 刘茜, 张伟, 刘节, 苏勤. 子宫平滑肌瘤的克隆性分析. 第四军医大学学报 2001; 22: 1576-1582
- 9 Rauf F, Bhurgri Y, Pervez S. Gastrointestinal stromal tumors: a demographic, morphologic and immunohistochemical study. *Indian J Gastroenterol* 2007; 26: 214-216
- 10 苏勤. 人肝细胞癌的癌前期病变. 诊断病理学杂志 2003; 10: 12-115
- 11 Lyon MF. X-chromosome inactivation and developmental patterns in mammals. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1972; 47: 1-35
- 12 巩丽, 张伟, 李艳红, 王旭霞, 朱少君, 韩秀娟, 苏勤. 多发性胃肠间质瘤的克隆性及其临床病理. 世界华人消化杂志 2007; 15: 3001-3005

编辑 史景红 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

世界华人消化杂志性质、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. (常务副总编辑: 张海宁 2009-01-28)

应用胃癌组织芯片研究RUNX3、VEGF与MVD的相关性及其意义

伏洁, 张煦, 王靖

伏洁, 张煦, 王靖, 兰州大学基础医学院病理学研究所 甘肃省兰州市 730000

作者贡献分布: 此实验研究由伏洁提供所用试剂, 分析数据并完成操作过程; 张煦设计指导, 王靖校对审核。

通讯作者: 张煦, 730000, 甘肃省兰州市, 兰州大学基础医学院病理研究所. zhangxu64@163.com

电话: 0931-8289565

收稿日期: 2008-10-18 修回日期: 2008-12-19

接受日期: 2008-12-22 在线出版日期: 2009-01-28

Correlation analysis among RUNX3, VEGF and MVD and their significance using gastric cancer tissue microarray

Jie Fu, Xu Zhang, Jing Wang

Jie Fu, Xu Zhang, Jing Wang, Institute of Pathology, College of Basic Medical Sciences of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Correspondence to: Xu Zhang, Institute of Pathology, College of Basic Medical Sciences of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. zhangxu64@163.com

Received: 2008-10-18 Revised: 2008-12-19

Accepted: 2008-12-22 Published online: 2009-01-28

Abstract

AIM: To investigate the expressions of human runt-related transcription factor 3 (RUNX3), vascular endothelial growth factor (VEGF) and microvascular density (MVD) using gastric cancer tissue microarray and their significance.

METHODS: Gastric cancer tissue microarray was prepared, and the expressions of RUNX3, VEGF and MVD were detected using immunohistochemistry in 80 gastric cancer cases proved pathologically.

RESULTS: RUNX3 expression was classified as negative 46.3% (37/80), weak positive 35.0% (28/80) and strong positive 18.7% (15/80) respectively; VEGF was strongly expressed in 47.5% (38/80), weakly in 30% (24/80) and negatively in 22.5% (18/80). A positive reaction was mainly distributed in cytoplasm. MVD was lower in the positive expression of RUNX3 than the negative expression; MVD in the positive

expression of VEGF was greater than the negative expression. The expression of RUNX3 was negatively correlated with MVD ($r_s = -0.742$, $P < 0.01$), and the expression of VEGF was positively correlated with MVD ($r_s = 0.683$, $P < 0.01$). The positive expression rates of VEGF increased gradually in negative expression and weak positive but decreased gradually in strong positive of RUNX3. The expression of RUNX3 was negatively correlated with VEGF ($r_s = -0.333$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: RUNX3 may inhibits the expression of VEGF by some mechanism and reduces the angiogenesis, growth, and metastasis of gastric cancer, combined detection of RUNX3, VEGF and MVD can estimate the biological behaviour and prognosis of the patients more exactly.

Key Words: Gastric cancer; Tissue microarray; Runt-related transcription factor 3; Vascular endothelial growth factor; Microvascular density

Fu J, Zhang X, Wang J. Correlation analysis among RUNX3, VEGF and MVD and their significance using gastric cancer tissue microarray. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(3): 321-325

摘要

目的: 探讨胃癌组织芯片中RUNX3、VEGF表达与MVD的相关性及其意义。

方法: 采用组织芯片技术建立经确证80例胃癌的组织芯片, 免疫组化检测芯片中RUNX3、VEGF的表达及微血管密度计数。

结果: RUNX3在胃癌芯片中表达阳性率分别为阴性46.3%(37/80)、弱阳性35.0%(28/80)和强阳性18.7%(15/80); VEGF的表达阳性率分别为阴性22.5%(18/80)、弱阳性30.0%(24/80)和强阳性47.5%(38/80), 其阳性表达部位为细胞质。MVD值RUNX3表达阳性者显著低于表达阴性者; VEGF表达阳性者显著高于表达阴性者, RUNX3的表达和MVD之间存在显著负相关($r_s = -0.742$, $P < 0.01$), VEGF的表达和

■背景资料

人类runt相关转录因子3(RUNX3)基因属于RUNT家族成员, 参与胚胎发育过程中细胞基因表达的调控。人类RUNT家族包括3个RUNT基因, 分别为RUNX1、RUNX2、RUNX3。其中RUNX3是最小的, 是哺乳动物RUNT家族进化的基础, 对其研究也是最早的。近年来研究发现, 在许多肿瘤中存在RUNX3基因的异常, 其抑癌机制尚不完全清楚, 可能作为TGF- β 传导通路中的一个重要环节, 参与TGF- β 上皮细胞生长的负调控作用。

■同行评议者

高泽立, 副教授, 上海交通大学医学院附属第九人民医院周浦分院消化科

■研究前沿

本研究提示RUNX3失活和VEGF激活在胃癌的进程中共同发挥作用,对于潜在机制的进一步研究,必将对胃癌的诊断和治疗带来新的启示。

MVD之间存在显著正相关($r_s = 0.683, P < 0.01$)。VEGF表达阳性率在RUNX3阴性组逐渐增高;在RUNX3弱阳性组逐渐增高,在RUNX3强阳性组逐渐降低, RUNX3的表达和VEGF之间存在显著的负相关($r_s = -0.333, P < 0.01$)。

结论: RUNX3作为一种抑癌基因可能通过某种机制抑制VEGF的表达减少胃癌的血管新生、生长和转移;联合检测RUNX3、VEGF和MVD的表达,对把握胃癌生物学行为和预后有一定的价值。

关键词: 胃癌; 组织芯片; 人类相关转录因子3; 血管内皮生长因子; 微血管密度

伏洁, 张煦, 王靖. 应用胃癌组织芯片研究RUNX3、VEGF与MVD的相关性及其意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(3): 321-325

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/321.asp>

0 引言

胃癌是一类多基因疾病, 癌基因的活化是促使肿瘤发生的关键因素之一, 但抑癌基因的失活在肿瘤发生、发展过程中可能起到更加常见、重要的作用^[1-3]。人类相关转录因子3(human runt-related transcription factor 3, RUNX3)是新发现的一个位于1号染色体(1p36.11-p36.13)^[4]的肿瘤抑制基因, 尤其在胃癌的发生发展过程中尤为重要^[1]。然而肿瘤血管生成受许多血管生成因子与抑制因子的调节, 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是最强有力的血管生成因子, 在血管新生中扮演至关重要的角色。二者与肿瘤浸润、转移及血管新生有密切关系, 在肿瘤的多步骤演进中起重要作用。其潜在的机制尚不清楚, 为证明RUNX3与VEGF之间的关系, 本实验采用组织芯片和超敏SP免疫组化法, 检测胃癌中RUNX3、VEGF的表达与微血管密度(microvascular density, MVD)的关系及意义。

1 材料和方法

1.1 材料 收集武威肿瘤医院2006-01/2007-12手术切除胃癌的蜡块80例, 术前未接受放疗和化疗。

1.2 方法

1.2.1 制作组织芯片: 复查HE切片, 在HE切片上找到肿瘤细胞伏击的区域并对照蜡块的位置作标记, 确定取材位点。用制备组织芯片的模具制作2 mm的空心蜡模, 用内径为2 mm的组织芯片取样器在蜡块的标记位点取出组织蜡芯, 将其

放入空心蜡模的孔中, 制成6×7组织微阵列并对组织芯片蜡块进行4 μm厚连续切片, 裱于APES防脱片预处理的载玻片上。

1.2.2 染色: 免疫组化均采用SP法, 切片经脱蜡、酒精水化、微波抗原热修复; 3%过氧化氢阻断后, 滴加稀释的一抗RUNX3(1:100)(北京博奥森公司)、VEGF和CD34(北京中杉公司), 4℃过夜后加二抗, DAB显色, 苏木素复染, 封片。以PBS代替一抗作阴性对照, 用已知阳性片作阳性对照。

1.2.3 结果判定: 在临床病理资料双盲的条件下, 分别由二位病理医师在芯片的实质区选取视野, 记数肿瘤细胞总数及阳性染色细胞所占比例, 独立判定结果, 最后讨论核实确认。RUNX3与VEGF的阳性表达为细胞质有棕褐色颗粒; 将阳性表达肿瘤细胞百分比≤10%记为阴性; 11%-50%记为弱阳性; >50%记为强阳性。

1.2.4 MVD测定: 采用CD34抗体标记血管内皮细胞, 低倍镜下选取微血管数量最密集视野, 在200倍视野范围计算3个视野的微血管数目, 取其平均值作为MVD。肿瘤区域凡是染成棕色的单个内皮细胞或内皮细胞簇, 均作为一个血管计数。

统计学处理 利用SPSS13.0 for Windows统计软件进行数据处理, MVD数值以mean±SD计算。采用 χ^2 检验和方差分析进行显著性比较, 采用Spearman等级相关和分类数据相关分析。 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 RUNX3和VEGF在胃癌芯片中的表达 RUNX3在正常胃腺上皮高表达, 胃癌芯片RUNX3表达阳性率分别是阴性组46.3%, 弱阳性组35.0%, 强阳性组18.7%, 阳性表达率逐渐降低; VEGF在正常胃腺上皮低表达, VEGF表达阳性率分别是阴性组22.5%, 弱阳性组30.0%, 强阳性组47.5%, 其阳性表达率逐渐升高, 阳性表达部位为肿瘤细胞胞质(图1), 详细资料见表1。

2.2 胃癌RUNX3、VEGF表达与MVD的关系 采用CD34标记微血管清晰, 定位确切。计数肿瘤细胞浸润区域。RUNX3表达阴性组MVD为 50.13 ± 9.28 , 弱阳性组为 38.21 ± 7.63 , 强阳性组为 19.42 ± 6.89 , 显著性递减($P < 0.05$)。RUNX3表达和MVD之间存在显著的负相关($r_s = -0.742, P < 0.01$); VEGF表达阴性组MVD为 23.24 ± 6.82 , 弱阳性组为 46.91 ± 7.28 , 强阳性组为 $51.31 \pm$

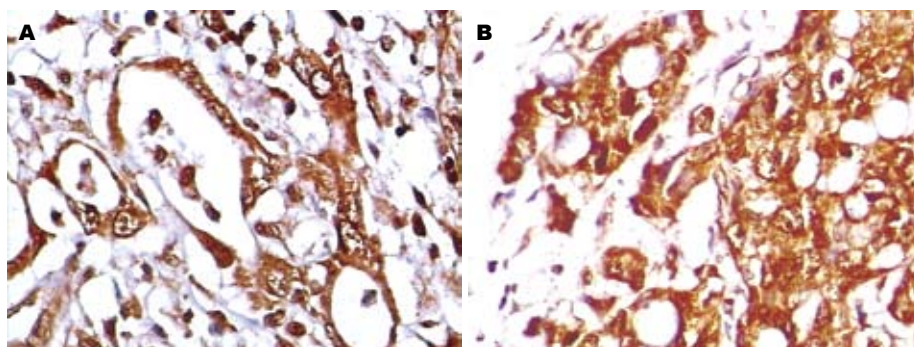


图 1 RUNX3和VEGF在胃癌芯片中的表达(40×). A: RUNX3表达强阳性; B: VEGF表达强阳性.

■ 相关报道

近两年发现RUNX3基因对胃癌细胞的生长有明显的抑制作用,并能阻止其在裸鼠体内的致瘤性.而敲除掉RUNX3基因,可使鼠胃黏膜发生异常增生.在人类许多癌细胞株和癌组织中都存在RUNX3杂合性缺失,并且与这些癌细胞株或癌组织中的RUNX3表达下调有关.而VEGF是体内外血管内皮细胞最主要的有丝分裂原,通过选择性地与血管内皮细胞膜上高亲和力的受体结合,使受体活化,然后进一步激活其下游的相关基因表达,刺激内皮细胞迁移与增殖.

表 1 病例信息和RUNX3/VEGF的表达

特征	总数 <i>n</i> = 80	阴性 18/37	弱阳性 24/28	强阳性 38/15	<i>P</i>
性别					
男	65	33/15	22/19	12/30	0.461
女	15	4/2	6/5	3/8	0.670
年龄/岁					
≤60	51	24/10	16/14	11/27	0.564
>60	29	13/8	12/10	4/11	0.426
病理类型					
管状	32	16/7	10/8	6/17	0.732
乳头状	12	3/3	6/3	3/6	0.982
弥漫性	19	9/3	6/7	4/9	
黏液性	3	1/1	2/1	0/1	
混合性	10	5/3	3/3	2/4	
印戒	4	3/1	1/2	0/1	
Lauren's分型					
肠型	45	22/10	14/15	10/20	0.281
弥漫型	26	12/6	9/7	5/13	0.952
混合型	9	3/2	5/2	0/5	
临床分期					
I - II	29	8/12	13/9	8/8	0.037
III - IV	51	29/6	15/15	7/30	0.004

表 2 RUNX3、VEGF表达与MVD的关系

变量	<i>n</i>	MVD	<i>F</i> & <i>P</i>	变量与MVD相关性
RUNX3				
阴性	40	50.13 ± 9.28	<i>F</i> = 64.38, <i>P</i> = 0.00	<i>r_s</i> = -0.742, <i>P</i> < 0.01
弱阳	28	38.21 ± 7.63		
强阳	12	19.42 ± 6.89		
VEGF				
阴性	18	23.24 ± 6.82	<i>F</i> = 79.83, <i>P</i> = 0.00	<i>r_s</i> = 0.683, <i>P</i> < 0.01
弱阳	24	46.91 ± 7.28		
强阳	38	51.31 ± 8.71		

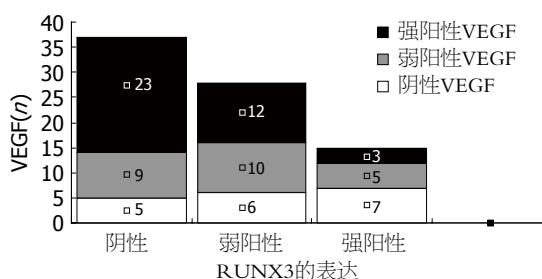


图 2 RUNX3表达与VEGF表达的相关性.

8.71, 显著性递增($P < 0.05$). VEGF表达和MVD之间存在显著的正相关($r_s = 0.683$, $P < 0.01$, 表2).

2.3 胃癌RUNX3和VEGF表达的相关性
VEGF表达阳性率在RUNX3阴性组逐渐增高(13.5% < 24.3% < 62.2%), 在RUNX3弱阳性组逐渐增高(21.4% < 35.7% < 42.9%), 在RUNX3强阳性组逐渐降低(46.7% > 33.3% > 20.0%), 分类数据的相关分析得出 $\chi^2 = 9.178$, $P = 0.002$, 认为RUNX3和VEGF表达存在线性变化关系; RUNX3和VEGF表达之间存在显著的负相关($r_s = -0.333$, $P < 0.01$, 图2).

3 讨论

胃癌的发生是一个多因素、多步骤、多基因参与的过程, 是环境和遗传共同作用的结果, 他涉

及到基因的不稳定性, 端粒酶的活化, 癌基因的激活, 抑癌基因的失活. RUNX3基因被认为是一种新发现的抑癌基因, 对胃癌细胞的生长有明显的抑制作用, 对胃黏膜上皮细胞的调控、脊神经节的神经发育和T细胞分化中都发挥重要作用^[5-8]. 在人类许多癌细胞株和癌组织中都存在RUNX3杂合性缺失, 并且与这些癌细胞株或癌组织中的RUNX3表达下调有关^[9]. RUNX3在正常胃腺上皮表达阳性, 在45%-60%的胃癌中出现RUNX3基因表达下调或缺失, 推测RUNX3基因可能是抑制胃癌发生的关键基因^[7,11]. 本实验RUNX3和VEGF他们在胃癌组织芯片中的表达在性别、年龄、病理类型、Lauren's分型方面并无显著性差异, 但在临床分期方面具有差异有显著性, 充分显示了RUNX3在胃癌的发生、发展过程中的抑制作用, 以及VEGF促进肿瘤生

■应用要点

随着研究的不断深入, RUNX3有望成为胃癌诊断的一个新型生物学指标和基因治疗靶点.

长方面的作用.

Li *et al*^[7]发现缺乏RUNX3基因阳性表达的小鼠, 胃黏膜上皮细胞增殖加快并且凋亡受到抑制, 而且细胞对生长抑制因子如TGF2 β 表现出拮抗效应, TGF2 β 又是许多细胞的有效抑制子(如上皮细胞、内皮细胞等), 表明RUNX3基因是胃上皮细胞生长和增殖的调控者^[6-7]. 研究证实, RUNX3在很多肿瘤中具有肿瘤抑制作用并且与肿瘤的浸润、转移及血管新生的关系密切^[10]. 而VEGF是体内外血管内皮细胞最主要的有丝分裂原, 通过选择性地与血管内皮细胞膜上高亲和力的受体结合, 使受体活化, 然后进一步激活其下游的相关基因表达, 刺激内皮细胞迁移与增殖.

胃癌的生长必须依赖血管的新生, 宿主内皮细胞增殖, 出芽形成新生血管, 向肿瘤方向生长, 构建肿瘤血运通道, 为其提供营养并运输代谢产物. 现已公认, 肿瘤血管生成是肿瘤生长和转移的必要条件. VEGF是最强有力的血管生成因子, 是目前已知活性最强、特异性最高的血管生成因子, 其他血管生成因子大都通过增强VEGF的表达产生血管生成作用^[12].

本实验胃癌VEGF表达阳性率为47.5%, 文献中报道的VEGF表达阳性率跨度很大, 从26.7%到84.0%; 研究表明, VEGF阳性胃癌呈为较大体积、进展期等, 其阳性组生存率低于阴性组, 能独立预测肝转移.

肿瘤血管新生机制复杂, 微血管密度是衡量肿瘤血管生成的量化指标, 一般应用FVIII Ag、CD31、CD34来标记肿瘤血管, 是检测评估血管新生的一种间接手段. 采用CD34标记微血管清晰, 定位确切, 使微血管计数简单高效. 仅计数肿瘤细胞浸润区域. 本组MVD范围在19-51之间, 平均为38.20, 文献中MVD值大致在24-48之间, 高MVD总生存率显著低下. 本研究显示, RUNX3的表达与MVD的 $r_s = -0.742$, 存在显著的负相关($P < 0.01$); 而VEGF表达与MVD的 $r_s = 0.683$, 存在显著的正相关($P < 0.01$), 胃癌RUNX3、VEGF表达与MVD之间具有显著性意义. 可能在RUNX3抑癌基因发挥作用的同时其对VEGF于MVD的抑制作用也发生了. 从实验中可以发现, RUNX3的阴性表达伴随VEGF过表达现象, RUNX3的低表达可能通过某种机制促进了VEGF的血管新生作用, 使MVD值升高. RUNX3表达与VEGF表达之间存在显著线性关系, 应用分类数据的相关分析, $r_s = -0.333$, 表

明RUNX3和VEGF表达之间存在显著的负相关($P < 0.05$).

本研究提示在形态学方面, RUNX3失活和VEGF激活在胃癌进程中同时发挥作用, 对于潜在机制的进一步研究, 必将对胃癌的诊断和治疗带来新的启示. VEGF主要是使内皮细胞分裂增殖、血管构建和升高血管的通透性, 内皮细胞遗传学上稳定, 突变率低, 针对内皮细胞的药物较少存在耐药性问题. 因此, 我们认为RUNX3、VEGF和MVD联合检测有助于胃癌的监测, 同时抑制两种或多种与肿瘤血管生成相关的因子, 或者加用抑制肿瘤血管形成的因子, 可以从多个靶点抑制肿瘤血管形成, 指导临床治疗从而产生更好的效果, 对把握胃癌生物学行为和预后等具有一定的价值. 故可考虑以RUNX3为靶点联合VEGF进行胃癌的抗血管生成治疗, 以他们为靶点的抗肿瘤治疗将具有广阔的前景, 随着研究的不断深入, RUNX3有望成为胃癌诊断的一个新型生物学指标和基因治疗靶点.

4 参考文献

- 1 Waki T, Tamura G, Sato M, Terashima M, Nishizuka S, Motoyama T. Promoter methylation status of DAP-kinase and RUNX3 genes in neoplastic and non-neoplastic gastric epithelia. *Cancer Sci* 2003; 94: 360-364
- 2 Kim TY, Lee HJ, Hwang KS, Lee M, Kim JW, Bang YJ, Kang GH. Methylation of RUNX3 in various types of human cancers and premalignant stages of gastric carcinoma. *Lab Invest* 2004; 84: 479-484
- 3 Osaki M, Moriyama M, Adachi K, Nakada C, Takeda A, Inoue Y, Adachi H, Sato K, Oshimura M, Ito H. Expression of RUNX3 protein in human gastric mucosa, intestinal metaplasia and carcinoma. *Eur J Clin Invest* 2004; 34: 605-612
- 4 Bae SC, Takahashi E, Zhang YW, Ogawa E, Shigesada K, Namba Y, Satake M, Ito Y. Cloning, mapping and expression of PEBP2 alpha C, a third gene encoding the mammalian Runt domain. *Gene* 1995; 159: 245-248
- 5 Lund AH, van Lohuizen M. RUNX: a trilogy of cancer genes. *Cancer Cell* 2002; 1: 213-215
- 6 Fukamachi H, Ito K. Growth regulation of gastric epithelial cells by Runx3. *Oncogene* 2004; 23: 4330-4335
- 7 Li QL, Ito K, Sakakura C, Fukamachi H, Inoue K, Chi XZ, Lee KY, Nomura S, Lee CW, Han SB, Kim HM, Kim WJ, Yamamoto H, Yamashita N, Yano T, Ikeda T, Itohara S, Inazawa J, Abe T, Hagiwara A, Yamagishi H, Ooe A, Kaneda A, Sugimura T, Ushijima T, Bae SC, Ito Y. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* 2002; 109: 113-124
- 8 Bangsow C, Rubins N, Glusman G, Bernstein Y, Negreanu V, Goldenberg D, Lotem J, Ben-Asher E, Lancet D, Levanon D, Groner Y. The RUNX3 gene--

- sequence, structure and regulated expression. *Gene* 2001; 279: 221-232
- 9 Yanada M, Yaoi T, Shimada J, Sakakura C, Nishimura M, Ito K, Terauchi K, Nishiyama K, Itoh K, Fushiki S. Frequent hemizygous deletion at 1p36 and hypermethylation downregulate RUNX3 expression in human lung cancer cell lines. *Oncol Rep* 2005; 14: 817-822
 - 10 Sato K, Tomizawa Y, Iijima H, Saito R, Ishizuka T, Nakajima T, Mori M. Epigenetic inactivation of the RUNX3 gene in lung cancer. *Oncol Rep* 2006; 15: 129-135
 - 11 Carvalho R, Milne AN, Polak M, Corver WE, Offerhaus GJ, Weterman MA. Exclusion of RUNX3 as a tumour-suppressor gene in early-onset gastric carcinomas. *Oncogene* 2005; 24: 8252-8258
 - 12 Wood JM. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) as a novel approach for cancer therapy. *Medicina (B Aires)* 2000; 60 Suppl 2: 41-47

■同行评价

本文选题新颖, 实验方法先进, 实验数据可信, RUNX3有望成为胃癌诊断的一个新型生物学指标, 为胃癌的基因靶向治疗的提供了新的理论依据。

编辑 史景红 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

世界华人消化杂志外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成tl/2或T_{1/2}¹, V_{max}不能Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*), *Ilex pubescens* Hook, *et Arn.var.glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*n*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylethanilide(*N*-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; *Ibid*, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), *S*(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, °C), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), *ρ*(密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), *φ*(体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), *T*_{max}, *C*_{max}, *V*_d, *T*_{1/2} *CI*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白. (常务副总编辑: 张海宁 2009-01-28)

安定联合氟马西尼应用于无痛胃镜44例

黄骏, 吴小微, 曾勇

■背景资料

胃镜检查传统方法经咽喉表面麻醉或服用多效胃镜胶后进行, 这种麻醉方法不能很好消除咽喉部反射, 严重者可引起心血管系统的改变如血压升高, 心率增快, 同时也妨碍医生的检查甚至诊断。目前多推荐无痛胃镜检查术, 即在一定药物的作用下使患者入睡后进行检查, 国内外已有相关文献报道。

黄骏, 吴小微, 曾勇, 武汉市汉阳医院 武汉科技大学附属汉阳医院消化内科 湖北省武汉市 430050

通讯作者: 黄骏, 430050, 湖北省武汉市, 武汉市汉阳医院, 武汉科技大学附属汉阳医院消化内科. hj-dd@163.com

收稿日期: 2008-09-07 修回日期: 2008-12-08

接受日期: 2008-12-22 在线出版日期: 2009-01-28

Clinical application of diazepam in combination with flumazenil in painless gastroscopy: an analysis of 44 cases

Jun Huang, Xiao-Wei Wu, Yong Zeng

Jun Huang, Xiao-Wei Wu, Yong Zeng, Department of Gastroenterology, Hanyang Hospital, Wuhan Science and Technology University, Wuhan 430050, Hubei Province, China

Correspondence to: Jun Huang, Department of Gastroenterology, Hanyang Hospital, Wuhan Science and Technology University, Wuhan 430050, Hubei Province, China. hj-dd@163.com

Received: 2008-09-07 Revised: 2008-12-08

Accepted: 2008-12-22 Published online: 2009-01-28

Abstract

AIM: To evaluate clinical efficacy of diazepam in combination with flumazenil in painless gastroscopy.

METHODS: Eighty six patients undergoing painless gastroscopy at our hospital were randomly divided into two groups. 2 mg/kg, iv. of propofol was administrated in group I ($n = 42$ cases), while diazepam 0.2-0.6 mg/kg flumazenil 0.5-1.0 mg was first administrated and then flumazenil was given in group II ($n = 44$ cases). Indicators such as heart rate, onset time of anesthesia, fixed-rate depth of anesthesia, the incidence of choking, apnea rate were detected during anesthesia.

RESULTS: No significant differences were found between group I and group II in heart rate during operation and regaining consciousness time. Group I was superior to group II in fixed-rate depth of anesthesia (14.3% vs 34.3%, $P < 0.05$), onset time (45 ± 11 s vs 58 ± 13 s, $P < 0.05$) and the incidence of choking (11.9% vs 29.5%, $P < 0.05$).

< 0.05) during operation, but the apnea rate was higher (54.8% vs 31.8%, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Diazepam in combination with flumazenil is of high safety and low cost, and the operation can be carried without an anesthetist, thus it still enjoys a good application in painless gastroscopy though with some faults.

Key Words: Diazepam; Flumazenil; Gastroscopy; Anesthesia

Huang J, Wu XW, Zeng Y. Clinical application of diazepam in combination with flumazenil in painless gastroscopy: an analysis of 44 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(3): 326-328

摘要

目的: 探讨安定联合氟马西尼应用于无痛胃镜的临床效果。

方法: 我院接受无痛胃镜检查的患者86例, 随机分成两组。I组(42例)静脉注射给予丙泊酚2 mg/kg麻醉; II组(44例)给予安定0.2-0.6 mg/kg静脉注射, 检查完毕立即给予氟马西尼催醒。麻醉过程中观察麻醉后心率、麻醉起效时间、术后清醒时间、麻醉深度、呼吸暂停、术中呛咳例数等指标。

结果: 给药后心率、术后清醒时间 I组与 II组间无统计学差异。麻醉深度体动率(14.3% vs 34.3%, $P < 0.05$)、起效时间(45 ± 11 s vs 58 ± 13 s, $P < 0.05$)、呛咳发生率(11.9% vs 29.5%, $P < 0.05$)、呼吸暂停率(54.8% vs 31.8%, $P < 0.05$) I组优于 II组。

结论: 安定联合氟马西尼应用于无痛胃镜检查, 虽然有部分缺陷, 但因其给药方便, 不须麻醉医师在场, 且安全性高、成本低等优点, 仍可临床推广。

关键词: 安定; 氟马西尼; 胃镜; 麻醉

黄骏, 吴小微, 曾勇. 安定联合氟马西尼应用于无痛胃镜44例. *世界华人消化杂志* 2009; 17(3): 326-328
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/326.asp>

■同行评议者

董蕾, 教授, 西安交通大学第二附属医院消化内科; 郭晓钟, 教授, 中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

0 引言

无痛胃镜操作时间短, 要求麻醉诱导快, 深度适当, 保障循环和呼吸平稳, 而且要求患者检查后苏醒迅速而完全, 术中术后并发症少, 患者能适时观察后, 自行离开检查室. 为探讨无痛胃镜麻醉用药选择的多样性, 根据安定的药理特性, 我院于无痛胃镜检查中选择安定联合氟马西尼取代需麻醉医师使用的丙泊酚, 并观察其临床效果.

1 材料和方法

1.1 材料 本院行无痛胃镜检查患者86例, 男39例, 女47例, 年龄18-72岁, 体质量46-82 kg, ASA分级 I, II级: 第 I 级: 患者心、肺、肝、肾、脑、内分泌等重要器官无器质性病变; 第 II 级: 有轻度系统性疾病, 但处于功能代偿阶段, 严重心肺肾疾病的患者不主张麻醉胃镜^[1]. 术前均无胃镜检查及麻醉禁忌证, 1 mo内无苯二氮卓类药物史. 患者被随机分为两组: I 组42例, 男/女为20/22, 年龄为 50.5 ± 22.5 岁, 体质量 65 ± 15.6 kg, 检查时间 3.5 ± 1.2 min, 麻醉时间 9.2 ± 0.9 min, 给予丙泊酚麻醉; II组44例, 男/女为19/25, 年龄为 49.4 ± 23.6 岁, 体质量 63 ± 14.8 kg, 检查时间 4.1 ± 1.3 min, 麻醉时间 8.7 ± 1.2 , 给予检查前予安定. 操作完毕以氟马西尼催醒, HR<65次/min者静脉注射阿托品0.5 mg. 检查前禁食12 h, 禁水8 h, 建立上肢静脉通道, 常规多功能心电监测: 心电图(ECG), 心率(HR), 呼吸频率(R), 血压(BP), 血氧饱和度(SaO₂), 鼻导管吸氧, 氧流量4-5 L/min.

1.2 方法 患者取左侧卧位, 头微后仰, 放置牙垫, I 组ip丙泊酚2 mg/kg, II组先静脉给予安定0.2-0.6 mg/kg. 至睫毛反射消失或呼之不应时停止给药. 术中连续监测心电图, 呼吸, 血压, 氧饱和度. 检查完毕后, I 组直接停药, II组立即给予氟马西尼0.5-1.0 mg静脉注射, 并继续观察术后神志变化及心电图, 呼吸, 血压, 氧饱和度.

疗效评定标准: 以置入胃镜时无咽部刺激反射如呛咳, 无体动说明麻醉效果良好. 停药5 min清醒, 呼之睁眼, 能明确指令意义, 说明麻醉深度控制适宜.

统计学处理 计量资料用mean±SD表示, 采用t检验, 计数资料用 χ^2 检验, 结果采用SPSS13.0统计软件进行处理, 以 $P<0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

两组间在麻醉后心率、术后清醒时间上差异无

统计学意义($P>0.05$). 在麻醉深度体动率、起效时间、术中呛咳发生率、呼吸暂停率差异有统计学意义($P<0.05$, 表1). 值得一提的是I组1例65岁患者麻醉后出现严重呼吸暂停, HR上升到120次/min后急速下降到40次/min, SaO₂急速下降到50%, 明显发绀, 立即停止操作, 经口对口人工呼吸及球囊辅助通气, 6 min后缓解, 恢复自主呼吸, SaO₂上升至95%, 术后追问患者有睡眠呼吸暂停病史. II组2例有明显咽部刺激反应及体动, 加大安定剂量到40 mg后完成检查, 术后倦怠, 加用0.25 mg氟马西尼, 休息后无不适.

3 讨论

胃镜检查传统方法经咽喉表面麻醉或服用多效胃镜胶后进行, 这种麻醉方法不能很好消除咽喉部反射, 严重者可引起心血管系统的改变如血压升高, 心率增快, 同时也妨碍医生的检查甚至诊断. 目前多推荐无痛胃镜检查术, 即在一定药物的作用下使患者入睡后进行检查, 国内外已有相关文献报道^[2], 药物有芬太尼, 哌替啶, 咪达唑仑等, 国内多选用丙泊酚, 有报道满意度达100%^[3], 但也有报道丙泊酚静脉注射有75%有血管刺激症状, 进而增加患者痛苦^[4]. 我院选择安定联合氟马西尼药物应用于无痛胃镜检查中, 经观察证实安全有效, 与丙泊酚相比在麻醉深度体动, 起效时间, 术中呛咳发生率方面稍差, 麻醉后心率, 术后清醒时间相当, 呼吸暂停率明显偏低.

氟马西尼因其特殊的构象, 能竞争性地抑制苯二氮卓类药物与受体结合, 催醒效果好, 用药1 min就可清醒^[5], 且无明显不良反应. 具体可以表现在如下三个方面: (1)安定可产生呼吸抑制作用, 氟马西尼能迅速逆转安定的呼吸抑制作用. (2)安定为苯二氮卓类作用时效短, 疗效好的一种药物, 在无痛胃镜中应用有其固有的优势. 氟马西尼既可促进定向, 理解能力的恢复, 亦可明显促进苏醒和记忆恢复. 而且氟马西尼对抗其残余作用而不至于再度发生抑制作用. (3)苯二氮卓类药物可通过抑制钙通道, 降低细胞内的钙内留而直接扩张气道平滑肌. 安定对组胺诱发的支气管收缩亦有良好的解痉作用. 氟马西尼对钙通道无影响, 故不会因拮抗作用而出现气道痉挛^[6].

总之, 安定作为无痛胃镜麻醉用药并用氟马西尼催醒是一个安全有效的选择, 由于安定为非麻醉药物, 故不用麻醉医师就可以进行无痛胃镜工作地开展, 减少人力支出, 降低成本,

■应用要点

安定作为无痛胃镜麻醉用药并用氟马西尼催醒是一个安全有效的选择, 由于安定为非麻醉药物, 故不用麻醉医师就可以进行无痛胃镜工作地开展, 减少人力支出, 降低成本.

■同行评价

本研究设计合理, 具有较好的临床参考价值.

表 1 用药前后两组观察指标变化

分组	麻醉后心率(次/min)	麻醉起效时间(s)	术后清醒时间(min)	麻醉深度体动n(%)	呼吸暂停n(%)	术中呛咳n(%)
I 组	75 ± 11	45 ± 11	4.3 ± 1.2	6(14.3)	23(54.8)	5(11.9)
II 组	77 ± 9	58 ± 13 ^a	3.9 ± 1.3	15(34.3) ^a	14(31.8) ^a	13(29.5) ^a

^a $P < 0.05$ vs I 组.

氟马西尼为安定所致的镇静, 催眠, 抗焦虑, 嗜睡, 顺行性遗忘, 中枢性肌松和呼吸抑制等各个方面均有肯定的拮抗作用, 不良反应轻微, 因此安定联合氟马西尼具有较好的临床应用价值, 在此项研究中, 我们发现虽然安定组麻醉深度略逊于丙泊酚组, 但几乎未发生严重呼吸抑制, 安全性高, 尤其适用于老年患者. 严重呼吸暂停有致命可能. 同时注射麻醉药过程中要注意给药速度及给药量, 术后患者血压需恢复至术前或接近术前水平, 能正确应答, 步态稳健后方可离开, 3 h内需有人陪护, 术后当天不能骑自行车、驾车和从事高空作业或操作重型机器^[7].

4 参考文献

- 何忠明. 丙泊酚与米达唑仑在无痛胃镜时心率、血压、氧饱和度的影响. 临床医学 2008; 28: 74
- 施震, 沈七襄, 陈利民, 王庆利, 甘国胜, 吴明春, 段伟. 瑞芬太尼-丙泊酚静脉麻醉用于无痛胃镜检查术的疗效观察. 解放军医学杂志 2005; 30: 918-919
- 何成兵, 王淮胜, 王丽娜. 丙泊酚在内镜检查中的应用. 临床麻醉学杂志 2003; 19: 691
- 张美华. 丙泊酚-芬太尼麻醉在门诊胃肠镜检查中的应用. 中外医疗 2008; 30: 133
- Whitwan JG. Drugs for sedation. In: McCloy R, eds. Quality control in edoscopy. Barlin Heidelberg: Spring-Verlag, 1991: 3-21
- 刘映龙. 氟吗西尼用于腔镜手术对抗咪唑安定作用的观察. 卫生职业教育 2005; 23: 109-110
- 刘华, 李玲, 王建. 胃镜无痛检查法的安全性探讨. 护理学杂志 2005; 20: 31-32

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

世界华人消化杂志数字用法标准

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 本刊论文中数字作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 ± 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的mean ± SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 ± 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成 3.6 ± 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如 8.4 ± 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 → 23.5 → 24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 ≤ 100, 百分数到个位; $101 \leq$ 分母 ≤ 1 000, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65. 完整的阿位伯数字不移行! (常务副总编辑: 张海宁 2009-01-28)

干扰素治疗慢性乙型肝炎疗效与HBV基因型的关系

黄重发, 施斌斌, 朱清, 武凌, 裴小红, 朴全慧, 周悒

黄重发, 施斌斌, 朱清, 武凌, 裴小红, 朴全慧, 周悒, 中国人民解放军第四五四医院消化科 江苏省南京市 210002
南京军区医学卫生科研课题资助项目, No. 07M047
作者贡献分布: 实验路线设计由黄重发操作完成; 实验技术由施斌斌操作完成, 统计学分析由朱清完成, 临床资料由武凌, 裴小红, 朴全慧及周悒负责收集整理; 论文写作由施斌斌完成.
通讯作者: 施斌斌, 210002, 江苏省南京市, 中国人民解放军第四五四医院消化科. shibinbin1974@sina.com
电话: 025-80865270
收稿日期: 2008-11-19 修回日期: 2008-12-19
接受日期: 2008-12-22 在线出版日期: 2009-01-28

Relationship between therapeutic efficacy of interferon in treating chronic hepatitis B and HBV genotypes

Chong-Fa Huang, Bin-Bin Shi, Qing Zhu, Ling Wu, Xiao-Hong Pei, Quan-Hui Pu, Yi Zhou

Chong-Fa Huang, Bin-Bin Shi, Qing Zhu, Ling Wu, Xiao-Hong Pei, Quan-Hui Pu, Yi Zhou, Department of Gastroenterology, the 454th Hospital of Chinese PLA, Nanjing 210002, China

Supported by: the Nanjing Military Area Command of Chinese PLA Scientific Research Foundation, No. 07M047
Correspondence to: Bin-Bin Shi, Department of Gastroenterology, the 454th Hospital of Chinese PLA, Nanjing 210002, China. shibinbin1974@sina.com

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

Accepted: 2008-12-22 Published online: 2009-01-28

Abstract

AIM: To study the effects of HBV genotypes on anti-virus-therapeutic efficacy of interferon in chronic HBV-infected patients.

METHODS: Thirty HBV-infected patients were treated with interferon for anti-virus. HBV genotypes were detected using PCR-RFLP and the response levels of interferon in different genotypes were observed.

RESULTS: For the 30 patients, the HBV genotypes were mainly type B (40.0%) and type C (56.67%). Level of HBV DNA was significantly higher in patients with type C than with type B (6.03 ± 1.35 vs 5.45 ± 1.21 , $P < 0.05$), and the interferon response rate was higher in patients with type B than with type C. Among those with no response, 1 case with type B and another case

with type C changed into type D.

CONCLUSION: It is suggested that HBV genotypes is correlated with the serum levels of HBV DNA and therapeutic efficacy of interferon. The genotype could be changed during the process of therapy.

Key Words: Hepatitis B Virus; Genotype; Genotype changes; Anti-virus therapy

Huang CF, Shi BB, Zhu Q, Wu L, Pei XH, Pu QH, Zhou Y. Relationship between therapeutic efficacy of interferon in treating chronic hepatitis B and HBV genotypes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(3): 329-332

摘要

目的: 探讨HBV不同基因型对干扰素抗病毒治疗的影响。

方法: 对30名HBV患者进行干扰素抗病毒治疗, PCR-RFLP检测HBV基因型, 观察不同基因型HBV对干扰素的应答水平。

结果: 30例患者HBV基因型以B型(40.0%)和C型(56.67%)为主, C型患者HBV DNA水平显著高于B型患者(6.03 ± 1.35 vs 5.45 ± 1.21 , $P < 0.05$), B型患者对干扰素应答率显著高于C型患者, 在无应答患者中分别有1名B型和C型转变为D型。

结论: HBV基因型与HBV DNA复制水平、抗病毒疗效均有一定的相关性, 在治疗过程中可发生基因型改变。

关键词: 乙型肝炎病毒; 基因型; 基因型改变; 抗病毒治疗

黄重发, 施斌斌, 朱清, 武凌, 裴小红, 朴全慧, 周悒. 干扰素治疗慢性乙型肝炎疗效与HBV基因型的关系. *世界华人消化杂志* 2009; 17(3): 329-332

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/329.asp>

0 引言

根据乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)全基

■背景资料

乙型肝炎病毒(HBV)感染具有很高的发病率, 是引起肝硬化和肝癌的最常见的原因之一. 不同HBV基因型病毒复制水平不同, 影响干扰素抗病毒治疗疗效, 在治疗过程中可能会出现基因型的转变, 其分子病毒学机制尚未明确。

■同行评议者

张占卿, 主任医师, 上海市(复旦大学)公共卫生中心; 李定国, 教授, 上海交通大学医学院(原上海第二医科大学)附属新华医院消化内科

■ 研发前沿

目前对HBV基因型的研究受到越来越多的关注,不同HBV基因型对抗病毒治疗应答率有显著的差异,基因型的转变可能是影响疗效的因素之一。

表 1 PCR引物及核苷酸序列

引物	序列	位置
BS1 sense	5'-CCTGCTGGTGGCTCCAGTTCC-3'	56-76
Pol2 antisense	5'-CGGGCAACGGGGTAAAGGTTTC-3'	1158-1138
YS1 sense	5'-GCGGGGTTTTCTTGTGA-3'	203-221
YS2 antisense	5'-GGGACTCAAGATGTTGTACAG-3'	787-767

因序列异质性 $\geq 8\%$ 的界线, HBV基因型可以分为8型(A-H)^[1]. HBV的不同基因型的结构差异可影响慢性乙型肝炎患者的病情发展、转归、HBV标志物的表达, 以及对抗病毒药物治疗的疗效. 本研究旨在探讨干扰素抗病毒治疗应答与HBV基因型及基因型转换之间的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 本研究30例HBeAg阳性慢性乙型肝炎(CHB)患者为我院门诊于2007-08/2008-05就诊的慢性乙型肝炎患者, 诊断符合2000年西安全国病毒性肝炎及肝病学术会议修订的病毒性肝炎诊断标准^[2]. 其中男20例, 女10例, 年龄17-53(平均年龄 33.6 ± 8.6)岁. 所有受检者排除HAV、HCV、HDV、HEV、HIV感染, 排除近3 mo应用抗病毒或影响免疫功能的药物. PCR扩增所用Taq酶、dNTP等是北京鼎国生物产品, 限制性内切酶是Promega公司产品. PCR扩增仪是美国ABI公司PE GeneAmp PCR System 9700, 引物由上海英骏公司提供. HBV DNA定量检测仪为Roche Lightcycler(Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis), 检测灵敏度为 10^3 copies/mL, 引物及探针为深圳匹基公司产品.

1.2 方法

1.2.1 治疗方案: 干扰素治疗 $\alpha 2b$ 5 MU/d肌注1 mo后改为隔日1次, 疗程6 mo. 治疗效果分为完全应答、部分应答、无应答. 完全应答: 血清HBV DNA $<10^3$ 拷贝/mL, HBeAg阴转(或HBeAg/抗Hbe血清转换), ALT复常; 部分应答: HBV DNA $<10^3$ copies/mL, 肝功能正常, 无HBeAg血清转换; 无应答: 未达到以上应答者. 完全应答和部分应答者为有效, 无应答者为无效. 观察项目: 患者治疗前、治疗后1、3、6 mo各复查一次血常规、肝功能、乙型肝炎血清标志物、HBV DNA(Roche荧光PCR定量). 治疗前及治疗结束后分别行基因型测定.

1.2.2 聚合酶链式反应联合限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)检测HBV基因型: 用巢式PCR

表 2 HBV基因型与HBV DNA之间的关系

基因型(n)	ALT(U/L)	HBV DNA(Log)
B(12)	86.24 ± 17.45	5.45 ± 1.21
C(17)	93.99 ± 23.81	6.03 ± 1.35^a

^a $P < 0.05$ vs B基因型.

扩增S基因: 第一轮引物为BS1/POL2, 20 μ L体系, 反应参数 94°C 1 min, 94°C 20 s, 55°C 20 s, 72°C 40 s, 72°C 5 min, 35个循环; 第二轮引物为YS1/YS2, 30 μ L体系, 反应参数 94°C 1 min, 94°C 20 s, 55°C 20 s, 72°C 25 s, 72°C 3 min, 32个循环. 得到S基因nt48-633之间片段长度为585 bp. 将PCR产物于琼脂糖凝胶电泳, 所有阳性产物以限制性内切酶Bsr I 和Sly I 平行酶切于 37°C 水浴4 h, 酶切体系15 μ L, 底物为10 μ L. 之后于琼脂糖凝胶电泳. 结果显示: 若单以Bsr I 切开者为B型, 若单以Sly I 切开者为C型, 若两酶同时切开者为A型, 若两酶同时切不开者为D型. PCR所用引物见表1.

统计学处理 用SPSS12.0统计软件进行分析, 计数资料用 χ^2 检验.

2 结果

2.1 基因分型 干扰素治疗前, 30例患者中HBV基因型40.0%(12/30)B型, C型56.67%(17/30), D型3.33%(1/30). 干扰素治疗后, 30例患者中HBV基因型B型36.67%(11/30)B型, C型53.3%(16/30), D型10.0%(3/30), 其中1名B基因型和1名C基因型治疗无应答者治疗结束后均转换为D基因型. 酶切图谱见图1.

2.2 基因型与HBV DNA的关系 C基因型HBV DNA对数值 6.03 ± 1.35 , B基因型HBV DNA对数值为 5.45 ± 1.21 , C基因型显著高于B基因型($P < 0.05$, 表2).

2.3 基因型与干扰素疗效的关系 干扰素治疗有效率40%, 其中B基因型58.33%, C基因型29.41%, D基因型1例治疗无应答(表3).

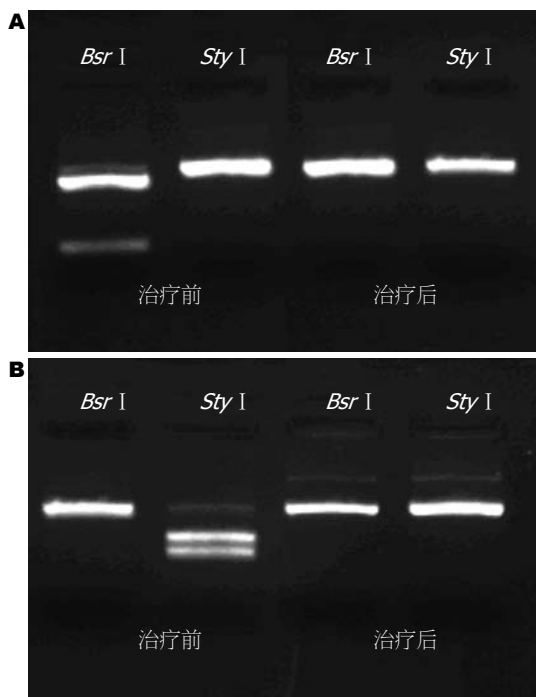


图1 干扰素治疗后基因型的转变. A: 基因型B→基因型D; B: 基因型C→基因型D.

3 讨论

HBV具有病毒复制产量高和突变率高的特征, 长期点突变累积形成了不同的基因型. 随着近年来新的HBV基因型的发现, 国内外学者从病毒学、流行病学和临床医学等方面对HBV基因型进行了大量的研究^[3-4]. HBV基因型分布呈现一定的地域性, A分布于全球, B和C型主要在亚洲, D型分布于南欧, E型分布于非洲, F型分布于美国, G型分布于美国和法国, H型分布于中美洲^[5]. 经继生 *et al*^[6]报道江苏地区HBV基因型主要是B型(33.5%)和C型(61.4%), 其中南京地区B型(50.0%)和C型(45.0%), 未检出A和D基因型. 我们研究发现南京地区HBV基因型B型(40.0%)和C型(56.67%), 未报道有D基因型, 而我们检测出1例患者为D基因型HBV, 追问病史, 此患者为西藏地区人, 大学毕业后来南京工作. 本次研究结果与上述报道结果相似.

日本学者^[7]报道C型HBV感染与乙型病毒性肝炎的慢性化相关, C型的HBeAg阳性率及血清HBVDNA水平较B型高. 国内学者也有类似报道^[8]. 本次研究也进一步证实上述结果, 而B型和C型两组间ALT无显著性差异. 这可能是C型对干扰素治疗应答率较B型低的原因. 提示C型HBV可通过本身活跃的复制能力和变异能力, 逃避宿主免疫和药物的双重压力, 而维持较高的病毒血症.

表3 不同HBV基因型与干扰素疗效的关系

治疗前HBV基因型	有效率	治疗后HBV基因型
B 40%(12/30)	58.33%(7/12)	B(11)
C 56.7%(17/30)	29.41%(5/17) ^a	C(16)
D 3.33%(1/30)	0%	D(3)

^a $P<0.05$ vs B基因型.

不同基因型HBV感染对抗病毒的反应不同. 干扰素治疗HBV感染的分子病毒学机制仍有许多是未知的. 欧美学者研究发现, 干扰素治疗后的疗效, HBV基因型C型较B型差, 基因型A型要比D型要好, HBeAg血清转换后有较高的HBV清除率, 且可获得较高的持续应答, 并有较好的组织学炎症改善^[9-10]. 亚洲学者^[11]报道, 对于亚洲患者来说, 相比感染了C基因型HBV的患者, 感染了HBV B基因型患者可以在较早的年龄发生HBeAg血清转换, 较少发生严重肝脏疾病, 且对干扰素治疗有更好的反应. 我们本次实验中发现, B基因型患者相较C基因型患者对干扰素有更高的应答率, 两者间具有显著性差异($P<0.05$), 进一步证实此观点. 而本次实验中1例D基因型患者干扰素治疗无效, 因例数少, 尚有待进一步观察. 提示HBV DNA基因型是预测乙型肝炎患者干扰素疗效及预后的重要指标之一.

国外学者研究发现在干扰素治疗复发的部分CHB患者中发生了HBV基因型的漂移, 主要有基因型C转变为基因型A^[12]. 在另一研究中发现, 急性乙型肝炎在HBeAg血清转换过程中, 出现C基因型转变为B基因型^[13]. 在我们此次研究中, 在干扰素治疗无应答者中, 初始为B基因型和C基因型的患者各有1名, 治疗结束后改变为D基因型, 而在治疗完全应答和部分应答者未检出D基因型. 在HBeAg血清转换者中未发现有C基因型转变为B基因型.

部分患者HBV可能为两种基因型的HBV混合感染, 但用目前标准基因型检测方法可能只能检测出其中主要的基因型, 但次要基因型尚不能检测出来, 且主要基因型和次要基因型各自所占比例不能准确测定. 不同基因型的混合感染在欧洲多表现为A型和D型之间, 在东亚可以发生于B和C基因型之间^[14]. 本实验中2名无应答者发生基因型漂移, 可能此2名患者原为HBV混合感染, 但因检测技术问题, 次要基因型未能检测出来. 在同一个患者身上发生基因型漂移

■ 相关报道

国内外研究显示, C型的HBeAg阳性率及血清HBVDNA水平较B型高, 对干扰素抗病毒疗效, HBV基因型C型较B型差, 基因型D型要比A型要差. 国外学者研究发现抗病毒治疗过程中发现有基因型C转变为基因型A.

■同行评价

本研究选题和研究内容符合当前研究热点,有一定应用和研究参考价值,但不够新颖。

的原因尚未明确,干扰素治疗后基因型的漂移可能是免疫选择的结果,由于机体免疫压力改变的作用影响,推测这种免疫压力的改变可能更主要对不同基因型HBV混合感染中的主要基因型产生作用,而次要基因型可以获得替代从而成为主要基因型。

不同基因型存在着生物学特性和临床特点差异,对抗病毒治疗疗效存在一定的影响,抗病毒治疗可致HBV基因型的发生改变,并对疗效产生影响,其具体机制有待进一步研究。

4 参考文献

- 1 Kato H, Gish RG, Bzowej N, Newsom M, Sugauchi F, Tanaka Y, Kato T, Orito E, Usuda S, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Eight genotypes (A-H) of hepatitis B virus infecting patients from San Francisco and their demographic, clinical, and virological characteristics. *J Med Virol* 2004; 73: 516-521
- 2 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 324-329
- 3 Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnus LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002; 83: 2059-2073
- 4 Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol* 2002; 83: 1267-1280
- 5 Sugauchi F, Orito E, Ichida T, Kato H, Sakugawa H, Kakumu S, Ishida T, Chutaputti A, Lai CL, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Hepatitis B virus of genotype B with or without recombination with genotype C over the precore region plus the core gene. *J Virol* 2002; 76: 5985-5992
- 6 经继生, 黄培, 阮成荣, 马洁, 汪顺才, 吴国强, 谢志萍, 朱传武, 章幼棠, 王开林, 张燕, 李林根, 丁琦, 赵文海, 梅存金, 庄洪润, 赵伟. 江苏省乙型肝炎病毒基因型分布与临床相关性. 江苏大学学报(医学版) 2006; 16: 123-126
- 7 Duong TN, Horiike N, Michitaka K, Yan C, Mizokami M, Tanaka Y, Jyoko K, Yamamoto K, Miyaoka H, Yamashita Y, Ohno N, Onji M. Comparison of genotypes C and D of the hepatitis B virus in Japan: a clinical and molecular biological study. *J Med Virol* 2004; 72: 551-557
- 8 陈进宇, 王鲁文, 龚作炯. HBV基因型与干扰素抗病毒疗效的关系. 中西医结合肝病杂志 2005; 15: 68-71
- 9 Halfon P, Bourlière M, Pol S, Benhamou Y, Ouzan D, Rotily M, Khiri H, Renou C, Pénaranda G, Saadoun D, Thibault V, Serpaggi J, Varastet M, Tainturier MH, Poynard T, Cacoub P. Multicentre study of hepatitis B virus genotypes in France: correlation with liver fibrosis and hepatitis B e antigen status. *J Viral Hepat* 2006; 13: 329-335
- 10 Erhardt A, Blondin D, Hauck K, Sagir A, Kohnle T, Heintges T, Häussinger D. Response to interferon alfa is hepatitis B virus genotype dependent: genotype A is more sensitive to interferon than genotype D. *Gut* 2005; 54: 1009-1013
- 11 Chu CJ, Hussain M, Lok AS. Hepatitis B virus genotype B is associated with earlier HBeAg seroconversion compared with hepatitis B virus genotype C. *Gastroenterology* 2002; 122: 1756-1762
- 12 Hannoun C, Krogsgaard K, Horal P, Lindh M. Genotype mixtures of hepatitis B virus in patients treated with interferon. *J Infect Dis* 2002; 186: 752-759
- 13 Chen BF, Liu CJ, Jow GM, Chen PJ, Kao JH, Chen DS. Evolution of Hepatitis B virus in an acute hepatitis B patient co-infected with genotypes B and C. *J Gen Virol* 2006; 87: 39-49
- 14 Bowyer SM, Sim JG. Relationships within and between genotypes of hepatitis B virus at points across the genome: footprints of recombination in certain isolates. *J Gen Virol* 2000; 81: 379-392

编辑 史景红 电编 何基才

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

• 消息 •

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

本刊讯 由中国科学技术信息研究所主办的中国科技论文统计结果发布会于2008-12-09在北京国际会议中心召开,世界胃肠病学主编马连生和编辑部主任程剑侠参加此项发布会。本会议介绍了中国精品科技期刊服务与保障系统,中国科技论文研究项目进展及精品科技期刊遴选,百篇最具影响学术论文评选,世界科技产出趋势和利用科学计量学工具分析领域发展趋势以及发布了中国科技论文统计结果。根据2007年度中国科技论文与引文数据库(CSTPCD2007)统计结果,WJG荣获2007年度“中国百种杰出学术期刊”称号,同时被选入2008年中国国际化精品科技期刊,中国精品科技期刊包括23种中国国际化精品期刊和301种中国精品科技期刊。(编辑:程剑侠 2009-01-28)

乙型肝炎患者血清IL-27的检测及其意义

左维泽, 张丽丽

左维泽, 张丽丽, 新疆石河子大学医学院第一附属医院感染性疾病科 新疆维吾尔自治区石河子市 832008

作者贡献分布: 此课题由左维泽与张丽丽设计; 病例收集, 实验操作, 数据分析及论文撰写由张丽丽完成; 课题指导与文章校审由左维泽完成。

通讯作者: 左维泽, 832008, 新疆维吾尔自治区石河子市, 新疆石河子大学医学院第一附属医院感染性疾病科。

zuoweize5828@163.com

电话: 0993-2850536

收稿日期: 2008-11-15 修回日期: 2008-12-08

接受日期: 2008-12-08 在线出版日期: 2009-01-28

Assay of serum IL-27 and its significance in HBV-infected patients

Wei-Ze Zuo, Li-Li Zhang

Wei-Ze Zuo, Li-Li Zhang, the First Hospital Affiliated to Medical College of Shihezi University, Shihezi 832008, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Correspondence to: Wei-Ze Zuo, the First Hospital Affiliated to Medical College of Shihezi University, Shihezi 832008, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. zuoweize5828@163.com

Received: 2008-11-15 Revised: 2008-12-08

Accepted: 2008-12-08 Published online: 2009-01-28

Abstract

AIM: To investigate the change and clinical significance of serum chemokine IL-27 in HBV-infected patients.

METHODS: The serum concentration of IL-27 was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); HBV DNA was detected by fluorescent quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR); liver function was assayed by automatic biochemistry analyzer.

RESULTS: Serum concentrations of IL-27 in control group ($n = 41$), acute hepatitis B group ($n = 33$), mild chronic hepatitis B (CHB) group ($n = 32$), moderate CHB group ($n = 30$) and severe CHB group ($n = 32$) were 14.123 ± 15.627 ng/L, 56.880 ± 15.813 ng/L, 23.872 ± 22.801 ng/L, 29.849 ± 24.300 ng/L, 35.703 ± 18.575 ng/L, respectively. The concentration of IL-27 was significantly higher in all HB groups than in control group ($P < 0.05$ or 0.01). The concentra-

tion of IL27 was significantly higher in severe CHB group than in mild CHB group ($P < 0.05$). However, the disparity of IL-27 concentration between mild CHB and moderate CHB group was statistically significant.

CONCLUSION: It is possible that IL-27 promotes immune clearance in acute hepatitis, however, in chronic hepatitis B it may have some cytopathic effect (CPE).

Key Words: Chemokine; Interleukin-27; Hepatitis B; Enzyme-linked immunosorbent assay

Zuo WZ, Zhang LL. Assay of serum IL-27 and its significance in HBV-infected patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(3): 333-335

摘要

目的: 探讨乙肝患者血清IL-27的变化规律及其临床意义。

方法: 采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清IL-27的浓度; 荧光定量聚合酶链反应法(FQ-PCR)检测HBV DNA; 全自动生化仪检测肝功能。

结果: 对照组($n = 41$)、急性乙肝组($n = 33$)、慢性乙肝(轻度)组($n = 32$)、慢性乙肝(中度)组($n = 30$)、慢性乙肝(重度)组($n = 32$)血清IL-27浓度分别为 14.123 ± 15.627 ng/L、 56.880 ± 15.813 ng/L、 23.872 ± 22.801 ng/L、 29.849 ± 24.300 ng/L、 35.703 ± 18.575 ng/L。急性乙肝组血清IL-27浓度显著高于慢性乙肝组及对照组(均 $P < 0.01$)；慢性乙肝(轻、中、重度)组血清IL-27浓度显著高于对照组($P < 0.05$ 或 < 0.01)；慢性乙肝(重度)组血清IL-27浓度明显高于慢性乙肝(轻度)组($P < 0.05$)；慢性乙肝(轻度)组血清IL-27浓度与慢性乙肝(中度)组比较, 差异无统计学意义；慢性乙肝(中度)组血清IL-27浓度与慢性乙肝(重度)组比较, 差异无统计学意义。

结论: 在急性乙型肝炎中IL-27可能促进了病毒清除；在慢性乙型肝炎感染中可能有一定的致细胞病变效应。

■背景资料

IL-27是经典的IL-6/IL-12家族的螺旋状的细胞因子, 是机体促炎反应的环境下由抗原提呈细胞产生的一种细胞因子。研究表明, IL-27能促进辅助性T细胞的分化, 增强杀伤性T淋巴细胞的活性, 并可通过多种机制促进Th1型免疫的发生, 诱导B细胞转化, 并主要作用于固有免疫系统和适应性免疫系统的各种细胞而发挥广泛的免疫调节作用。

■同行评议者

石统东, 副教授, 重庆医科大学附属第二医院感染病科

■应用要点

消除免疫耐受, 提高人体免疫功能, 尤其是特异性细胞免疫功能, 清除细胞内、外的HBV cccDNA, 是清除HBV的关键。

关键词: 细胞因子; 白介素27; 乙型肝炎; 酶联免疫吸附法

左维泽, 张丽丽. 乙型肝炎患者血清IL-27的检测及其意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(3): 333-335

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/333.asp>

0 引言

IL-27是经典的IL-6/IL-12家族的螺旋状的细胞因子^[1], 是机体促炎反应的环境下由抗原提呈细胞产生的一种细胞因子. 研究表明, IL-27能促进辅助性T细胞的分化^[2], 增强杀伤性T淋巴细胞的活性, 并可通过多种机制促进Th1型免疫的发生, 诱导B细胞转化, 并主要作用于固有免疫系统和适应性免疫系统的各种细胞而发挥广泛的免疫调节作用^[3]. 而IL-27与乙型肝炎的发病是否有关目前尚未见报道.

1 材料和方法

1.1 材料 病例组: 127例乙肝患者, 来源于2004-11/2008-08我院住院患者, 其中, 急性乙肝患者33例、慢性乙肝(轻度)患者32例、慢性乙肝(中度)30例、慢性乙肝(重度)32例, 男92例, 女35例, 年龄(39.5 ± 12.2)岁. 诊断标准符合依据2000年全国传染病与寄生虫病学术会议修订的《病毒性肝炎防治方案》诊断标准: HBsAg(+), 有临床症状, 肝功能异常, 病程在6 mo之内诊断为急性乙型肝炎, 超过6 mo诊断为慢性乙型肝炎^[3]. 所有病例均未接受免疫调节和抗病毒治疗, 均为汉族. 排除HAV、HCV、HDV、HEV感染; 排除酒精性肝炎、脂肪肝、自身免疫性肝炎等其他肝炎; 排除肿瘤、自身免疫性疾病、感染性疾病和心血管疾病. 41例正常对照来源于同一时期我院健康体检人群, 其中男29例, 女12例, 年龄(36 ± 15)岁, 排除HBV感染, 均为汉族, 其他排除标准同病例组. 所有受试者均知情同意.

1.2 方法

1.2.1 标本收集: 所有受试者均清晨抽取空腹外周血2 mL, 肝素抗凝, 30 min内常规离心, 分离血清, 血清标本冻存于-80℃超低温冰箱待测.

1.2.2 IL-27的检测: 用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清IL-27, 试剂盒购于美国rapidbio(RB)公司, 严格按说明书操作.

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件分析, 数据以mean±SD表示, 多个样本均数两两比较采用LSD法方差分析.

表1 乙型肝炎患者组与正常对照组血清IL-27浓度 (ng/L)

分组	n	IL-27(ng/L)
正常对照组	41	14.123 ± 15.627 ^{bcfh}
急性乙肝组	33	56.880 ± 15.813
慢乙肝(轻度)组	32	23.872 ± 22.801
慢乙肝(中度)组	30	29.849 ± 24.300
慢乙肝(重度)组	32	35.703 ± 18.575

^bP<0.01 vs 急性乙肝组; ^cP<0.05 vs 慢乙肝(轻度)组; ^fP=0.01 vs 慢乙肝(中度)组; ^hP<0.01 vs 慢乙肝(重度)组.

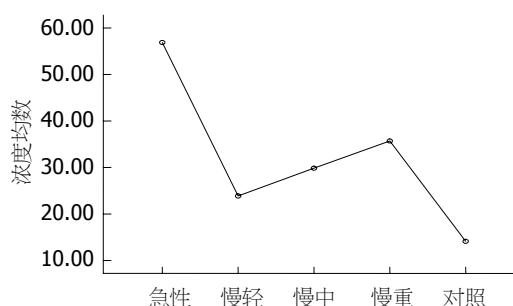


图1 乙型肝炎患者组与正常对照组血清IL-27浓度均数图.

2 结果

急性乙肝组、慢性乙肝(轻度)组、慢性乙肝(中度)组、慢性乙肝(重度)组及正常对照组各组血清IL-27浓度经过方差齐性检验, 结果为($F = 23.866, P < 0.001$)具有方差齐性.

急性乙肝组、慢性乙肝(轻度)组、慢性乙肝(中度)组、慢性乙肝(重度)组血清IL-27浓度均显著高于正常对照组血清IL-27浓度(P 值分别为<0.01、<0.05、<0.01、<0.01); 急性乙肝组血清IL-27浓度显著高于慢性乙肝(轻、中、重)组血清IL-27浓度(均 $P < 0.01$); 慢性乙肝(轻度)组血清IL-27浓度显著低于慢乙肝(重度)组血清IL-27浓度($P = 0.016$); 慢性乙肝(中度)组与慢性乙肝(轻、重)度组血清IL-27浓度比较, 差异无统计学意义(表1). 急性乙肝组、慢性乙肝(轻、中、重)组与正常对照组血清IL-27浓度均数比较见图1.

3 讨论

目前研究认为Th1/Th2细胞比例失衡可能是HBV感染慢性化的机制之一^[4-5]. 急性自限性乙肝患者表现为强烈的、多克隆和非特异性的CTL和Th1细胞反应, 相反在慢性乙肝患者中则以Th2细胞反应占优势, 难以检测到特异性的Th1细胞应答, 从而倾向于发生持续性的HBV感染^[6]. 消除免疫耐受, 提高人体免疫功能, 尤其是特异性细胞免疫功能, 清除细胞内、外的HBV

cccDNA, 是清除HBV的关键。

体外实验研究表明, IL-27可通过多种机制促进Th1型免疫的发生^[7-8], IL-27诱导Th1类细胞因子及干扰素的信号表达, IL-27可诱导NK细胞产生IFN- γ , 而在缺少IL-27受体的细胞内IFN的表达降低^[9-12]。另外IL-27可增强初始CD4⁺ T细胞MHC I 的表达, 可促进初始CD4⁺ T细胞的增殖, 但目前尚不清楚目前还不清楚IL-27通过哪条信号转导途径诱导初始CD4⁺ T细胞的增殖^[13-15]。

本实验研究发现, 乙型肝炎(急性乙肝组、慢性轻、中、重)各组血清IL-27水平均明显高于正常对照组, 且急性乙肝组明显高于慢性(轻、中、重)组, 慢性(重度)组显著高于慢性(轻度)组, 但慢性(中度)组与慢性(重度)组比较, 差异无统计学意义, 有待于扩大样本量深入研究。这提示在急性乙型肝炎的发病过程中, IL-27可能促进机体Th1型免疫的发生, 促进了细胞免疫反应, 从而对清除乙肝病毒起到了积极作用; 在慢性乙型肝炎发病中, IL-27有可能在促进病毒清除的过程中同时增强了肝脏的炎症反应, 从而加重了肝细胞的损伤。具体IL-27如何发挥上述生物学作用, 以及何种机制调节人体内IL-27的浓度, 尚待进一步研究IL-27及其受体在HBV感染中的生物学功能。

4 参考文献

- Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, Hibbert L, Churakova T, Travis M, Vaisberg E, Blumenschein WM, Mattson JD, Wagner JL, To W, Zurawski S, McClanahan TK, Gorman DM, Bazan JF, de Waal Malefyt R, Rennick D, Kastelein RA. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity* 2002; 16: 779-790
- Owaki T, Asakawa M, Morishima N, Hata K, Fukai F, Matsui M, Mizuguchi J, Yoshimoto T. A role for IL-27 in early regulation of Th1 differentiation. *J Immunol* 2005; 175: 2191-2200
- Takeda A, Hamano S, Yamanaka A, Hanada T, Ishibashi T, Mak TW, Yoshimura A, Yoshida H. Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. *J Immunol* 2003; 170: 4886-4890
- Weng HL, Wang BE, Jia JD, Wu WF, Xian JZ, Mertens PR, Cai WM, Dooley S. Effect of interferon-gamma on hepatic fibrosis in chronic hepatitis B virus infection: a randomized controlled study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 819-828
- Weng HL, Cai WM, Wang BE, Jia JD, Zhou XQ, Shi DM, Zhang DF, Zhao YR, Hao LJ, Wang SY, Wu WF, Xian JZ. [Clinical study of anti-hepatic fibrosis effect of IFN-gamma in patients with chronic hepatitis B] *Zhonghua Yixue Zazhi* 2003; 83: 943-947
- Lund RJ, Löytömäki M, Naumanen T, Dixon C, Chen Z, Ahlfors H, Tuomela S, Tahvanainen J, Scheinin J, Henttinen T, Rasool O, Lahesmaa R. Genome-wide identification of novel genes involved in early Th1 and Th2 cell differentiation. *J Immunol* 2007; 178: 3648-3660
- Schnurr M, Toy T, Shin A, Wagner M, Cebon J, Maraskovsky E. Extracellular nucleotide signaling by P2 receptors inhibits IL-12 and enhances IL-23 expression in human dendritic cells: a novel role for the cAMP pathway. *Blood* 2005; 105: 1582-1589
- Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, Huang E, Tato CM, Johnson LM, Villarino AV, Huang Q, Yoshimura A, Sehy D, Saris CJ, O'Shea JJ, Hennighausen L, Ernst M, Hunter CA. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol* 2006; 7: 937-945
- Khader SA, Partida-Sanchez S, Bell G, Jelley-Gibbs DM, Swain S, Pearl JE, Ghilardi N, Desauvage FJ, Lund FE, Cooper AM. Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after Mycobacterium tuberculosis infection. *J Exp Med* 2006; 203: 1805-1815
- Hibbert L, Pflanz S, De Waal Malefyt R, Kastelein RA. IL-27 and IFN-alpha signal via Stat1 and Stat3 and induce T-Bet and IL-12Rbeta2 in naive T cells. *J Interferon Cytokine Res* 2003; 23: 513-522
- Wirtz S, Becker C, Fantini MC, Nieuwenhuis EE, Tubbe I, Galle PR, Schild HJ, Birkenbach M, Blumberg RS, Neurath MF. EBV-induced gene 3 transcription is induced by TLR signaling in primary dendritic cells via NF-kappa B activation. *J Immunol* 2005; 174: 2814-2824
- Pflanz S, Hibbert L, Mattson J, Rosales R, Vaisberg E, Bazan JF, Phillips JH, McClanahan TK, de Waal Malefyt R, Kastelein RA. WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J Immunol* 2004; 172: 2225-2231
- Serre K, Mohr E, Toellner KM, Cunningham AF, Granjeaud S, Bird R, MacLennan IC. Molecular differences between the divergent responses of ovalbumin-specific CD4 T cells to alum-precipitated ovalbumin compared to ovalbumin expressed by Salmonella. *Mol Immunol* 2008; 45: 3558-3566
- Kallioli GD, Ivashkiv LB. IL-27 activates human monocytes via STAT1 and suppresses IL-10 production but the inflammatory functions of IL-27 are abrogated by TLRs and p38. *J Immunol* 2008; 180: 6325-6333
- Karpuzoglu E, Phillips RA, Gogal RM Jr, Ansar Ahmed S. IFN-gamma-inducing transcription factor, T-bet is upregulated by estrogen in murine splenocytes: role of IL-27 but not IL-12. *Mol Immunol* 2007; 44: 1808-1814

■同行评价

本文对乙肝的研究有一定的积极意义, 试验设计比较合理, 但简单。

编辑 史景红 电编 吴鹏朕

多潘立酮联合复方消化酶治疗功能性消化不良84例

郑丹, 夏冰, 施先艳, 宋敏, 吴杰, 王萍, 张姮

■背景资料

功能性消化不良发病率高, 是临床上常见的消化系统疾病, 常规采用的单纯促动力治疗效果并不佳。功能性消化不良有不同的病理生理机制, 不同症状与不同病理生理机制有关, 而非某种病理生理机制能解释所有症状。针对不同机制的多药联合应用治疗功能性消化不良从理论上分析应具有更好的疗效。本文尝试多潘立酮联合复方消化酶治疗, 取得了一定效果。

郑丹, 夏冰, 施先艳, 武汉大学中南医院消化内科 湖北省武汉市 430071

郑丹, 宋敏, 吴杰, 王萍, 张姮, 武汉市中心医院消化内科 湖北省武汉市 430014

作者贡献分布: 此课题由郑丹, 夏冰及施先艳设计; 研究过程由郑丹, 宋敏, 吴杰, 王萍及张姮共同完成; 夏冰, 施先艳, 吴杰及王萍对此研究提供指导、技术支持; 数据分析、论文写作由郑丹完成。

通讯作者: 夏冰, 430071, 湖北省武汉市武昌区, 武汉大学中南医院消化内科. bingxia2004@yahoo.com.cn

电话: 027-67812999 传真: 027-67812892

收稿日期: 2008-09-15 修回日期: 2008-12-17

接受日期: 2008-12-22 在线出版日期: 2009-01-28

Combined therapy of domperidone and compound digestive enzymes for functional dyspepsia: an analysis of 84 cases

Dan Zheng, Bing Xia, Xian-Yan Shi, Min Song, Jie Wu, Ping Wang, Heng Zhang

Dan Zheng, Bing Xia, Xian-Yan Shi, Department of Gastroenterology, Wuhan University Zhongnan Hospital, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Dan Zheng, Min Song, Jie Wu, Ping Wang, Heng Zhang, Department of Gastroenterology, the Central Hospital of Wuhan, Wuhan 430014, Hubei Province, China

Correspondence to: Bing Xia, Department of Gastroenterology, Wuhan University Zhongnan Hospital, Wuhan 430071, Hubei Province, China. bingxia2004@yahoo.com.cn

Received: 2008-09-15 Revised: 2008-12-17

Accepted: 2008-12-22 Published online: 2009-01-28

Abstract

AIM: To study the efficacy and safety of combined therapy of domperidone and compound digestive enzymes for functional dyspepsia.

METHODS: Eighty-four patients with functional dyspepsia were randomly grouped into experimental group ($n = 42$) and the controls ($n = 42$). The patients in the control group were only given domperidone 10 mg 3 times per day 30 min before meals for 4 weeks. The patients in the experimental group were given 1 capsule of compound digestive enzyme 3 times a day 30 min after meals in addition to domperidone 10 mg 3 times per day for four weeks. The thera-

peutic efficacy and side effects were compared between the two groups by chi square test.

RESULTS: The general therapeutic efficacy in the experimental group was superior to the controls (85.7% vs 61.9%, $P < 0.05$). The symptoms of upper abdominal pain, abdominal distention, early satiety and stomach burn in the patients in the experimental group were more improved than in the control group. The experimental group had shown shorter onset time than the controls. No severe side-effects were found in the both groups.

CONCLUSION: Combined therapy of domperidone and compound digestive enzymes can more significantly improve general efficacy and symptoms in patients with functional dyspepsia than single use of motility medicine domperidone.

Key Words: Functional dyspepsia; Domperidone; Compound digestive enzymes

Zheng D, Xia B, Shi XY, Song M, Wu J, Wang P, Zhang H. Combined therapy of domperidone and compound digestive enzymes for functional dyspepsia: an analysis of 84 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(3): 336-339

摘要

目的: 观察多潘立酮联合复方消化酶胶囊治疗功能性消化不良的临床疗效和安全性。

方法: 84例功能性消化不良患者随机分为两组, 每组42例, 两组均口服多潘立酮片, 三餐饭前30 min服用10 mg; 试验组加服复方消化酶胶囊, 三餐饭后30 min服用1粒, 4 wk后观察疗效。

结果: 试验组治疗总有效率明显优于对照组, 分别为85.7%和61.9% ($P < 0.05$)。对上腹痛、餐后饱胀、早饱、上腹烧灼感症状改善情况进行比较, 试验组治疗前后的症状总积分及症状改善有效率较对照组有显著性差异 ($P < 0.05$), 而且起效时间明显缩短。两组患者均未发现严重不良反应。

■同行评议者

欧希龙, 副教授, 东南大学中大医院消化科

结论: 多潘立酮联合复方消化酶胶囊治疗功能性消化不良的临床疗效明显优于单用促动力药多潘立酮。

关键词: 功能性消化不良; 多潘立酮; 复方消化酶

郑丹, 夏冰, 施先艳, 宋敏, 吴杰, 王萍, 张姮. 多潘立酮联合复方消化酶治疗功能性消化不良84例. 世界华人消化杂志 2009; 17(3): 336-339

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/336.asp>

0 引言

功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)是临床上最为常见的消化系统疾病之一, 30%人群在一生中均出现过消化不良的症状^[1]. 功能性消化不良的发病率约为30%-50%^[2], 其病因十分复杂, 与胃肠动力障碍、内脏感知异常、胃酸分泌异常及消化不良等有关, 其中胃肠动力障碍是功能性消化不良的重要病因^[3]. 促动力药物(多潘立酮)是治疗功能性消化不良的主要药物, 但由于功能性消化不良的发病机制是多因素的, 单纯促动力治疗效果并不佳. 针对不同机制的多药联合应用治疗功能性消化不良从理论上分析应具有更好的疗效. 我们采用多潘立酮联合复方消化酶治疗功能性消化不良, 并与单用多潘立酮治疗进行比较, 旨在评价该治疗方法治疗功能性消化不良的临床疗效和应用的安全性.

1 材料和方法

1.1 材料 根据功能性消化不良的诊断标准(罗马III)^[4], 选取2007-12/2008-05在我院门诊就诊的84例功能性消化不良患者, 年龄范围在18-65岁, 有餐后饱胀不适, 早饱, 上腹痛, 上腹烧灼感等症状, 上述症状至少存在6 mo, 并且后3 mo符合诊断标准. 经过胃镜、腹部B超或者上消化道造影及肝胆胰等检查, 排除了器质性、系统性及代谢性疾病. 将入选者随机分为两组, 试验组42例, 男20例, 女22例, 平均年龄42.6岁. 对照组42例, 男18例, 女24例, 平均年龄45.2岁. 两组年龄、性别、病情严重程度、分型等差别无统计学意义.

1.2 方法

1.2.1 研究设计: 研究采用随机、平行、对照设计. 试验组口服多潘立酮片(商品名: 吗叮啉), 饭前30 min服用10 mg, 每日3次; 复方消化酶胶囊(商品名: 达吉), 饭后30 min服用1粒, 每日3次. 对照组仅单独给予10 mg吗叮啉, 饭前30 min服用, 每日3次. 治疗疗程均为4 wk, 每周门诊复诊记录

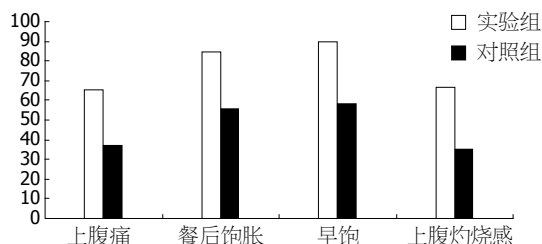


图1 治疗有效率对比.

观察指标.

1.2.2 观察指标: 于用药前后随访并记录患者餐后饱胀、早饱、上腹痛、上腹烧灼感、反酸、烧心、恶心呕吐等主要临床症状改善的情况及时间. 并观察患者的不良反应. 症状评分按临床症状程度分级: 0级为没有症状; I级为有轻度症状, 患者需提醒能意识到症状存在; II级为症状稍重, 患者可意识到症状存在, 但不影响工作, 正常活动未受限制; III级为症状重, 患者意识到症状存在, 无自发缓解期, 或明显影响患者生活及工作, 且难以忍受. 评分标准: 0级为0分; I级为1分; II级为2分; III级为3分.

1.2.3 疗效判断: 判断标准: 显效为症状积分减轻 $\geq 75\%$; 有效为症状积分减轻 $\geq 50\%$, 而 $< 75\%$; 无效为症状积分未减轻或加重. 总有效率 = 显效率 + 有效率.

统计学处理 采用SPSS13.0进行统计分析. 二组比较采用 χ^2 检验、 t 检验. $P < 0.05$ 具有统计学差异.

2 结果

2.1 患者消化不良症状 试验组与对照组在治疗后消化不良症状均有改善, 试验组显效28例, 有效8例, 无效6例, 总有效率85.7%; 对照组显效20例, 有效6例, 无效16例, 总有效率61.9%, 试验组较对照组在治疗后改善更显著($P < 0.05$).

2.2 两组治疗前后消化系症状评分 治疗前, 两组评分相当, 试验组 11.5 ± 2.7 , 对照组 11.3 ± 2.8 ; 治疗后, 试验组 3.2 ± 1.9 , 对照组 6.7 ± 2.1 , 试验组评分较对照组明显减低($P < 0.05$).

2.3 治疗前后两组消化系症状 试验组对主要症状的治疗有效率均较对照组有显著改善(图1), 上腹痛为65.4%与37.5%($P < 0.05$), 餐后饱胀为84.8%与55.5%($P < 0.01$), 早饱为90.0%与58.1%($P < 0.01$), 上腹烧灼感为66.7%与35.0%($P < 0.05$). 治疗前后两组消化系症状发生率见表1.

■ 研究前沿

功能性消化不良的病因十分复杂, 病例机制目前国内外均在不断研究中. 针对发病机制多样的特点, 寻找出最优的多药联合治疗方案将是下一步研究的方向.

■创新盘点

国内外有关单药物治疗FD的文章较多,但国内目前还未见利用消化酶联合其他药物治疗FD的报道.本文提出多潘立酮联合复方消化酶治疗FD,试验表明疗效明显优于单用促动力药多潘立酮.

表 1 治疗前后两组消化系症状发生率比较 $n(\%)$

症状	治疗前		治疗后	
	试验组	对照组	试验组	对照组
上腹痛	26(61.90)	24(57.14)	9(21.43)	15(35.71)
餐后饱胀	33(78.57)	36(85.71)	5(11.90)	16(38.10)
早饱	30(71.43)	31(73.81)	3(7.14)	13(30.95)
上腹	21(50.00)	20(47.62)	7(16.67)	13(30.95)
烧灼感				

2.4 症状改善的平均时间 试验组症状改善时间为 8.3 ± 0.73 d; 对照组症状改善的时间 13.6 ± 0.85 d. 试验组明显低于对照组.

2.5 不良反应 试验组与对照组均无严重不良反应, 没有因为不良反应而退出试验的患者. 对照组两例有恶心、头晕, 试验组也仅有4例出现不良反应, 除恶心、头晕外还有腹泻发生. 但两组临床安全性评价无统计学差异.

3 讨论

FD是消化系统疾病中的常见病和多发病. 功能性消化不良不是一种同质性疾病. 病理生理研究发现, 功能性消化不良有不同的病理生理机制, 不同症状与不同病理生理机制有关, 而非某种病理生理机制能解释所有症状^[5]. 目前国内外并无标准的治疗方案, 不同的发病机制对应不同的药物治疗. 根据罗马III标准将功能性消化不良分为餐后不适综合征和上腹痛综合征, 餐后不适综合征主要与胃动力障碍、内脏感觉异常有关, 促动力药物治疗效果较明显; 而上腹痛综合征与胃酸分泌异常关系更大一些, 抑酸治疗可能效果好; 另外抗焦虑药物和安慰剂治疗功能性消化不良也有一定疗效. 但胃动力障碍被认为在其中发挥最重要的作用, 因此调节胃肠动力仍是最重要的治疗手段之一, 而且动力障碍可继发或伴发化学性消化不良.

多潘立酮是目前临床上最常用的促胃动力剂, 他结构上与丙甲基酮苯基相似, 是一种外周多巴胺受体拮抗剂, 具有外周阻滞作用, 不透过血脑屏障, 特异性的作用于上消化系统, 可使幽门舒张期直径增大, 增加胃蠕动促进胃排空, 减少胃酸对黏膜损伤, 恢复胃窦与十二指肠的协调性, 有效解除上消化系统动力障碍症状^[6]. 目前比较常用的胃动力药还有莫沙比利、伊托比利、曲美布汀等, 国内外多项研究表明这些药物在治疗功能性消化不良方面

也具有良好疗效, 尤其是曲美布汀, 目前研究较多, 其对胃肠运动具有双向调节作用^[2,7], 并有提高内脏敏感性解除疼痛的作用. 消化酶的代表药物有得每通、泌特、达吉等. 得每通是单纯的胰酶制剂, 仅用于胰源性消化不良; 泌特除胰酶外加入了促进胆汁分泌的阿嗪米特以及减少肠道产气的二甲硅油, 对肝胆疾病引起的伴有胀气的消化不良效果好^[8]; 而达吉含有胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、胰脂酶、胰酶和熊去氧胆酸, 分别在胃底、胃窦及十二指肠三个不同部位崩解, 胃肠道内消化酶量升高, 加快碳水化合物、脂肪、蛋白质的消化, 促进腔内食物消化和吸收^[9], 使肠道细菌分解产物特别是气体减少而改善症状, 对各种消化功能不良均有效^[10-11]. 消化酶的补充在胰源性消化不良的治疗已有共识^[12], 但在非胰源性消化不良尤其是功能性消化不良的治疗效果还有待明确. 柯美云 *et al*^[13]观察复方消化酶治疗消化不良患者的疗效和安全性, 结果表明消化酶治疗消化不良是一种安全有效的方法. 本试验中采用随机对照研究, 旨在了解复方消化酶的加入能否明显提高FD的疗效, 研究结果说明, 与单用多潘立酮比较, 合用复方消化酶不仅可明显改善功能性消化不良的症状, 而且在症状改善时间上也明显缩短, 另外, 不良反应也未明显增加.

总之, 多潘立酮联合复方消化酶治疗功能性消化不良的临床疗效明显优于单用促动力药多潘立酮, 值得在临床上应用.

4 参考文献

- 1 张万岱. 功能性胃肠病罗马标准的简介和解读. 世界华人消化杂志 2008; 16: 120-124
- 2 Hiyama T, Yoshihara M, Matsuo K, Kusunoki H, Kamada T, Ito M, Tanaka S, Chayama K, Haruma K. Treatment of functional dyspepsia with serotonin agonists: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1566-1570
- 3 周福生, 祝淑贞. 功能性消化不良发病机制的研究进展. 临床消化病杂志 2005; 17: 256-258
- 4 Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology* 2006; 130: 1377-1390
- 5 邹多武, 许国铭. 功能性消化不良. 中华消化杂志 2006; 26: 765-767
- 6 上海多潘立酮多中心临床研究协作组. 多潘立酮片治疗功能性消化不良的临床研究. 中华消化杂志 2003; 23: 220-222
- 7 Hiyama T, Yoshihara M, Matsuo K, Kusunoki H, Kamada T, Ito M, Tanaka S, Nishi N, Chayama K, Haruma K. Meta-analysis of the effects of

- prokinetic agents in patients with functional dyspepsia. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 304-310
- 8 王凯旋, 李兆申. 消化酶与消化不良. 国际消化病杂志 2008; 28: 14-16
- 9 上海市达吉临床研究协作组. 多种消化酶制剂治疗消化不良的多中心、随机、安慰剂、双盲、平行对照研究. 胃肠病学 2003; 8: 79-82
- 10 Kleveland PM, Johannessen T, Kristensen P, Løge I, Sandbakken P, Dybdahl J, Petersen H. Effect of pancreatic enzymes in non-ulcer dyspepsia. A pilot study. *Scand J Gastroenterol* 1990; 25: 298-301
- 11 Malfertheiner P, Domínguez-Muñoz JE. Effect of exogenous pancreatic enzymes on gastrointestinal and pancreatic hormone release and gastrointestinal motility. *Digestion* 1993; 54 Suppl 2: 15-20
- 12 徐克成. 慢性胰腺炎的胰酶治疗. 中华消化杂志 2005; 25: 313-315
- 13 柯美云, 孙晓红, 钱家鸣, 邹多武, 许国铭, 赵卡冰, 程留芳. 复方消化酶治疗消化不良患者的疗效和安全性随机双盲安慰剂对照多中心临床试验. 中华消化杂志 2008; 28: 179-182

■同行评价

本研究设计合理, 方法可靠, 书写规范, 但新颖性欠缺。

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●

世界华人消化杂志正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一律左顶格写, 后空 1 格写标题; 2 级标题后空 1 格接正文。以下逐条陈述: (1) 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。(2) 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。(3) 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。(4) 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图 1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按 ●、○、■、□、▲、△ 顺序使用标准的符号。统计学显著性用: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则 ¹ $P < 0.05$, ² $P < 0.01$; 第 3 套为 ³ $P < 0.05$, ⁴ $P < 0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P < 0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、- 应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm} \times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴。(5) 致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。(常务副总编辑: 张海宁 2009-01-28)

急性暴发型溃疡性结肠炎合并特发性血小板减少性紫癜1例

邵幼林, 赵卫峰, 黄小平, 陈良云, 甘建和, 林敏

■背景资料

溃疡性结肠炎和特发性血小板减少性紫癜都是与感染、免疫、遗传等因素相关的病因未明的疾病,二者并发极为罕见。

邵幼林, 赵卫峰, 黄小平, 陈良云, 甘建和, 苏州大学附属第一医院感染科 江苏省苏州市 215006

林敏, 苏州大学附属第一医院消化科 江苏省苏州市 215006
作者贡献分布: 邵幼林、赵卫峰及黄小平负责诊治, 组织会诊; 陈良云、甘建和及林敏参与讨论; 邵幼林、陈良云及林敏共同收集资料; 写作由邵幼林完成。

通讯作者: 赵卫峰, 215006, 江苏省苏州市, 大学附属第一医院感染科. zhaoweifeng@yahoo.com.cn

电话: 0512-67780385

收稿日期: 2008-11-14 修回日期: 2008-12-09

接受日期: 2008-12-15 在线出版日期: 2009-01-28

A case study of acute fulminant ulcerative colitis complicated with idiopathic thrombocytopenic purpura

You-Lin Shao, Wei-Feng Zhao, Xiao-Ping Huang, Liang-Yun Chen, Jian-He Gan, Min Lin

You-Lin Shao, Wei-Feng Zhao, Xiao-Ping Huang, Liang-Yun Chen, Jian-He Gan, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Min Lin, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Wei-Feng Zhao, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China. zhaoweifeng@yahoo.com.cn

Received: 2008-11-14 Revised: 2008-12-09

Accepted: 2008-12-15 Published online: 2009-01-28

Abstract

A 19-year-old man was admitted to hospital due to a fever for two weeks and hematochezia for 8 days. A diagnosis of acute fulminant ulcerative colitis (UC) was established, based on clinical features, X-ray and colonoscopy. He was diagnosed as idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) according to clinical features, thrombocytopenia and bone marrow aspiration at the same time. ITP associated with fulminant UC is relatively rare.

Key Words: Ulcerative colitis; Idiopathic thrombocytopenic purpura

Shao YL, Zhao WF, Huang XP, Chen LY, Gan JH, Lin M. A case study of acute fulminant ulcerative colitis complicated with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(3): 340-341

摘要

患者, 男, 19岁, 因发热15 d, 便血8 d入院。典型的临床表现结合实验室检查、腹部平片和结肠镜下所见诊断为急性暴发型溃疡性结肠炎(UC)。入院后患者血小板进行性下降, 排除DIC等引起, 结合骨髓穿刺结果及激素治疗后迅速缓解疗效, 诊断为特发性血小板减少性紫癜(ITP)。急性暴发型UC合并ITP临床罕见。

关键词: 溃疡性结肠炎; 特发性血小板减少性紫癜

邵幼林, 赵卫峰, 黄小平, 陈良云, 甘建和, 林敏。急性暴发型溃疡性结肠炎合并特发性血小板减少性紫癜1例。世界华人消化杂志 2009; 17(3): 340-341

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/340.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)可有多种肠外表现, 但免疫介导的血液病却极罕见。我们现报道急性暴发型UC合并特发性血小板减少性紫癜(idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP)1例。

1 病例报告

男, 19岁, 因发热15 d, 便血8 d, 于2008-07-20急诊入院。患者半月前无明显诱因出现发热, 体温未测, 伴鼻塞流涕, 无畏寒寒战, 无腹痛腹泻, 自行服药(具体不祥)无缓解。8 d前患者解暗红色血便, 数10次, 伴里急后重, 同时感左下腹痛, 便血1 d后感发热好转, 仍解暗红色血便, 每天数10次。当晚便血晕倒后送我院急救。查体: T 37.7℃, P 90次/min, R 19次/min, Bp 105/60 mmHg; 神志清楚, 精神萎靡, 消瘦, 自主体位, 查体欠合作; 全身皮肤见散瘀点、紫癜; 心率90次/min, 律齐, 各瓣膜区未闻及病理性杂音; 腹平软, 左下腹压痛, 无反跳痛, 肠鸣音8次/min; 脑膜刺激征阴性。急查血常规: WBC: $3.7 \times 10^9/L$, NE: 75%, RBC: $2.96 \times 10^{12}/L$, HGB: 99 g/L, PLT: $33 \times 10^9/L$; 生化检查: 白蛋白22.1 g/L, 尿素氮22.3 mmol/L, 肌酐199.8 $\mu\text{mol}/L$, 超敏C反应蛋白15.44 mg/L; 大便隐血阳性, 腹部平片: 乙状结肠扩张, 低位性肠梗阻(图1)。拟“(1)发热、便血待查:

■同行评议者

张小晋, 主任医师, 北京积水潭医院消化内科

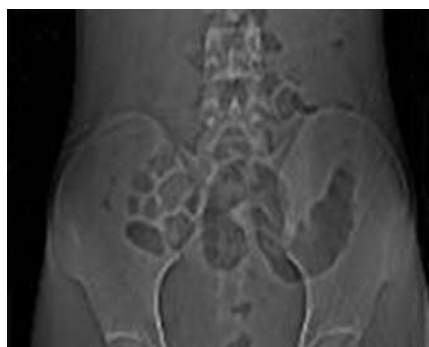


图1 腹部立位平片示乙状结肠扩张。

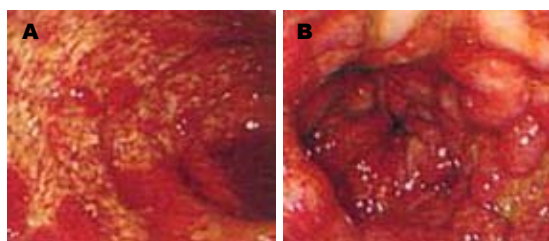


图2 结肠镜观。A: 结肠黏膜充血水肿、糜烂伴出血和溃疡; B: 散在息肉样隆起, 表面糜烂。

细菌性痢疾? 溃疡性结肠炎? (2)低位性肠梗阻, (3)DIC?”收住院。

入院后予全肠外营养(TPN)支持治疗, 隔天大便隐血均为阳性, 病原体检测阴性。第4天血小板降至 $14 \times 10^9/L$, 输血小板10单位。第6天骨穿: 巨核细胞数量增加、成熟障碍。根据临床表现和实验室检查, 符合ITP诊断标准^[1], 予地塞米松10 mg静滴, 3 d后改强的松30 mg po。第7天大便减为2次, 腹部平片: 低位性肠梗阻较前改善, 遂行结肠镜检查: 整个结肠黏膜充血水肿、脆性增加, 广泛片状糜烂伴出血和溃疡, 横结肠至直肠黏膜见散在息肉样隆起, 表面糜烂(图2)。根据临床表现和肠镜结果, 符合UC诊断标准^[2], 加用柳氮黄吡啶(SASP)3 g/d。第10天患者一般情况好转, 无腹痛, 全身皮肤无瘀点、紫癜, 左下腹无压痛, 血小板 $134 \times 10^9/L$, 予出院后继续使用SASP, 强的松治疗。患者临床过程和血小板变化见图3。2 mo后随访患者强的松10 mg/d, SASP 3 g/d维持, 血象正常, 无腹泻等不适。

2 讨论

UC是一种原因不明的肠道慢性非特异性炎症, 腹痛、腹泻、黏液便和血便是主要临床症状, 但暴发型少见。本例除一般UC表现外, 还有身体衰弱、精神萎靡、贫血、低蛋白血症、中毒性结肠扩张等临床和检查异常, 诊断急性暴发型UC。

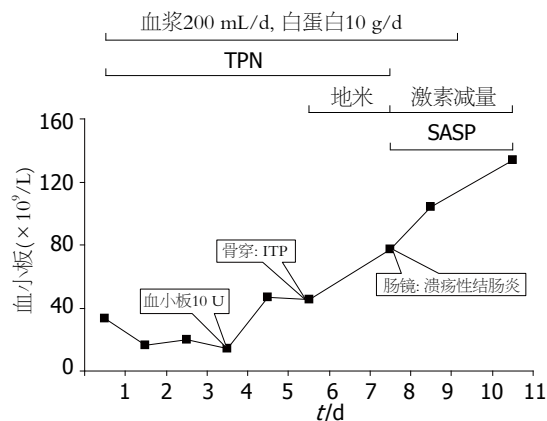


图3 患者入院后临床过程和血小板变化。

UC可伴有多种肠外表现, 包括: 外周关节炎、原发性硬化性胆管炎等。但UC合并ITP罕见, Mizuta *et al*^[3]总结了17例个案报道, 国内尚未见报道。ITP以血小板减少、骨髓巨核细胞数正常或增生伴成熟障碍, 临床表现为皮肤、黏膜出现瘀点、瘀斑。但需排除其他原因引起的血小板减少。已证明未控制的严重的UC可发生高凝和继发的纤溶异常, 甚至DIC^[4]。而UC本身也可出现纤溶物增加^[5]。本患者存在DIC的临床表现, >1次DIC实验指标异常, 但不够诊断标准, 排除DIC; 同时排除其他引起血小板减少和血液凝聚-纤溶异常的疾病, 根据检查结果和治疗反应符合ITP。UC和ITP给予激素治疗均可取得疗效。本患者予激素和SASP治疗, 有限时间内取得较好疗效。但病情如果复发, 有些患者需要使用免疫抑制剂或结肠或/和脾切除。

致谢: 感谢本院消化科和血液科医师在本病诊治中提供的帮助。

3 参考文献

- 中华医学会儿科学分会血液学组, 中华儿科杂志编辑委员会. 特发性血小板减少性紫癜诊疗建议(修订草案). 中华儿科杂志 1999; 37: 50-51
- 中华医学会儿科学分会. 对炎症性肠病诊断治疗规范的建议. 中华消化杂志 2001; 21: 236-239
- Mizuta Y, Isomoto H, Kadokawa Y, Akazawa Y, Chin S, Kanazawa Y, Takeshima F, Omagari K, Murase K, Sawai T, Nakagoe T, Murata I, Kohno S. Immune thrombocytopenic purpura in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 2003; 38: 884-890
- Suskind DL, Murray K, Christie D. An unusual case of an ulcerative colitis flare resulting in disseminated intravascular coagulopathy and a bladder hematoma: a case report. *BMC Gastroenterol* 2004; 4: 26
- Souto JC, Martínez E, Roca M, Mateo J, Pujol J, González D, Fontcuberta J. Prothrombotic state and signs of endothelial lesion in plasma of patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 1883-1889

■同行评价

本文病例交代清楚, 图片清晰, 可以在临床诊断治疗时给与临床医师提供参考和帮助。

编辑 李军亮 电编 何基才

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!

陈光 教授
吉林大学第一医院消化器官外科

陈耀凯 副教授
中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所

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

迟宝荣 教授
吉林大学第一医院消化内科

杜群 副研究员
广州中医药大学脾胃研究所药理室

范建高 教授
上海交通大学附属第一人民医院消化内科/脂肪肝诊治中心

高泽立 副教授
上海交通大学医学院附属第九人民医院周浦分院消化科

戈之铮 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

龚建平 教授
重庆医科大学附属第二医院肝胆外科

郭晓钟 教授
中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

金瑞 教授
首都医科大学附属北京佑安医院消化科

刘绍能 主任医师
中国中医科学院广安门医院消化科

禄韶英 主治医师
西安交通大学医学院第一附属医院普外科

倪润洲 教授
江苏省南通大学附属医院消化内科

欧希龙 副教授
江苏省东南大学中大医院消化科

彭曦 副研究员
重庆市西南医院烧伤研究所

石统东 副教授
重庆医科大学附属第二医院感染病科

宋振顺 教授
中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科

孙学英 教授
哈尔滨医科大学第一附属医院黑龙江省肝脾外科中心

谭学瑞 教授
汕大医学院第一附属医院院长室

田晓峰 教授
大连医科大学附属第二医院普通外科

万军 主任医师
中国人民解放军解放军总医院南楼老年消化科

吴建国 教授
武汉大学生命科学院病毒学国家重点实验室

吴泰璜 教授
山东省立医院肝胆外科

肖恩华 教授
中南大学湘雅二医院放射教研室

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

伊力亚尔·夏合丁 教授
新疆医科大学第一附属医院胸外科

阴赅宏 研究员
首都医科大学附属北京友谊医院感染暨急救医学科

张小晋 主任医师
北京积水潭医院消化内科

张占卿 主任医师
上海市复旦大学公共卫生中心