

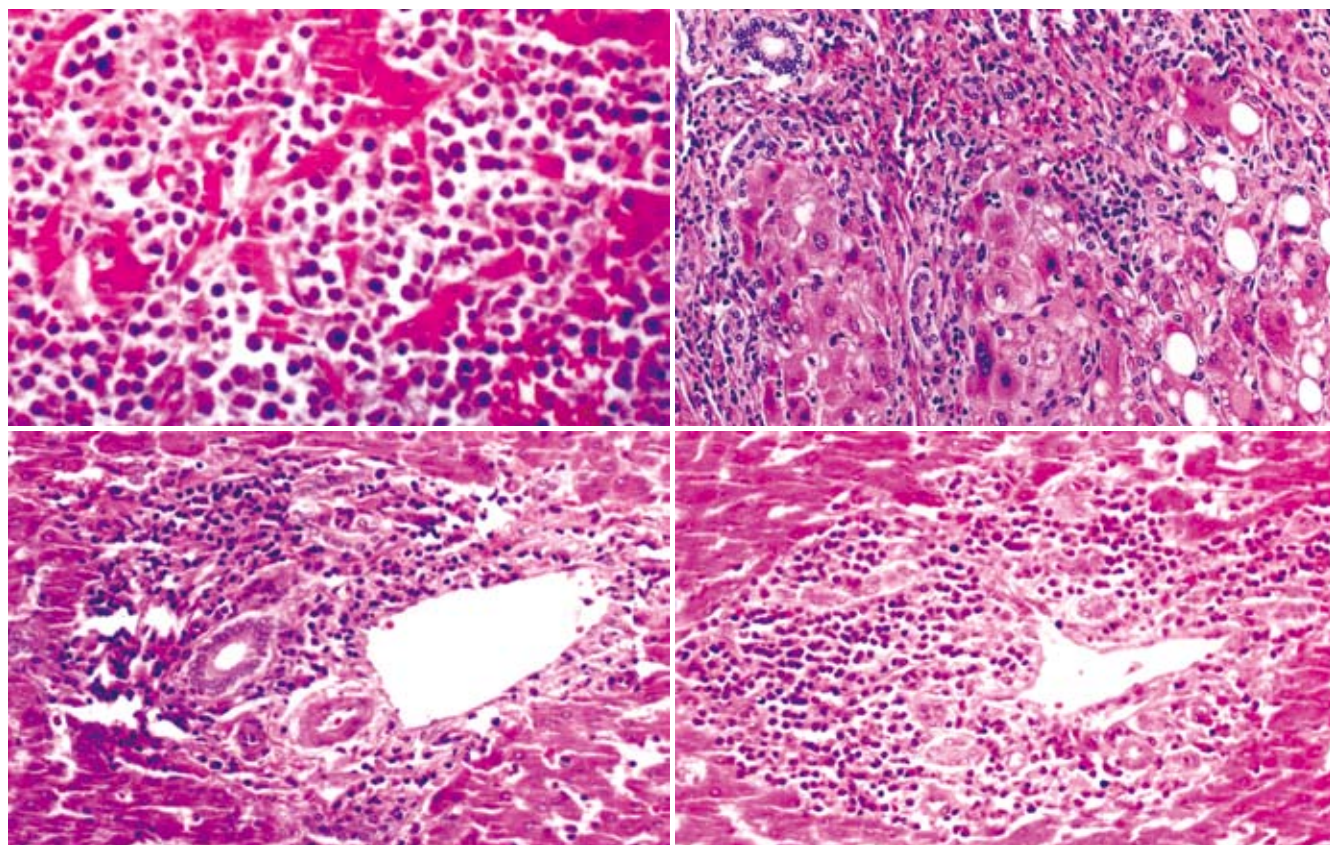
ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2009年3月28日 第17卷 第9期 (Volume 17 Number 9)



9 / 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
田宇彬教授
王邦茂教授
王炳元教授
王承党副教授
王晓艳副教授
闻勤生教授
夏冰教授
夏时海副教授
徐可树教授
许乐主任医师
杨建民教授
姚树坤教授
叶红军主任医师
张春清教授
张国梁主任医师
张军教授
张小晋主任医师
张晓岚教授
张筱茵副教授
张志坚教授
郑培永副教授
郑鹏远教授
周国雄主任医师
朱春兰主任医师
邹晓平主任医师

消化外科学

别平教授
蔡开琳副教授
蔡三军主任医师
曹杰主任医师

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

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

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

消化感染病学

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

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

消化中医药学

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

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

消化肿瘤学

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

消化影像学

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

消化内镜及介入治疗学

丁佑铭教授
郝俊鸣副主任医师
潘林娜教授
孙明军教授
万军教授

吴硕东教授
袁友红副教授

消化中西医结合学

唐文富副教授
王学美研究员
魏睦新教授
张春虎副教授

消化基础研究

曹洁副教授
曹鹏副研究员
樊红副教授
高春芳研究员
高国全教授
高英堂研究员
管冬元副教授
胡旭初副教授
黄文林教授
李刚教授
李杰副教授
李永哲副研究员
李增山副教授
刘克辛教授
梅林教授

彭曦副研究员
钱睿哲教授
任超世研究员
任浩副教授
台桂香教授
谭学瑞教授
田颖刚副研究员
汪思应教授
吴军研究员
吴俊华副教授
徐宁志研究员
许文燮教授
姚登福教授

阴赅宏研究员
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3月28日 第17卷 第9期 (总第269期)

述 评	849 Smad4在肿瘤侵袭和转移中的作用 黄晓丹, 张发明, 季国忠
基础 研究	854 阿司匹林对幽门螺杆菌定植的影响 王静, 王蔚虹, 李江, 刘芳勋
	862 水砷暴露大鼠肝损伤和肝纤维化模型的建立 闫超, 吴君, 刘芙蓉, 张莉莎
	867 同种异体大鼠骨髓移植诱导肝移植免疫耐受 傅锦波, 王效民, 黄小进, 罗琪, 尹震宇, 卢明珠, 余德
	873 <i>CDK1p58</i> 基因过表达抑制INS-1细胞的增殖 刘洋, 杨红旺, 孟雁
	877 JAK/STAT信号通路在胰弹性蛋白酶诱导大鼠Kupffer细胞分泌IL-18中的作用 李敏利, 朱人敏, 张晓华, 史薇, 杨妙芳, 季洪赞, 郭婧芸
	882 永生化骨髓间充质干细胞的生物学特性 方驰华, 程斌, 范应方
临床 研究	886 福建地区乙型肝炎肝硬化与人类白细胞抗原DRB1基因的相关性 李东良, 彭经宙, 赵书民, 林小钦, 杨才生, 林华
	891 胆管炎性狭窄疤痕组织中PDGF和CTGF的表达及意义 陈卫明, 李彦旭, 柴新群, 冯贤松
文 献 综 述	896 氧化应激与非酒精性脂肪性肝病研究进展 杨丽丽, 柳涛, 王森, 邢练军, 季光, 郑培永
	901 PDZ连接激酶/T-LAK细胞源蛋白激酶研究进展 张安平, 刘宝华
	906 数字减影血管造影对小肠出血的诊断价值 李洪翠, 李肖, 杨丽, 唐承薇
研 究 快 报	910 胰岛淀粉样多肽在生后发育期间家兔十二指肠中的表达及意义 胡赟, 梁文妹
	914 甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物的制备及体外缓释特征 杨建华, 路新卫, 韦莉萍, 丁婷
临 床 经 验	918 乳铁蛋白联合标准疗法根除幽门螺杆菌的荟萃分析 邹健, 董洁, 于晓峰
	927 胃间质瘤的内镜早期诊断及腹腔镜手术治疗 王震宇, 秦鸣放, 赵宏志, 蔡旺, 王光霞, 张莉, 李焕喜
	931 三叶因子1与胃癌发生发展过程中血管生成的关系 赖铭裕, 廖晓霞, 林瑶光, 梁志海, 陈晖, 李素艳, 蒋敦科, 刘莹
	935 原发性肝脏淋巴瘤的临床病理特点及其外科治疗 刘玉国, 脱帅, 徐克, 孙士财
	940 血浆脑钠肽原对肝硬化难治性腹水的判断价值

	<p>陈峰松, 赵建妹, 王爱华, 何荣丽, 马文婷</p> <p>945 结直肠癌与其他恶性肿瘤血清低分子差异蛋白的比较</p> <p>盛新华, 高春芳, 王秀丽, 李冬晖, 郑国宝</p> <p>950 结直肠类癌内镜下诊断及治疗51例</p> <p>韩建勇, 赵继先, 康金旺, 王颖</p>
致 谢	954 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	<p>853 全国消化疾病诊治进展学习班在京举办</p> <p>861 世界华人消化杂志数字用法标准</p> <p>866 第二十一次全国中西医结合消化学术会议征文通知</p> <p>872 <i>WJG</i>荣获2007年“中国百种杰出学术期刊”和2008年中国国际化精品科技期刊</p> <p>876 世界华人消化杂志名词术语标准</p> <p>881 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>885 《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆2008年版《中文核心期刊要目总览》</p> <p>895 中国科技期刊引证报告(核心版)发布<i>WJG</i> 2007年影响因子0.745</p> <p>900 第九次全国消化系疾病学术会议征文通知</p> <p>909 2009年广东省中西医结合、中医脾胃消化病学术会议暨国家级继续教育项目消化病进展研讨班征文通知</p> <p>913 世界华人消化杂志修回稿须知</p> <p>926 世界华人消化杂志计量单位标准</p> <p>930 第十二届全国腹部影像学会议征文通知</p> <p>944 世界华人消化杂志英文摘要要求</p> <p>949 世界华人消化杂志参考文献要求</p> <p>953 《世界胃肠病学杂志》(英文版)成功通过评审被PMC收录</p>
封面故事	<p>刘玉国, 脱帅, 徐克, 孙士财. 原发性肝脏淋巴瘤的临床病理特点及其外科治疗.</p> <p>世界华人消化杂志 2009; 17(9): 935-939</p> <p>http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/935.asp</p>
本期责任人	<p>编务 刘晓芳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 吴鹏朕; 责任编辑 李军亮; 英文编辑 张海宁, 张晓枚;</p> <p>审核编辑 张海宁; 形式规范 马连生</p>

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
陈可冀 题写版权刊名
(旬刊)

创 刊 1993-01-15
改 刊 1998-01-25
出 版 2009-03-28
原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣
总 编 辑 马连生
常务副总编辑 张海宁
编辑部主任 张海宁
期 刊 名 称 世界华人消化杂志
主 管 单 位 山西省科学技术厅
主 办 单 位 太原消化病研治中心

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

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

印刷 北京科信印刷厂

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

订购 全国各地邮电局

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

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

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

特别声明

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

2009年版权归世界华人消化杂志所有

中国标准连续出版物号 **ISSN 1009-3079**
CN 14-1260/R

邮发代号 82-262

国外代号 **M 4481**

国内定价 每份24.00元 全年864.00元

广告经营许可证 1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

March 2009 Contents in Brief Volume 17 Number 9

EDITORIAL	849 Role of Smad4 in cancer invasion and metastasis <i>Huang XD, Zhang FM, Ji GZ</i>
BASIC RESEARCH	854 Effects of aspirin on <i>Helicobacter pylori</i> colonization <i>Wang J, Wang WH, Li J, Liu FX</i> 862 Model establishment of liver injury and fibrosis in rats exposed to oral arsenic solution <i>Yan C, Wu J, Liu FR, Zhang LS</i> 867 Immune tolerance in orthotopic liver transplantation induced by allogenic bone marrow transplantation in rats <i>Fu JB, Wang XM, Huang XJ, Luo Q, Yin ZY, Lu MZ, Yu D</i> 873 Over-expression of <i>CDK11p58</i> gene suppresses the proliferation of rat insulinoma cell line INS-1 <i>Liu Y, Yang HW, Meng Y</i> 877 Role of JAK/STAT signaling pathway in pancreatic elastase-induced secretion of interleukin-18 within rat Kupffer cells <i>Li ML, Zhu RM, Zhang XH, Shi W, Yang MF, Ji HZ, Guo JY</i> 882 Biological characteristics of immortalized bone marrow mesenchymal stem cells <i>Fang CH, Cheng B, Fan YF</i>
CLINICAL RESEARCH	886 Association between liver cirrhosis due to HBV infection and HLA-DRB1 gene polymorphism in Fujian Province <i>Li DL, Peng JZ, Zhao SM, Lin XQ, Yang CS, Lin H</i> 891 Expression and significance of PDGF and CTGF in cholangitic stenosis <i>Chen WM, Li YX, Chai XQ, Feng XS</i>
REVIEW	896 Progress in research of oxidative stress and non-alcoholic fatty liver disease <i>Yang LL, Liu T, Wang M, Xing LJ, Ji G, Zheng PY</i> 901 Progress in research of PDZ-binding-kinase/T-LAK cell-originated protein kinase <i>Zhang AP, Liu BH</i> 906 Diagnostic value of digital subtraction angiography in small intestinal bleeding <i>Li HC, Li X, Yang L, Tang CW</i>
RAPID COMMUNICATION	910 Expression of islet amyloid polypeptide in duodenum of rabbits during the postnatal development period <i>Hu Y, Liang WM</i> 914 Preparation of Metronidazole/MMT antibacterial composite and <i>in vitro</i> release characteristics <i>Yang JH, Lu XW, Wei LP, Ding T</i>
CLINICAL PRACTICE	918 Meta-analysis on the efficacy of lactoferrin supplementation combined with standard treatment during <i>Helicobacter pylori</i> eradication therapy <i>Zou J, Dong J, Yu XF</i> 927 Early endoscopic diagnosis and laparoscopic surgery for gastric stromal tumors

	<p><i>Wang ZY, Qin MF, Zhao HZ, Cai W, Wang GX, Zhang L, Li HX</i></p> <p>931 Expression of trefoil factor 1 in gastric cancer and its correlation with neovascularization <i>Lai MY, Liao XX, Lin YG, Liang ZH, Chen H, Li SY, Jiang DK, Liu Y</i></p> <p>935 Clinicopathological features of primary liver lymphoma and its surgical therapy <i>Liu YG, Tuo S, Xu K, Sun SC</i></p> <p>940 Value of serum plasma pro-brain natriuretic peptide in the diagnosis of refractory ascites due to cirrhosis <i>Chen FS, Zhao JM, Wang AH, He RL, Ma WT</i></p> <p>945 Comparative analysis of differential serum low molecular weight proteins between colorectal cancer and other malignant tumors <i>Sheng XH, Gao CF, Wang XL, Li DH, Zheng GB</i></p> <p>950 Diagnosis and treatment of 51 colorectal carcinoid tumors with endoscopy <i>Han JY, Zhao JX, Kang JW, Wang Y</i></p>
ACKNOWLEDGMENT	954 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<p><i>Liu YG, Tuo S, Xu K, Sun SC</i>. Clinicopathological features of primary liver lymphoma and its surgical therapy.</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(9): 935-939</p> <p>http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/935.asp</p>
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	<p>Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Peng-Zhen Wu</i></p> <p>Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i> English Language Editor: <i>Hai-Ning Zhang, Xiao-Mei Zhang</i></p> <p>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 March 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: wjcd@wjgnet.com

PRINTING

Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

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

OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

HONORARY EDITOR-IN-CHIEF

Bo-Rong Pan

EDITOR-IN-CHIEF

Lian-Sheng Ma

SCIENCE EDITORS

Director: Hai-Ning Zhang

SUBSCRIPTION

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

CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

COPYRIGHT

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

SPECIAL STATEMENT

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

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

Smad4在肿瘤侵袭和转移中的作用

黄晓丹, 张发明, 季国忠

黄晓丹, 张发明, 季国忠, 南京医科大学第二附属医院消化医学中心 南京医科大学消化内镜研究所 江苏省南京市 210011

季国忠, 教授, 主要从事消化系疾病的诊治及肝脏疾病发病机制的研究。

江苏省自然科学基金资助项目, No. BK2001168

南京市科技发展基金资助项目, No. 20080128

南京医科大学科技发展基金重点资助项目, No. CX2004029

南京医科大学科技发展基金重点资助项目, No. 08NMUZ021

作者贡献分布: 本文综述由黄晓丹完成; 张发明和季国忠审校。

通讯作者: 季国忠, 教授, 210011, 江苏省南京市, 南京医科大学第二附属医院消化医学中心, 南京医科大学消化内镜研究所。jgzl@163.com

电话: 025-58509931

收稿日期: 2008-02-05 修回日期: 2009-03-10

接受日期: 2009-03-15 在线出版日期: 2009-03-28

Role of Smad4 in cancer invasion and metastasis

Xiao-Dan Huang, Fa-Ming Zhang, Guo-Zhong Ji

Xiao-Dan Huang, Fa-Ming Zhang, Guo-Zhong Ji, Institute of Digestive Endoscopy and Medical Center for Digestive Diseases, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, Jiangsu Province, China

Supported by: the Nature Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2001168; the Program of Science and Technology of Nanjing, No. 20080128; the Science and Technology Innovation Foundation of Nanjing Medical University, No. CX2004029; and the Science and Technology Innovation Foundation of Nanjing Medical University, No. 08NMUZ021

Correspondence to: Professor Guo-Zhong Ji, Institute of Digestive Endoscopy and Medical Center for Digestive Diseases, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, Jiangsu Province, China. jgzl@163.com

Received: 2009-02-05 Revised: 2009-03-10

Accepted: 2009-03-15 Published online: 2009-03-28

Abstract

Transforming growth factor beta (TGF- β) is a ubiquitous and essential regulator of cellular and physiologic processes including proliferation, differentiation, migration, cell survival, angiogenesis and immunosurveillance. The tumor suppressor gene Smad4 (DPC4) is the central intracellular mediator of transforming growth factor- β -Smad(TGF- β -Smad) signaling, which is a key pathway in cancer invasion and metastasis. This review focuses on the mechanisms

whereby the Smads are modified and regulated, and summarizes current views on the role of Smad4 in tumorigenesis, with emphasis on cancer invasion and metastasis.

Key Words: Transforming growth factor beta; Smad4; Tumor; Metastasis

Huang XD, Zhang FM, Ji GZ. Role of Smad4 in cancer invasion and metastasis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(9): 849-853

摘要

转化生长因子 β (transforming growth factor beta, TGF- β)是一种对细胞生长、分化和多种生理、病理过程起重要调节作用的细胞因子。TGF- β -Smad信号通路是肿瘤发生机制中的重要通路, Smad4在TGF- β -Smad通路中处于核心地位。近来大量研究发现, Smad4在肿瘤的侵袭和转移过程中发挥重要作用, 本文就此予以综述。

关键词: 转化生长因子 β ; Smad4; 肿瘤; 转移; 侵袭

黄晓丹, 张发明, 季国忠. Smad4在肿瘤侵袭和转移中的作用. *世界华人消化杂志* 2009; 17(9): 849-853

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/849.asp>

0 引言

由于进化的发展和多细胞生命的出现, 严控细胞的运动、分裂、分化和参与组织形成成为必须。错综复杂的细胞间通讯系统确保单个细胞在整个有机体中表现出“得体”的行为。在这些通讯方式之中, 最普遍的是与转录调节因子配对的膜受体所识别的分泌调节因子。转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)就是这些分泌调节因子中最重要的一种, 发挥激素样活性的多功能多肽作用^[1-2]。TGF- β 家族包括TGF- β 、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)、Activin、Inhibin等^[1,3]。TGF- β 信号通路的核心是Smad转录因子, 人和鼠基因组中编码8种Smad蛋白, Smad4在TGF- β 通路中处

■背景资料

转化生长因子 β (TGF- β)是一种对细胞生长、分化和多种生理、病理过程起重要调节作用的细胞因子。TGF- β -Smad信号通路是肿瘤发生机制中的重要通路, Smad4在TGF- β -Smad通路中处于核心地位, 在肿瘤的侵袭和转移过程中发挥重要作用。

■同行评议者

刘正稳, 教授, 西安交通大学医学院第一附属医院感染科

■研发前沿

肿瘤细胞的运动是肿瘤发生转移的重要条件, 研究肿瘤细胞运动的动力学机制, 是目前研究肿瘤转移的重要热点, 大量的研究文献的发表已经凸显该领域的重要性。

于中枢地位^[1,4]。目前, Smad4在胰腺癌^[5]、结肠癌^[6]、胃癌^[7]、肝癌^[8-9]等肿瘤中的发生机制得到了深入的研究。我们曾对这方面的进展予以综述^[10]。但是, Smad4在肿瘤进展和转移中机制的研究越来越多, 我们也在此领域获得了一定的研究进展。因此, 本综述进一步回顾Smad4在肿瘤侵袭和转移中作用的研究进展。

1 TGF-β-Smad信号通路及Smad4的核心作用

TGF-β于19世纪80年代早期得以鉴定, 现被认为是一种重要的组织内稳态和胚胎发育的调节因子^[2]。TGF-β引起的生理反应因受体细胞的内在特性不同而表现各异。所有TGF-β细胞因子的信号转导都通过一种相当简单而高度保守的机制介导^[1]。Smad蛋白家族成员作为TGF-β下游受体激酶, 在TGF-β信号通路中扮演所必须的介导作用。研究发现, Smad是I型TGF-β受体激酶的底物以及磷酸化的Smad聚集于细胞核^[11], 证实了有活性的TGF-β受体和Smads之间的联系, 明确了Smad是TGF-β信号通路的中枢“变换器”。

迄今为止, 在哺乳动物中发现了8种不同的Smads家族成员^[1]。根据他们的结构和功能不同, Smads被分为3个亚族^[1]: (1)受体激活的Smads(receptor-regulated smads, R-Smads), 包括Smad1、2、3、5、8, 其肽链竣基端含有保守的磷酸化位点SSxS基序, 可与TGF-β受体直接作用并磷酸化, 之后与Smad4结合为二聚体转位入核。R-Smads与信号通路的特异性有关: Smad2和Smad3介导TGF-β的信号, Smad1、5、8则介导BMP的信号; (2)通用型Smad(common-mediator smad, Co-Smad), 目前在人类仅发现Smad4, 他是所有R-Smads的结合配体, 并促进R-Smads转移入细胞核, 可与Smads家族其他成员相互作用形成稳定的异源多聚体, 转位入核后调节靶基因转录; (3)抑制型Smads(inhibitory-smads, I-Smads), 包括Smad6、7, 为TGF-β-Smad信号转导通路的负调节因子, 可与R-Smads竞争性结合受体, 阻止R-Smads磷酸化, 从而阻断TGF-β的生物学效应。Smads家族成员的结构十分相似。其中, 最引人重视的是其氨基末端和羧基末端区域, 即分别为mad homology domain 1(MH1)结构域和mad homology domain 2(MH2)结构域^[2]。R-Smads和Co-Smad的MH1和MH2域高度同源。MH1域具有序列特异的DNA结合能力, MH2域是形成同源/异源聚合物的结合位点, Smad4的MH2域同时还具有转录激活和核定

位功能^[2]。Smad4在Smads介导信号时主要起协同作用, 他自己并不能传递信号。Smad4与不同Smads蛋白的协同作用是TGF-β超家族信号转导途径中的关键环节, 如同交通枢纽, 涉及Smad4下游调控或者交互对话信号通路, 如mitogen-activated protein kinase(MAPKs)、cyclin-dependent kinases(CDKs)、phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K)以及最近发现的调节上皮细胞间充质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)和细胞外基质重塑和肿瘤细胞运动等方面^[12]。

2 Smad4扮演抑癌基因的作用

Smad4最初是在胰腺癌中发现的, 也被称为Deleted in Pancreatic Carcinoma Locus 4(DPC4), 其缺失和突变率为50%, 并是胰腺癌诊断中的一个重要标志物^[13]。但是, 有人认为TGF-β抵抗的产生和Smad4的缺失可能是相互独立的事件^[1,14], 因某些Smad4缺陷的细胞系仍可获得TGF-β转录效应, 且有的Smad4缺陷的肿瘤细胞依然可以通过TGF-β刺激抑制其生长, 而某些TGF-β效应缺陷的细胞系, 恢复Smad4后, TGF-β信号并不能恢复^[15]。

Smad4在结肠癌中功能性缺失率为30%^[16]。Xie *et al*^[17]采用组织Microarray的方法, 研究了瑞典600多例结肠癌样本, 结果提示2.3%的病例不表达Smad4基因, Smad2、pSmad2和Smad4不表达均与进展肿瘤、淋巴结转移和生存时间短有关。最近研究显示, Smad4对结肠癌的转移有重要作用^[18-19], 长期的临床病例随访和病理学资料研究表明Smad4低表达与结肠癌转移和预后不良有相关性^[19-20]。

韩国一研究小组的随访研究^[21]还发现胃癌组织Smad4阳性表达的胃癌患者, 其预后比阴性者好。临床随访研究^[22]也发现了类似的结果。Okano *et al*^[23]检测了2型人类表皮生长因子受体(HER2)和TGF-β两种生长信号系统, 发现Smad4表达减少的HER2阳性胃癌过度表达环氧合酶-2(COX-2)与其预后差有关。

TGF-β-Smad通路在肝细胞性肝癌中的机制研究较少, 人肝细胞性肝癌中Smad4的突变率较低^[24], 不同研究的结果差别较大。Longerich *et al*^[25]检测肝细胞性肝癌的Smad4 mRNA水平, 发现Smad4缺失率为10%。Ijichi *et al*^[15]观察了8种肝癌细胞系, 无一发生TGF-β-Smad通路功能受损, 故认为该通路对于肝癌不发挥肿瘤抑制

■相关报道

体外研究表明, 沉默Smad4促进肿瘤细胞运动相关基因一致性上调表达。临床病理及随访研究表明, Smad4与肿瘤进展和转移有关。

作用. 而Yakicier *et al*^[26]的报道则相反. Tannapfel *et al*^[27]用蛋白芯片检测肝细胞性肝癌上调和下调蛋白时, 也发现Smad4下调. Torbenson *et al*^[24]报道肝癌Smad4表达增加与TβR II过度表达具有显著的相关性. 我们检测了Smad4信号通路中多种分子在肝癌中的表达^[9], 通过Smad4 shRNA慢病毒表达载体^[28], 转染肝癌细胞后, 细胞凋亡减少, 侵袭能力增强^[8].

在食管癌细胞中, 32.2%的肿瘤表达Smad4^[29]. 术后随访显示, Smad4低表达的患者比Smad4高表达的患者生存时间长^[29]. Smad4的表达可以提示促进肿瘤进展和淋巴结转移的发生^[29]. TGF-β-Smad信号通路与肾癌的发生也密切相关^[30]. 免疫组化实验发现, Smad蛋白的表达降低参与了肾细胞癌的发生, TGF-β-Smad信号通路的改变可能是肾癌发生的重要因素^[30]. 在41例宫颈癌的原发癌组织中, Smad4蛋白的缺失率为24.4%, Smad4低表达占63.4%, 提示Smad4基因的表达改变是宫颈癌发生一个重要因素^[31].

此外, Smad4在乳腺癌骨转移的发生中发挥重要作用^[32]. 也有人对肺癌^[33]、前列腺癌^[34]等进行过研究, 都发现有较少的基因缺失率. 然而, 在众多肿瘤中, Smad4在消化系统肿瘤尤其是胰腺癌缺失和突变率最高.

3 Smad4调控肿瘤细胞侵袭、转移的依据

肿瘤细胞的侵袭和转移是其最重要的生物学行为, 是导致患者死亡的关键. 临床病理资料表明Smad4与肿瘤的侵袭、远处转移、国际抗癌联盟肿瘤TNM分期有密切关系. 日本一个研究小组通过检测大量人胃癌组织Smad4蛋白表达和术后生存分析, 发现Smad4蛋白低表达率为25%, Smad4蛋白保守表达组患者比低表达组患者的预后好; Smad4表达与胃癌侵袭胃壁的深度有关, 侵袭越深, 表达越少; 多因素分析还发现, Smad4表达扮演胃癌独立预后因子的作用. 韩国的一项大宗临床病例研究也报道类似的结果, 并发现Smad4在TNM分期I期胃癌组中的表达明显高于中晚期胃癌. 这些研究从临床角度反映了Smad4蛋白与胃癌的侵袭、分期、远处转移有密切关系. 长期的临床病例随访和病理学资料研究表明Smad4低表达与结肠癌患者发生转移和预后不良有相关性^[17-19,35].

体外研究表明, 沉默Smad4促进肿瘤细胞运动相关基因一致性上调表达^[36]. 该现象首先是日本一个研究小组于2005年在《Oncogene》

报道^[36], 该研究针对胰腺癌细胞, 用RNAi技术沉默Smad4, 通过与对照细胞系对比, 以基因芯片和蛋白质组学技术, 发现了246个以前未报道的TGF-β下游基因, 多种上调和下调蛋白与细胞运动、细胞骨架调节、细胞周期调节、细胞增殖、核的转运、氧化损伤等有关; 最让人感兴趣是, 他们观察到TGF-β1刺激Smad4基因敲低的细胞系后, 5种有关细胞运动的基因都一致上调, 而与细胞黏附、细胞增殖或抗凋亡、细胞结构、细胞转录、细胞代谢、细胞转运等相应的相关分子, 都没有呈现这一一致性趋势. 这提示抑制肿瘤细胞Smad4蛋白表达, 可能影响肿瘤分子细胞动力学变化. 我们的研究发现, 肝癌细胞Smad4沉默后, 肿瘤细胞凋亡减少、增殖增加、迁徙力增加^[8].

影响肿瘤细胞侵袭和转移的因素, 除了细胞内的细胞动力机制外, 还涉及细胞外基质、神经递质等多种因素^[37-44]. 细胞外基质蛋白的降解与Smad4与有关, 如基质金属蛋白酶9(MMP9)、基质金属蛋白酶2(MMP2)等^[38-40]. 上皮细胞间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是有极性的上皮细胞转化成具有活动能力的细胞的过程, 近年来, EMT被提出参与肿瘤细胞的侵袭和转移^[41], 其特征之一是上皮型钙黏蛋白(E-Cadherin)表现丧失^[42-43], 有研究显示Smad4与上皮细胞间充质转化有关^[5].

4 结论

Smad4在众多肿瘤中缺失或突变, 尤其是在消化系统肿瘤, 发挥抑癌基因功能. 最近, Smad4与肿瘤进展和转移相关的现象正在得到关注, 但是这方面的研究还远远不够. 目前对Smad4的研究尚待深入: 关于Smad4所调节的靶基因及其调控因素还不清楚; 在复杂的胞内信号转导系统中, Smad4是否是其他信号转导通路与TGF-β超家族信号通路间的整合点之一, 并发挥何种作用. 总之, 研究Smad4如何通过介导肿瘤分子细胞动力学变化而影响肿瘤细胞的运动、侵袭和转移, 对于阐明肿瘤发展的机制和提供新的防治策略有重要意义.

5 参考文献

- 1 Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 2003; 425: 577-584
- 2 Massagué J. TGFbeta in Cancer. *Cell* 2008; 134: 215-230
- 3 Gordon KJ, Blobe GC. Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human

■创新盘点

本文综述Smad4在肿瘤的侵袭和转移过程中的重要作用, 重点回顾Smad4在介导肿瘤分子细胞动力学方面的研究依据.

■应用要点

TGF- β -Smad信号通路是肿瘤发生机制中的重要通路, Smad4在通路中处于关键地位, 针对的Smad4研究不仅可以深入探索肿瘤侵袭、转移的发病机制, 也为肿瘤的防治提供了更多的靶点和策略。

- disease. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1782: 197-228
- 4 Wang LH, Kim SH, Lee JH, Choi YL, Kim YC, Park TS, Hong YC, Wu CF, Shin YK. Inactivation of SMAD4 tumor suppressor gene during gastric carcinoma progression. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 102-110
 - 5 Zhao S, Venkatasubbarao K, Lazor JW, Sperry J, Jin C, Cao L, Freeman JW. Inhibition of STAT3 Tyr705 phosphorylation by Smad4 suppresses transforming growth factor beta-mediated invasion and metastasis in pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2008; 68: 4221-4228
 - 6 Wang H, Rajan S, Liu G, Chakrabarty S. Transforming growth factor beta suppresses beta-catenin/Wnt signaling and stimulates an adhesion response in human colon carcinoma cells in a Smad4/DPC4 independent manner. *Cancer Lett* 2008; 264: 281-287
 - 7 Barros R, Pereira B, Duluc I, Azevedo M, Mendes N, Camilo V, Jacobs RJ, Paulo P, Santos-Silva F, van Seuning I, van den Brink GR, David L, Freund JN, Almeida R. Key elements of the BMP/Smad pathway co-localize with CDX2 in intestinal metaplasia and regulate CDX2 expression in human gastric cell lines. *J Pathol* 2008; 215: 411-420
 - 8 Huang S, Zhang F, Miao L, Zhang H, Fan Z, Wang X, Ji G. Lentiviral-mediated Smad4 RNAi induced anti-proliferation by p16 up-regulation and apoptosis by caspase 3 down-regulation in hepatoma SMMC-7721 cells. *Oncol Rep* 2008; 20: 1053-1059
 - 9 Ji GZ, Wang XH, Miao L, Liu Z, Zhang P, Zhang FM, Yang JB. Role of transforming growth factor-beta1-Smad signal transduction pathway in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 644-648
 - 10 季国忠, 王学浩. 转化生长因子 β -Smad信号通路在肿瘤发生中的作用. *医学研究生学报* 2005; 18: 542-545
 - 11 Souchelnyskiy S, Tamaki K, Engström U, Wernstedt C, ten Dijke P, Heldin CH. Phosphorylation of Ser465 and Ser467 in the C terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 1997; 272: 28107-28115
 - 12 Matsuura I, Denissova NG, Wang G, He D, Long J, Liu F. Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. *Nature* 2004; 430: 226-231
 - 13 Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 1996; 271: 350-353
 - 14 Bardeesy N, Cheng KH, Berger JH, Chu GC, Pahler J, Olson P, Hezel AF, Horner J, Lauwers GY, Hanahan D, DePinho RA. Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer. *Genes Dev* 2006; 20: 3130-3146
 - 15 Ijichi H, Ikenoue T, Kato N, Mitsuno Y, Togo G, Kato J, Kanai F, Shiratori Y, Omata M. Systematic analysis of the TGF-beta-Smad signaling pathway in gastrointestinal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289: 350-357
 - 16 Pizzi S, Azzoni C, Bassi D, Bottarelli L, Milione M, Bordi C. Genetic alterations in poorly differentiated endocrine carcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer* 2003; 98: 1273-1282
 - 17 Xie W, Rimm DL, Lin Y, Shih WJ, Reiss M. Loss of Smad signaling in human colorectal cancer is associated with advanced disease and poor prognosis. *Cancer J* 2003; 9: 302-312
 - 18 Shiou SR, Singh AB, Moorthy K, Datta PK, Washington MK, Beauchamp RD, Dhawan P. Smad4 regulates claudin-1 expression in a transforming growth factor-beta-independent manner in colon cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67: 1571-1579
 - 19 Xiao DS, Wen JF, Li JH, Hu ZL, Zheng H, Fu CY. Effect of deleted pancreatic cancer locus 4 gene transfection on biological behaviors of human colorectal carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 348-352
 - 20 Losi L, Bouzourene H, Benhattar J. Loss of Smad4 expression predicts liver metastasis in human colorectal cancer. *Oncol Rep* 2007; 17: 1095-1099
 - 21 Kim YH, Lee HS, Lee HJ, Hur K, Kim WH, Bang YJ, Kim SJ, Lee KU, Choe KJ, Yang HK. Prognostic significance of the expression of Smad4 and Smad7 in human gastric carcinomas. *Ann Oncol* 2004; 15: 574-580
 - 22 徐岩, 王振宁, 徐惠绵, 陈亚男, 罗阳. 胃癌癌变过程中 Smad4表达的变化及其与临床病理特征的关系. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1510-1515
 - 23 Okano H, Shinohara H, Miyamoto A, Takaori K, Tanigawa N. Concomitant overexpression of cyclooxygenase-2 in HER-2-positive on Smad4-reduced human gastric carcinomas is associated with a poor patient outcome. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6938-6945
 - 24 Torbenson M, Marinopoulos S, Dang DT, Choti M, Ashfaq R, Maitra A, Boitnott J, Wilentz RE. Smad4 overexpression in hepatocellular carcinoma is strongly associated with transforming growth factor beta II receptor immunolabeling. *Hum Pathol* 2002; 33: 871-876
 - 25 Longerich T, Breuhahn K, Odenthal M, Petmecky K, Schirmacher P. Factors of transforming growth factor beta signalling are co-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Virchows Arch* 2004; 445: 589-596
 - 26 Yakicier MC, Irmak MB, Romano A, Kew M, Ozturk M. Smad2 and Smad4 gene mutations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1999; 18: 4879-4883
 - 27 Tannapfel A, Anhalt K, Häusermann P, Sommerer F, Benicke M, Uhlmann D, Witzigmann H, Hauss J, Wittekind C. Identification of novel proteins associated with hepatocellular carcinomas using protein microarrays. *J Pathol* 2003; 201: 238-249
 - 28 季国忠, 张发明, 翟惠虹, 范志宁, 樊代明, 王学浩. Smad4基因RNAi慢病毒载体的构建与鉴定. *第四军医大学学报* 2005; 27: 600-602
 - 29 Natsugoe S, Xiangming C, Matsumoto M, Okumura H, Nakashima S, Sakita H, Ishigami S, Baba M, Takao S, Aikou T. Smad4 and transforming growth factor beta1 expression in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1838-1842
 - 30 Popović Hadzija M, Hrasčan R, Bosnar MH, Zeljko Z, Hadzija M, Cadez J, Pavelić K, Kapitanović S. Infrequent alteration of the DPC4 tumor suppressor gene in renal cell carcinoma. *Urol Res* 2004; 32: 229-235
 - 31 Baldus SE, Schwarz E, Lohrey C, Zapatka M, Landsberg S, Hahn SA, Schmidt D, Dienes HP, Schmiegel WH, Schwarte-Waldhoff I. Smad4

- deficiency in cervical carcinoma cells. *Oncogene* 2005; 24: 810-819
- 32 Yang L, Huang J, Ren X, Gorska AE, Chytil A, Aakre M, Carbone DP, Matrisian LM, Richmond A, Lin PC, Moses HL. Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis. *Cancer Cell* 2008; 13: 23-35
- 33 Nagatake M, Takagi Y, Osada H, Uchida K, Mitsudomi T, Saji S, Shimokata K, Takahashi T, Takahashi T. Somatic in vivo alterations of the DPC4 gene at 18q21 in human lung cancers. *Cancer Res* 1996; 56: 2718-2720
- 34 Aitchison AA, Veerakumarasivam A, Vias M, Kumar R, Hamdy FC, Neal DE, Mills IG. Promoter methylation correlates with reduced Smad4 expression in advanced prostate cancer. *Prostate* 2008; 68: 661-674
- 35 Tanaka T, Watanabe T, Kazama Y, Tanaka J, Kanazawa T, Kazama S, Nagawa H. Loss of Smad4 protein expression and 18qLOH as molecular markers indicating lymph node metastasis in colorectal cancer—a study matched for tumor depth and pathology. *J Surg Oncol* 2008; 97: 69-73
- 36 Jazag A, Ijichi H, Kanai F, Imamura T, Guleng B, Ohta M, Imamura J, Tanaka Y, Tateishi K, Ikenoue T, Kawakami T, Arakawa Y, Miyagishi M, Taira K, Kawabe T, Omata M. Smad4 silencing in pancreatic cancer cell lines using stable RNA interference and gene expression profiles induced by transforming growth factor-beta. *Oncogene* 2005; 24: 662-671
- 37 Zhang F, Ren G, Lu Y, Jin B, Wang J, Chen X, Liu Z, Li K, Nie Y, Wang X, Fan D. Identification of TRAK1 (Trafficking protein, kinesin-binding 1) as MGB2-Ag: a novel cancer biomarker. *Cancer Lett* 2009; 274: 250-258
- 38 Kitamura T, Kometani K, Hashida H, Matsunaga A, Miyoshi H, Hosogi H, Aoki M, Oshima M, Hattori M, Takabayashi A, Minato N, Taketo MM. SMAD4-deficient intestinal tumors recruit CCR1+ myeloid cells that promote invasion. *Nat Genet* 2007; 39: 467-475
- 39 Imamichi Y, Waidmann O, Hein R, Eleftheriou P, Giehl K, Menke A. TGF beta-induced focal complex formation in epithelial cells is mediated by activated ERK and JNK MAP kinases and is independent of Smad4. *Biol Chem* 2005; 386: 225-236
- 40 Ellenrieder V, Hendler SF, Ruhland C, Boeck W, Adler G, Gress TM. TGF-beta-induced invasiveness of pancreatic cancer cells is mediated by matrix metalloproteinase-2 and the urokinase plasminogen activator system. *Int J Cancer* 2001; 93: 204-211
- 41 Pardali K, Moustakas A. Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1775: 21-62
- 42 Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17: 548-558
- 43 Larue L, Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene* 2005; 24: 7443-7454

■同行评价

本文综述Smad4在肿瘤的侵袭和转移过程中的重要作用,重点叙述Smad4通过介导肿瘤分子细胞动力学变化而影响细胞的运动、侵袭和转移与多种肿瘤的关系,内容有一定新颖性。

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 •

全国消化疾病诊治进展学习班在京举办

本刊讯 由《中华内科杂志》主办的“全国消化疾病诊治进展学习班”拟定于2009-08-08/10在北京举办。主要内容涉及:肠易激综合征、功能性消化不良、缺血性肠病、炎症性肠病、胃食管反流病、不明原因消化道出血、慢性胰腺炎、食管胃底静脉曲张、经鼻胃镜的临床应用、食管源性胸痛及胃食管反流病与内脏高敏感、肝脏疾病的肠屏障功能改变。授课教师:林三仁、刘新光、柯美云、钱家鸣、张澍田、周丽雅、杨云生、谢鹏雁、刘玉兰、丁士刚、吕愈敏等国内消化领域著名专家。学习期满授予学员国家级I类继续教育学分6分[项目编号:2009-03-03-085(国)]。可来电、来函或电子邮件索取正式通知(请注明消化学习班)。注册费900元,资料费100元,食宿统一办理,费用自理。

欢迎全国广大消化科及内科医师参加。

联系方式:沈志伟,100710,北京东四西大街42号中华医学会《中华内科杂志》编辑部,shenzhw@163.com。电话:010-85158275,85158280;传真:010-85158275。

阿司匹林对幽门螺杆菌定植的影响

王静, 王蔚虹, 李江, 刘芳勋

■背景资料

*H pylori*感染在世界范围广泛存在, 非甾体抗炎药是目前处方量最大的药物之一, 二者被认为是导致胃黏膜损伤及溃疡形成的主要因素。使用NSAIDs同时合并*H pylori*感染在临床上并不少见, 但二者同时存在时的致病性及致病机制并不清楚。来自临床及流行病学研究结果, 尚存在分歧。

王静, 王蔚虹, 李江, 刘芳勋, 北京大学第一医院消化内科 北京市 100034

王静, 北京大学第一医院消化内科硕士, 主要从事非甾体类消炎药对幽门螺杆菌作用机制的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30770981

作者贡献分布: 王蔚虹与王静对此文所作贡献均等; 此课题由王蔚虹设计; 实验操作由王静、李江及刘芳勋完成; 数据分析由王静与王蔚虹完成; 本论文写作由王静与王蔚虹完成。

通讯作者: 王蔚虹, 100034, 北京市西城区西什库大街8号, 北京大学第一医院消化内科。wangweihong@medmail.com.cn

电话: 010-66551122-2581 传真: 010-66518105

收稿日期: 2009-02-02 修回日期: 2009-02-21

接受日期: 2009-02-23 在线出版日期: 2009-03-28

Effects of aspirin on *Helicobacter pylori* colonization

Jing Wang, Wei-Hong Wang, Jiang Li, Fang-Xun Liu

Jing Wang, Wei-Hong Wang, Jiang Li, Fang-Xun Liu, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30770981

Correspondence to: Wei-Hong Wang, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Peking University, 8 Xishiku Avenue, Xicheng District, Beijing 100034, China. wangweihong@medmail.com.cn

Received: 2009-02-02 Revised: 2009-02-21

Accepted: 2009-02-23 Published online: 2009-03-28

Abstract

AIM: To investigate effects of aspirin on *H pylori* colonization and the related mechanism.

METHODS: After co-incubation with aspirin, the morphology of *H pylori* was observed by transmission electron microscopy. The flagellar motility was assessed by 0.3% stab agar motility test. The adherence to AGS cells was determined using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA expression levels of flagellar genes (*flaA*, *flaB*), urease genes (*ureA*, *ureB*) and adhesin genes (*babA*, *sabA*, *alpA*, *alpB*, *hpaA*, *hopZ*) were determined using SYBR green I real-time PCR.

RESULTS: Separation and non-integrity of cell wall, rarefaction and asymmetry of cytoplasm, and even lysis of the bacteria were the morpho-

logical effects of aspirin on *H pylori*. When incubated *H pylori* in the presence of aspirin, the ability of flagellar motility and adherence to AGS cells were inhibited. The expression of *ureA*, *ureB*, *babA*, *sabA*, *alpA*, *alpB*, *hpaA*, *hopZ* were up-regulated in the presence of aspirin, while the expression of *flaA*, *flaB* were down-regulated.

CONCLUSION: Aspirin decreases the colonization of *H pylori* by inhibiting flagellar motility, adherence ability and destructing normal structure of the bacteria.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Aspirin; Colonization; Ultrastructure

Wang J, Wang WH, Li J, Liu FX. Effects of aspirin on *Helicobacter pylori* colonization. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(9): 854-861

摘要

目的: 探讨阿司匹林体外培养条件下对*H pylori*定植相关因子的影响及其机制。

方法: 阿司匹林与*H pylori*共同培养, 电镜观察其形态结构, 3 g/L的琼脂穿刺培养观察细菌动力, 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测不同浓度阿司匹林对*H pylori*黏附性的影响。SYBR green I 实时定量PCR测定编码*H pylori*鞭毛蛋白基因(*flaA*、*flaB*)、尿素酶基因(*ureA*、*ureB*)以及黏附素基因(*babA*、*sabA*、*alpA*、*alpB*、*hpaA*、*hopZ*)的表达。

结果: 体外培养条件下, 阿司匹林导致*H pylori*形态发生改变, 细菌胞壁不完整, 且发生不同程度的凹陷变形, 细菌细胞壁和细胞膜间出现空隙, 胞质分布不均匀, 出现高电子密度颗粒, 并有溶菌样改变。阿司匹林显著降低*H pylori*的鞭毛动力, 并剂量依赖性的抑制*H pylori*对AGS细胞的黏附。阿司匹林降低*H pylori*鞭毛蛋白基因(*flaA*、*flaB*)mRNA水平的表达, 增加尿素酶基因(*ureA*、*ureB*)及黏附素基因(*babA*、*sabA*、*alpA*、*alpB*、*hpaA*、*hopZ*)mRNA水平的表达(均 $P<0.05$)。

结论: 阿司匹林通过破坏*H pylori*的正常结构,

■同行评议者

张小晋, 主任医师, 北京积水潭医院消化内科

降低细菌的动力及黏附性, 从而降低细菌的定植能力.

关键词: 幽门螺杆菌; 阿司匹林; 定植; 超微结构

王静, 王蔚虹, 李江, 刘芳勋. 阿司匹林对幽门螺杆菌定植的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(9): 854-861
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/854.asp>

0 引言

*H pylori*感染在世界范围广泛存在, 在发达国家30%的人群长期慢性感染, 在发展中国家则高达90%^[1-2], 非甾体抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)是目前处方量最大的药物之一^[3], 二者被认为是导致胃黏膜损伤及溃疡形成的主要因素. 使用NSAIDs同时合并*H pylori*感染在临床上不少见, 但二者同时存在时的致病性并不清楚, 临床及流行病学的研究结果尚存在分歧^[4-5]. 体外研究显示阿司匹林和选择性的COX-2抑制剂塞来昔布可剂量依赖性的抑制*H pylori*的生长, 抑制*H pylori*尿素酶及空泡毒素的活性, 并通过改变*H pylori*外膜蛋白的表达而增强其对抗生素的敏感性^[6-10], 提示NSAIDs对*H pylori*致病性的拮抗作用. *H pylori*感染和NSAIDs共同存在时, 对胃黏膜的作用不是两者简单的相加, 二者之间可能存在某种相互作用, 从而影响*H pylori*在胃肠道的致病性. 定植是*H pylori*致病的前提, *H pylori*的定植需要有完整的螺旋状的形态、鞭毛的动力、黏附素及其受体的特异结合、尿素酶为细菌的定植提供适宜的微环境^[11]. 本研究旨在进一步探讨阿司匹林对*H pylori*定植相关因子: 细菌的形态、鞭毛的动力、黏附性的影响, 并探讨其相关机制.

1 材料和方法

1.1 材料 标准菌株*H pylori* 26695购自ATCC (American Type Culture Collection), 由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所张建中教授惠赠. 阿司匹林购自美国Sigma公司, 溶于二甲基亚砜(DMSO)备用. 胃癌上皮细胞株AGS细胞(CRL-1739, ATCC)由北京肿瘤研究所分子生物学实验室吕有勇教授惠赠. SYBR Green Real-time PCR Master Mix购自ToYoBo公司.

1.2 方法

1.2.1 培养基的制备: 配制含有1 mmol/L的阿司匹林及溶媒对照(DMSO)(1/1000)的哥伦比亚血平皿.

1.2.2 琼脂穿刺培养动力测定: 收集培养48 h生长状态良好的*H pylori*, 悬于脑心浸液(37 g/L), 并调整菌液浓度至 10^{11} CFU/L, 取10 μ L接种于含3 g/L琼脂, 80 g/L脱纤维羊血的布氏肉汤半固体培养基, 置于37 $^{\circ}$ C, 含850 mL/L氮气、50 mL/L氧气和150 mL/L二氧化碳的混合气, 饱和湿度环境培养5 d, 测量晕圈直径^[12-13].

1.2.3 超微结构观察: 收集培养48 h的*H pylori*, PBS漂洗3次, 加入25 g/L的戊二醛4 $^{\circ}$ C固定2 h后, 用PBS漂洗3次, 每次10 min, 再用10 g/L的锇酸4 $^{\circ}$ C固定30 min, 接着用PBS漂洗3次. 依次用系列丙酮在4 $^{\circ}$ C下脱水后, Epon812包埋, 超薄切片, 醋酸铀、枸橼酸铅双染色, JEM1230型透射电镜下观察.

1.2.4 ELISA检测细菌对AGS细胞的黏附性: 胃癌上皮细胞株AGS, 在无抗生素的含100 mL/L胎牛血清的1640培养基中培养, 置于37 $^{\circ}$ C、含50 mL/L二氧化碳、饱和湿度的环境, 每天弃去旧液, 换以新鲜培养基, 并于细胞生长约80%融合时用含0.2 g/L EDTA的胰蛋白酶消化, 以 10^4 /孔接种于96孔细胞培养板, 培养20 h后, 以 10^7 /孔加入分别以0.5、1.0、1.5 mmol/L阿司匹林预处理6 h的*H pylori*, 37 $^{\circ}$ C, 60 r/min, 振荡培养30 min. 阳性对照只加*H pylori*; 阴性对照细菌、细胞均不加; 另设只加AGS细胞不加细菌的对照. 10 g/L的多聚甲醛固定1 h, 50 g/L的BSA封闭30 min, 抗*H pylori*的单克隆抗体作为一抗, 4 $^{\circ}$ C过夜, 抗鼠的IgG-HRP作为二抗, 室温孵育1 h, 100 μ L TMB显色30 min后, 2 mol/L的硫酸终止反应, 450 nm酶标仪读取A值. 黏附率计算公式: $A(\text{AGS细胞加}H\text{ pylori}) - A(\text{AGS细胞}) / A(\text{阳性对照}) - A(\text{阴性对照}) \times 100^{[14]}$.

1.2.5 *H pylori*总RNA的提取及逆转录: 收集培养48 h的*H pylori* 26695, 以Tris-Hcl洗涤. 依次采用TRIzol裂解细菌, 氯仿进行液相分离, 异丙醇沉淀RNA, 最后以750 mL/L乙醇洗盐. 紫外分光光度法测定RNA浓度, 取RNA 4 μ g, 用无RNA酶的DNA酶 I 处理以去除DNA污染, 加Random Primers 1.5 μ L, DEPC水稀释后70 $^{\circ}$ C, 5 min, 冰上15 min, 加入5 \times RT Buffer 10 μ L, dNTPs 2.5 μ L, M-MLV 2 μ L, 37 $^{\circ}$ C 1 h, 70 $^{\circ}$ C 10 min, 得到cDNA 50 μ L, -20 $^{\circ}$ C保存.

1.2.6 实时定量PCR: 内参为16SrRNA基因, 鞭毛蛋白基因(*flaA*、*flaB*), 尿素酶基因(*ureA*、*ureB*)及黏附素基因(*babA*、*sabA*、*alpA*、*alpB*、*hpaA*、*hopZ*)引物设计采用Primer Express3.0软

■ 研究前沿

胃黏膜损害的两个最主要的致病因子, *H pylori*和NSAIDs共同存在时的致病性, 尚存在争议. 多项研究表明, 二者之间的作用不是简单的相加, 协同或拮抗, 二者之间可能存在复杂的相互作用, 从而影响对方的致病性. NSAIDs服用者是否必须根除*H pylori*治疗, *H pylori*阳性是否是NSAIDs使用的禁忌, 是目前临床医生面临的问题, 也是研究的热点.

■相关报道

Wang *et al* 研究发现, 体外培养条件下, 阿司匹林剂量依赖性地抑制 *H pylori* 的生长, 并提高 *H pylori* 对抗生素的敏感性. Shirin *et al* 研究显示, 布洛芬、吲哚美辛及选择性 COX-2 抑制剂 NS-398 亦可以抑制 *H pylori* 的生长. 马惠霞 *et al* 研究发现阿司匹林及 COX-2 抑制剂塞来昔布剂量依赖性地抑制 *H pylori* 毒力因子尿素酶、空泡毒素的活性, 并能改变其外膜蛋白的表达. 张孝平 *et al* 进一步研究发现, 阿司匹林通过提高 *H pylori* 外膜对抗生素的通透性, 从而提高 *H pylori* 对甲硝唑和克拉霉素的敏感性.

表 1 *H pylori* 26695 鞭毛蛋白、尿素酶、黏附素基因及管家基因引物核苷酸序列

引物名称	核苷酸序列(5'-3')
<i>flaA</i> -F	ATTGGCGTGTAGCAGAAGTGA
<i>flaA</i> -R	TGACTGGACCGCCACATC
<i>flaB</i> -F	ACATCATTGTGAGCGGTGTGA
<i>flaB</i> -R	GCCCTAACCCTCTCAAAT
<i>ureA</i> -F	GCTGGTGCATTGGCTTTA
<i>ureA</i> -R	GGATAGCGACTGCACATCGT
<i>ureB</i> -F	TCCTGATGGGACAAAACCTCGTA
<i>ureB</i> -R	ACGGCTTTTTTGCCTTCGT
<i>babA</i> -F	TGCTCAGGGCAAAGGAATAA
<i>babA</i> -R	ATCGTGGTGGTTACGCTTTTG
<i>sabA</i> -F	GGTGTGCTGCAACAGACTCAA
<i>sabA</i> -R	CATAAGCTGTTGCGCCAAATT
<i>alpA</i> -F	GCACGATCGGTAGCCAGACT
<i>alpA</i> -R	ACACATCCCCGCATTCAAG
<i>alpB</i> -F	ACGCTAAGAAACAGCCCTCAAC
<i>alpB</i> -R	TCATGCGTAACCCACATCA
<i>hpaA</i> -F	GAGCGTGGTGGCTTTGTTAGT
<i>hpaA</i> -R	TCGCTAGCTGGATGGTAATTCA
<i>hopZ</i> -F	GCGCCGTTACTAGCATGATCA
<i>hopZ</i> -R	GAAATCTTTCGGCGCGTTT
<i>16SrRNA</i> -F	CCGCTACGCGCTCTTTAC
<i>16SrRNA</i> -R	CTAACGAATAAGCACCGGCTAAC

表 2 定量 PCR 检测阿司匹林对 *H pylori* 鞭毛蛋白、尿素酶及黏附素基因 cDNA 含量的影响

基因	Aspirin 组(1 mmol/L)	DMSO 溶媒对照组(1/1000)
<i>flaA</i>	38.60 ± 0.59 ^a	108.54 ± 8.44
<i>flaB</i>	69.30 ± 3.15 ^a	94.66 ± 3.40
<i>ureA</i>	56.91 ± 1.73 ^a	36.38 ± 5.30
<i>ureB</i>	33.16 ± 1.51 ^a	15.75 ± 4.74
<i>babA</i>	32.47 ± 1.50 ^a	17.20 ± 3.48
<i>sabA</i>	30.58 ± 1.41 ^a	17.19 ± 3.85
<i>alpA</i>	40.60 ± 1.94 ^a	21.64 ± 4.27
<i>alpB</i>	23.75 ± 2.05 ^a	12.32 ± 3.65
<i>hpaA</i>	32.06 ± 0.92 ^a	13.81 ± 4.18
<i>hopZ</i>	100.25 ± 4.37 ^a	45.54 ± 5.82

^a*P* < 0.05 vs DMSO 对照组.

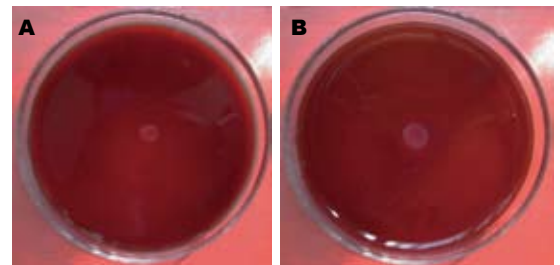


图 1 阿司匹林对 *H pylori* 鞭毛动力的影响. A: 阿司匹林(1 mmol/L); B: DMSO 对照(1/1000).

件(Applied Biosystem Perkin-Elmer), 核苷酸序列 5'-3' 见表 1. 25 μ L PCR 反应体系包括: SYBR Green Realtime PCR Master Mix(Toyobo) 12.5 μ L, 上、下游引物各 1 μ L (5 pmol/L), cDNA 2.5 μ L, DEPC 水补至 25 μ L. 反应循环参数 95 $^{\circ}$ C 10 min, 预变性, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 61 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环; 熔解曲线 95 $^{\circ}$ C 15 s, 61 $^{\circ}$ C 30 s, 96 $^{\circ}$ C 15 s, 分析 Realtime PCR 反应产物的纯度以判断实验的特异性. ABI PRISM 7300 Detector System 自动检测每个 PCR 循环 Reporter 荧光的释放, 根据已知初始 cDNA 分子数的标准曲线, 得出样本的 cDNA 分子数, 与该样本 *16SrRNA* 的 cDNA 分子数相比进行标准化.

统计学处理 所有实验均重复 3 次, 实验数据 mean \pm SD 表示, 采用 *t* 检验, 以 SPSS 11.0 软件进行处理.

2 结果

2.1 阿司匹林对 *H pylori* 鞭毛动力的影响 阿司匹林组晕圈直径(5.17 \pm 1.33 mm) 显著小于 DMSO 溶媒对照组(8.21 \pm 1.63 mm), 差异有统计学意义 (*P* < 0.05, 图 1).

2.2 阿司匹林对 *H pylori* 超微结构的影响 透射电

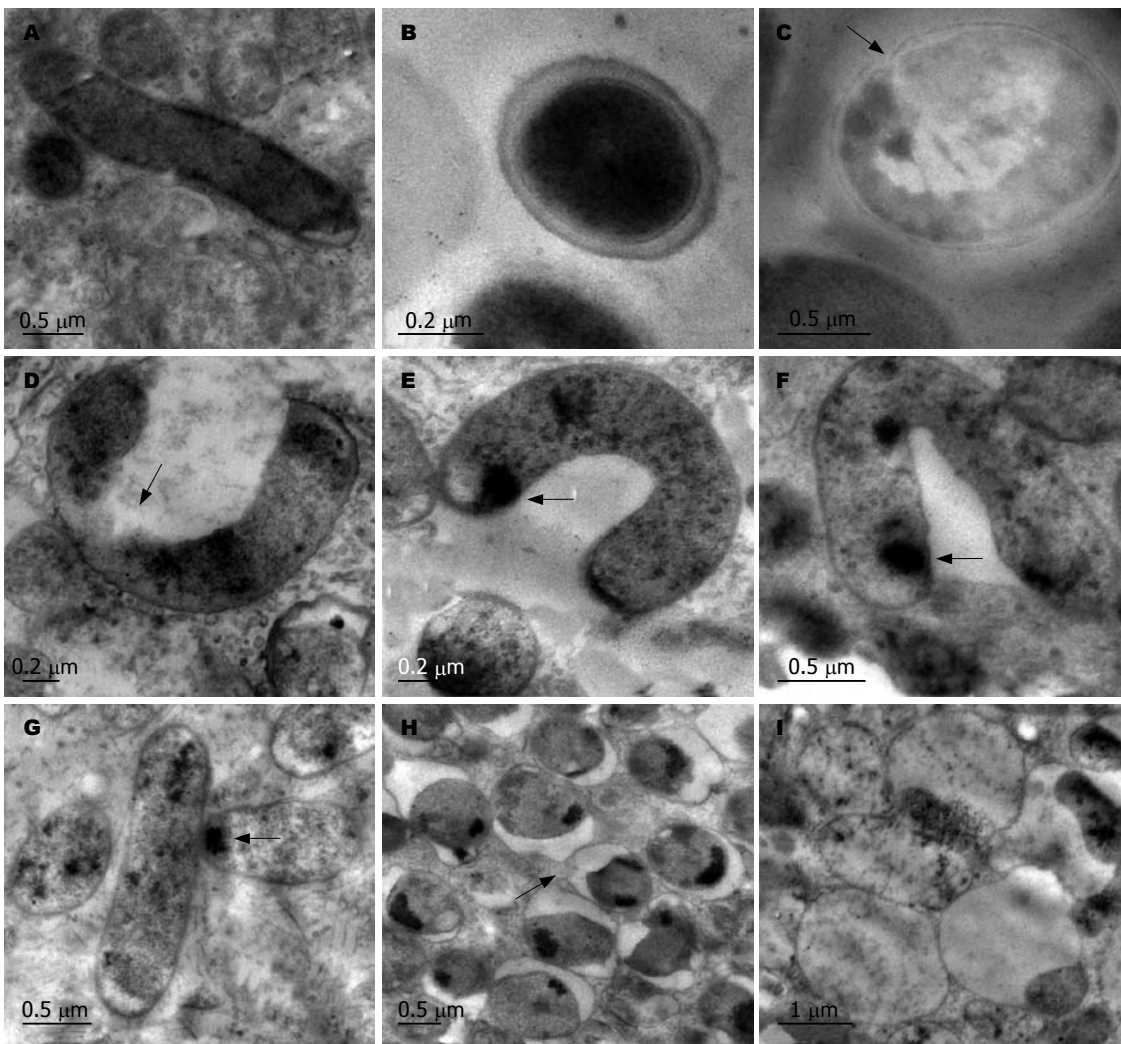
镜下, 溶媒对照组细菌切面多呈杆状, 细胞壁、细胞膜完整, 胞质均匀, 电子密度中等. 阿司匹林(1 mmol/L) 处理后, *H pylori* 胞壁变薄不完整, 有的菌体部分或全部细胞壁脱落消失, 细菌发生不同程度的凹陷变形, 甚至有溶菌样改变. *H pylori* 细胞壁和细胞膜间出现空隙, 胞质内容物稀疏, 电子密度降低. 细菌内部结构消失, 胞质分布不均匀, 出现高电子密度颗粒(图 2).

2.3 阿司匹林对 *H pylori* 黏附性的影响 阿司匹林明显降低 *H pylori* 对 AGS 细胞的黏附性, 且呈剂量依赖性, 阿司匹林各浓度组与 DMSO 对照组(1/1000) 相比, 差异具有统计学意义 (*P* < 0.05, 图 3).

2.4 阿司匹林对 *H pylori* 鞭毛蛋白、尿素酶及黏附素基因的影响 阿司匹林(1 mmol/L) 处理后, *H pylori* 鞭毛蛋白(*flaA*、*flaB*) cDNA 含量与对照组相比降低 (*P* < 0.05), 尿素酶基因(*ureA*、*ureB*) 及黏附素基因(*babA*、*sabA*、*alpA*、*alpB*、*hpaA*、*hopZ*) cDNA 含量与对照组相比增加 (*P* < 0.05), 各基因增加或降低的幅度在 1.5-2.5 倍之间(表 2).

3 讨论

作为胃黏膜损害的两个最主要的致病因子,



■创新盘点
 本研究发现阿司匹林、塞来昔布可以破坏*H. pylori*的正常结构,降低细菌的动力、尿素酶的活性、黏附性,从而降低*H. pylori*的定植能力.

图 2 透射电镜下阿司匹林对*H. pylori*超微结构的影响. A-B: DMSO对照组(1/1000),细菌呈典型的杆状,细胞壁、细胞膜完整,胞质均匀,电子密度中等; C-D: 阿司匹林处理组胞壁变薄不完整,部分或全部细胞壁脱落消失; E-F: 细菌形状发生改变,呈U型, V形; G: 细菌胞质内容物稀疏,电子密度降低,并出现高电子密度颗粒; H: 细胞壁与细胞质膜发生分离,胞周间隙扩大; I: 溶菌样改变.

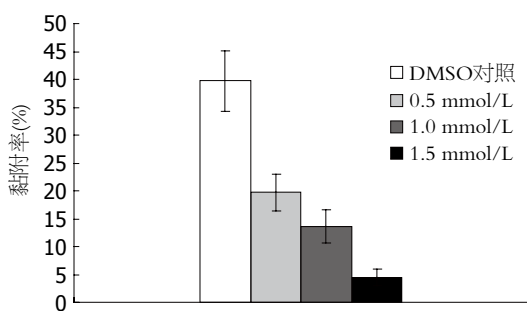


图 3 阿司匹林对*H. pylori*黏附AGS细胞的影响.

*H. pylori*和NSAIDs共同存在时的致病性及致病机制尚存在争议. 临床研究显示伴有*H. pylori*感染的NSAIDs服用者较单纯*H. pylori*感染或单纯服用NSAIDs发生消化性溃疡的风险增加^[15]. 对需要长期服用NSAIDs维持治疗的消化性溃疡患者,根除*H. pylori*溃疡复发率及其并发症的发生

率均显著降低^[16]. 然而目前为止还有很多研究并未证实二者同时存在时对胃黏膜的损害作用增强^[4-5]. 在NSAIDs服用者中,胃肠道不良反应的发生率*H. pylori*阳性与阴性者相比无显著性差异^[17],另有数据显示,NSAIDs使用者胃黏膜前列腺素的合成在*H. pylori*阳性者显著高于*H. pylori*阴性者^[18-19],即*H. pylori*的定植减轻了NSAIDs对前列腺素合成的抑制. 动物实验观察到*H. pylori*与NSAIDs共同作用比单独应用NSAIDs的胃黏膜炎症积分低,两者间有显著性差异^[20];预先给与*H. pylori*灌胃后再给与吲哚美辛较先给相同剂量及疗程的吲哚美辛再给与*H. pylori*灌胃组胃黏膜的炎症反应轻^[21].

*H. pylori*感染致病最基本的条件是定植,其定居的因素包括鞭毛的动力、尿素酶和黏附素等. 正常的螺旋状形态以及*H. pylori*的鞭毛动力

■应用要点

*H pylori*是胃癌发生的明确危险因素,而NSAIDs可以降低*H pylori*的定植并可以诱导上皮细胞凋亡及调节血管生成,因此可用于胃癌的化学预防。另外,本研究有助于理解临床及流行病学研究所见的伴有*H pylori*感染的NSAIDs服用者的胃黏膜损害的特征。

使其快速穿过黏液层移动到相对中性的胃黏膜表面,尿素酶中和胃酸,保证*H pylori*定植的微环境呈中性,黏附是定植的关键^[22-23]。如果没有黏附素与宿主细胞表面的黏附受体结合,*H pylori*在胃内长期定植几乎没有可能。*H pylori*若不能黏附于胃黏膜,就会因表面上皮细胞和黏液层的脱落而被快速清除。NSAIDs通过抑制环氧化酶,导致胃肠黏膜生理性的PG合成不足,从而使得黏液和碳酸氢盐的分泌减少、黏膜血流减少,并可直接产生细胞毒作用而损害胃黏膜屏障^[24-25],因此推测其可能使*H pylori*更易于定植,但是很多研究并未证实这种推测^[4,26-29],甚至有研究表明NSAIDs服用者,*H pylori*感染率反而是下降的^[30-31]。我们的体外研究发现阿司匹林可以破坏*H pylori*的正常结构,降低细菌的鞭毛动力、尿素酶的活性^[10]及黏附性,可能部分解释这一现象。

黏附素是位于细菌特定结构的一种蛋白,是细菌黏附定植的物质基础,目前得到证实的黏附素有以下几种: BabA、SabA、AlpA、AlpB、HpaA及HopZ^[32-37]。BabA、SabA、AlpA、AlpB、HpaA及HopZ均经证实为外膜蛋白,且它们之间具有氨基酸的同源性,在基因组中至少包含一个高度同源序列^[38]。*H pylori*黏附素为数众多,而且不同的环境和培养条件下,黏附素的表达种类和数量变化很大。我们的体外研究显示阿司匹林降低*H pylori*对AGS细胞的黏附性,但却增加黏附素基因*babA*、*sabA*、*alpA*、*alpB*、*hpaA*、*hopZ* mRNA水平的表达,究竟基因水平表达增加的黏附素是否伴随有活性的蛋白产物的增加,抑或是药物对*H pylori*生长及黏附活性的抑制、细菌结构的破坏造成的代偿性增加,尚需进一步进行表达蛋白质组、结构蛋白质组及功能蛋白质组的研究来明确。同一宿主黏附素受体表达的可变性以及不同宿主受体表达的遗传变异性进一步加剧了黏附系统的复杂性。有研究表明,*H pylori*与宿主的黏附可以使宿主细胞受体的表达暂时性升高^[39]。本研究中阿司匹林降低细菌对AGS细胞的黏附,从而可能减少AGS细胞黏附素受体的表达,这样即使*H pylori*本身表达的黏附素增加,总的黏附活性也是降低的。

*H pylori*合成的尿素酶量很大,约占菌体总蛋白的10%^[40],而且几乎所有的*H pylori*均含有尿素酶。尿素酶可水解人类代谢的废物,释放氨和二氧化碳,氨产生的细菌微环境中的低酸和

高pH使细菌能够顺利穿过胃黏液层到达黏膜表面,从而达到定植和损伤胃黏膜的目的。多项研究表明尿素酶对于*H pylori*的初始定植是必需的^[41-43],抗溃疡药物依卡倍特干扰*H pylori*定植的机制之一即抑制细菌尿素酶活性^[44]。阿司匹林剂量依赖性的降低尿素酶的活性^[10],因此可能进一步降低细菌的定植。

尿素酶由两个亚单位: UreA和UreB组成,包括九个基因: *ureC*、*D*、*A*、*B*、*I*、*E*、*F*、*G*、*H*, 其中*ureA*和*ureB*为结构基因,*ureC*和*ureD*位于结构基因之前,*ureI*、*ureE*、*ureF*、*ureG*和*ureH*为辅助基因,他们与结构基因一起为表达尿素酶的活性所必须^[45]。尿素酶是一种镍金属酶,其活性由其活性部位的镍含量所决定。该酶的活性需要在全酶的六个活性位点上插入两个Ni²⁺,这个插入过程由尿素酶基因簇中辅助基因编码的蛋白来完成。目前已发现多种蛋白能够通过影响镍离子来调节尿素酶的活性。除了蛋白调节外,不同的离子浓度对尿素酶的活性也有重要的调节作用^[46]。尿素酶抑制剂可以被分为两大类: (1)活性位点导向的(即底物类似物); (2)机制导向的。前者主要是与尿素酶活性位点的两个Ni²⁺形成连接,使得活性位点的Ni²⁺和氨基酸残基的定位与尿素酶底物类似而发挥对酶的抑制;后者主要是通过干扰尿素酶的催化机制使酶失活。体外研究观察到阿司匹林可以剂量依赖性的降低*H pylori*尿素酶的活性,然而却增加了尿素酶结构基因*ureA*、*ureB* mRNA水平的表达,阿司匹林降低*H pylori*尿素酶活性的机制尚不清楚,可能是源于蛋白的翻译或是翻译后的修饰,也可能是通过上述机制干扰了尿素酶的活性。

有鞘的鞭毛是*H pylori*介导感染宿主的毒力因子之一,低动力菌株在宿主的定植及生存能力均显著低于高动力菌株。悉生乳猪动物模型研究表明,菌株动力性与其在宿主的感染率成正比,动力最强的菌株感染率可达100%,而动力最差的菌株感染率仅为17%^[47]。无鞭毛菌株或鞭毛突变株由于不能定居与胃黏膜,因而失去了致病力^[48]。*H pylori*的鞭毛由A和B两个亚单位组成,分别由鞭毛基因*flaA*和*flaB*编码。*flaB*基因缺失的菌株鞭毛结构正常,保留部分功能,细菌动力为野生株的60%^[13,49],*flaA*基因缺失的菌株鞭毛变短,只能轻微移动,*flaA*、*flaB*基因均缺失的菌株没有鞭毛,也不具有动力^[13]。水杨酸盐可以剂量依赖性地抑制大肠杆菌,普通变形菌

(*proteus vulgaris*)和米氏变形菌(*proteus mirabilis*), 雷氏普罗威登斯菌(*providencia rettgeri*), 斯氏普罗威登斯菌(*providencia stuartii*)和洋葱伯霍尔德杆菌(*burkholderia cepacia*)的运动^[50]. 同时, 水杨酸盐类还可以通过抑制构成鞭毛的单体-鞭毛素的生成来抑制大肠杆菌鞭毛的产生^[51]. 本研究与上述观点一致, 并进一步证实, 阿司匹林通过降低鞭毛素基因*flaA*和*flaB*, 尤其是前者的表达而影响*H pylori*的动力.

很多研究涉及细菌动力程度与炎症因子水平及疾病严重程度之间的关系. 有些研究表明, 鞭毛的运动性越强, 刺激外周血和胃黏膜淋巴细胞分泌IL-8的能力越强. IL-8是中性粒细胞的强烈激活剂, 被激活的中性粒细胞会释放反应性的氧代谢产物和蛋白溶解酶, 产生急性炎症反应^[52]. 分离自残胃炎的*H pylori*动力明显低于分离自慢性胃炎、消化性溃疡以及胃癌的菌株, 这提示胃部疾病的类型和疾病分期会对高动力的菌株产生选择性压力^[53]. 阿司匹林是否可以通过降低*H pylori*的动力而影响*H pylori*相关性疾病的转归, 有待于进一步研究.

透射电镜观察发现, 阿司匹林处理后*H pylori*菌胞壁变薄不完整, 且发生不同程度的凹陷变形, 有的菌体部分或全部细胞壁脱落消失, 细胞壁和细胞膜间出现空隙, 提示阿司匹林与*H pylori*外膜作用. 同时本研究还发现, 经阿司匹林作用后*H pylori*菌胞质内容物稀疏, 电子密度下降, 空隙明显扩大, 提示细菌内容物的渗漏. 此外, 可见细菌内部结构消失, 胞质分布不均匀, 并出现高电子密度颗粒, 提示阿司匹林进入了细菌内并与胞质作用, 改变了胞质的结构. 这些发现从细菌形态学角度进一步说明, 阿司匹林不仅可改变*H pylori*的形态, 而且可作用于细菌外膜, 破坏其结构与功能, 并能进入细菌内与胞质作用, 从而抑制细菌的生长.

胃癌居全球肿瘤发病率和癌症死亡率的第4位和第2位^[54], 高危人群数目众多, 因此化学预防是目前最有前景的降低胃癌发病率和死亡率的方法. *H pylori*是胃癌发生的明确的危险因素, WHO将其定为I类致癌因子^[55], *H pylori*感染率随年龄的增加而增加^[56]; 50%以上的NSAIDs使用者年龄大于60岁, NSAIDs可通过环氧酶酶依赖的和非依赖的途径抑制微血管生成、诱导上皮细胞凋亡, 从而有利于胃癌的化学预防, 并可预防胃癌的淋巴转移. 一项荟萃分析显示长期应用NSAIDs包括阿司匹林可以显著降低非贲

门部胃癌的发生率, 并呈剂量依赖性的关系^[57]. 本实验进一步证实NSAIDs可能降低*H pylori*的定植. 因此, 尽管对于胃癌发生风险较低的人群, 常规服用阿司匹林来预防胃癌可能弊大于利, 但是对于那些胃癌发生风险高及*H pylori*感染风险高的人群, 服用阿司匹林尤其是胃肠道副作用相对较少的选择性的COX-2抑制剂, 预防胃癌可能是可行的.

4 参考文献

- 1 Telford JL, Covacci A, Rappuoli R, Chiara P. Immunobiology of Helicobacter pylori infection. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 498-503
- 2 Walker MM, Crabtree JE. Helicobacter pylori infection and the pathogenesis of duodenal ulceration. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 859: 96-111
- 3 Antonov KI, Isacson DG. Prescription and nonprescription analgesic use in Sweden. *Ann Pharmacother* 1998; 32: 485-494
- 4 Loeb DS, Talley NJ, Ahlquist DA, Carpenter HA, Zinsmeister AR. Long-term nonsteroidal anti-inflammatory drug use and gastroduodenal injury: the role of Helicobacter pylori. *Gastroenterology* 1992; 102: 1899-1905
- 5 Stack WA, Atherton JC, Hawkey GM, Logan RF, Hawkey CJ. Interactions between Helicobacter pylori and other risk factors for peptic ulcer bleeding. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 497-506
- 6 Gu Q, Xia HH, Wang WH, Wang JD, Wong WM, Chan AO, Yuen MF, Lam SK, Cheung HK, Liu XG, Wong BC. Effect of cyclo-oxygenase inhibitors on Helicobacter pylori susceptibility to metronidazole and clarithromycin. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 675-681
- 7 Wang WH, Wong WM, Dailidienne D, Berg DE, Gu Q, Lai KC, Lam SK, Wong BC. Aspirin inhibits the growth of Helicobacter pylori and enhances its susceptibility to antimicrobial agents. *Gut* 2003; 52: 490-495
- 8 Wang WH, Hu FL, Benjamin CY, Wong WM, Berg DE, Lam SK. Inhibitory effects of aspirin and indometacin on the growth of Helicobacter pylori in vitro. *Chinese J Dig Dis* 2002; 3: 172-177
- 9 Shirin H, Moss SF, Kancherla S, Kancherla K, Holt PR, Weinstein IB, Sordillo EM. Non-steroidal anti-inflammatory drugs have bacteriostatic and bactericidal activity against Helicobacter pylori. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1388-1393
- 10 马慧霞, 王蔚虹, 胡伏莲, 李江. 阿司匹林和塞来昔布对幽门螺杆菌的体外影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2747-2752
- 11 Andersen LP. Colonization and infection by Helicobacter pylori in humans. *Helicobacter* 2007; 12 Suppl 2: 12-15
- 12 Osaki T, Hanawa T, Manzoku T, Fukuda M, Kawakami H, Suzuki H, Yamaguchi H, Yan X, Taguchi H, Kurata S, Kamiya S. Mutation of luxS affects motility and infectivity of Helicobacter pylori in gastric mucosa of a Mongolian gerbil model. *J Med Microbiol* 2006; 55: 1477-1485
- 13 Josenhans C, Labigne A, Suerbaum S. Comparative ultrastructural and functional studies of Helicobacter pylori and Helicobacter mustelae flagellin mutants: both flagellin subunits, FlaA and

■名词解释

SYBR Green Real-time PCR: 在PCR反应体系中, 加入过量SYBR green I荧光染料, SYBR green I荧光染料特异性地掺入DNA双链后, 发射荧光信号. 由于荧光染料能和任何dsDNA结合, 因此使实验容易产生假阳性信号, 特异性低的问题目前可以用带有熔解曲线(melting curve)分析的软件加以解决.

■同行评价

本研究立意较好,方法科学,结果可靠,结论明确,与临床紧密结合,是一篇较好的论文。

- FlaB, are necessary for full motility in *Helicobacter* species. *J Bacteriol* 1995; 177: 3010-3020
- 14 McGuckin MA, Every AL, Skene CD, Linden SK, Chionh YT, Swierczak A, McAuley J, Harbour S, Kaparakis M, Ferrero R, Sutton P. Muc1 mucin limits both *Helicobacter pylori* colonization of the murine gastric mucosa and associated gastritis. *Gastroenterology* 2007; 133: 1210-1218
 - 15 Huang JQ, Sridhar S, Hunt RH. Role of *Helicobacter pylori* infection and non-steroidal anti-inflammatory drugs in peptic-ulcer disease: a meta-analysis. *Lancet* 2002; 359: 14-22
 - 16 Chan FK, To KF, Wu JC, Yung MY, Leung WK, Kwok T, Hui Y, Chan HL, Chan CS, Hui E, Woo J, Sung JJ. Eradication of *Helicobacter pylori* and risk of peptic ulcers in patients starting long-term treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs: a randomised trial. *Lancet* 2002; 359: 9-13
 - 17 Schaeferbeke T, Broutet N, Zerbib F, Combe B, Bertin P, Lamouliatte H, Perie F, Joubert-Collin M, Megraud F. Should we eradicate *Helicobacter pylori* before prescribing an NSAID? Result of a placebo-controlled study. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2637-2643
 - 18 Bhang CS, Lee HS, Kim SS, Song HJ, Sung YJ, Kim JI, Chung IS, Sun HS, Park DH, Lee YS. Effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitor and non-selective NSAIDs on *Helicobacter pylori*-induced gastritis in Mongolian gerbils. *Helicobacter* 2002; 7: 14-21
 - 19 Hudson N, Balsitis M, Filipowicz F, Hawkey CJ. Effect of *Helicobacter pylori* colonisation on gastric mucosal eicosanoid synthesis in patients taking non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Gut* 1993; 34: 748-751
 - 20 Schraier M, Petrelli L, Bonfanti M, Di Bella A, Pest P, Man F, Adami J, Tokumoto M. [Experimental model of infection of *Helicobacter pylori* in the mouse. A study of gastric damage caused by indomethacin] *Acta Gastroenterol Latinoam* 2001; 31: 115-121
 - 21 纪开宇, 胡伏莲, 李爱东, 李江. 幽门螺杆菌与吲哚美辛在Balb/c小鼠胃黏膜损伤中的相互作用. *中华医学杂志* 2003; 83: 726-730
 - 22 Mobley HL. *Helicobacter pylori* factors associated with disease development. *Gastroenterology* 1997; 113: S21-S28
 - 23 Chow J, Ma L, Ch C. The role of adhesion molecules in gastric ulcer healing. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 467-468
 - 24 Halter F. Mechanism of gastrointestinal toxicity of NSAIDs. *Scand J Rheumatol Suppl* 1988; 73: 16-21
 - 25 Scarpignato C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: how do they damage gastroduodenal mucosa? *Dig Dis* 1995; 13 Suppl 1: 9-39
 - 26 Caselli M, Pazzi P, LaCorte R, Aleotti A, Trevisani L, Stabellini G. *Campylobacter*-like organisms, nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastric lesions in patients with rheumatoid arthritis. *Digestion* 1989; 44: 101-104
 - 27 Shallcross TM, Rathbone BJ, Wyatt JL, Heatley RV. *Helicobacter pylori* associated chronic gastritis and peptic ulceration in patients taking non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Aliment Pharmacol Ther* 1990; 4: 515-522
 - 28 Graham DY, Lidsky MD, Cox AM, Evans DJ Jr, Evans DG, Alpert L, Klein PD, Sessoms SL, Michaletz PA, Saeed ZA. Long-term nonsteroidal antiinflammatory drug use and *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 1991; 100: 1653-1657
 - 29 Santucci L, Fiorucci S, Patoia L, Di Matteo FM, Brunori PM, Morelli A. Severe gastric mucosal damage induced by NSAIDs in healthy subjects is associated with *Helicobacter pylori* infection and high levels of serum pepsinogens. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 2074-2080
 - 30 Taha AS, Nakshabendi I, Lee FD, Sturrock RD, Russell RI. Chemical gastritis and *Helicobacter pylori* related gastritis in patients receiving non-steroidal anti-inflammatory drugs: comparison and correlation with peptic ulceration. *J Clin Pathol* 1992; 45: 135-139
 - 31 Laine L, Marin-Sorensen M, Weinstein WM. Nonsteroidal antiinflammatory drug-associated gastric ulcers do not require *Helicobacter pylori* for their development. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 1398-1402
 - 32 Boren T, Falk P, Roth KA, Larson G, Normark S. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science* 1993; 262: 1892-1895
 - 33 Mahdavi J, Sondén B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, Roche N, Angstrom J, Larsson T, Teneberg S, Karlsson KA, Altraja S, Wadström T, Kersulyte D, Berg DE, Dubois A, Petersson C, Magnusson KE, Norberg T, Lindh F, Lundskog BB, Arnqvist A, Hammarström L, Borén T. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* 2002; 297: 573-578
 - 34 Odenbreit S, Till M, Hofreuter D, Faller G, Haas R. Genetic and functional characterization of the alpAB gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Mol Microbiol* 1999; 31: 1537-1548
 - 35 Evans DG, Evans DJ Jr, Moulds JJ, Graham DY. N-acetylneuraminyllactose-binding fibrillar hemagglutinin of *Campylobacter pylori*: a putative colonization factor antigen. *Infect Immun* 1988; 56: 2896-2906
 - 36 Evans DG, Karjalainen TK, Evans DJ Jr, Graham DY, Lee CH. Cloning, nucleotide sequence, and expression of a gene encoding an adhesin subunit protein of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 1993; 175: 674-683
 - 37 Evans DG, Evans DJ Jr, Lampert HC, Graham DY. Restriction fragment length polymorphism in the adhesin gene hpaA of *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 1282-1288
 - 38 Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzgerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocayne JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weidman JM, Fujii C, Bowman C, Watthey L, Wallin E, Hayes WS, Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, Venter JC. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997; 388: 539-547
 - 39 Bode G, Malfertheiner P, Ditschuneit H. Pathogenetic implications of ultrastructural findings in *Campylobacter pylori* related gastroduodenal disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1988; 142: 25-39
 - 40 Bauerfeind P, Garner R, Dunn BE, Mobley HL. Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease

- and catalase at low pH. *Gut* 1997; 40: 25-30
- 41 Eaton KA, Brooks CL, Morgan DR, Krakowka S. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* 1991; 59: 2470-2475
- 42 Skouloubris S, Thiberge JM, Labigne A, De Reuse H. The *Helicobacter pylori* Urel protein is not involved in urease activity but is essential for bacterial survival in vivo. *Infect Immun* 1998; 66: 4517-4521
- 43 Eaton KA, Gilbert JV, Joyce EA, Wanken AE, Thevenot T, Baker P, Plaut A, Wright A. In vivo complementation of ureB restores the ability of *Helicobacter pylori* to colonize. *Infect Immun* 2002; 70: 771-778
- 44 Ito Y, Shibata K, Hongo A, Kinoshita M. Ecabet sodium, a locally acting antiulcer drug, inhibits urease activity of *Helicobacter pylori*. *Eur J Pharmacol* 1998; 345: 193-198
- 45 Mobley HL, Island MD, Hausinger RP. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev* 1995; 59: 451-480
- 46 Perez GI, Gower CB, Blaser MJ. Effects of cations on *Helicobacter pylori* urease activity, release, and stability. *Infect Immun* 1994; 62: 299-302
- 47 O'Toole PW, Lane MC, Porwollik S. *Helicobacter pylori* motility. *Microbes Infect* 2000; 2: 1207-1214
- 48 Eaton KA, Morgan DR, Krakowka S. *Campylobacter pylori* virulence factors in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* 1989; 57: 1119-1125
- 49 Suerbaum S, Josenhans C, Labigne A. Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flaB flagellin genes and construction of H. pylori flaA- and flaB-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. *J Bacteriol* 1993; 175: 3278-3288
- 50 Kunin CM, Hua TH, Bakaletz LO. Effect of salicylate on expression of flagella by *Escherichia coli* and *Proteus*, *Providencia*, and *Pseudomonas* spp. *Infect Immun* 1995; 63: 1796-1799
- 51 Farber BF, Wolff AG. The use of nonsteroidal antiinflammatory drugs to prevent adherence of *Staphylococcus epidermidis* to medical polymers. *J Infect Dis* 1992; 166: 861-865
- 52 Watanabe S, Takagi A, Tada U, Kabir AM, Koga Y, Kamiya S, Osaki T, Miwa T. Cytotoxicity and motility of *Helicobacter pylori*. *J Clin Gastroenterol* 1997; 25 Suppl 1: S169-S171
- 53 Kurihara N, Kamiya S, Yamaguchi H, Osaki T, Shinohara H, Kitahara T, Ishida H, Ozawa A, Otani Y, Kubota T, Kumai K, Kitajima M. Characteristics of *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with different gastric diseases. *J Gastroenterol* 1998; 33 Suppl 10: 10-13
- 54 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 2001; 94: 153-156
- 55 Logan RP. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Lancet* 1994; 344: 1078-1079
- 56 Dooley CP, Cohen H, Fitzgibbons PL, Bauer M, Appleman MD, Perez-Perez GI, Blaser MJ. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and histologic gastritis in asymptomatic persons. *N Engl J Med* 1989; 321: 1562-1566
- 57 Wang WH, Huang JQ, Zheng GF, Lam SK, Karlberg J, Wong BC. Non-steroidal anti-inflammatory drug use and the risk of gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1784-1791

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度, 例如6 347意指6 000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的mean \pm 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 \pm 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 $23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24$. 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 \leq 100, 百分数到个位; $101 \leq$ 分母 \leq 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 2009-03-28)

水砷暴露大鼠肝损伤和肝纤维化模型的建立

闫超, 吴君, 刘芙蓉, 张莉莎

■背景资料

长期水砷暴露可以导致肝损伤及肝纤维化甚至肝癌,但其发生机制目前尚未明确,导致目前防治上的困难。目前还没有良好的实验模型制作方面的报道。

闫超, 吴君, 刘芙蓉, 张莉莎, 贵阳医学院附属医院感染科 贵州省贵阳市 550004

闫超, 在读硕士, 主要从事肝脏疾病的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30471592

中国肝炎防治基金会“王宝恩肝纤维化研究基金”资助项目, No. 20070013

作者贡献分布: 此课题总设计、经费、分析工具、实验指导由吴君提供; 闫超负责本子课题设计; 研究过程由闫超与刘芙蓉完成; 数据分析由闫超完成; 张莉莎对实验过程给予指导性支持; 本论文写作由闫超完成。

通讯作者: 吴君, 550004, 贵州省贵阳市, 贵阳医学院附属医院感染科. wuwuj@21cn.com

电话: 0851-6774146 传真: 0851-6750569

收稿日期: 2009-01-07 修回日期: 2009-02-01

接受日期: 2009-02-09 在线出版日期: 2009-03-28

Model establishment of liver injury and fibrosis in rats exposed to oral arsenic solution

Chao Yan, Jun Wu, Fu-Rong Liu, Li-Sha Zhang

Chao Yan, Jun Wu, Fu-Rong Liu, Li-Sha Zhang, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30471592; and China Foundation of Hepatitis Prevention and Cure, Liver Fibrosis Foundation of Wang Baoen, No. 20070013

Correspondence to: Jun Wu, Department of Infectious Diseases, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. wuwuj@21cn.com

Received: 2009-01-07 Revised: 2009-02-01

Accepted: 2009-02-09 Published online: 2009-03-28

Abstract

AIM: To establish a liver injury and fibrosis model in oral arsenic solution exposed rats and to provide a comparatively ideal animal research model for mechanism-study, prevention and cure of liver injury and fibrosis induced by oral arsenic solution exposure.

METHODS: Eighty rats were divided into control group and model group at random. Rats in control group were fed with common animal feeds and tap water while model group were fed with common animal feeds and 100 mg/L iAs³⁺ water. Ten rats were executed in each group after 1, 2, 3 and 4 months' arsenic-exposure for detection of liver function. Hepatic tissues were

observed with optical microscope and transmission electron microscope in order to find out the pathological changes. Masson dyeing was also performed in order to run semi-quantitative analysis with image analysis system.

RESULTS: After 1 month's arsenic-exposure, hydropic, fatty and ballooning degeneration cells in hepatic lobule, hyperplastic inflammatory cells and some necrotic cells in portal area were observed, but the hepatic lobule remained intact. After 3 and 4 months' arsenic-exposure, the pathological injury of rats' hepatic tissue became more and more severe, fibrous tissues were hyperplastic and trabs were growing in portal area which showed the tendency of liver fibrosis. With transmission electron microscope, shape-change of the cell nucleus, expansion of nuclear membrane and tumid mitochondrion whose pole was disappearing and border blurry was observed. The serum ALT and AST were higher in model group than in control group, the serum ALT had statistical significance between 3, 4 months' model groups and control group (69.36 ± 15.70 U/L, 104.49 ± 16.86 U/L vs 50.68 ± 4.31 U/L, both $P < 0.05$). The size of fibrosis was significantly increased in model group. There was statistical significance in 2, 3, 4 months' model groups compared with control group (0.48 ± 0.15 , 0.57 ± 0.11 , 1.07 ± 0.22 vs 0.21 ± 0.13 , both $P < 0.05$) and so it was in 1, 2, 3 months' model groups compared with 4 months' model group ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The liver injury and fibrosis model in oral arsenic solution exposed rats were successfully established which provides a comparatively ideal animal research model for the research of arsenic liver injury and fibrosis.

Key Words: Arsenic; Liver injury; Liver fibrosis; Model

Yan C, Wu J, Liu FR, Zhang LS. Model establishment of liver injury and fibrosis in rats exposed to oral arsenic solution. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(9): 862-866

摘要

目的: 建立水砷暴露致大鼠肝损伤及肝纤维

■同行评议者

汪波, 副主任医师, 北京大学第一医院急诊科

化的动物模型, 为砷中毒致肝损伤及肝纤维化的机制研究和防治提供较好的实验平台。

方法: 80只大鼠被随机分成正常对照组和模型组, 对照组给予普通饲料和自来水, 模型组给予普通饲料和砷水(100 mg/L). 分别于第1、2、3、4月末各随机处死10只, 检测血清样本中谷丙转氨酶(ALT), 谷草转氨酶(AST)的含量; 取部分肝组织处理后于光镜和电镜观察, 了解肝组织病理改变; 并应用图像分析法进行Masson染色纤维化面积半定量分析。

结果: 砷暴露1 mo, 大鼠肝组织HE染色可见细胞水样变性、脂肪变性及气球样变性, 汇管区见炎症细胞浸润, 部分肝细胞坏死, 但肝小叶结构尚完整. 砷暴露3、4 mo后大鼠肝组织损伤明显加重, 并可见汇管区纤维组织增生, 纤维条索形成, 肝纤维化趋势明显. 电镜下可见砷暴露组大鼠肝脏组织细胞核形状改变, 核膜扩张并且不完整, 线粒体肿胀, 边界不清, 极消失. 砷暴露大鼠血清ALT、AST的结果比正常对照组增高, ALT在3、4 mo后增高更明显(69.36 ± 15.70 U/L, 104.49 ± 16.86 U/L vs 50.68 ± 4.31 U/L, 均 $P < 0.05$). 模型组纤维化面积明显增大, 造模2、3、4 mo后肝组织纤维化面积与正常对照组比较差异有统计学意义(0.48 ± 0.15 , 0.57 ± 0.11 , 1.07 ± 0.22 vs 0.21 ± 0.13 , 均 $P < 0.05$); 造模4 mo后肝组织纤维化面积与造模1、2、3 mo后比较差异也有统计学意义($P < 0.05$).

结论: 成功建立了水砷暴露致肝损伤、肝纤维化的动物模型, 为砷暴露致肝损伤、肝纤维化的研究提供了较理想的模型。

关键词: 砷; 肝损伤; 肝纤维化; 模型

闫超, 吴君, 刘芙蓉, 张莉莎. 水砷暴露大鼠肝损伤和肝纤维化模型的建立. 世界华人消化杂志 2009; 17(9): 862-866
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/862.asp>

0 引言

砷是一种可严重影响人类健康的环境毒物, 具有致癌性^[1-2]. 砷可以引起不同程度的肝损伤、肝纤维化、肝硬化及肝癌^[3-6]. 砷暴露致肝损伤、肝纤维化、肝硬化及肝癌的防治研究已逐渐成为国内外研究的热点^[7-11]. 但是, 砷致肝损伤尤其是肝纤维化动物模型目前尚少见报道. 本实验室模拟饮水砷暴露中毒病区患者饮用高浓度砷水导致砷中毒的方式, 已经成功建立了砷暴露小鼠肝纤维化模型^[12-13]. 本实验尝试采用大

鼠自由饮用高浓度砷溶液造模, 建立较理想的砷暴露致肝损伤大鼠动物模型, 为砷中毒致肝损伤的机制研究提供较好的实验模型。

1 材料和方法

1.1 材料 健康清洁级SD大鼠, 体质量180-200 g, 购自贵阳医学院实验动物中心; 亚砷酸钠(NaAsO_2 美国Sigma chemical公司), 批号76H0240; AEROSET2000型全自动生化分析仪; OlympusCX21型光学显微镜; 日立H-7650透射电子显微镜; Biomias2001图象分析系统。

1.2 方法

1.2.1 模型复制药物浓度的确定: SD大鼠25只, 随机分成5组, 均给予普通饲料. 正常组给予自来水(自由饮用); 其他四组分别给予不同浓度亚砷酸钠溶液(100、200、300、400 mg/L)自由饮用, 1 mo后杀鼠(各组大鼠耐受较好, 均无死亡), 根据大鼠肝脏组织HE染色切片显示的肝组织损伤情况确定模型复制的药物浓度. 选定100 mg/L作为本实验模型复制的药物浓度。

1.2.2 模型复制过程: SD大鼠80只, 雌雄各半, 在贵阳医学院动物实验中心清洁级实验动物饲养房(温度: 15-25℃, 湿度: 40%-70%)饲养, 饲料由贵阳医学院动物实验中心提供. 适应饲养1 wk后, 随机分成正常对照组和模型组. 正常对照组40只给予普通饲料和自来水(自由饮用); 模型组40只给予普通饲料和100 mg/L的亚砷酸钠溶液(自由饮用)。

1.2.3 标本采集: 模型组分别于造模第1、2、3、4月末各处死10只, 另外处死10只正常对照, 采集标本. 股动脉放血后脱颈处死大鼠, 采集血清样本送检谷丙转氨酶(ALT), 谷草转氨酶(AST), 取适量肝组织放入100 g/L中性甲醛溶液固定, 石蜡包埋、切片、HE和Masson染色, 另取适量肝组织置于戊二醛溶液中固定, 处理后于透射电子显微镜下观察肝组织损伤情况。

1.2.4 血清肝功能指标检测: 由贵阳医学院附属医院生化实验室用美国Abbott公司AEROSET2000型全自动生化分析仪检测血清ALT、AST等肝功能项目。

1.2.5 肝组织病理观察: 处死的大鼠迅速剖开腹腔, 取出肝脏, 进行肉眼观察, 注意有无充血、脂肪变、肿大、萎缩、结节、囊肿等变化. 切取部分肝组织(肝右叶)于中性甲醛中固定、石蜡包埋、切片、HE染色由贵阳医学院附属医院病理科完成. 低、高倍镜下观察肝组织的病理改变。

■ 研发前沿

目前, 砷中毒致肝损伤及肝纤维化的研究已成为国内外研究热点, 研究主要集中在砷致肝损伤的氧化应激、细胞凋亡等方面, 但都未能明确阐明其机制。

■ 创新盘点

本实验较好的建立了砷中毒致肝损伤及肝纤维化的实验动物模型,与国内外其他研究相比,本实验造模时间更短,大鼠耐受性更好,暴露方式也更接近砷中毒地区的染毒方式。

1.2.6 肝组织Masson染色: 切取部分肝组织于中性甲醛中固定、石蜡包埋、切片。进行胶原三重染色(Masson染色),由贵阳医学院附属医院病理科完成。在400×倍光学显微镜下,通过SONY摄像头将实验动物肝组织马松染色切片图象采集并输入Biomias2001图象分析系统进行单位(视场)面积纤维组织面积测量。每张切片(每例动物标本)随机选取5个区域(视场),用HSV颜色分割法测量单位面积内纤维组织的面积,即每例切片共有5个数据,计算各剂量组小鼠肝内纤维组织面积的均值,反应肝组织纤维化的严重程度。

1.2.7 肝细胞超微结构检查: 按要求取材后置于戊二醛溶液,交由贵阳医学院电镜室完成,日立H-7600透射电子显微镜下观察肝组织损伤情况。

统计学处理 计量资料用mean±SD表示,采用SPSS11.5统计学软件处理数据,组间比较采用t检验, $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 肉眼观 正常对照组大鼠生活状态良好,毛发光泽;模型组大鼠毛发粗糙,精神萎靡,动作迟钝,易激惹,进食、进水量明显减少,个别大鼠出现皮肤溃烂,造模结束时各组大鼠均无死亡。

正常对照组大鼠肝脏表面光滑、质软,无结节和囊肿,色泽粉红,未见淤血、脂肪变性,无明显肿大或萎缩。砷暴露组大鼠肝脏被膜光泽差,大鼠肝脏体积增大,质稍韧,少数局部有米粒大小的灰白色结节。

2.2 肝组织病理检查结果

2.2.1 肝组织HE染色: 可见正常对照组大鼠肝细胞以中央静脉为中心,呈放射状排列,无肝细胞变性、坏死及炎症细胞浸润,小叶结构完整(图1A)。砷暴露1、2 mo模型组大鼠肝脏细胞可见水样变性、脂肪变性及气球样变性,汇管区见炎症细胞浸润,部分肝细胞坏死,肝小叶结构尚完整。砷暴露3、4 mo模型组大鼠比1、2 mo模型组明显加重,除了以上改变加重外,尚可见汇管区纤维组织增生,纤维条索形成,肝纤维化趋势明显(图1B)。

2.2.2 肝组织Masson染色: 可见正常对照组大鼠肝组织肝小叶结构完整,未见有染成绿色的胶原纤维(图2A)。模型组大鼠肝组织可见明显的肝细胞坏死并被纤维增生来修复,增生的纤维形成细丝状或汇集成粗条索甚至片状,包绕汇管区并向肝小叶间及叶内、肝小叶中心延伸(图2B)。

表1 大鼠肝功能检测结果 (mean ± SD, n = 10)

分组	ALT(U/L)	AST(U/L)
正常对照组	50.68 ± 4.31	194.50 ± 27.59
1 mo	62.68 ± 23.57	193.09 ± 55.79
2 mo	62.75 ± 14.40	190.38 ± 35.42
3 mo	69.36 ± 15.70 ^a	238.53 ± 86.30
4 mo	104.49 ± 16.86 ^{ac}	275.01 ± 74.21

^a $P<0.05$ vs 正常对照组; ^c $P<0.05$ vs 1、2、3 mo模型组。

2.2.3 肝细胞超微结构观察: 电镜下可见模型组大鼠肝组织细胞核形状改变,核膜扩张并且不完整,线粒体肿胀,边界不清,极消失(图3)。

2.3 大鼠血清中肝功能指标 模型组大鼠血清ALT、AST的结果比正常对照组增高,ALT在3、4 mo模型组与正常组组间比较有统计学意义($P<0.05$); 4 mo模型组与1、2、3 mo模型组比较均有统计学意义($P<0.05$)。各组AST差异无统计学意义($P>0.05$,表1)。

2.4 大鼠Masson染色纤维化半定量数据 模型组纤维化面积明显增大,造模1 mo后纤维化面积为 0.24 ± 0.12 ,造模2、3、4 mo后肝组织纤维化面积与正常对照组比较差异有统计学意义(0.48 ± 0.15 , 0.57 ± 0.11 , 1.07 ± 0.22 vs 0.21 ± 0.13 , 均 $P<0.05$); 造模4 mo后肝组织纤维化面积与造模1、2、3 mo后比较差异也有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

近年来,砷暴露致肝损伤、肝纤维化、肝硬化及肝癌的防治研究已逐渐成为国内外研究的热点。但目前多数为人群流行病学的调查研究,对其发生机制的研究较少,且尚缺乏成熟的砷中毒致肝损伤及肝纤维化动物模型。目前国内外研究所采用的砷致肝损伤动物模型多采用砷水灌胃造模,造模时间多较短,创伤大,肝损伤及纤维化尚未形成老鼠已多数不能耐受,且这种方式与慢性砷中毒患者肝损伤的砷暴露形式相去甚远。Santra *et al*^[3]用低浓度砷水给小鼠饮用,6 mo后发现肝细胞膜的损伤; 12 mo后肝脏质量明显增加,15 mo可见纤维化。我实验室^[10-13]采用小鼠自由饮用高浓度砷水造模,6 mo时已见胶原纤维增生,10 mo后可见明显的肝纤维化形成,成功建立了砷暴露致小鼠肝纤维化的动物模型,并且初步探讨了一些细胞因子在砷暴露致肝损伤中的作用。

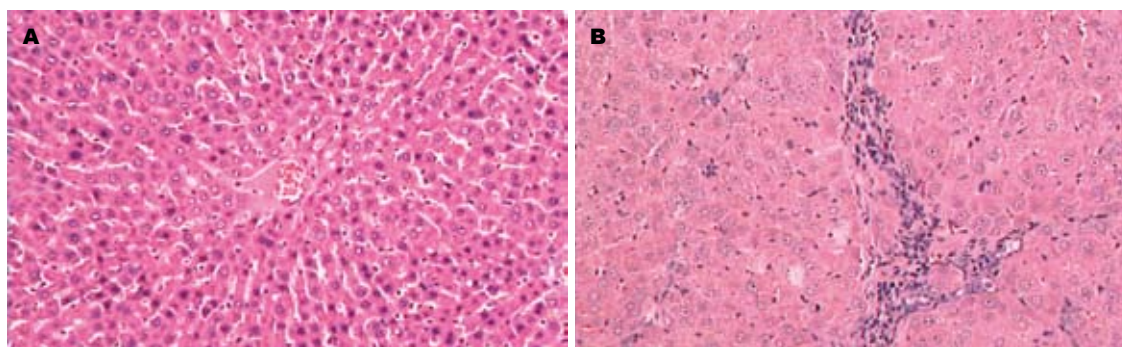


图 1 肝组织病理改变(HE染色). A: 正常对照组; B: 4 mo模型组.

■应用要点
本研究为砷中毒致肝损伤和肝纤维化的研究提供了很好的实验平台, 对研究其发生机制有重要的意义.

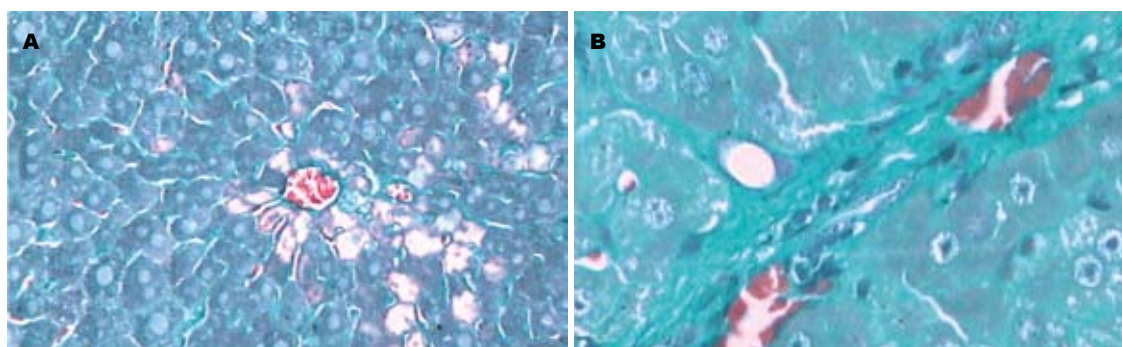


图 2 光镜下肝组织Masson染色观. A: 对照组; B: 模型组.

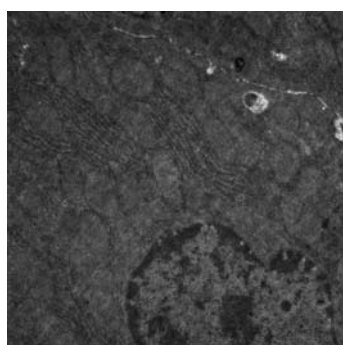


图 3 电镜下肝细胞器观.

本实验中, 大鼠砷暴露1、2 mo后肝细胞见大片水样变性及脂肪变性, 汇管区及肝小叶内见炎症细胞浸润, 但肝小叶结构完整. 随着造模时间的延长, 砷暴露3、4 mo后, 大鼠肝细胞损伤明显加重, 汇管区可见纤维组织增生, 并有少量纤维条索形成, 说明肝细胞损伤程度随砷暴露时间延长而加重, 并且高度趋向于纤维化. 造模1、2、3、4 mo后大鼠血清ALT、AST的含量较正常对照组升高, 表明砷可以导致肝细胞损伤, 而且随着造模时间延长, 肝损伤加重, 这可能与砷在肝脏中的蓄积有关. 动物实验表明, 砷可在大鼠肝组织中蓄积, 慢性砷暴露大鼠肝组织的砷含量与暴露浓度呈正相关. Xie *et al*^[14]发现大鼠暴露于亚砷酸钠0、10、20、40、80 ppm溶液10 wk后, 与对照组相比, 砷暴露各组肝组织含

砷浓度均高于对照组, 显微镜下观察可见肝细胞变性、炎症及点状坏死.

本实验成功建立了饮水型砷暴露致肝损伤、肝纤维化的大鼠模型. 与目前国内外所报道的模型相比, 本实验砷暴露方式更接近水病区砷中毒患者的暴露方式, 且造模时间更短, 出现肝损伤的时间更早; 与本室建立的砷暴露小鼠肝损伤、肝纤维化模型相比较, 大鼠模型出现肝损伤、肝纤维化的时间也更早, 且耐受性更好, 为进一步研究砷暴露致肝损伤的发生机制及防治提供了较理想的实验平台.

4 参考文献

- 1 Brown KG, Ross GL. Arsenic, drinking water, and health: a position paper of the American Council on Science and Health. *Regul Toxicol Pharmacol* 2002; 36: 162-174
- 2 李达圣, 安冬, 曾正, 朱爱华, 张锐智. 贵州燃煤型砷中毒患者患恶性肿瘤死亡观察. *中国地方病学杂志* 2004; 23: 42-45
- 3 Santra A, Maiti A, Das S, Lahiri S, Charkaborty SK, Mazumder DN. Hepatic damage caused by chronic arsenic toxicity in experimental animals. *J Toxicol Clin Toxicol* 2000; 38: 395-405
- 4 Liu J, Liu Y, Goyer RA, Achanzar W, Waalkes MP. Metallothionein-I/II null mice are more sensitive than wild-type mice to the hepatotoxic and nephrotoxic effects of chronic oral or injected inorganic arsenicals. *Toxicol Sci* 2000; 55: 460-467
- 5 Waalkes MP, Keefer LK, Diwan BA. Induction of

■同行评价

本研究思路清晰,技术路线明确,方法可靠,为今后对砷中毒致肝细胞损伤的机制研究和进一步干预提供基础,实际意义很大。

- proliferative lesions of the uterus, testes, and liver in swiss mice given repeated injections of sodium arsenate: possible estrogenic mode of action. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; 166: 24-35
- 6 黎平, 刘铭, 李达圣, 王述全. 燃煤污染型砷中毒临床症状体征分析. *中国地方病学杂志* 2000; 19: 139-141
- 7 吴君. 砷对肝脏毒性的研究进展. *中国药物与临床* 2005; 5: 645-647
- 8 勒翠红, 翟城, 戴国均. 饮高砷水致地方性砷中毒的现状调查及其对人血清巯基含量的影响. *工业卫生与职业病* 2002; 28: 80-82
- 9 苏丽琴, 金银龙. 现场流行病学研究对慢性砷中毒判定的意义. *卫生研究* 2005; 34: 636-639
- 10 蒋玲, 李玲, 吴君, 欧兵, 张韵, 李诚秀, 程明亮, 杨勤. 氧化应激致慢性水砷暴露小鼠肝损伤作用. *中国公共卫生* 2008; 24: 593-595
- 11 欧兵, 吴君, 李玲, 张韵, 蒋玲, 李诚秀, 程明亮, 杨勤. 促肝纤维化因子在水砷暴露小鼠肝组织中的表达. *中国公共卫生* 2008; 24: 254-256
- 12 欧兵, 张韵, 吴君. 砷与肝纤维化. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2330-2331
- 13 罗天永, 梁耀东, 吴君. 砷与肝损伤. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2328-2329
- 14 Xie Y, Trouba KJ, Liu J, Waalkes MP, Germolec DR. Biokinetics and subchronic toxic effects of oral arsenite, arsenate, monomethylarsonic acid, and dimethylarsinic acid in v-Ha-ras transgenic (Tg.AC) mice. *Environ Health Perspect* 2004; 112: 1255-1263

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

第二十一次全国中西医结合消化学术会议征文通知

本刊讯 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会决定于2009-07-23/26在南宁市召开第二十一次全国中西医结合消化系统疾病学术会议,并同时举办全国中西医结合消化疾病(重点为功能性胃肠病、炎症性肠病和消化内镜新技术临床应用演示)新技术新理论继续教育学习班。学习班招收对象:中西医结合、中医或西医的消化专业医师、科研人员、研究生等。参加学习班者授予国家级1类继续教育学分;大会论文报告者另授继续教育学分6分。

1 征稿内容

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

2 征稿要求

请注明作者姓名、单位、详细通讯地址、邮编。稿件请附800字论文摘要,尽可能以电子信件的形式将稿件传送,截稿日期:2009-06-30。

3 联系方式

袁海锋,朱永苹,530011,广西壮族自治区南宁市华东路10号广西中医学院瑞康医院,电话:0771-2188107;13597004049;13077766271,传真:0771-2411156, rkxhnk@sina.com或czs.xiaohua@163.com

同种异体大鼠骨髓移植诱导肝移植免疫耐受

傅锦波, 王效民, 黄小进, 罗琪, 尹震宇, 卢明珠, 余德

傅锦波, 王效民, 黄小进, 罗琪, 尹震宇, 卢明珠, 厦门大学附属中山医院肝胆外科 福建省厦门市 361004
余德, 厦门大学附属中山医院肝胆外科 福建省厦门市 361004
傅锦波, 硕士, 主治医师, 主要从事肝移植方面研究。
卫生部科学研究基金-福建省卫生教育联合攻关计划项目基金资助, No. WJ2005-2-020
作者贡献分布: 此课题由王效民、尹震宇及傅锦波设计; 研究过程由傅锦波、黄小进、罗琪、卢明珠及余德操作完成; 数据分析由傅锦波与黄小进完成; 本论文写作由傅锦波完成。
通讯作者: 王效民, 361004, 福建省厦门市, 厦门大学附属中山医院肝胆外科。wxm@xmzsh.com
电话: 0592-2993161
收稿日期: 2008-12-16 修回日期: 2009-01-16
接受日期: 2009-01-19 在线出版日期: 2009-03-28

Immune tolerance in orthotopic liver transplantation induced by allogeneic bone marrow transplantation in rats

Jin-Bo Fu, Xiao-Min Wang, Xiao-Jin Huang, Qi Luo, Zhen-Yu Yin, Ming-Zhu Lu, De Yu

Jin-Bo Fu, Xiao-Min Wang, Xiao-Jin Huang, Qi Luo, Zhen-Yu Yin, Ming-Zhu Lu, Department of Hepatobiliary Surgery, Zhongshan Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China
De Yu, Department of Radiotherapy, Zhongshan Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China
Correspondence to: Xiao-Min Wang, Department of Hepatobiliary Surgery, Zhongshan Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China. wxm@xmzsh.com
Received: 2008-12-16 Revised: 2009-01-16
Accepted: 2009-01-19 Published online: 2009-03-28

Abstract

AIM: To establish the allogeneic animal bone marrow and orthotopic liver transplantation model in rats, and to investigate the feasibility and possible mechanism of immune tolerance induced by allogeneic animal bone marrow transplantation.

METHODS: SD rats (donor, ♂) and Wistar rats (recipient, ♀) were randomly and averagely divided into three groups and conditioned by three methods. Group II Wistar rats (recipient, ♀) were induced with sublethal total body irradiation (TBI, 11 Gy) and group III with TBI (7

Gy), followed by infusion of SD (donor, ♂) rat bone marrow cells (8×10^7) within 4 h, then rats in group III were administered intraperitoneally with cytoxan (CTX, 50 mg/kg) 2 days later. Then three groups were performed orthotopic liver transplantations using modified Kamada's two-cuff technique in rats 28 days later. According to the GenBank, the specific primer of rat SRY gene was designed. Recipient rats were detected for donor origin cells in the peripheral blood lymphocyte on day 10, 20 using polymerase chain reaction (PCR). PCR product was analyzed by electrophoresis. Delayed type hypersensitivity (DTH), survival time and the histopathologic changes in liver after liver transplantation in rats were compared.

RESULTS: Chimera of SD rats was found in the peripheral blood lymphocytes of the Wistar rats in Group II and III. DTH results showed that Wistar rats were specifically tolerant to the SD rats. The DTH in group II or III is obviously lower than that in group I (0.22 ± 0.028 mm, 0.23 ± 0.032 mm vs 0.71 ± 0.026 mm, $P < 0.01$). The rats in Group I died 4-5 days later. The survival rate in Group II or III were significantly higher than that in group I (8.14 ± 2.53 d, 8.33 ± 2.11 d vs 3.79 ± 0.83 d, $P < 0.01$). According the Banff scores, the rats in group II and III showed lighter pathological changes than in group I.

CONCLUSION: Treatment of 7 Gy TBI and the injection of CTX (50 mg/kg) plus donor bone marrow transplantation (BMT) establishes a rat chimera model successfully and enhance the survival time of liver transplantation model in rats. Infusion of the bone marrow cells might be an effective method for maintaining the tolerant state and for prolonging survival time of liver transplantation model in rats.

Key Words: Bone marrow transplantation; Liver transplantation; Rat; Immune tolerance; Animal model

Fu JB, Wang XM, Huang XJ, Luo Q, Yin ZY, Lu MZ, Yu D. Immune tolerance in orthotopic liver transplantation induced by allogeneic bone marrow transplantation in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(9): 867-872

背景资料

器官移植已广泛应用于治疗多种疾病, 目前, 影响器官移植手术成功的最主要因素是术后的免疫排斥反应。因此移植外科最终突破在于基础免疫学方面的突破, 其中以特异性免疫耐受途径的寻找和研究最为迫切, 成为目前要求的焦点和热点。

同行评议者

张宗明, 教授, 清华大学第一附属医院普通外科; 邱双健, 副教授, 复旦大学中山医院肝肿瘤外科

■ 研发前沿

目前异体器官移植是目前外科基础研究及临床应用研究的前沿。临床器官移植的主要障碍之一是手术后出现排斥反应。当前, 解决排斥反应主要是通过通过免疫抑制剂产生非特异性的耐受, 但由于免疫抑制剂的长期乃至终身应用, 除了经济负担外, 药物本身的不良反应也给移植受者带来了十分不利的影响。因此, 人们致力于寻找另一种有效的方法, 使得移植器官在不应用免疫抑制剂的情况下能够长期存活。这种理想的方法就是免疫耐受。

摘要

目的: 建立同种异体大鼠骨髓及肝联合移植动物模型, 探讨骨髓移植诱导肝移植术后免疫耐受的可行性及其可能机制。

方法: 将SD大鼠(♂)、Wistar大鼠(♀)分成三组: I、II组和III组, II组Wistar大鼠(♀)TBI(11 Gy), 4 h后输入SD大鼠(♂)BMC(8×10^7), III组Wistar大鼠(♀)TBI(7 Gy), 4 h后输入SD大鼠(♂)BMC(8×10^7), 2 d后CTX(50 mg/kg)腹腔注射, 三组均于28 d后Kamada“二袖套法”行SD→Wistar大鼠肝移植。分别于BMT后10、20 d通过PCR方法检测II组和III组Wistar大鼠体内的SD大鼠源性Y染色体特异性片段, 并比较三组大鼠肝移植术后1 wk生存率、生存状况、生存时间, 以及移植肝脏的病理变化。

结果: II组和III组大鼠外周血均检测出SD大鼠源性嵌合体。DTH检查结果显示II组和III组大鼠对SD大鼠产生免疫耐受, II组和III组DTH足掌厚度差值较I组小(0.22 ± 0.028 mm, 0.23 ± 0.032 mm vs 0.71 ± 0.026 mm, 均 $P < 0.01$)。肝移植结果显示: II组和III组Wistar大鼠对SD大鼠肝移植的存活时间较I组大鼠肝移植存活时间明显延长(8.14 ± 2.53 d, 8.33 ± 2.11 d vs 3.79 ± 0.83 d, 均 $P < 0.01$)。依据Banff方案病理评分, II组和III组为轻度(I级), I组为重度(III级)。

结论: 应用7 Gy TBI+CTX+供体BMT可成功建立同种异体大鼠嵌合体模型, 诱导特异性免疫耐受, 可提高肝移植术后大鼠的生存状况及生存时间。

关键词: 骨髓移植; 肝移植; 大鼠; 免疫耐受; 动物模型

傅锦波, 王效民, 黄小进, 罗琪, 尹震宇, 卢明珠, 余德. 同种异体大鼠骨髓移植诱导肝移植免疫耐受. 世界华人消化杂志 2009; 17(9): 867-872

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/867.asp>

0 引言

目前, 肝脏移植(liver transplantation, LT)已成为治疗终末期肝病最有效的方法。然而, 同种异体排斥反应仍然是器官移植的主要障碍, 肝移植术后急性排斥反应发生率仍可高达12%-34%^[1]。为了研究嵌合体和移植耐受的关系, 人们已经成功建立了一些嵌合体的动物模型^[2-4]。如事先移植同源供体的骨髓细胞可以重建受体的免疫系统, 之后再行同源供肝移植, 在新的免疫环

境受体对供肝可能产生特异性免疫耐受。本实验将在这方面作深入的研究探讨其建立的可行性及机制。

1 材料和方法

1.1 材料 近交系封闭群♂SD大鼠60只(♂供体), ♀Wistar大鼠60只(♀受体, 上海实验动物中心提供), 体质量250-300 g, 供体体质量低于受体20-50 g, 术前12 h禁食, 不禁水。

1.2 方法

1.2.1 分组: 将SD大鼠和Wistar大鼠随机分为3组, 每组20只, 并分别编号, 如SD大鼠I组1号称SD1.1, Wistar大鼠II组8号称W2.8。I组大鼠Kamada“二袖套法”行SD→Wistar大鼠肝移植; II组Wistar大鼠(♀)全身照射(Total Body Irradiation, TBI)11 Gy, 4 h后输入SD大鼠(♂)(Bone Marrow Cells, BMC) 8×10^7 , 28 d后Kamada“二袖套法”行SD→Wistar大鼠肝移植; III组Wistar大鼠(♀)TBI 7 Gy, 4 h后输入SD大鼠(♂)BMC 8×10^7 , 2 d后环磷酰胺(Cytosan, CTX)50 mg/kg腹腔注射, 28 d后Kamada“二袖套法”行SD→Wistar大鼠肝移植。

1.2.2 骨髓细胞移植: (1)大鼠处死后置于750 mL/L乙醇中浸泡10 min, 无菌条件下采集两侧股骨骨髓, 用RPMI 1640冲洗骨髓腔, 200目钢筛过滤制成单细胞悬液, 离心后配制成 2×10^{13} 个/L, 直接放入4℃冰箱保存。(2)在移植当天将Wistar大鼠用100 g/L水合氯醛0.2-0.3 g/kg作腹腔注射麻醉后, 置于 20×20 cm²照射野内, 采用⁶⁰Co γ射线全身照射。II组为11 Gy, 剂量率为0.9 Gy/min; III组为7 Gy, 剂量率为0.5 Gy/min。(3)两组Wistar大鼠均于照射后4 h内自尾静脉输入相应编号SD大鼠骨髓细胞 8×10^7 , 2 d后III组大鼠腹腔内注射CTX 50 mg/kg。

1.2.3 肝移植: 采用Kamada“二袖套法”^[5-7], 即肝下下腔静脉(infrahepatic vena cava, IVC)与门静脉(portal vein, PV)分别用套管吻合, 胆管用支架管吻合, 肝上下腔静脉(suprahepatic vena cava, SVC)直接吻合的方法。(1)术前准备: 术前准备好PV、IVC套管, 分别采用聚乙烯静脉穿刺针的套管制成, 长约4 mm, 外径分别为2.1 mm和2.7 mm, 管体与管柄各半, 管体中段环形刻下浅槽, 以防血管套上后滑脱并有利于固定结扎线。胆总管插管采用硬膜外麻醉导管, 长约3 mm。采用上海手术器械厂的显微外科手术器械包, Satinsky钳, 5-0、7-0医用无损伤缝合针线, 在手

■ 相关报道

美国Pittsburgh大学的Starzl研究小组在25例存活2-22年的肝移植受体的皮肤、淋巴结、肾、胸腺等组织中检测到供体骨髓源性过客白细胞, 将远离移植部位持续存在少量供体源性细胞的状态称为“微嵌合体”, 并提出“微嵌合体”是维持移植免疫耐受的基础, 还可以防止移植植物抗宿主疾病(GVHD)的产生。

术显微镜下双人操作完成。(2)供肝的获取: 供体采用100 g/L水合氯醛0.2-0.3 g/kg作腹腔注射麻醉。腹部去毛消毒, 十字切口入腹。游离肝下下腔静脉, 结扎右肾上腺静脉, 并切断右肾动静脉。顺时针方向游离肝周韧带, 近肝侧结扎并离断左膈下静脉, 结扎并切断左肝至食管高位血管支, 游离肝外胆管并行胆管内插入支架管并固定, 经门静脉主干向肝脏内匀速灌注含肝素50 U的4℃乳酸林格液10 mL, 行肝脏冷灌注。当肝脏变白时, 在靠近左肾静脉入口处剪断肝下下腔静脉, 形成灌注液流出道, 在膈肌上方Satinsky钳钳夹肝上下腔静脉及部分膈肌, 横断肝上下腔静脉, 在胆总管分叉下方1 cm左右切断胆总管, 剪断肝固有动脉, 脾静脉上缘切断门静脉, 将供肝取出, 置于4℃乳酸林格液中保存备用。(3)供肝修剪及套管安装: 紧贴膈肌环剪去膈肌水平以上SVC及膈肌组织, 仅保留膈肌环。SVC左右两侧7-0无损伤缝线各缝1针。修整IVC及PV, 在4℃乳酸林格液中将门静脉与肝下下腔静脉壁外翻, 分别套在自制的聚乙烯管上, 用5-0丝线环扎固定, 完成袖套制备。(4)受体原位肝移植: 大鼠乙醚吸入麻醉后, 上腹部直切口入腹, 采用自制拉钩, 腰桥充分暴露手术野。分步游离受体肝脏, 游离完将受体肝脏取出。将供肝自4℃乳酸林格液保存液中取出置于受体原位, 冰生理盐水纱布覆盖肝脏, 并间断用冰生理盐水冲洗肝脏表面, 7-0无损伤线吻合肝上、下腔静脉, 吻合时, 向肝上、下腔静脉内注入4℃生理盐水, 驱出血管腔内的空气。吻合成功后, 经门静脉向供肝内灌注4℃生理盐水5 mL, 排除肝内的肝素乳酸林格液, 夹闭肝下下腔静脉, 将供肝门静脉套管插入受体门静脉内, 开放门静脉及肝上、下腔静脉阻断夹, 结束无肝期。肝下下腔静脉的吻合方法与门静脉相同, 最后将供体胆管插入受体胆管插管内, 检查腹腔内无出血后迅速用38-39℃生理盐水20 mL复温。术后灯光照射复温3 h, 自由饮食。

1.2.4 观察指标: (1)术前、术后同条件下饲养, 术后每天观察各组Wistar大鼠生存状况及存活率, 并将异常者做好相应记录, 包括精神状态、体温、进食水量、体质量、皮毛特点、活动情况, 对外界刺激反应等。死亡大鼠进行尸检, 查清死亡原因。(2)术后10、20 d分别取外周血抽提DNA, 检测SD大鼠源性Y染色体的特异性片段, 采用PCR方法, 引物序列来自大鼠SRY基因库: Sry F17: 5'-catctctgactctctggtgcaa-3', Sry R16:

5'-atgctgggattctgttgagcc-3'(上海英骏生物工程有限公司合成)。PCR产物为241 bp, 对应于大鼠sry基因273-514位点之间。同时以Wistar大鼠(♀)和雄性SD大鼠(♂)作为阴性和阳性对照。(3)脾细胞制备: 将SD大鼠脾脏置于200目钢筛上, 玻璃注射器内芯研磨, 红细胞裂解液去除红细胞, 用含50 mL/L庆大霉素RPMI 1640冲洗过滤制成单细胞悬液, 用大鼠淋巴细胞分离液分离并洗涤计数制成细胞数为 5×10^9 /L。(4)迟发型超敏反应(DTH): 各组Wistar大鼠腹股沟皮下注射 1×10^7 (50 μ L)SD大鼠脾细胞预致敏, 7 d后于右后脚掌注射 1×10^7 相同的脾细胞, 左脚掌注射50 μ L生理盐水作对照。24 h后测量两脚掌的厚度, 取其差值作为DTH指标。(5)肝移植存活时间的观察: I组大鼠饲养28 d, II组和III行骨髓细胞移植(bone marrow transplantation, BMT)28 d后, 采用Kamada“二袖套法”进行原位肝移植, 观察大鼠的生存时间。(6)病理组织学检查: I组肝移植术后4 d, II组和III组肝移植术后7 d分别处死3只大鼠, 取出肝脏组织, 常规石蜡切片, 光镜下观察急性排斥反应情况。依据移植肝排斥反应活检诊断与分级的Banff标准^[8-10]: 无排斥: 汇管区三体(肝动脉、门静脉和胆管)炎细胞浸润最多只有二体; 不明确: 炎细胞浸润程度未达到急性排斥的诊断标准, 且不能排除缺血性损伤; 轻度(I级): 排斥性炎细胞浸润少数汇管区的胆管和血管, 炎细胞数量较少, 仅局限在汇管区间隙中; 中度(II级): 排斥性炎细胞浸及多数或全部汇管区的胆管和血管; 重度(III级)在中度的基础上, 炎细胞浸润汇管区周围, 伴有中-重度静脉炎并扩展到肝实质, 引起静脉周肝细胞坏死。观察结果由2位病理学专家同时观察并判定。

统计学处理 数据以mean \pm SD表示, 利用SPSS10.0统计软件分析, 两两比较采用t检验。

2 结果

2.1 大鼠生存情况 I组大鼠肝移植, 术后死亡2例, 均因术后肝上、下腔静脉吻合口出血而死亡, 大鼠均在4-5 d死亡; II组BMT移植2 d后开始出现弓背翘毛, 活动及进食水明显减少, 10-12 d部分大鼠死亡, 眼睛、鼻腔、口腔及多个内脏出血(尸检), 15 d后症状减轻, 逐渐恢复, 死亡率为25%(5/20), 肝移植术后出血死亡2例, 门静脉血栓1例, 1 wk存活率80%(12/15); III组BMT移植后症状出现时间较晚且明显较轻, 恢复快, 死亡率为5%(1/20), 尸检脏器出血亦较轻, 肝移植术

■应用要点

诱导器官移植受者对供者器官特异的免疫耐受, 是解决器官移植排斥最彻底的方法。其中建立嵌合体是器官免疫耐受的重要途径, 被认为是诱导供者特异性耐受的最安全而有效的方法。建立同种异体大鼠骨髓及肝联合移植动物模型对移植免疫学研究有着深远意义, 目前还鲜有报道。

■名词解释

移植物抗宿主病(GVHD): 骨髓移植(BMT)后出现的多系统损害(皮肤、食管、胃肠、肝脏等)的全身性疾病, 是造成死亡的重要原因之一。有急性(aGVHD)和慢性(cGVHD)之分, 前者发生在BMT后3 mo内, 后者发生在BMT 3 mo以后。

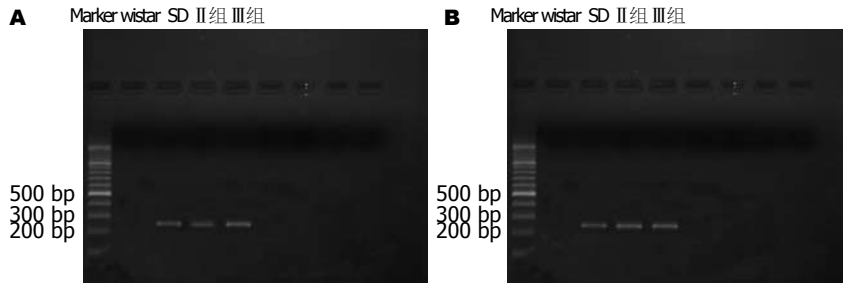


图1 BMT不同时间嵌合体检测结果. A: 10 d; B: 20 d.

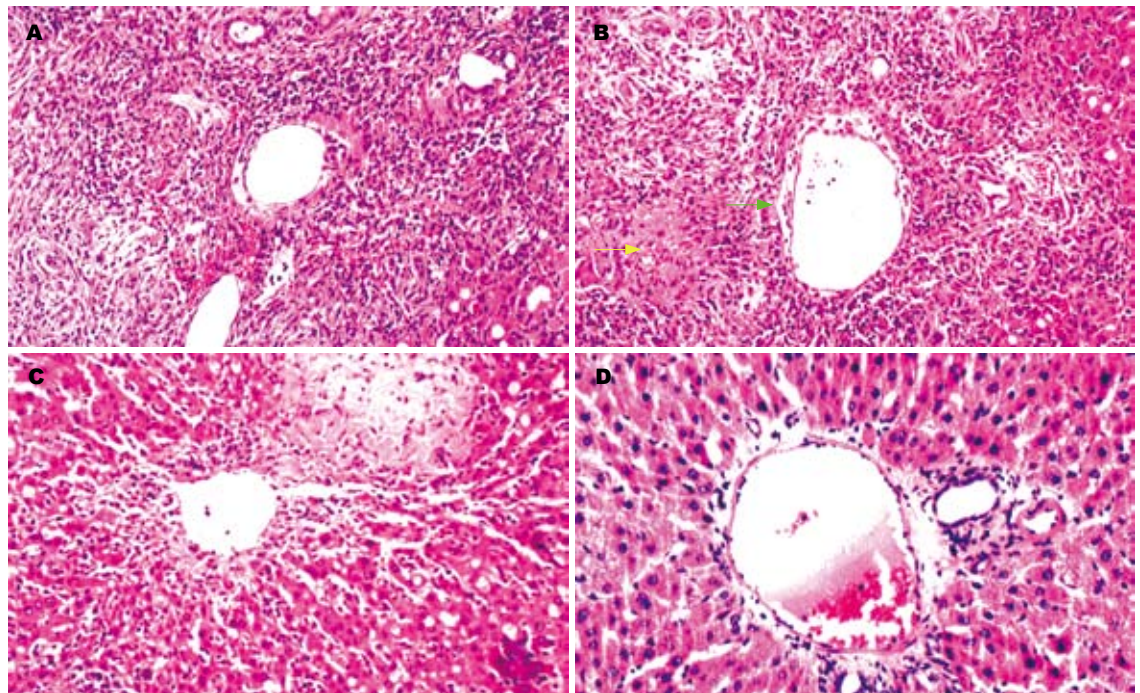


图2 不同组的移植物的病理检查结果. A: 混合性炎细胞, 包括大量淋巴细胞, 嗜酸细胞, 明显累及大多数或所有汇管区, 并浸及汇管区周围的肝实质中; B: 血管内皮损伤(绿色箭头), 肝细胞变性坏死(黄色箭头); C: 汇管区无明显淋巴细胞聚集; D: 血管内皮完好。

表1 DTH、肝移植实验结果

分组	n	DTH足掌厚度 差值(mm)	肝移植 生存时间(d)
I ←SD	20	0.71 ± 0.026	3.79 ± 0.83
II ←SD	15	0.22 ± 0.028 ^a	8.14 ± 2.53
III ←SD	19	0.23 ± 0.032 ^a	8.33 ± 2.11

^a $P < 0.05$ vs I组.

后出血死亡1例, 胆漏1例, 门静脉血栓1例, 1 wk存活率84.2%(16/19). II组和III组间差异无统计学意义($P > 0.05$), 但与I组比较差异有统计学意义($P < 0.01$).

2.2 嵌合体检测 BMT 10、20 d后, Wistar大鼠(♀)外周血检测SD大鼠(♂)源性嵌合体, 均发现了Y染色体特异性片段, 嵌合体诱导成功, 在10 d时II组比III组明显, 两组在20 d时无明显区别(图1).

2.3 DTH反应 BMT 20 d后, DTH反应结果见表1. II组和III组对SD大鼠脾细胞DTH反应均在较低水平, 差异无统计学意义, 但两组与I组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$).

2.4 肝移植存活时间 II组和III组Wistar大鼠对SD大鼠肝移植的存活时间, 差异无统计学意义, 但较I组大鼠肝移植存活时间明显延长, 差异有统计学意义($P < 0.01$, 表1).

2.5 移植物的病理检查结果 I组: 重度(III级)炎细胞浸润汇管区周围, 伴有中-重度静脉炎并扩展到肝实质, 引起静脉周肝细胞坏死(图2A-B). II组和III组: 轻度(I级)排斥性炎细胞浸润少数汇管区的胆管和血管, 炎细胞数量较少, 仅局限在汇管区间隙中(图2C-D).

3 讨论

诱导形成供受体嵌合体可使受体产生对供体特

异性免疫无反应性^[11-12]. 在骨髓细胞移植后可形成稳定的供受体嵌合体, 受体可产生对来自同一供体的后续器官移植的耐受^[13-16]. 目前研究最多的是建立转基因骨髓嵌合体诱导免疫耐受, 但是, 以往建立嵌合体需要对受体进行去髓性预处理(如致死量照射、大剂量细胞毒性药物等), 清除淋巴细胞, 这种方法的后果是以增加肿瘤和感染以及移植抗宿主病(graft versus host disease, GVHD)的发生率为代价, 而且在临床上难以推广应用. 因此, 我们采用比较温和的诱导方法^[17-18], 即低剂量TBI联合注射CTX, 促进形成稳定的嵌合体. 本实验研究经过上述两种方法诱导, 并于BMT 10 d和20 d后检测受体Wistar大鼠(♀)外周血(PCR), 均发现了供体SD大鼠(♂)Y染色体特异性片段, 说明了两种方法都能成功诱导嵌合体形成. 在10 d时II组比III组明显, 两组在20 d时无明显区别. 但同时也观察到, II组大鼠(亚致死TBI 11 Gy)生存情况明显不如III组(7 Gy TBI+腹腔注射50 mg/kg CTX), 死亡率达25%, 较III组5%明显高. 这可能包含以下原因: (1)II组TBI剂量较大, 骨髓抑制迅速、强烈, 早期嵌合体容易形成, 但是容易引起急性放射病, 骨髓造血功能严重障碍, 另一方面移植骨髓中含有供体T淋巴细胞, 与受体同种异型抗原发生应答, 产生GVHD, 部分受体不能承受致死; (2)III组TBI剂量较小, 早期骨髓抑制可能不够充分, 但随着CTX发挥作用, CTX可以清除大部分供体反应性T细胞而减轻GVHD^[19-21], 在受体内形成稳定的嵌合体. 有临床实验表明, 较低剂量的TBI即可以杀伤95%以上的外周淋巴细胞, 仅保留了少量的自体淋巴细胞, 这样既能促进骨髓细胞移植, 形成稳定的嵌合体, 同时减少了GVHD的发生. 进一步研究证实, 受体Wistar大鼠对SD大鼠已产生特异性耐受, 表现为DTH反应呈抑制状态, 而未行骨髓移植的Wistar大鼠对SD大鼠仍有强烈反应. 上述实验结果说明耐受和嵌合体之间存在着一定的特异性关系.

建立同种异体大鼠骨髓及肝联合移植动物模型对移植免疫学研究有着深远意义, 目前还鲜有报道. 诱导器官移植受者对供者器官特异的免疫耐受, 是解决器官移植排斥最彻底的方法. 诱导稳定的嵌合体的形成, 并成功建立肝移植动物模型, 是我们实验的主要目的. 嵌合体的形成有助于提高移植器官的存活率, 这种观点已经成为大多数的学者的共识. SD→Wistar大鼠的肝移植为高排异组合, 可作为肝移植排

斥反应的研究模型^[22-24]. 本实验研究发现, I组大鼠肝移植后均于4-5 d出现肝功能衰竭症状而死亡, 病理证实为急性排斥反应; 而II组和III组BMT移植后再行肝移植, 存活率和存活时间明显延长. 由此可见, 骨髓细胞输注有利于形成稳定的嵌合体, 对供体产生了一定的免疫耐受, 由于受体造血及免疫系统未被完全破坏, 使受体与供体的造血干细胞群可在受体内混合存在, 这样可使GVHD发生率明显下降, 同时可达到诱导并维持移植器官的长期耐受, 因此具有良好的临床应用前景.

总之, 通过上述诱导方法, 成功地建立了同种异体大鼠骨髓及肝联合移植动物模型, 为今后研究有关嵌合体与耐受的关系提供了有益的尝试, 为临床应用提供了理论基础及可靠依据, 为同源供肝移植提供了一个新方法, 并期待着在临床上得到应用.

4 参考文献

- 1 Kwekkeboom J, Tha-In T, Tra WM, Hop W, Boor PP, Mancham S, Zondervan PE, Vossen AC, Kusters JG, de Man RA, Metselaar HJ. Hepatitis B immunoglobulins inhibit dendritic cells and T cells and protect against acute rejection after liver transplantation. *Am J Transplant* 2005; 5: 2393-2402
- 2 Kawai T, Cosimi AB, Wee SL, Houser S, Andrews D, Sogawa H, Phelan J, Boskovic S, Nadazdin O, Abrahamian G, Colvin RB, Sach DH, Madsen JC. Effect of mixed hematopoietic chimerism on cardiac allograft survival in cynomolgus monkeys. *Transplantation* 2002; 73: 1757-1764
- 3 Sogawa H, Boskovic S, Nadazdin O, Abrahamian G, Colvin RB, Sachs DH, Cosimi AB, Kawai T. Limited efficacy and unacceptable toxicity of cyclophosphamide for the induction of mixed chimerism and renal allograft tolerance in cynomolgus monkeys. *Transplantation* 2008; 86: 615-619
- 4 Tillson M, Niemeyer GP, Welch JA, Brawner W, Swaim SF, Rynders P, Lenz SD, Dean B, Lothrop CD Jr. Hematopoietic chimerism induces renal and skin allograft tolerance in DLA-identical dogs. *Exp Hematol* 2006; 34: 1759-1770
- 5 Kamada N, Calne RY. Orthotopic liver transplantation in the rat. Technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage. *Transplantation* 1979; 28: 47-50
- 6 Kamada N, Calne RY. A surgical experience with five hundred thirty liver transplants in the rat. *Surgery* 1983; 93: 64-69
- 7 Delriviere L, Gibbs P, Kobayashi E, Goto S, Kamada N, Gianello P. Detailed modified technique for safer harvesting and preparation of liver graft in the rat. *Microsurgery* 1996; 17: 690-696
- 8 Tanaka T, Kyo M, Kokado Y, Takahara S, Hatori M, Suzuki K, Hasumi M, Toki K, Ichimaru N, Yazawa K, Hanafusa T, Namba Y, Oka K, Moriyama T, Imai E, Okuyama A, Yamanaka H. Correlation between the Banff 97 classification of renal allograft biopsies and clinical outcome. *Transpl Int* 2004; 17: 59-64
- 9 Bates WD, Davies DR, Welsh K, Gray DW,

■同行评价

本文通过建立同种异体大鼠骨髓及肝联合移植动物模型, 探讨了骨髓移植诱导肝移植术后免疫耐受的可行性及其可能机制. 实验设计合理, 具有一定的临床应用价值.

- Fuggle SV, Morris PJ. An evaluation of the Banff classification of early renal allograft biopsies and correlation with outcome. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 2364-2369
- 10 Mueller A, Schnuelle P, Waldherr R, van der Woude FJ. Impact of the Banff '97 classification for histological diagnosis of rejection on clinical outcome and renal function parameters after kidney transplantation. *Transplantation* 2000; 69: 1123-1127
- 11 Wekerle T, Sykes M. Mixed chimerism and transplantation tolerance. *Annu Rev Med* 2001; 52: 353-370
- 12 Wekerle T, Blaha P, Langer F, Schmid M, Muehlbacher F. Tolerance through bone marrow transplantation with costimulation blockade. *Transpl Immunol* 2002; 9: 125-133
- 13 Sayegh MH, Fine NA, Smith JL, Rennke HG, Milford EL, Tilney NL. Immunologic tolerance to renal allografts after bone marrow transplants from the same donors. *Ann Intern Med* 1991; 114: 954-955
- 14 Helg C, Chapuis B, Bolle JF, Morel P, Salomon D, Roux E, Antonioli V, Jeannet M, Leski M. Renal transplantation without immunosuppression in a host with tolerance induced by allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 1994; 58: 1420-1422
- 15 Sorof JM, Koerper MA, Portale AA, Potter D, DeSantes K, Cowan M. Renal transplantation without chronic immunosuppression after T cell-depleted, HLA-mismatched bone marrow transplantation. *Transplantation* 1995; 59: 1633-1635
- 16 唐礼功, 谢森, 潘铁军, 饶作祥, 李志雄, 姚爱萍, 郑三根. 输供体骨髓对嵌合体的影响. *中华实验外科杂志* 2004; 21: 637
- 17 Neipp M, Exner BG, Ildstad ST. A nonlethal conditioning approach to achieve engraftment of xenogeneic rat bone marrow in mice and to induce donor-specific tolerance. *Transplantation* 1998; 66: 969-975
- 18 Neipp M, Gammie JS, Exner BG, Li S, Chambers WH, Pham SM, Ildstad ST. A partial conditioning approach to achieve mixed chimerism in the rat: depletion of host natural killer cells significantly reduces the amount of total body irradiation required for engraftment. *Transplantation* 1999; 68: 369-378
- 19 Mayumi H, Umesue M, Nomoto K. Cyclophosphamide-induced immunological tolerance: an overview. *Immunobiology* 1996; 195: 129-139
- 20 Zhang QW, Mayumi H, Umesue M, Tomita Y, Nomoto K, Yasui H. Fractionated dosing of cyclophosphamide for establishing long-lasting skin allograft survival, stable mixed chimerism, and intrathymic clonal deletion in mice primed with allogeneic spleen cells. *Transplantation* 1997; 63: 1667-1673
- 21 Morrissey NJ, Blom D, Ryan CK, Fisher T, Bronsther O, Orloff MS. Tolerance induction permits the development of graft-versus-host disease: donor-mediated attack following small bowel transplantation in mixed chimeras. *Transpl Immunol* 1999; 7: 19-25
- 22 Kamada N. The immunology of experimental liver transplantation in the rat. *Immunology* 1985; 55: 369-389
- 23 李涛, 唐华美, 孙星, 彭志海. “二袖套法”大鼠原位肝移植的技术改进. *中国普通外科杂志* 2005; 7: 486-488
- 24 孙倍成, 王学浩, 胡建平, 张浩, 李相成. 大鼠肝移植技术改进及免疫排斥初步观察. *南京医科大学学报(自然科学版)* 2001; 21: 281-283

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

**WJG 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 2009-03-28)

CDK11p58基因过表达抑制INS-1细胞的增殖

刘洋, 杨红旺, 孟雁

刘洋, 杨红旺, 孟雁, 中国医学科学院基础医学研究所 北京协和医学院基础学院生理学系 北京市 100005
刘洋, 北京协和医学院硕士, 主要从事疾病基因功能研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30870989
国家973计划基金资助项目, No. 2006CB503907
科技部专项基金资助项目, No. 2004CCA01400
北京市自然科学基金资助项目, No. 5062034
作者贡献分布: 刘洋与孟雁对此文献均等; 此课题由孟雁、刘洋及杨红旺设计; 研究过程由刘洋与杨红旺操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由孟雁提供; 数据分析由刘洋完成; 本论文写作由刘洋、杨红旺及孟雁完成。
通讯作者: 孟雁, 100005, 北京市东单三条5号, 中国医学科学院基础医学研究所, 北京协和医学院基础学院生理学系。ymengsmile@yahoo.com
电话: 010-65296492 传真: 010-65265315
收稿日期: 2009-03-02 修回日期: 2009-03-20
接受日期: 2009-03-23 在线出版日期: 2009-03-28

Over-expression of CDK11p58 gene suppresses the proliferation of rat insulinoma cell line INS-1

Yang Liu, Hong-Wang Yang, Yan Meng

Yang Liu, Hong-Wang Yang, Yan Meng, Department of Physiology, Institute of Basic Medical Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100005, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30870989; the National 973 Program, No. 2006CB503907; the Research Foundation from Ministry of Science and Technology of China, No. 2004CCA01400; and the Natural Science Foundation of Beijing, No. 5062034
Correspondence to: Dr. Yan Meng, Institute of Basic Medical Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100005, China. ymengsmile@yahoo.com
Received: 2009-03-02 Revised: 2009-03-20
Accepted: 2009-03-23 Published online: 2009-03-28

Abstract

AIM: To observe the influences of CDK11p58 gene on the proliferation and cell cycle of rat insulinoma cell line INS-1.

METHODS: Rat insulinoma INS-1 cells were divided into three groups: the experimental group transfected with plasmid pcDNA3.0-CDK11p58; empty vector group transfected with pcDNA3.0; blank control group without any interference. After 48 hours, the expression of CDK11p58 was detected by Western blot. The proliferation activities of the INS-1 cells were assessed by

the MTT assay. Cell cycle was analyzed by flow cytometry.

RESULTS: In comparison with that in the empty vector group, the expression of CDK11p58 gene were significantly up-regulated in the experimental group after 48-h transfection ($P < 0.01$). Over-expression of CDK11p58 gene suppressed the growth of INS-1 cells ($P < 0.05$), and increased the G₁-phase cell proportion significantly ($69.87\% \pm 1.77\%$ vs $63.03\% \pm 2.66\%$, $P < 0.01$). INS-1 cells were partly blocked at G₁ phase.

CONCLUSION: CDK11p58 gene is involved in the proliferation activity of INS-1 cells. Over-expression of CDK11p58 gene may suppress INS-1 cell growth and the mechanisms may be due to the G₁ phase arrest.

Key Words: CDK11p58 gene; INS-1 cell; Cell proliferation; Cell cycle

Liu Y, Yang HW, Meng Y. Over-expression of CDK11p58 gene suppresses the proliferation of rat insulinoma cell line INS-1. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(9): 873-876

摘要

目的: 研究CDK11p58基因对大鼠胰岛瘤细胞INS-1增殖及周期的影响。

方法: INS-1细胞分为3组: 实验组转染pcDNA3.0-CDK11p58质粒; 空载体组转染pcDNA3.0空载体; 空白对照组不加任何干扰。48 h后, Western blot检测细胞中CDK11p58基因表达水平; MTT法检测转染CDK11p58基因对细胞增殖的影响; 流式细胞仪检测转染CDK11p58基因后细胞周期的变化。

结果: 转染48 h后, 与空载体组相比, 实验组CDK11p58基因的表达水平显著升高($P < 0.01$), INS-1细胞存活率下降($P < 0.05$), G₁期细胞比例显著上升($69.87\% \pm 1.77\%$ vs $63.03\% \pm 2.66\%$, $P < 0.01$), 细胞出现G₁期阻滞。

结论: CDK11p58基因与INS-1细胞增殖相关, 其高表达引起的细胞增殖速度放缓的作用机

■背景资料

CDK11是新近发现的中国人2型糖尿病的易感基因, CDK11p58基因功能为参与细胞周期调控和凋亡相关事件等。本课题组发现CDK11p58基因与胰岛β细胞增殖相关, 其高表达引起的细胞增殖速度放缓机制可能与其所致的细胞G₁期延长有关。

■同行评议者

樊红, 副教授, 东南大学医学院发育与疾病相关基因教育部重点实验室

■研发前沿

2型糖尿病是严重威胁人类健康的重大疾病之一,目前在2型糖尿病的研究中,胰岛β细胞凋亡的机制得到广泛的重视.研究清楚CDK11p58基因在影响胰岛β细胞增殖及凋亡中发挥的作用,将为研究2型糖尿病发生发展提供了重要的实验基础.

制可能与其所致的细胞G₁期延长有关.

关键词: CDK11p58基因; INS-1细胞; 细胞增殖; 细胞周期

刘洋, 杨红旺, 孟雁. CDK11p58基因过表达抑制INS-1细胞的增殖. 世界华人消化杂志 2009; 17(9): 873-876

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/873.asp>

0 引言

CDK11(cyclin-dependent kinase 11)也称为CDC2L2(cell division cycle 2-like 2)是近年报道的一个中国人2型糖尿病易感基因,定位于人1号染色体的1p36.33区,其编码蛋白为CDK11P110和CDK11P58^[1]. Tsutsui *et al*研究发现,CDK11基因功能包括参与细胞周期调控、mRNA转录和凋亡信号传导等^[2-3]. 其中CDK11P58主要在G₂/M期表达,其功能为参与细胞周期调控和凋亡相关事件等. 在有丝分裂中,CDK11P58可以使姐妹染色单体聚合,促进中心粒成熟,促进纺锤丝的聚集和双极纺锤丝的形成等^[4-6]. 目前有关该基因在胰岛β细胞增殖及周期中是否发挥的作用未见报道. 本实验我们在高糖培养条件下,在大鼠胰岛瘤细胞INS-1中过表达CDK11p58基因,观察其对INS-1细胞增殖和细胞周期的影响,探讨CDK11p58基因与胰岛细胞增殖之间的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI 1640细胞培养基(钮因公司),胎牛血清(Hyclone公司), Lipofectamine 2000(Invitrogen公司),蛋白酶和磷酸酶抑制剂(Roche公司), CDK11P58抗体(Santa Cruz公司),二抗(中杉金桥公司), PVDF膜(Millipore公司), ECL显色试剂盒(Pierce公司), MTT(华美公司),碘化丙啶(鼎国公司),其余试剂均为国产分析纯. 大鼠胰岛瘤INS-1细胞由中日友好医院临床医学研究所娄晋宁教授惠赠.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: INS-1细胞快速解冻后分装入60 mm培养皿中,加入含100 mL/L胎牛血清RPMI 1640完全培养基(含青霉素100 kU/L,链霉素100 mg/L, 50 μmol/L巯基乙醇, 10 mmol/L葡萄糖),单层培养和孵化于50 mL/L CO₂培养箱中, 37°C, 95%湿度条件下培养. 高糖培养葡萄糖浓度为20 mmol/L.

1.2.2 分组及转染: INS-1细胞分为3组: 实验

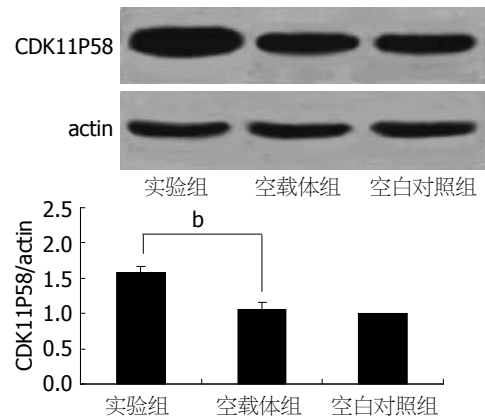


图1 转染48 h后INS-1细胞中CDK11p58基因的表达. ^b*P*<0.01 vs 空载体组.

组、空载体组和空白对照组. 实验组细胞转染pcDNA3.0-CDK11p58质粒,空载体组转染pcDNA3.0空载体,空白对照组不加任何干扰.在细胞融合率达到70%-80%时进行转染,转染前24 h将培养基换为无抗生素培养基,转染步骤按照Lipofectamine 2000说明书进行.

1.2.3 蛋白表达检测: 上述各组INS-1细胞转染48 h后,用PBS清洗,离心收集细胞,加入新鲜配制的细胞裂解液,离心后收集上清,测定蛋白含量.取等量总蛋白与上样缓冲液混合,变性后上样,SDS-PAGE电泳,转移蛋白至PVDF膜上.用含50 g/L脱脂奶粉的PBST溶液封闭,兔抗鼠CDK11P58多克隆抗体(1:1000)孵育过夜,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体(1:2000)室温孵育1 h, ECL发光显色.

1.2.4 细胞存活率检测: 取对数生长期细胞,接种于96孔板,细胞贴壁后转染pcDNA3.0-CDK11p58质粒及pcDNA3.0空载体.设空白对照组,另设培养液对照孔,加150 μL培养液作为调零孔.分别培养24、48和72 h后,每孔加20 μL MTT(5 g/L),在CO₂培养箱中避光培养3 h.弃培养液,每孔加入150 μL的DMSO,室温下避光振荡10 min,使结晶物充分融解.用酶标仪在490 nm处测定吸光度值.记录结果,绘制细胞生长曲线.

1.2.5 细胞周期检测: 上述各组细胞经转染48 h后,终止培养.消化成单细胞悬液,离心10 min后弃上清, PBS洗涤2次,用4°C预冷的700 mL/L乙醇4°C固定24 h.固定后经PBS洗涤2次,加入RNaseA至终浓度50 mg/L, 37°C水浴30 min,然后加入PI至终浓度为50 mg/L,避光染色10 min.尼龙网过滤,在流式细胞仪上检测细胞周期分布.

统计学处理 采用SPSS11.5统计软件,计量

■相关报道

国内外有关报道提示CDK11p58基因参与细胞凋亡相关事件,本实验室前期的研究证明其过表达与胰岛β细胞凋亡相关,但引起胰岛β细胞凋亡的具体机制尚缺乏研究报道.

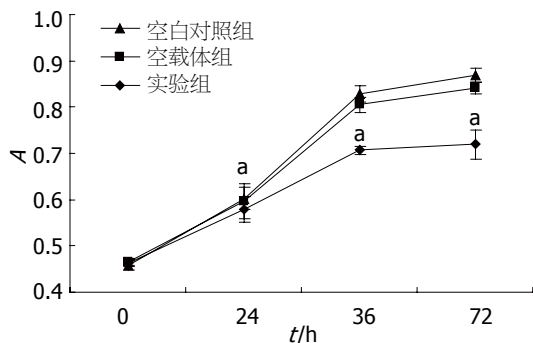


图 2 过表达*CDK11p58*基因对INS-1细胞增殖的影响. ^a*P*<0.05 vs 空载体组.

表 1 过表达*CDK11p58*基因对INS-1细胞周期的影响 (% mean ± SD, *n* = 3)

分组	细胞周期		
	G ₁	S	G ₂ /M
实验组	69.87 ± 1.77 ^b	18.50 ± 1.64	11.63 ± 2.50
空载体组	63.03 ± 2.66	18.90 ± 1.83	18.03 ± 4.50
空白对照组	63.63 ± 2.02	23.33 ± 1.99	14.00 ± 2.43

^b*P*<0.01 vs 空载体组.

资料均采用mean ± SD表示, 采用*t*检验进行统计分析, *P*<0.05认为具有统计学意义.

2 结果

2.1 转染后各组*CDK11p58*基因表达 Western blot结果显示, 转染*CDK11p58*基因48 h后, 与空载体组相比, 实验组INS-1细胞中*CDK11P58*蛋白表达水平显著升高(*P*<0.01), 约为空载体组的1.6倍(图1).

2.2 过表达*CDK11p58*基因对INS-1细胞增殖的影响 转染*CDK11p58*基因24 h后, 与空载体组相比, 实验组INS-1细胞的凋亡率显著增加、存活率在率明显减少(*P*<0.05), 至72 h, 上述变两组间仍存在显著性差异(*P*<0.05, 图2).

2.3 过表达*CDK11p58*基因对INS-1细胞周期的影响 流式细胞仪检测结果显示, 转染48 h后, 实验组INS-1细胞G₁期细胞比例(69.87 ± 1.77)上升, 与空载体组(63.03 ± 2.66)相比存在显著差异(*P*<0.01); 而空载体组G₁期细胞比例与空白对照组(63.63 ± 2.02)相比无显著差异(表1, 图3).

3 讨论

2型糖尿病已成为严重威胁人类健康的重大疾病之一, 其发病的主要原因是肥胖、脂质代谢紊乱和炎症等因素引起的机体组织对胰岛素不

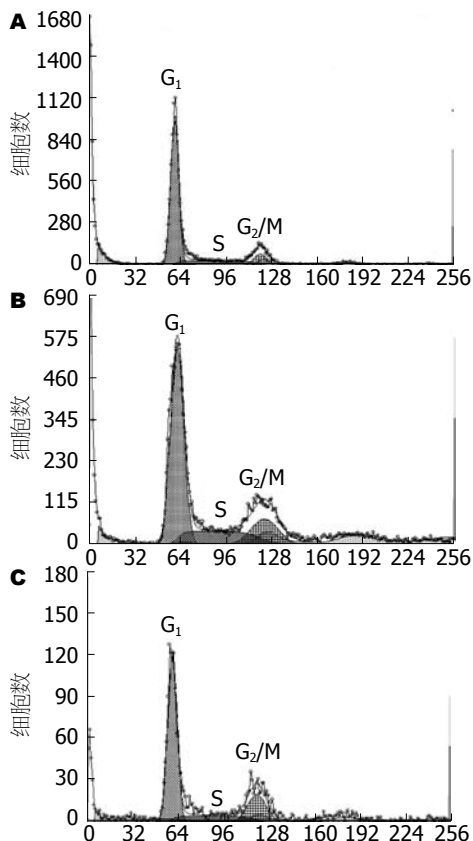


图 3 过表达*CDK11p58*基因对INS-1细胞周期的影响. A: 实验组; B: 空载体组; C: 空白对照组.

敏感所致的胰岛素抵抗和胰岛β细胞凋亡引起的胰岛功能受损. 目前在2型糖尿病的研究中, β细胞凋亡的机制受到越来越广泛的重视.

细胞增殖与凋亡密切相关, 细胞周期阻滞后, 机体可通过诱导细胞凋亡来清除体内损伤的细胞, 同时, 细胞凋亡也常伴有细胞生长阻滞. *CDK11(CDC2L2)*是新近发现的中国北方汉族人群2型糖尿病的易感基因, 其与老龄人群2型糖尿病发病的易感性关系密切^[7]. 研究表明, 采用高糖条件培养INS-1细胞可引起细胞内糖毒性, 致使β细胞出现功能异常, 模拟病理情况^[8-9]. *CDK11p58*基因已被证实参与细胞凋亡事件, 我们在前期的研究中已表明, 过表达*CDK11p58*基因可以引起INS-1细胞的凋亡, 但是其与参与INS-1细胞周期及细胞增殖的调控情况尚不清楚. 本实验我们采用高糖培养大鼠胰岛瘤细胞INS-1, 过表达*CDK11p58*基因, 利用MTT及流式细胞仪检测等方法观察*CDK11p58*基因对INS-1细胞细胞周期及增殖的影响.

研究结果显示, 转染48 h后, 与空载体组和空白对照组相比, 实验组INS-1细胞中*CDK11p58*基因表达水平明显升高, 细胞的凋亡

应用要点

本实验的研究结果为进一步探讨*CDK11p58*基因在诱导β细胞凋亡及在2型糖尿病发生发展中的作用提供了重要的实验基础.

■同行评价

本文立意有一定的创新性,设计方法尚可,结果可信,但讨论不够深入。

率增加、存活率显著下降,同时,细胞的增殖速度放缓,G₁期的细胞比例显著上升,即部分细胞被阻滞于G₁期。

以上结果表明,CDK11p58基因的过表达可导致INS-1细胞周期的异常,从而引起INS-1细胞的生长受阻、凋亡增加和存活率降低。其作用机制可能是:过表达的CDK11p58基因影响了INS-1细胞内某些细胞周期调控因子的合成,从而导致相应的细胞周期相关蛋白表达异常,使部分INS-1细胞的生长被阻滞于G₁期,不能继续完成正常的分裂过程,进而使进入S期的细胞数目减少,DNA复制合成受阻,细胞增殖速度放缓,从而引起细胞的凋亡和存活率下降。至于CDK11p58基因的过表达能引起INS-1细胞中何种细胞周期调控因子的异常表达还需进一步的实验证明。

本实验的研究结果为进一步探讨CDK11p58基因在诱导胰岛β细胞凋亡及在2型糖尿病发生发展中的作用提供了重要的实验基础。

4 参考文献

- Gururajan R, Grenet J, Lahti JM, Kidd VJ. Isolation and characterization of two novel metalloproteinase genes linked to the Cdc2L locus on human chromosome 1p36.3. *Genomics* 1998; 52: 101-106
- Tsutsui T, Umemura H, Tanaka A, Mizuki F, Hirose Y, Ohkuma Y. Human mediator kinase subunit CDK11 plays a negative role in viral activator VP16-dependent transcriptional regulation. *Genes Cells* 2008; 13: 817-826
- Yun X, Wu Y, Yao L, Zong H, Hong Y, Jiang J, Yang J, Zhang Z, Gu J. CDK11(p58) protein kinase activity is associated with Bcl-2 down-regulation in pro-apoptosis pathway. *Mol Cell Biochem* 2007; 304: 213-218
- Hu D, Valentine M, Kidd VJ, Lahti JM. CDK11(p58) is required for the maintenance of sister chromatid cohesion. *J Cell Sci* 2007; 120: 2424-2434
- Yokoyama H, Gruss OJ, Rybina S, Caudron M, Schelder M, Wilm M, Mattaj IW, Karsenti E. Cdk11 is a RanGTP-dependent microtubule stabilization factor that regulates spindle assembly rate. *J Cell Biol* 2008; 180: 867-875
- Petretti C, Savoian M, Montembault E, Glover DM, Prigent C, Giet R. The PITSLRE/CDK11p58 protein kinase promotes centrosome maturation and bipolar spindle formation. *EMBO Rep* 2006; 7: 418-424
- Li Y, Wu G, Zuo J, Gao J, Chang Y, Fang FD. Genetic variations of the CDC2L2 gene are associated with type 2 diabetes in a Han Chinese cohort. *Diabetes Metab Res Rev* 2007; 23: 455-461
- Collier JJ, Zhang P, Pedersen KB, Burke SJ, Haycock JW, Scott DK. c-Myc and ChREBP regulate glucose-mediated expression of the L-type pyruvate kinase gene in INS-1-derived 832/13 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293: E48-E56
- Ubeda M, Rukstalis JM, Habener JF. Inhibition of cyclin-dependent kinase 5 activity protects pancreatic beta cells from glucotoxicity. *J Biol Chem* 2006; 281: 28858-28864

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 2009-03-28)

JAK/STAT信号通路在胰弹性蛋白酶诱导大鼠Kupffer细胞分泌IL-18中的作用

李敏利, 朱人敏, 张晓华, 史薇, 杨妙芳, 季洪赞, 郭婧芸

李敏利, 朱人敏, 张晓华, 杨妙芳, 季洪赞, 郭婧芸, 南方医科大学南京临床学院 中国人民解放军南京军区南京总医院千部消化内科 江苏省南京市 210002
史薇, 广州市第一人民医院消化内科 广东省广州市 510180
李敏利, 2006届南方医科大学硕士, 主要从事消化系统疾病的研究。

南京军区南京总医院科研基金资助项目, No. 2006020

作者贡献分布: 李敏利与朱人敏对此文所作贡献均等; 此课题由朱人敏与张晓华设计, 研究过程由李敏利、史薇、杨妙芳、季洪赞及郭婧芸操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由张晓华提供; 数据分析由李敏利、朱人敏、史薇及郭婧芸完成; 本论文写作由李敏利与朱人敏完成。

通讯作者: 朱人敏, 教授, 210002, 江苏省南京市中山东路305号, 中国人民解放军南京军区南京总医院消化内科. jsmz@163.com
电话: 025-80860027

收稿日期: 2008-11-27 修回日期: 2009-02-27

接受日期: 2009-03-02 在线出版日期: 2009-03-28

Role of JAK/STAT signaling pathway in pancreatic elastase-induced secretion of interleukin-18 within rat Kupffer cells

Min-Li Li, Ren-Min Zhu, Xiao-Hua Zhang, Wei Shi, Miao-Fang Yang, Hong-Zan Ji, Jing-Yun Guo

Min-Li Li, Ren-Min Zhu, Xiao-Hua Zhang, Hong-Zan Ji, Miao-Fang Yang, Jing-Yun Guo, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA Nanjing Military Command, Nanjing Clinical School of Southern Medical University, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China

Wei Shi, Department of Gastroenterology, the First People's Hospital, Guangzhou 510180, Guangdong Province, China

Supported by: the Research Foundation of Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, No. 2006020

Correspondence to: Dr. Ren-Min Zhu, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA Nanjing Military Command, 305 East Zhongshan Road, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China. jsmz@163.com

Received: 2008-11-27 Revised: 2009-02-27

Accepted: 2009-03-02 Published online: 2009-03-28

Abstract

AIM: To investigate the role of JAK/STAT signaling pathway in secretion of interleukin-18 (IL-18) by Kupffer cells in experimental acute pancreatitis with liver injury.

METHODS: Hepatic Kupffer cells extracted through enzymatic digestion and density gradient centrifugation were divided into four

groups. Group A (normal saline group) served as control group; Group B was lipopolysaccharide (LPS) treatment group; Group C was LPS plus pancreatic elastase treatment group; Group D was AG490 treatment group. The concentrations (IL-18) in Kupffer cell supernatant were determined by ELISA, and the expression of JAK2 protein was determined by immunofluorescence and Western blot.

RESULTS: The concentrations of IL-18 in the supernatant and JAK2 protein in group B had increased significantly compared with those in group A (IL-18: 312.23 ± 20.5 ng/L vs 13.50 ± 2.18 ng/L, $P < 0.01$). The same result was seen when group C was compared with group B ($P < 0.01$). The concentrations of IL-18 and JAK2 protein in group D decreased significantly compared with those in group C (317.31 ± 25.24 ng/L vs 438.86 ± 21.32 ng/L, $P < 0.01$), but just only slightly increased compared with those in group B.

CONCLUSION: Inhibition of JAK/STAT signaling pathway activation may reduce pancreatic elastase-induced expression of proinflammatory cytokines IL-18 in rat Kupffer cells, which may help alleviate liver injury induced by acute pancreatitis.

Key Words: JAK/STAT pathway; Interleukin-18; Acute pancreatitis; Kupffer cells; Liver injury

Li ML, Zhu RM, Zhang XH, Shi W, Yang MF, Ji HZ, Guo JY. Role of JAK/STAT signaling pathway in pancreatic elastase-induced secretion of interleukin-18 within rat Kupffer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(9): 877-881

摘要

目的: 探讨JAK/STAT信号通路在胰弹性蛋白酶(elastase)诱导Kupffer细胞分泌IL-18中的作用机制。

方法: 采用酶消化法及密度梯度离心法将提取的肝脏Kupffer细胞分为4组, A组: 生理盐水组(正常对照组); B组: 脂多糖(LPS)处理组; C

背景资料

急性胰腺炎(AP)是临床常见急腹症之一,其特点是起病急,进展快,并发症多。住院患者死亡率高达25%。AP并发胰腺外器官损伤时死亡率极高。因此,对于早期控制AP症状和并发症对其预后至关重要, JAK/STAT信号通路作为一条重要的炎症反应性通路,参与多种炎症介质介导的信号转导过程,他在AP发生、发展过程中起到重要调节作用。

同行评议者

刘连新, 教授, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科

■ 研发前沿

AP合并肝损伤作为评价AP疗效和预后的重要指标,其复杂的致病机制是目前AP一大研究热点及难点.随着分子生物学的发展,有关AP发病以及并发胰腺外器官损伤各机制中,炎症细胞过度激活学说成为一大研究热点.

组: LPS和elastase处理组; D组: AG490预处理组. 采用酶免疫吸附(ELISA)法检测Kupffer细胞上清液中IL-18含量; 细胞免疫荧光染色技术和Western blot法检测细胞总蛋白中JAK2的表达.

结果: 与A组比较, B组在给予LPS刺激后, JAK2蛋白的表达以及上清液中IL-18含量均明显增加(IL-18: 312.23 ± 20.5 ng/L vs 13.50 ± 2.18 ng/L, $P < 0.01$); C组在同时给予LPS和elastase刺激后, JAK2的表达显著升高, 上清液中IL-18含量与B组比较也显著增加($P < 0.01$); 而D组在预先给予AG490处理后, JAK2表达明显下降, 上清液中IL-18含量也有不同程度降低, 与C组比较差异有统计学意义(317.31 ± 25.24 ng/L vs 438.86 ± 21.32 ng/L, $P < 0.01$), 但与B组比较, 各值仅有轻微变化, 差异无统计学意义.

结论: 抑制JAK/STAT通路的活化可下调elastase诱导Kupffer细胞分泌促炎症因子IL-18的表达, 这可能有助于减轻急性胰腺炎时炎症反应和肝损伤.

关键词: 急性胰腺炎; JAK/STAT信号通路; 白介素-18; 枯否细胞; 肝损伤

李敏利, 宋人敏, 张晓华, 史薇, 杨妙芳, 季洪赞, 郭婧芸. JAK/STAT信号通路在胰弹性蛋白酶诱导大鼠Kupffer细胞分泌IL-18中的作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(9): 877-881
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/877.asp>

0 引言

关于急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)发病机制以及合并胰腺外器官损伤的研究, 国内外取得了不少进展, 近年来, 炎症细胞过度激活学说更成为一大研究热点. AP时, 炎症胰腺组织释放大量的炎症介质, 并通过一序列生物学级联放大效应, 进一步释放大促炎症因子, 其中包括近年新发现的一种重要的炎症因子IL-18, 这些炎症介质在AP发生、发展过程中起重要调节作用, 是导致AP病情加重的关键因素^[1]. 肝脏拥有全身最大的巨噬细胞群, 即枯否细胞(kupffer cell, KC), 它具有强大的分泌各种细胞因子的功能, 对AP的病情严重程度及胰腺外器官损伤起重要作用^[2]. Janus激活/信号传导和转录激活子(janus kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT)信号通路是细胞因子信号传导的重要途径, 但AP时, JAK/STAT通路介导肝脏分泌IL-18作用的

研究目前尚无报道. 本研究旨在通过培养原代大鼠KC, 观察AP时KC中JAK2蛋白表达情况及IL-18含量, 明确JAK/STAT通路在AP时KC分泌IL-18的作用机制, 以探讨减少AP引起急性炎症反应的有效途径.

1 材料和方法

1.1 材料 Percoll分离液购自Pharmacia公司; AG490购自Biosource公司; Hepes、PMSF均购自Amresco公司; RPMI 1640干粉培养液购自Gibco公司; 胰弹性蛋白酶购自Chemicon公司; IL-18试剂盒购自ADL公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠JAK2-IgG购自Cell Signal公司; 兔抗大鼠 β -actin购自博士德公司; 细胞裂解液购自碧云天公司; 其他常用试剂均为国产分析纯试剂. PVDF膜为美国Millipore公司产品; 酶标仪、PAGE凝胶电泳仪、垂直电泳槽、电泳凝胶图像分析系统均购自Bio-Rad公司.

1.2 方法

1.2.1 枯否细胞的分离、纯化和培养: 健康 δ SD大鼠24只(200-250 g), 购自中国人民解放军南京军区南京总医院实验动物中心. 按文献[3]的改进方法采用酶消化法、密度梯度离心以及选择贴壁法提取KC. 将提取的KC接种于6孔板中(1×10^6 /L), 1 h后去除培养基, 用温PBS清洗2遍, 去除未贴壁细胞, 贴壁细胞即为实验所需的高纯度KC. 细胞活性测定采用苔盼蓝拒染实验, 细胞性质测定采用吞噬墨汁实验.

1.2.2 枯否细胞分组和处理: 本实验参照Murr *et al*^[4-5]的方法, 并根据本实验要求作一定改进. 将上述获得的KC用含100 mL/L FCS的RPMI-1640培养基培养24 h后分成4组($n = 6$). A组(正常对照组): 在培养基上清液中加入生理盐水(30 mL/L); B组: 上清液中加入脂多糖(LPS, 50 μ g/L); C组: 上清液中加入LPS(50 μ g/L)和胰弹性蛋白酶(elastase, 1 U/mL); D组: 上清液中加入AG490(30 μ mol/L)预先刺激0.5 h后, 再用LPS(50 μ g/L)和elastase(1 U/mL)处理.

1.2.3 细胞上清液收集: KC在加入刺激因子作用后12 h收集培养基, 4 $^{\circ}$ C, 10000 g离心10 min, 取上清液并立即置于-70 $^{\circ}$ C保存.

1.2.4 细胞上清液中IL-18含量测定: ELISA法检测细胞上清液中IL-18的含量, 具体步骤严格按试剂盒使用说明书进行操作, 通过绘制标准曲线得出样品中相应细胞因子含量. 该方法检测IL-18的灵敏度为1 ng/L.

■ 相关报道

研究发现, AP肝损伤进展、严重程度与炎症因子作用有关, 但有关AP肝损伤机制中具体作用途径还不清楚.

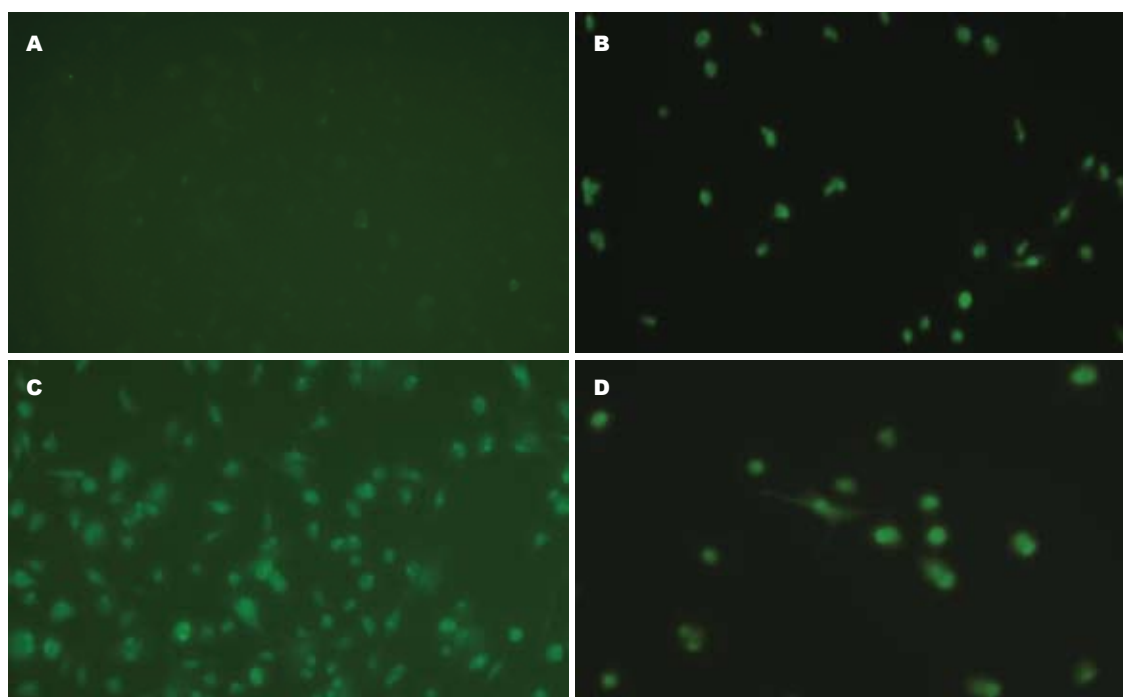


图1 枯否细胞JAK2表达变化情况($\times 200$)。A: 正常对照组; B: LPS组; C: LPS+elastase共同处理组; D: AG490治疗组。

1.2.5 细胞免疫荧光染色: 各实验组KC经爬片后用100 g/L多聚甲醛固定30 min, PBS冲洗15 min, 0.1% Triton X-100通透10 min, PBS震荡冲洗15 min, 10% BSA-PBST封闭30 min; 各加一抗(JAK2单克隆抗体1:50稀释)4℃孵育过夜, PBS冲洗5 min $\times 3$, 二抗(1:100稀释), 37℃暗盒孵育1.5 h, PBS洗5 min $\times 3$, 抗荧光淬灭封片液封片。JAK2阳性主要定位于细胞质, 细胞质发荧光为阳性细胞。阴性对照不加一抗, 其余步骤相同。Olympus荧光显微镜观察并摄片。

1.2.6 细胞总蛋白中JAK2表达的检测: 各实验组分别在添加刺激因子继续培养12 h后收集细胞, 同期收集对照组细胞, 用RIPA细胞裂解液裂解细胞, 提取总蛋白。所提取的蛋白均采用Bradford法行总蛋白定量, 各取100 μg /孔, 行100 mL/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离(2 h)。待电泳结束后, 将蛋白(低温条件下湿转3 h)转至PVDF膜上, 膜按常规封闭。加入兔抗鼠JAK2单克隆抗体(1:1000稀释), 4℃过夜, 用TBST洗膜5次, 每次6 min, 再加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1:2000稀释), 室温摇床上反应4 h, 再用TBST洗膜5次, 每次6 min。洗膜后ECL化学发光, X线底片曝光显影, 以 β -actin作为内参照。用Bio-Rad图像分析系统照相, 用Image-Pro软件分析, 以相应条带灰度值表示相对蛋白含量。

统计学处理 所有数据采用SPSS13.0统计软件进行分析, 计量资料以mean \pm SD表示, 多组均

数间比较采用单因素方差分析, 两组均数间比较采用 t 检验, $P<0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 KC分离培养、得率和纯度鉴定 经酶消化法、Percoll密度梯度离心和选择性贴壁法提取肝脏KC, 每只大鼠KC获得 $(2.40\pm 0.16)\times 10^7$ 个, 细胞贴壁率为42.7%, 采用台盼蓝拒染法鉴定细胞活力为95%以上; 吞噬墨汁实验鉴定细胞纯度达92%以上。

2.2 IL-18含量 与A组比较, B组IL-18含量显著增加($P<0.01$); 与B组比较, C组IL-18含量增加更明显($P<0.01$); 与C组比较, D组IL-18含量明显减少($P<0.01$), 但与B组比较仅有轻微变化, 差异无统计学意义($P>0.05$, 表1)。

2.3 JAK2蛋白表达与定位

2.3.1 细胞免疫荧光: 荧光显微镜下观察细胞发绿色荧光情况。未作处理的KC未检测到荧光染色的细胞(图1A); B组可见JAK2表达微弱(图1B); 给与LPS和elastase处理后, JAK2表达上调, 与B组比较差异显著(图1C, $P<0.01$); D组给与AG490预处理后, JAK2表达明显下调, 与C组比较明显减弱差异显著($P<0.01$), 但和B组比较无显著性差异($P>0.05$, 图1D)。

2.3.2 细胞中JAK2蛋白表达检测: 各实验组和对照组KC中均有JAK2表达(图2)。给予LPS刺激后, KC中JAK2蛋白表达比对照组明显增加

■创新盘点

本文用ELISA法检测枯否细胞上清液中IL-18含量; 细胞免疫荧光染色和Western blot方法直接检测KC中JAK2表达量的变化, 分析其与AP肝损伤的可能关系。

■应用要点

本文主要研究在KC各条信号通路中的一条重要信号通路JAK/STAT信号通路在AP肝损伤中表达的变化情况, 可为AP治疗提供新的思路。

■名词解释

脂多糖(LPS): 革兰氏阴性细菌细胞壁上的特有结构, 其化学成分主要有O特异性链、核心多糖和类脂A3部分组成。当机体受到创伤、烧伤、感染等外界损伤时, 他可突破机体黏膜屏障, 进而导致严重反应的发生、发展, 在机体严重反应过程中有重要促进作用。

表 1 AP大鼠KC上清液IL-18含量($\mu\text{g/L}$, mean \pm SD, $n = 6$)

分组	IL-18
正常对照组	13.50 \pm 2.18
LPS组	312.23 \pm 20.5 ^a
LPS + elastase共同处理组	438.86 \pm 21.32 ^{ab}
AG490治疗组	317.31 \pm 25.24 ^{ad}

^a $P < 0.05$ vs 正常对照组; ^b $P < 0.01$ vs LPS组; ^c $P < 0.01$ vs LPS + elastase共同处理组。

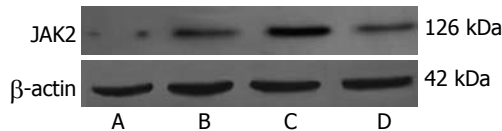


图 2 细胞中JAK2蛋白表达检测。A: 正常对照组; B: LPS组; C: LPS+elastase共同处理组; D: AG490治疗组。

($P < 0.01$); 同时给予LPS和elastase刺激后, JAK2表达进一步增加($P < 0.01$); 预先给予AG490处理后在给予LPS和elastase刺激, JAK2表达和C组比较明显降低($P < 0.01$), 但与B组比较仅略有增加($P > 0.05$, 图3)。

3 讨论

KC是定居于肝窦内的巨噬细胞, 是体内最大的固定型巨噬细胞群, 约占巨噬细胞总数的80%-90%, 是产生炎症因子的主要效应细胞。AP时, 由于胰腺腺泡细胞大量坏死和凋亡, 促使胰酶异常激活并释放入血, 同时炎症胰腺组织释放大量的炎症介质, 经门静脉到达肝脏。这些促炎症因子通过刺激并激活KC内信号转导通路, 通过一序列生物学反应后引起连锁和放大效应, 释放大量细胞因子, 如IL-18、TNF- α 、IL-6等, 这些细胞因子均参与AP并发肝损伤的发生和发展^[6-9]。AP时, 肝脏是机体炎症反应最为活跃及免疫细胞聚集的重要器官, 对AP的严重程度、疾病进展及预后均有重要监测作用。

JAK/STAT信号通路是细胞因子信号转导的重要途径之一, 近年来备受关注, 他代表的是一条信号从细胞膜到细胞核的信号转导途径, 涉及免疫、细胞增殖分化、细胞凋亡、炎症等多种生理和病理反应的调节作用。目前已发现多种细胞因子, 主要有IL-18、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等, 他们均可通过激活JAK/STAT信号转导通路, 在炎症反应的发生、发展过程中发挥重要作用, 因此推测针对性阻断JAK/STAT信号通路将可能达到改善AP并发肝损伤病理过程的目的^[10-11]。

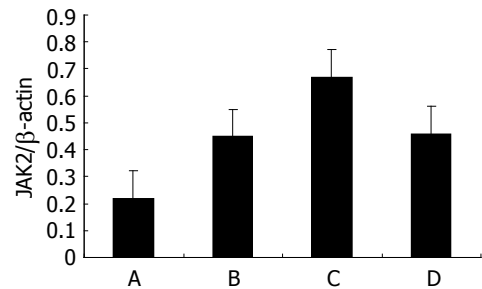


图 3 各组SD大鼠肝脏JAK2/ β -actin的灰度比值。A: 正常对照组; B: LPS组; C: LPS+elastase共同处理组; D: AG490治疗组。

IL-18是一种新发现的促炎症因子, 主要由肝脏枯否细胞以及肝外巨噬细胞产生。IL-18有许多生物学活性, 他可诱导机体产生大量 γ -干扰素、TNF- α 、IL-1 β 等细胞因子, 并通过这些细胞因子介导组织、器官的炎症坏死, 同时加强FasL介导的细胞凋亡途径导致细胞损伤, 最终导致全身性组织损害^[12-13]。近年来多项研究发现, AP时IL-18呈高水平表达, 而当合并局部胰腺坏死及远处器官功能衰竭等并发症时, IL-18表达增高更为显著, 他反映了AP的严重程度, 可以作为AP的病情预测指标^[14-15]。AG490是一种人工合成的苯丙亚甲基丙二腈脂类衍生物, 为JAK2特异性抑制剂, 可以与受体酪氨酸激酶竞争结合位点, 阻断其下游激酶活化, 进而抑制细胞因子介导的生物、病理效应。研究发现AG490能抑制IL-18诱导JAK/STAT信号通路的活化^[16]。因此, 本实验重点通过体外培养KC, 模拟体外AP模型, 观察在给予AG490处理后KC上清液中IL-18表达情况和KC中JAK2表达情况, 探讨AP肝损伤机制中, IL-18和AP肝损伤之间的关系, 以及IL-18介导JAK/STAT信号通路参与AP发病及发展的过程。

本研究发现, 正常KC上清液中IL-18有极少量表达, 给予LPS刺激后, KC上清液中IL-18表达显著上调, 同时给予LPS和elastase刺激后, IL-18表达增加更为显著, 而预先给予AG490处理后IL-18表达则明显低于AP肝损伤组。由此可见, LPS和elastase通过协同作用, 使KC产生的生物学效应得以放大, 从而正性上调KC IL-18蛋白的表达, 而AG490则有效降低了KC上清液中IL-18的表达。另外, 我们又通过细胞免疫荧光的方法和Western blot法检测JAK2蛋白的表达情况, 发现KC细胞质中JAK2荧光量、荧光强度以及总蛋白含量变化与IL-18表达在动态变化上基本一致。因此推测, KC中可能存在JAK/STAT信号通

路结合位点, AP肝损伤时, elastase刺激KC后激活JAK2, 通过JAK2/STAT信号通路诱导IL-18的大量分泌和活化; 但阻断JAK2活化后, 由于抑制了其下游信号活化, 进而减少了IL-18的分泌. 这进一步提示AP时, 可能通过激活KC中的JAK/STAT信号通路, 介导IL-18表达上调, 进而在AP肝损伤中发挥重要作用. 总之, 上述研究提示在AP诱发急性炎症反应和并发肝损伤的发生、发展过程中, JAK/STAT信号通路起到重要调节作用; 通抑制JAK/STAT信号通路的信号转导途径, 可有效减轻AP炎症反应, 进而达到减轻肝损伤的作用. 因此, 在参考基础实验的基础上, 还应再进行深入完全的临床研究, 以更好地掌握AP并发肝损伤的发病机制, 寻找出潜在的新的预防性和治疗方法.

4 参考文献

- Jaffray C, Yang J, Norman J. Elastase mimics pancreatitis-induced hepatic injury via inflammatory mediators. *J Surg Res* 2000; 90: 95-101
- Pastor CM, Vonlaufen A, Georgi F, Hadengue A, Morel P, Frossard JL. Neutrophil depletion--but not prevention of Kupffer cell activation--decreases the severity of cerulein-induced acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1219-1224
- Liu H, Cao H, Wu ZY. Isolation of Kupffer cells and their suppressive effects on T lymphocyte growth in rat orthotopic liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3133-3136
- Murr MM, Yang J, Fier A, Kaylor P, Mastorides S, Norman JG. Pancreatic elastase induces liver injury by activating cytokine production within Kupffer cells via nuclear factor-Kappa B. *J Gastrointest Surg* 2002; 6: 474-480
- 冬暄, 田伏洲, 李红, 李旭, 罗皓, 向珂. 胰弹性蛋白酶对内毒素诱导的肝枯否细胞TNF- α 、IL-1 β 表达的影响. *解放军医学杂志* 2004; 29: 801-802
- Ueda T, Takeyama Y, Yasuda T, Matsumura N, Sawa H, Nakajima T, Ajiki T, Fujino Y, Suzuki Y, Kuroda Y. Significant elevation of serum interleukin-18 levels in patients with acute pancreatitis. *J Gastroenterol* 2006; 41: 158-165
- Malleo G, Mazzon E, Siriwardena AK, Cuzzocrea S. TNF-alpha as a therapeutic target in acute pancreatitis--lessons from experimental models. *ScientificWorldJournal* 2007; 7: 431-448
- Stimac D, Fisić E, Milić S, Bilić-Zulle L, Perić R. Prognostic values of IL-6, IL-8, and IL-10 in acute pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 209-212
- Jee SH, Chu CY, Chiu HC, Huang YL, Tsai WL, Liao YH, Kuo ML. Interleukin-6 induced basic fibroblast growth factor-dependent angiogenesis in basal cell carcinoma cell line via JAK/STAT3 and PI3-kinase/Akt pathways. *J Invest Dermatol* 2004; 123: 1169-1175
- Lee C, Lim HK, Sakong J, Lee YS, Kim JR, Baek SH. Janus kinase-signal transducer and activator of transcription mediates phosphatidic acid-induced interleukin (IL)-1beta and IL-6 production. *Mol Pharmacol* 2006; 69: 1041-1047
- Sugimoto N, Nakahira M, Ahn HJ, Micallef M, Hamaoka T, Kurimoto M, Fujiwara H. Differential requirements for JAK2 and TYK2 in T cell proliferation and IFN-gamma production induced by IL-12 alone or together with IL-18. *Eur J Immunol* 2003; 33: 243-251
- Tsutsui H, Matsui K, Okamura H, Nakanishi K. Pathophysiological roles of interleukin-18 in inflammatory liver diseases. *Immunol Rev* 2000; 174: 192-209
- Takeuchi D, Yoshidome H, Kato A, Ito H, Kimura F, Shimizu H, Ohtsuka M, Morita Y, Miyazaki M. Interleukin 18 causes hepatic ischemia/reperfusion injury by suppressing anti-inflammatory cytokine expression in mice. *Hepatology* 2004; 39: 699-710
- Rau B, Baumgart K, Paszkowski AS, Mayer JM, Beger HG. Clinical relevance of caspase-1 activated cytokines in acute pancreatitis: high correlation of serum interleukin-18 with pancreatic necrosis and systemic complications. *Crit Care Med* 2001; 29: 1556-1562
- Endo S, Inoue Y, Fujino Y, Wakabayashi G, Inada K, Sato S. Interleukin 18 levels reflect the severity of acute pancreatitis. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2001; 110: 285-291
- Kalina U, Kauschat D, Koyama N, Nuernberger H, Ballas K, Koschmieder S, Bug G, Hofmann WK, Hoelzer D, Ottmann OG. IL-18 activates STAT3 in the natural killer cell line 92, augments cytotoxic activity, and mediates IFN-gamma production by the stress kinase p38 and by the extracellular regulated kinases p44erk-1 and p42erk-21. *J Immunol* 2000; 165: 1307-1313

■同行评价

本研究选题较为新颖, 研究方法选择适当, 结果准确, 结论可靠, 有一定的创新性和临床价值.

编辑 李军亮 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 2009-03-28)

永生化骨髓间充质干细胞的生物学特性

方驰华, 程斌, 范应方

■背景资料

越来越多的研究表明, 骨髓间充质干细胞(BMSCs)治疗器官功能衰竭有很好的疗效。同时发现BMSCs具有体外易衰老等缺点, 这严重影响了BMSCs进一步研究及临床应用。

方驰华, 程斌, 范应方, 南方医科大学珠江医院肝胆一科 广东省广州市 510282
方驰华, 教授, 主要从事肝脏肿瘤外科、腹腔镜外、数字化虚拟肝脏及肝脏干细胞研究。

作者贡献分布: 本实验设计由方驰华完成; 实验实施及文章撰写由程斌完成; 论文修改由范应方完成。

通讯作者: 方驰华, 510282, 广东省广州市, 南方医科大学珠江医院肝胆一科. fangch_dr@126.com
电话: 020-84360607

收稿日期: 2009-01-06 修回日期: 2009-01-16

接受日期: 2009-02-09 在线出版日期: 2009-03-28

Biological characteristics of immortalized bone marrow mesenchymal stem cells

Chi-Hua Fang, Bin Cheng, Ying-Fang Fan

Chi-Hua Fang, Bin Cheng, Ying-Fang Fan, Department of Hepatobiliary Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

Correspondence to: Chi-Hua Fang, Department of Hepatobiliary Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China. fangch_dr@126.com

Received: 2009-01-06 Revised: 2009-01-20

Accepted: 2009-02-09 Published online: 2009-03-28

Abstract

AIM: To study biological characteristics of immortalizing bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs).

METHODS: Plasmid pCMVSV40T/PUR containing the simian virus 40 large T antigen gene (SV40Tag) was transfected into BMSCs. The cell shape of immortalized BMSCs was observed. Its capacity to differentiate into osteoblast cells was detected through the activity of ALP. Its tumorigenicity was examined using the nude mice experiment. Growth curve of cells in different serum concentration culture was described and its activity was measured.

RESULTS: Untreated BMSCs, after fifteenth passages, could not passage, while immortalized BMSCs of this passage preserved good activity but with contact inhibition. Immortalized BMSCs differentiated into osteoblasts. The cells,

which were injected into nude mice, had no tumorigenicity. The immortalized BMSCs, cultured in 20% serum concentration, grew faster than that in other serum concentrations. The activity of immortalized BMSCs, which were frozen by 50% and 90% of serum concentration, were higher than that of 20%.

CONCLUSION: *In vitro*, the immortalized BMSCs, with pCMVSV40T/PUR, have good activity, but no tumorigenicity. The immortalized BMSCs can provide a large number of cells.

Key Words: SV40T; Bone marrow mesenchymal stem cells; Immortalization

Fang CH, Cheng B, Fan YF. Biological characteristics of immortalized bone marrow mesenchymal stem cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(9): 882-885

摘要

目的: 探讨永生化骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)的生物学特性。

方法: 通过质粒pCMVSV40T/PUR导入大鼠BMSCs, 建立永生化BMSCs。在倒置显微镜下观察细胞形态; 采用检测碱性磷酸酶的活性, 了解永生化BMSCs是否可分化为成骨细胞; 采用裸鼠皮下接种实验检测细胞的致瘤性; 应用不同血清浓度进行细胞培养及冻存, 描绘其生长曲线及复苏后的活性。

结果: 未导入质粒的BMSCs培养至15代后细胞不能继续传代, 呈明显衰老迹象, 而永生化BMSCs培养至5代后仍可保持较好的活性, 但具有明显接触抑制; 永生化BMSCs具有分化为成骨细胞的能力; 裸鼠接种后无致瘤性; 与其他血清浓度相比, 20%血清培养组的细胞生长速度较快; 50%及90%血清组其复苏后较20%血清组活性高($P < 0.05$)。

结论: 在体外, pCMVSV40T/PUR构建的永生化BMSCs具有活性较好等特性, 且无成瘤性, 可为BMSCs的研究及应用提供大量的细胞来源。

■同行评议者

程树群, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院综合治疗三科

关键词: 猴肾病毒40; 骨髓间充质干细胞; 永生化

方驰华, 程斌, 范应方. 永生化骨髓间充质干细胞的生物学特性. 世界华人消化杂志 2009; 17(9): 882-885
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/882.asp>

0 引言

越来越多的研究表明, 骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 治疗器官功能衰竭有很好的疗效^[1]. 同时发现BMSCs具有体外易衰老等缺点, 这严重影响了BMSCs进一步研究及临床应用^[2]. 本研究通过质粒pCMVSV40T/PUR导入永生化基因SV40T建立了永生化BMSCs, 并对其特性进行分析.

1 材料和方法

1.1 材料 DMEM培养基购自Hyclone公司, 胰蛋白酶购自Amersco公司, 胎牛血清购自美国Gibco公司, 胎蓝为Amersco公司产品, 碱性磷酸酶(ALP)检测试剂购置盒晶美生物工程公司, 倒置生物显微镜购置重庆光学仪器厂, 脂质体Lipofectamine2000和小剂量质粒提取试剂盒购自美国Gibco公司, pCMVSV40T/PUR质粒由瑞典Jan Holgersson教授惠赠.

1.2 方法

1.2.1 pCMVSV40T/PUR的鉴定及转染: 采用percoll梯度离心法分离纯化大鼠的BMSCs^[3]. 挑选生长状态良好、80%汇合的第3代BMSCs, 以脂质体Lipofectin2000为载体通过质粒pCMVSV40T/PUR转染后, 细胞通过嘌呤霉素筛选后, 克隆扩大培养, 建成永生化BMSCs.

1.2.2 ALP检测成骨细胞: 取永生化BMSCs细胞, 以 $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的种植密度接种到预置盖玻片的六孔培养板中培养, 使用成骨添加剂的条件培养基(高糖DMEM完全培养液中加入地塞米松100 nmol/L、 β -甘油磷酸钠10 mmol/L、维生素C 50 mg/L)持续培养, 细胞培养3 d后, 取出六孔培养板中的盖玻片, PBS冲洗5 min, 3次, 将ALP底物(按照ALP试剂盒配制: A液为2 mol/L乙二醇胺缓冲液, 每50 mL含乙二醇胺10 mL、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 100 mg, 用浓盐酸约1.95 mL调pH至10.0; B液为30 mmol/L磷酸对硝基苯酚, 临用前将A、B液等量混合), 加2滴于盖玻片上, 和细胞内ALP直接反应, 镜下观察, 阳性细胞呈蓝黑色.

1.2.3 裸鼠接种检测细胞致瘤性: 取第15代永生化BMSCs, 用无血清培养基制备成单细胞悬液($1 \times 10^{10}/\text{L}$). 在无菌条件下分别接种于5只周龄

为4-6 wk的BALB/c-nu/nu裸小鼠腋窝皮下, 每只0.2 mL, 观察4 wk.

1.2.4 绘制永生化BMSCs生长曲线: 将永生化BMSCs以 $1.2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 密度置于24个6孔板内, 每板为一个单位. 根据不同的血清浓度培养分为4个组, 每组6个单位, 培养24 h后每天取各组1个单位进行计数, 取平均数, 绘制其生长曲线, 实验重复3次. 通过预实验发现下列各组细胞传代时间较短, 细胞活性较好: (1)5%胎牛血清+95% DMEM培养基(简称5%血清培养组); (2)10%胎牛血清+90% DMEM培养基(简称10%血清培养组); (3)20%胎牛血清+80% DMEM培养基(简称20%血清培养组); (4)30%胎牛血清+70% DMEM培养基(简称30%血清培养组). 本实验采用上述几组血清浓度进行细胞培养, 找到最佳的血清培养浓度.

1.2.5 检测永生化BMSCs复苏后的活性: 永生化BMSCs采用以下不同的血清浓度组进行细胞冻存: 10% DMSO+20%胎牛血清+70% DMEM培养基(简称20%血清组); 10% DMSO+50%胎牛血清+40% DMEM培养基(简称50%血清组); 10% DMSO+90%胎牛血清(简称90%血清组), 每组5个单位. 复苏后采用胎蓝染色进行细胞活性检测.

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件包进行统计分析, 计量资料以mean \pm SD表示, 当不同组间方差齐时, 采用F检验分析, 并通过SNK-q进行两两比较; 当方差不齐时, 采用近似F检验-Wilch法, 通过Dunnett's T3进行两两比较. $P < 0.05$ 为差异有显著性.

2 结果

2.1 BMSCs的生物学性状 永生化BMSCs随着传代次数的增加其形态未见明显改变, 细胞传代至15代时, 细胞增长速度无减慢趋势, 图中箭头所示: 形态胞核明显, 胞质丰富, 清晰(图1A), 与4-5代未转染pCMVSV40T/PUR质粒的细胞相似(图1B), 约7-9 d传代一次, 但仍具有生长抑制特性. 未转染的BMSCs在第7代时细胞增长速度减慢, 约10 d传一代, 且细胞形态有所改变. 图中箭头所示: 当细胞传至15代时, 细胞表现出皱缩, 体积增大, 胞体变平, 很难继续传代(图1C).

2.2 成骨诱导后细胞内ALP活性检测 永生化的BMSCs在条件培养基培养1 wk后, 细胞变为多角形, 细胞周边出现长丝状突出; 胞质中可见蓝黑色的细小颗粒, 数个细胞连成块状, 染色较强,

■ 相关报道

Zhang *et al* 通过将pCMVSV40T/PUR质粒导入前软骨细胞后, 细胞可在体外大量培养, 但永生化的BMSCs尚无进一步报道.

应用要点

本研究通过pCMVSV40T/PUR质粒建立永生化的BMSCs可在体外提供大量的活性较好的细胞,为其进一步研究及应用提供细胞来源。

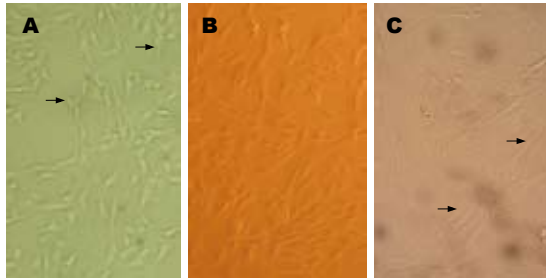


图1 BMSCs的生物学性状($\times 200$)。A: 经质粒转染后15代的BMSCs; B: 未转染的4代的BMSCs; C: 未转染的15代的BMSCs。

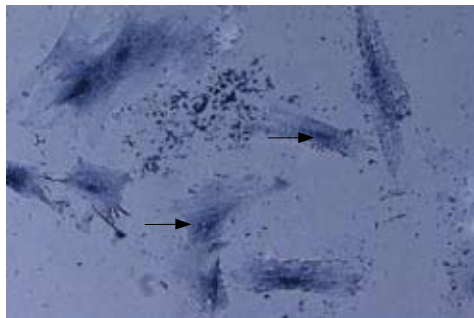


图2 成骨诱导4 wk后的永生化的BMSCs碱性磷酸酶染色($\times 200$)。

而散在的细胞染色略弱,细胞边界清楚。诱导2 wk以上,细胞基质中可见钙沉积,逐渐出现的矿化物至4 wk时已形成明显骨结节,染色将结节中沉积的钙染成黑色(图2)。

2.3 致癌性检测 永生化的BMSCs接种接种于4-6 wk的BALB/c-nu/nu裸小鼠后,观察4 wk,未见肿瘤形成。

2.4 血清培养浓度对细胞生长速度的影响 各血清培养组均呈“S”形(图3),其中以20%血清组生长速度最快。

2.5 血清浓度对细胞复苏后活性的影响 各组细胞冻存1 mo后进行复苏,通过胎盘蓝拒染率计算细胞存活率。通过方差齐性分析发现各组间方差齐($P>0.05$)。采用方差及SNK-q分析:不同浓度组之间永生化的BMSCs复苏后的存活率进行方差分析差异有显著性意义($P<0.01$)。进一步SNK-q两两比较显示:90%血清组、50%血清组细胞存活率显著性高于20%血清组($P<0.01$);50%血清组与90%血清组存活率差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

研究表明,BMSCs具有极强的自我复制能力和多向分化潜能,来源广泛,易于获取,而且BMSCs具有低免疫原性,应用方便^[4-5]。Ozawa *et al*^[6-7]表明,

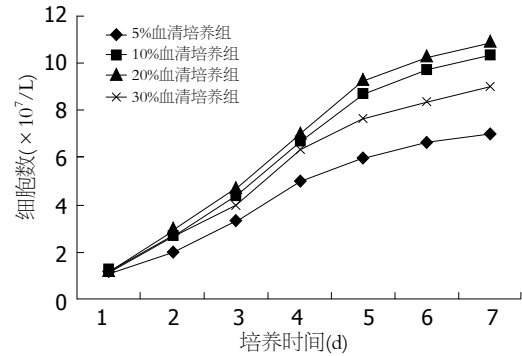


图3 各血清浓度组永生化的BMSCs的生长曲线。

BMSCs暴露于受损的肝脏组织中时,可帮助修复受损的肝脏;同时有研究发现BMSCs在体外仍可分化为肝细胞^[8-9];Dasa *et al*^[10-11]发现人BMSCs移植入受损的大鼠神经系统中,可分化为少突神经胶质细胞,使神经系统恢复较好;还有研究表明人BMSCs可分化为软骨细胞^[12-13]。因此,BMSCs的诱导分化和移植是目前研究的热点之一。

虽然如此,但有研究表明BMSCs传代至6代后细胞生长逐渐缓慢,呈现衰老现象^[14]。本研究室通过BMSCs细胞培养发现当传代至7代后,细胞呈明显的衰老,传代时间明显延长。故细胞存在数量不足、体外扩增困难、体外传代、保存及复苏后增殖及分化能力下降等问题,严重影响其进一步广泛应用。

Zhang *et al*^[15]发现SV40T具有避免细胞凋亡及延长细胞寿命的特性,通过将pCMVSV40T/PUR质粒导入前软骨细胞后,发现细胞的生长呈S形,随着培养时间的延长,细胞数量随之增加,端粒酶长度也未见明显减短,且在无细胞生长因子的情况下当传代至30代时仍无向其他细胞分化的趋势。但永生化的BMSCs尚无进一步报道。

本研究室成功通过pCMVSV40T/PUR质粒将永生化的基因SV40T导入BMSCs中,建立了永生化的BMSCs,并传代至15代,发现永生化的BMSCs胞核明显,胞质丰富,活性较好,与4代细胞相似,而第15代未处理的BMSCs出现细胞皱缩等衰老形态,且很难继续扩增,表明导入永生化的基因SV40T后可体外大量获取BMSCs。

实验还通过永生化的BMSCs置于成骨添加剂的条件培养基中培养后可分化为成骨细胞,由此可见其仍保留BMSCs的基本特性-分化为成骨细胞能力。通过不同的血清浓度培养该细胞发现当血清浓度为20%时细胞生长速度最快且活性较好;永生化的BMSCs通过50%血清冻存复苏后细胞的活性与90%血清组无显著性差异,但

显著性高于20%血清组。

本研究镜下观察发现永生化BMSCs细胞间仍存在接触抑制, 且通过裸鼠皮下注射永生化BMSCs后, 观察4 wk后, 未见瘤体的出现, 表明细胞为良性细胞可能性大。

体外将pCMVSV40T/PUR质粒的导入, 使得BMSCs其具有体外大量扩增等优点, 且不具有成瘤性, 为今后BMSCs的研究及应用提供大量的细胞来源。

4 参考文献

- 1 Xu R, Jiang X, Guo Z, Chen J, Zou Y, Ke Y, Zhang S, Li Z, Cai Y, Du M, Qin L, Tang Y, Zeng Y. Functional analysis of neuron-like cells differentiated from neural stem cells derived from bone marrow stroma cells in vitro. *Cell Mol Neurobiol* 2008; 28: 545-558
- 2 Nakahara M, Takagi M, Hattori T, Wakitani S, Yoshida T. Effect of Subcultivation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem on their Capacities for Chondrogenesis, Supporting Hematopoiesis, and Telomea Length. *Cytotechnology* 2005; 47: 19-27
- 3 程斌, 方驰华, 范应方, 李晓锋. 骨髓间充质干细胞提取方法的改良. *中国组织工程研究与临床康复* 2008; 12: 9293-9296
- 4 Kulig KM, Vacanti JP. Hepatic tissue engineering. *Transpl Immunol* 2004; 12: 303-310
- 5 Shimizu K, Ito A, Honda H. Mag-seeding of rat bone marrow stromal cells into porous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *J Biosci Bioeng* 2007; 104: 171-177
- 6 Ozawa K, Sato K, Oh I, Ozaki K, Uchibori R, Obara Y, Kikuchi Y, Ito T, Okada T, Urabe M, Mizukami H,

- 7 Kume A. Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs). *J Autoimmun* 2008; 30: 121-127
- 8 Khan AA, Parveen N, Mahaboob VS, Rajendraprasad A, Ravindrakrishna HR, Venkateswarlu J, Rao SG, Narusu ML, Khaja MN, Pramila R, Habeeb A, Habibullah CM. Safety and efficacy of autologous bone marrow stem cell transplantation through hepatic artery for the treatment of chronic liver failure: a preliminary study. *Transplant Proc* 2008; 40: 1140-1144
- 9 何文艳, 刘树贤, 姜慧卿. 大鼠骨髓间充质干细胞向类肝细胞体外诱导分化. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2464-2469
- 10 俞瑞绍, 刘海林. 体外诱导小鼠骨髓间充质干细胞分化为肝样细胞. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3577-3582
- 11 Cízková D, Rosocha J, Vanický I, Jergová S, Cízek M. Transplants of human mesenchymal stem cells improve functional recovery after spinal cord injury in the rat. *Cell Mol Neurobiol* 2006; 26: 1167-1180
- 12 刘颖, 陈东, 李菁华. 骨髓间充质干细胞向神经细胞分化及在成年胶质瘤大鼠脑内的迁移. *神经解剖学杂志* 2007; 23: 626-630
- 13 Matsuda C, Takagi M, Hattori T, Wakitani S, Yoshida T. Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Chondrocytes for Construction of Three-dimensional Cartilage Tissue. *Cytotechnology* 2005; 47: 11-17
- 14 许澍洽, 许扬滨. BMSCs构建组织工程软骨的研究进展. *中国修复重建外科杂志* 2008; 22: 163-166
- 15 赵凌云, 钱淑琴, 赵廷宝. 人骨髓间充质干细胞的贴壁分离与体外培养. *中国组织工程研究与临床康复* 2007; 11: 5649-5651
- 16 Zhang S, Chen A, Hu W, Li M, Liao H, Zhu W, Song D, Guo F. Immunological purification of rat precartilaginous stem cells and construction of the immortalized cell strain. *Arch Orthop Trauma Surg* 2008; 128: 1339-1344

■同行评价

本文有较强的科学性和创新性, 条理清楚, 逻辑严密, 结论可信, 语言表达流畅简洁。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆 2008年版《中文核心期刊要目总览》

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12400余种。本版还加大了专家评审力度, 5500多位学科专家参加了核心期刊评审工作。经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目。《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表, 第66页)。(常务副总编辑: 张海宁 2009-03-28)

福建地区乙型肝炎肝硬化与人类白细胞抗原DRB1基因的相关性

李东良, 彭经宙, 赵书民, 林小钦, 杨才生, 林华

■背景资料

乙型肝炎病毒(HBV)感染慢性化是乙型肝炎临床难以治愈的重要原因。造成这种临床结果的原因,除与病毒因素有关外,宿主因素在发病中也起重要作用。深入了解宿主遗传因素在肝硬化形成中的作用,有助于揭示HBV感染慢性化的机制。

李东良, 彭经宙, 林小钦, 杨才生, 林华, 中国人民解放军南京军区福州总医院肝胆内科 福建省福州市 350025
赵书民, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院感染科 上海市 200003
李东良, 博士, 主任医师, 教授, 主要从事传染性疾病的遗传背景及器官移植相关肝病的研究。
福建省自然科学基金资助项目, No. 2006J0120
作者贡献分布: 此课题由李东良设计; 研究过程主要由彭经宙完成, 林小钦协助实验; 数据分析由赵书民完成; 杨才生与林华协助病例及样本收集; 论文写作由李东良完成。
通讯作者: 李东良, 教授, 350025, 福建省福州市西二环北路156号, 中国人民解放军南京军区福州总医院肝胆内科。
dongliangli@gmail.com
电话: 0591-22859128
收稿日期: 2009-01-10 修回日期: 2009-02-12
接受日期: 2009-02-16 在线出版日期: 2009-03-28

Association between liver cirrhosis due to HBV infection and HLA-DRB1 gene polymorphism in Fujian Province

Dong-Liang Li, Jing-Zhou Peng, Shu-Min Zhao, Xiao-Qin Lin, Cai-Sheng Yang, Hua Lin

Dong-Liang Li, Jing-Zhou Peng, Xiao-Qin Lin, Cai-Sheng Yang, Hua Lin, Hepatobiliary Department, Fuzhou General Hospital of Chinese PLA Nanjing Military Command, Fuzhou 350025, Fujian Province, China
Shu-Min Zhao, Department of Infectious Diseases, Changzheng Hospital, Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200003, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Fujian Province, No. 2006J0120
Correspondence to: Dong-Liang Li, Hepatobiliary Department, Fuzhou General Hospital of Chinese PLA Nanjing Military Command, 156 Xihuan North Road, Fuzhou 350025, Fujian Province, China. dongliangli@gmail.com
Received: 2009-01-10 Revised: 2009-02-12
Accepted: 2009-02-16 Published online: 2009-03-28

Abstract

AIM: To investigate the association between HLA-DRB1 gene polymorphism and the genetic susceptibility to HBV-induced liver cirrhosis in Fujian Han population.

METHODS: Genotyping of HLA-DRB1 gene was performed in 93 patients with HBV-induced cirrhosis and 84 healthy individuals using sequencing-based typing. The distribution of

alleles in control group was checked by Hardy-Weinberg genetic equilibrium; association between disease and frequencies of alleles were analyzed using genetic statistical methods to find the gene polymorphisms.

RESULTS: The frequency of HLA-DRB1*04 allele was significantly higher in patient group than in control group ($OR = 2.536$, 95% CI: 1.292-4.97, $P = 0.0068$). However, the frequency of HLA-DRB1*1101 allele was significantly lower in patient group than in control group ($OR = 0.339$, 95% CI: 0.119-0.964, $P = 0.0425$). Significant difference was found in genotype of HLA-DRB1 04 between the case group and the control group ($OR = 3.456$, 95% CI: 1.553-7.692, $\chi^2 = 9.227$, $P = 0.0024$). There was significant dose-response relationship between liver cirrhosis and the genotype of HLA-DRB1 04 ($OR = 2.457$, 95% CI: 1.274-4.737, $\chi^2 = 7.197$, $P = 0.0073$).

CONCLUSION: HLA-DRB1*04 allele and HLA-DRB1*1101 allele may be the susceptibility and resistant genes in the patients with liver cirrhosis respectively.

Key Words: Hepatitis B; Liver cirrhosis; Human leucocyte antigen; Gene frequency; Genotyping

Li DL, Peng JZ, Zhao SM, Lin XQ, Yang CS, Lin H. Association between liver cirrhosis due to HBV infection and HLA-DRB1 gene polymorphism in Fujian Province. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(9): 886-890

摘要

目的: 研究人类白细胞抗原(human leucocyte antigen, HLA)-DRB1基因多态性与福建汉族人乙型肝炎肝硬化的遗传易感性关系。

方法: 以93例福建地区汉族人群乙型肝炎肝硬化患者为研究对象,以同一地区84例健康人为对照人群,采用DNA测序分型技术(sequencing-based typing, SBT)对HLA-DRB1等位基因精确分型,计算各组等位基因频率,对照人群等位基因分布进行Hardy-Weinberg

■同行评议者

樊红, 副教授, 东南大学医学院发育与疾病相关基因教育部重点实验室

遗传平衡检验,应用遗传统计方法进行关联分析,确定与乙型肝炎肝硬化相关的易感基因及基因型。

结果:乙型肝炎肝硬化组HLA-DRB1*04等位基因频率明显高于对照组($OR = 2.536$, $95\%CI: 1.292-4.978$, $P = 0.0068$), HLA-DRB1*1101等位基因频率明显低于对照组($OR = 0.339$, $95\%CI: 0.119-0.964$, $P = 0.0425$); HLA-DRB1 04基因型在病例组与对照组之间分布差异具有统计学意义($OR = 3.456$, $95\%CI: 1.553-7.692$, $\chi^2 = 9.227$, $P = 0.0024$),乙型肝炎肝硬化与HLA-DRB 04基因型剂量线性相关($OR = 2.457$, $95\%CI: 1.274-4.737$, $\chi^2 = 7.197$, $P = 0.0073$)。

结论:HLA-DRB1*04主型等位基因及其基因型可能是乙型肝炎肝硬化的易感基因,HLA-DRB1*1101等位基因可能为其抗性基因。

关键词:乙型肝炎;肝硬化;人类白细胞抗原;基因频率;基因分型

李东良, 彭经宙, 赵书民, 林小钦, 杨才生, 林华. 福建地区乙型肝炎肝硬化与人类白细胞抗原DRB1基因的相关性. 世界华人消化杂志 2009; 17(9): 886-890

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/886.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染可造成广泛的疾病谱,包括隐性感染、急性肝炎、无症状携者、慢性肝炎、肝衰竭、肝硬化甚至原发性肝癌。造成这种不同疾病过程和临床结果的原因,除了与病毒本身的因素有关外,更重要的是由于不同个体对HBV感染所发生的免疫反应及其病理损伤不同。人白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)与机体免疫状态密切相关,并在乙型肝炎免疫发病机制中起重要作用,其中某些基因的多态性可能导致机体免疫功能的差异,因而有可能影响HBV感染的不同临床转归。临床资料也显示乙型肝炎肝硬化具有家族聚集倾向,具有遗传易感性特征。我们采取病例-对照研究方法,通过DNA测序分型(sequencing-based typing, SBT)技术,对福建地区93例乙型肝炎肝硬化患者及84名健康人的HLA-DRB1基因进行对照研究,以探讨HLA-DRB1基因与乙型肝炎肝硬化的遗传易感性关系。

1 材料和方法

1.1 材料 病例组为乙型肝炎肝硬化患者。从

2006-12/2007-12中国人民解放军南京军区福州总医院肝胆内科门诊及住院确诊的乙型肝炎肝硬化患者中募集,其中失代偿期肝硬化59例依据临床表现、实验室检查及影像学检查(B超、CT、MRI)确诊,代偿性肝硬化34例均经肝活检确诊。男57例,女36例,平均年龄 48.00 ± 9.35 岁;对照组84例,为与病例组无血缘关系的正常健康人,从我院体检中心募集。其中男44例,女40例,平均年龄 42.68 ± 10.97 岁,所有入选对象均为签订知情同意书的福建籍汉族成年人,并排除罹患受遗传因素影响较大的常见疾病,如高血压和糖尿病等。

1.2 方法

1.2.1 样品采集及处理:抽取全血10 mL, 5 mL EDTA K2抗凝血用于基因组DNA抽提, 5 mL不抗凝血用于病毒及生化检测。

1.2.2 血清HBV标志物及HBV DNA检测:酶联免疫(ELISA)法检测血清HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、抗-HBc、抗HBc-IgM(上海实业科华生物技术有限公司产品);荧光定量聚合酶链反应(PCR)法检测血清HBV DNA水平(深圳匹基生物工程有限公司试剂盒),检测低限参考值为 $\leq 5 \times 10^5$ copies/L。

1.2.3 人基因组DNA抽提质量检测:抗凝血2000 r/min离心10 min,按试剂说明书操作,分离外周血单个核细胞(PBMC),加入400 μ L细胞裂解液(50 mmol/L Tris, 10 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl, 4%十二烷基硫酸钠, pH8.0)及20 g/L蛋白酶K 20 μ L, 50 $^{\circ}$ C过夜。PBMC裂解产物,以饱和酚,酚-氯仿及氯仿-异戊醇抽提后,加入3倍体积无水乙醇,10%体积3 mol/L醋酸钠溶液置0 $^{\circ}$ C冰箱沉淀2 h以上,13 000 r/min离心15 min,弃上清,室温干燥后,以100 μ L TE缓冲液溶解,用紫外分光光度计测定(波长260 nm)DNA浓度,10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测纯度及完整性。模板DNA保存于-20 $^{\circ}$ C待检。

1.2.4 HLA-DRB1基因型分型:采用SBT,由北京华中生科技发展有限公司依据双方签署的技术服务合同完成。首先采用9组5'端加尾修饰的群特异性(Group-Specific)引物扩增靶DNA,对得到的扩增产物采用根据群特异性5'端尾设计的测序引物进行测序。依据HLA序列数据库,通过专业分型软件(MachMaker)对测序标本进行HLA分型。为保证对HLA基因分型结果的准确性,采用了对同一样品重复编号送检以及将已知HLA-A基因型型别的基因组DNA样品作为待

■ 研发前沿

近年来,随着分子生物学技术和人类基因组学的发展,宿主遗传因素在HBV感染中的作用引起了国内外学者的高度关注,成为新的研究热点。

■ 相关报道

已发现一批可能与HBV感染相关的基因,如来自于非洲、欧洲和亚洲的大规模样本的遗传相关性研究证明,HLA-DRB1*1302等位基因与HBV感染的清除机制有关。

表 1 对照人群中各基因位点的HWE检验结果

基因座位	等位基因	<i>n</i>	杂合子	纯合子 _s	H(O)	H(E)	HW(ef = 1%)
DRB1 (<i>n</i> = 84)	Group	13	75	9	0.893	0.897	NA
	Allele	32	78	6	0.929	0.932	NA

H(O): 观测杂合度; H(E): 期望杂合度; ef: 期望频率; NA: $P < 0.01$, 达到HW遗传平衡。

检样品送检。

统计学处理 采用Cervus2.0软件分别计算总样本、病例组与对照组HLA-DRB1位点主型及亚型等位基因频率; 对对照组等位基因频率进行遗传平衡检验(Hardy-Weinberg Equilibrium test, HWE), 采用Pearson χ^2 检验和Fisher精确检验进行等位基因单因素分析, 采用逐步Logistic regression筛选与肝硬化相关的等位基因及其基因型, Trend test检验计算关联基因型的剂量-效应关系。计算公式参见文献[1]。

2 结果

2.1 基因组质量 抽提产物经紫外分光光度检测示DNA含量为176-282 mg/L; 10 g/L琼脂糖凝胶电泳显示基因组纯度高, 无杂带出现(图1)。

2.2 HLA-DRB1基因多态性 在测序成功的总样本中DRB1座位共检出14个主型等位基因(Group)39个亚型等位基因(Allele), 依次为DRB1*09、DRB1*04、DRB1*12、DRB1*15、DRB1*07和DRB1*14常见。其中DRB1*04多态性最高, 共检出9种亚型等位基因, 以DRB1*0403和DRB1*0405最为常见。

2.3 Hardy-Weinberg平衡检验 对照人群在纯合子与杂合子观测值与期望值比较符合Hardy-Weinberg比数, 可以满足群体遗传学研究对对照人群的要求(表1)。

2.4 HLA-DRB1等位基因差异显著性检验 DRB1*04($\chi^2 = 5.10, P = 0.024$), DRB1*0405($\chi^2 = 4.74, P = 0.035$), DRB1*1101($\chi^2 = 4.32, P = 0.038$)和DRB1*1202($\chi^2 = 6.99, P = 0.008$)在病例组与对照组之间分布差异具有统计学意义(表2)。

2.5 HLA-DRB1等位基因与乙型肝炎肝硬化相关性 纳入性别因素逐步Logistic回归分析显示, 除性别因素外, 进入回归模型的HLA-DRB1主型有DRB1*04和DRB1*11, DRB1*04($OR = 2.536, 95\%CI: 1.292-4.978, P = 0.0068$)具有统计学意义。亚型多因素分析进入回归模型的有DRB1*1202和DRB1*1101, DRB1*1101($OR =$

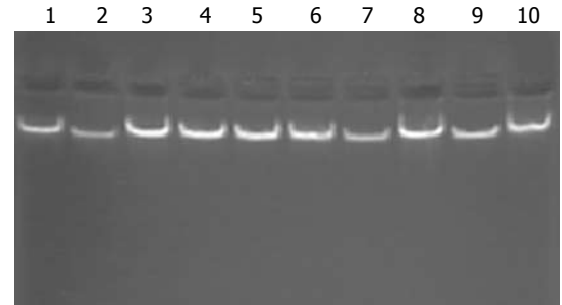


图 1 基因组凝胶电泳(70 mV/2.5 h)。

0.339, 95%CI: 0.119-0.964, $P = 0.0425$)具有统计学意义(表3)。

2.6 HLA-DRB1基因表现型与乙型肝炎肝硬化相关性 HLA-DRB1基因型多因素分析显示只有HLA-DRB1 04主型进入Logistic回归模型, HLA-DRB1 04($OR = 3.456, 95\%CI: 1.553-7.692, \chi^2 = 9.227, P = 0.0024$)在病例组与对照组之间分布差异具有统计学意义, 与等位基因的分析结果一致。

2.7 基因型的剂量-效应关系 乙型肝炎肝硬化与HLA-DRB1 04基因型剂量线性相关($OR = 2.457, 95\%CI: 1.274-4.737, \chi^2 = 7.197, P = 0.0073$)。

3 讨论

遗传易感性是指不同基因型(遗传类型)的人群对某种疾病的易感程度。感染病与非感染疾病的遗传易感性有所不同, 由于是获得性疾病, 其遗传易感性至少包括两个方面: (1)感染的易感性。即同样暴露于某一病原后, 感染/不感染、持续感染/自限性清除的可能性; (2)发病易感性或疾病严重程度易感性。即感染同样的病原体后, 不同个体表现不同的疾病类型或严重程度。本研究以福建籍汉族慢性乙型肝炎肝硬化患者为研究对象, 以同一地区健康成年人作为对照人群, 采取精确的基因分型技术, 应用病例-对照关联研究方法重点观察了宿主的HLA-DRB1基因多态性特征与乙型肝炎肝硬化发病易感性的关系。结果发现HLA-DRB1*04等位基因及其基因型与乙型肝炎肝硬化正相关。DRB1*1101

表 2 病例组与对照组HLA-DRB1等位基因频率及差异显著性检验

等位基因	病例组		对照组		卡方检验	
	计数 <i>n</i>	<i>f</i>	计数	<i>f</i>	χ^2	<i>P</i>
DRB1*03	10	0.0538	9	0.0536		1.0000
DRB1*04	36	0.1935	18	0.1071	5.100	0.0240
DRB1*07	14	0.0753	14	0.0833		0.8450
DRB1*08	12	0.0645	10	0.0595		1.0000
DRB1*09	30	0.1613	30	0.1786		0.6730
DRB1*11	6	0.0323	14	0.0833		0.0630
DRB1*12	21	0.1129	26	0.1548		0.2740
DRB1*13	10	0.0538	8	0.0476		0.8140
DRB1*14	16	0.0860	12	0.0714		0.6950
DRB1*15	21	0.1129	18	0.1071		1.0000
DRB1*mx	10	0.0538	9	0.0477		1.0000
DRB1*0301	9	0.0484	8	0.0476		1.0000
DRB1*0403	10	0.0538	9	0.0536		1.0000
DRB1*0405	12	0.0645	3	0.0179	4.736	0.0348
DRB1*0701	14	0.0753	14	0.0833		0.8449
DRB1*0901	30	0.1613	30	0.1786		0.6733
DRB1*1101	6	0.0323	14	0.0833	4.320	0.0380
DRB1*1201	17	0.0914	12	0.0714		0.5630
DRB1*1202	4	0.0215	14	0.0833	6.990	0.0080
DRB1*1501	10	0.0538	8	0.0476		0.8142
DRB1*1502	11	0.0591	6	0.0357		0.3315
DRB1*sx	63	0.3389	50	0.2983		0.4260
	186	0.9462	168	0.9286		0.5164

在两组中基因频率均<5%者不纳入分析, DRB1*mx、DRB1*sx分别为除表中列出的主型和亚型等位基因的合并项, *f*: 基因频率, 对 χ^2 检验有统计学差异的等位基因进一步Fisher精确检验验证。

表 3 HLA-DRB1等位基因与乙型肝炎肝硬化多因素分析结果 (Logistic回归)

	参数估计	mean ± SD	χ^2	<i>P</i>	OR	95%CI	
						OR1	OR2
Sex	1.7389	0.2421	51.5873	<0.0001	5.691	3.541	9.147
DRB1*04	0.9306	0.3441	7.3149	0.0068	2.536	1.292	4.978
DRB1*11	-0.8962	0.5402	2.7527	0.0971	0.408	0.142	1.176
Sex	1.6082	0.2365	46.2424	<0.0001	4.994	3.141	7.938
DRB1*1101	-1.0829	0.5337	4.1171	0.0425	0.339	0.119	0.964
DRB1*1202	-1.1365	0.6135	3.4320	0.0639	0.321	0.096	1.068

与乙型肝炎肝硬化负相关. 提示前者为乙型肝炎肝硬化的易感基因, 后者为乙型肝炎肝硬化的保护基因(抗性基因). 在对HLA-DRB1等位基因及基因型频率分析过程中, 虽然还发现一些等位基因在病例组与对照组分布存在统计学差异, 但是, 纳入性别因素经非条件Logistic回归校正分层分析, 没有统计学意义, 所以不能确诊与乙型肝炎肝硬化易感或抵抗相关. 如DRB1*0405, DRB1*1202在单因素 χ^2 检验中发

现其在对照组与病例组分布差异具有统计学意义, 但在多因素等位基因及基因型分析无统计学意义, 因此, 不能确定其为乙型肝炎肝硬化的关联成分, 有待扩大样本量或采取其他遗传分析策略进一步研究.

有关HLA-DRB1*04等位基因及其基因型与肝硬化的相关性报道较少. Aikawa *et al*^[21]研究认为HLA-DRB1*0405等位基因的存在有利于HCV感染进展成肝硬化, 与本课题的研究结

■创新盘点

本研究发现了新的与汉族人群乙型肝炎肝硬化形成有关的HLA等位基因及其基因型. 从新的角度探讨了HBV感染慢性化的机制.

■同行评价

本研究目的明确,方法得当,结果具有一定临床指导意义,如扩大样本量,结论将更加可靠。

果一致。但是,台湾的一项研究却发现,台湾汉族人群中HLA-DRB1*0406在HBV感染康复组的基因频率远高于慢性HBV感染组^[3]。出现与台湾地区研究结果不一致的原因,可能与入选研究对象的疾病表型不同有关,台湾的研究对象为暴露HBV的乙肝病毒感染者,而本研究的研究对象是慢性HBV感染者中的肝硬化患者。对HLA-DRB1*1101基因多态性与HBV感染慢性化或肝硬化相关性的报道相对较多,多数研究显示HLA-DRB1*11为乙型肝炎慢性化的抗性基因^[4-5],还有学者研究显示HLA-DRB1*11为丙型肝炎肝硬化的保护性基因^[6-7],这些研究与本研究结果基本一致。但是,也有少数相反的研究报道, Amarapurpar *et al*^[8]对印度西部26例慢性乙型肝炎患者和100名健康对照者进行HLA-DR基因分型,发现DRB1*11可能促进慢性HBV感染的持续与发展。造成这种结论不一致的可能原因有:(1)入选研究对象的疾病表型不一致;(2)HLA等位基因在不同人群中的分布差异显著,人群层化现象可造成假的阳性关联;(3)样本量偏小影响易感基因的检出效率,理想的遗传关联研究应具备大样本,小P值,与生物学功能相关,而在已报道的一些研究中的样本量较少,不能满足遗传流行病学研究样本量的基本要求;(4)实验技术的局限性。既往对HLA基因多采用血清型分型方法,这种方法仅能确认等位基因的主型,不能确定亚型。不同亚型意味着这些等位分子(Allomorph)之间存在着差异,HLA对抗原的递呈能力也可能因为这些肽段单个氨基酸残基的改变而发生显著的变化,从而影响到包括HBV感染在内的感染性疾病的转归,因此,很可能丢掉很多有价值的信息;(5)数据分析有一定缺陷。在数据处理中通常亦未能考虑性别因素对HBV感染转归的影响,并且,多数文献对对照组人群的等位基因分布未进行Hardy-Weinberg遗传平衡检验,有些研究没有进行多因素分层分析。因此,有可能得出虚假关联的结论。

HLA等位基因不同,所呈递的HBV CTL表位亦不同。HBV感染后所出现的自限性急性感染、迁延不愈的慢性感染或肝硬化等临床类型,

以及对抗病毒治疗应答反应的差异,除与感染HBV的时机、毒株的数量和毒力、病毒变异等因素相关外,探索宿主HLA限制性的改变,以及由此所决定的HBV特异性CTL应答,有助于深入认识HBV感染的免疫病理机制。本研究在群体水平和流行病学角度首次发现HLA-DRB1*04等位基因及其基因型与福建籍汉族人乙型肝炎肝硬化密切相关,而RB1*1101则与本地区乙型肝炎肝硬化负相关。但是,由于这些研究结果尚未得到其他研究的证实,尚不能下明确的结论,究竟是确切关联还是虚假关联?这些关联等位基因究竟是致病位点,还是遗传标记(这些位点与疾病位点存在连锁不平衡)?其功能和意义如何?有待进一步深入研究才能准确回答。

4 参考文献

- 1 谭建明,周永昌,唐孝达.组织配型技术与临床应用.第1版.北京:人民卫生出版社,2002:82-109
- 2 Aikawa T, Kojima M, Onishi H, Tamura R, Fukuda S, Suzuki T, Tsuda F, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M. HLA DRB1 and DQB1 alleles and haplotypes influencing the progression of hepatitis C. *J Med Virol* 1996; 49: 274-278
- 3 Wu YF, Wang LY, Lee TD, Lin HH, Hu CT, Cheng ML, Lo SY. HLA phenotypes and outcomes of hepatitis B virus infection in Taiwan. *J Med Virol* 2004; 72: 17-25
- 4 Liu HY, Kong BH, Luo X, Xu YP, Dai MS, Jiang S. [Study on the association between maternal-infantile vertical transmission of hepatitis B virus and human leukocyte antigen DR gene domain] *Zhonghua Fuchanke Zazhi* 2003; 38: 599-603
- 5 Jiang YG, Wang YM, Liu TH, Liu J. Association between HLA class II gene and susceptibility or resistance to chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2221-2225
- 6 Renou C, Halfon P, Pol S, Cacoub P, Jouve E, Bronowicki JP, Arpurt JP, Rifflet H, Picon M, Causse X, Canva V, Denis J, Tran A, Bourlière M, Ouzan D, Pariente A, Dantin S, Alric L, Cartier V, Reville M, Caillat-Zucman S. Histological features and HLA class II alleles in hepatitis C virus chronically infected patients with persistently normal alanine aminotransferase levels. *Gut* 2002; 51: 585-590
- 7 Hüe S, Cacoub P, Renou C, Halfon P, Thibault V, Charlotte F, Picon M, Rifflet H, Piette JC, Pol S, Caillat-Zucman S. Human leukocyte antigen class II alleles may contribute to the severity of hepatitis C virus-related liver disease. *J Infect Dis* 2002; 186: 106-109
- 8 Amarapurpar DN, Patel ND, Kankonkar SR. HLA class II genotyping in chronic hepatitis B infection. *J Assoc Physicians India* 2003; 51: 779-781

编辑 李军亮 电编 何基才

胆管炎性狭窄疤痕组织中PDGF和CTGF的表达及意义

陈卫明, 李彦旭, 柴新群, 冯贤松

陈卫明, 咸宁市中心医院外科 湖北省咸宁市 437100
李彦旭, 柴新群, 冯贤松, 华中科技大学同济医学院附属协和
和医院肝胆外科 湖北省武汉市 430022
陈卫明, 在读硕士, 主治医师, 主要从事肝胆外科疾病的研究工作。
作者贡献分布: 此课题由陈卫明、李彦旭及柴新群设计; 研究过
程由陈卫明、李彦旭及冯贤松操作完成; 数据分析与论文写作
由陈卫明与李彦旭完成。
通讯作者: 柴新群, 副教授, 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肝胆外科。
xinqunc@hotmail.com
电话: 027-85351623
收稿日期: 2009-01-16 修回日期: 2009-03-05
接受日期: 2009-03-07 在线出版日期: 2009-03-28

Expression and significance of PDGF and CTGF in cholangitic stenosis

Wei-Ming Chen, Yan-Xu Li, Xin-Qun Chai,
Xian-Song Feng

Wei-Ming Chen, Department of Surgery, Xianning Central
Hospital, Xianning 437100, Hubei Province, China
Yan-Xu Li, Xin-Qun Chai, Xian-Song Feng, Department
of Hepatobiliary Surgery, Union Hospital, Tongji Medical
College, Huazhong University of Science and Technology,
Wuhan 430022, Hubei Province, China
Correspondence to: Xin-Qun Chai, Department of Hepa-
tobiliary Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College,
1277 Jiefang Road, Wuhan 430022, Hubei Province,
China. xinqunc@hotmail.com
Received: 2009-01-16 Revised: 2009-03-05
Accepted: 2009-03-07 Published online: 2009-03-28

Abstract

AIM: To investigate expressions of platelet-derived growth factor (PDGF) and connective tissue growth factor (CTGF) in cholangitic stenosis, and analyze molecular mechanism for innocuousness biliary tract stricture.

METHODS: SP immunohistochemistry was applied to detect the expression of PDGF and CTGF in 10 normal bile duct tissue specimens, 20 scar tissue specimens of extrahepatic bile duct and 12 scar tissue specimens of intrahepatic bile duct, and the relationship of the expression with cholangitic stenosis was also analyzed.

RESULTS: The positive expression of PDGF and CTGF was remarkably stronger in scar tissues of extrahepatic and intrahepatic bile ducts than in

normal bile duct tissues. Kruskal-Wallis Test and Man-Whitney Test revealed that expressions of PDGF and CTGF in scar tissues of extrahepatic bile duct were not positively related to that of intrahepatic bile duct, whereas there was a positive relationship between the expression of PDGF and CTGF in scar tissues of extrahepatic and intrahepatic bile duct and that of in normal bile duct ($P < 0.01$). Correlation analysis revealed that there was a positive relationship between the expression of PDGF and that of CTGF in scar tissues of extrahepatic bile duct ($r = 0.63, P < 0.05$). Moreover, there was a positive relationship between the expression of PDGF and that of CTGF in scar tissues of intrahepatic bile duct ($r = 0.58, P < 0.05$).

CONCLUSION: PDGF and CTGF may play a coordinate regulatory role in benign cholangitic stenosis, and the expressions of PDGF and CTGF have a close correlation with benign cholangitic stenosis.

Key Words: Cholangitic Stenosis; Platelet-derived growth factor; Connective tissue growth factor; Immunohistochemistry

Chen WM, Li YX, Chai XQ, Feng XS. Expression and significance of PDGF and CTGF in cholangitic stenosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(9): 891-895

摘要

目的: 检测血小板衍生生长因子(PDGF)和结缔组织生长因子(CTGF)在胆管炎性疤痕组织中的表达, 拟从分子水平来初步探讨良性胆道狭窄形成机制。

方法: 采用免疫组化SP法检测10例正常胆管组织、20例肝外胆管疤痕组织及12例肝内胆管疤痕组织中PDGF和CTGF的表达, 并初步分析两者表达的相关性及其表达与胆管炎性疤痕形成的相关性。

结果: 肝内、外胆管疤痕组织PDGF和CTGF表达均较高, 正常胆管组织表达最弱。经两两比较, 肝外、内胆管疤痕组间差异无显著性意义($P > 0.05$)。而两组与正常胆管对照组比较差

■背景资料

肝内、外胆管疤痕组织中生长因子PDGF和CTGF均被激活, 可能参与了成纤维细胞的分化增殖、胶原合成与降解以及对细胞因子的调控, 并导致疤痕增生, 两者具有协同性。生长因子PDGF和CTGF与胆道炎性疤痕形成密切相关, 可能为今后的炎性疤痕的治疗提供了一个新的靶点。

■同行评议者

徐智, 教授, 北京大学第三医院外科

■ 研究前沿

在胆管炎性疤痕组织形成过程中,许多因子参与作用,但任何一种细胞因子的研究结果都无法解释复杂的纤维化过程,但立足于每种细胞因子的体内或体外研究,仍有助于去揭示这些细胞因子在炎性疤痕纤维化过程中的调节作用,并为今后临床上纤维化靶向治疗提供新的思路。

异均有非常显著性意义($P < 0.01$)。Spearman相关分析表明:肝外、内胆管疤痕组织中PDGF和CTGF的表达均呈正相关($r = 0.63, 0.58$, 均 $P < 0.05$)。

结论:在肝内、外胆管疤痕组织中,PDGF和CTGF均被激活,两者的表达呈正相关,与胆道炎性疤痕形成密切相关。

关键词:胆管;炎性疤痕;血小板衍生生长因子;结缔组织生长因子;免疫组化

陈卫明,李彦旭,柴新群,冯贤松.胆管炎性狭窄疤痕组织中PDGF和CTGF的表达及意义.世界华人消化杂志 2009; 17(9): 891-895
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/891.asp>

0 引言

胆管组织结构受损伤后,由增生的肉芽组织经改建成熟后形成纤维结缔组织来修复,进而致胆道管腔炎性狭窄。炎性反应既有对机体有利方面,如填补创口和缺损以保持组织器官的完整性和坚固性;也可能对机体产生不利或有害的影响,如炎性反应增生可引起体内各种管道的狭窄,引发器官的功能障碍等。如何预防和治疗炎性反应对机体产生的不良影响是当今医学界所面临的棘手问题。目前,有关胆道炎性狭窄的形成机制及防治措施的研究则少见文献报道。胆管损伤后出现炎性狭窄在临床中较为常见,突出表现为胆道管腔疤痕增生狭窄,尤以肝门部或肝门部以上胆管狭窄尤为显著^[1]。现代细胞生物学和分子生物学在炎性疤痕形成方面的研究发现:修复细胞(主要是成纤维细胞)的大量增殖与凋亡抑制、细胞外基质中胶原合成与降解失衡、部分细胞因子的大量产生及三者的密切关系构成了炎性疤痕的生物学基础。我们应用免疫组化方法检测了血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)和结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)在肝外、肝胆管疤痕组织、正常胆管组织中的表达强度、阳性细胞数及组织定位,拟从分子水平来初步探讨胆道良性狭窄形成机制,探讨PDGF和CTGF的表达与胆管炎性疤痕形成的相关性,为临床防治胆管炎性狭窄提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2003-01/2008-06咸宁医学院附属

第一医院经病理证实的肝外胆管狭窄疤痕石蜡包埋标本20例(肝外胆管疤痕组),其中男12例,女8例,发病年龄24-78(平均51)岁;肝内胆管狭窄疤痕石蜡包埋标本12例(肝内胆管疤痕组),其中男6例,女6例,发病年龄29-79(平均52)岁;同时,取肝移植供肝的肝外胆管组织6例,肝血管瘤切除的肝内胆管组织4例(共10例,作为正常胆管组织对照组)。鼠抗人PDGF mAb(武汉博士德生物工程有限公司产品);兔抗人CTGF mAb(武汉博士德生物工程有限公司产品);聚合物增强剂(试剂A)酶标抗鼠聚合物(试剂B);即用型SP试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司产品);DAB KID; Lli Vision+Polymer HRP(Ms/Rb)IHC Kit; PBS磷酸盐缓冲液(粉剂); Poly-L-Lysine; 柠檬酸型抗原修复缓冲液。

1.2 方法 采用免疫组织化学技术链霉菌抗素蛋白-过氧化物酶连接法(SP法)检测肝外、肝内胆管炎性疤痕组织和正常胆管组织PDGF和CTGF的表达和定位。

1.2.1 免疫组织化学法检测PDGF的表达:石蜡切片脱蜡和水化后,用PBS(pH7.4)冲洗3次,每次3 min;对组抗原进行相应的修复;每张切片加50 μ L 30 mL/L过氧化氢溶液,室温孵育10 min; PBS冲洗3次,每次3 min;除去PBS液,每张切片加50 μ L的一抗(鼠抗人PDGF mAb),室温下4 $^{\circ}$ C过夜; PBS冲洗3次,每次3 min;除去PBS液,每张切片加50 μ L聚合物增强剂(试剂A),室温下孵育20 min。PBS冲洗3次,每次3 min;除去PBS液,每张切片加50 μ L酶标抗鼠聚合物(试剂B),室温下孵育30 min。PBS冲洗3次,每次3 min;除去PBS液,每张切片加50 μ L新鲜配制DAB溶液,显微镜下观察10 min;自来水冲洗,苏木素复染,1 mL/L盐酸分化,自来水冲洗, PBS返蓝;梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明,中性树脂封固。

1.2.2 免疫组织化学法检测CTGF的表达:一抗用兔抗人CTGF mAb,二抗用生物素标记羊抗兔IgG,余步骤同PDGF检测方法。

1.2.3 阳性对照实验:已知的PDGF和CTGF阳性切片用作阳性对照。

1.2.4 阴性对照实验:空白对照:用0.01 mol/L PBS代替一抗,其余步骤不变。置换实验:用正常鼠和兔血清代替一抗进行相同步骤的免疫组化染色。

1.2.5 结果判定标准:参照1996年全国免疫组织化学技术与诊断标准化专题研讨会意见:细胞质或核内见淡黄色颗粒明显高于背景色为阳性

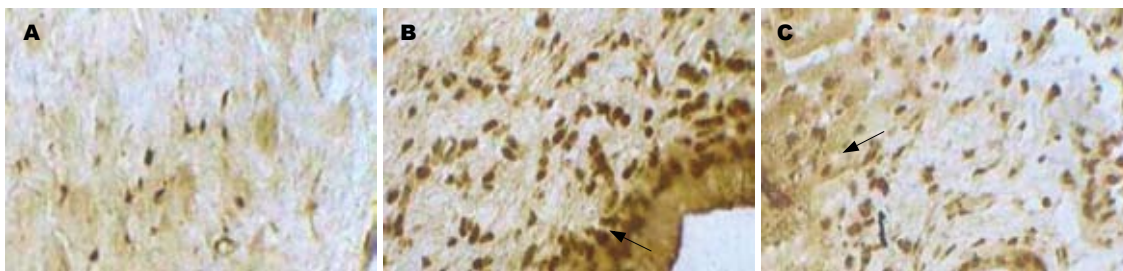


图 1 PDGF蛋白的表达(SP × 400). A: 正常胆管组; B-C: 疤痕组.



图 2 CTGF蛋白的表达(SP × 400). A: 正常胆管组; B-C: 疤痕组.

■ 相关报道
国内外对炎性疤痕的研究多集中在皮肤疤痕和整形美容领域, 而对胆道炎性狭窄的形成机制及防治措施的研究则少见文献报道.

细胞. 阳性细胞评定标准: PDGF和CTGF主要以棕色颗粒着色于胞质和胞膜为阳性细胞. 细胞的着色强度可分为以下级数: “-”为阴性细胞; “+”为细胞核和/或细胞质染成淡棕黄色; “+++”为深棕黄色; “++”则介于两者之间. 每例标本随机取5个高倍(100倍)视野观察和计数阳性细胞, 计算出平均值.

统计学处理 统计学处理应用SPSS12.0软件系统, 计算机处理. 数据用mean ± SD表示, 采用非参数检验中Kruskal-Wallis Test和Man-Whitney Test进行多组间的比较. 检验标准: $P < 0.05$ 表示两组差异有显著性. 采用Spearman相关分析进行PDGF和CTGF表达关系的分析.

2 结果

2.1 PDGF蛋白的表达 正常胆管组织PDGF蛋白无表达或极少量表达, 淡染(图1A). 在肝外、内胆管疤痕组织中表达呈强阳性, 阳性细胞呈棕黄色, 主要定位于胆管上皮细胞、血管内皮细胞、增生的FB、巨噬细胞、中性粒细胞和淋巴细胞的细胞核中, 胞质中少量表达(图1B-C).

2.2 CTGF蛋白的表达 正常胆管组织CTGF蛋白无表达或极少量表达, 淡染(图2A). 在肝外、内胆管疤痕组织中表达呈强阳性, 阳性细胞呈棕黄色, 主要定位于细胞核, 细胞质中少量弱阳性表达, 在胆管上皮细胞、血管内皮细胞、增生的FB及炎细胞中均有强阳性表达(图2B-C), 两者的分布较一致. 阴性对照片不着色.

表 1 各组中PDGF和CTGF蛋白分析结果 (mean ± SD)

分组	n	PDGF	CTGF
肝外胆管疤痕组	20	36.90 ± 2.48 ^b	34.23 ± 1.30 ^b
肝内胆管疤痕组	12	35.67 ± 11.89 ^b	32.61 ± 13.20 ^b
正常胆管组	10	1.54 ± 0.96	1.22 ± 0.98

^b $P < 0.01$ vs 正常胆管组.

2.3 PDGF和CTGF蛋白表达分析 每张组织切片在低倍镜下(×100)随机选择五个视野, 计数PDGF和CTGF蛋白表达的阳性细胞数, 计算出平均值. 数据经统计分析, 发现两指标中, 肝外、内胆管疤痕组织表达均较高, 正常胆管组织表达最弱. 经两两比较, 肝外、内胆管疤痕组间差异无显著性意义($P > 0.05$). 而两组与正常胆管对照组比较差异均有非常显著性意义($P < 0.01$, 表1).

2.4 PDGF和CTGF蛋白表达的关系 Spearman相关分析表明: 肝外、内胆管疤痕组织中PDGF和CTGF蛋白两者的表达均成正相关($r = 0.63$, $P < 0.05$; $r = 0.58$, $P < 0.05$).

3 讨论

PDGF是一种与损伤愈合有关的生长因子, 在损伤愈合中可以不同的方式产生. PDGF主要由血小板分泌的 α 颗粒释放, 以AB亚型最丰富, 在人血小板和急性伤口渗出液中主要是AA亚型. 此外, 巨噬细胞、激活的单核细胞、内皮细

■应用要点

本研究检测PDGF和CTGF在胆管炎性疤痕组织中的表达,以及两者表达的相关性和协同性,拟从分子水平来初步探讨良性胆道狭窄形成机制,为临床防治胆管炎性疤痕狭窄提供理论依据。

细胞、表皮细胞和成纤维细胞等都可以分泌该因子。PDGF对成纤维细胞、平滑肌细胞、单核细胞、中性粒细胞等有趋化吸引作用,并强烈刺激成纤维细胞增殖及诱导其合成胶原、纤维连接蛋白(fibronectin, Fn)和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)等成分,以形成肉芽组织,促进创面愈合。由于血小板凝聚和脱颗粒是对组织损伤的起始反应,所以现在认为是创面愈合早期的重要介质。

研究发现,创伤后释放的PDGF是单核细胞和FB的黏附趋化剂,并促进其增殖,激活巨噬细胞诱导FB产生胶原蛋白和纤维连接蛋白,并使胶原酶活化,调节胞外基质的更新。FB在过度增生炎性组织中的化学趋化和促进有丝分裂的反应明显高于炎性组织,可能与细胞表面PDGF受体水平不同有关。Haisa *et al*^[2]发现炎性组织FB表面受体水平比正常皮肤FB高4-5倍,而两者 β 受体水平无差别。而Schneider *et al*^[3]通过对大鼠胰腺星形细胞(pancreatic stellate cells, PSC)原代培养发现,在 α -SMA阳性的MFB样细胞中存在PDGF α 和PDGF β 受体,在培养基中加入50 μ g/L PDGF和5 μ g/L bFGF可显著加快细胞增殖,认为PDGF是最有效的分裂原。目前有学者用重组人PDGF(recombinant human platelet-derived growth factor, rhPDGF)来促进伤口的愈合,其机制是通过促进伤口的上皮化来实现的^[4]。

CTGF是一种新发现的刺激成纤维细胞增殖和胶原沉积的生长因子,是高度保守的CCN(CTGF、Cef10/cyr61和Nov的缩写)多肽家族中的成员。CTGF为肝素结合型,含349个氨基酸,富含半胱氨酸,其分子质量约为36-38 kDa,可由成纤维细胞、平滑肌细胞和内皮细胞分泌。成年哺乳动物心、脑、肾、肺、肝等中均有表达。人类CTGF基因定位于染色体6q23.1,包括5个外显子,4个内含子。

CTGF富含半胱氨酸的促分裂原,属间充质细胞生长因子,其具有多种生物学活性如:促进细胞增殖及ECM的产生、促进有丝分裂细胞增殖、合成胶原、调节细胞外基质基因的表达、介导细胞的趋化、黏附、调节新生血管形成、刺激细胞迁移、促进软骨和骨骼的发育等。

CTGF是近年来备受重视的促纤维化蛋白因子。在病理状况下,CTGF过度表达,他可以直接作用于间充质来源细胞(如成纤维细胞),促进其增殖和ECM的合成,还能作为TGF- β 的下游蛋白的角色介导其促纤维化作用,而TGF- β 已

被认为是炎性组织形成及不同组织中纤维化发生的关键介导因素^[6]。李世荣 *et al*^[7]发现体外培养的人增生性炎性组织成纤维细胞与正常皮肤的相比,胶原合成、CTGF及CTGF基因表达均显著增高。刘剑毅 *et al*^[8]用反义寡核苷酸作用于体外培养的人炎性组织成纤维细胞,能抑制其CTGF表达、胶原合成。Garrett *et al*^[9]认为CTGF对于TGF- β 1诱导的MFB的分化是必需的,但仅CTGF不足以引起MFB的分化和胶原基质的收缩。CTGF是一种重要的促纤维化因子,作为TGF/SMADs途径的下游介质参与炎性组织的形成。阻断CTGF的产生及其促纤维化效应可能为今后的炎性疤痕的治疗提供了一个新的靶点。相比TGF- β 1来说,CTGF对抗纤维化作用应该更有效和安全,因为CTGF的生理条件下表达水平很低,其作用范围也主要局限于结缔组织。阻断CTGF不会出现阻断TGF- β 1后可能产生的有害的临床反应。因此,CTGF可作为选择性干预纤维化疾病结缔组织形成的特殊靶子,CTGF可作为选择性干预纤维化形成具有诱人前景^[10]。

本实验结果表明,PDGF和CTGF在肝内、外胆管疤痕组织的胆管上皮细胞、增生的FB、血管内皮细胞及一些炎症细胞中均有强阳性表达。主要定位于细胞膜和细胞质表达。正常胆管组表达较弱,甚至无表达。说明PDGF和CTGF与胆管疤痕形成有密切的关系。Lading *et al*^[11]在病理性疤痕组织里培养FB实验研究中表明,PDGF蛋白的表达升高。创伤后释放的PDGF是单核细胞和FB的黏附趋化剂,并促进其增殖,激活巨噬细胞诱导FB产生胶原蛋白和纤维连接蛋白,并使胶原酶活化,调节胞外基质的更新。PDGF表达与多种生长因子在调控创面修复方面有相互影响的作用,他们相互协调控制,共同作用影响组织的修复增生^[12-13]。CTGF在FB、成肌细胞、造血细胞等多种细胞的增殖和分化中起重要的作用。在正常的胆管组织中,CTGF仅呈极低水平表达。在各种因素的刺激下,CTGF能迅速表达,他可以直接作用于间充质来源细胞(如成纤维细胞),促进其增殖和ECM的合成,还能作为TGF- β 的下游蛋白的角色介导其促纤维化作用,从而促进胆管组织中FB的增殖与合成。

在组织修复过程中,PDGF和CTGF和某些相关的细胞因子表达存在相互的网络调控作用,并由此影响修复细胞的增殖与分化。Heikkila *et al*^[14]研究表明PDGF和CTGF基因的表达是触发平滑肌细胞增殖的关键因素和始动因素。

Simpson *et al*^[15]报道, 多种生长因子可以激活细胞内某些酶的变化, 增加PDGF和CTGF的表达, 最终引起一系列生物效应. 通过Spearman相关分析表明PDGF和CTGF两者成正相关关系, 说明两者在促进疤痕形成的过程中是相互协同作用的. PDGF和CTGF的激活和协同作用可能参与了FB的增殖甚至表型的转化, 或胶原合成与降解及细胞因子的调控过程^[16]. 并导致异常的疤痕增生. PDGF和CTGF蛋白的高表达与良性胆管狭窄的疤痕组织纤维化的发生有着密切的关系.

因此, 肝外、内胆管疤痕组织中PDGF和CTGF被激活, 可能参与了成纤维细胞的分化增殖、胶原合成与降解以及对细胞因子的调控, 并导致疤痕增生. 在肝外胆管疤痕组织中PDGF和CTGF蛋白两者的表达成正相关, 且在肝内胆管疤痕组织中PDGF和CTGF蛋白两者的表达亦成正相关, 表明两者具有协同性. PDGF和CTGF与良性胆道狭窄疤痕形成密切相关.

4 参考文献

- Geng ZM, Xiang GA, Han Q, Liu XG, Su BS, Liu QG, Pan CE. An experimental study on mechanism of benign biliary stricture. *Zhonghua Gandan Waike Zazhi* 2001; 7: 618-619
- Haisa M, Okochi H, Grotendorst GR. Elevated levels of PDGF alpha receptors in keloid fibroblasts contribute to an enhanced response to PDGF. *J Invest Dermatol* 1994; 103: 560-563
- Schneider E, Schmid-Kotsas A, Zhao J, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Adler G, Waltenberger J, Grünert A, Bachem MG. Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281: C532-C543
- Ehrlich HP, Freedman BM. Topical platelet-derived growth factor in patients enhances wound closure in the absence of wound contraction. *Cytokines Cell Mol Ther* 2002; 7: 85-90
- Segarini PR, Nesbitt JE, Li D, Hays LG, Yates JR 3rd, Carmichael DF. The low density lipoprotein receptor-related protein/alpha2-macroglobulin receptor is a receptor for connective tissue growth factor. *J Biol Chem* 2001; 276: 40659-40667
- Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331: 1286-1292
- 李世荣, 刘剑毅, 纪淑兴. 体外培养人增生性瘢痕成纤维细胞胶原合成及结缔组织生长因子的表达. *中华整形外科杂志* 2004; 20: 124-127
- 刘剑毅, 李世荣, 纪淑兴. 反义寡核苷酸对人瘢痕疙瘩成纤维细胞结缔组织生长因子基因表达和胶原合成的作用. *中华烧伤杂志* 2004; 20: 72-75
- Garrett Q, Khaw PT, Blalock TD, Schultz GS, Grotendorst GR, Daniels JT. Involvement of CTGF in TGF-beta1-stimulation of myofibroblast differentiation and collagen matrix contraction in the presence of mechanical stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 1109-1116
- Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, Tamatani T, Nakanishi T, Takigawa M, Takehara K. Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *J Rheumatol* 2000; 27: 149-154
- Ladin DA, Hou Z, Patel D, McPhail M, Olson JC, Saed GM, Fivenson DP. p53 and apoptosis alterations in keloids and keloid fibroblasts. *Wound Repair Regen* 1998; 6: 28-37
- Ghosh M, Liu G, Randall G, Bevington J, Leffak M. Transcription factor binding and induced transcription alter chromosomal c-myc replicator activity. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 10193-10207
- Lepique AP, Moraes MS, Rocha KM, Eichler CB, Hajj GN, Schwindt TT, Armelin HA. c-Myc protein is stabilized by fibroblast growth factor 2 and destabilized by ACTH to control cell cycle in mouse Y1 adrenocortical cells. *J Mol Endocrinol* 2004; 33: 623-638
- Heikkila R, Schwab G, Wickstrom E, Loke SL, Pluznik DH, Watt R, Neckers LM. A c-myc antisense oligodeoxynucleotide inhibits entry into S phase but not progress from G0 to G1. *Nature* 1987; 328: 445-449
- Simpson CS, Morris BJ. Basic fibroblast growth factor induces c-fos expression in primary cultures of rat striatum. *Neurosci Lett* 1994; 170: 281-285
- 胡振富, 罗力生, 罗盛康. 病理性瘢痕中c-myc、c-fos和ras原癌基因表达的实验研究. *中华整形外科杂志* 2002; 18: 165-167

■同行评价

本文选题密切结合临床, 拟在解决临床问题, 选题得当, 方法正确, 结果可靠, 讨论切题, 文笔流畅, 有一定的基础研究价值.

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中期刊的第1位. 2007年WJG的影响因子为0.745, 内科医学类28中期刊的第10位. 即年指标0.163, 他引率0.85, 引用刊数482种, 扩散因子10.88, 学科影响指标0.73. (编辑: 程剑侠 2009-03-28)

氧化应激与非酒精性脂肪性肝病研究进展

杨丽丽, 柳涛, 王淼, 邢练军, 季光, 郑培永

■背景资料

非酒精性脂肪肝病是一种遗传-环境-代谢应激相关性疾病, 其发病机制尚未完全明确, 多种因素与其发生发展相关, 其中氧化应激对于非酒精性脂肪性肝病的发生发展起着关键作用。

杨丽丽, 柳涛, 王淼, 邢练军, 季光, 郑培永, 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

国家自然科学基金资助项目, No. 30772802

上海市教委重点学科基金资助项目, No. J50305

作者贡献分布: 本文文献检索, 资料分析及撰写由杨丽丽完成, 柳涛及王淼协助; 选题、指导、审校由邢练军、季光及郑培永完成。

通讯作者: 郑培永, 200032, 上海市宛平南路725号, 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。zpsychina@sina.com

电话: 021-64385700-1316 传真: 021-64286261

收稿日期: 2009-01-23 修回日期: 2009-02-24

接受日期: 2009-03-02 在线出版日期: 2009-03-28

Progress in research of oxidative stress and non-alcoholic fatty liver disease

Li-Li Yang, Tao Liu, Miao Wang, Lian-Jun Xing, Guang Ji, Pei-Yong Zheng

Li-Li Yang, Tao Liu, Miao Wang, Lian-Jun Xing, Guang Ji, Pei-Yong Zheng, Institute of Digestive Diseases, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30772802, and the Shanghai Leading Academic Discipline Project, No. J50305

Correspondence to: Pei-Yong Zheng, Institute of Digestive Diseases, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China. zpsychina@sina.com

Received: 2009-01-23 Revised: 2009-02-24

Accepted: 2009-03-02 Published online: 2009-03-28

Abstract

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a genetic-environmental-metabolic stress related disease, with its pathogenesis not completely elucidated, whereas oxidative stress plays a major role in the occurrence and development of NAFLD. This article provides a brief review on the role of oxidative stress in NAFLD and its related factors such as the mitochondria, microsomes, lipid peroxidation and uncoupling protein -2.

Key Words: Non-alcoholic fatty liver disease; Oxidative stress; Reactive oxygen species

Yang LL, Liu T, Wang M, Xing LJ, Ji G, Zheng PY. Progress in research of oxidative stress and non-alcoholic

fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(9): 896-900

摘要

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种遗传-环境-代谢应激相关性疾病, 其发病机制尚未完全明确, 其中氧化应激对于NAFLD的发生发展起着关键作用。本文对NAFLD与氧化应激及其相关影响因素(如线粒体、微粒体、脂质过氧化、解偶联蛋白-2)作一综述。

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; 氧化应激; 活性氧

杨丽丽, 柳涛, 王淼, 邢练军, 季光, 郑培永. 氧化应激与非酒精性脂肪性肝病研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(9): 896-900

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/896.asp>

0 引言

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指除外酒精和其他明确的损肝因素所致的, 以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为主要特征的临床病理综合征, 包括单纯性脂肪肝以及由其演变的脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)和肝硬化^[1]。目前, NAFLD是导致无症状性转氨酶升高的首要病因, 而且有部分患者会进展至终末期肝病, 有些与肝肿瘤有关而危及生命^[2]。NAFLD是一种遗传-环境-代谢应激相关性疾病, 其发病机制尚未完全明确, 多种因素与其发生发展相关, 其中氧化应激对于NAFLD的发生发展起着关键作用。近年来对NAFLD的观察也表明, 氧化应激在其早期可能已存在致病作用^[3]。

1 氧化应激

细胞呼吸利用氧产生能形成ATP时, 氧衍生的自由基或活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生及其作用超过对其防御或去毒的能力, 这种细胞氧化还原失调造成组织、细胞损伤的状态称为氧化应激^[3]。ROS包括羟基(OH·)、超氧阴离子

■同行评议者

张国梁, 主任医师, 天津市第一中心医院消化内科

基(O^2)、过氧化氢(H_2O_2)等在需氧代谢过程中氧还原产生的主要由氧组成的、氧化性强的物质,其分子外层表面带有1个或数个不成对的电子,具有反应活性很高,作用范围有限,弥散能力低的特点。

在生理状况下ROS的产生量很少,可维持在有利无害的极低水平,履行其生理功能。例如参与生物氧化还原过程的电子传递;介导吞噬细胞杀灭、清除病原微生物;参与细胞内外的信号转导;通过多种机制杀伤肿瘤细胞;有助于清除有毒化合物等。但病理水平下ROS的产生增多,超过抗氧化系统的清除能力出现相对或绝对过剩,其攻击邻近组织、细胞,通过传递1或2个电子氧化大分子物质,引起DNA、蛋白质和脂质等的氧化或再氧化损害,破坏细胞结构和功能的完整性^[4],产生氧化应激。

肝实质细胞中有3个部位可产生ROS:线粒体、微粒体和过氧化物酶体。NAFLD时氧化应激主要来自增加的氧化反应,包括线粒体脂肪酸的氧化和过氧化反应、以及细胞色素P450 2E1(cytochrome P450 2E1, CYP2E1)和细胞色素P450 4A(cytochrome P450 4A, CYP4A)对长链和超长链脂肪酸的 ω -氧化,当耗尽了有效的抗氧化物质时,便会导致ROS的蓄积,产生氧化应激,加速NAFLD的进展。

2 线粒体与氧化应激

线粒体是肝细胞最重要的细胞器之一,是脂肪酸进行 β -氧化和三羧酸循环、ATP合成和ROS形成的主要场所^[5]。脂肪酸进入细胞后,首先在线粒体外或胞质中被活化,在脂酰CoA合成酶催化下,由ATP提供能量,将脂肪酸转变成脂酰CoA,然后进入线粒体进行氧化。脂酰CoA在 β -氧化过程中使氧化型辅酶(NAD和FAD)转变为还原型(NADH和FADH₂),NADH和FADH₂在线粒体呼吸链电子传递中重新氧化。在正常呼吸状态下,NADH和FADH₂将他的电子传递给呼吸链中的复合物,在这一过程中,这些电子中的绝大多数电子将沿着呼吸链最终传递至细胞色素c氧化酶,与氧和质子结合形成水,但一小部分可漏溢而直接与氧反应形成超氧阴离子自由基和其他ROS^[6]。

线粒体电子传递系统可消耗细胞90%的氧,是氧化应激和ROS形成的主要部位。正常情况下,能量供应充足,线粒体电子转运速度和物质氧化速度可以适应能量需求,氧化还原生成的

能量以ATP形式贮存起来,同时,生成的ROS可被体内的抗氧化剂清除,不对机体产生损伤;但NAFLD时,脂质贮积使血清脂肪酸增多,肝脏对游离脂肪酸摄取的增加使线粒体 β -氧化速度代偿性增加,进而增加ROS的产出,当超过抗氧化物质的清除能力而导致ROS蓄积时,ROS又可把线粒体作为首要的打击靶子,直接损害线粒体膜DNA(mitochondrial DNA, mtDNA),引起其超微结构异常,使线粒体DNA碱基对缺失突变,从而导致肝细胞脂肪代谢失调和ROS的过量产出^[7],形成一恶性循环。ROS还可直接损害线粒体膜呼吸链复合物,而呼吸链复合物的任何一个位点如果电子流受到阻碍,可导致电子直接与氧反应生成 O^2 ,诱致ROS产生并减少ATP生成。

早期脂肪变性的肝脏往往表现为线粒体超微结构损伤^[8],呼吸链复合物含量及活性下降,合成ATP功能障碍。Pérez-Carreras *et al*^[9]研究中测得NAFLD患者呼吸链复合物活性比对照组降低了30%-50%,且线粒体有不规则肿胀,内嵴排列紊乱、溶解、断裂。在低胆碱饮食诱导的NAFLD动物模型中, H_2O_2 的产生显著增加,线粒体呼吸链复合物I活性降低了35%^[10]。Hayashi *et al*^[11]研究发现NAFLD患者线粒体的超微结构异常,线粒体呼吸链活性下降和氧化磷酸化缺陷,导致电子在呼吸链流动中阻断而被传递到分子氧,产生超氧化离子和过氧化氢,最终导致线粒体肿胀、破裂。

3 微粒体与氧化应激

微粒体是ROS产生的另一个重要场所。在肝脏摄取脂肪酸过多或线粒体氧化系统活性受抑制时,线粒体外脂肪酸氧化系统如微粒体氧化系统等起非常重要的作用。细胞色素氧化酶P450(CYP2E1, CYP4A)是微粒体氧化体系的关键酶,其中CYP2E1的表达受瘦素诱导而被胰岛素负调控,CYP4A则被过氧化物酶体增殖激活受体诱导。CYP4A能催化长链脂肪酸和极长链脂肪酸生成具毒性的二羟基脂肪酸及其他生物活性的 ω -羟基化代谢物、超氧化物和 H_2O_2 。其中二羟基脂肪酸被过氧化物酶降解,产生短链酰基CoA和酰基CoA,而酰基CoA可作为肝内脂肪酸氧化系统某些酶的配体^[12],具有控制基因诱导的作用,增加肝细胞对“二次打击”的易感性。 H_2O_2 等ROS类通过蓄积对机体造成各种损伤,产生氧化应激。

■ 研究前沿

氧化应激对非酒精性脂肪性肝病发生发展起着重要的作用,其具体作用机制错综复杂,如何有效阻断氧化应激对非酒精性脂肪性肝病的进一步损伤是当前面临的严峻挑战。

■创新盘点

本文对氧化应激的相关影响因素如线粒体、微粒体、脂质过氧化、解偶联蛋白-2及其这些相关因素在非酒精性脂肪性肝病发生发展中的作用进行了逐一说明。

CYP2E1是细胞色素氧化酶P450的2E1亚型,其在氧化应激和脂质过氧化过程中起重要的作用,NAFLD中肝脏的CYP2E1活性增强^[13]。人的CYP2E1的分子质量为56.9 kDa,主要分布在成人肝脏,并且富集于肝小叶中心区域,其参与脂肪酸在微粒体的 ω -氧化,能降低分子氧含量,产生过氧化物如H₂O₂、OH⁻等ROS类,此作用如果不被有效的抗氧化剂阻断,就可产生氧化应激^[14]。NASH患者普遍存在CYP2E1的过表达,这可能与胰岛素抵抗使肝细胞膜对胰岛素敏感性降低有关^[15]。在离体培养的肝细胞也观察到CYP2E1的过表达减少了胰岛素受体底物-1和胰岛素受体底物-2的酪氨酸磷酸化而增加其丝氨酸磷酸化^[16]。游离脂肪酸是CYP2E1的基质也是其诱导剂,其通过使CYP2E1表达增加,导致大量ROS释放^[11]。CYP2E1的过表达可造成肝毒性和线粒体的损伤,同时由CYP2E1产生的ROS通过扩散作用,激活肝星状细胞形成肝纤维化^[17]。

CYP2E1抑制剂可以对抗由于乙醇、游离脂肪酸等诱导的CYP2E1过表达而致的氧化应激和脂质过氧化^[18]对细胞起保护作用,补充抗氧化剂亦可提供保护作用。而且在人肝脏实验性NASH模型中,CYP2E1分布在小静脉周边区域,与肝细胞损伤最严重的部位相一致^[19],证明微粒体中的氧化应激可引起细胞损伤。

4 氧化应激与脂质过氧化

氧化应激可增加脂质过氧化产物和细胞因子的释放,介导NAFLD的发生发展^[20]。由各种原因导致的ROS生成过多而蓄积时将导致ROS与多聚不饱和脂肪酸(poly-unsaturated fatty acids, PUFAs)作用启动细胞内脂质过氧化反应,此时ROS与生物膜的磷脂、酶和膜受体相关PUFAs的侧链及核酸等大分子物质反应形成脂质过氧化产物,从而使细胞膜的流动性和通透性、细胞的结构和功能发生改变。ROS可与线粒体的PUFAs发生脂质过氧化反应,减弱线粒体呼吸链活性,从而增加细胞氧化应激,产生更多的ROS而加重脂质过氧化反应。脂质过氧化产物可进一步损害线粒体呼吸链复合物,直接或间接的损伤mtDNA,这会导致更多的ROS产生而陷入一个恶性循环^[21]。PUFAs过氧化还可促进动物模型ApoB在内质网后、分泌前的蛋白溶解,而减少极低密度脂蛋白的分泌,加重甘油三酯在肝脏内的积聚。脂质过氧化反应可诱致中性白

细胞对脂质的趋化产生炎性浸润使肝脏发生炎症、坏死和还可激活库普弗细胞和星状细胞促进肝纤维化^[22-23]。脂质过氧化反应还可消耗细胞内的抗氧化物,导致谷胱甘肽和维生素E缺乏,使ROS的灭活发生障碍而增多。

丙二醛(malonyl-dialdehyde, MDA)和壬烯(4-hydroxynonenal, HNE)是两个强毒力的脂质过氧化产物,他们的半寿期较ROS长,且能弥散到细胞内、外其他靶位,扩大氧化应激的损害。二者均是双功能因子,可直接或通过蛋白质结合形成交链导致免疫应答,还可使包括细胞骨架蛋白在内的蛋白质发生交联,形成Mallory小体,进而诱发自身免疫反应。MDA和HNE又可激活库普弗细胞和星状细胞,促进胶原纤维合成,形成纤维化甚至肝硬化^[24]。另外HNE还具有中性粒细胞趋化作用,能导致肝小叶内中性粒细胞浸润^[25]。Yesilova *et al*^[26]证实,NAFLD患者MDA含量增高,而且与肝组织炎症、坏死及纤维化呈显著正相关。因此,氧化应激、脂质过氧化在NAFLD发病机制中的作用不容忽视。

5 解偶联蛋白-2与氧化应激

解偶联蛋白-2(uncoupling protein-2, UCP-2)是一种位于线粒体内膜上的载体蛋白,介导质子漏,使ATP合成解偶联^[27],对ROS产生起负性调节作用,其基因位于人类11号染色体,鼠类7号染色体上,该基因区与肥胖有关^[28]。ROS和脂质过氧化产物生成增加到一定数量时,肝脏发生氧化应激,启动适应机制,使线粒体UCP-2表达上升,抑制ROS生成,促进脂质氧化,减少脂质过氧化产物的生成,调节机体能量代谢使脂肪酸氧化,以热量的形式释放出去。正常肝组织中只有库普弗细胞表达UCP-2,但Horimoto *et al*^[29]研究发现库普弗细胞并不是肝组织中惟一表达UCP-2的细胞,肝细胞和胆管上皮细胞也有表达。UCP-2可以调节线粒体内膜上的质子跨膜转运,增加线粒体内膜的质子漏过率,进一步影响ATP合成。线粒体内经三羧酸循环产生的还原当量沿呼吸链传递时释放出的能量,可将H⁺跨线粒体内膜从基质转移至膜间隙,形成一个跨膜电化学梯度,UCP-2介导质子的跨膜内流,使ATP合成酶催化ADP磷酸化为ATP所需的电化学梯度降低,ADP磷酸化合成ATP效率下降,氧化与磷酸化解偶联^[30]。Yang *et al*^[31]进行的实验也发现,脂肪变性的肝细胞中UCP-2表达增多,其线粒体ATP含量较对照组下降15%。NAFLD时线粒体

中UCP-2表达上升为一种适应性反应, 因为甘油三酯的合成需供给ATP, UCP-2使ATP的合成解耦联, 故有助于抑制脂质合成, 限制脂质在肝细胞内沉积, 从而阻止NAFLD的发生和发展, 而且ATP合成解耦联, 可降低线粒体4期呼吸的氧化还原压力, 限制ROS的产生, 减少脂质氧化。

但是, 在肝脏环境急剧变化时, 却可能因为UCP-2使ATP合成受抑制, 导致肝细胞内ATP降低甚至耗竭, 而ATP有助于维持细胞的紧密性和活力, 在短暂缺血、能量需求急剧增加、应激等情况下ATP供不应求, 则肝细胞对坏死更加敏感。因此, 非酒精性脂肪性肝病中UCP-2表达增加是一把“双刃剑”。Fülöp *et al*^[32]报道尽管脂肪肝线粒体中UCP-2表达增多可使Fas介导的损伤加剧, 但UCP-2的减少将使脂肪肝处于持续的氧化应激状态。

6 结论

随着“二次打击”学说的提出, 氧化应激在非酒精性脂肪性肝病发病机制中的作用日益受到重视。其作用机制非常复杂, 各种影响因素之间存在着潜在的联系且相互作用, 互为因果。目前, 国内外众多学者在治疗由ROS蓄积造成的氧化应激损伤上, 大多从单一的作用途径着手, 如给予抗氧化的药物、改善线粒体功能的药物、降低CYP2E1含量的药物, 这些药物均能在一定程度上降低氧化应激损伤, 改善NAFLD的病理生理指标, 但其并不能消除氧化应激。因此找到一种能多基因、多靶点完全有效阻断NAFLD氧化应激的药物, 是我们近阶段将要面临的挑战。

7 参考文献

- 1 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南. 中华肝脏病杂志 2006; 14: 161-163
- 2 Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis: pathologic features and differential diagnosis. *Semin Diagn Pathol* 2005; 22: 330-338
- 3 曾民德. 脂肪性肝病的氧化应激及其治疗对策. 国外医学·消化系疾病分册 2005; 25: 263-266
- 4 范建高, 曾民德. 脂肪性肝病. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2005; 489
- 5 Pessayre D, Berson A, Fromenty B, Mansouri A. Mitochondria in steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 57-69
- 6 McKenzie M, Liolitsa D, Hanna MG. Mitochondrial disease: mutations and mechanisms. *Neurochem Res* 2004; 29: 589-600
- 7 Serviddio G, Sastre J, Bellanti F, Viña J, Vendemiale G, Altomare E. Mitochondrial involvement in non-alcoholic steatohepatitis. *Mol Aspects Med* 2008; 29: 22-35
- 8 Kojima H, Sakurai S, Uemura M, Fukui H,

- Morimoto H, Tamagawa Y. Mitochondrial abnormality and oxidative stress in nonalcoholic steatohepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 2007; 31: S61-S66
- 9 Pérez-Carreras M, Del Hoyo P, Martín MA, Rubio JC, Martín A, Castellano G, Colina F, Arenas J, Solís-Herruzo JA. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003; 38: 999-1007
- 10 Petrosillo G, Portincasa P, Grattagliano I, Casanova G, Matera M, Ruggiero FM, Ferri D, Paradies G. Mitochondrial dysfunction in rat with nonalcoholic fatty liver involvement of complex I, reactive oxygen species and cardiolipin. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1767: 1260-1267
- 11 Hayashi S, Yasui H, Sakurai H. Essential role of singlet oxygen species in cytochrome P450-dependent substrate oxygenation by rat liver microsomes. *Drug Metab Pharmacokinet* 2005; 20: 14-23
- 12 Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346: 1221-1231
- 13 Prompila N, Wittayalertpanya S, Komolmit P. Hepatic cytochrome P450 2E1 activity in nonalcoholic fatty liver disease. *J Med Assoc Thai* 2008; 91: 733-738
- 14 Robertson G, Leclercq I, Farrell GC. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G1135-G1139
- 15 Woodcroft KJ, Hafner MS, Novak RF. Insulin signaling in the transcriptional and posttranscriptional regulation of CYP2E1 expression. *Hepatology* 2002; 35: 263-273
- 16 Schattenberg JM, Wang Y, Singh R, Rigoli RM, Czaja MJ. Hepatocyte CYP2E1 overexpression and steatohepatitis lead to impaired hepatic insulin signaling. *J Biol Chem* 2005; 280: 9887-9894
- 17 Wu D, Cederbaum AI. Oxidative stress mediated toxicity exerted by ethanol-inducible CYP2E1. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 207: 70-76
- 18 Gonzalez FJ. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutat Res* 2005; 569: 101-110
- 19 Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 2467-2474
- 20 Pessayre D. Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S20-S27
- 21 Begrich K, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* 2006; 6: 1-28
- 22 Lieber CS. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol* 2004; 34: 9-19
- 23 Haufroid V, Ligoeka D, Buyschaert M, Horsmans Y, Lison D. Cytochrome P4502E1 (CYP2E1) expression in peripheral blood lymphocytes: evaluation in hepatitis C and diabetes. *Eur J Clin Pharmacol* 2003; 59: 29-33
- 24 Niemelä O, Parkkila S, Juvonen RO, Viitala K, Gelboin HV, Pasanen M. Cytochromes P450 2A6, 2E1, and 3A and production of protein-aldehyde adducts in the liver of patients with alcoholic and non-alcoholic liver

■名词解释

氧化应激: 细胞呼吸利用氧产生能形成ATP时, 氧衍生的自由基或活性氧的产生及其作用超过对其防御或去毒的能力, 这种细胞氧化还原失调造成组织、细胞损伤的状态称为氧化应激。

■同行评价

本综述选题较好, 论述全面, 对临床医生的研究工作有很好指导作用.

- diseases. *J Hepatol* 2000; 33: 893-901
- 25 Tilg H, Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2000; 343: 1467-1476
- 26 Yesilova Z, Yaman H, Oktenli C, Ozcan A, Uygun A, Cakir E, Sanisoglu SY, Erdil A, Ates Y, Aslan M, Musabak U, Erbil MK, Karaeren N, Dagalp K. Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic Fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 850-855
- 27 Serviddio G, Bellanti F, Tamborra R, Rollo T, Capitanio N, Romano AD, Sastre J, Vendemiale G, Altomare E. Uncoupling protein-2 (UCP2) induces mitochondrial proton leak and increases susceptibility of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) liver to ischaemia-reperfusion injury. *Gut* 2008; 57: 957-965
- 28 Saleh MC, Wheeler MB, Chan CB. Uncoupling protein-2: evidence for its function as a metabolic regulator. *Diabetologia* 2002; 45: 174-187
- 29 Horimoto M, Fülöp P, Derdák Z, Wands JR, Baffy G. Uncoupling protein-2 deficiency promotes oxidant stress and delays liver regeneration in mice. *Hepatology* 2004; 39: 386-392
- 30 Chan CB, Saleh MC, Koshkin V, Wheeler MB. Uncoupling protein 2 and islet function. *Diabetes* 2004; 53 Suppl 1: S136-S142
- 31 Yang S, Zhu H, Li Y, Lin H, Gabrielson K, Trush MA, Diehl AM. Mitochondrial adaptations to obesity-related oxidant stress. *Arch Biochem Biophys* 2000; 378: 259-268
- 32 Fülöp P, Derdák Z, Sheets A, Sabo E, Berthiaume EP, Resnick MB, Wands JR, Paragh G, Baffy G. Lack of UCP2 reduces Fas-mediated liver injury in ob/ob mice and reveals importance of cell-specific UCP2 expression. *Hepatology* 2006; 44: 592-601

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

第九次全国消化系疾病学术会议征文通知

本刊讯 中华医学会消化病学分会定于2009-12-04/06在广州市召开第九次全国消化系疾病学术会议. 现将会议的征文内容及有关事项通知如下:

1 征文内容

与消化系统疾病有关的流行病学、基础及临床研究. (1)功能性胃肠疾病及动力障碍性胃肠病(包括胃食管反流病); (2)幽门螺杆菌及其相关疾病; (3)胰腺疾病; (4)肝胆疾病; (5)胃肠道肿瘤; (6)炎症性肠病; (7)胃肠激素; (8)消化疾病介入治疗; (9)青年委员会专场(全部用英文交流).

2 征文要求

(1)报送的论文要求800字左右的中文摘要一份, 摘要内容包括: 目的、方法、结果、结论, 注明作者姓名、单位及邮编, 论文文责自负. 投青年会专场的论文必须附相应的英文摘要, 第一作者年龄须在45周岁以下(1964-11后出生). (2)凡已在全国性学术会议或全国公开发行的刊物上发表过的论文不予受理. (3)通过本次会议专用网站报送电子文稿及报名注册, 会议不接受书面投稿. 要求作者本人通过会议网站上传稿件并留下联系方式, 会议网址: <http://www.csgd.org.cn>. (4)截稿日期: 2009-09-15.

希望各地委员积极、认真组织所在地区医生踊跃投稿并参会.

PDZ连接激酶/T-LAK细胞源蛋白激酶研究进展

张安平, 刘宝华

张安平, 刘宝华, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所普通外科 重庆市 400042
作者贡献分布: 本文由张安平完成, 张安平和刘宝华共同审核。
通讯作者: 张安平, 400042, 重庆市大坪长江之路10号, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所普通外科。
anping_zhang@163.com
电话: 023-68757952
收稿日期: 2008-12-25 修回日期: 2009-01-28
接受日期: 2009-02-09 在线出版日期: 2009-03-28

Progress in research of PDZ-binding-kinase/T-LAK cell-originated protein kinase

An-Ping Zhang, Bao-Hua Liu

An-Ping Zhang, Bao-Hua Liu, Department of General Surgery, Daping Hospital, Research Institute of Field Surgery, the Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400042, China
Correspondence to: Dr. An-Ping Zhang, Department of General Surgery, Daping Hospital, Research Institute of Field Surgery, the Third Military Medical University of Chinese PLA, 10 Daping Changjiang Zhi Road, Chongqing 400042, China. anping_zhang@163.com
Received: 2008-12-25 Revised: 2009-01-28
Accepted: 2009-02-09 Published online: 2009-03-28

Abstract

PDZ-binding-kinase/T-LAK cell-originated protein kinase (PBK/TOPK) is a recently identified 322-amino acid serine/threonine kinase involved in cell cycle and proliferative regulation of malignant cells. PBK/TOPK promotes tumor cell proliferation through p38 MAPK activity and regulation of the DNA damage repair response. New studies indicate that PBK/TOPK have a important potential to induce malignant transformation, suggesting a potential target for chemotherapeutic treatment of cancer.

Key Words: PDZ-binding-kinase/T-LAK cell-originated protein kinase; MAPKK; Serine/threonine kinase

Zhang AP, Liu BH. Progress in research of PDZ-binding-kinase/T-LAK cell-originated protein kinase. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(9): 901-905

摘要

PDZ连接激酶/T-LAK细胞源蛋白激酶(PDZ-

binding-kinase/T-LAK cell-originated protein kinase, PBK/TOPK)是一种新近发现的丝-苏氨酸激酶, 具有参与调控恶性肿瘤细胞的增殖和周期变化, 促进肿瘤细胞转化, 并且通过MAPKK信号通路参与调控细胞DNA损伤修复. 特别是近期发现其具有强烈的细胞恶性诱导潜能而可能成为新的肿瘤治疗靶点.

关键词: PDZ连接激酶/T-LAK细胞源蛋白激酶; MAPKK; 丝-苏氨酸激酶

张安平, 刘宝华. PDZ连接激酶/T-LAK细胞源蛋白激酶研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(9): 901-905
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/901.asp>

0 引言

作为MAPKK分子家族成员之一的PBK/TOPK, 在结构除具有该家族成员的某些共同特征, 同时又缺乏具有催化功能的域结构. 研究表明PBK/TOPK通过参与调控恶性肿瘤细胞的增殖和周期变化, 特别是对有丝分裂的纺锤体形成具有重要作用, 其异常表达具有强烈的细胞致癌潜能成为研究的重点. 本文综述了PBK/TOPK结构特征、功能及相关作用信号通路.

1 PBK/TOPK的基本特性

PBK/TOPK是一种新近发现的丝-苏氨酸激酶, 属于MAPKK分子家族成员. Gaudet *et al*于2000年在HeLa细胞cDNA文库中克隆出了一种与hD1g分子PDZ结构域结合的分子PBK(PDZ-binding-kinase, PBK)^[1]. 随后Abe *et al*构建T-LAK细胞cDNA文库, 克隆和表达出新型蛋白激酶T-LAK细胞源蛋白激酶PBK/TOPK(T-LAK cell-originated protein kinase, TOPK), 通过序列分析发现两者是同一种分子, 即命名为PBK/TOPK. 结构分析显示PBK/TOPK是一种含有322个氨基酸的丝-苏氨酸激酶, 他是介导T细胞和T-LAK细胞的细胞毒功能的重要信号, 而淋巴因子激活的杀伤T(T-LAK)细胞对于肿瘤细胞具有细胞毒作用, T-LAK细胞表达膜相关淋巴

■背景资料

PBK/TOPK是MAPKK家族新成员, 作为一种丝/苏氨酸激酶, 参与调控细胞增殖和周期、DNA损伤修复, 具有强烈的细胞恶性诱导潜能, 可能成为肿瘤发生的标志物和抗肿瘤治疗的新靶点.

■同行评议者

周晓武, 副主任医师, 中国人民解放军空军总医院普外科

■ 研发前沿

PBK/TOPK通过p38MAPK激活促进细胞的有效修复机制促进肿瘤细胞的生长,参与DNA损伤修复反应机制的激活,而细胞MAPK信号通路过度激活是细胞恶性转化的关键之一。其异常表达可能导致Ras/Raf/MEK/ERK信号通路异常激活,诱导细胞恶性转化而导致肿瘤。PBK/TOPK可作为抗肿瘤治疗的新靶点。

细胞毒素和膜蛋白淋巴细胞毒素,当T-LAK细胞灭活后则淋巴细胞毒素消失。PBK/TOPK具有双重MAPKK特性,他位于MEK1/2和MKK7之间,且更接近MEK1/2,TPBK/TOPK在体内可使p38MAPK磷酸化,而不能使JNK或ERK磷酸化。PBK/TOPK在功能上与MKK3/6相关,而与MKK7或MEK1/2无关。PBK/TOPK缺少MAPKK家族的典型氨基酸序列如第七和第八区域的(S/T)XXX(S/T),这些区域是维持催化功能的重要结构域。PBK/TOPK拥有NXXXT,其门冬氨酸替代第一个丝氨酸或苏氨酸^[2]。因此PBK/TOPK本身没有催化活性,他需要个别氨基酸的残基磷酸化才有催化活性。由于PBK/TOPK通过参与调控肿瘤细胞的增殖和周期变化,特别是对有丝分裂期的纺锤体形成具有重要作用,其异常表达具有强烈的细胞致癌潜能成为研究的重点。

2 PBK/TOPK参与恶性肿瘤细胞增殖及周期的调控

研究发现在正常外周血细胞未见PBK/TOPK-mRNA表达,在GA-10 Burkitt淋巴瘤细胞系、ALL患者的血液标本和复发骨髓瘤的胸水标本中, PBK/TOPK mRNA表达强度与反应性增生的扁桃体B细胞系的表达相比,前者更高。同样在其他8种Burkitt淋巴瘤细胞系、HL-60、乳腺癌细胞系MD321、结肠癌细胞系(Caco)、甲状腺癌(TC797)和Ewing瘤中都检测到高水平表达的PBK/TOPK mRNA。通过对高增殖活性的恶性肿瘤患者的临床标本检测也可观察到这种PBK/TOPKmRNA表达增强现象^[3]。Nandi *et al*报道12例AML中有9例检测到PBK/TOPK蛋白的表达,3例ALL和1例浆细胞淋巴瘤均有强阳性表达。而用TPA诱导HL60向单核、巨噬细胞分化后, PBK/TOPK蛋白表达在24 h内明显降低。PBK/TOPK可使COS细胞转染子的p38MAPK磷酸化,但不能使ERK或JNK磷酸化,在血液系恶性肿瘤中PBK/TOPK表达和磷酸化c-Myc的表达具有明显的关联性,因此PBK/TOPK参与调控恶性肿瘤细胞增殖。在HL-60分化后期, PBK/TOPK缺失的情况下, Cyclin D1和磷酸化p38仍能维持稳定水平, p38磷酸化与HL-60细胞中PBK/TOPK信号通路相关。结果表明PBK/TOPK蛋白在血液系恶性肿瘤表达,并与白血病细胞的分化相关, PBK/TOPK表达升高可诱导细胞转化和生长,表达下降可阻止恶性肿瘤细胞的生长。且PBK/TOPKmRNA表达与细胞周期激

活的细胞比例有关^[4]。在有丝分裂期, Cdc2/CyclinB可激活PDZ结合激酶,通过Cdc2/CyclinB识别的蛋白磷酸化位点而与有丝分裂纺锤体形成相关,同时PBK在胞质分裂中发挥一定作用。应用阿霉素阻遏白血病细胞生长之后, PBK/TOPK的表达明显下降,表明PBK/TOPK表达可能调控白血病细胞的生长或存活。PBK/TOPK主要通过E2F、CREB/ATF与PBK/TOPK启动子中的特异性位点结合而发挥对细胞周期的特异性调控^[5]。在正常组织中, Gaudet *et al*在成人睾丸、胎盘、心肌和胰腺组织中检测到了PBK/TOPK的mRNA,其中胎盘含量最丰富;并在骨骼肌、肾脏、肝脏和肺中检测到PBK/TOPK的低水平表达^[1]。通过分析81例乳腺癌的全基因组谱研究发现PBK/TOPK是一种细胞癌/睾丸抗原。运用siRNA抑制PBK/TOPK的表达可显著抑制细胞生长,因PBK/TOPK在乳腺癌中过度表达,敲除内源性PBK/TOPK可抑制乳腺癌细胞生长,导致胞质分裂异常,最终肿瘤细胞发生凋亡。研究表明在乳腺癌细胞的有丝分裂早期,组蛋白H3(Ser10)的细胞周期依赖性磷酸化与PBK/TOPK的表达水平和定位相关, PBK/TOPK-组蛋白H3信号通路可促进有丝分裂进程,使乳腺癌细胞的增殖活力增强^[6]。Fujibuchi *et al*证明PBK/TOPK表达定位在睾丸组织的精母细胞,在精子细胞和精原细胞中不表达,即在精子发生过程中,增殖活跃的细胞表达PBK/TOPK^[7]。Dougherty *et al*发现神经多能祖细胞在增殖时也表达PBK/TOPK,特别是在PCNA阳性的增殖细胞中高表达;而GFAP阳性的静止期神经干细胞和NeuN阳性的成熟神经细胞中不表达^[8]。

PBK/TOPK在高度增殖的恶性细胞和有特定增殖空间的正常组织细胞中表达上调, PBK/TOPK通过C-末端与hDIg癌基因结合与细胞增殖密切相关,但作用机制不清,且PBK/TOPK定位在人体正常组织和肿瘤组织的哪些细胞尚待研究。

在有丝分裂期PBK/TOPK的表达和磷酸化增强,他直接和cdk1/cyclinB1复合物结合上调, PBK/TOPK-Thr9被cdk1/cyclinB1复合物磷酸化。通过观察纺锤体形态,特别是中纺锤体,发现PCR1只与PBK/TOPK-T9E结合,运用SiRNA技术研究显示Thr9磷酸化PBK/TOPK才能与PCR1结合。运用紫杉醇处理细胞后,发现细胞停滞于G₂期, cdk1/cyclinB1表达增强, cdk1/cyclinB1使PBK/TOPK在Thr9磷酸化后与PCR1结合。

PBK/TOPK-Thr9磷酸化后呈酸性, PBK/TOPK在253-275位点开放, PRC1与PBK/TOPK的结合加强. cdk1/cyclinB1使PRC1磷酸化是在纺锤体中有丝分裂连接的第一步, 过度表达PRC1可抑制有丝分裂进程. 在PRC1转染子中, 可使有丝分裂细胞数目降低和分离前期细胞数目比例升高. 实验显示, 在体内PBK/TOPK可使PRC1的cdk1/cyclinB1依赖性磷酸化增强, 而在体外PBK/TOPK并不能使PRC1磷酸化, 但其增强的机制不明. 尽管PBK/TOPK通过假信号肽存在于细胞核或细胞质中, 但在整个细胞周期中PBK/TOPK始终与cdk1结合. 因此PBK/TOPK在体内主要与cdk1结合形成复合物. PBK/TOPK形成激酶-作用底物复合物, 他包括cdk1/cyclinB1、微管和PRC1, 该复合物迫使PRC1磷酸化, PBK/TOPK作为一种KIND域激酶在cdk1/cyclinB1和酶作用底物PRC1形成激酶-作用底物复合物中起重要作用, 该复合物反而促进cdk1/cyclinB1的催化作用. PBK/TOPK可促进PRC1的cdk1/cyclinB1依赖的磷酸化作用, 如在有丝分裂期间, PRC1不能被cdk1/cyclinB1复合物适时的磷酸化, 有丝分裂则可能不稳定而延迟进行, 特别是从分裂前期至分裂后期将延长. PBK/TOPK在细胞内的表达水平则反映了有丝分裂的精确度, 提高增殖活性, 维持有丝分裂的稳定性^[9]. 另有研究PBK/TOPK在细胞周期表达特点发现, PBK/TOPK蛋白在G₂至M期表达升高, 同时Cyclin B1表达也上调. 在细胞周期中PBK/TOPK蛋白表达依赖于分裂后期促进复合物. 在细胞周期阻断停止后8 h PBK/TOPK的磷酸化增强且达高峰, 但是PBK/TOPK上调缓和, 则与PBK/TOPK蛋白表达水平相当. 这说明PBK/TOPK磷酸化可能不受上游调节激酶诱导的关键氨基酸磷酸化的调控. PBK/TOPK-Thr9可被cdk1磷酸化, 在G₂至M期, PBK/TOPK和Cyclin B1的表达被共同上调, 这两种蛋白紧密相关. PBK/TOPK可直接与cdk1/cyclin B1结合, 但是在有丝分裂间期PBK/TOPK存在于细胞质和细胞核. cdk1/cyclinB1使Thr9磷酸化, PBK/TOPK则与cdk1/cyclinB1、微管结合紧密. 在G₂期开始时cdk1/cyclinB1的表达增强, 在有丝分裂期表达达高峰, 通过Thr9磷酸化, cdk1/cyclinB1表达上调对于PBK/TOPK定位于纺锤丝非常重要. 在没有PBK/TOPK的情况下, 通过干扰APC与Cyclin B1的结合, Cyclin B1的降解从有丝分裂中期提前至有丝分裂后期. 因此PBK/TOPK可延长有丝分裂期Cyclin B1的表

达时间, 可促进G₁至G₂期进展, 抑制PBK/TOPK可使细胞停滞在S和G₂期之间. 当PBK/TOPK在细胞中的表达抑制时, 中纺锤体变薄和模糊, 表明PBK/TOPK对于中纺锤体形成和胞质分裂非常重要^[10]. 细胞周期特异性转录因子E2F和细胞周期AMP反应元件结合蛋白/激活转录因子均是PBK/TOPK在非白血性白血病细胞生长停滞期的关键调控因子. 砷作用于肿瘤细胞可使Cyclin B1表达上调和激活cdk1/cyclinB1复合物, 砷诱导PBK/TOPK的磷酸化, 而PBK/TOPK可直接使组蛋白H2AX磷酸化, H2AX磷酸化在DNA修复中可促进染色体结构构型的改变以及协助染色体与修复因子的结合. 如果抑制PBK/TOPK的表达, 则砷诱导的细胞凋亡增强^[11]. 实验发现当异常表达PBK/TOPK的纤维肉瘤细胞受到阿霉素诱导DNA损伤过程中, PBK/TOPK和p53形成复合物导致p53不稳定和使G₂/M检测点减弱, 并可导致阿霉素诱导的多倍体细胞瞬时消失而成非整倍体细胞, 表现出细胞恶性转化潜能^[12].

PBK/TOPK/CDK1/cyclinB的结合参与细胞有丝分裂中纺锤体的形成, PBK/TOPK在细胞周期G₂/M进展中起到重要的作用, 细胞周期调控异常最终导致肿瘤的发生.

3 PBK/TOPK通过p38MAPK激活促进肿瘤细胞生长而调控细胞DNA损伤修复

癌变通常是正常细胞分化异常、增殖过度、凋亡受阻的结果^[13]. 研究发现, 细胞内信号转导通路与肿瘤发生发展密切, 其中MAPK信号通路在这些过程中起重要作用. MAPK家族包含4个成员: ERK(extracellular signal-regulated)、JNK (Jun N-terminal kinase)、p38MAPK和大丝裂原活化蛋白激酶(big MAP kinase 1, BMK1)/ERK5, 是许多生长信号转导途径的会聚点. MAPK的激活是通过细胞内一系列磷酸化级联反应而实现的. 不同的胞外刺激信号活化不同的信号转导通路, 通过依赖或非依赖Ras机制激活MAPK, 形成级联反应MAPKKK-MAPKK-MAPK. ERK1/2通常由生长因子通过Ras-Raf-MEK通路的磷酸化而激活, 也可由佛波酯通过PKC-Raf-MEK通路而被激活^[14]. JNK/SAPK、p38和BMK1/ERK5可由细胞内外各种刺激如紫外线、氧化应激、炎症因子而激活^[14-15]. MAPK活化后进入细胞核内, 调控一系列转录因子的表达, 如Elk-1、Sap-1、c-fos、c-Myc、ATF2、NF-κB、HSF-1等^[16-17], 从而调控细胞的增殖、分化、凋亡, 并在血管发生、肿瘤

■ 相关报道

研究显示PBK/TOPK可促进大肠癌的细胞转化, 大肠癌组织中PBK/TOPK高表达, 而在正常组织中表达很低.

■应用要点

PBK/TOPK在高度增殖的恶性细胞和有特定增殖空间的正常细胞中表达被上调。PBK/TOPK/CDK1/cyclinB的结合参与细胞有丝分裂中纺锤体的形成,并在细胞周期G₂/M进展中起重要作用,细胞周期调控异常最终导致肿瘤发生。

细胞黏附、侵袭转移过程中具有重要作用。

在体外PBK/TOPK的功能与MAPKK相似,能与p38MAPKK有选择的相互作用和使其磷酸化。PBK/TOPK的表达与细胞增殖相关,但是PBK/TOPK沉默并不能抑制细胞周期进程,在生长因子或DNA损伤作用细胞后,PBK/TOPK的表达降低而使p38的激活受损,细胞活力降低。研究显示PBK/TOPK作为一种生长因子调控激酶,在多种肿瘤细胞中表达增强,可诱导肿瘤细胞周期进程,敲除PBK/TOPK对于正常细胞周期进程却不产生影响。PBK/TOPK是p38生长因子激活的介导子,是DNA损伤传感机制的一部分,而H2AX的磷酸化必需PBK/TOPK。PBK/TOPK通过激发肿瘤细胞的有效修复机制,促进肿瘤细胞的生长,参与DNA损伤修复反应机制的激活。

PBK/TOPK在转化细胞中表达持续增强,而IGF-I通过激活PI3K和ERK信号而诱导PBK的表达。E2F和cAMP反应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)可调控PBK/TOPK转录。IGF-I通过PI3K和ERK通路激活CREB,诱导E2F的表达,E2F和CREB作为转录因子对IGF-I诱导的PBK/TOPK表达产生反应。在神经干细胞和睾丸中PBK/TOPK高表达,说明PBK/TOPK对于具有增殖活性的正常细胞增殖具有重要作用,但是抑制PBK表达对于短期生长因子激活的细胞增殖并不产生影响。P38是调控细胞的迁移和侵袭,PBK/TOPK敲除可使长期细胞生长受到抑制。shPBK细胞对DNA损伤的敏感性降低同时有损 γ -H2AX的形成, γ -H2AX可以修复DNA损伤位点的DNA损伤反应蛋白(DNA damage response, DDR),H2AX的Ser139磷酸化需要MDC1结合,这种结合可促进DDR蛋白的集聚^[18]。实验发现磷酸化的H2AX表达降低,而导致DNA损伤增强,使DDR蛋白未能得到修补,其结果是细胞的长期修复生长和存活受到损伤。DDR蛋白变异可促进肿瘤的发展,如大肠癌的MUTYH变异^[19-20]。有效的DNA修复机制有利于细胞的存活,同时也可能是肿瘤细胞对治疗产生抵抗的原因。抑制DNA修复通路可促进DNA损伤药物的作用效果。PBK/TOPK的表达受到IGF-I和EGF的调控,参与DNA损伤修复信号通路,PBK/TOPK联合DNA损伤药物而启动IGF-IR或EGFR,可能是一种抗肿瘤治疗的新靶点^[21]。

4 PBK/TOPK具有强烈的促大肠癌细胞恶性转化潜能,但信号通路尚不明确

在正常细胞中MAPK在受到生长因子刺激后激

活,导致细胞增殖、分化和其他细胞变化。在MAPK信号通路中存在多种副反馈环,可抑制MAPK通路的过度激活,而维持细胞生长的内环境的稳定^[22]。在大肠癌细胞中MAPK过度激活则导致细胞生长被扰乱。由于Ras和Raf变异,二者在癌细胞中被激活,除了MAPK信号通路外尚有多种信号与Ras和Raf相关,如PI-3K、Ral/GEF/Ral)、I- κ B、Src、ERKs通过SOS磷酸化对Ras激活具有副反馈调节,通过MEK磷酸化对MEK激活具有副反馈调节,而Ras或Raf变异导致MAPK过度激活是否导致细胞转化尚不清楚^[23]。在MAPK通路中MEK1和MEK2具有独特的性质。MEK1和MEK2能整合其他丝裂信号通路如ERK通路。如果MAPK通路异常可导致细胞转化,则在肿瘤细胞中必然存在MEK或ERK的致癌模式。研究发现在转化的NIH3T3细胞中存在MEK1的激活,以及MEK1分别在S217或S221变异或二者同时变异。这有助于了解MAPK信号在细胞转化过程中的重要性^[24]。但是在正常细胞中MEK1无激活,因此对于MEKs和ERKs间的是否存在负反馈通路尚需要进一步研究。

研究显示PBK/TOPK可促进大肠癌细胞的转化,大肠癌组织中PBK/TOPK高表达,而在正常组织中表达很低。PBK/TOPK过度表达可导致JB6C141细胞转化,阻断HCT116大肠癌细胞中的PBK/TOPK表达可使细胞的致癌作用降低。PBK/TOPK可使ERK2磷酸化,反之亦然。这种正反馈是PBK/TOPK诱导细胞转化的原因。阻断PBK/TOPK可使下游底物磷酸化下调,如c-MYC, c-FOS, CREB, ELK1。结果显示PBK/TOPK是MEK的致癌基因。由于PBK/TOPK主要在大肠癌细胞中激活而在正常细胞中不激活,因此PBK/TOPK可能是大肠癌药物治疗的新靶点。MEK转导Ras或Raf, ERKs负反馈于Ras或Raf,而下调MAPK信号,维持正常细胞生长。PBK/TOPK在癌细胞中过度表达,Raf可独立调控PBK/TOPK。B-Raf或C-Raf激活并不能使PBK/TOPK磷酸化。PBK/TOPK和ERK2之间的正反馈增强两种蛋白的激酶活性,从而调控细胞转化。癌细胞中Ras/Raf/MEK/ERK信号通路被激活,由于MEK或PBK/TOPK可诱导ERK2活性增强,ERKs到MEK之间的强负反馈可能是Ras/Raf/MEK/ERK信号通路激活的原因^[25]。Ras或Raf变异可增强MEK激活,因此MEK的激活不仅决定于上游激酶的过度激活也可通过抑制ERK下游底物而激活。

5 结论

PBK/TOPK在恶性肿瘤细胞转化中的作用尚待进一步研究, 第一, hDlg、cdk1/cyclinB、ERK2和p38四种激酶能使PBK/TOPK磷酸化. 但是在肿瘤细胞中PBK/TOPK的上游信号激酶尚未被确定; 第二, PBK/TOPK在癌细胞中过度表达的原因不清; 第三, PBK/TOPK的结构如何对于认识PBK/TOPK的功能和开发新的PBK/TOPK抑制因子具有关键作用; 第四, 各种大肠癌细胞系、癌组织、癌旁组织和正常组织样本中PBK/TOPK的表达情况也需进一步广泛研究, 目的在于PBK/TOPK过度表达是否能够成为肿瘤形成的重要标志物.

6 参考文献

- Gaudet S, Branton D, Lue RA. Characterization of PDZ-binding kinase, a mitotic kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 5167-5172
- Abe Y, Matsumoto S, Kito K, Ueda N. Cloning and expression of a novel MAPKK-like protein kinase, lymphokine-activated killer T-cell-originated protein kinase, specifically expressed in the testis and activated lymphoid cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 21525-21531
- Simons-Evelyn M, Bailey-Dell K, Toretsky JA, Ross DD, Fenton R, Kalvakolanu D, Rapoport AP. PBK/TOPK is a novel mitotic kinase which is upregulated in Burkitt's lymphoma and other highly proliferative malignant cells. *Blood Cells Mol Dis* 2001; 27: 825-829
- Nandi A, Tidwell M, Karp J, Rapoport AP. Protein expression of PDZ-binding kinase is up-regulated in hematologic malignancies and strongly down-regulated during terminal differentiation of HL-60 leukemic cells. *Blood Cells Mol Dis* 2004; 32: 240-245
- Nandi AK, Rapoport AP. Expression of PDZ-binding kinase (PBK) is regulated by cell cycle-specific transcription factors E2F and CREB/ATF. *Leuk Res* 2006; 30: 437-447
- Park JH, Lin ML, Nishidate T, Nakamura Y, Katagiri T. PDZ-binding kinase/T-LAK cell-originated protein kinase, a putative cancer/testis antigen with an oncogenic activity in breast cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 9186-9195
- Fujibuchi T, Abe Y, Takeuchi T, Ueda N, Shigemoto K, Yamamoto H, Kito K. Expression and phosphorylation of TOPK during spermatogenesis. *Dev Growth Differ* 2005; 47: 637-644
- Dougherty JD, Garcia AD, Nakano I, Livingstone M, Norris B, Polakiewicz R, Wexler EM, Sofroniew MV, Kornblum HI, Geschwind DH. PBK/TOPK, a proliferating neural progenitor-specific mitogen-activated protein kinase kinase. *J Neurosci* 2005; 25: 10773-10785
- Abe Y, Takeuchi T, Kagawa-Miki L, Ueda N, Shigemoto K, Yasukawa M, Kito K. A mitotic kinase TOPK enhances Cdk1/cyclin B1-dependent phosphorylation of PRC1 and promotes cytokinesis. *J Mol Biol* 2007; 370: 231-245
- Matsumoto S, Abe Y, Fujibuchi T, Takeuchi T, Kito K, Ueda N, Shigemoto K, Gyo K. Characterization of a MAPKK-like protein kinase TOPK. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325: 997-1004
- Zykova TA, Zhu F, Lu C, Higgins L, Tatsumi Y, Abe Y, Bode AM, Dong Z. Lymphokine-activated killer T-cell-originated protein kinase phosphorylation of histone H2AX prevents arsenite-induced apoptosis in RPMI7951 melanoma cells. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6884-6893
- Nandi AK, Ford T, Fleksher D, Neuman B, Rapoport AP. Attenuation of DNA damage checkpoint by PBK, a novel mitotic kinase, involves protein-protein interaction with tumor suppressor p53. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358: 181-188
- Köbel M, Pohl G, Schmitt WD, Hauptmann S, Wang TL, Shih IeM. Activation of mitogen-activated protein kinase is required for migration and invasion of placental site trophoblastic tumor. *Am J Pathol* 2005; 167: 879-885
- Reddy KB, Nabha SM, Atanaskova N. Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2003; 22: 395-403
- Raviv Z, Kalie E, Seger R. MEK5 and ERK5 are localized in the nuclei of resting as well as stimulated cells, while MEKK2 translocates from the cytosol to the nucleus upon stimulation. *J Cell Sci* 2004; 117: 1773-1784
- Dong C, Davis RJ, Flavell RA. Signaling by the JNK group of MAP kinases. c-jun N-terminal Kinase. *J Clin Immunol* 2001; 21: 253-257
- Obata T, Brown GE, Yaffe MB. MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway. *Crit Care Med* 2000; 28: N67-N77
- Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Lobrich M, Jeggo PA. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res* 2004; 64: 2390-2396
- Risinger MA, Groden J. Crosslinks and crosstalk: human cancer syndromes and DNA repair defects. *Cancer Cell* 2004; 6: 539-545
- Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP. MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* 2005; 123: 1213-1226
- Ayllón V, O'connor R. PBK/TOPK promotes tumour cell proliferation through p38 MAPK activity and regulation of the DNA damage response. *Oncogene* 2007; 26: 3451-3461
- Chapman S, Asthagiri AR. Resistance to signal activation governs design features of the MAP kinase signaling module. *Biotechnol Bioeng* 2004; 85: 311-322
- Eblen ST, Slack-Davis JK, Tarcsafalvi A, Parsons JT, Weber MJ, Catling AD. Mitogen-activated protein kinase feedback phosphorylation regulates MEK1 complex formation and activation during cellular adhesion. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 2308-2317
- Sauro HM, Kholodenko BN. Quantitative analysis of signaling networks. *Prog Biophys Mol Biol* 2004; 86: 5-43
- Zhu F, Zykova TA, Kang BS, Wang Z, Ebeling MC, Abe Y, Ma WY, Bode AM, Dong Z. Bidirectional signals transduced by TOPK-ERK interaction increase tumorigenesis of HCT116 colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 2007; 133: 219-231

■同行评价

本文选题较新, 内容全面, 文献引用合理, 具有较好的可读性.

数字减影血管造影对小肠出血的诊断价值

李洪翠, 李肖, 杨丽, 唐承薇

■背景资料

小肠解剖位置特殊, 引起其出血的原因复杂, 尽管有多种方法可以检查小肠出血, 但各有其局限性, 小肠出血的诊断是临床工作的难点. 随着医学影像学的发展, 数字减影血管造影技术的应用, 小肠出血的诊断率有所提高, 并可在血管造影的同时履行介入治疗.

李洪翠, 李肖, 杨丽, 唐承薇, 四川大学华西医院消化内科 四川省成都市610041

国家自然科学基金资助项目, No. 30770984

作者贡献分布: 本文综述由李洪翠与李肖完成, 杨丽与唐承薇审核.

通讯作者: 李肖, 610041, 四川省成都市外南国学巷37号, 四川大学华西医院消化内科. simonlixiao@263.net
电话: 028-81812291

收稿日期: 2009-01-16 修回日期: 2009-02-25

接受日期: 2009-03-02 在线出版日期: 2009-03-28

Diagnostic value of digital subtraction angiography in small intestinal bleeding

Hong-Cui Li, Xiao Li, Li Yang, Cheng-Wei Tang

Hong-Cui Li, Xiao Li, Li Yang, Cheng-Wei Tang, Department of Gastroenterology, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30770984

Correspondence to: Xiao Li, Department of Gastroenterology, West China Hospital of Sichuan University, 37 Wainan Guoxue Road, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. simonlixiao@263.net

Received: 2009-01-16 Revised: 2009-02-25

Accepted: 2009-03-02 Published online: 2009-03-28

Abstract

Due to lack of specific clinical symptoms of small intestinal bleeding and the limitation of its conventional examination methods, diagnosis of small intestinal bleeding is in a great dilemma. The purpose of this paper is to review the value of digital subtraction angiography (DSA) in the diagnosis of small intestinal bleeding and hope to instruct clinical diagnosis and therapy sufficiently.

Key Words: Small intestinal bleeding; Diagnosis; Digital subtraction angiography

Li HC, Li X, Yang L, Tang CW. Diagnostic value of digital subtraction angiography in small intestinal bleeding. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(9): 906-909

摘要

小肠出血的临床表现缺乏特异性, 多种检查方法各有局限, 明确诊断比较困难. 本文就数字

减影血管造影(digital subtraction angiography, DSA)在小肠出血诊断方面的应用价值进行综述, 以发挥其在小肠出血中的诊断优势, 进一步提高小肠出血的诊断率, 更好地指导临床诊治.

关键词: 小肠出血; 诊断; 数字减影血管造影

李洪翠, 李肖, 杨丽, 唐承薇. 数字减影血管造影对小肠出血的诊断价值. *世界华人消化杂志* 2009; 17(9): 906-909

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/906.asp>

0 引言

小肠出血通常是指Treitz韧带到回盲瓣之间肠道的出血, 约占消化道出血的3%-5%^[1], 国内有文献报道达2%-15%^[2]. 临床上小肠出血常常表现为原因不明的出血, 即经胃镜和结肠镜检查阴性而诊断不明的持续性或反复发作性出血, 其临床表现缺乏特异性, 且多表现为间歇性、隐匿性出血, 部分患者仅表现为慢性贫血而无任何不适, 一般不引起患者的注意. 由于小肠居于消化道的特殊部位, 长5-7 m, 肠襻之间相互重叠、蠕动和收缩使肠段在腹腔内的部位变化不定, 长期以来缺乏直观、清晰观察小肠的检查方法, 致使小肠出血得不到早期确诊. 因此, 快速而准确找到小肠出血的部位是临床工作的关键与难点.

1 小肠出血常用诊断方法及其特点

目前, 小肠出血的诊断方法主要有: (1)内镜检查: 胃镜和纤维结肠镜能排除食管、胃、十二指肠球部及结、直肠的病变出血, 但不能观察小肠病变. 小肠镜具有直观性且可进行活检, 但费时、操作难度大、患者难以耐受, 在临床应用中受限. 胶囊内镜是小肠出血诊断技术的一次飞跃, 敏感性较高. Albert *et al*^[3]报道胶囊内镜诊断小肠出血阳性率为79.9%, 但内镜在肠道内移动无法控制, 滞留的肠液对图像观察有一定影响, 且价格昂贵, 临床尚未广泛开展. (2)肠道X线检查: 是诊断小肠疾病的一种常用检查

■同行评议者

韩新巍, 教授, 河南省郑州大学第一附属医院放射科

方法, 但定位、定性阳性率低. (3)放射核素扫描检查: 诊断小肠出血敏感性高, 当出血量达到0.1-0.4 mL/min时扫描可能得到阳性结果^[4], 即扫描时可看到核素自血管内外渗, 但不能精确定位, 更无病因诊断价值. (4)剖腹探查和术中内镜: 比较直观但创伤较大, 剖腹探查可以发现大的血管病变和肿瘤, 但不能发现小的病变; 术中内镜在大量活动性出血时难以辨认出血灶, 因此及时而准确的寻找小肠出血的部位通常是常规检查的盲点.

2 DSA检查方法及特点

DSA检查是将常用的介入导管, 选择性或超选择性地插入腹腔干、肠系膜上、下动脉, 按一定流率注入一定浓度和剂量的造影剂, 并通过减影技术消除血管以外其他组织结构而突出显示靶血管的形态、分支、分布等. DSA图像清晰、密度分辨率高, 可以发现微血管的病变, 能了解到病变血管与周围血管的吻合及交通情况, 及时诊断并迅速作出治疗方案. 选择性血管造影检查是诊断小肠出血的一种重要手段, 其定位定性诊断率高, 尤其是DSA提高了小肠出血的检出率, 研究证实其特异性高于常规血管造影^[5]. DSA检查对不明原因的消化道出血定位诊断率为44%-68%^[4]. DSA与其他诊断方法相比, 具有以下特点: (1)肠道内积血不影响检查结果, 且在造影时出血量越大, 其阳性率越高. 当出血量达0.5-1 mL/min时, 肠系膜动脉内造影定位诊断率达50%-72%, 出血量<0.5 mL/min或出血停止, 诊断阳性率则下降^[6]. (2)检查时患者取平卧位, 患者痛苦较小, 危重患者亦可耐受检查. (3)若结果阳性, 不仅能发现出血部位, 而且可以根据造影表现, 判断出血的原因及性质. (4)DSA是血管源性病变、尤其是黏膜下血管病变的重要诊断方法. (5)便于术前明确诊断, 有利于手术准确切除, 以免盲目切除增加手术死亡率. (6)DSA检查不仅具有诊断价值, 且可经导管给药(比如靶血管内灌注垂体后叶素等), 必要时及时履行血管内栓塞治疗. Yoon *et al*^[7]报道了3例肾病晚期血液透析的患者, 出现消化道出血, 经胃镜和结肠镜检查未明确出血灶, 考虑小肠出血, 予选择性诊断性血管造影, 在回肠动脉和空肠动脉的分支见造影剂外溢, 将导管插入供血动脉, 予栓塞治疗后出血立即停止. 术后随访4-12 mo, 未发现小肠缺血和坏死. 因此, DSA检查对小肠出血的诊断优势是其他检查方法不可取代的, 且

兼具诊断与治疗双重作用.

3 DSA的适应证与禁忌证

张春福 *et al*^[8]认为对于下消化道出血患者, 凡是内镜、消化道钡剂造影未见器质性病变或放射性核素扫描无确切出血阳性者, 均应作选择性肠系膜上、下动脉的DSA检查. 在急性大量出血的情况下, 不宜进行肠道钡剂检查, 由于肠腔积血的影响, 内镜的应用也受到限制, 有学者提出此时急诊血管造影检查应作为首选^[9].

血管造影检查无绝对的禁忌证, 但对于造影剂过敏、严重的凝血功能障碍、严重的高血压、心功能不全者应慎用^[10].

4 DSA影像学特征

4.1 直接征象 造影剂外溢为直接征象, 表现为肠腔内造影剂聚集. 随造影时间的延长, 造影剂外渗更明显, 外渗造影剂团的形态大小与出血量有关. 研究表明出血量>0.5 mL/min时, 即可见造影剂从血管内外渗到肠腔^[11]. 出血量大时, 造影剂外溢范围广而易见, 有时可见胃肠道的黏膜征, 甚至可见造影剂向肠腔喷射; 少量出血时造影剂外渗少, 有时难以发现造影剂外渗征象.

4.2 间接征象 出血间接征象为原发病变血管造影表现, 表现为局部血管密集、粗细不均、毛细血管迂曲扩展、肿瘤血管、肿瘤染色等. 小肠出血的最常见原因是血管发育异常(40%)和肿瘤(33%)^[12]. DSA在显示肿瘤血管及血管畸形方面具有独特的优势, 根据肠管异常显影血管及供血动脉来源对肿瘤作出定位诊断, 再通过分析肿瘤血管和肿瘤染色等征象, 部分可作出定性诊断. 对于血管性病变, 可显示血管畸形、动脉瘤及供血动脉的来源和部位.

5 DSA诊断小肠出血的敏感性与特异性分析

自1963年Nusbaum应用血管造影确定消化道出血部位以来, 血管造影检查在消化道出血诊断中应用较多, 其诊断下消化道出血敏感性达86%, 特异性达100%^[13]. 罗光华 *et al*^[14]报道了25例消化道出血患者, 经胃镜及肠镜检查排除十二指肠及结肠出血, 临床诊断为小肠出血, 均行肠系膜上动脉DSA检查, 结果11例见造影剂外溢, 12例显示出血间接征象, 其中5例同时出现直接征象和间接征象, 诊断小肠出血阳性率达72%, 阳性病例造影剂所见出血部位与术中所见出血部位一致, 定位诊断率为100%, 阳性病例与手术病理诊断的符合率为75%. 有一项

■研发前沿

DSA检查对小肠出血具有定位和定性诊断价值, 且可在检查的同时进行介入性止血. 目前尚在进一步研究血管造影对小肠出血的阳性检出率及血管内止血的效果.

■相关报道

由于DSA对小肠出血的检查受血管造影的时机(是否处于急性出血期)、出血速度、临床用药、造影剂的浓度和用量、选择性插管的程度、造影技术与设备、病变本身的性质(大小、供血)及有无移动性伪影等多因素的影响, 报道的检出率有差异.

■应用要点

对于急性小肠大出血及不明原因的下消化道出血可采用DSA检查,掌握造影时机,减少影响其检查率的因素,以期提高检出率。

研究^[15]对69例结肠镜检查阴性的急性下消化道出血患者进行血管造影检查,48例明确出血原因。Browder *et al*^[16]对50例下消化道出血的患者予急诊血管造影检查,定位诊断了36例。Burgess *et al*^[17]对15例急性下消化道出血患者行DSA检查,10例发现活动性出血。唐郁宽 *et al*^[18]对23例小肠出血患者行DSA检查,20例发现出血征象,病变发现率87%,定位诊断率73.9%,与手术病理诊断符合率77.8%。各家的敏感性与特异性报道结果不一,可能与检查前对其适应证的把握不一相关。总之,DSA检查对小肠出血的定位和定性诊断具有重要的应用价值。

6 面临的问题与对策

DSA是一项有创性检查,应由操作熟练和有经验的医生操作。DSA对小肠出血的检出率受血管造影时机(是否处于急性出血期)、出血速度、临床用药、造影剂的浓度和用量、选择性插管的程度、造影技术与设备、病变本身的性质(大小、供血)及有无移动性伪影等多因素的影响。故DSA检查应尽量在患者出血活动期及未使用止血药物之前进行,尽量避免在DSA检查时使用缩血管药,以免影响其阳性检出率。当造影无阳性发现时,要考虑患者出血可能已经停止或正处于出血间歇期,此时可保留导管,待出血活动时再重复造影,甚至可在保持患者生命体征平稳条件下用药物诱发出血来提高检出率。Johnston *et al*^[19]报道抗凝剂、血管扩张剂、纤溶蛋白溶解剂经动脉导管灌注诱发出血,成功率达29%-80%。Ryan *et al*^[20]对内镜及血管造影检查阴性的隐匿性下消化道出血的16例患者,经肠系膜动脉插管后灌注组织纤维蛋白溶酶原激活剂、盐酸苄唑林等诱发出血,6例患者明确了出血部位。检查时需注意导管头端的位置,应用足够量的造影剂及其流速,除对小肠的主要供血动脉进行全面检查外,还要对临床考虑的可能出血部位及造影过程中可疑之处进行超选择插管造影,延长造影时间,并多期血管成像,以发现微小病变。对于择期检查的患者,应做肠道清洁准备,检查前可使用654-2减少肠蠕动,清醒患者需要训练好呼吸、在闭气末状态下屏气造影,以免影响图像效果。近年来,平板大功率DSA的问世,集数字电影、旋转、路标、步进、跟踪、自动定位等多种功能和技术于一体,更加彰显了DSA在小肠出血诊治中的优势。

7 结论

DSA已成为一项成熟的检查方法,其操作简单、快捷、微创,可急诊进行,对患者条件要求相对较低,显著提高了小肠出血的检出率,对小肠出血的定位与定性诊断具有重要的应用价值。可视情况予以留置导管、靶向给药;对有阳性发现且适合于介入治疗的病例可同时采取血管内栓塞治疗以达立即止血之目的;对需要外科手术的病例也具有重要的指导意义。

8 参考文献

- Lewis BS. Small intestinal bleeding. *Gastroenterol Clin North Am* 2000; 29: 67-95, vi
- 晁宏伟. 小肠出血43例诊治分析. *临床医学* 2008; 28: 16
- Albert JG, Schülbe R, Hahn L, Heinig D, Schoppmeyer K, Porst H, Lorenz R, Plauth M, Dollinger MM, Mössner J, Caca K, Fleig WE. Impact of capsule endoscopy on outcome in mid-intestinal bleeding: a multicentre cohort study in 285 patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008; 20: 971-977
- Concha R, Amaro R, Barkin JS. Obscure gastrointestinal bleeding: diagnostic and therapeutic approach. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41: 242-251
- Defreyne L, Uder M, Vanlangenhove P, Van Maele G, Kunnen M, Kramann B. Angiography for acute lower gastrointestinal hemorrhage: efficacy of cut film compared with digital subtraction techniques. *J Vasc Interv Radiol* 2003; 14: 313-322
- Ghosh S, Watts D, Kinnear M. Management of gastrointestinal haemorrhage. *Postgrad Med J* 2002; 78: 4-14
- Yoon W, Kim JK, Kim HK, Han YM, Kang HK. Acute small bowel hemorrhage in three patients with end-stage renal disease: diagnosis and management by angiographic intervention. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2002; 25: 133-136
- 张春福, 李炳辉, 孙志奇, 陈丽, 宋燕钧, 田鸿钧. 数字减影血管造影在小肠出血中的应用. *中国老年学杂志* 2007; 27: 1516
- 陈克敏. 难治性消化道出血的影像诊断和介入治疗. *中华消化杂志* 2008; 28: 654
- White RA, Hollier LH. *Vascular Surgery: Basic Science and Clinical Correlations*. 2nd ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2005: 385
- Krüger K, Heindel W, Dölken W, Landwehr P, Lackner K. Angiographic detection of gastrointestinal bleeding. An experimental comparison of conventional screen-film angiography and digital subtraction angiography. *Invest Radiol* 1996; 31: 451-457
- Varela Lema L, Ruano-Ravina A. Effectiveness and safety of capsule endoscopy in the diagnosis of small bowel diseases. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42: 466-471
- Lee EW, Laberge JM. Differential diagnosis of gastrointestinal bleeding. *Tech Vasc Interv Radiol* 2004; 7: 112-122
- 罗光华, 肖文莲, 单鸿, 唐德秋. 不明原因小肠出血数字减影血管造影价值. *介入放射学杂志* 2006; 15: 222
- Abadia C, Adet A, Esteve S, Feu F, Armengol JR, Malagelada J, Pique JM. Usefulness of angiography

- in patients with undiagnosed lower gastrointestinal bleeding. *Gastrointestinal Endoscopy* 2004; 59: 271
- 16 Browder W, Cerise EJ, Litwin MS. Impact of emergency angiography in massive lower gastrointestinal bleeding. *Ann Surg* 1986; 204: 530-536
- 17 Burgess AN, Evans PM. Lower gastrointestinal haemorrhage and superselective angiographic embolization. *ANZ J Surg* 2004; 74: 635-638
- 18 唐郁宽, 陈汉威, 周泽健, 邵培坚, 许向东, 叶海鸣. 介入治疗小肠急性出血的临床应用价值. *影像诊断与介入放射学* 2001; 10: 29
- 19 Johnston C, Tuite D, Pritchard R, Reynolds J, McEniff N, Ryan JM. Use of provocative angiography to localize site in recurrent gastrointestinal bleeding. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2007; 30: 1042-1046
- 20 Ryan JM, Key SM, Dumbleton SA, Smith TP. Nonlocalized lower gastrointestinal bleeding: provocative bleeding studies with intraarterial tPA, heparin, and tolazoline. *J Vasc Interv Radiol* 2001; 12: 1273-1277

■同行评价
本文选题科学, 内容新颖, 全面的综述了消化道出血的造影诊断方法与技术.

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 •

2009年广东省中西医结合、中医脾胃消化病学术会议暨 国家级继续教育项目消化病进展研讨班征文通知

本刊讯 由广东省中西医结合学会脾胃消化病专业委员会, 广东省中医药学会消化病专业委员会主办的2009年脾胃消化病学术会议暨国家级继续教育项目消化病进展研讨班将于2009-09-25/27在广东省广州市召开, 现将会议征文有关事项通知如下:

1 征稿内容

中西医结合、中医治疗消化道统疾病的基础理论研究、临床经验总结、诊治的新进展, 名老中医、西医和中西医结合专家个人诊治特色总结.

2 征稿要求

论文资料务必真实可靠, 书写规范, 简明扼要, 每篇以3000字以内为宜, 并附800字左右的摘要1份; 来稿请用电脑打印, 用word软件编入, 并附软盘, 或发送电子邮件, 文稿中请注明作者姓名、单位、通讯地址、邮政编码及联系电话. 截稿日期: 2009-07/30

3 交流方式

专题报告、论文宣读与讨论答疑相结合. 入选论文并参会者给予记I类学分6分, 另外将择优编入《现代消化及介入诊疗》杂志. 参加继续教育研讨班者另给予国家级一类学分12分.

4 投稿地址

(1)E-mail: zhangwdcn@163.com; (2)全文、摘要并附软盘寄至广东省广州市广州大道北1838号南方医院消化编辑罗永华同志(邮编: 510105); 并注明脾胃消化病学术会议投稿. 无论文者也欢迎参会或报名参加研讨班.

5 联系方式

姚永莉, 510105, 广东省广州市广州大道北1838号, 南方医院消化内科, 电话: 13189096556

胰岛淀粉样多肽在生后发育期间家兔十二指肠中的表达及意义

胡 赟, 梁文妹

■背景资料

胰岛淀粉样多肽由胰岛细胞分泌, 也见于胃肠道。目前尚未见其在生后发育家兔十二指肠表达的报道。本研究较详细的观察了其在生后不同时段家兔十二指肠的定位及分布特点, 充实了有关IAPP的研究资料。

胡赟, 梁文妹, 贵阳医学院组织学与胚胎学教研室 贵州省贵阳市 550004
贵州省科学技术基金资助项目, No. 黔科通200350
贵州省教育厅自然科学基金资助项目, No. 黔教科2002314
作者贡献分布: 此课题由梁文妹设计, 并指导实验及论文的撰写, 对文章的知识性内容作批评性审阅; 研究过程、数据分析、文章起草由胡赟完成。
通讯作者: 梁文妹, 教授, 550004, 贵州省贵阳市北京路9号, 贵阳医学院组织学与胚胎学教研室, wenmeiliang@126.com
电话: 0851-6909118
收稿日期: 2009-01-16 修回日期: 2009-03-04
接受日期: 2009-03-09 在线出版日期: 2009-03-28

Expression of islet amyloid polypeptide in duodenum of rabbits during the postnatal development period

Yun Hu, Wen-Mei Liang

Yun Hu, Wen-Mei Liang, Department of Histology and Embryology, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China
Supported by: the Science and Technology Foundation of Guizhou Province, No. 200350; and the Research Program of Nature Science of the Department of Education of Guizhou Province, No. 2002314

Correspondence to: Professor Wen-mei Liang, Department of Histology and Embryology, Guiyang Medical University, 9 Beijing Road, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. wenmeiliang@126.com
Received: 2009-01-16 Revised: 2009-03-04
Accepted: 2009-03-09 Published online: 2009-03-28

Abstract

AIM: To investigate the expression and distribution features of islet amyloid polypeptide (IAPP) in duodenum of rabbits during the postnatal development period.

METHODS: Sixty rabbits were equally divided into the 5th, 15th, 25th, 35th, 60th, and 90th d groups. Immunohistochemical SABC staining and image analysis were performed to detect the expression of IAPP.

RESULTS: The expression of IAPP was found in the duodenum of rabbits at different postnatal development stages. Positive production was

brownish-yellow and resided in the cytoplasm. In the 5th and 15th d groups, a few IAPP positive cells scattered over epithelium mucosa cells, and the staining was weaker. During 25th to 90th d, the number of IAPP positive cells increased and staining became stronger gradually. The positive cells were mainly distributed in the connective tissue of tunica propria, and some cells scattered over epithelium mucosa cells. The result of image analysis indicated the number of IAPP positive cells increased from 35th to 90th d ($F = 24.19$, $P = 0.0001$), and the mean grey values decreased gradually from 15th d ($F = 72.42$, $P = 0.004$).

CONCLUSION: IAPP maybe involve in the development of tunica mucosa in rabbit duodenum as a nutrition factor.

Key Words: Islet amyloid polypeptide; Rabbit; Postnatal development; Duodenum

Hu Y, Liang WM. Expression of islet amyloid polypeptide in duodenum of rabbits during the postnatal development period. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(9): 910-913

摘要

目的: 观察家兔生后发育期间十二指肠胰岛淀粉样多肽(islet amyloid polypeptide, IAPP)的表达及分布特点。

方法: 家兔60只, 分为生后5、15、25、35、60、90 d共6组, 每组10只, 应用免疫组织化学SABC法及图像分析方法检测IAPP在十二指肠的表达及分布特点。

结果: 不同发育阶段家兔十二指肠中均有IAPP的表达, 阳性产物呈棕黄色, 存在于胞质。生后5、15 d, IAPP阳性细胞散在分布于黏膜上皮细胞间, 细胞数量少且染色浅淡; 25-90 d, IAPP阳性细胞数量增多, 且细胞染色深, 主要分布于固有层结缔组织中, 少量分散存在于黏膜上皮细胞间。图像分析结果表明, IAPP阳性细胞的数量从第35天开始逐渐增多($F = 24.19$, $P = 0.0001$), 平均灰度值从第15天开始逐渐下

■同行评议者

洪天配, 教授, 北京大学第三医院内分泌科

降($F = 72.42, P = 0.004$).

结论: IAPP作为一种营养因子, 可能对生后家兔十二指肠黏膜的生长发育起重要作用.

关键词: 胰岛淀粉样多肽; 家兔; 生后发育; 十二指肠

胡赞, 梁文妹. 胰岛淀粉样多肽在生后发育期间家兔十二指肠中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(9): 910-913
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/910.asp

0 引言

IAPP又称为糖尿病相关肽(diabetes-associated peptide, DAP)或淀粉不溶素(amylin), 自从1986年被提纯以来, 已引起众多学者的关注. 除由胰岛细胞分泌外, 也可由胃肠内分泌细胞分泌^[1]. 已有研究证明, 人胎胃、小肠、结肠、直肠和阑尾均有IAPP的表达. 但现有研究中对生后不同发育阶段家兔十二指肠中是否有IAPP表达尚无定论. 本研究应用免疫组织化学及图像分析方法, 对家兔十二指肠生后发育期间IAPP的定位及分布特点进行了较详细的定性和定量分析, 为深入研究IAPP的生理作用及其对生后发育的影响提供更多的形态学依据.

1 材料和方法

1.1 材料 生后5、15、25、35、60、90 d家兔各10只, 体质量分别为 0.072 ± 0.006 、 0.151 ± 0.003 、 0.209 ± 0.021 、 0.345 ± 0.091 、 1.21 ± 0.152 、 2.001 ± 0.093 kg, 由贵阳医学院动物实验动物中心提供. 经股动脉放血处死后, 迅速取其十二指肠组织入Bouin液固定, 梯度酒精脱水, 常规石蜡包埋, 制成4 μm 厚连续切片.

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学SABC法: 显示IAPP阳性细胞. 其主要步骤为: 切片常规脱蜡至水, 甲醇-过氧化氢封闭10 min, 正常羊血清(1:50)室温30 min, 兔抗IAPP(1:2000, Peninsula Lab INC产品)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 羊抗兔IgG(1:100)37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育20 min, SABC复合物37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育20 min, DAB-H₂O₂液显色, 苏木精复染, 中性树脂胶封片. 方法对照: 以PBS缓冲液代替IAPP抗血清, 余步骤同上.

1.2.2 图像分析: 随机选取各发育阶段家兔十二指肠切片3张, 应用BioMias图像分析系统进行检测. 在40倍物镜下, 每张切片随机选取5个视野,

计数IAPP阳性细胞数量, 并测得其平均灰度值.

统计学处理 应用SPSS11.0统计学软件对所得数据进行显著性分析. 组间比较用单因素方差分析(One-way analysis of variance, ANOVA)(mean \pm SD), $P < 0.05$ 具有统计学意义.

2 结果

2.1 免疫组织化学染色结果 生后发育不同阶段的家兔十二指肠中均有IAPP阳性细胞, 阳性产物呈棕黄色, 存在于胞质(图1). 生后5 d及15 d, IAPP阳性细胞散在于黏膜上皮细胞间, 多呈柱状, 细胞数量少且染色浅淡(图1A-B); 25 d到35 d, IAPP阳性细胞则位于固有层结缔组织中, 圆形或卵圆形, 且数量逐渐增多, 免疫染色变深(图1C-D); 60 d及90 d时IAPP阳性细胞不仅分布于固有层结缔组织中, 也分散存在于黏膜上皮细胞间, 且细胞数量多, 染色深(图1E-F). 方法对照切片上未见阳性细胞.

2.2 图像分析结果 IAPP阳性细胞数量在5 d、15 d、25 d时变化不明显($P > 0.05$), 从35 d开始, 细胞数量开始增多($F = 24.19, P < 0.05$); IAPP阳性细胞的平均灰度值在15 d、25 d时呈逐渐降低趋势($F = 72.42, P < 0.05$), 但35 d以后变化不明显($P > 0.05$, 表1).

3 讨论

IAPP是由胰岛B细胞分泌的一种37肽, 具有抑制餐后胰高血糖分泌、抑制胃排空、抑制食欲等多种生理功能^[2]. 生理状态下, IAPP与胰岛素共存于胰岛B细胞内, 与胰岛素及其他葡萄糖调节因子一起调节体内糖的代谢, 对维持体内血糖水平稳定起重要作用^[3-4]. IAPP是2型糖尿病发生的重要病理因素之一, 可通过启动细胞内凋亡信号蛋白^[5]、氧化应激^[6]、诱导细胞膜离子样通道形成^[7]等机制引起B细胞凋亡及功能衰竭. 另有研究证实, IAPP具有与降钙素基因相关肽及降钙素相似的结构, 是降钙素家族成员之一, 能促进成骨细胞增殖及骨形成, 同时还能抑制破骨细胞的活性及骨吸收, 对骨的生长和改建具有重要的调节作用^[8].

此外, IAPP还与胃肠道的功能密切相关. 能抑制胃酸分泌, 减少肥大细胞的脱颗粒现象, 增加肠系膜淋巴管收缩的频率和幅度, 促进胃溃疡的愈合等, 对胃肠黏膜的生长和修复有重要的调节作用^[9]. IAPP能以旁分泌、自分泌方式调节胃黏膜的内分泌活动^[1], 或作为一种新的

■ 研发前沿

胰岛淀粉样多肽与糖尿病发生发展的相关机制一直是研究热点, 近年来逐渐深入并涉及到肥胖、骨质疏松等领域, 但这些作用机制仍不是很明确.

■ 相关报道

已有研究证明, 人胎胃、小肠、结肠、直肠和阑尾及大鼠胃肠道均有胰岛淀粉样多肽的表达, 而人胎小肠中仅十二指肠上皮及固有层有表达, 空肠及回肠均未表达.

■应用要点

本文的相关工作为胰岛淀粉样多肽生物学功能研究提供了实验依据。在家兔十二指肠的生后发育过程中,胰岛淀粉样多肽的表达、形态及定量结果改变与消化和内分泌功能的调节密切相关,为研究其在十二指肠生后发育中的作用提供了形态学资料。

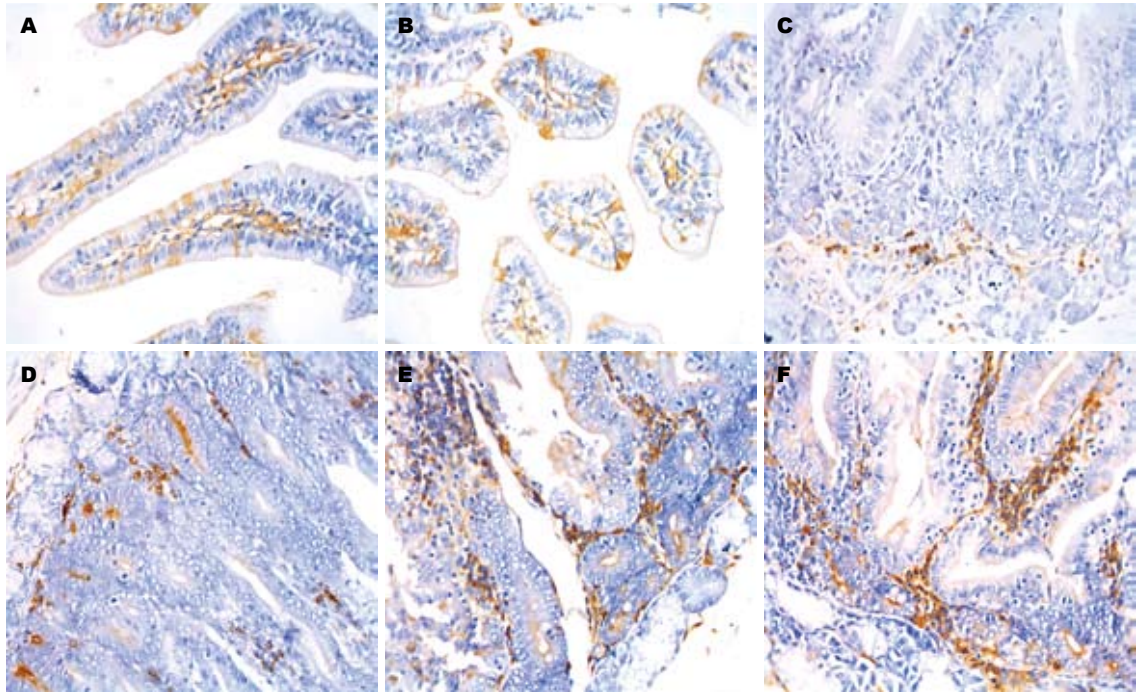


图1 生后不同发育阶段家兔十二指肠IAPP的表达(SABC, ×400)。A: 5 d; B: 15 d; C: 25 d; D: 35 d; E: 60 d; F: 90 d。

表1 生后各发育阶段IAPP阳性细胞的图像分析结果 (mean ± SD)

生后(d)	测量指标			
	细胞数量	P	平均灰度值	P
5	11.56 ± 3.54		186.51 ± 11.03	
15	10.01 ± 4.13	0.3120	171.18 ± 11.29 [°]	0.004
25	10.67 ± 2.51	0.5470	152.38 ± 26.58 [°]	0.015
35	28.37 ± 4.27 [°]	0.0001	151.19 ± 29.92	0.348
60	45.36 ± 2.09 [°]	0.0001	150.41 ± 24.93	0.111
90	52.48 ± 6.22 [°]	0.0001	150.84 ± 25.66	0.173

[°]P<0.05, [°]P<0.05 vs 5 d组。

脑肠肽参与维持消化过程中血糖稳定的内分泌反应^[10]。已有的研究证明,人胎小肠中仅十二指肠上皮及固有层有IAPP的表达,且与胎龄有关。本研究结果表明,生后不同发育阶段家兔十二指肠均有IAPP表达,其定位从上皮逐渐向固有层过渡,与胎儿十二指肠IAPP表达的结果相似。综合以上研究结果,我们认为在生长发育的过程中,随着IAPP的表达由上皮向固有层迁移,IAPP逐渐参与了十二指肠消化和内分泌功能的调节过程,与十二指肠的生长发育密切相关。

目前有关IAPP在胃肠道表达的文献报道均只涉及其分布特征方面的研究,本研究除定性外,还尝试应用图像分析方法测量了IAPP阳性表达强度的改变。我们发现随生后发育时间的

延长,兔十二指肠IAPP阳性细胞数量逐渐增多,平均灰度值逐渐下降,表明IAPP阳性表达的程度增强,IAPP含量增多。我们推测这可能是对胃肠道所接受的食物刺激越来越复杂的一种适应性反应。

German *et al*^[9]的研究表明IAPP能促进胃肠黏膜的生长和修复,在减少有害因素对胃黏膜造成损伤的同时刺激保护因素发挥作用,从而促进胃溃疡的愈合。综合现有文献报道及本组研究结果,我们推测随家兔生后发育时间延长,十二指肠分泌增加的IAPP可能作为一种营养因子,促进小肠黏膜的生长发育,并且通过肠-胰岛轴调节机制影响胰岛激素对糖代谢的调节,同时对生后发育期间骨骼的构建起调节作用。

4 参考文献

- Mulder H, Lindh AC, Ekblad E, Westermark P, Sundler F. Islet amyloid polypeptide is expressed in endocrine cells of the gastric mucosa in the rat and mouse. *Gastroenterology* 1994; 107: 712-719
- Gebre-Medhin S, Olofsson C, Mulder H. Islet amyloid polypeptide in the islets of Langerhans: friend or foe? *Diabetologia* 2000; 43: 687-695
- Yan LM, Taterek-Nossol M, Velkova A, Kazantzis A, Kapurniotu A. Design of a mimic of nonamyloidogenic and bioactive human islet amyloid polypeptide (IAPP) as nanomolar affinity inhibitor of IAPP cytotoxic fibrillogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 2046-2051
- Knight JD, Williamson JA, Miranker AD. Interaction of membrane-bound islet amyloid polypeptide with soluble and crystalline insulin. *Protein Sci* 2008; 17:

- 1850-1856
- 5 Zhang S, Liu J, Dragunow M, Cooper GJ. Fibrillogenic amylin evokes islet beta-cell apoptosis through linked activation of a caspase cascade and JNK1. *J Biol Chem* 2003; 278: 52810-52819
- 6 Konarkowska B, Aitken JF, Kistler J, Zhang S, Cooper GJ. Thiol reducing compounds prevent human amylin-evoked cytotoxicity. *FEBS J* 2005; 272: 4949-4959
- 7 Quist A, Doudevski I, Lin H, Azimova R, Ng D, Frangione B, Kagan B, Ghiso J, Lal R. Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 10427-10432
- 8 Naot D, Cornish J. The role of peptides and receptors of the calcitonin family in the regulation of bone metabolism. *Bone* 2008; 43: 813-818
- 9 German SV, Zhukova SE, Komarov FI, Kopylova GN, Kuper GJ, Luk'iantseva GV, Samonina GE, Smirnova EA, Umarova BA. [Pancreatic hormone amylin and integrity of the gastric mucosa] *Vestn Ross Akad Med Nauk* 2001; 34-38
- 10 Guidobono F. Amylin and gastrointestinal activity. *Gen Pharmacol* 1998; 31: 173-177

■同行评价
本文选题较好, 设计合理, 结果可靠, 具有较好的学术价值。

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

1 修回稿信件

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

2 稿件修改

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

3 版权

本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期); 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录。(常务副总编辑: 张海宁 2009-03-28)

甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物的制备及体外缓释特征

杨建华, 路新卫, 韦莉萍, 丁婷

■背景资料

蒙脱土属矿物中药, 对人、畜、植物无毒害和腐蚀作用。蒙脱土本身对胃肠道有多种作用, 口服后紧密覆盖消化道表面, 吸附黏蛋白, 有加强修复和保护消化道黏膜的功能, 并减轻药物对黏膜刺激产生的毒副作用, 还能固定和清除多种病原体和毒素, 防止各种炎症因子对胃黏膜的侵害, 平衡正常胃肠道菌群的微生态, 促进消化道局部免疫作用, 具有局部止血作用。

杨建华, 韦莉萍, 丁婷, 南方医科大学中医药学院 广东省广州市 510515
路新卫, 南方医科大学药学院 广东省广州市 510515
广州市科技攻关计划基金资助项目, No. 2004Z3-E0171
广东省卫生厅医学科研基金资助项目, No. A2004411
作者贡献分布: 此课题由韦莉萍与杨建华设计; 研究过程由杨建华、路新卫及丁婷完成; 本论文写作由杨建华完成。
通讯作者: 韦莉萍, 510515, 广东省广州市, 南方医科大学中医药学院. caoweiy@yaho.com.cn
电话: 020-88289063
收稿日期: 2008-10-18 修回日期: 2009-03-05
接受日期: 2009-03-09 在线出版日期: 2009-03-28

Preparation of Metronidazole/ MMT antibacterial composite and *in vitro* release characteristics

Jian-Hua Yang, Xin-Wei Lu, Li-Ping Wei, Ting Ding

Jian-Hua Yang, Li-Ping Wei, Ting Ding, Department of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China
Xin-Wei Lu, School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China
Supported by: the Key Projects of Guangzhou Healthy Bureau, No. 2004Z3-E0171; and the Medical Scientific Research Program of Guangdong Provincial Healthy Bureau, No. A2004411

Correspondence to: Li-Ping Wei, Department of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. caoweiy@yaho.com.cn
Received: 2008-10-18 Revised: 2009-03-05
Accepted: 2009-03-09 Published online: 2009-03-28

Abstract

AIM: To prepare a Metronidazole/MMT antimicrobial composite and study its *in vitro* release characteristics.

METHODS: Metronidazole is intercalated into the interlayer of Na-MMT with ion-exchange. Metronidazole/MMT was analyzed by XRD, FTIR and TG, and its release characteristics was detected by *in vitro* release experiment.

RESULTS: The interlayer space of Metronidazole/MMT has increased to 1.3026 nm from 1.2345 nm, showing that Metronidazole has already been intercalated into the interlayer of

Na-MMT. *In vitro* experiment demonstrated that Metronidazole/MMT antimicrobial composite had a good characteristic of sustained-release.

CONCLUSION: Metronidazole/MMT antimicrobial composite with sustained-release property can be further developed into a sustained-release anti-infection drugs.

Key Words: Metronidazole; Antimicrobial composite; Sustained-release; Na-MMT

Yang JH, Lu XW, Wei LP, Ding T. Preparation of Metronidazole/MMT antibacterial composite and *in vitro* release characteristics. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(9): 914-917

摘要

目的: 研究甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物的制备及其体外释放特性。

方法: 以离子交换方式将甲硝唑插层到钠基蒙脱土的层间, 通过XRD、FTIR及TG对抗菌复合物的性能进行表征, 并通过体外释放试验检测缓释效果。

结果: 插层后, 钠基蒙脱土层间距由1.2345 nm增大到1.3026 nm, 说明甲硝唑已经插入钠基蒙脱土层间; 通过体外释放试验检测证实抗菌复合物具有良好的缓释效果。

结论: 甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物具有缓释作用, 可进一步开发成抗感染缓释药物。

关键词: 甲硝唑; 抗菌复合物; 缓释; 钠基蒙脱土

杨建华, 路新卫, 韦莉萍, 丁婷. 甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物的制备及体外缓释特征. *世界华人消化杂志* 2009; 17(9): 914-917
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/914.asp>

0 引言

蒙脱土(montmorillonite, MMT)又称“蒙脱石”, 属于2:1型层状硅铝酸盐, 具有独特的双八面体结构和层纹状组合, 由于其具有较大的比表面积, 在456-676 m²/g之间, 因此有较强的吸附性^[1]; 作

■同行评议者

唐文富, 副主任医师, 四川大学华西医院中西医结合科

为药用矿物始载于《本草纲目拾遗》^[2], 以蒙脱土为主要原料研制的黏膜保护和止泻剂如思密达等已广泛应用于临床且无毒副作用^[3]. 还可以通过超声、振荡、搅拌等方法^[4]将不同物质插入到蒙脱土的层间, 蒙脱土经其他物质插层处理后得到的蒙脱土复合物层间距加大, 比表面积进一步加大, 表面吸附能力加强, 因此适合作为抗菌药物的载体^[5-11].

甲硝唑(Metronidazole)属于硝基咪唑类, 在临床上被广泛应用于治疗各种厌氧菌感染的治疗, 其价格低廉, 疗效肯定, 也是治疗幽门螺杆菌(*H pylori*)感染的药物之一. 大量研究显示, 接近30%的消化性溃疡患者在使用甲硝唑治疗的过程中, 由于药物不良反应如恶心呕吐、味觉差和腹泻等消化道症状和服药次数多, 导致患者依从性差从而影响其临床应用^[12]. 有11.5%的患者提前终止治疗, 其中2/3患者因药物不良反应终止治疗^[13]. 因此, 进一步研制减少药物毒副作用、增加患者依从性的新药, 以提高疗效, 是根除*H pylori*治疗的重要研究方向. 本试验以离子交换法制备甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物(Metronidazole/MMT), 并进行体外缓释试验的初步研究, 为今后进一步研究提供理论基础.

1 材料和方法

1.1 材料 甲硝唑原料药由罗田宏源化学原料药有限公司提供(批号: 06112402); 钠基蒙脱土(Na-MMT)由浙江三鼎科技有限公司提供. 仪器: TSHZ-台式恒温水浴振荡器(上海跃进医疗器械厂), BioMate5型紫外分光光度计(Thermo公司), D/maxIII X衍射仪(日本理学公司), 傅立叶变换红外光谱仪(美国Perkin-Elmer公司), 热重分析仪(美国Perkin-Elmer公司).

1.2 方法

1.2.1 甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物的合成 精密称取一定量甲硝唑溶于50 mL去离子水中, 加入到一定量钠基蒙脱土溶液中, 调整溶液的pH值, 超声波振荡40 min后, 在100℃油浴恒温搅拌一定时间, 静置, 过滤, 洗涤, 真空干燥, 研磨并过200目筛, 即得甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物, 干燥保存.

1.2.2 结构表征及性能测试 用X射线仪测定样品的XRD谱, 测试条件为CuK α 辐射线, 电压40 KV, 扫描速度为3度/min, 步长为0.02度. 用傅立叶变换红外光谱仪进行测试, 扫描范围400-4000/cm, KBr压片. 用热重分析仪测热失重曲线, 测试条件为空气气氛, 升温速率为20℃/min, 气流量为

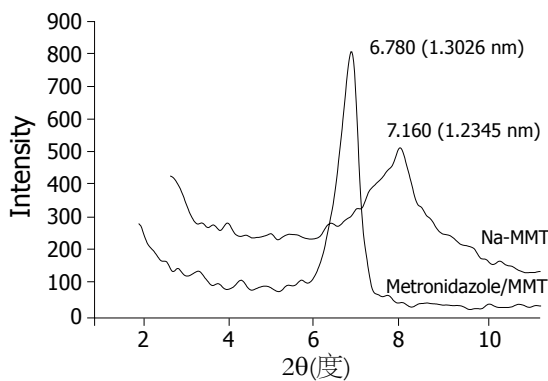


图1 钠基蒙脱土和甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物的XRD图谱.

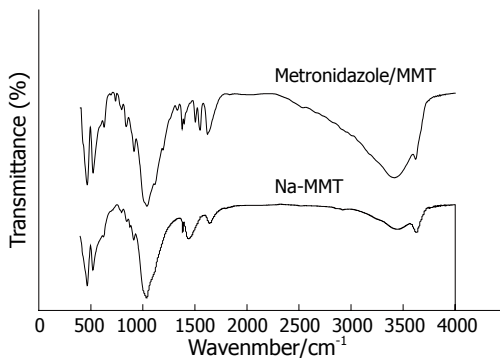


图2 钠基蒙脱土和甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物的FTIR图谱.

20 mL/min.

1.2.3 甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物的体外释放度实验 称取一定量甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物2份, 分别置于500 mL锥形瓶内, 以人工胃液和肠液^[14]为释放介质, 将锥形瓶放置于恒温水浴振荡器中, 转速100 r/min, 温度(37±0.5)℃, 进行体外缓释, 分别于0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、5.0、6.0 h取样5 mL, 经0.45 μm微孔过滤膜过滤, 并及时补充5 mL预热过的释放介质, 用紫外分光光度计测定吸收值, 计算其累积释放度, 并绘制累积释药量-时间曲线.

2 结果

2.1 XRD分析 钠基蒙脱土和甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物的XRD图谱如图1所示. 钠基蒙脱土的2θ角为7.160度, 层间距为1.2345 nm, 插层后的甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物的衍射峰与钠基蒙脱土的相比发生明显位移, 并向小角度偏移, 2θ角变为6.780度, 层间距增大到1.3026 nm. 说明部分甲硝唑已插层到钠基蒙脱土片层结构中.

2.2 FTIR分析 钠基蒙脱土和甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物的红外图谱如图2所示. 图中显示钠基蒙脱土和甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物的红外光谱

■ 研发前沿

甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物是否具有蒙脱土对黏膜保护性的特点, 及其动物体内释放试验效果如何, 还有待于进一步研究探讨.

■应用要点

甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物通过缓释作用减少服药次数和服药种类,提高患者的依从性,减少*H pylori*感染治疗失败率,具有广阔的开发前景和应用价值。

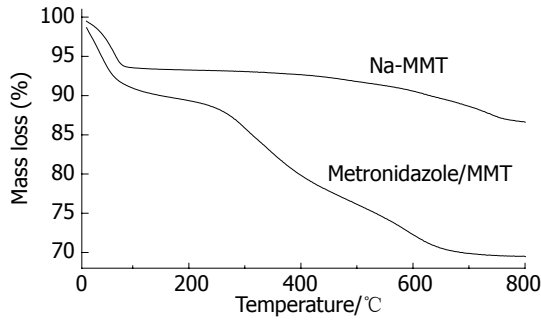


图3 钠基蒙脱土和甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物的TG曲线。

共同特征是在3620/cm处的Al-OH伸缩振动和1030-1050/cm范围内强的Si-O-Si的骨架振动吸收峰,在甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物的红外光谱中出现特征峰,即在1550/cm出现N=O伸缩振动,同时3420/cm和1640/cm处的-OH峰强度减弱,这是因为甲硝唑插层后层间的结合水被置换出来,水的含量减少,结合甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物的XRD图谱分析,表明甲硝唑已经入钠基蒙脱土的层间。

2.3 TG分析 从图3的钠基蒙脱土和甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物的热重分析曲线可以看出钠基蒙脱土在200°C以前失重较大,是由于钠基蒙脱土失去表面吸附水和层间的结合水所导致;在500-750°C也有明显的失重,这是由于蒙脱土硅酸盐晶体中的-OH在高温下脱去水而形成。甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物热失重过程可分为3个阶段:第1阶段在升温的初始阶段,温度为20-150°C,在此阶段蒙脱土表面的吸附水分和层间的结合水蒸发,引起甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物的失重,失重率约占其总重的7.2%;第2阶段是温度为230-340°C,此阶段是药物发生急剧失重的阶段,也是热分解的主要阶段,失重率约占其总重的11.3%;第3阶段是在500-750°C,同样是由于蒙脱土硅酸盐晶体中的-OH在高温下脱去而形成,失重率约占其总重的3.6%。甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物的热分解温度约为230°C,比甲硝唑的开始分解温度180°C提高50°C,表现出复合物的热稳定性显著提高。

2.4 体外释放度实验 由图4的缓释曲线可知,在人工胃液和肠液中甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物可释放出甲硝唑,并随着缓释时间的延长,其累积释放量逐渐增加,由此可知钠基蒙脱土可以作为一种缓释载体,他能使药物有效浓度长时间保持恒定。分别以人工胃液和人工肠液为溶出介质的体系中,在0-0.5 h其累积释放量分别达到

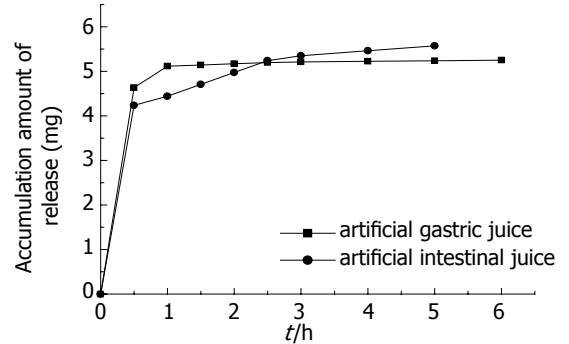


图4 甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物的缓释曲线。

4.7 mg/500 mL和4.3 mg/500 mL,这主要由吸附在钠基蒙脱土表面的甲硝唑释放所致,吸附量约占甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物的4%;0.5-6 h插层在钠基蒙脱土中甲硝唑均匀释放,其累积释放量分别达到5.3 mg/500 mL和5.7 mg/500 mL,释药量约占插层在钠基蒙脱土中甲硝唑的47%和55%,释放速度分别控制在8%/h和10%/h。随着时间的延长,甲硝唑在人工肠液中的溶出量明显高于其在人工胃液中的溶出量,说明pH值的变化对甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物的缓释作用有一定影响。

3 讨论

蒙脱土属矿物中药,对人、畜、植物无毒害和腐蚀作用^[3]。蒙脱土本身对胃肠道有多种作用,口服后紧密覆盖消化道表面,吸附黏蛋白,有加强修复和保护消化道黏膜的功能,并减轻药物对黏膜刺激产生的毒副作用,还能固定和清除多种病原体和毒素,防止各种炎症因子对胃黏膜的侵害,平衡正常胃肠道菌群的微生态,促进消化道局部免疫作用,具有局部止血作用^[15-16]。甲硝唑具有变态反应低、组织相容性等特点,但全身毒副作用较明显,其半衰期短,血药浓度波动大,服药次数多,导致患者依从性差,影响治疗。本试验所合成的甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物经XRD、FTIR及TG对其进行表征,证实甲硝唑已经进入钠基蒙脱土层间,其体外释放实验也说明药物浓度平稳可达临床要求,且持续时间较长。

通过体外缓释释放曲线可以看出,0-0.5 h,甲硝唑在人工肠液和人工胃液中释放速度较快,这可能与被吸附在钠基蒙脱土表面的甲硝唑因分子间作用力不强有关;0.5-6 h,不同释放介质中的甲硝唑累积释放量变化很慢,可能由于蒙脱土片层间的甲硝唑阳离子与蒙脱土结构负电

荷作用, 以及蒙脱土片层的阻隔作用抑制了药物的释放速度. 甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物中被钠基蒙脱土表面所吸附的甲硝唑在溶液中迅速达到一定浓度, 而通过离子交换方式进入蒙脱土层间的甲硝唑可缓慢释放出来, 使释放时间延长, 其整个释放过程有利于甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物迅速起效并保持有效浓度恒定, 从而使局部药物浓度提高.

前0.5 h内在肠液中甲硝唑的释放速度比在胃液中的释放速度慢, 可能由于甲硝唑在水溶液中呈碱性^[17], 与释放介质中的电荷相互作用, 因此在碱性的人工肠液中甲硝唑的释放速度比在酸性人工胃液慢; 而0.5-6 h之间, 人工肠液中甲硝唑的释放速度比在人工胃液慢的释放速度快, 甲硝唑为咪唑衍生物, 其结构中具有氨基氮原子可与H⁺结合质子化形成阳离子, 人工肠液为碱性, 其中阴离子带有的负电性大于强酸性的人工胃液, 其阴、阳离子之间的相互吸引, 使得质子化的甲硝唑更容易释放.

甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物具有缓释特性, 另外层间距进一步增加, 吸附细菌的能力增强^[18-19], 局部高浓度的药物可以有效的作用到被吸附的细菌上, 达到抗感染的目的, 从而可以减少抗生素的用量. 但是甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物是否具有蒙脱土对黏膜保护性的特点, 及其动物体内释放试验效果如何, 还有待于进一步研究探讨.

总之, 甲硝唑/蒙脱土抗菌复合物通过缓释作用减少服药次数和服药种类, 提高患者的依从性, 减少*H pylori*感染治疗失败率, 具有广阔的开发前景和应用价值.

4 参考文献

- 1 何宏平. 粘土矿物与金属离子作用研究. 第1版. 北京: 石油工业出版社, 2001: 2-40
- 2 翟永功, 次向明, 邹星, 郭丽丽. 药用蒙脱石粘土的矿物组成与化学成分分析. 中草药 2002; 33: 291-293
- 3 白慧东, 徐建国, 尚靖, 蒋玉凤. 膨润土的药用状况. 新

- 4 疆中医药 2006; 24: 75-77
- 4 邱玉超, 韦莉萍, 路新卫, 徐耿明, 施永德, 李玲, 钟导雄. 插层蒙脱土不同方法的比较. 第一军医大学分校学报 2004; 27: 100-102
- 5 Polubesova T, Chen Y, Navon R, Chefetz B. Interactions of hydrophobic fractions of dissolved organic matter with Fe(3+) - and Cu(2+)-montmorillonite. *Environ Sci Technol* 2008; 42: 4797-4803
- 6 Daković A, Matijasević S, Rottinghaus GE, Ledoux DR, Butkeraitis P, Sekulić Z. Aflatoxin B(1) adsorption by natural and copper modified montmorillonite. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2008; 66: 20-25
- 7 He H, Yang D, Yuan P, Shen W, Frost RL. A novel organoclay with antibacterial activity prepared from montmorillonite and Chlorhexidini Acetas. *J Colloid Interface Sci* 2006; 297: 235-243
- 8 Tong G, Yulong M, Peng G, Zirong X. Antibacterial effects of the Cu(II)-exchanged montmorillonite on *Escherichia coli* K88 and *Salmonella choleraesuis*. *Vet Microbiol* 2005; 105: 113-122
- 9 Ma YL, Guo T. [Preparation of Cu(2+)-loaded montmorillonite and its bactericidal mechanism against *Escherichia coli*] *Yaoxue Xuebao* 2007; 42: 318-322
- 10 Hu CH, Xu ZR, Xia MS. Antibacterial effect of Cu2+-exchanged montmorillonite on *Aeromonas hydrophila* and discussion on its mechanism. *Vet Microbiol* 2005; 109: 83-88
- 11 韦莉萍, 路新卫, 杨建华; 南方医科大学. 硝基咪唑类药物纳米蒙脱土缓释剂及其制备方法. 中国专利 200810219931.5. 2008-12-15
- 12 王非, 李建成, 张玉江. 甲硝唑的不良反应. 中国误诊学杂志 2008; 8: 1757
- 13 Broutet N, Tchamgoué S, Pereira E, Lamouliatte H, Salamon R, Mégraud F. Risk factors for failure of *Helicobacter pylori* therapy--results of an individual data analysis of 2751 patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 99-109
- 14 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 第1版. 北京: 化学工业出版社, 2005: 附录72
- 15 邹爱红, 王厚亮, 刘继富. 天然消化道粘膜保护剂思密达的成分及物相分析. 资源开发与市场 1999; 15: 202
- 16 陈况, 陈淑洁, 姒健敏, 孙柯科, 王良静. 不同产地的天然蒙脱石对大鼠慢性萎缩性胃炎治疗作用的比较. 中国新药杂志 2007; 16: 296-299
- 17 常威, 徐丹红, 王春芳. 蒙脱石对甲硝唑吸收和疗效的影响. 兰州大学学报(医学版) 2005; 31: 54
- 18 韦莉萍, 钟导雄, 施永德, 徐耿明, 邱玉超, 李玲, 路新卫, 何肖娟. 纳米蒙脱石对金黄色葡萄球菌的吸附作用. 第一军医大学分校学报 2004; 27: 98-99
- 19 路新卫, 韦莉萍, 朱全红, 杨建华. 抗菌硅橡胶导尿管材料的合成及其性能. 中国组织工程研究与临床康复 2008; 12: 8091-8094

■同行评价

本研究选题较好, 设计科学, 具有较好的学术价值.

编辑 李军亮 电编 何基才

乳铁蛋白联合标准疗法根除幽门螺杆菌的荟萃分析

邹健, 董洁, 于晓峰

■背景资料

幽门螺杆菌 (*H pylori*) 感染是一个十分普遍的公共卫生问题, 但是其耐药现象的发生率逐年升高, 现有根除方案疗效逐渐下降。临床上迫切需要研发新的抗菌药物。近年来, 许多研究发现乳铁蛋白 (lactoferrin, LF) 具有抗 *H pylori* 的作用, 而且他使用安全、不良反应小、价格便宜, 具有广泛的应用前景。

邹健, 董洁, 于晓峰, 复旦大学附属华东医院消化科 上海市 200040

作者贡献分布: 此课题由邹健设计; 研究过程由邹健、董洁及于晓峰操作完成; 数据分析由邹健与董洁完成; 论文写作由邹健完成。

通讯作者: 邹健, 200040, 上海市延安西路221号, 复旦大学附属华东医院消化科, apollozou@hotmail.com

电话: 021-62483180

收稿日期: 2008-11-03 修回日期: 2008-11-30

接受日期: 2008-12-08 在线出版日期: 2009-03-28

Meta-analysis on the efficacy of lactoferrin supplementation combined with standard treatment during *Helicobacter pylori* eradication therapy

Jian Zou, Jie Dong, Xiao-Feng Yu

Jian Zou, Jie Dong, Xiao-Feng Yu, Department of Gastroenterology, Huadong Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China

Correspondence to: Dr. Jian Zou, Department of Gastroenterology, Huadong Hospital, Fudan University, 221 Yan'an Western Road, Shanghai 200040, China. apollozou@hotmail.com

Received: 2008-11-03 Revised: 2008-11-30

Accepted: 2008-12-08 Published online: 2009-03-28

Abstract

AIM: To systematically evaluate whether adding lactoferrin to *H pylori* eradication regimens could improve eradication rates and reduce side effects during anti-*H pylori* treatment.

METHODS: Eligible articles were identified by searching electronic databases. We included all randomized trials comparing lactoferrin supplementation to placebo or no treatment during anti-*H pylori* regimens. Statistical analysis was performed with Review Manager 5.0.10. Subanalysis/Sensitivity analysis was also performed.

RESULTS: We identified 9 randomized trials ($n = 1343$). Pooled *H pylori* eradication rates for patients with and without lactoferrin were 86.57% (95% CI: 83.99%-89.15%) and 74.44% (95% CI: 71.14%-77.74%) by intention-to-treat analysis, respectively, and the odds ratio (OR) was 2.26 (95%

CI: 1.70-3.00); the occurrence of total side effects, especially nausea, for groups with or without lactoferrin were 9.05% (95% CI: 6.83%-11.27%) and 16.28% (95% CI: 13.43%-19.13%), respectively; the summary OR was 0.15 (95% CI: 0.04-0.54).

CONCLUSION: Our review suggests that supplementation with lactoferrin could be effective in increasing eradication rates of anti-*H pylori* therapy, and could be considered helpful for patients with eradication failure.

Key Words: Lactoferrin; *Helicobacter pylori*; Eradication; Meta-analysis

Zou J, Dong J, Yu XF. Meta-analysis on the efficacy of lactoferrin supplementation combined with standard treatment during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(9): 918-926

摘要

目的: 系统性评价乳铁蛋白联合标准疗法对 *H pylori* 根除率的影响, 及根除过程中的不良反应发生率。

方法: 从常用电子数据库检索标准三联或四联疗法联合与未联合乳铁蛋白根除 *H pylori* 的随机临床试验, 荟萃分析各项研究的根除率和不良反应发生率的合并OR值; 进行亚组分析和敏感性分析; 以漏斗图检测发表偏倚。

结果: 共9项随机临床试验(1343例)符合纳入标准。标准疗法联合与未联合乳铁蛋白按意向治疗(ITT)分析的 *H pylori* 的根除率分别为86.57%(95% CI: 83.99%-89.15%)和74.44%(95% CI: 71.14%-77.74%), 合并OR值为2.26(95% CI: 1.70-3.00); 总不良反应发生率分别为9.05%(95% CI: 6.83%-11.27%)和16.28%(95% CI: 13.43%-19.13%), 合并OR值0.15(95% CI: 0.04-0.54)。

结论: 联合乳铁蛋白可有效提高标准疗法的 *H pylori* 根除率, 降低根除过程中的不良反应发生率。

关键词: 乳铁蛋白; 幽门螺杆菌; Meta分析; 根除率;

■同行评议者

刘改芳, 主任医师, 河北医科大学第三医院消化内科

不良反应

邹健, 董洁, 于晓峰. 乳铁蛋白联合标准疗法根除幽门螺杆菌的荟萃分析. 世界华人消化杂志. 2009; 17(9): 918-926
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/918.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)感染是一个十分普遍的公共卫生问题. 发展中国家感染率高达70%-90%, 发达国家约为25%-50%^[1]. 根除*H pylori*治疗在处理消化性溃疡、萎缩性胃炎、胃癌、胃黏膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤以及其他相关疾病中被推荐^[2-4]. 最新的Maastricht共识推荐的*H pylori*根除治疗方案为质子泵抑制剂或铋剂联合克拉霉素和阿莫西林或甲硝唑^[5], 可获得75%-98%的根除率. 虽然大多数的一线方案的根除率可以达到80%^[6-7], 仍有20%的患者治疗失败, 在耐药菌株流行的地区根除失败率还要升高^[8]. 二线根除方案一般由质子泵抑制剂和铋剂联合四环素和甲硝唑组成, 但是其费用高、不良反应大、病人依从性差. 近年来, 许多研究发现乳铁蛋白(lactoferrin, LF)具有抗*H pylori*的作用, 而且他使用安全、不良反应小、价格便宜^[9-11]. 因此, 本研究严格纳入相关随机对照临床试验进行荟萃分析, 系统性评价LF联合标准三联或四联疗法能否提高*H pylori*根除率, 减少根除过程中的不良反应.

1 材料和方法

1.1 材料 通过英文检索词*Helicobacter pylori*, *H pylori*, Lactoferrin以及中文检索词乳铁蛋白, 幽门螺杆菌检索PubMed(1966-01/2008-10), EMBASE(1980-01/2008-10), Cochrane Controlled Trials Register(Issue 3, 2008), Science Citation Index(1945-01/2008-10), 中国期刊全文数据库(1994-01/2008-10)和万方数据库(1981-01/2008-10), 对检索到文献的参考文献进行再检索, 以查全相关文献. 同时对一些主要国际性消化会议(如美国消化疾病周、亚太消化疾病周、世界胃肠病学会议、欧洲*H pylori*研究组Maastricht会议等)的会议摘要进行手工检索, 并向医药公司咨询是否有尚发表的随机对照试验. 共检索到59篇相关文献. 根据出版类型剔除11篇综述、5篇评论、1篇述评、2篇会议报道, 共40篇.

1.2 方法

1.2.1 文献纳入: 纳入标准: 随机临床试验; 研究对象包括从未接受过*H pylori*根除治疗和初治失

败者; 对照组接受标准三联或四联疗法治疗, 治疗组接受LF联合三联或四联疗法治疗; *H pylori*根除率和(或)不良反应数据齐全; 根除治疗至少4 wk后以活检组织学或¹³C呼气试验证实*H pylori*感染情况; 文献不受语种限制. 所有文献的纳入由两名研究者独立进行, 存在意见分歧时, 由第三名研究者参与决定纳入与否. 纳入文献的质量评价采用Jadad评分标准(0-7分), 评分标准基于以下3点: 随机化、双盲和失访的描述. 由两名研究者独立评分, 低于3分者为低质量试验, 予以剔除. 多次发表的试验仅提取最近发表的数据.

1.2.2 数据提取: 从纳入文献中提取关键数据, 包括*H pylori*根除率和总不良反应发生率, 以及进入试验患者例数、年龄、国家、LF的剂量和用药时间、根除治疗方案、腹泻、上腹痛、恶心发生率、*H pylori*检测方法等.

统计学处理 将数据输入Cochrane协作网提供的RevMan5.0.10软件进行分析. 以卡方检验评估各研究间的异质性, 临界值设为0.1. 不存在异质性时, 采用固定效应模型(Mantel-Haenszel法); 存在异质性时, 采用随机效应模型(DerSimonian-Laird法). 分别计算*H pylori*根除治疗按意向治疗(ITT)分析和按方案(PP)分析的根除率, 并根据患者根除次数、抗生素种类和LF用药天数分亚组进行分析. 为保证结果的稳定性行敏感性分析. 以漏斗图检测发表偏倚, 并作Egger线性回归分析证明漏斗图结果.

2 结果

2.1 纳入文献 从40篇文献中剔除13篇研究对象为动物的文献后, 通过阅读文献标题和摘要进一步剔除9篇非临床试验和3篇无关文献; 对剩余的15篇文献详细阅读全文. 其中4篇未联合三联或四联疗法, 2篇无根除率和不良反应信息, 结果共9篇文献^[12-20]入选. 值得强调的是, 其中5篇来自同一研究机构-意大利Mario教授领导的课题组. 根据干预措施和受试者进入试验的时间判断为非重复发表, 故同时纳入. 所有纳入文献的基本特征见表1.

2.2 *H pylori*根除率 9篇文献对*H pylori*根除率进行了描述, 其中5项研究报道LF联合疗法能显著改善根除率. 4项研究表明根除率无明显改善. 按ITT分析, 数据合并后治疗组670例患者中580例*H pylori*获根除, 根除率为86.57%(95% CI = 83.99%-89.15%); 对照组501例患者中673例获根除, 根除率为74.44%(95% CI = 71.14%-77.74%),

■ 研发前沿

多项研究表明, LF可以提高*H pylori*的根除率, 但是亦有结果相反的报道. 本研究对LF联合标准疗法根除*H pylori*的随机临床试验进行了荟萃分析, 确定联合方案的有效性, 为临床应用奠定基础.

■ 相关报道

最新的Maastricht共识推荐的 *H pylori* 根除治疗方案为质子泵抑制剂或铋剂联合克拉霉素和阿莫西林或甲硝唑, 可获得75%-98%的根除率。

表 1 纳入文献的基本特征

作者	年份	形式	n (blf/con)	疾病	诊断 方法	根除 次数	LF方案	根除率 (%)	不良反应 (%)	标准 方案	疗程 (d)	根除率 (%)	不良反应 (%)	Q
de Bortoli <i>et al</i> ^[12]	2007	JA	206 (105/101)	-	histology+RUT /HpSA+UBT UBT(8 wk later)	1	Lf (200 mg bid) E (20 mg bid) C (500 mg bid) A (1 g bid) Pb (5 g bid)	ITT 88.6 (93/105) PP 92.1 (93/101)	9.5	E (20 mg bid) C (500 mg bid) A (1 g bid)	7	ITT 72.3 (73/101) PP 76 (73/96)	40.6 (41/101)	4
Zullo <i>et al</i> ^[13]	2007	JA	144 (72/72)	PUD (8/144)	histology+RUT UBT(4-6 wk later)	1	Lf (200 mg bid) R (20 mg bid) C (500 mg bid) Ti (500 mg bid)	ITT 72.2 (52/72) PP 76.5 (52/68)	10.3	R (20 mg bid) L (500 mg qd) A (1 g bid)	7	ITT 68.1 (49/72) PP 69.1 (49/71)	11.3 (8/71)	5
Tursi <i>et al</i> ^[14]	2007	JA	70 (35/35)	PUD (29/70)	histology+RUT histology+RUT /UBT(4 wk later)	2	Lf (200 mg bid) RBC (400 mg bid) E (40 mg qd) A (1 g bid) Ti (500 mg bid)	ITT 94.3 (33/35) PP 97.1 (33/34)	17.6	RBC (400 mg bid) E (40 mg qd) A (1 g bid) Ti (500 mg bid)	7	ITT 88.6 (31/35) PP 91.2 (31/34)	29.4 (10/34)	4
Di Mario <i>et al</i> ^[15]	2006	JA	402 (134/ 132/136)	PUD (102/ 402)	histology+RUT /histology+HpSA UBT/HpSA (8-10 wk later)	1	Lf (200 mg bid) E (20 mg bid) C (500 mg bid) Ti (500 mg bid)	ITT 89.5 (120/134) or 73.4 (97/132) PP 93.0 (120/129) or 76.9 (97/126)	6.7 or 9	E (20 mg bid) C (500 mg bid) Ti (500 mg bid)	7 or 14	ITT 77.2 (105/136) PP 78.3 (105/134)	9.5 (13/136)	5
Zullo <i>et al</i> ^[16]	2005	JA	133 (65/68)	NUD (133/133)	histology+RUT UBT(4-6 wk later)	1	Lf (200 mg bid) E (20 mg bid) C (500 mg bid) A (1 g bid)	ITT 76.9 (50/65) PP 78.1 (50/64)	9.2	E (20 mg bid) C (500 mg bid) A (1 g bid)	7	ITT 77.9 (53/68) PP 80.3 (53/66)	10.3 (7/68)	5
Di Mario <i>et al</i> ^[17]	2004 ^M	Ab	369 (120/ 121/128)	-	UBT/HpSA (8 wk later)	1	Lf (200 mg bid) E (20 mg bid) C (500 mg bid) Ti (500 mg bid)	ITT 92.0 (110/120) or 72.0 (88/121)	7.5 or 9.9	E (20 mg bid) C (500 mg bid) Ti (500 mg bid)	7 or 14	ITT 76.0 (98/128) PP 76.9 (20/26) or 77.3(17/22)	10 (13/128)	3
Di Mario <i>et al</i> ^[18]	2004 ^N	Ab	119 (64/55)	-	UBT/HpSA (8 wk later)	2	Lf (200 mg bid) E (20 mg bid) A (1 g bid) Ti (500 mg bid)	ITT 80.0 (51/64) PP 80.0 (51/64)	6.3	E (20 mg bid) A (1 g bid) Ti (500 mg bid) B (120 mg qd)	14	ITT 64.0 (35/55) PP 64.8 (35/54)	9.1 (5/55)	4
Di Mario <i>et al</i> ^[19]	2003 ^M	JA	74 (24/ 26/24)	PUD (17/74)	histology+UBT /HpSA UBT/HpSA (8 wk later)	1	Lf (200 mg bid) R (20 mg bid) C (500 mg bid) Ti (500 mg bid)	ITT 100 (24/24) PP 100 (24/24)	-	R (20 mg bid) C (500 mg bid) Ti (500 mg bid)	7 or 10	ITT 76.9 (20/26) or 70.8(17/24) PP 76.9 (20/26) or 77.3(17/22)	-	4
Di Mario <i>et al</i> ^[20]	2003 ^N	JA	150 (51/ 52/47)	PUD (26/150)	histology+UBT /HpSA UBT /HpSA (8-10 wk later)	1	Lf (200 mg bid) R (20 mg bid) C (500 mg bid) Ti (500 mg bid)	ITT 92.2 (47/51) PP 95.9 (47/49)	13.7 (7/51)	R (20 mg bid) C (500 mg bid) Ti (500 mg bid)	7 or 10	ITT 71.2 (37/52) or 70.2(33/47) PP 72.5 (37/51) or 75.0(33/44)	15.4 (8/52)	5

Ab: 摘要; JA: 全文; C: 克拉霉素; A: 阿莫西林; R: 雷贝拉唑; Ti: 替硝唑; E: 埃索美拉唑; RBC: 枸橼酸铋雷尼替丁; B: 铋剂; L: 左氧氟沙星; Pb: 益生菌; UBT: 13C-呼气试验; RUT: 快速尿素酶试验; HpSA: 幽门螺杆菌粪便抗原; PUD: 消化性溃疡病; NUD, 非溃疡性疾病; Q: Jadad评分; ^{M, N}: 同一作者在同一年先后发表的2篇文章。

表 2 治疗组与对照组IT根除率比较

Study or subgroup	Lactoferrin		Control		Weight(%)	Odds Ratio M-H (Fixed) 95% CI	Odds Ratio M-H (Fixed) 95% CI			
	Events	Total	Events	Total						
Bortlli 2007	93	105	73	101	13.0	2.97[1.41, 6.25]				
Mario 2003 ^M	24	24	20	26	0.6	15.54[0.82, 292.61]				
Mario 2003 ^N	47	51	37	52	4.4	4.76[1.46, 15.57]				
Mario 2004 ^M	110	120	98	128	12.1	3.37[1.57, 7.24]				
Mario 2004 ^N	51	64	35	55	11.7	2.24[0.99, 5.09]				
Mario 2006	120	134	105	136	16.6	2.53[1.28, 5.01]				
Tursi 2007	33	35	31	35	2.7	2.13[0.36, 12.46]				
Zullo 2005	50	65	53	68	18.2	0.94[0.42, 2.13]				
Zullo 2007	52	72	49	72	20.8	1.22[0.60, 2.49]				
Total(95% CI)		670		673	100.0	2.26[1.70, 3.00]				
Total events:	580		501							
Heterogeneity: $\chi^2 = 12.14$, $df = 8$ ($P = 0.15$), $I^2 = 34\%$										
Test for overall effect: $Z = 5.62$ ($P < 0.00001$)										
						0.01	0.1	1	10	100
						Favours control		Favours experimental		

■创新盘点

本研究发现LF联合疗法比标准方案具有更高的根除率, 并可以降低根除过程中的不良反应. 对于初次根除失败的人群, LF联合疗法同样具有作用.

^{M,N}: 同一作者在同一年先后发表的2篇文章.

表 3 治疗组与对照组不良反应发生率比较

Study or subgroup	Lactoferrin		Control		Weight(%)	Odds Ratio M-H (Random) 95% CI	Odds Ratio M-H (Random) 95% CI			
	Events	Total	Events	Total						
Bortlli 2007	10	105	41	101	16.4	0.15[0.07, 0.33]				
Mario 2003 ^N	7	51	8	52	11.7	0.88[0.29, 2.62]				
Mario 2004 ^M	9	120	13	128	14.4	0.72[0.29, 1.74]				
Mario 2004 ^N	4	64	5	55	8.9	0.67[0.17, 2.62]				
Mario 2006	9	134	13	136	14.5	0.68[0.28, 1.65]				
Tursi 2007	6	34	10	34	11.1	0.51[0.16, 1.62]				
Zullo 2005	6	65	7	68	11.1	0.89[0.28, 2.79]				
Zullo 2007	7	68	8	71	11.9	0.90[0.31, 2.64]				
Total(95% CI)		641		645	100.0	0.57[0.35, 0.94]				
Total events:	58		105							
Heterogeneity: $\tau^2 = 0.25$; $\chi^2 = 13.52$, $df = 7$ ($P = 0.06$), $I^2 = 48\%$										
Test for overall effect: $Z = 2.20$ ($P = 0.03$)										
						0.01	0.1	1	10	100
						Favours control		Favours experimental		

^{M,N}: 同一作者在同一年先后发表的2篇文章.

合并OR值为2.26(95% CI 1.70-3.00, 表2). 按PP分析, 治疗组和对照组的*H pylori*根除率分别为88.18%(95% CI 85.44%-90.92%)和75.75%(95% CI 72.11%-79.39%), 合并OR值为2.50(95% CI 1.48-4.24).

2.3 不良反应发生率 8篇文献报道了总不良反应发生率, 其中2项研究表明LF联合疗法能降低不良反应发生率. 数据合并后, 治

疗组和对照组的总不良反应发生率分别为9.05%(95% CI 6.83%-11.27%)和16.28%(95% CI 13.43%-19.13%), 合并OR值为0.57(95% CI 0.35-0.94, 表3). 分别对特定不良反应症状进行分析, 结果显示治疗组恶心的发生率降低(2.14% vs 12.50%), OR值为0.15(95% CI 0.04-0.54, 表4). 而腹泻、味觉障碍和上腹痛的发生率在治疗组和对照组之间无差异(OR: 0.31 vs 0.50 vs 0.47;

■应用要点

乳铁蛋白是一种糖蛋白,在多种组织、体液以及中性粒细胞中有表达。他是一种具有多种生物学功能的蛋白质,参与铁的转运,还具有抗微生物、抗氧化、抗癌、免疫调节等功能。

表 4 治疗组与对照组恶心发生率比较

Study or subgroup	Lactoferrin		Control		Weight(%)	Odds Ratio M-H (Fixed) 95% CI	Odds Ratio M-H (Fixed) 95% CI
	Events	Total	Events	Total			
Bortlli 2007	2	105	15	101	88.5	0.11[0.02, 0.50]	
Tursi 2007	1	35	2	35	11.5	0.49[0.04, 5.61]	
Total(95% CI)		140		136	100.0	0.15[0.04, 0.54]	
Total events:	3		17				
Heterogeneity: $\chi^2 = 1.02$, $df = 1$ ($P = 0.31$), $I^2 = 2\%$							
Test for overall effect: $Z = 2.94$ ($P = 0.003$)							
						0.01	
						0.1	
						1	
						10	
						100	
						Favours control	
						Favours experimental	

表 5 治疗组与对照组不同抗生素亚组根除率比较

Study or subgroup	Lactoferrin		Control		Weight(%)	Odds Ratio M-H (Fixed) 95% CI	Odds Ratio M-H (Fixed) 95% CI	
	Events	Total	Events	Total				
9.11 Eradication rate-C+A								
Bortlli 2007	93	105	73	101	13.0	2.97[1.41, 6.25]		
Zullo 2005	50	65	53	68	18.2	0.94[0.42, 2.13]		
Subtotal (95% CI)		170		169	31.2	1.79[1.05, 3.05]		
Total events:	143		126					
Heterogeneity: $\chi^2 = 4.17$, $df = 1$ ($P = 0.04$), $I^2 = 76\%$								
Test for overall effect: $Z = 2.13$ ($P = 0.03$)								
9.12 Eradication rate-C+Ti								
Mario 2003 ^M	24	24	20	26	0.6	15.54[0.82, 292.61]		
Mario 2003 ^N	47	51	37	52	4.4	4.76[1.46, 15.57]		
Mario 2004 ^M	110	120	98	128	12.1	3.37[1.57, 7.24]		
Mario 2006	120	134	105	136	16.6	2.53[1.28, 5.01]		
Zullo 2007	52	72	49	72	20.8	1.22[0.60, 2.49]		
Subtotal (95% CI)		401		414	54.4	2.54[1.74, 3.71]		
Total events:	353		309					
Heterogeneity: $\chi^2 = 7.10$, $df = 4$ ($P = 0.13$), $I^2 = 44\%$								
Test for overall effect: $Z = 4.83$ ($P < 0.00001$)								
9.13 Eradication rate-A+Ti								
Mario 2004 ^N	51	64	35	55	11.7	2.24[0.99, 5.09]		
Tursi 2007	33	35	31	35	2.7	2.13[0.36, 12.46]		
Subtotal (95% CI)		99		90	14.4	2.22[1.06, 4.67]		
Total events:	84		66					
Heterogeneity: $\chi^2 = 0.00$, $df = 1$ ($P = 0.96$), $I^2 = 0\%$								
Test for overall effect: $Z = 2.10$ ($P = 0.04$)								
Total(95% CI)		670		673	100.0	2.26[1.70, 3.00]		
Total events:	580		501					
Heterogeneity: $\chi^2 = 12.14$, $df = 8$ ($P = 0.15$), $I^2 = 34\%$								
Test for overall effect: $Z = 5.62$ ($P < 0.00001$)								
Test for subgroup differences: Not applicable								
						0.01		
						0.1		
						1		
						10		
						100		
						Favours control		
						Favours experimental		

^{M, N}: 同一作者在同一年先后发表的2篇文章.

表 6 治疗组与对照组不同疗程亚组根除率比较

Study or subgroup	Lactoferrin		Control		Weight(%)	Odds Ratio M-H (Fixed) 95% CI	Odds Ratio M-H (Fixed) 95% CI
	Events	Total	Events	Total			
8.11 Eradication rate-7 days							
Bortlli 2007	93	105	73	101	10.2	2.97[1.41, 6.25]	
Mario 2003 ^M	24	24	20	26	0.5	15.54[0.82, 292.61]	
Mario 2003 ^N	47	51	37	52	3.5	4.76[1.46, 15.57]	
Mario 2004 ^M	110	120	98	128	9.5	3.37[1.57, 7.24]	
Mario 2006	120	134	105	136	13.1	2.53[1.28, 5.01]	
Tursi 2007	33	35	31	35	2.1	2.13[0.36, 12.46]	
Zullo 2005	50	65	53	68	14.4	0.94[0.42, 2.13]	
Zullo 2007	52	72	49	72	16.4	1.22[0.60, 2.49]	
Subtotal (95% CI)	606		618		69.7	2.26[1.67, 3.06]	
Total events:	529		466				
Heterogeneity: $\chi^2 = 12.14$, $df = 7$ ($P = 0.10$), $I^2 = 42\%$							
Test for overall effect: $Z = 5.27$ ($P < 0.00001$)							
8.12 Eradication rate-7+7 days							
Mario 2004 ^M	110	120	88	121	8.8	4.13[1.93, 8.83]	
Mario 2006	120	134	97	132	12.3	3.09[1.57, 6.07]	
Subtotal (95% CI)	254		253		21.1	2.54[2.13, 5.83]	
Total events:	230		185				
Heterogeneity: $\chi^2 = 0.31$, $df = 1$ ($P = 0.58$), $I^2 = 0\%$							
Test for overall effect: $Z = 4.90$ ($P < 0.00001$)							
8.13 Eradication rate-14 days							
Mario 2004 ^M	51	64	35	55	9.2	2.24[0.99, 5.09]	
Subtotal (95% CI)	64		55		9.2	2.24[0.99, 5.09]	
Total events:	51		35				
Heterogeneity: Not applicable							
Test for overall effect: $Z = 1.93$ ($P = 0.05$)							
Total(95% CI)	924		926		100.0	2.53[1.97, 3.23]	
Total events:	810		686				
Heterogeneity: $\chi^2 = 14.97$, $df = 10$ ($P = 0.13$), $I^2 = 33\%$							
Test for overall effect: $Z = 7.35$ ($P < 0.00001$)							
Test for subgroup differences: Not applicable							

■名词解释

LF是一种分子质量为70-80 kDa的糖蛋白, 在多种组织如: 乳腺、外分泌腺、黏膜表面、生殖腺中大量表达, 存在于乳汁、眼泪、唾液和其他体液以及血浆、中性粒细胞中。胃黏膜和胃液中亦存在LF。LF可以通过结合铁离子, 竞争性夺取*H pylori*生长所需的铁; 阻止*H pylori*在胃内定植, 减少细菌量等机制发挥其抗*H pylori*的作用。

^{M, N}: 同一作者在同一年先后发表的2篇文章。

95% CI: 0.07-1.47 vs 0.21-1.20 vs 0.17-1.31).
 2.4 亚组分析和敏感性分析 纳入资料根据抗生素选择、LF使用时间和受试者根除次数进行亚组分析。在抗生素选择组, C+A亚组、C+Ti亚组和A+Ti亚组与对照组相比差异均具有显著性, 合并OR值为1.79(95% CI = 1.05-3.05), 2.54(95% CI = 1.74-3.71)和2.22(95% CI = 1.70-3.00)(表5)。在LF使用时间组, 7-day亚组和7+7-day亚组与对照组相比差异具有显著性, 合并OR值为2.26(95% CI 1.67-3.06)和3.52(95% CI 2.13-5.83,

表6)。在受试者根除次数组中, 初次根除亚组和多次根除亚组与对照组相比差异均具有显著性, 合并OR值为2.27(95% CI 1.67-3.08)和2.22(95% CI 1.06-4.67, 表7)。敏感性分析显示, 排除低质量文献后, 治疗组与对照组之间的*H pylori*根除率依然有显著差异, 合并OR值为2.11(95% CI 1.55-2.86); 排除一项联用益生菌的研究后, 根除率仍无明显改变(OR = 2.15, 95% CI 1.58-2.93)。
 2.5 发表偏倚 漏斗图肉眼观察有轻度不对称

■同行评价

本文进行了一个很好的荟萃分析, 结果对临床 *H pylori* 的治疗提供了一种新的方法.

表 7 治疗组与对照组不同根除次数亚组根除率比较

Study or subgroup	Lactoferrin		Control		Weight(%)	Odds Ratio		Odds Ratio	
	Events	Total	Events	Total		M-H (Fixed)	95% CI	M-H (Fixed)	95% CI
10.11 Eradication rate—first									
Bortlli 2007	93	105	73	101	13.0	2.97	[1.41, 6.25]		
Mario 2003 ^M	24	24	20	26	0.6	15.54	[0.82, 292.61]		
Mario 2003 ^N	47	51	37	52	4.4	4.76	[1.46, 15.57]		
Mario 2004 ^M	110	120	98	128	12.1	3.37	[1.57, 7.24]		
Mario 2006	120	134	105	136	16.6	2.53	[1.28, 5.01]		
Zullo 2005	50	65	53	68	18.2	0.94	[0.42, 2.13]		
Zullo 2007	52	72	49	72	20.8	1.22	[0.60, 2.49]		
Subtotal (95% CI)	571		583		85.6	2.27	[1.67, 3.08]		
Total events:	496		435						
Heterogeneity: $\chi^2 = 12.14$, $df = 6$ ($P = 0.06$), $I^2 = 51\%$									
Test for overall effect: $Z = 5.21$ ($P < 0.00001$)									
10.12 Eradication rate—rescue									
Mario 2004 ^N	51	64	35	55	11.7	2.24	[0.99, 5.09]		
Mario 2006	33	35	31	35	2.7	2.13	[0.36, 12.46]		
Subtotal (95% CI)	99		90		14.4	2.22	[1.06, 4.67]		
Total events:	84		66						
Heterogeneity: $\chi^2 = 0.00$, $df = 1$ ($P = 0.96$), $I^2 = 0\%$									
Test for overall effect: $Z = 2.10$ ($P = 0.04$)									
Total(95% CI)	670		673		100.0	2.26	[1.70, 3.00]		
Total events:	580		501						
Heterogeneity: $\chi^2 = 12.14$, $df = 8$ ($P = 0.15$), $I^2 = 34\%$									
Test for overall effect: $Z = 5.62$ ($P < 0.00001$)									
Test for subgroup differences: Not applicable									

^{M, N}: 同一作者在同一年先后发表的2篇文章.

(图1), 但Egger线性回归分析显示无显著发表偏倚($P = 0.980$).

3 讨论

*H pylori*是一种特异性定植于胃黏膜的微生物, 在世界范围内, 其感染率超过50%, 对于消化性溃疡、MALT淋巴瘤、萎缩性胃炎等患者须行 *H pylori*根除治疗. 但是, 目前标准疗法的根除率逐年下降, 有超过20%的患者面临治疗失败的问题^[21]. 如何改良 *H pylori* 的治疗方案, 提高根除率, 成为临床医生面临的一个重要课题. LF是一种分子质量为70-80 kDa的糖蛋白, 在多种组织如: 乳腺、外分泌腺、黏膜表面、生殖腺中大量表达, 存在于乳汁、眼泪、唾液和其他体液以及血浆、中性粒细胞中. 胃黏膜和胃液中亦存在LF. LF是一种具有多种生物学功能的蛋白质, 他不

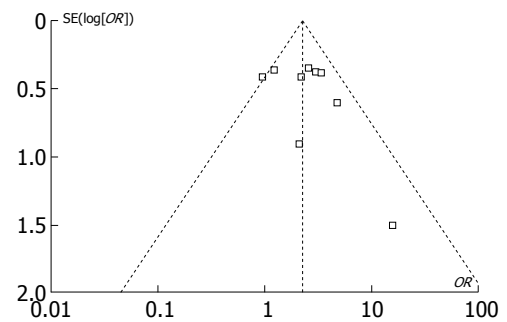


图 1 荟萃分析入选文献漏斗图.

仅参与铁的转运, 而且还具有抗微生物、抗氧化、抗癌、免疫调节等功能^[22-24]. LF可以通过结合铁离子, 竞争性夺取 *H pylori* 生长所需的铁; 阻止 *H pylori* 在胃内定植, 减少细菌量等机制发挥其抗 *H pylori* 的作用. 近年研究表明, LF可以提高 *H pylori* 的根除率^[15,17], 但是亦有结果相反的

报道^[13,16]. 鉴于目前各研究结论不一, 本文对LF联合标准疗法根除*H pylori*的随机临床试验进行了荟萃分析, 结果显示无论是按ITT分析, 还是按PP分析, LF联合标准疗法均具有更高的根除率(86.57% vs 74.44%, $P<0.01$), 说明LF联合标准疗法能提高*H pylori*根除率. 对于初次根除失败的人群, LF同样具有作用.

在根除治疗过程中, 常会发生腹泻、恶心、呕吐、中上腹痛等抗生素相关不良反应, 在四联疗法中发生率尤其升高, 这些不良反应常常会造成治疗的中断. 而LF具有安全性高、不良反应小的特点, 含有LF的治疗方案在根除*H pylori*过程中, 不良反应发生率也有所降低, 尤其是恶心的发生率降低尤为明显. 说明LF联合疗法可以减少根除过程中的不良反应. 本荟萃分析还发现, 克拉霉素加替硝唑的抗生素组合具有最高的根除率, 考虑到LF可以结合并破坏细菌的细胞膜^[25-26], 这提示LF可能与克拉霉素和替硝唑具有更好的协同杀菌作用.

一些方法学上的缺陷可能会影响本荟萃分析的有效性. 一方面, 大多数临床实验由Mario和Zullo教授两个研究团队完成; 另一方面, 所纳入研究存在地域差异, 所有研究人群均源自意大利, 缺少其他地区的资料. 总之, 本荟萃分析结果显示LF联合标准疗法能有效提高*H pylori*根除率, 并可降低根除过程中的不良反应发生率, 尤其是恶心的发生率. 由LF、克拉霉素、替硝唑和质子泵抑制剂组成的1 wk疗法, 可以成为一种有效的抗*H pylori*二线根除方案.

致谢: 感谢上海交通大学医学院附属仁济医院消化科的童锦禄博士在统计方面提供的帮助.

4 参考文献

- 1 Go MF. Review article: natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16 Suppl 1: 3-15
- 2 Rauws EA, Tytgat GN. Cure of duodenal ulcer associated with eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1990; 335: 1233-1235
- 3 Brenes F, Ruiz B, Correa P, Hunter F, Rhamakrishnan T, Fontham E, Shi TY. *Helicobacter pylori* causes hyperproliferation of the gastric epithelium: pre- and post-eradication indices of proliferating cell nuclear antigen. *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 1870-1875
- 4 Boot H, de Jong D, van Heerde P, Taal B. Role of *Helicobacter pylori* eradication in high-grade MALT lymphoma. *Lancet* 1995; 346: 448-449
- 5 Malfertheiner P, Mégraud F, O'Morain C, Hungin AP, Jones R, Axon A, Graham DY, Tytgat G; European *Helicobacter Pylori* Study Group

- (EHPSG). Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht 2-2000 Consensus Report. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 167-180
- 6 Perri F, Qasim A, Marras L, O'Morain C. Treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2003; 8 Suppl 1: 53-60
- 7 Neville PM, Barrowclough S, Crocombe W, Axon AT, Wrangstadh M, Moayyedi P. Randomised study of the efficacy of omeprazole and clarithromycin with either amoxicillin or metronidazole in the eradication of *Helicobacter pylori* in screened primary care patients. *Dig Liver Dis* 2001; 33: 131-134
- 8 Lee JM, Breslin NP, Hyde DK, Buckley MJ, O'Morain CA. Treatment options for *Helicobacter pylori* infection when proton pump inhibitor-based triple therapy fails in clinical practice. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13: 489-496
- 9 Ellison RT 3rd. The effects of lactoferrin on gram-negative bacteria. *Adv Exp Med Biol* 1994; 357: 71-90
- 10 Dial EJ, Hall LR, Serna H, Romero JJ, Fox JG, Lichtenberger LM. Antibiotic properties of bovine lactoferrin on *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 2750-2756
- 11 Dial EJ, Lichtenberger LM. Effect of lactoferrin on *Helicobacter felis* induced gastritis. *Biochem Cell Biol* 2002; 80: 113-117
- 12 de Bortoli N, Leonardi G, Ciancia E, Merlo A, Bellini M, Costa F, Mumolo MG, Ricchiuti A, Cristiani F, Santi S, Rossi M, Marchi S. *Helicobacter pylori* eradication: a randomized prospective study of triple therapy versus triple therapy plus lactoferrin and probiotics. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 951-956
- 13 Zullo A, De Francesco V, Scaccianoce G, Manes G, Efrati C, Hassan C, Maconi G, Piglionica D, Cannaviello C, Panella C, Morini S, Ierardi E. *Helicobacter pylori* eradication with either quadruple regimen with lactoferrin or levofloxacin-based triple therapy: a multicentre study. *Dig Liver Dis* 2007; 39: 806-810
- 14 Tursi A, Elisei W, Brandimarte G, Giorgetti GM, Modeo ME, Aiello F. Effect of lactoferrin supplementation on the effectiveness and tolerability of a 7-day quadruple therapy after failure of a first attempt to cure *Helicobacter pylori* infection. *Med Sci Monit* 2007; 13: CR187-CR190
- 15 Di Mario F, Aragona G, Dal Bó N, Cavallaro L, Marcon V, Olivieri P, Benedetti E, Orzès N, Marin R, Tafner G, Chilovi F, De Bastiani R, Fedrizzi F, Franceschi M, Salvat MH, Monica F, Piazzi L, Valiante F, Vecchiati U, Cavestro GM, Comparato G, Iori V, Maino M, Leandro G, Pilotto A, Ruggie M, Franzè A; Gastrointestinal Study Unit (GISU). Bovine lactoferrin for *Helicobacter pylori* eradication: an open, randomized, multicentre study. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 1235-1240
- 16 Zullo A, De Francesco V, Scaccianoce G, Hassan C, Panarese A, Piglionica D, Panella C, Morini S, Ierardi E. Quadruple therapy with lactoferrin for *Helicobacter pylori* eradication: a randomised, multicentre study. *Dig Liver Dis* 2005; 37: 496-500
- 17 Di Mario F, Dal Bó N, Aragona G, Marcon V, Olivieri P, Marin R, DeBastiani R, Chilovi F, Piazzi L, Fedrizzi F, Tafner G, Vecchiati U, Monica F, Heras H, Franceschi M, Orzes N, Benedetti E, Fanigliulo L, Mazzocchi G, Maino M, Iori V, Cavestro GM, Franzè A, on behalf of GISU. Efficacy of bovine

- lactoferrin for *Helicobacter pylori* eradication: Results of a multicenter study. *Helicobacter* 2004; 9: 568
- 18 Di Mario F, Dal Bó N, Aragona G, Marcon V, Olivieri PG, Marin R, DeBastiani R, Chilovi F, Piazzini L, Chilovi F, Fedrizzi F, Tafner G, Monica F, Heras H, Germanà B, Fanigliulo L, Mazzocchi G, Maino M, Iori V, Cavestro GM, Franzè A. Bovine lactoferrin as rescue treatment for *Helicobacter pylori* infection: Results of a multicenter study. *Helicobacter* 2004; 9: 569-570
- 19 Di Mario F, Aragona G, Bò ND, Ingegnoli A, Cavestro GM, Moussa AM, Iori V, Leandro G, Pilotto A, Franzè A. Use of lactoferrin for *Helicobacter pylori* eradication. Preliminary results. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36: 396-398
- 20 Di Mario F, Aragona G, Dal Bò N, Cavestro GM, Cavallaro L, Iori V, Comparato G, Leandro G, Pilotto A, Franzè A. Use of bovine lactoferrin for *Helicobacter pylori* eradication. *Dig Liver Dis* 2003; 35: 706-710
- 21 Altintas E, Sezgin O, Ulu O, Aydin O, Camdeviren H. Maastricht II treatment scheme and efficacy of different proton pump inhibitors in eradicating *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1656-1658
- 22 Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP, Welsh MJ. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature* 2002; 417: 552-555
- 23 Baldwin DA, Jenny ER, Aisen P. The effect of human serum transferrin and milk lactoferrin on hydroxyl radical formation from superoxide and hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1984; 259: 13391-13394
- 24 Wada T, Aiba Y, Shimizu K, Takagi A, Miwa T, Koga Y. The therapeutic effect of bovine lactoferrin in the host infected with *Helicobacter pylori*. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 238-243
- 25 Borody TJ, Ashman O. Lactoferrin: milking ulcers? *Dig Liver Dis* 2003; 35: 691-693
- 26 Miehle S, Reddy R, Osato MS, Ward PP, Conneely OM, Graham DY. Direct activity of recombinant human lactoferrin against *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2593-2594

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

世界华人消化杂志计量单位标准

本刊讯 本刊计量单位采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 M_r , 30 000或30 kDa(M 大写斜体, r 小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A 大写斜体, r 小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是 u (小写正体). 计量单位在+、-、±及-后列出. 如 $37.6 \pm 1.2^\circ\text{C}$, 45.6 ± 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、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B₁₂用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外 uv , 百分比%, 升L, 尽量把 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 μg , hr改成h, 重量 γ 改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg \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% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“kg”表示. (常务副总编辑: 张海宁 2009-03-28)

胃间质瘤的内镜早期诊断及腹腔镜手术治疗

王震宇, 秦鸣放, 赵宏志, 蔡旺, 王光霞, 张莉, 李焕喜

王震宇, 秦鸣放, 赵宏志, 蔡旺, 王光霞, 张莉, 李焕喜, 天津医科大学南开临床学院 天津市南开医院微创外科 天津市 300100

作者贡献分布: 此文资料总结及论文撰写由王震宇完成; 资料收集由王震宇、赵宏志、蔡旺、张莉及李焕喜完成; 超声内镜操作由王震宇与王光霞完成; 腹腔镜手术由秦鸣放、王震宇及赵宏志完成; 秦鸣放负责全文理论指导。

通讯作者: 王震宇, 副主任医师, 300100, 天津市, 天津医科大学南开临床学院, 天津市南开医院微创外科。

wzy1110@gmail.com

电话: 022-27435268

收稿日期: 2009-01-14 修回日期: 2009-03-06

接受日期: 2009-03-09 在线出版日期: 2009-03-28

Early endoscopic diagnosis and laparoscopic surgery for gastric stromal tumors

Zhen-Yu Wang, Ming-Fang Qin, Hong-Zhi Zhao, Wang Cai, Guang-Xia Wang, Li Zhang, Huan-Xi Li

Zhen-Yu Wang, Ming-Fang Qin, Hong-Zhi Zhao, Wang Cai, Guang-Xia Wang, Li Zhang, Huan-Xi Li, Department of Minimally Invasive Surgery, Tianjin Nankai Hospital; Nankai Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300100, China

Correspondence to: Zhen-Yu Wang, Department of Minimally Invasive Surgery, Tianjin Nankai Hospital; Nankai Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300100, China. wzy1110@gmail.com

Received: 2009-01-14 Revised: 2009-03-06

Accepted: 2009-03-09 Published online: 2009-03-28

Abstract

AIM: To explore the value of combination of gastroscopy, endoscopic ultrasonography (EUS) and laparoscopy in discovering, diagnosing and treating small gastrointestinal stromal tumors (GIST) of stomach (diameter < 2 cm).

METHODS: From August 2004 to September 2008, 23 patients were found with gastric submucosal tumors by gastroscopy, 16 of which were primarily diagnosed with GIST by EUS. The diameters of tumors are from 0.89 cm to 1.95 cm with an average of 1.42 cm. All of the 16 patients received laparoscopic partial gastrectomy under gastroscope. Following up after operation was carried out to check for tumor recurrence and metastases.

RESULTS: All operations were successfully ac-

complished within 45-90 min (60 min on average). There were no complications and mortalities. The median postoperative hospital stay was 4 days (range 3-7 d). Of all the 16 cases, 15 cases (93.8%) were verified with GIST by immunohistochemistry and pathology, and 1 case was with schwannoma. For patients suffering from gastric stromal tumors, there were no tumor recurrence and metastases at a mean postoperative follow-up of 27 months (range 3-52 mo).

CONCLUSION: It is helpful to diagnose small GIST of stomach and predict the risk before operation by combination of gastroscopy and EUS. Laparoscopic partial gastrectomy under the localization of gastroscopy is safe and effective and the prognosis is favorable.

Key Words: Gastrointestinal stromal tumors; Gastroscopy; Endoscopic ultrasonography; Laparoscopy

Wang ZY, Qin MF, Zhao HZ, Cai W, Wang GX, Zhang L, Li HX. Early endoscopic diagnosis and laparoscopic surgery for gastric stromal tumors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(9): 927-930

摘要

目的: 探讨胃镜、超声内镜、腹腔镜联合应用在小胃间质瘤(直径<2 cm)发现、诊断和治疗中的作用和价值。

方法: 2004-08/2008-09我院胃镜发现的胃黏膜下隆起性病变患者23例, 进行超声内镜检查, 初步诊断胃间质瘤16例(直径0.89-1.95 cm, 平均1.42 cm)。随后在胃镜辅助定位下, 行腹腔镜胃部分切除术。术后长期随访, 有无局部复发及远处转移。

结果: 手术全部成功, 手术时间45-90(平均60) min, 无术后并发症及死亡病例。术后胃肠功能恢复时间18-36(平均28) h, 住院时间3-7(平均4) d。术后病理诊断间质瘤15例, 术前诊断符合率93.8%, 神经鞘瘤1例。15例胃间质瘤患者术后随访3-52(平均27) mo, 未发现肿瘤局部复发和转移。

■背景资料

胃间质瘤(GISTs)具有恶性潜能, 从良性到恶性是一种渐进过程。其侵袭危险程度与肿瘤大小、核分裂像计数和部位等因素有关。但胃间质瘤缺乏典型症状, 早期发现困难, 普通胃镜检查无法确定诊断。

■同行评议者

周国雄, 主任医师, 南通大学附属医院消化内科

■ 研发前沿

胃肠道间质瘤的临床研究集中在早期、准确诊断、风险评估、微创手术及分子靶向药物治疗。多种新技术如EUS、腹腔镜的应用,取得了十分理想的效果。

结论: 胃镜联合超声内镜有助于发现及诊断小胃间质瘤,并可在术前初步判定危险度。在胃镜辅助定位下,行腹腔镜胃部分切除术治疗小胃间质瘤安全、有效、预后良好。

关键词: 胃间质瘤; 胃镜; 内镜超声; 腹腔镜

王震宇, 秦鸣放, 赵宏志, 蔡旺, 王光霞, 张莉, 李焕喜. 胃间质瘤的内镜早期诊断及腹腔镜手术治疗. 世界华人消化杂志 2009; 17(9): 927-930

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/927.asp>

0 引言

胃间质瘤是一种起源于胃壁固有肌层或黏膜肌层的间叶性肿瘤,是胃肠道最常见的非上皮性肿瘤。胃间质瘤症状隐匿,早期诊断困难,并具有非定向分化和潜在恶性的特点。我院利用胃镜和内镜超声检查术(endoscopic ultrasonography, EUS)联合早期诊断直径小于2 cm的胃间质瘤,并在胃镜辅助定位下行腹腔镜胃部分切除术,取得满意的效果,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 2004-08/2008-09因上腹不适,食欲不振及既往胃、十二指肠病史复查等原因在我院行胃镜检查,发现胃黏膜下隆起性病变23例,立即行EUS。EUS诊断胃间质瘤16例,其中男10例,女6例,年龄35-68(平均55.2)岁,测量直径0.89-1.95(平均1.42) cm。16例患者在术中胃镜定位下行腹腔镜胃部分切除术。胃镜、超声内镜、腹腔镜均为Fujinon电子内窥镜设备。

1.2 方法

1.2.1 胃镜联合EUS检查: 胃镜检查发现胃黏膜下隆起性病变后,立即行EUS检查。EUS设备可酌情使用电子环扫超声内镜、电子线阵式超声内镜或微型超声探头,超声频率7.5-20 MHz。超声内镜经口腔、微型超声探头经胃镜活检通道插入胃腔内,吸尽气体后,注水100-500 mL,将超声探头置于隆起病变处扫查。

1.2.2 术中胃镜定位、腹腔镜胃部分切除术: 气管内插管,静脉复合麻醉。患者仰卧,头高脚低,双下肢分开,呈“人”字形,术者立于患者两腿之间。三孔法或四孔法, Trocar位于脐下缘(10 mm),置入30度腹腔镜;左锁骨中线肋缘下(12 mm),为主操作孔、右锁骨中线肋缘下(5 mm),为辅助孔,左侧腋前线(5 mm),助手辅助牵拉胃,根据病灶部位,适当调整。术中胃镜引导定位,将胃镜冷光源正对瘤体,腹腔镜下发现光照部

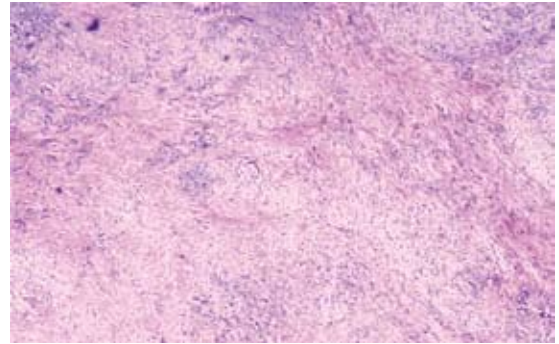


图1 病理证实胃间质瘤。

位,于肿瘤旁胃壁行2针牵引缝合线,作为肿瘤定位标记,并提起胃。肿瘤位于胃体前壁者,用内镜切割吻合器(Endo-GIA)直接楔形切除;位于前壁近胃大弯侧或胃底部者,用超声刀及结扎速(Ligasure),先分离胃结肠韧带或胃脾韧带;位于前壁近胃小弯侧者,先分离部分肝胃韧带;位于胃后壁者,先切断胃结肠韧带和(或)胃脾韧带,把胃后壁翻起,再用直线切割闭合器楔形切除。切缘离肿块至少2 cm。切除标本装入取物袋内取出。肿瘤切除后胃镜检查,避免术后胃出血及胃腔狭窄。

1.2.3 随访: 术后每3 mo,通过电话、门诊随访,每6 mo行胃镜检查,必要时辅以B超、CT或EUS检查。

2 结果

手术全部成功,完整切除肿瘤。手术时间45-90(平均60) min。无术后并发症及死亡病例。术后胃肠功能恢复时间18-36(平均28) h。住院时间3-7(平均4) d。

术后病理诊断证实为胃间质瘤(图1)15例, EUS诊断符合率93.8%,根据GIST NIH风险分级标准全部属极低危。1例病理诊断为神经鞘瘤,为良性肿瘤,未进一步治疗。

15例胃间质瘤患者术后随访3-52(平均27) mo,无死亡病例,未发现肿瘤局部复发和远处转移。

3 讨论

胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumors, GIST)是以c-kit/PDGFRα基因突变为主要发病机制,特征性表达CD117蛋白^[1-2],由梭形或/和上皮样细胞构成,是胃肠道最常见的间叶源性肿瘤。GIST可发生于胃肠道各个部位,包括腹腔及腹膜后,发病率依次为胃(60%-70%)>小肠

■ 相关报道

胃肠道间质瘤的基础和临床研究已非常深入,在基因和分子生物学水平阐明了病因,临床诊断和治疗也有了很大的进步。普遍认为其具有潜在恶性,并建立了多种风险评估标准。早期诊断、微创切除和特异性分子靶向药物治疗明显改善了其预后。

(20%-25%)>结肠(5%-10%)>胃肠外(<5%)^[3-4].

GIST是一种恶性潜能未定的肿瘤, 无绝对良性, 良恶性之间无截然界限, 从良性到恶性是一种渐进过程. 所有GIST均可能随时间的推移, 肿瘤的生长, 发展为恶性肿瘤, 只是侵袭危险有所区别, 即肿瘤复发转移可能性大小有差异. 影响GIST侵袭危险程度判定的因素很多, 目前肯定的指标为肿瘤大小、核分裂像计数和部位^[5-8]. 不同大小的胃间质瘤预后明显不同. Otani *et al*^[9]研究显示极低危和低危组术后5年无瘤生存率达100%, 明显优于中危和高危组(89.9%). 因此, 早期发现小的胃间质瘤(<2 cm), 对预后具有重要意义.

胃间质瘤缺乏特异性的临床表现, 尤其小的胃间质瘤常无症状, 早期诊断困难. 本组患者均在胃镜检查时发现黏膜下隆起性病变, 后进一步检查诊断. 胃镜发现为突入消化道腔内的圆形或半球形隆起, 有宽的基底, 边界清晰, 隆起表面的黏膜色泽与周围一致. 但普通消化内镜不能判定其深度、来源和性质, 而且活检一般只能取到表层, 无法进一步确定诊断.

超声内镜将超声探头深入到消化道腔内进行扫描, 接近病变减少干扰, 并采用高频探头, 图像分辨力更高, 有利于发现小的病灶. EUS消化道管壁显示为5层结构, 不同病变的起源层次和回声特点不同. 胃间质瘤显示为位于第4或第2层的圆形或椭圆形低回声团块, 内部回声均匀, 边界清楚, 可与脂肪瘤(第3层, 强回声、均匀、边界清)、静脉瘤(第3层, 无回声、均匀、边界清)、异位胰腺(第3层, 低回声间有点状强回声、不均匀、边界清)、壁外压迫(管壁外面, 胃壁结构正常, 向腔内突出)等相鉴别. 内镜超声引导的细针穿刺活检术(EUS-FNA)更可准确取得活检标本, 进行特征性的免疫组化检查和细胞核分裂相的计数. EUS可精确地探查肿瘤的起源层次、体积大小、边界、周围淋巴结及回声方式, 是目前诊断胃间质瘤首选的方法^[10-13]. 结合EUS-FNA更可进一步提高诊断的准确率, 并有助于术前判定危险程度和预后, 对治疗方法的选择具有指导作用^[14].

胃间质瘤手术应完全切除肿瘤并尽可能保留胃功能, 广泛的切除术并不能提高生存率. 因很少发生淋巴转移, 也不需淋巴结的清扫. 腹腔镜胃部分切除术具有创伤小, 术后胃肠功能恢复快, 住院时间短的优点, 成为最佳治疗手段. 研究^[15-16]显示腹腔镜手术安全、有效, 适合<5

cm的胃间质瘤. 但小的胃间质瘤浆膜表面突出不明显, 术中定位困难, 可术中胃镜引导, 精确定位. 手术应完整切除肿瘤, 避免肿瘤破裂, 引起腹腔种植, 造成恶性结果, 切缘应距肿瘤2 cm以上.

小的胃间质瘤(<2 cm)恶性危险度低, 早期发现和手术将明显改善胃间质瘤的预后. 本组资料通过胃镜和超声内镜的联合应用, 早期发现并术前初步判定胃间质瘤的性质和危险程度, 在术中胃镜的准确定位下, 腹腔镜手术切除肿瘤. 三种内镜联合应用完成胃间质瘤的早期诊断和微创治疗. 随访至今, 未发现局部复发和远处转移, 效果良好.

4 参考文献

- Miselli F, Millefanti C, Conca E, Negri T, Piacenza C, Pierotti MA, Tamborini E, Pilotti S. PDGFRA immunostaining can help in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumors. *Am J Surg Pathol* 2008; 32: 738-743
- 王彦丽, 赵向荣, 白辰光, 杨蕾, 马大烈. 胃肠道间质瘤组织中PDGFR α 和C-kit基因突变和蛋白表达的关系. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2300-2305
- Bertolini V, Chiaravalli AM, Klersy C, Placidi C, Marchet S, Boni L, Capella C. Gastrointestinal stromal tumors--frequency, malignancy, and new prognostic factors: the experience of a single institution. *Pathol Res Pract* 2008; 204: 219-233
- 顾国利, 王石林, 任力, 魏学明, 李德昌, 周晓武, 黄蓉蓉. 胃肠道间质瘤的临床病理分析和免疫组化特点. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2241-2246
- Vallbohmer D, Marcus HE, Baldus SE, Brabender J, Lurje G, Drebber U, Metzger R, Holscher AH, Schneider PM. Comparative analysis of four histopathological classification systems to discriminate benign and malignant behaviour in gastrointestinal stromal tumors. *Anticancer Res* 2008; 28: 367-372
- Imamura M, Yamamoto H, Nakamura N, Oda Y, Yao T, Kakeji Y, Baba H, Maehara Y, Tsuneyoshi M. Prognostic significance of angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor. *Mod Pathol* 2007; 20: 529-537
- 马大烈, 白辰光. 胃肠道间质瘤的病理诊断和预后. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2367-2371
- Joensuu H. Risk stratification of patients diagnosed with gastrointestinal stromal tumor. *Hum Pathol* 2008; 39: 1411-1419
- Otani Y, Furukawa T, Yoshida M, Saikawa Y, Wada N, Ueda M, Kubota T, Mukai M, Kameyama K, Sugino Y, Kumai K, Kitajima M. Operative indications for relatively small (2-5 cm) gastrointestinal stromal tumor of the stomach based on analysis of 60 operated cases. *Surgery* 2006; 139: 484-492
- Lachter J, Bishara N, Rahimi E, Shiller M, Cohen H, Reshef R. EUS clarifies the natural history and ideal management of GISTs. *Hepatogastroenterology* 2008; 55: 1653-1656
- Ji F, Wang ZW, Wang LJ, Ning JW, Xu

■同行评价

本文设计合理, 图片清晰, 结论可靠, 语言流畅, 有一定的临床应用价值.

- GQ. Clinicopathological characteristics of gastrointestinal mesenchymal tumors and diagnostic value of endoscopic ultrasonography. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: e318-e324
- 12 钟慧闽, 杨杰, 姚萍, 曲晓静. 284例内镜超声检查与治疗分析. *中国内镜杂志* 2008; 14: 511-513
- 13 宗春华, 徐雷鸣, 陈惠芳. 内镜超声检查术在胃间质瘤中的诊断价值. *中国内镜杂志* 2006; 12: 917-921
- 14 Scarpa M, Bertin M, Ruffolo C, Polese L, D'Amico DF, Angriman I. A systematic review on the clinical diagnosis of gastrointestinal stromal tumors. *J Surg Oncol* 2008; 98: 384-392
- 15 Mochizuki Y, Kodera Y, Fujiwara M, Ito S, Yamamura Y, Sawaki A, Yamao K, Kato T. Laparoscopic wedge resection for gastrointestinal stromal tumors of the stomach: initial experience. *Surg Today* 2006; 36: 341-347
- 16 Catena F, Di Battista M, Fusaroli P, Ansaloni L, Di Scioscio V, Santini D, Pantaleo M, Biasco G, Caletti G, Pinna A. Laparoscopic treatment of gastric GIST: report of 21 cases and literature's review. *J Gastrointest Surg* 2008; 12: 561-568

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

第十二届全国腹部影像学术会议征文通知

本刊讯 由中华医学会放射学分会腹部学组主办, 山西省医学会放射学分会承办, 山西医科大学第一医院协办的第十二届全国腹部影像学学术年会拟定于2009-05-15/18在山西省太原市卡萨国际商务酒店举行. 本届年会将邀请国内、外著名专家做专题讲座, 并进行优秀论文代表发言、英语论文发言、疑难病例讨论及科学论文展板等形式多样的学术交流活动.

1 征文内容

腹部普通X线、CT、MRI、正电子发射计算机体层成像(PET)、腹部介入放射学、超声诊断学、分子影像学、放射学管理、质量控制及放射技术学等方面的论著、讲座、述评、综述、短篇报道、病例讨论等.

2 征文要求

(1)按中华医学会系列杂志稿约要求撰写800字左右标准结构式摘要, 包括目的、材料与方法、结果、结论四要素. (2)已在全国公开发行的刊物上发表的论文不再采用. (3)截稿日期: 2009-04-25.

3 投稿方式

(1)网上投稿: 组委会已开通“网上投稿”主页, 网址为: <http://www.rc-csr.org/ccra12/>或<http://www.chinaradiology.org/ccra12/>. (2)邮寄投稿: 采用Word格式电脑打印并需同时附软盘或光盘(请自留底稿, 恕不退稿). 来稿请在信封上注明“腹部影像征文”. (3)电子邮箱投稿: zrp_7142@163.com, 邮件名称“腹部会议投稿”. 各种方式投稿均请写清楚作者单位、详细通信地址、邮政编码、手机号码及E-mail地址. 邮寄地址: 山西省太原市解放南路85号, 山西医科大学第一医院放射科, 李健丁主任收, 邮政编码: 030001.

4 会议注册

<http://www.chinaradiology.org/csar12/> 进入网页注册, 特别提醒注册优惠及条件.

我们将竭尽全力, 使本次会议成为融学术交流、继续教育和新技术、新产品展示为一体的学术会议. 欢迎广大从事腹部影像诊断和介入的同道踊跃投稿、报名. 参会者将获得国家 I 类继续教育学分6分.

三叶因子1与胃癌发生发展过程中血管生成的关系

赖铭裕, 廖晓霞, 林瑶光, 梁志海, 陈晖, 李素艳, 蒋敦科, 刘莹

赖铭裕, 廖晓霞, 林瑶光, 梁志海, 陈晖, 李素艳, 蒋敦科, 刘莹, 广西医科大学第一附属医院老年消化内科 广西壮族自治区南宁市 530021
广西青年科学基金资助项目, No. 桂科青0728075
作者贡献分布: 赖铭裕与廖晓霞对此文所作贡献均等; 此课题由赖铭裕、梁志海及林瑶光设计, 研究过程由廖晓霞、陈晖、李素艳、蒋敦科及刘莹操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由赖铭裕提供; 数据分析由赖铭裕、梁志海及廖晓霞完成; 本论文写作由赖铭裕与廖晓霞完成。
通讯作者: 赖铭裕, 530021, 广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学第一附属医院老年消化内科。
laimingyu2005103@yahoo.com.cn
电话: 0771-5356596 传真: 0771-5351574
收稿日期: 2009-01-23 修回日期: 2009-03-07
接受日期: 2009-03-09 在线出版日期: 2009-03-28

Expression of trefoil factor 1 in gastric cancer and its correlation with neovascularization

Ming-Yu Lai, Xiao-Xia Liao, Yao-Guang Lin, Zhi-Hai Liang, Hui Chen, Su-Yan Li, Dun-Ke Jiang, Ying Liu

Ming-Yu Lai, Xiao-Xia Liao, Yao-Guang Lin, Zhi-Hai Liang, Hui Chen, Su-Yan Li, Dun-Ke Jiang, Ying Liu, Department of Geriatric Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Supported by: the Foundation for Young Scientists of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 0728075
Correspondence to: Dr. Ming-Yu Lai, Department of Geriatric Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. laimingyu2005103@yahoo.com.cn
Received: 2009-01-23 Revised: 2009-03-07
Accepted: 2009-03-09 Published online: 2009-03-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of trefoil factor 1 (TFF1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in normal gastric mucosa, adjacent carcinoma and gastric carcinoma and to explore its role in neovascularization.

METHODS: The expressions of TFF1, VEGF and MVD (CD34 monoclonal antibody labeling) were determined by immunohistochemical method in 174 gastric specimens including 42 normal gastric mucosa, 66 adjacent carcinoma and 66 gastric carcinomas.

RESULTS: In normal control group, adjacent carcinoma and gastric carcinoma group, the expression of TFF1 had a decreasing tendency (209.40 ± 16.00 , 199.12 ± 16.68 , 189.17 ± 16.20 , $P < 0.01$), but the expression of VEGF and the MVD had an increasing tendency (69.7%, 40.9%, 35.7%; 38.90 ± 6.74 , 28.68 ± 5.08 , 25.13 ± 4.46). MVD was positively correlated with grey levels of TFF1 ($r = 0.811$, $P < 0.01$), in other words, there was a negative correlation between the MVD values and the expression of TFF1.

CONCLUSION: TFF1, a specific anti-oncogene for gastric carcinoma, doesn't have a close correlation with tumor vessel neogenesis.

Key Words: Trefoil factor 1; Vascular endothelial growth factor; Micro-vessel density; Gastric cancer; Immunohistochemistry

Lai MY, Liao XX, Lin YG, Liang ZH, Chen H, Li SY, Jiang DK, Liu Y. Expression of trefoil factor 1 in gastric cancer and its correlation with neovascularization. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(9): 931-934

摘要

目的: 观察三叶因子1(TFF1)和血管内皮生长因子(VEGF)在正常胃黏膜组织、癌旁组织和胃癌组织中的表达, 并探讨TFF1与胃癌发生发展过程中血管生成的关系。

方法: 采用SP免疫组化方法检测42例正常组织、66例癌旁组织和66例胃癌组织中TFF1和VEGF的表达, 以CD34标记血管内皮, 测定MVD。

结果: TFF1表达在正常胃黏膜组织→癌旁组织→胃癌组织中呈逐渐减弱趋势(209.40 ± 16.00 , 199.12 ± 16.68 , 189.17 ± 16.20), 差异具有显著性($P < 0.01$), 而VEGF的表达和MVD呈逐渐上升趋势(69.7%, 40.9%, 35.7%; 38.90 ± 6.74 , 28.68 ± 5.08 , 25.13 ± 4.46)。MVD值与TFF1灰度值呈正相关($r = 0.811$, $P < 0.01$), 即MVD值与TFF1的表达呈负相关。

结论: TFF1作为一种胃癌特异性抑制因子,

■背景资料

血管新生是肿瘤生长转移的主要原因, 血管内皮生长因子(VEGF)与肿瘤血管新生过程中发挥关键作用。国外研究发现TFF1具有VEGF同样的血管生成作用, 但TFF1作为胃癌的一个抑制因子, 在胃癌的发生发展过程中与血管生成的关系未明。

■同行评议者

黄颖秋, 教授, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

■研发前沿

TFF1作为胃癌的特异性抑制因子已有研究证实,但在胃癌生长转移中的作用未明.本文通过研究探讨其与肿瘤中血管新生的关系.

在胃癌发生发展过程中并未促进新生血管的生成.

关键词: 三叶因子1; 血管内皮生长因子; 微血管密度; 胃癌; 免疫组织化学

赖铭裕, 廖晓霞, 林瑶光, 梁志海, 陈晖, 李素艳, 蒋敦科, 刘莹. 三叶因子1与胃癌发生发展过程中血管生成的关系. 世界华人消化杂志 2009; 17(9): 931-934

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/931.asp>

0 引言

近年来,关于胃癌发病机制的研究中,三叶因子(trefoil factors, TFFs)与胃癌的发生、发展逐渐引起关注. TFF1是三叶因子家族之一,其分子中具有特定的三叶草结构域,这种结构的稳定性使其具有明显的抗酸、抗蛋白酶和抗热分解特性,对胃肠道黏膜有保护和修复作用.有研究发现TFF1具有血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)同样的血管生成作用,可促进鸡胚绒毛尿囊膜的血管生成,可诱导人脐静脉内皮细胞形成类微血管结构.因此,我们用免疫组织化学方法研究TFF1和VEGF在正常胃黏膜组织、癌旁组织和胃癌组织的表达情况,初步探讨其与胃癌发生发展中血管生成的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 选取广西医科大学第一附属医院2005-01/2007-09接受胃大部切除术的胃癌标本66例,均经组织病理学检查证实.所有标本术前均未接受非甾体抗炎药治疗及放化疗.其中,男44例,女22例,年龄29-74(中位年龄55.9)岁.其中高、中分化腺癌18例,低未分化腺癌48例;未侵及浆膜层者26例,侵及浆膜层及浆膜外者40例;发生局部淋巴结转移者29例,无局部淋巴结转移者37例.同时取距癌缘3-5 cm的癌旁组织66例,正常胃黏膜组织42例作为对照组.试剂采用鼠抗人TFF1 mAb(即用型)、链霉菌抗生素蛋白-生物素-过氧化物酶(SP)免疫组织化学试剂盒、二氨基联苯(DAB)显色剂均购自福建迈新生物技术开发公司,鼠抗人VEGF mAb、鼠抗人CD34 mAb(工作浓度1:50),购自美国Santa Cruz公司.

1.2 方法 所有标本均经100 g/L甲醛固定,常规脱水、透明、渗蜡、包埋,4 μm厚连续切片.常规脱蜡、水化,采用免疫组织化学超敏两步法

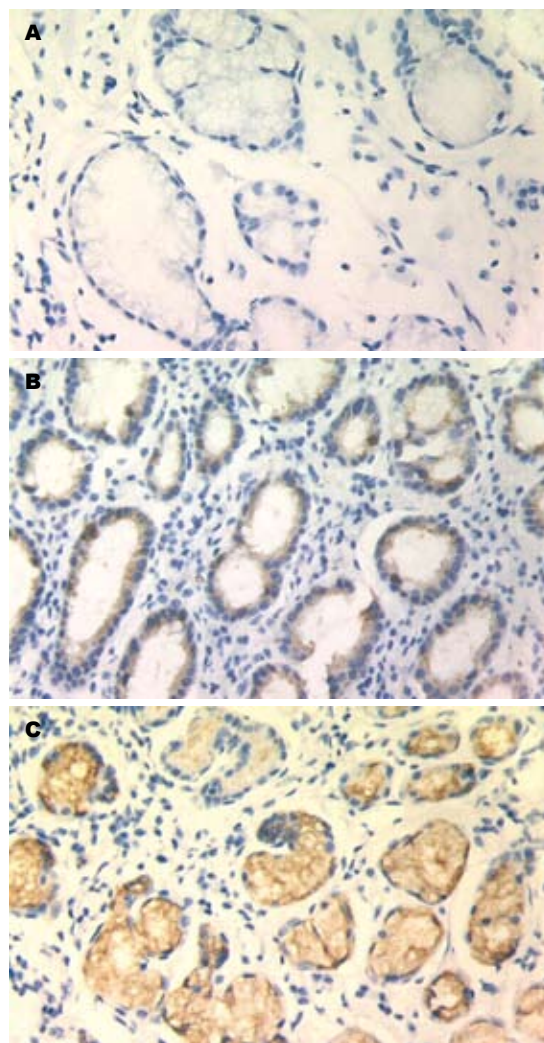


图1 TFF1在不同组织中的表达(×400). A: 胃癌组织; B: 癌旁组织; C: 正常胃组织.

(SP染色), DAB显色,苏木素复染,吹干,具体操作按SP试剂盒说明书进行.阴性对照采用生理盐水磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗,余步骤相同.

阳性信号为细胞胞质和胞膜上出现黄色或棕黄色染色.每例取5个高倍视野(×400),用病理图像分析仪测定阳性信号平均灰度值,灰度值越高, TFF1表达越弱.每张切片中看到有>5%的肿瘤细胞胞质或胞膜染色阳性,即判定为VEGF阳性.任何被染成棕色的血管内皮细胞或血管内皮细胞簇均作为一个血管计数.每例先在低倍镜(×100)下观察全片以确定肿瘤内血管密度最高处,再在高倍镜(×200)下记录5个视野内的微血管数,取其平均值作为该病例的MVD值.

统计学处理 使用统计学软件SPSS11.5进行分析,采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 TFF1和VEGF在不同胃组织中的表达 TFF1

■相关报道

研究发现TFF1可促进鸡胚绒毛尿囊膜的血管生成,诱导人脐静脉内皮细胞形成类微血管结构.

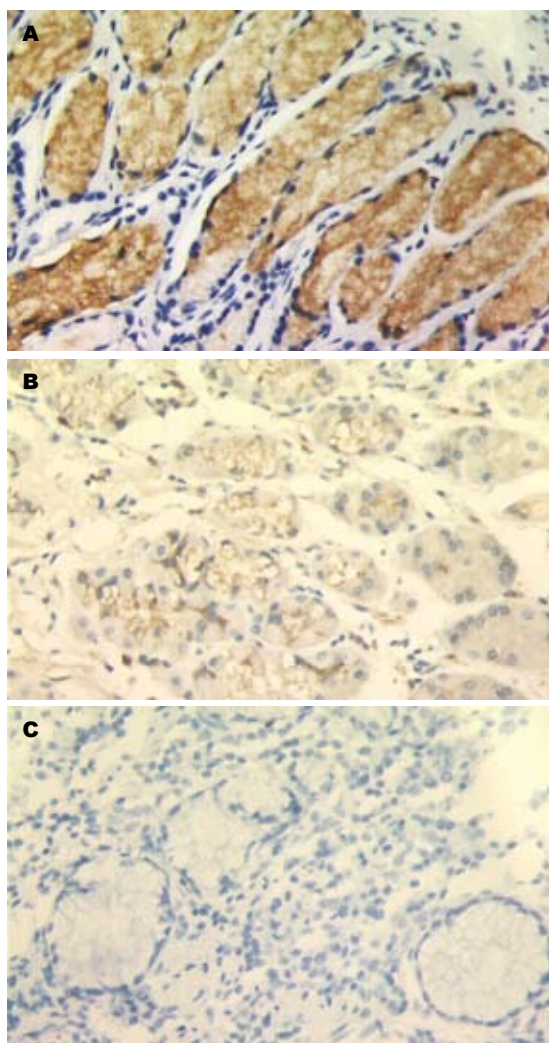


图 2 VEGF在不同组织中的表达($\times 400$). A: 胃癌组织; B: 癌旁组织; C: 正常胃组织.

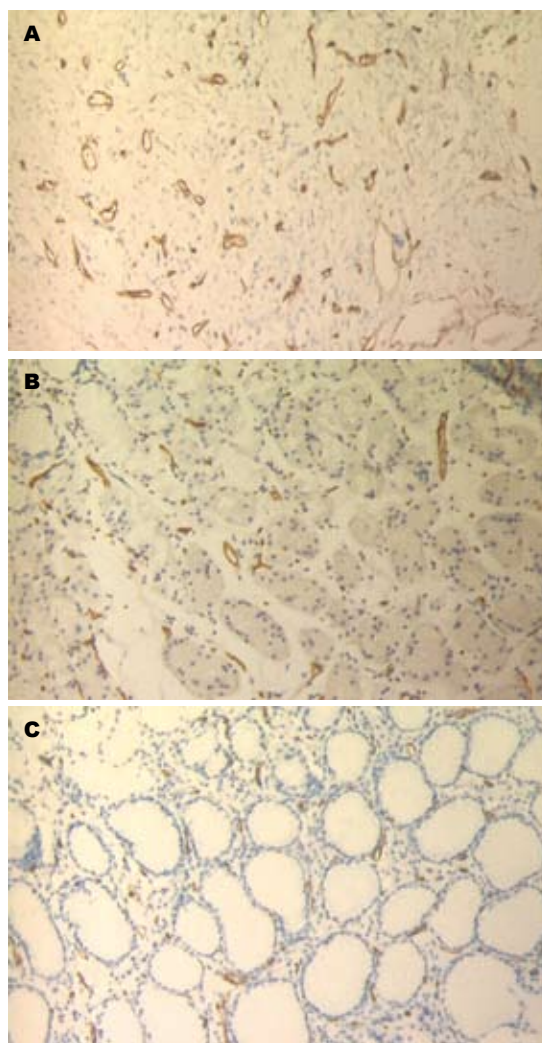


图 3 不同组织中的MVD($\times 400$). A: 胃癌组织; B: 癌旁组织; C: 正常胃组织.

■创新盘点

本实验联合检测胃癌组织的TFF1、血管内皮生长因子及微血管密度,有助于了解TFF1在胃癌发病机制中的作用途径,了解他与其他指标的相互关系,以及各观察指标在胃癌发病机制中各自的地位.

在胃癌组织、癌旁组织和正常胃黏膜组织中的阳性信号平均灰度值分别为 209.40 ± 16.00 , 199.12 ± 16.68 和 189.17 ± 16.20 , 各组间两两比较, 差异均有统计学意义($P < 0.01$). VEGF在胃癌组织、癌旁组织和正常胃黏膜组织中的阳性表达率分别为69.7%(46/66), 40.9%(27/66), 35.7%(15/42), 各组间两两比较, 差异均有统计学意义($P < 0.01$, 图1-2).

2.2 不同胃组织中的MVD值 MVD在胃癌组织、癌旁组织和正常组织中的平均值分别为 38.90 ± 6.74 , 28.68 ± 5.08 , 25.13 ± 4.46 , 各组间两两比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$, 图3).

2.3 TFF1与血管生成关系的分析 TFF1在VEGF阳性表达组和阴性表达组中的阳性信号平均灰度值分别为 213.02 ± 16.29 和 201.09 ± 11.99 ($P < 0.01$); VEGF阳性表达组和阴性表达组中MVD平均值分别为 41.08 ± 6.93 , 33.90 ± 2.01 , VEGF阳性表达组的MVD值高于阴性表达组中

的MVD值($P < 0.01$); MVD值与TFF1灰度值呈正相关($r = 0.811$, $P < 0.01$), 即MVD值与TFF1的表达呈负相关.

3 讨论

肿瘤的增殖和转移依赖于血管生成^[1]. 多数研究表明^[2], 实体肿瘤的生长需要血管来提供营养和排泄自身代谢产物. 当肿瘤的体积 $< 1 \text{ mm}^3$ 时这一过程可通过组织渗透来完成, 当其体积 $> 2 \text{ mm}^3$ 时, 其发展必须依赖新生血管的形成, 进而发生扩散转移. 恶性肿瘤发展由无血管期过渡到血管期, 具有诱导血管生成的能力, 此外肿瘤细胞周边的一些细胞也可能接受某些信号传递, 分泌某些生长因子促进肿瘤毛细血管生成. 目前常采用MVD来定量评估肿瘤的新生血管.

VEGF是1989年Ferrara *et al*从牛垂体滤泡星状细胞培养液中首先纯化出来, 并发现具有促进血管内皮细胞有丝分裂的活性^[3]. VEGF

■同行评价

本文初步探讨了三叶因子1在胃癌发生发展过程中与新生血管生成的关系,对该领域的进一步研究提供了实验依据,学术价值较好。

是由各种肿瘤细胞及某些正常细胞产生的^[4-5],被认为是肿瘤血管形成中最关键的驱动因子。Ichikuta *et al*^[6]研究发现VEGF在胃癌组织中阳性表达率为39%,与血管浸润有密切关系。Kakeji *et al*^[7]研究发现VEGF在胃癌中的阳性率为42%,而且VEGF阳性表达的胃癌更易发生血行转移。

TFF1于1982年由Masiakowski *et al*^[8]在雌激素诱导的人乳腺癌细胞系MCF-7中获得。TFF1在正常组织中主要由胃窦和胃体的隐窝及表层上皮的黏膜细胞产生,而在食管、结肠、胰腺、肝脏、前列腺、卵巢等组织中低水平表达甚至不表达。大量研究发现TFF1表达于正常胃黏膜,在胃黏膜肠化、不典型增生到胃癌的发展过程中TFF1表达逐渐降低,50%甚至更多的胃癌组织TFF1表达缺失^[9-10]。提示TFF1进行性缺失参与早期胃癌发生。Park *et al*^[11]对基因图谱分析时发现,原发性胃癌发生时,人染色体21q22常有复位基因的缺失,而此位点正是TFF1的基因所处位置,表明TFF1在胃癌发生的早期起作用,进而可能影响相关癌基因及抑癌基因的改变,促进胃癌的发生。认为TFF1可能是一种胃癌特异性抑制因子^[12-13]。研究发现TFF1可促进鸡胚绒毛尿囊膜的血管生成,诱导人脐静脉内皮细胞形成类微血管结构^[14]。本研究显示在正常胃黏膜组织→癌旁组织→胃癌组织中,TFF1表达呈逐渐减弱趋势,差异具有显著性($P<0.01$),而VEGF的表达和MVD呈逐渐上升趋势($P<0.01$)。TFF1在VEGF阳性表达组中的表达低于阴性表达组,而MVD值则相反,TFF1的表达与MVD呈负相关。可认为TFF1作为一种胃癌特异性抑制因子,在胃正常组织中高表达,而在胃癌发生发展过程中表达逐渐减少,而VEGF的表达渐增加,诱导血管的生成,为肿瘤的浸润、转移创造条件。胃癌组织中TFF1与血管生成的关系有待进一步的研究,明确其在胃癌增殖、浸润及转移中的作用机制为胃癌的防治开辟新的思路。

4 参考文献

- 1 Folkman J. Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview. *EXS* 1997; 79: 1-8
- 2 Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging

- 3 mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86: 353-364
- 4 Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161: 851-858
- 5 Collins PD, Connolly DT, Williams TJ. Characterization of the increase in vascular permeability induced by vascular permeability factor in vivo. *Br J Pharmacol* 1993; 109: 195-199
- 6 Zagzag D. Angiogenic growth factors in neural embryogenesis and neoplasia. *Am J Pathol* 1995; 146: 293-309
- 7 Ichikura T, Tomimatsu S, Ohkura E, Mochizuki H. Prognostic significance of the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C in gastric carcinoma. *J Surg Oncol* 2001; 78: 132-137
- 8 Kakeji Y, Koga T, Sumiyoshi Y, Shibahara K, Oda S, Maehara Y, Sugimachi K. Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression in gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2002; 21: 125-129
- 9 Masiakowski P, Breathnach R, Bloch J, Gannon F, Krust A, Chambon P. Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res* 1982; 10: 7895-7903
- 10 Luqmani Y, Bennett C, Paterson I, Corbishley CM, Rio MC, Chambon P, Ryall G. Expression of the pS2 gene in normal, benign and neoplastic human stomach. *Int J Cancer* 1989; 44: 806-812
- 11 Leung WK, Yu J, Chan FK, To KF, Chan MW, Ebert MP, Ng EK, Chung SC, Malfertheiner P, Sung JJ. Expression of trefoil peptides (TFF1, TFF2, and TFF3) in gastric carcinomas, intestinal metaplasia, and non-neoplastic gastric tissues. *J Pathol* 2002; 197: 582-588
- 12 Park WS, Oh RR, Park JY, Yoo NJ, Lee SH, Shin MS, Kim SY, Kim YS, Lee JH, Kim HS, An WG, Lee JY. Mapping of a new target region of allelic loss at 21q22 in primary gastric cancers. *Cancer Lett* 2000; 159: 15-21
- 13 Lefebvre O, Chenard MP, Masson R, Linares J, Dierich A, LeMeur M, Wendling C, Tomasetto C, Chambon P, Rio MC. Gastric mucosa abnormalities and tumorigenesis in mice lacking the pS2 trefoil protein. *Science* 1996; 274: 259-262
- 14 Machado JC, Carneiro F, Ribeiro P, Blin N, Sobrinho-Simões M. pS2 protein expression in gastric carcinoma. An immunohistochemical and immunoradiometric study. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 1585-1590
- 15 Rodrigues S, Van Aken E, Van Bocxlaer S, Attoub S, Nguyen QD, Bruyneel E, Westley BR, May FE, Thim L, Mareel M, Gspach C, Emami S. Trefoil peptides as proangiogenic factors in vivo and in vitro: implication of cyclooxygenase-2 and EGF receptor signaling. *FASEB J* 2003; 17: 7-16

编辑 李军亮 电编 何基才

原发性肝脏淋巴瘤的临床病理特点及其外科治疗

刘玉国, 脱帅, 徐克, 孙士财

刘玉国, 徐克, 孙士财, 中国人民解放军第313医院普通肝胆外科 辽宁省葫芦岛市 125000

脱帅, 中国人民解放军第202医院普通外科 辽宁省沈阳市 110003

作者贡献分布: 此课题由刘玉国、脱帅、徐克及孙士财设计; 研究过程由刘玉国、脱帅、徐克及孙士财操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由脱帅提供; 数据分析由刘玉国、脱帅、徐克及孙士财完成; 本文写作由刘玉国与脱帅完成。

通讯作者: 脱帅, 110003, 辽宁省沈阳市, 中国人民解放军第202医院普通外科。lqztcw@sina.com

电话: 0429-8900326

收稿日期: 2008-12-29 修回日期: 2009-02-16

接受日期: 2009-02-23 在线出版日期: 2009-03-28

Clinicopathological features of primary liver lymphoma and its surgical therapy

Yu-Guo Liu, Shuai Tuo, Ke Xu, Shi-Cai Sun

Yu-Guo Liu, Ke Xu, Shi-Cai Sun, Department of Hepatobiliary Surgery, the 313rd Hospital of Chinese PLA, Huludao 125000, Liaoning Province, China

Shuai Tuo, Department of General Surgery, the 202nd Hospital of Chinese PLA, Shenyang 110003, Liaoning Province, China

Correspondence to: Shuai Tuo, Department of General Surgery, the 202nd Hospital of Chinese PLA, Shenyang 110003, Liaoning Province, China. lqztcw@sina.com

Received: 2008-12-29 Revised: 2009-02-16

Accepted: 2009-02-23 Published online: 2009-03-28

Abstract

AIM: To study clinicopathological features of primary liver lymphoma (PLL) and its diagnostic as well as therapeutic methods.

METHODS: Seven cases of primary liver lymphoma, diagnosed and treated at our hospital during 1975 and 2008, were retrospectively studied. The etiology, clinical presentations, morphology (detected by light microscopy, electron microscopy, or immunohistochemistry), serological tests of alpha fetal protein (AFP), carcinoma embryonic antigen (CEA), hepatitis B surface antigen (HBsAg), and lactate dehydrogenase (LDH), as well as therapeutic results were systematically analyzed.

RESULTS: Of the 7 patients, 4 patients presented with epigastric pain and fever, and 3 patients had

fever, night sweats, and loss of weight. Five patients were complicated with chronic hepatitis or cirrhosis. Histopathological findings showed that 5 patients were B cell phenotype with positive staining of CD20 and CD79 α . Electron microscopy of B cell lymphoma revealed an abundance of blood capillaries among tumor cells and organelles in cytoplasm. The other 2 patients belonged to T cell phenotype with positive expression of CD3 and CD45RO. Scant cytoplasm and few of organelles were prominent ultrastructural characteristics of T cell lymphoma. Serological test showed that 5 patients were negative for AFP and CEA, and HBsAg was positive in 5 patients. LDH level was elevated (range: 675.54 U/L-1246.5 U/L). The longer survival time was achieved in the 3 patients treated by surgical resection plus biochemotherapy (average survival: 23 months), compared with the 4 patients receiving surgical resection plus chemotherapy (average survival: 9.5 months).

CONCLUSION: Hepatitis B virus (HBV) infection is prevalent in PLL patients. The major clinicopathological features of PLL include B symptoms, space-occupying lesion in the liver, and elevated LDH level. Surgical resection plus biochemotherapy is a more effective approach, which prolongs survival time of PLL patients.

Key Words: Liver neoplasm; Malignant lymphoma; Biochemotherapy

Liu YG, Tuo S, Xu K, Sun SC. Clinicopathological features of primary liver lymphoma and its surgical therapy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(9): 935-939

摘要

目的: 探讨原发性肝恶性淋巴瘤(primary liver lymphoma, PLL)的临床病理特点及诊治方法。

方法: 对我院1975-2008年收治的经病理确诊的7例原发性肝恶性淋巴瘤的病因、临床表现、形态学光镜、电镜、免疫组织化学、血清学甲胎蛋白(AFP)、乙型肝炎(HBsAg)、乳酸脱氢酶(LDH)和治疗结果进行系统分析。

结果: 本组7例患者, 4例均上腹痛发热, 3例有

■背景资料

原发性肝脏恶性淋巴瘤(PLL)发病率占肝脏恶性肿瘤的0.1%, 占结外淋巴瘤的0.4%。按照结外淋巴瘤的定义, PLL是指病变局限于肝内, 早期无淋巴结及肝外扩散具有淋巴细胞标记的恶性肿瘤。其病因学和发病机制尚不清楚, 无特异临床症状, 术前误诊率高, 往往误诊为原发性肝癌或肝转移性肿瘤。目前, PLL标准的治疗方法尚未确定。

■同行评议者

孙殿兴, 主任医师, 白求恩国际和平医院肝病科

■ 研究前沿

原发性肝淋巴瘤临床罕见, 自从Ata于1965年首次报道以来, 至今英语文献仅251例, 其病因和发病机制尚不清楚。

淋巴瘤B症状, 发热、盗汗、体质量减轻。有5例合并慢性肝炎或肝硬化。组织病理学5例为B细胞表型。免疫组织化学显示CD20、CD79 α 阳性, 电镜示瘤细胞间毛细血管、胞质细胞器发达。2例为T细胞表型, CD3、CD45RO阳性, 电镜下瘤细胞质稀疏, 细胞器不发达。血清学检查5例AFP和CEA阴性。5例HBsAg阳性, 2例HBsAg阴性。LDH 675.54 U/L-1246.5 U/L。4例术后采用化疗者生存时间平均为9.5 mo。3例术后采用生物化疗者生存时间为23.0 mo。

结论: PLL与HBV病毒感染有关; 伴有B症状, 常见肝内占位性病变和LDH增高; 首选手术切除联合生物化疗的治疗模式; 能够延长患者的生存时间。

关键词: 肝肿瘤; 恶性淋巴瘤; 生物化疗

刘玉国, 脱帅, 徐克, 孙士财. 原发性肝淋巴瘤的临床病理特点及其外科治疗. 世界华人消化杂志 2009; 17(9): 935-939
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/935.asp>

0 引言

原发性肝脏恶性淋巴瘤(primary lymphoma of the liver, PLL)发病率占肝脏恶性肿瘤的0.1%, 占结外淋巴瘤的0.4%^[1-2]。按照结外淋巴瘤的定义, PLL是指病变局限于肝内, 早期无淋巴结及肝外扩散具有淋巴细胞标记的恶性肿瘤^[3]。其病因学和发病机制尚不清楚, 无特异临床症状, 术前误诊率高, 往往误诊为原发性肝癌或肝转移性肿瘤^[4]。目前, PLL标准的治疗方法尚未确定。本研究收集了中国人民解放军第313医院于1975-01/2008-10收治的7例PLL患者的临床资料, 并结合相关文献, 回顾性分析其临床病理特征和治疗方式对患者生存状况的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 1975-01/2008-10我院普通肝胆外科病房收治的经病理学和手术证实的PLL 7例, 男性5例, 女性2例, 年龄25-59(平均44.57 \pm 12.62)岁。

1.2 方法

1.2.1 组织学和免疫组织化学检查: 所有病例手术切除瘤组织经40 g/L中性甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋, 切片厚度4 μ m, 行HE染色。对所有病例石蜡包埋组织切片行多个免疫组织化学染色观察。采用LSAB法, 包括CD20、CD3、CD79a、CD45RO(购自美国Dako公司)。

1.2.2 电镜检查: 肿瘤组织以25 g/L戊二醛和10 g/L锇酸双重固定, Epon包埋, 超薄切片, 铀-铅染

色、PHIPIS-CM10透射电镜观察。

1.2.3 诊断标准及方法: 按照WHO《造血与淋巴瘤组织肿瘤疾病》结外淋巴瘤的诊断分类方法^[5]。(1)临床症状主要由肝浸润引起;(2)无其他组织、器官侵犯和远处淋巴结肿大;(3)无外周血白细胞浸润;(4)骨髓像正常。诊断以手术标本的病理诊断为准。

1.2.4 治疗方法: 手术7例, 手术方式部分肝叶切除; 手术者中, 手术加化疗4例, [化疗CHOP方案(环磷酰胺, 多柔比星, 长春新碱, 泼尼松)]疗程4-6 wk。手术加生物化疗3例, [生物化疗(生物治疗树突状细胞dendritic cell, DC)回输治疗为主, 辅以细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine induced killer, CIK)白介素2(interleukin-2, IL-2), α -干扰素(interferon- α , INF- α), 粒单核细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)]等免疫治疗。

2 结果

2.1 临床资料 7例患者均符合原发性肝恶性淋巴瘤诊断标准。首发症状肝区胀痛或上腹不适4例。B超常规检查发现肝内占位7例, 扪及肿块4例。发热、盗汗、体质量减轻3例, 无浅表淋巴结肿大。患慢性肝炎或肝硬化者5例。血清学检查: 5例AFP和CEA阴性。2例AFP阳性, 1例CA19-9阳性, 5例HBsAg阳性, 2例HBsAg阴性, LDH 657.5-1246.5 U/L。所有患者外周血涂片均未发现幼稚白细胞。4例骨髓穿刺细胞学检查未发现异常细胞。CT、胸片及手术均未发现其他器官占位病灶, 临床特点见表1。

2.2 治疗方式与生存状况 本组手术加化疗者4例, 平均生存时间为9.5 mo。3例手术加生物治疗者生存时间为23.0 mo。影像学检查: 7例患者超声检查病灶7个, 检出率100%。超声考虑血管瘤3例, 误诊率42.8%; CT检查7次; 诊断为肝细胞肝癌5例, 误诊率71.4%; MRI诊断肝癌和血管瘤各1例, 误诊率28.5%。

2.3 组织病理及免疫组织化学检查 病理学检查: 所有肝脏标本都含有单个大肿瘤(除1例多个结节或弥散存在的肿块), 4例位于肝左叶, 2例位于肝右叶, 1例位于肝脏中央。大体上肿瘤与其他原发性肝脏肿瘤类似, 但肿瘤切面十分特征, 即瘤结节中间部分黄白色, 周边有红色不规则充血带。

组织学检查: 瘤细胞呈弥漫性分布, 细胞较大, 呈圆形, 卵圆形或不规则形。核大浓染, 核膜

表 1 7例PLL患者临床特点

病例	性别/ 年龄(岁)	临床症状 /体征	病史	化验	影像学	治疗	组织学	诊断后 生存 (mo)
1	男/59	右上腹隐 痛, 发热, 浅 表LN(-)	乙肝病 史20年	HBsAg(+)/AFP(-) CEA(-)骨髓及血常 规正常	CT: 肝左叶内见 一直径8 cm低密 度影; B超发现肝 占位	肝不规则切 除术, CHOP 方案6周期	B细胞性低度恶 性, 破坏汇管区浸 润	12
2	女/51	右上腹隐 痛, 合并肝 硬化, 浅表 LN(-)	乙肝病 史18年	AFP(-), CEA(-)肝功 正常, 血常规正常	CT: 肝右叶内见 一直径5 cm低密 度影; B超发现肝 占位	肝不规则切 除术, CHOP 方案6周期	T细胞性低度恶性 淋巴瘤, 肝细胞 癌, 破坏肝窦隙和 汇管区浸润	10
3	男/25	发热, 浅表 LN(-)	乙肝携 带者8年	AFP(-), CEA(-)JLDH 增高, 血常规正常	CT: 肝左叶内见 一直径6 cm低密 度影; B超发现肝 占位	肝不规则切 除术CHOP方 案6周期放疗	霍奇金氏恶性淋 巴瘤, 破坏性肝窦 隙和汇管区浸润	11
4	女/31	右上腹隐 痛, 发热, 合 并肝硬化, 浅表LN(-)	乙肝病 史5年	AFP(+), CEA(-), CA199(+), r-GT增 高, 血常规正常	CT: 肝右叶内见 一直径14 cm低 密度影; B超发现 肝占位	肝不规则切 除术, CHOP 方案6周期	T细胞性恶性淋巴 瘤, 腹膜后恶性神 经鞘瘤, 肝脏大部 分被瘤组织替代	5
5	男/41	偶有上腹部 疼痛, 浅表 LN(-)	乙肝病 史10年	AFP(-), CEA(-), 肝 功正常, 血常规正常	MRI: 两肝有多 个结节或团块 状信号区大小 2.8-7.1 cm, B超 发现肝占位	肝肿瘤切除 术, 生物化疗	非霍奇金大B细胞 性, 破坏性肝窦隙 和汇管区浸润	24
6	男/52	无任何不 适, 浅表 LN(-)	-	AFP(-), 肝功正常, 抗-HCV(+), 血常 规正常	CT: 肝左叶内5 cm × 7 cm大小 低密度占位性病 变; B超发现肝 占位B超发现左 肝占位	肝不规则切 除术, 生物化 疗	大B细胞性, 破坏 性肝窦隙和汇管 区浸润	14
7	男/53	偶有上腹部 疼痛, 发热, 浅表LN(-)	乙肝病 史13年	AFP(-), CEA(-), 肝 功正常, 血常规正常	CT: 肝右叶内见 一直径6 cm × 5 cm低密度影; B 超发现肝占位	肝不规则切 除术, 生物化 疗	非霍奇金B细胞源 性, 肝脏大部分被 瘤组织替代, 破坏 性肝窦隙和汇管 区浸润	31

■相关报道

Aozasa *et al*在所研究的69例PLL患者中HBV阳性检出率为20%, 在PLL发病之前有9.6%-44%的患者有慢性肝病. Ohsawa *et al*首次报道了在PLL病例的淋巴瘤细胞中检测到HCV基因组, HCV的直接形式通过感染肝细胞引起外源性抗原刺激参与PLL发生有关.

厚, 染色质不均匀. 可见核仁, 胞质少, 可见多核瘤细胞, 病理核分裂象多见(图1A). 肿瘤周边肝组织的汇管区, 可见小叶间静脉, 小叶间动脉、小叶间胆管和大量成熟的淋巴细胞(图1B). 瘤细胞侵入并破坏临近肝组织和汇管区内胆管、静脉和动脉(图1C-D). 免疫组化检查证实5例为非霍奇金B细胞性淋巴瘤. 对CD20CD79a呈阳性表达; 2例为非霍奇金T细胞淋巴瘤, 对CD3、CD45RO呈阳性表达.

电镜检查: 瘤细胞形态、大小不规则. 瘤细胞内毛细胆管扩张, 腔面微绒毛减少. 腔内有胆汁淤滞, 胆栓形成. 相邻细胞有紧密联接, 细胞核明显不规则, 胞质内可见粗面内质网、线粒

体及空泡结构(图2A). 瘤细胞呈圆形、椭圆形及不规则形. 胞质比例大, 核形有的比较规则, 周界平滑整齐, 有的核膜不规则, 有较深凹陷, 核内异染色质成小块沿核膜分布, 可见核仁, 胞质稀疏, 细胞器少, 可见少量变性线粒体及短小扩张粗面内质网(图2B).

3 讨论

原发性肝淋巴瘤临床罕见, 自从Ata于1965年首次报道以来, 至今英语文献仅251例^[5]. 其病因和发病机制尚不清楚. 文献报道, 免疫系统异常, 或乙肝病毒(HBV)/丙肝病毒(HCV)诱发的慢性活动型肝炎在PLL发生、发展中起重要作用^[6].

■应用要点

首选手术切除联合生物化疗的治疗模式;能够延长患者的生存时间.

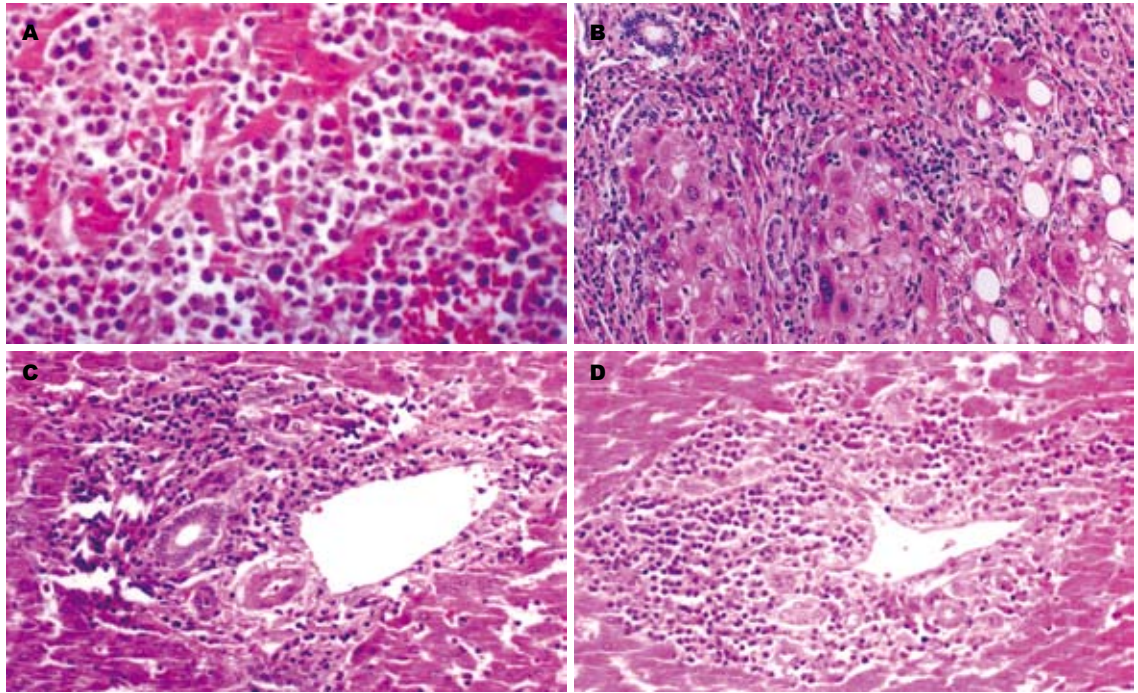


图1 PLL组织学检查结果. A: 淋巴瘤细胞弥漫侵袭肝组织, 肝索断裂(HE染色 $\times 200$); B: PLL瘤灶周边肝组织切片, 示汇管区内大量成熟的淋巴细胞(HE染色 $\times 150$); C: PLL肝瘤组织切片, 瘤细胞侵入并破坏汇管区胆管(胆管内形成瘤栓样结构)、静脉和动脉(HE染色 $\times 150$); D: PLL肝组织切片, 瘤细胞侵入并破坏肝组织和汇管区内胆管、静脉、动脉(HE染色 $\times 200$).

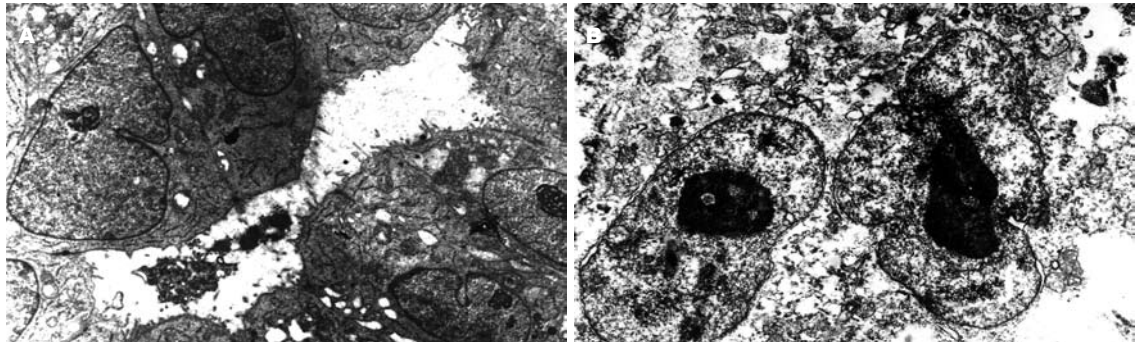


图2 PLL电镜检查结果. A: PLL瘤细胞形态、大小不规则, 瘤细胞内毛细胆管扩张, 腔面微绒毛减少; 腔内有胆汁淤滞, 胆栓形成; 相邻细胞有紧密联接, 细胞核明显不规则, 胞质内可见粗面内质网、线粒体及空泡结构($\times 8140$); B: PLL瘤细胞呈不规则形, 胞质比例大, 核膜不规则, 有较深凹陷, 核内异染色质成小块沿核膜分布, 可见核仁, 胞质稀疏, 细胞器少, 可见少量变性线粒体及短小扩张粗面内质网($\times 7700$).

Aozasa *et al*^[7]在所研究的69例PLL患者中HBV阳性检出率为20%, 在PLL发病之前有9.6%-44%的患者有慢性肝病^[8]. 本组亦有5例有HBV感染, 2例有结节性肝硬化改变. Ohsawa *et al*^[4]首次报道了在PLL病例的淋巴瘤细胞中检测到HCV基因组, HCV的直接形式通过感染肝细胞引起外源性抗原刺激参与PLL发生有关. PLL组织发生可能起源于肝脏汇管区内的淋巴组织. 作者不仅观察到肿瘤周围汇管区可见到大量成熟淋巴细胞浸润, 而且观察到瘤细胞弥漫浸润肝脏, 破坏汇管区胆管及肝小叶结构. 本研究结果证实了PLL组织发生起源于肝脏汇管区的淋巴细胞以及肝炎

病毒长期持续刺激可诱发细胞恶变是造成PLL发生的重要因素. 另外, PLL和自身免疫病或工业毒素有关^[9]. 本组患者未发现这些危险因素.

PLL诊断标准不一, 根据外淋巴瘤的诊断标准^[10-11]: (1)临床症状主要为肝脏浸润引起的; (2)无其他组织、器官侵犯和远处淋巴结肿大; (3)无外周白细胞浸润; (4)骨髓像正常. 本组病例皆符合上述诊断标准. 既往文献表明^[12]PLL典型地发生在50岁男性, 但是, 患者年龄范围实际分布很广. 本文报道的病例中有5例男性, 年龄在25-59岁之间, 2例女性, 年龄分别为31岁和51岁, 平均年龄44.57岁. 男、女比是5:2与文献报道相似.

PLL临床特征表现为, 上腹部疼痛、食欲减退、呕吐等消化道症状. 淋巴瘤B症状, 消瘦、发热、体重减轻. 体检, 肝肿大. 实验室检查血清转氨酶、乳酸脱氢酶(LDH)、 β -2微球蛋白升高, 血小板减少. 肿瘤标志物(AFP、CEA)在正常范围内. 本组病例中4例上腹部疼痛和肝肿大较为明显. PLL患者中有B症状者占一半以上, 提示伴有B症状的肝占位性病变, 必须要考虑到PLL鉴别诊断. Page *et al*^[11]通过动态观察PLL变化, 发现术前LDH明显升高, 术后PLL常下降至正常. 本组病例中有5例LDH术前增高, 术后LDH降至正常. 认为LDH可作为诊断PLL和判断预后的指标.

PLL为单发病灶(60%), 也可为多发(35%), 极少为肝内浸润性(4%)^[8]. 大体病理特点可分为单发肿块型, 多发结节型和弥漫浸润型, 其中多数为单发肿块型, 而弥漫浸润型很少见^[10]. 免疫组化检查显示PLL分型79%是B细胞型并且在PLL中真性组织细胞性淋巴瘤发生率数较其他结外淋巴瘤为高. PLL患者的骨髓像检查一般无特殊异常, 最终诊断依赖于手术后的病理诊断, 免疫组化检查对于明确PLL的表型和鉴别诊断具有重要价值.

由于PLL临床少见, 临床尚缺少统一的治疗方案. 多数学者认为手术切除仍是目前PLL最主要和最有效的治疗方法^[13]. 其不但可切除肿瘤, 且可明确诊断, 确定肿瘤分期以指导下一步的治疗, 并判断预后.

关于手术与手术加化疗的疗效比较已有报道, Lei *et al*^[2]报道了10例PLL单纯根治性手术, 平均生存期22 mo. Avlonieis *et al*^[14]报道了14例PLL手术加化疗, 平均生存期为20.7 mo, 结果显示, 单纯手术组与手术加化疗组的生存率比较, 差异均无统计学意义. 本研究在PLL手术加化疗治疗的基础上, 采用生物治疗与化疗合并使用, 即生物化学治疗(biochemotherapy). 生物治疗是以DC回输治疗为主, 辅助以CIK细胞和IL-2, INF- α , GM-CSF等免疫治疗. 本组7例PLL术后的患者中, 4例术后加化疗组, 生存时间平均为9.5 mo; 3例术后加生物化疗, 平均生存时间为23.0 mo. 本研究发现, PLL可能具有人群差异, 我国PLL患者与文献报道的白种PLL患者其生物学行为不同, 我国人群PLL以B症状为显著表现, 呈现高度侵袭性临床过程, 对局部和系统性治疗效果差, 生存期短.

虽然本组病例数有限, 未能进行统计比较,

但仍然显示, 对于PLL手术后采用生物化疗能够获得满意的效果. 并且在我们临床应用中, 患者对生物化疗具有良好的耐受性, 没有观察到明显的不良反应. 研究结果提示, 生物化疗对PLL的治疗有显著疗效.

4 参考文献

- 1 Page RD, Romaguera JE, Osborne B, Medeiros LJ, Rodriguez J, North L, Sanz-Rodriguez C, Cabanillas F. Primary hepatic lymphoma: favorable outcome after combination chemotherapy. *Cancer* 2001; 92: 2023-2029
- 2 Eom DW, Huh JR, Kang YK, Lee YS, Yu E. Clinicopathological features of eight Korean cases of primary hepatic lymphoma. *Pathol Int* 2004; 54: 830-836
- 3 Fernandez MP, Redvanly RD. Primary hepatic malignant neoplasms. *Radiol Clin North Am* 1998; 36: 333-348
- 4 Ohsawa M, Tomita Y, Hashimoto M, Kanno H, Aozasa K. Hepatitis C viral genome in a subset of primary hepatic lymphomas. *Mod Pathol* 1998; 11: 471-478
- 5 Santos ES, Raez LE, Salvatierra J, Morgensztern D, Shanmugan N, Neff GW. Primary hepatic non-Hodgkin's lymphomas: case report and review of the literature. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2789-2793
- 6 Bronowicki JP, Bineau C, Feugier P, Hermine O, Brousse N, Oberti F, Rousselet MC, Dharancy S, Gaulard P, Flejou JF, Cazals-Hatem D, Labouyrie E. Primary lymphoma of the liver: clinical-pathological features and relationship with HCV infection in French patients. *Hepatology* 2003; 37: 781-787
- 7 Aozasa K, Mishima K, Ohsawa M. Primary malignant lymphoma of the liver. *Leuk Lymphoma* 1993; 10: 353-357
- 8 Ohsawa M, Aozasa K, Horiuchi K, Kataoka M, Hida J, Shimada H, Oka K, Wakata Y. Malignant lymphoma of the liver. Report of five cases and review of the literature. *Dig Dis Sci* 1992; 37: 1105-1109
- 9 DeMent SH, Mann RB, Staal SP, Kuhajda FP, Boitnott JK. Primary lymphomas of the liver. Report of six cases and review of the literature. *Am J Clin Pathol* 1987; 88: 255-263
- 10 Baschinsky DY, Weidner N, Baker PB, Frankel WL. Primary hepatic anaplastic large-cell lymphoma of T-cell phenotype in acquired immunodeficiency syndrome: a report of an autopsy case and review of the literature. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 227-232
- 11 Maher MM, McDermott SR, Fenlon HM, Conroy D, O'Keane JC, Carney DN, Stack JP. Imaging of primary non-Hodgkin's lymphoma of the liver. *Clin Radiol* 2001; 56: 295-301
- 12 Lei KI. Primary non-Hodgkin's lymphoma of the liver. *Leuk Lymphoma* 1998; 29: 293-299
- 13 Scoazec JY, Degott C, Brousse N, Barge J, Molas G, Potet F, Benhamou JP. Non-Hodgkin's lymphoma presenting as a primary tumor of the liver: presentation, diagnosis and outcome in eight patients. *Hepatology* 1991; 13: 870-875
- 14 Avlonitis VS, Linos D. Primary hepatic lymphoma: a review. *Eur J Surg* 1999; 165: 725-729

■同行评价

原发性肝脏淋巴瘤在临床上十分罕见, 文献报道也较少. 本文报道了7例该病患者, 对其各种临床资料进行了分析, 研究内容重要, 提供了许多有意义的信息.

血浆脑钠肽原对肝硬化难治性腹水的判断价值

陈峰松, 赵建妹, 王爱华, 何荣丽, 马文婷

■背景资料

腹水和肝性脑病、上消化道出血是肝硬化的三大并发症。按国际腹水俱乐部定义腹水可分为UA和RA, RA又包括利尿剂拮抗性腹水和利尿剂使用障碍型腹水两种类型。而脑钠肽是利钠肽家族成员之一, 具有利钠利尿扩血管的生理作用, 同时在水钠滞留的病理生理中亦起着重要作用。

陈峰松, 赵建妹, 王爱华, 何荣丽, 马文婷, 江苏省常州市第一人民医院(苏州大学附属第三医院)消化内科 江苏省常州市 213003

作者贡献分布: 此课题由陈峰松与赵建妹设计; 研究过程由陈峰松、赵建妹、王爱华、何荣丽及马文婷完成; 数据分析由陈峰松与何荣丽完成; 论文写作由陈峰松与马文婷完成。

通讯作者: 陈峰松, 213003, 江苏省常州市局前街185号, 江苏省常州市第一人民医院(苏州大学附属第三医院)消化内科。

cfs@sina.com

电话: 0519-86181102

收稿日期: 2008-10-20 修回日期: 2008-10-30

接受日期: 2008-11-17 在线出版日期: 2009-03-28

Value of serum plasma pro-brain natriuretic peptide in the diagnosis of refractory ascites due to cirrhosis

Feng-Song Chen, Jian-Mei Zhao, Ai-Hua Wang, Rong-Li He, Wen-Ting Ma

Feng-Song Chen, Jian-Mei Zhao, Ai-Hua Wang, Rong-Li He, Wen-Ting Ma, Department of Gastroenterology, the First People's Hospital of Changzhou (the Third Hospital Affiliated to Soochow University), Changzhou 213003, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Feng-Song Chen, Department of Gastroenterology, the First People's Hospital of Changzhou (the Third Hospital Affiliated to Soochow University), 185 Juqian Street, Changzhou 213003, Jiangsu Province, China. cfs@sina.com

Received: 2008-10-20 Revised: 2008-10-30

Accepted: 2008-11-17 Published online: 2009-03-28

Abstract

AIM: To evaluate the relationship between the plasma levels of pro-brain natriuretic peptide (proBNP) with cirrhosis severity, and to determine whether the plasma proBNP is valuable for diagnosis of refractory ascites (RA).

METHODS: The plasma levels of proBNP in 38 patients with cirrhosis were analyzed by ELISA, and the effect of proBNP on diagnosis of RA was by ROC.

RESULTS: Plasma proBNP was significantly increased in cirrhotic patients compared with healthy subjects (228.0 ± 83.4 pmol/L vs 127.4 ± 21.1 pmol/L), and was significantly correlated with CTP score ($r = 0.774, P < 0.01$). Levels of proBNP of patients with pre-ascites, uncomplicated ascites and refractory ascites were 169.8

± 51.3 , 238.8 ± 55.2 and 320.3 ± 63.4 pmol/L, respectively. The area values under the ROC curve generated by the proBNP were 0.857 in the diagnosis of RA, and the optimal threshold values of the proBNP was 264 pmol/L.

CONCLUSION: The plasma level of proBNP is correlated with cirrhosis severity and is valuable for diagnosis of refractory ascites.

Key Words: Liver cirrhosis; Pro Brain/B-type natriuretic peptide; Refractory ascites

Chen FS, Zhao JM, Wang AH, He RL, Ma WT. Value of serum plasma pro-brain natriuretic peptide in the diagnosis of refractory ascites due to cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(9): 940-944

摘要

目的: 探讨血浆脑钠肽原(proBNP)水平和肝硬化病情严重程度的相互关系, 及其对难治性腹水(RA)的判断价值。

方法: 用ELISA法检测38例不同腹水程度的肝硬化患者血浆proBNP水平, 应用ROC曲线及其下面积评价proBNP对RA的判断价值。

结果: 肝硬化患者血浆proBNP水平显著高于健康对照组(228.0 ± 83.4 pmol/L vs 127.4 ± 21.1 pmol/L), 且与CTP积分相关($r = 0.774, P < 0.01$)。肝硬化无腹水患者、非难治性腹水患者、难治性腹水患者proBNP水平分别为 169.8 ± 51.3 、 238.8 ± 55.2 、 320.3 ± 63.4 pmol/L, 组间差异有统计学意义。血浆proBNP判断RA的ROC曲线下面积为0.857, 其最佳临界值为264 pmol/L。

结论: 肝硬化患者血浆proBNP水平升高且与病情严重程度相关, 同时对难治性腹水具有良好的判断价值。

关键词: 肝硬化; 脑钠肽原; 难治性腹水

陈峰松, 赵建妹, 王爱华, 何荣丽, 马文婷. 血浆脑钠肽原对肝硬化难治性腹水的判断价值. *世界华人消化杂志* 2009; 17(9): 940-944

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/940.asp>

■同行评议者

张吉翔, 教授, 南昌大学第二附属医院消化内科

0 引言

腹水是肝硬化的常见并发症之一, 包括非难治性腹水(uncomplicated ascites, UA)和难治性腹水(refractory ascites, RA). 其中RA指在限钠饮食和大剂量使用利尿剂(呋塞米160 mg/d, 螺内酯400 mg/d)后仍治疗无效, 或药物治疗以及治疗性腹腔穿刺抽取腹水好转后短期内腹水快速复发^[1-4]. RA患者病情重、单纯内科药物治疗效果不佳、预后差, 故如何早期发现、早期治疗, 尤为重要. 而脑钠肽(brain/B-type natriuretic peptide, BNP)属于利钠肽(natriuretic peptide, NP)家族成员, 具有排钠利尿、扩血管、降压等作用. 研究发现, 肝硬化患者血浆BNP及其前体proBNP水平升高, 且和病情严重程度以及门脉高压、水钠储留等密切相关^[5-7]. 本文旨在探讨肝硬化患者血浆脑钠肽原(proBNP)水平和肝硬化病情的相互关系, 及其对肝硬化难治性腹水的判断价值.

1 材料和方法

1.1 材料 选择我院2008-03/2008-07间肝硬化住院患者38例为肝硬化组, 其中男22例, 女16例, 年龄31-82(平均59.0±13.0)岁. 所有患者均经病史、症状和体征、生化、影像学、组织学结果等确诊, 肝硬化诊断符合2000年西安全国传染病和寄生虫病学术会议修订的诊断标准. 并将有急慢性呼吸系统疾病、高血压、冠心病、风湿病、传导阻滞、肾功能不全、甲状腺疾病、电解质紊乱、糖尿病和高脂血症、有酗酒史、3 mo内有上消化道出血者均排除在外.

我院正常健康体检人群20例为对照组, 其中男14名, 女6名, 年龄25-80(平均58.5±16.0)岁. 无心、肝、肾、肺等重大脏器疾病, 血压正常, 血脂、血糖、肝肾功能、电解质均正常, 乙肝三系阴性, 无酗酒史, 近期均无服用药物史.

1.2 方法

1.2.1 血样采集: 所有入选对象均于治疗前清晨空腹抽取肘静脉血2 mL, 以EDTA抗凝, 于2 h内以3000 r/min离心15 min, 分离血浆, 置于-80℃冰箱保存待测. 同时采集其余血样并送相关实验室检测血常规、肝肾功能、血脂、电解质、凝血功能等.

1.2.2 proBNP的检测: 采用ELISA法检测, 使用美国ADL公司提供的proBNP试剂盒, 严格按试剂盒说明书操作并计算结果.

1.2.3 难治性腹水的判断: 所有患者入院当天即接受B超和/或腹部CT检查, 观察腹水情况, 并

测量体质量和腰围; 治疗过程中, 动态监测体质量、腰围、日尿量变化, 定期复查B超和/或腹部CT、血电解质、肝肾功能等相关项目. 按照文献^[3]国际腹水俱乐部(International Club of Ascites, ICA)标准对难治性腹水患者做出判断, 并以此结果为金标准, 对proBNP判断RA的准确性进行ROC曲线(ROC curve)分析.

国际腹水俱乐部RA诊断标准^[3]: (1)大剂量利尿剂(呋塞米160 mg/d, 螺内酯400 mg/d)治疗时间≥1 wk, 同时限钠饮食(每日低于5.2 g); (2)利尿剂无效, 服大剂量利尿剂的最后4 d体质量平均减轻<200 g/d或尿钠排泄量<钠盐摄入量; (3)腹水早期复发定义为最初药物治疗有效, 腹水消除后4 wk内又出现中到重度腹水, 但不包括腹穿放腹水后3 d内出现的腹水; (4)出现利尿剂诱发的并发症, 包括: 肝性脑病; 肾功能减退, 血清肌酐升高一倍且>20 mg/L(176.8 μmol/L); 低血钠, 血清钠<125 mmol/L且较使用利尿剂前降低10 mmol/L以上; 血清钾>6 mmol/L或<3 mmol/L.

统计学处理 计数资料应用 χ^2 检验; 计量资料用mean±SD表示, 如果数据成正态分布且方差齐性, 多组数据间比较用单因素方差分析检验(one way ANOVA), 两组间均数差异采用t检验; 否则, 多组间行非参数秩和检验(Kruskall-Wallis H Test), 两组间比较使用Mann-Whitney U检验. 相关分析采用Spearman相关检验. 统计分析用SPSS15.0软件进行; ROC曲线分析用Medcalc9.4.1.1进行. $P<0.05$ 认为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 临床特征 38例患者中, 乙肝后肝硬化33例, 乙肝和血吸虫混合性肝硬化2例, 原发性胆汁性肝硬化2例, 血吸虫性肝硬化1例; 按Child-Turcotte-Pugh(CTP)分级, A级6例, B级21例, C级11例; 按腹水程度分, 无腹水患者9例, 非难治性腹水21例, 难治性腹水8例, 各组研究对象纳入时临床特征见表1. 对照组和肝硬化组年龄、性别之间差异无统计学意义(均 $P>0.05$).

2.2 肝硬化组患者和对照组血浆proBNP水平 肝硬化组和对照组血浆proBNP水平分别为228.0±83.4 pmol/L和127.4±21.1 pmol/L, 组间差异有统计学意义(表1).

2.3 不同CTP分级肝硬化患者proBNP水平及其与CTP积分相关性 CTP分级A、B、C级的患者proBNP水平分别为142.1±30.2、197.0±

■ 研发前沿

难治性腹水是肝硬化的并发症之一, 治疗效果和预后均较差. 而TIPS和自身腹水浓缩回输等治疗方法的效果也存在一定的争议. 如何早期发现RA患者, 并寻找更为有效的治疗方法已成为目前的研究热点和亟需解决的问题.

■ 相关报道

Kalambokis *et al* 报道顽固性腹水患者皮下注射奥曲肽, 能够改善肾功能和血流动力学, 提高利尿剂疗效, 同时明显减少肾素和血管紧张素的生成. 从而认为奥曲肽对肝硬化顽固性腹水具有一定的治疗作用.

■创新盘点

本文通过对肝硬化患者血浆proBNP水平进行研究,在探索其和病情严重程度、腹水程度之间关系的基础上,运用ROC曲线分析获取proBNP判断肝硬化难治性腹水的最佳临界值。

表 1 肝硬化组和对照组临床特征 (mean ± SD)

	肝硬化组(按腹水程度)				对照组(n = 20)
	无腹水(n = 9)	UA(n = 21)	RA(n = 8)	全部患者(n = 38)	
年龄(岁)	55.6 ± 7.1	60.9 ± 13.7	57.9 ± 16.0	59.0 ± 13.0	58.5 ± 16.0
性别(男/女)	5/4	14/7	3/5	22/16	14/6
谷丙转氨酶(U/L)	28.3 ± 16.3 ^a	46.1 ± 28.0 ^{ae}	67.9 ± 27.1 ^{ae}	60.9 ± 36.7 ^a	20.6 ± 7.3
总胆红素(μmol/L)	19.3 ± 11.2 ^a	62.8 ± 95.2 ^a	88.1 ± 66.4 ^{ae}	57.8 ± 79.6 ^a	10.0 ± 4.0
凝血酶原时间(s)	12.3 ± 1.6 ^a	14.4 ± 5.24 ^a	15.8 ± 3.0 ^{ae}	14.2 ± 4.3 ^a	10.4 ± 2.4
肌酐(μmol/L)	72.9 ± 11.5	80.1 ± 20.0	87.1 ± 39.9	81.0 ± 26.2	74.1 ± 12.6
INR	1.10 ± 0.12 ^a	1.28 ± 0.43 ^a	1.40 ± 0.27 ^{ae}	1.27 ± 0.36 ^a	0.98 ± 0.08
proBNP(pmol/L)	169.8 ± 51.3 ^a	238.8 ± 55.2 ^{ae}	320.3 ± 63.4 ^{ae}	228.0 ± 83.4 ^a	127.4 ± 21.1

^aP<0.05 vs 对照组; ^eP<0.05 vs UA; ^{ae}P<0.05 vs 无腹水; 对照组正常参考值, 谷丙转氨酶<45 U/L、总胆红素<17.1 μmol/L、凝血酶原时间<14 s、肌酐<144 μmol/L、INR 0.8-1.2、proBNP<150 pmol/L。

表 2 以ICA标准和proBNP判断RA比较 (n)

ICA标准	以proBNP水平判断		合计
	UA	RA	
UA	17	4	21
RA	1	7	8
合计	18	11	29

两方法之间差异无统计学意义, Fisher确切概率法P = 0.001。

48.2、334.2 ± 41.6 pmol/L, 组间差异有统计学意义。proBNP水平和CTP积分的相关系数r = 0.774(P<0.01), 两者呈正相关(图1)。

2.4 不同腹水程度患者proBNP水平 肝硬化患者中无腹水者proBNP水平为169.8 ± 51.3 pmol/L; 非难治性腹水患者为238.8 ± 55.2 pmol/L; 难治性腹水患者为320.3 ± 63.4 pmol/L; 组间差异均有统计学意义(表1)。

2.5 proBNP水平判断难治性腹水的ROC曲线分析 proBNP判断难治性腹水的ROC曲线下面积为0.857, 95%可信区间为0.677-0.958(图2)。根据Yoden指数获取proBNP判断难治性腹水的最佳临界值为264 pmol/L。以该临界值为参照标准, 血浆proBNP判断肝硬化难治性腹水的灵敏度为87.50%, 特异度为80.95%, 阳性似然比为4.59, 阴性似然比为0.15(表2)。

3 讨论

腹水是肝硬化最常见的并发症之一, 50%的患者在确诊为肝硬化后的10年内会出现腹水, 腹水又包括UA和RA。难治性腹水占肝硬化腹水患者总数的5%-10%, 其病情重、单纯内科药物治疗效果差, 1年内死亡率大于50%, 所以如何早期发

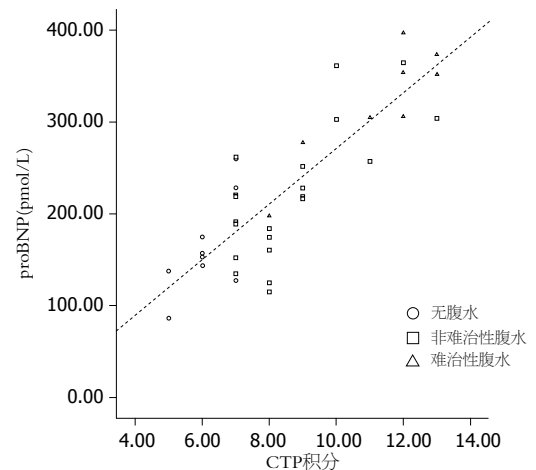


图 1 proBNP和CTP积分关系图。

现、诊断难治性腹水患者, 并及时给予TIPS、自身腹水回输等有效治疗尤显重要。

BNP主要由心室产生和分泌, 心室负荷、室壁张力改变是刺激其分泌的主要条件^[8], 其调节主要基于基因水平^[9]。在表达中首先在心室细胞内翻译成含有134个氨基酸的前原脑钠肽(pre-proBNP)。受刺激释放时, 切除N末端26个氨基酸后生成由108个氨基酸组成的proBNP, 后者进一步在膜合丝氨酸蛋白酶的作用下裂解成无活性的76肽N末端脑钠肽原(N-terminal proBNP, NT-proBNP)和32肽有活性的BNP^[10-11]。BNP通过和尿钠肽受体(natriuretic peptide receptors, NPR)结合产生生理效应, 包括: (1)扩血管、降压作用。BNP可减少血管内游离钙离子, 扩张血管, 降低肺毛细血管压、右房压力, 减少回心血流量、减少心输出量, 降低血压。(2)作用于肾上腺球状带, 抑制肾素-血管紧张素-醛固酮系统, 减少肾素和醛固酮的分泌, 抑制钠的重吸收; 同时作用

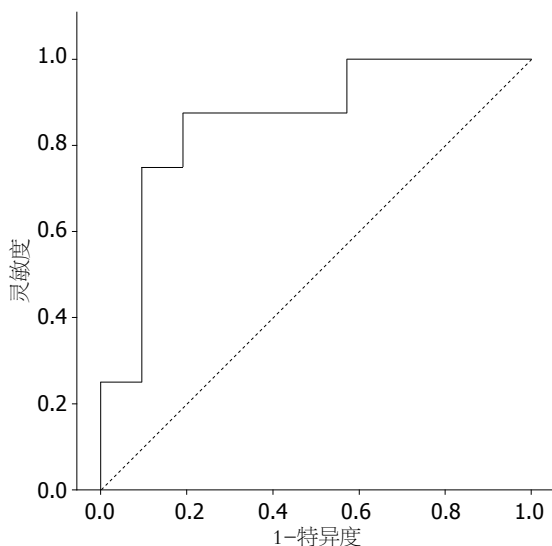


图 2 血浆proBNP判断难治性腹水的ROC曲线.

于肾小球旁器,舒张肾动脉、提高肾血流量、增加肾灌注压和肾小球率过滤,增加水的排出,从而起到利尿利钠作用. Holmes *et al*^[12]给常人iv BNP,可使醛固酮分泌减少二分之一,而钠排泄增加两倍.(3)拮抗交感系统,抑制交感神经张力,舒张血管平滑肌,扩张外周血管,降低外周阻力,减轻心脏后负荷.(4)抑制心肌纤维化和平滑肌细胞增值,调节心肌重构^[13].此外,BNP可抑制血管内皮细胞表达因子以及纤溶酶原激活抑制物-1,从而防止血栓形成^[14].近年研究发现,肝硬化患者血浆proBNP和BNP均显著高于健康对照组,且和肝硬化病情严重程度及门静脉压力相关.同时La Villa *et al*^[6]研究发现肝硬化合并腹水及水钠储留患者血浆BNP水平较无腹水患者显著升高,其原因主要有:(1)水钠储留、血容量扩张促进心室合成BNP;(2)肝硬化患者内源性血管活性系统活性增强,血管紧张素II、去甲肾上腺素等水平升高,促进BNP合成;(3)肾脏BNP受体反应性下降,反馈性的引起BNP升高;(4)肾功能下降,BNP灭活、排泄减少^[6-7].现阶段的研究较多的关注于BNP和肝硬化病情以及肝硬化心肌病的关系,对其在腹水形成和诊治中的作用研究较少.但BNP半衰期短、易受外源性BNP药物使用的影响,在临床有一定的局限性.本文探讨了BNP无活性前体proBNP和肝硬化病情严重程度的关系及其对难治性腹水的判断价值.

CTP积分和分级用于临床已有40多年,是判断终末期肝病患者肝脏储备功能及预后的最重要也最为常用的工具之一.在本研究中,肝硬化患者血浆proBNP水平显著高于健康对照组,且

和CTP积分正相关($r = 0.774, P < 0.01$).提示血浆proBNP和肝硬化病情严重程度密切相关,同时proBNP能较好的评估肝硬化患者的病情轻重程度.在临床工作中,可以将proBNP作为肝功能评价参考指标之一.

在所有38名患者中,9例无腹水,8例为难治性腹水,难治性腹水患者占总患者数的21.1%,占腹水患者的27.6%,高于国外文献^[15]报道,其原因可能和患者均来源于住院人群,病情相对较重有关.研究显示,RA患者的proBNP显著高于UA患者,而后者亦显著高于无腹水组,提示proBNP水平和肝硬化腹水严重程度相关,并参与了腹水形成的病理生理过程.

受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线分析,是对检验项目临床应用性能评价的定量资料进行归纳分析的最常用的统计方法之一,被公认为衡量诊断信息和诊断决策质量的最佳方法^[16],现广泛用于医学诊断性能的评价.ROC曲线下面积(记为 A_z)可反映诊断试验的准确性大小.一般认为 A_z 为0.7-0.9时,表示诊断准确性为中等;0.9以上时表示诊断准确性较高.以国际腹水俱乐部诊断标准为金标准,对proBNP诊断难治性腹水的准确性进行ROC曲线分析,取得的 A_z 为0.857. Youden指数 = 灵敏度+特异度-1,可以综合反映灵敏度和特异度,能较好的评价指标的判别能力,诊断试验中多根据Youden最大为原则确定最佳临界值.本研究中,根据Youden指数获取proBNP判断RA的最佳临界值,其对肝硬化患者RA的诊断具有较好的特异度和灵敏度,提示proBNP在判断难治性腹水方面具有较高的准确性.临床工作中,观测肝硬化患者血浆proBNP水平有助于RA的早期筛选和诊断,以及时调整治疗方案.

总之,肝硬化患者血浆proBNP水平显著升高,且和病情严重程度显著相关,临床中检测肝硬化腹水患者血浆proBNP,对难治性腹水患者的早期发现和诊断具有一定的参考价值.

4 参考文献

- 1 Runyon BA. Management of adult patients with ascites due to cirrhosis. *Hepatology* 2004; 39: 841-856
- 2 Arroyo V, Ginès P, Gerbes AL, Dudley FJ, Gentilini P, Laffi G, Reynolds TB, Ring-Larsen H, Schölmerich J. Definition and diagnostic criteria of refractory ascites and hepatorenal syndrome in cirrhosis. International Ascites Club. *Hepatology* 1996; 23: 164-176
- 3 Moore KP, Wong F, Gines P, Bernardi M, Ochs A, Salerno F, Angeli P, Porayko M, Moreau R,

■应用要点

肝硬化难治性腹水患者单纯内科药物治疗效果差、预后不佳.而本研究发现肝硬化患者血浆proBNP水平和病情严重程度相关,且对RA具有较好的判断价值.

■同行评价

本文研究了血浆脑钠肽原对肝硬化难治性腹水的判断价值,发现肝硬化患者血浆proBNP水平升高且和病情严重程度相关,具有一定的先进性和实用价值。

- Garcia-Tsao G, Jimenez W, Planas R, Arroyo V. The management of ascites in cirrhosis: report on the consensus conference of the International Ascites Club. *Hepatology* 2003; 38: 258-266
- 4 Gerbes AL, Gulberg V. Progress in treatment of massive ascites and hepatorenal syndrome. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 516-519
- 5 Yildiz R, Yildirim B, Karıncaoglu M, Harputluoglu M, Hilmioglu F. Brain natriuretic peptide and severity of disease in non-alcoholic cirrhotic patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1115-1120
- 6 La Villa G, Romanelli RG, Casini Raggi V, Tosti-Guerra C, De Feo ML, Marra F, Laffi G, Gentilini P. Plasma levels of brain natriuretic peptide in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1992; 16: 156-161
- 7 Wong F, Siu S, Liu P, Blendis LM. Brain natriuretic peptide: is it a predictor of cardiomyopathy in cirrhosis? *Clin Sci (Lond)* 2001; 101: 621-628
- 8 Redfield MM, Rodeheffer RJ, Jacobsen SJ, Mahoney DW, Bailey KR, Burnett JC Jr. Plasma brain natriuretic peptide concentration: impact of age and gender. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 976-982
- 9 Matsuo H. Discovery of a natriuretic peptide family and their clinical application. *Can J Physiol Pharmacol* 2001; 79: 736-740
- 10 Berendes E, Schmidt C, Van Aken H, Hartlage MG, Rothenburger M, Wirtz S, Scheld HH, Brodner G, Walter M. A-type and B-type natriuretic peptides in cardiac surgical procedures. *Anesth Analg* 2004; 98: 11-19, table of contents
- 11 Mair J, Hammerer-Lercher A, Puschendorf B. The impact of cardiac natriuretic peptide determination on the diagnosis and management of heart failure. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39: 571-588
- 12 Holmes SJ, Espiner EA, Richards AM, Yandle TG, Frampton C. Renal, endocrine, and hemodynamic effects of human brain natriuretic peptide in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 91-96
- 13 Tamura N, Ogawa Y, Chusho H, Nakamura K, Nakao K, Suda M, Kasahara M, Hashimoto R, Katsuura G, Mukoyama M, Itoh H, Saito Y, Tanaka I, Otani H, Katsuki M. Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 4239-4244
- 14 Mueller T, Gegenhuber A, Poelz W, Haltmayer M. Biochemical diagnosis of impaired left ventricular ejection fraction--comparison of the diagnostic accuracy of brain natriuretic peptide (BNP) and amino terminal proBNP (NT-proBNP). *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 159-163
- 15 Salerno F, Borroni G, Moser P, Badalamenti S, Cassarà L, Maggi A, Fusini M, Cesana B. Survival and prognostic factors of cirrhotic patients with ascites: a study of 134 outpatients. *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 514-519
- 16 Metz CE, Herman BA, Roe CA. Statistical comparison of two ROC-curve estimates obtained from partially-paired datasets. *Med Decis Making* 1998; 18: 110-121

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 •

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 2009-03-28)

结直肠癌与其他恶性肿瘤血清低分子差异蛋白的比较

盛新华, 高春芳, 王秀丽, 李冬晖, 郑国宝

盛新华, 中国人民解放军第二军医大学研究生一队 上海市 200433

高春芳, 王秀丽, 李冬晖, 郑国宝, 中国人民解放军第二军医大学与150中心医院研究生联合培养点全军肛肠外科研究所 河南省洛阳市 471031

全军医学科研“十一五”计划基金资助项目, No. 08Z006

作者贡献分布: 盛新华与高春芳对此文所作贡献均等; 此课题由盛新华、高春芳、王秀丽、郑国宝及李冬晖设计; 研究过程由盛新华与王秀丽操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由王秀丽与李冬晖提供; 数据分析由王秀丽与盛新华完成; 论文写作由盛新华完成。

通讯作者: 高春芳, 471031, 河南省洛阳市, 中国人民解放军第二军医大学与150中心医院研究生联合培养点全军肛肠外科研究所. gaochunfang150@163.com

电话: 0379-64169327

收稿日期: 2009-02-04 修回日期: 2009-02-23

接受日期: 2009-03-02 在线出版日期: 2009-03-28

Comparative analysis of differential serum low molecular weight proteins between colorectal cancer and other malignant tumors

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

Xin-Hua Sheng, the First Team of Graduate School, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China

Chun-Fang Gao, Xiu-Li Wang, Dong-Hui Li, Guo-Bao Zheng, Institute of Anal-colorectal Surgery, Joint Postgraduate Training Center of the Second Military Medical University and the 150th Central Hospital of Chinese PLA, Luoyang 471031, Henan Province, China

Supported by: the Medical Research Foundation during the 11th Five-Year Plan Period, No. 08Z006

Correspondence to: Chun-Fang Gao, Institute of Anal-colorectal Surgery, Joint Postgraduate Training Center of the Second Military Medical University and the 150th Central Hospital of Chinese PLA, Luoyang 471031, Henan Province, China. gaochunfang150@163.com

Received: 2009-02-04 Revised: 2009-02-23

Accepted: 2009-03-02 Published online: 2009-03-28

Abstract

AIM: To evaluate the diagnostic specificity of differentially expressed serum low molecular proteins for colorectal cancer by comparative analysis between the patients with colorectal cancer and with other malignant tumors.

METHODS: A total of 218 serum samples from patients with colorectal cancer ($n = 68$) and other

malignant tumors (breast, gastric, esophagus, liver, lung and kidney, 25 cases each) were collected. Their serum protein fingerprinting was read by surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry (SELDI-TOF-MS). Biomarker Wizard software was used to analyze the distinct proteins between colorectal cancer and other malignant tumors and to create receiver operating characteristic (ROC) curves. Then Fisher's discriminant model was established using the distinct proteins with the area under the curve (AUC) > 0.8.

RESULTS: Relatively 12 proteins were highly expressed and 102 proteins were lowly expressed in the sera of colorectal cancer compared with that of the other malignant tumors. Of all the 75 proteins with AUC > 0.5 by ROC analysis, six proteins (AUC > 0.8) were selected to establish the Fisher's discriminant model. The accuracy of distinguishing colorectal cancer from other malignant tumors was 91.7%, and the sensitivity and specificity were 88.2% and 93.3%, respectively.

CONCLUSION: The significantly differentially expressed serum low molecular proteins have a high diagnostic specificity for distinguishing colorectal cancer from other malignant tumors, which deserves further research.

Key Words: Colorectal carcinoma; Proteomics; Surface enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry; Mass-to-charge ratio; Discriminant analysis

Sheng XH, Gao CF, Wang XL, Li DH, Zheng GB. Comparative analysis of differential serum low molecular weight proteins between colorectal cancer and other malignant tumors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(9): 945-949

摘要

目的: 通过结直肠癌与其他常见恶性肿瘤血清低分子差异蛋白的分析, 探讨其对结直肠癌的诊断特异性。

方法: 收集结直肠癌(68例)、其他恶性肿瘤

■背景资料

近年来结直肠癌的诊断、治疗取得了一些长足的进展, 但总体疗效并无明显改善, 术后5年生存在50%左右, 早期诊断率还很低, 缺乏灵敏度高、特异性强的早期诊断方法。SELDI-TOF-MS将蛋白质芯片与质谱技术相结合, 具有高通量、高灵敏度等优势, 能检测出传统方法检测不到的蛋白质或多肽, 已成为肿瘤蛋白质组学主要技术之一, 为肿瘤的早期诊断与鉴别研究提供了理想的平台。

■同行评议者

何超, 教授, 浙江大学医学院附属邵逸夫医院肛肠外科; 刘连新, 教授, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普通外科三病房

■ 研发前沿

应用SELDI-TOF-MS技术进行比较蛋白质组学研究已成为疾病蛋白质组学研究的热点,不同的研究小组建立了多种疾病的血清或组织蛋白质指纹谱诊断模型,发现了一些极富意义的低分子量蛋白或多肽,由于其在血清中的含量极微,对这些蛋白的鉴定还存在相当的困难。

(乳腺癌、胃癌、食管癌、肝癌、肺癌及肾癌各25例)血清标本共218份,应用表面增强激光解吸/电离-飞行时间-质谱检测其蛋白质指纹谱。用Biomarker Wizard软件分析结直肠癌与其他恶性肿瘤患者血清中的低分子差异蛋白后,分别作出受试者工作特征(ROC)诊断曲线,再选取ROC曲线下面积(AUC)>0.8的蛋白,建立Fisher判别模型。

结果: 结直肠癌与其他恶性肿瘤相比,血清中有12种蛋白相对高表达,102种蛋白相对低表达。ROC曲线显示,有75种蛋白AUC>0.5,其中8911、8919、8964、11726、14049、14139 M/Z的蛋白AUC>0.8。用这6种蛋白建立的Fisher判别模型,鉴别结直肠癌的敏感性88.2%,特异性93.3%,准确率91.7%。

结论: 结直肠癌与其他恶性肿瘤相比,血清中存在明显差异表达的低分子蛋白,对结直肠癌具有诊断特异性,值得进一步研究。

关键词: 结直肠肿瘤; 蛋白质组学; 表面增强激光解吸/电离-飞行时间-质谱; 质荷比; 判别分析

盛新华, 高春芳, 王秀丽, 李冬晖, 郑国宝. 结直肠癌与其他恶性肿瘤血清低分子差异蛋白的比较. 世界华人消化杂志 2009; 17(9): 945-949

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/945.asp>

0 引言

结直肠癌(colorectal carcinoma, CRC)是威胁人类健康与生命的恶性肿瘤之一。在我国,随着人们生活水平的提高、饮食结构及生活方式的改变,CRC的发病率呈上升趋势。近年我们从血清蛋白质指纹谱研究入手,应用表面增强激光解吸/电离-飞行时间-质谱(surface enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry, SELDI-TOF-MS)技术,建立了CRC早期诊断与临床分期诊断模型,具有较高的敏感性与特异性^[1-3]。本实验我们仍采用血清差异蛋白质组研究方法,从CRC与其他恶性肿瘤患者血清中筛选出了明显差异表达的低分子蛋白。

1 材料和方法

1.1 材料 CRC与其他恶性肿瘤患者血清标本取自2006-06/2007-12中国人民解放军第150中心医院住院的手术患者,均经术后病理确诊。CRC组68例,男36例,女32例,年龄<40岁11例,40-60岁32例,≥60岁25例,其中Dukes A期6例、B期28例、C期23例、D期11例。其他恶性肿瘤组包括

乳腺癌、胃癌、食管癌、肝癌、肺癌及肾癌各25例,男78例,女72例,年龄<40岁31例,40-60岁67例,≥60岁52例。正常人对照组67例,男35例,女32例,年龄<40岁14例,40-60岁29例,≥60岁24例,为同期本院健康体检人群。以上三组人群在性别构成、年龄分布上均无统计学差异。所有病例均排除能影响血清中蛋白质含量的其他相关疾病的干扰。受检者均获知情同意。尿素、乙腈(acetonitrile, ACN)、三氟乙酸(trifluoroacetic, TFA)、芥子酸(sinapinic acid, SPA)、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液(Tris-HCl)、3-环乙胺-1-丙磺酸(CHAPS)及羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)等均购自美国Sigma公司。SELDI蛋白质芯片系统(PBS II-C型)及其配套的金属亲和表面(immobilized metal affinity capture, IMAC30)铜离子芯片均购自美国CiphaGen公司。

1.2 方法

1.2.1 血清标本的采集: 清晨空腹抽取静脉血5 mL于普通干燥管,常温下放置不超过4 h或4℃冷藏不超过12 h,析出血清后,1000 r/min离心20 min,取上清液分装,每管100 μL,置-80℃冰箱或液氮中保存。用于质控的血清取自同一个健康人,一次留取100 mL,分装于Eppendorf管中,每管50 μL,置于-80℃低温冰箱中保存,作为每次实验的质控血清。

1.2.2 样品的准备: 4℃融解血清,20 000 g离心10 min;取20 μL血清,置于1.5 mL离心管中;加40 μL U9缓冲液(含9 mol/L尿素、2% CHAPS、50 mmol/L Tris-HCl, pH9.0);4℃振荡30 min,使蛋白质变性;取10 μL变性后的样品,每管加入120 μL结合/洗脱缓冲液(含100 mmol/L磷酸钠、500 mmol/L氯化钠, pH7.0);4℃混匀。使最后上样的血清稀释约40倍。

1.2.3 芯片的预处理及与血清蛋白的结合: 芯片每孔加100 mmol/L硫酸铜50 μL,室温下200 r/min振荡5 min,倒除硫酸铜;用去离子水冲洗5次后甩干,每孔中加入100 mmol/L醋酸钠(pH4.0)50 μL,室温下200 r/min振荡5 min;去离子水冲洗5次后芯片每孔加入结合/洗脱缓冲液150 μL,置于振荡器上,室温孵育5 min后除去缓冲液,重复1次,后每孔加入50 μL稀释好的血清样品,置于振荡器上,4℃孵育60 min后除去缓冲液;接着用150 μL结合/洗脱缓冲液冲洗2次,每次振荡5 min,最后1次用1 mmol/L HEPES(pH7.0)快速冲洗。取出芯片,待芯片即将风干时,加入饱和SPA(SPA 1 mg溶于15 μL 50% ACN、

15 μL 1% TFA中)2次, 每次0.5 μL. 风干后上机检测.

1.2.4 芯片检测与数据收集处理: SELDI蛋白质芯片质谱仪在检测样品蛋白质指纹谱前用已知分子质量的标准蛋白质芯片校正, 使误差<0.1%. 检测时设定SELDI-TOF-MS的激光强度为175, 灵敏度为8, 收集数据的质荷比(M/Z)范围为2000-20 000, 收集位置20-80. 用Ciphergen ProteinChip 3.2.0软件自动采集数据, 用Biomarker Wizard 3.2.0软件对芯片检测得到的蛋白质相对含量及蛋白质M/Z数据进行分析处理, Biomarker Patterns软件建立用于区分3组人群的决策分类树.

统计学处理 采用芯片系统自带的软件和SPSS13.0统计软件. 计数资料的比较用χ²检验. 应用受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线对差异蛋白进行评价, 并计算各自的ROC曲线下面积(area under the curve, AUC). 选取AUC>0.8的标志蛋白, 建立Fisher判别函数.

2 结果

2.1 芯片检测的稳定性 用质控标本进行SELDI-TOF-MS技术的稳定性测试, 将质控血清分别在同一芯片的8个点上同时检测以观察其批内的差异, 然后在不同实验日的三条芯片上再加以检测, 以观察其批间的差异. 结果显示, 该芯片检测到的同一个蛋白峰位置的批内和批间变异系数分别为0.3%和0.5%; 蛋白峰标准化强度(峰高)的批内和批间变异系数分别为9%和14%.

2.2 三组人群决策分类树鉴别效率 利用Biomarker Patterns软件对检测得到的3组人群的蛋白质指纹谱数据进行数据挖掘, 建立的决策分类树鉴别CRC、其他恶性肿瘤及正常人的准确率分别为97.1%(66/68)、93.3%(140/150)、95.5%(64/67), 总准确率94.7%.

2.3 CRC组与其他恶性肿瘤组血清低分子差异蛋白 用Biomarker Wizard软件对两组患者血清中的低分子蛋白质指纹谱数据进行对比分析, 共发现差异蛋白质峰114个(P<0.05), 其中在CRC中高表达的有12种, 低表达的有102种.

2.4 差异蛋白ROC曲线评价 对114个差异蛋白质分别用ROC曲线进行评价, AUC>0.5且其95%可信限下限>0.5的蛋白共有75个, 其中AUC>0.8以上的有6个, M/Z分别为8911、8919、8964、11 726、14 049、14 139(表1, 图1).

表 1 标志蛋白的相对含量及ROC曲线下面积

标志蛋白 (M/Z)	相对含量		P值	AUC (95%CI)
	结直肠癌	其他肿瘤		
8911	0.648	4.577	0.000	0.859 (0.808, 0.909)
8919	1.423	7.896	0.000	0.829 (0.773, 0.884)
8964	0.441	2.867	0.000	0.909 (0.870, 0.948)
11 726	0.717	3.456	0.000	0.849 (0.798, 0.899)
14 049	0.225	1.500	0.000	0.853 (0.804, 0.902)
14 139	0.173	1.033	0.000	0.804 (0.747, 0.861)

2.5 Fisher判别分析模型的建立 以AUC>0.8的蛋白建立的Fisher判别函数如下: CRC = -1.244-0.01X₁+0.054X₂+0.005X₃+0.062X₄-0.002X₅+0.198X₆; 其他恶性肿瘤 = -2.16+0.015X₁+0.188X₂+0.132X₃+0.225X₄+0.468X₄+0.46X₅. 其中X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆分别代表8911、8919、8964、11 726、14 049、14 139 M/Z蛋白的相对含量. 进行判别分析时, 将每种蛋白的相对含量分别代入上述2个判别函数中求值, 哪一个判别函数值较大, 则该观察单位就属于哪一类. 本实验中判别CRC的敏感性88.2%(60/68), 特异性93.3%(140/150), 准确率91.7%(200/218).

3 讨论

在全球范围内, CRC的发病率在男、女性中分别位居第4和第3位, 死亡率分别位居第4和第5位^[4]. 我国CRC的发病亦不容乐观^[5], 严重威胁着人们的身心健康. 患者如获得早期诊断和治疗, 5年生存率将达到90%^[6]. 遗憾的是, 大部分患者在确诊时已处于进展期或已有转移, 错过了极佳的治疗窗口期. CRC早期诊断方法如直肠指诊、粪潜血试验、肠黏膜脱落细胞学检查及影像学检查等均不同程度地存在敏感性与特异性不高的问题, 而合适的肿瘤标志物将有利于癌症的检出. 目前临床应用较多的CRC相关性肿瘤标志物有CEA、CA19-9和CA242等, 用于手术前后的对比、估计预后, 其中CEA作为CRC的标志物应用最广泛, 有较高的特异性(93.5%), 但敏感性仅为47.3%^[7].

研究发现, 肿瘤在发生、发展过程中伴随了一系列细胞及亚细胞水平的变化, 包括蛋白质结构和功能的改变. 人血清中的蛋白质相当丰富并不断变化, 单一的血清肿瘤标志物难以真正反溯到相关的细胞、组织, 而发现一组与特定组织癌变相关的血清蛋白质则是更有效的途

■ 相关报道

Engwegen *et al*分析了结直肠癌患者与正常人的血清蛋白质谱, 并以其他恶性肿瘤(乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌及非小细胞肺癌)作对照, 建立的分类树模型预测结直肠癌的敏感性与特异性为65%-90%, 鉴定出了载脂蛋白C-I、载脂蛋白A-I及白蛋白氨基末端片段.

■应用要点

SELDI-TOF-MS检测并经ROC曲线分析得到的6个血清低分子差异表达蛋白建立的判别分析模型具有较好的鉴别诊断能力, 这些标志性差异蛋白可能在结直肠癌的发生发展中起到了重要作用。

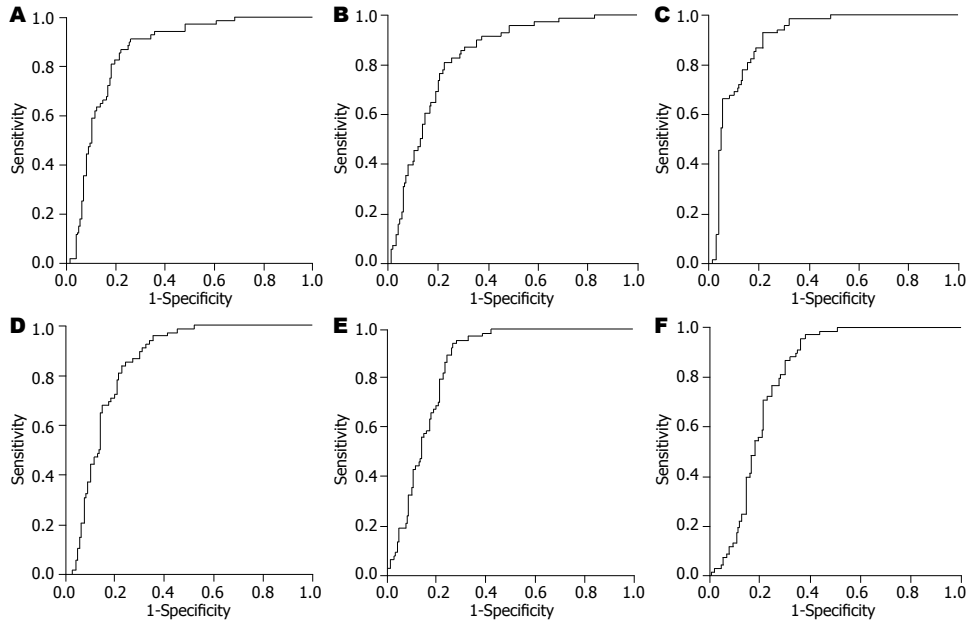


图1 结直肠癌与其他恶性肿瘤血清低分子差异蛋白ROC曲线. A-F分别代表8911、8919、8964、11726、14049、14139 M/Z蛋白。

径, 这也就是所谓的“癌症指纹”。因此, 研究人员正从过去的用“单一标志物”诊断肿瘤的模式向“多种标志物联合应用”的诊断模式过渡, 这不仅更加适合蛋白质组学高通量的特点, 而且也为肿瘤的诊断提供了更多的思路 and 机会^[8]。高通量SELDI蛋白质芯片技术的出现加速了开展发现“癌症指纹”的研究^[9]。该技术是蛋白质芯片技术与质谱技术相结合的产物, 自Adam *et al*^[10]、Petricoin *et al*^[11]将其应用于前列腺癌、卵巢癌的研究以来, 已被广泛应用于临床常见恶性肿瘤^[12]的研究。我们也利用该技术, 从血清蛋白质组学分析入手, 建立了CRC早期诊断模型及对中晚期CRC进行Dukes分期的分类树模型^[1-3]。这几种诊断模型的联合应用可将术前CRC患者进行准确分期, 为临床治疗提供决策依据。

目前广泛开展的肿瘤血清蛋白质组学研究, 大多将与某种肿瘤相关的良性病和正常人作对照, 而将其他恶性肿瘤纳入对照进行的研究不多。Engwegen *et al*^[6]应用CM10芯片分析了77例CRC患者与80例正常人的血清蛋白质谱, 同时选取38例其他系统的恶性肿瘤(包括乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌及非小细胞肺癌)标本作对照, 建立的分类树模型, 预测CRC的敏感性与特异性为65%-90%。本研究我们在前期工作的基础上, 将临床上其他常见的恶性肿瘤(乳腺癌、食管癌、肝癌、胃癌、肺癌、肾癌)作为对照, 并以健康人作正常对照, 建立的决策分类树鉴别

CRC、其他恶性肿瘤及正常人的准确率分别为97.1%、93.3%、95.5%。进而筛选出CRC与其他恶性肿瘤的血清低分子差异表达蛋白, 应用ROC曲线分析筛选出的AUC>0.8的蛋白8911、8919、8964、11726、14049、14139 M/Z, 以此6种蛋白建立Fisher判别模型。最终结果显示, 建立的模型鉴别CRC与其他恶性肿瘤的敏感性88.2%, 特异性93.3%, 准确率为91.7%。

由于SELDI技术本身具有较强的操作依赖性, 实验结果可因样品来源和处理条件的不一致或操作过程的非标准化, 造成实验结果批次之间或同类样本在不同检测单位之间的平行性与可重复性较差, 使实验结果的可信度遭到质疑^[13-14]。我们在实验中严格规定了实验操作流程, 对样品的存储条件、保存时间、冻融的次数、芯片和基质的选择以及检测参数的设置等各个环节都进行了规范, 建立了SELDI技术的标准化平台。本实验中我们用同一个正常人的血清作为质控血清, 对SELDI-TOF-MS技术的稳定性进行评价, 结果表明, 我们建立的芯片检测方法具有较好的稳定性。

总之, 本实验通过蛋白质芯片技术发现了CRC与其他恶性肿瘤患者血清中的低分子差异表达蛋白, 利用这些蛋白建立的判别分析模型具有较好的鉴别诊断能力, 今后还需要用大样本量的研究来证实。同时, 这些标志性差异蛋白可能在CRC的发生发展中起到了重要作用, 对这些差异表达蛋白的鉴定也正在进行中。

4 参考文献

- 1 Zhao G, Gao CF, Song GY, Li DH, Wang XL. [Identification of colorectal cancer using proteomic patterns in serum] *Ai Zheng* 2004; 23: 614-618
- 2 高春芳, 赵光, 郑国宝, 李冬晖, 王秀丽. 利用血清中蛋白质组构型鉴定Dukes A期结直肠癌. *解放军医学杂志* 2005; 30: 460-462
- 3 张剑锋, 高春芳, 郑国宝, 王秀丽, 李冬晖, 陈建平. 结直肠癌Dukes B、C、D期患者血清比较蛋白质组学研究. *中华实验外科杂志* 2006; 23: 1348-1350
- 4 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- 5 张思维, 陈万青, 孔灵芝, 李光琳, 赵平. 中国部分市县2003年恶性肿瘤发病年度报告. *中国肿瘤* 2007; 16: 494-507
- 6 Engwegen JY, Helgason HH, Cats A, Harris N, Bonfrer JM, Schellens JH, Beijnen JH. Identification of serum proteins discriminating colorectal cancer patients and healthy controls using surface-enhanced laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1536-1544
- 7 Chen YD, Zheng S, Yu JK, Hu X. Artificial neural networks analysis of surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectra of serum protein pattern distinguishes colorectal cancer from healthy population. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8380-8385
- 8 Zolg W. The proteomic search for diagnostic biomarkers: lost in translation? *Mol Cell Proteomics* 2006; 5: 1720-1726
- 9 Powell K. Proteomics delivers on promise of cancer biomarkers. *Nat Med* 2003; 9: 980
- 10 Adam BL, Qu Y, Davis JW, Ward MD, Clements MA, Cazares LH, Semmes OJ, Schellhammer PF, Yasui Y, Feng Z, Wright GL Jr. Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res* 2002; 62: 3609-3614
- 11 Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, Mills GB, Simone C, Fishman DA, Kohn EC, Liotta LA. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002; 359: 572-577
- 12 Azad NS, Rasool N, Annunziata CM, Minasian L, Whiteley G, Kohn EC. Proteomics in clinical trials and practice: present uses and future promise. *Mol Cell Proteomics* 2006; 5: 1819-1829
- 13 Engwegen JY, Gast MC, Schellens JH, Beijnen JH. Clinical proteomics: searching for better tumour markers with SELDI-TOF mass spectrometry. *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27: 251-259
- 14 Poon TC. Opportunities and limitations of SELDI-TOF-MS in biomedical research: practical advices. *Expert Rev Proteomics* 2007; 4: 51-65

■同行评价

本文目的及结论明确, 实验方法较为先进, 统计分析结果较可靠, 参考文献引用恰当而充分, 具有较好的学术价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

世界华人消化杂志参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在“Pang *et al*”的右上角注角码; 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 2009-03-28)

结直肠类癌内镜下诊断及治疗51例

韩建勇, 赵继先, 康金旺, 王颖

■背景资料

结直肠类癌属于神经内分泌肿瘤, 临床少见, 部分具有恶性行为, 需病理检查明确诊断, 内镜、实验室检查、影像学检查及治疗仍需进一步探讨、完善。

韩建勇, 赵继先, 康金旺, 王颖, 河北北方学院附属第二医院消化内科 河北省张家口市 075100

作者贡献分布: 韩建勇与赵继先对此文所作贡献均等; 此课题由韩建勇、赵继先、康金旺及王颖设计; 研究过程由韩建勇、赵继先、康金旺及王颖操作完成; 研究数据分析由赵继先完成; 本论文写作由韩建勇完成。

通讯作者: 韩建勇, 075100, 河北省张家口市宣化区钟楼北街6号, 河北北方学院附属第二医院消化内科。

hanjianyong1972@163.com

电话: 0313-3042262

收稿日期: 2009-01-30 修回日期: 2009-02-27

接受日期: 2009-03-02 在线出版日期: 2009-03-28

Diagnosis and treatment of colorectal carcinoid tumors with endoscopy: an analysis of 51 cases

Jian-Yong Han, Ji-Xian Zhao, Jin-Wang Kang, Ying Wang

Jian-Yong Han, Ji-Xian Zhao, Jin-Wang Kang, Ying Wang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075100, Hebei Province, China

Correspondence to: Dr. Jian-Yong Han, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Hebei North University, 6 Zhonglou North Street, Xuanhua District, Zhangjiakou 075100, Hebei Province, China. hanjianyong1972@163.com

Received: 2009-01-30 Revised: 2009-02-27

Accepted: 2009-03-02 Published online: 2009-03-28

Abstract

AIM: To study endoscopic diagnosis and management of colorectal carcinoid tumors.

METHODS: Fifty one patients were certified by colonoscopy and pathology during April 1986 to August 2008. Morphologic characteristics, trans-endoscopic treatment and prognosis were documented for further analysis.

RESULTS: Male patients significantly outnumbered female patients with a ratio of 1.83. The average age was 53.0 ± 13.2 years. The most frequent occurrence location was rectum with almost 86.3 percents. Most carcinoid tumors, about 74.5%, were smaller than 1.0 cm in diameter. The classic characters were submucosal tumor with yellow color and rigid or tough texture,

and always were lack of activities. There was metastasis of tumor when it was bigger than 2.0 cm, and there was no recurrence for smaller ones (≤ 1.0 cm) after EMR. Six patients had undergone endoscopic ultrasonic examination and it was very helpful for EMR.

CONCLUSION: Understanding the endoscopic characters of colorectal carcinoid tumors was helpful for correct diagnosis. Deep biopsy and EMR can help improve the correct diagnosis rate. EMR is safe and effective for carcinoid tumors with a diameter less than 1.0 cm.

Key Words: Carcinoid tumors; Neuroendocrine tumors; Colonoscopy; Endoscopic mucosal resection; Endoscopic ultrasonography

Han JY, Zhao JX, Kang JW, Wang Y. Diagnosis and treatment of colorectal carcinoid tumors with endoscopy: an analysis of 51 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(9): 950-953

摘要

目的: 探讨结直肠类癌的内镜下诊断及治疗。

方法: 收集1986-04/2008-08我院经结肠镜检查并病理证实的类癌51例。分析其形态学特点、结肠镜下治疗及预后。

结果: 结直肠类癌男性明显多于女性(1.83 : 1), 平均年龄 53.0 ± 13.2 岁, 直肠最多见(86.3%), 最大径多小于1.0 cm(74.5%), 内镜下多表现为典型的黏膜下肿物, 色黄, 质硬或韧, 活动度差, ≥ 2.0 cm多发生转移, ≤ 1.0 cm者EMR法切除均无复发, 6例术前行超声内镜检查, 明确内镜下治疗的可能性。

结论: 掌握内镜下类癌的特点有助于提高肉眼诊断, 深凿活检或EMR切除活检有助于提高诊断率, ≤ 1.0 cm的类癌内镜下切除安全、有效。

关键词: 类癌; 神经内分泌瘤; 结肠镜; 内镜下黏膜切除术; 超声内镜

韩建勇, 赵继先, 康金旺, 王颖. 结直肠类癌内镜下诊断及治疗

■同行评议者

曹秀峰, 主任医师, 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心; 房林, 副教授, 同济大学附属上海市第十人民医院普外科

51例. 世界华人消化杂志 2009; 17(9): 950-953
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/950.asp>

0 引言

类癌属于神经内分泌瘤, 起源于神经内分泌细胞, 多来源于嗜铬细胞, 有内分泌颗粒, 属于神经外胚层的胺前体摄取和脱羧(amine precursor uptake and decarboxylation, APUD)肿瘤, 具有复发转移潜能, 可分为良性、不确定恶性、低度恶性和高度恶性四种^[1], 较少见, 好发于消化系统(67.5%-73.7%), 其次为呼吸系统(25.1%-25.3%)^[2-3], 偶见于肾、中耳、睾丸、卵巢. 类癌占全部恶性肿瘤的0.05%-0.2%, 消化系统类癌占胃肠道恶性肿瘤的0.4%-1.5%^[4]. 收集1986-04/2008-08我院经结肠镜检查并病理证实的类癌51例, 部分行内镜下治疗, 取得较好效果, 报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 收集1986-04/2008-08我院经结肠镜检查并病理证实的类癌51例, 检出率0.16%. 男33例, 女18例, 男性明显高于女性. 年龄20-88(平均年龄53.0±13.2)岁. 51例均为单发, 无多发者. 行结肠镜检查原因为便血、腹泻、腹痛、便秘、腺瘤复查等.

1.2 方法 内镜下黏膜切除术(endoscopic mucosal resection, EMR), 于病灶边缘的黏膜下层1点或多点注射0.05 g/L肾上腺素生理盐水1-8 mL, 使病变及其周围组织隆起(抬举征阳性), 应用圈套器将病变及其周围少量正常黏膜套入, 行高频电切除.

2 结果

2.1 形态学表现及诊断

2.1.1 病灶分布: 直肠44例(86.3%), 乙状结肠2例(3.9%), 降结肠1例(2.0%), 横结肠1例(2.0%), 升结肠3例(5.9%), 病变位于直肠者占绝大多数. 44例直肠类癌中34例(77.3%)病灶位于距肛缘8cm以内, 4例(9.1%)位于8-10 cm(表1).

2.1.2 形态特点: 内镜下表现以典型的黏膜下肿物为主(44例, 86.3%, 44/51), 病灶表面黏膜光滑, 其中4例(9.1%, 4/44)顶端发生凹陷或糜烂; 3例(5.9%, 3/51)表现为无蒂浸润型环壁肿物, 2例(3.9%, 2/51)表现为巨大肿块, 肿块表面结节不平, 有糜烂及浅溃疡; 1例(2.0%, 1/51)表现为分叶息肉状, 顶端无糜烂; 1例(2.0%, 1/51)表现为

表 1 51例结直肠类癌患者的病灶大小

	病灶直径(cm)				
	≤0.5	0.6-1.0	1.1-1.5	1.6-2.0	>2.0
n	20	18	1	2	10
%	39.2	35.3	2.0	3.9	19.6

巨大溃疡, 形态不规则, 边界不清, 结节不平, 溃疡底不平, 被污秽苔, 局部蠕动消失. 42例对质地进行描述, 其中39例(92.9%)质地韧或硬, 仅有3例(7.1%)报告质地软. 34例对色泽进行描述, 其中25例(73.5%)色黄, 8例(23.5%)色泽发红或正常, 仅有1例色泽略白. 但资料中对其活动度的描述比较缺乏, 仅18例(35.3%)描述为无明显滑动或微动, 其余未描述.

2.1.3 诊断情况: 表现为黏膜下肿物的44例患者中, 仅7例(15.9%)内镜下考虑为类癌, 且主要集中在2000年后, 其余多诊断为平滑肌瘤或间质瘤, 少数诊断为脂肪瘤、腺瘤、息肉等, 肿块型及溃疡型均诊断为结直肠癌.

2.1.4 内镜活检: 42例经深凿活检病理确诊, 6例经第二次深凿活检或EMR活检确诊, 3例经外科手术后随访病理确诊. 活检块数4-6块.

2.2 伴发结直肠疾病 1例直肠类癌患者同时伴发直肠黑色素瘤, 1例乙状结肠类癌患者既往胃平滑肌瘤史, 5例患者伴化生性或炎性息肉, 16例患者伴多发腺瘤.

2.3 转移 8例发生转移, 占15.7%, 最小径为1.6 cm, 淋巴结转移4例, 肝并淋巴结转移4例.

2.4 治疗 约一半的类癌患者(23例, 45.1%)进行了内镜下治疗, 其中4例为活体组织检查时钳净(病灶最大径均小于0.4 cm), 病理连续切片检查切缘无癌; 19例行内镜下治疗, 电切术4例, 最大径均小于0.8 cm, 其中2例切净, 1例(最大径0.8 cm)切缘可见癌组织, 再次活检钳取局部组织可见癌, 1例(最大径0.6 cm)切缘可见癌组织, 再次活检钳取局部组织8块, 未见癌; EMR法切除15例(6例术前超声内镜检查), 最大径0.3-1.6 cm, 2例(最大径1.5、1.6 cm)切缘可见癌组织. 治疗成功者随访3 mo-18年, 未见复发. 13例(包括内镜下治疗失败3例)患者行外科手术切除. 4例患者未治疗(1例因脑出血死亡; 1例因心肌梗死死亡; 2例无症状存活), 5例患者转外院治疗, 9例患者失访.

3 讨论

类癌是一种少见的神经内分泌肿瘤, 来源于肠嗜

■**研发前沿**
 提高类癌的诊断水平以及恶性类癌的综合治疗方案仍是本病的研究重点.

■**创新盘点**
 本文对类癌的诊断及治疗进行了总结, 对常见黏膜下肿物进行了内镜下的鉴别诊断, 超声内镜检查的应用提高了治疗的合理性.

■应用要点

掌握类癌在内镜下的形态学特征, 超声内镜及EMR技术的应用, 可以显著提高结直肠癌类癌的诊治水平。

铬细胞或Kultschitzsky细胞, 可发生于身体任何部位, 位于黏膜层或黏膜下层. 全球每年发病率为1.2-2.1/10万^[5-6], 欧洲每年发病率1.95/10万, 平均分布于男女性^[7]. 尸体解剖研究结果显示其患病率达0.5%-1.0%, 而且主要发生于小肠^[8], Berge *et al*的研究估计超过1.22%^[9]. 平均确诊年龄59.9-61.4岁, 男性多于女性, 2.08:1^[2], 也有报道男女发病率无统计学差异^[10], 年龄呈双高峰, 小峰为15-25岁, 女性多于男性, 大峰为65-75岁, 男性占优势, 低于50岁组女性占优势^[7].

内镜下主要表现为半球形黏膜下肿块, 呈淡黄色或黄白色, 质硬或韧, 无明显滑动或微动, 表面黏膜多光滑、完整, 部分较大病灶可因表面黏膜紧张度增高, 血液供应不足或肠道炎症造成顶端不规则红斑凹陷、糜烂或浅溃疡, 病变周围可见散在的轻度发红, 放大内镜可见表面隐窝开口正常. 需区别于脂肪瘤、平滑肌瘤, 脂肪瘤也呈现黏膜下肿块外观, 但中央无凹陷, 色泽黄或淡黄半透明状, 质地软, 按压变形(即所谓的枕垫征), 活检可见黄色脂肪显露(裸脂征). 平滑肌瘤色泽白或正常, 质地硬, 按压不变形, 触之滑动, 无脐凹. 肿块型及溃疡型难以与结直肠癌内镜下鉴别.

内镜活检结合病理检查是重要而有效的诊断手段, 但类癌多位于黏膜下, 需多块深凿活检, 必要时可多次或用EMR法活检, 本组51例患者中, 82.4%经一次活检而病理确诊, 11.8%经第二次活检或EMR法活检而确诊, 成功率94.2%. 有文献报道最佳活检部位为肿物顶部, 如果病灶顶部存在凹陷或溃疡时, 则活检的阳性率会更高^[11].

超声内镜检查有助于确定类癌浸润深度及有无淋巴结转移, 术前超声内镜检查可以明确有无肌层和周围血管浸润, 充分判断内镜下治疗的可行性^[12], 避免盲目进行内镜下治疗, 避免不必要的外科手术. 本组6例患者术前进行超声内镜检查, 4例未浸及肌层, EMR法成功切除. 近年来内镜黏膜下剥离术(endoscopic submucosal dissection, ESD)的开展, 使病灶切除更完全^[13].

类癌的X线表现与肿瘤部位、大小及浸润深度范围有关. X线气钡双重造影、CT和MRI可以发现黏膜层肿物或结肠肠壁增厚. X线气钡双重造影可见局部息肉样改变. CT显示肿瘤实质性部分密度均匀, 增强扫描肿瘤强化比较明显, 边界清楚. 大的肿瘤形态多不规则, 分叶状, 容易发生囊变坏死, 密度不均匀. 肿瘤在MRI上信

号特点为T1加权像(T1WI)呈稍低信号和T2加权像(T2WI)稍高信号^[14]. 类癌可以浸润全肠壁并肠系膜淋巴结转移. 局部或腹膜后淋巴结及肝转移可以通过CT及B超检查发现. 但这些改变并不能区分类癌与结直肠癌或结直肠其他类型肿瘤, 还需要与实验室检查、生长抑素受体闪烁扫描法等相结合, 进行综合判断. 5-羟色胺分解产物5-羟吲哚乙酸(5-HIAA)是类癌的一个重要标志物, 24 h大于30 mg提示类癌综合征. 嗜铬粒蛋白A(CgA)是另一个重要生化标志物, 且其血浆水平与肿瘤大小呈正相关^[15], 值得注意的是患者CgA越高(>5000 μg/L), 存活率越低, 本组CgA阳性率为84.6%(11/13).

多数类癌患者无症状, 在检查时偶然发现, 部分患者可因瘤体大或发生糜烂、溃疡而产生症状. 类癌组织具有分泌功能, 当产生激素过多, 超过肝、肺灭活能力, 或类癌细胞转移到肝脏, 其分泌的生物活性物质通过肝静脉直接进入体循环, 导致血液中激素浓度急剧升高, 并作用于血管和肠道平滑肌等, 而引起类癌综合征, 如腹泻、脸红和间断的呼吸困难. 本组表现为巨大肿块或溃疡患者均有便血或潜血阳性, 大部分伴有腹痛, 未见类癌综合征发生, 考虑与后肠类癌一般不分泌或极少分泌5-羟色胺等活性物质有关.

转移的发生率与肿瘤的大小、浸润深度及发生部位密切相关. 以局部淋巴结、肠系膜淋巴结、腹膜后淋巴结转移及肝转移最多见, 少数可有骨转移, 发生率接近10%^[16-17], 甚至达16.4%(直肠的3.7%到空回肠的17.2%)^[10], 偶有皮肤转移^[18]. 本组表现为巨大肿块或溃疡者均发生转移, >2.0 cm转移率70%(7/10).

本组内镜下治疗的23例中, 4例≤0.4 cm, 镜下见位于黏膜层, 活检钳净, 4例(≤0.8 cm)电切术治疗, 成功率75%(3/4), 15例(≤1.6 cm)EMR治疗成功率86.7%(13/15). EMR法明显优于普通电切术. 由于病变的大小与远处转移的危险度相关, 小的类癌(<1 cm)无肌层及淋巴结受累, 局部切除可完全治愈^[11,19-20], 而肿瘤直径1-2 cm者转移率较小于1.0 cm者显著升高, 达23.9%^[10], 且多数浸及肌层甚至浆膜层, 内镜下完全切除困难, 仍应以手术为主, 本组最大径1.5、1.6 cm两例因切缘不净而手术切除, 也可以先进行超声内镜检查判断内镜下治疗的可行性; 直径大于2 cm者多数有局部淋巴结或远处转移, 应当行标准的直肠癌切除术^[4,21].

4 参考文献

1 Klöppel G, Perren A, Heitz PU. The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: the WHO classification. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1014: 13-27

2 Modlin IM, Lye KD, Kidd M. A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. *Cancer* 2003; 97: 934-959

3 Modlin IM, Sandor A. An analysis of 8305 cases of carcinoid tumors. *Cancer* 1997; 79: 813-829

4 石美鑫. 实用外科学. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 930-933

5 Crocetti E, Paci E. Malignant carcinoids in the USA, SEER 1992-1999. An epidemiological study with 6830 cases. *Eur J Cancer Prev* 2003; 12: 191-194

6 Taal BG, Visser O. Epidemiology of neuroendocrine tumours. *Neuroendocrinology* 2004; 80 Suppl 1: 3-7

7 Quaedvlieg PF, Visser O, Lamers CB, Janssen-Heijen ML, Taal BG. Epidemiology and survival in patients with carcinoid disease in The Netherlands. An epidemiological study with 2391 patients. *Ann Oncol* 2001; 12: 1295-1300

8 Moertel CG, Sauer WG, Dockerty MB, Baggenstoss AH. Life history of the carcinoid tumor of the small intestine. *Cancer* 1961; 14: 901-912

9 Berge T, Linell F. Carcinoid tumours. Frequency in a defined population during a 12-year period. *Acta Pathol Microbiol Scand [A]* 1976; 84: 322-330

10 Soga J. Early-stage carcinoids of the gastrointestinal tract: an analysis of 1914 reported cases. *Cancer* 2005; 103: 1587-1595

11 顾芳, 吕愈敏, 孟江涛, 林三仁, 周丽雅. 消化道类癌的内镜诊断及治疗. *北京大学学报(医学版)* 2001; 33: 446-448

12 周平红, 姚礼庆, 钟芸诗, 徐美东, 高卫东, 何国杰, 张轶群, 陈巍峰, 秦新裕. 直肠类癌的内镜超声诊断和内镜黏膜下切除. *中华消化内镜杂志* 2006; 23: 175-178

13 周平红, 姚礼庆, 徐美东, 陈巍峰, 钟芸诗, 高卫东, 何国杰, 秦新裕. 内镜黏膜下剥离术治疗直肠类癌. *中华胃肠外科杂志* 2007; 10: 319-322

14 李惠章, 李威, 尹超, 吴国庚, 于经瀛, 周诚. 消化道类癌的影像学诊断. *医学影像学杂志* 2007; 17: 571-573

15 Nobels FR, Kwekkeboom DJ, Coopmans W, Schoenmakers CH, Lindemans J, De Herder WW, Krenning EP, Bouillon R, Lamberts SW. Chromogranin A as serum marker for neuroendocrine neoplasia: comparison with neuron-specific enolase and the alpha-subunit of glycoprotein hormones. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2622-2628

16 Zuetenhorst JM, Hoefnageli CA, Boot H, Valdés Olmos RA, Taal BG. Evaluation of (111)In-pentetreotide, (131)I-MIBG and bone scintigraphy in the detection and clinical management of bone metastases in carcinoid disease. *Nucl Med Commun* 2002; 23: 735-741

17 Meijer WG, van der Veer E, Jager PL, van der Jagt EJ, Piers BA, Kema IP, de Vries EG, Willemse PH. Bone metastases in carcinoid tumors: clinical features, imaging characteristics, and markers of bone metabolism. *J Nucl Med* 2003; 44: 184-191

18 Norman JL, Cunningham PJ, Cleveland BR. Skin and subcutaneous metastases from gastrointestinal carcinoid tumors. *Arch Surg* 1971; 103: 767-769

19 Vogelsang H, Siewert JR. Endocrine tumours of the hindgut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005; 19: 739-751

20 汪嵘, 陈星, 原丽莉. 直径≤1 cm的直肠类癌诊治探讨. *山西医药杂志* 2006; 35: 869-870

21 任雪雷, 陆品相, 陆立平, 姚礼庆. 消化道类癌的外科治疗和疗效. *中国现代医学杂志* 2002; 12: 46-48

■同行评价
结直肠类癌临床少见, 本文作者总结51例进行分析, 对临床具有一定的指导作用。

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界胃肠病学杂志》(英文版)
成功通过评审被PMC收录

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

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

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

曹秀峰 主任医师

南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心

陈光 教授

吉林大学第一医院消化器官外科

程树群 副教授

中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院综合治疗三科

迟宝荣 教授

吉林大学第一医院消化内科

樊红 副教授

东南大学医学院发育与疾病相关基因教育部重点实验室

房林 副教授

同济大学附属上海市第十人民医院普外科

韩天权 教授

上海交通大学医学院附属瑞金医院外科, 上海消化外科研究所

韩新巍 教授

河南省郑州大学第一附属医院放射科

何超 教授

浙江大学医学院附属邵逸夫医院院肛肠外科

何裕隆 教授

中山大学附属第一医院胃肠胰腺外科

洪天配 教授

北京大学第三医院内分泌科

黄恒青 主任医师

福建省第二人民医院消化内科

黄颖秋 教授

本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

李健丁 教授

山西医科大学第一医院放射科

刘改芳 主任医师

河北医科大学第三医院消化内科

刘连新 教授

哈尔滨医科大学第一临床医学院普通外科

刘正稳 教授

西安交通大学医学院第一附属医院感染科

邱双健 副教授

复旦大学附属中山医院肝癌研究所、肝肿瘤外科

潘秀珍 教授

福建省立医院消化研究室

曲智威 副主任医师

北华大学附属医院消化内科

孙殿兴 主任医师

白求恩国际和平医院肝病科

唐文富 副教授

四川大学华西医院中西医结合科

汪波 副主任医师

北京大学第一医院急诊科

王振宁 教授

中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

徐智 教授

北京大学第三医院外科

许玲 副教授

中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科

张国梁 主任医师

天津市第一中心医院消化内科

张小晋 主任医师

北京积水潭医院消化内科

张宗明 教授

清华大学第一附属医院消化医学中心

周国雄 主任医师

南通大学附属医院消化内科