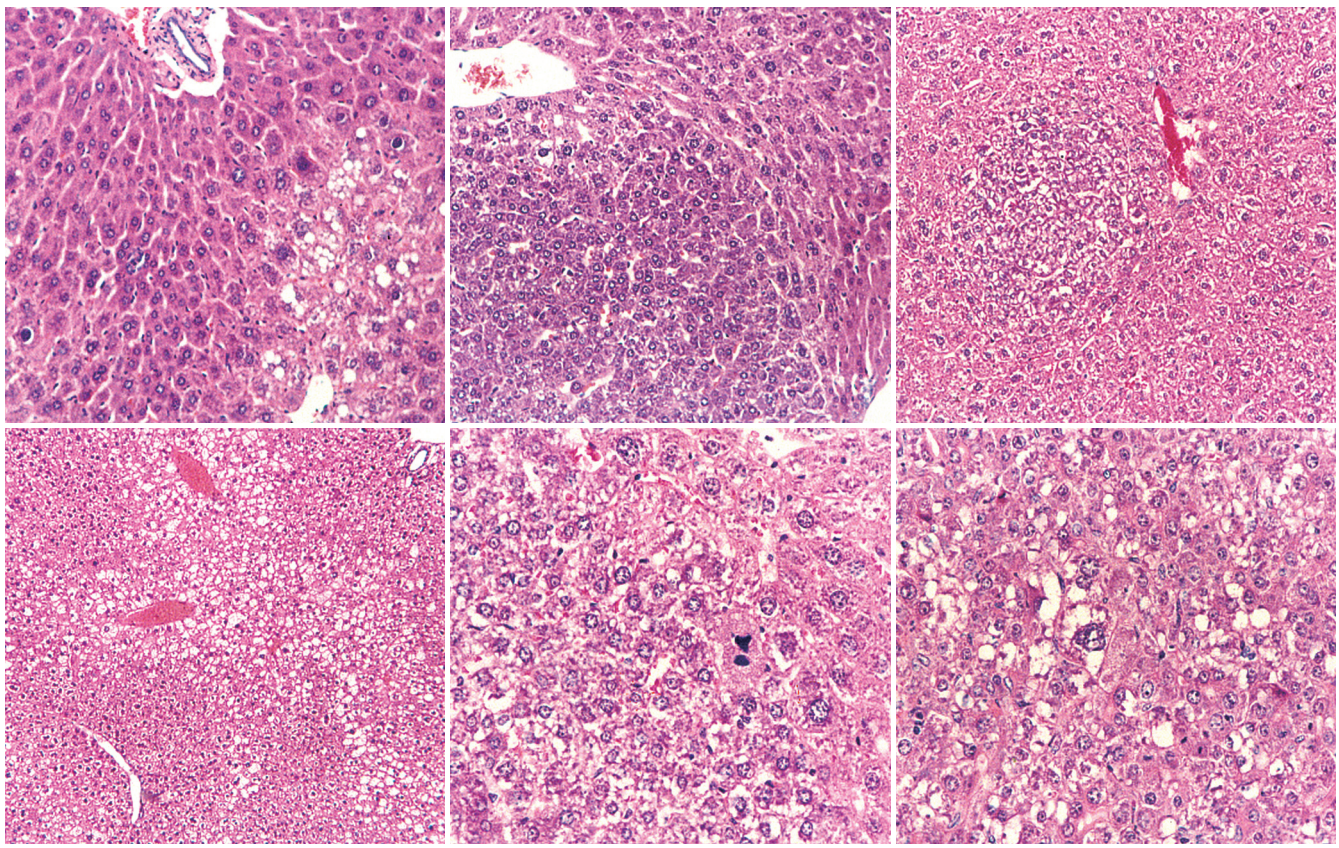
ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2006 年 6 月 18 日　第 14 卷　第 17 期　(Volume 14 Number 17)



17 | 2006

名誉总编辑
潘伯荣
总编辑
马连生

《世界华人消化杂志》对所有来稿均进行同行评议，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》，俄罗斯《文摘杂志》收录.

世界华人消化杂志
www.wjgnet.com
二零零六年六月十八日
第十四卷
第十七期
世界胃肠病学杂志社

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2006-01-01/2008-12-31
wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问
陈可冀教授 北京
黄象谦教授 天津
黄志强教授 北京
裘法祖教授 武汉
王宝恩教授 北京
危北海研究员 北京
吴孟超教授 上海
杨春波教授 福州
周殿元教授 广州

名誉总编辑
潘伯荣教授 西安

社长/总编辑
马连生教授 北京

副总编辑
陈士葆教授 上海
房殿春教授 重庆
姜洪池教授 哈尔滨
王苑本教授 天津
吴云林教授 上海
徐克成教授 广州
杨思凤教授 吉林
姚希贤教授 石家庄
岳茂兴教授 北京
张万岱教授 广州
周学文教授 沈阳

常务编委
程英升副教授 上海
高毅主任医师 广州
江学良主任医师 上海
李岩教授 沈阳
刘连新教授 哈尔滨
吕宾教授 杭州
罗和生教授 武汉
聂青和副教授 西安
王小众教授 福州

编委
白爱平主治医师 广州
别平教授 重庆
白文元教授 石家庄
白玉贤教授 哈尔滨
蔡淦教授 上海
蔡开琳副教授 武汉
曹洁副教授 上海
陈海龙教授 大连
陈红松副研究员 北京
陈积圣教授 广州
陈建荣副教授 南通
陈立波副教授 武汉
陈凛教授 北京
陈其奎教授 广州
陈强谱教授 滨州
陈仕珠主任医师 西安
陈卫昌教授 苏州
陈耀凯副教授 重庆
陈贻胜教授 福州
陈知水教授 武汉
陈治水主任医师 哈尔滨
陈祖林副教授 重庆
程爱国教授 唐山
程红岩教授 上海
程树群副教授 上海
迟宝荣教授 长春
崔云甫教授 哈尔滨
代文杰教授 哈尔滨
戴冬秋教授 沈阳
党双锁副教授 西安
邓长生教授 武汉
董蕾教授 西安
杜群副研究员 广州
樊红副教授 南京
范建高教授 上海
范志宁主任医师 南京
房静远教授 上海
傅春彬主任医师 吉林
高成新教授 上海
高春芳研究员 上海
高峰教授 西安
高润平教授 长春
戈之铮教授 上海
龚国忠教授 长沙
龚建平教授 重庆
巩鹏副教授 大连
谷俊朝主任医师 北京
关玉盘教授 北京
管冬元副教授 上海
郭克建教授 沈阳
郭晓钟教授 沈阳
郭新宁教授 银川
韩天权教授 上海
郝春秋副教授 西安
郝俊鸣副主任医师 北京
何超教授 杭州
何裕隆教授 广州
何振平教授 重庆
洪天配教授 北京
侯晓华教授 武汉
黄恒青主任医师 福州
黄金华副教授 广州
黄晓东副主任医师 武汉
黄颖秋教授 本溪
黄裕新教授 西安
黄志勇副教授 武汉
季国忠副教授 南京
季加孚教授 北京
姜慧卿教授 石家庄
蒋龙元副教授 广州
金瑞教授 北京
匡安仁教授 成都
兰平教授 广州
蓝宇教授 北京
劳绍贤教授 广州
李定国教授 上海
李东辉教授 厦门
李方儒教授 天津
李国威教授 西安
李继强教授 上海
李靖副教授 重庆
李军祥教授 北京
李奇林教授 广州
李胜研究员 济南
李涛主治医师 北京
李晓宇主任医师 北京
李旭副教授 广州
李延青教授 济南
李永哲副研究员 北京
李瑗教授 南宁
李玉民教授 兰州
李增山副教授 西安
李兆申教授 上海
李志霞教授 北京
李宗芳教授 西安
梁力建教授 广州
林胜璋副教授 温州
林勇讲师 上海
刘宝瑞教授 南京
刘彬彬副研究员 上海
刘冰熔教授 哈尔滨
刘成海研究员 上海
刘平教授 上海
刘杞教授 重庆
刘铁夫教授 哈尔滨
刘颖斌副教授 杭州
刘占举教授 郑州
刘正稳教授 西安

世界华人消化杂志®
编辑委员会

刘作金副教授 重庆
龙致贤教授 北京
鲁华玉研究员 北京
陆才德教授 宁波
陆伦根教授 上海
陆云飞教授 南宁
禄韶英主治医师 西安
吕明德教授 广州
吕宁主任医师 北京
吕云福教授 海口
马大烈教授 上海
茅爱武主任医师 上海
梅林教授 北京
孟庆华教授 北京
宁琴教授 武汉
牛建昭教授 北京
欧希龙副教授 南京
潘林娜教授 哈尔滨
潘兴华副主任医师 昆明
潘秀珍教授 福州
彭波副教授 西安
彭吉润主任医师 北京
彭曦副研究员 重庆
彭心宇教授 石河子
彭志海教授 上海
秦波教授 重庆
秦成勇教授 济南
秦环龙教授 上海
钱建民教授 上海
秦仁义教授 武汉
卿三华教授 广州
邱双健副教授 上海
邱伟华副主任医师 上海
任超世研究员 天津
任建安教授 南京
任建林教授 厦门
邵成浩讲师 上海
邵先玉教授 泰安
邵永孚教授 北京
沈洪教授 南京
沈琳副教授 北京
沈薇教授 重庆
施诚仁教授 上海
施瑞华教授 南京
石统东副教授 重庆
宋世兵主任医师 北京
宋振顺教授 西安
孙诚谊教授 贵阳
孙殿兴主任医师 石家庄
孙家邦教授 北京
孙秀发教授 武汉
孙学英教授 哈尔滨
邰升副教授 哈尔滨
谭学瑞教授 汕头
唐采白副教授 徐州
唐芙爱教授 郑州
唐霓副研究员 重庆
唐文富主治医师 成都
唐文皓副主任医师 上海
唐旭东主任医师 北京
汤展宏副教授 南宁
唐志鹏副研究员 上海
田素礼教授 哈尔滨
屠红副研究员 上海
万军教授 北京
汪波副主任医师 北京
汪思应教授 合肥
王承党副教授 福州
王春友教授 武汉
王广义教授 长春
王吉耀教授 上海
王健生副教授 西安
王鲁副教授 上海
王效民教授 厦门
王晓艳副教授 长沙
王新月教授 北京
王学美研究员 北京
王正康教授 北京
王志刚副主任医师 上海
王忠裕教授 大连
卫洪波教授 广州
魏经国教授 西安
魏来教授 北京
闻勤生教授 西安
吴德全教授 哈尔滨
吴建国教授 武汉
吴君主任医师 贵阳
吴萍主任医师 徐州
吴志勇教授 上海
席启主任医师 大同
夏建川研究员 广州
向德兵讲师 重庆
肖恩华教授 长沙
谢晓华副教授 广州
徐爱民副教授 上海
徐迎新研究员 北京
许春舫主任医师 苏州
徐存拴教授 新乡
徐大华副主任医师 北京
徐德忠教授 西安
徐列明教授 上海
徐小元教授 北京
许玲副教授 上海
许文燮教授 上海
许亚平副教授 镇江
闫惠平研究员 北京
严律南教授 成都
阎晓初副教授 重庆
杨冬华教授 广州
杨广顺教授 上海
杨建勇教授 广州
杨林副研究员 广州
杨维良教授 哈尔滨
杨希山教授 广州
杨云生教授 北京
姚登福教授 南通
姚树坤教授 石家庄
伊力亚尔·夏合丁教授 乌鲁木齐
阴赫宏研究员 北京
于红刚副教授 武汉
余宏宇教授 上海
于健春教授 北京
于颖彦教授 上海
郁宝铭教授 上海
喻荣彬副教授 南京
张柏和教授 上海
张方信主任医师 兰州
张吉翔教授 南昌
张锦生教授 上海
张军教授 西安
张青云研究员 北京
张群华教授 上海
张水军教授 郑州
张绪清副教授 重庆
张学教授 北京
张宗明教授 北京
赵桂珍教授 沈阳
赵景民教授 北京
赵连三教授 成都
赵平副教授 上海
郑民华教授 上海
智发朝教授 广州
周伯平教授 深圳
周丁华主任医师 北京
周国雄主任医师 南通
周士胜教授 大连
周霞秋教授 上海
周晓东研究员 广州
庄林主任医师 昆明
朱传武副主任医师 苏州
朱春兰主任医师 哈尔滨
朱立元教授 深圳
朱人敏教授 南京
邹小明教授 哈尔滨
左国营副主任药师 昆明

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目　次 ●　2006 年 6 月 18 日　第 14 卷　第 17 期　(总第169期)

述　评

1649 重视肝纤维化的治疗 徐列明

基础研究

1654 RNA干扰体外抑制人食管鳞癌细胞Eca-109缺氧诱导因子-1α的表达
肖斌, 施瑞华, 杜琰萍, 朱宏, 凌亭生, 张国新, 林艳, 郝波

1662 电针足三里和阳陵泉穴对家兔胃胆运动及脑肠肽的影响
常小荣, 严洁, 刘玉群, 张泓, 易受乡, 林亚平

1669 聚乳酸-O-羧甲基壳聚糖纳米粒子的制备及其对培养猪肝细胞的影响
陈钟, 戴新征, 杨欣荣, 祝文彩

1675 苦参碱对大鼠原位肝移植冷缺血再灌注损伤的保护作用
朱新华, 仇毓东, 史敏科, 丁义涛

1681 慢病毒介导的双自杀基因对大肠癌细胞的靶向杀伤作用
陈海金, 黄宗海, 苏国强, 吴爱国, 俞金龙

1688 大鼠急性胰腺炎早期肺损伤机制及前列腺素E_1的保护作用
尹勇, 李兆丽

临床研究

1693 拉米夫定体外对慢性乙型肝炎患者树突状细胞功能的影响
张冬云, 郑鹏远, 张晓琴, 刘光辉, 娄惠萍, 唐芙爱, 白经修, 祁元明

1699 DNA甲基化对大肠癌相关基因表达的调控意义
李庚, 千新来, 崔静, 王中群, 冶亚平, 杨晓煜, 李永真

1704 结扎和硬化疗法治疗肝硬化食管静脉曲张出血疗效比较的荟粹分析
范铁艳, 程留芳

文献综述

1710 干细胞与胃癌关系的研究进展
王宁, 陈凛, 赵向阳

1714 转座子及其相关技术的研究
黄春, 张万江

1721 慢性心力衰竭中胃肠系统变化的意义
于佳慧, 王岚峰

1726 温热治疗肿瘤的基础研究进展
张安平, 刘宝华, 张连阳

研究快报

1731 SMMC-7721肝癌细胞膜上β_2糖蛋白Ⅰ受体的表达
高沿航, 高普均, 王丹, 时阳, 李玉琴, 朴云峰, 杨翰仪

临床经验

1735 HBsAg疫苗冲击树突状细胞联合乙肝免疫球蛋白对慢性乙型肝炎及HBV携带者的疗效
郑鹏远, 白蓉, 娄海山, 唐芙爱, 白经修, 司方明, 琚新, 徐建强

1739 中药通腑泻热方辅助治疗消化性溃疡急性穿孔并发脓毒症23例
谢晓华, 赵先明, 黄谊, 杨银芬

1742 美常安联合柳氮磺吡啶治疗溃疡性结肠炎22例 向军英, 冯迎春

1745 婴儿肝炎综合征、胆道闭锁、胆总管囊肿与巨细胞病毒感染的关系 王宝香, 朱润庆

病例报告

1748 苯巴比妥致固定性药疹1例
梁淑文, 屈昌民, 王晓英

附　　录	1749 世界华人消化杂志投稿须知
致　　谢	1754 致谢世界华人消化杂志编委
消　　息	1653 国际肝胆胰协会中国分会第二届全国学术研讨会暨第三届全国普通外科主任论坛通知 1661 第十一届全国普通外科学术会议征文通知 1668 2006上海中日早期胃肠肿瘤国际研讨会通告 1674 专家门诊 1680 技法与经验 1687 第六届全国消化道恶性病变介入治疗研讨会第二轮通知 1698 全国胃黏膜癌前病变与癌前疾病诊治研讨会、第八届中西医结合实验医学研讨会 1703 2006广州肝病防治研究新进展学术报告会 1709 更正与说明专栏、第十一届全国胰腺外科学术研讨会征文 1720 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 1744 2006年第十二届华北区消化学术会议征文通知
封面故事	Min Lian, Ying Liu, Shun-Zhang Yu, Geng-Sun Qian, Shu-Guang Wan, Kenneth R Dixon. Hepatitis B virus x gene and cyanobacterial toxins promote aflatoxin B1-induced hepatotumorigenesis in mice. *World J Gastroenterol* 2006; 12(19): 3065-3072 http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/3065.asp
国际会议	7th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association September 3-7, 2006 convention@edinburgh.org www.edinburgh.org/conference 71st ACG Annual Scientific Meeting and Postgraduate Course October 20-25, 2006 XXX pan-american congress of digestive diseases XXX congreso panamericano de anfermedades digestivas November 25-December 1, 2006 amg@gastro.org.mx www.gastro.org.mx

世界華人消化杂志

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 2006-06-18
原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣　社长总编辑 马连生
编辑部主任 张海宁　英文编辑 张海宁
中文编辑 潘伯荣 张海宁
电子编辑 张敏 李琪
本期审读 王瑾晖

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
出版 世界胃肠病学杂志社
100023，北京市2345信箱
E-mail: wcjd@wjgnet.com
http://www.wjgnet.com
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893
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 世界胃肠病学杂志社发行部
(100023，北京市2345信箱)
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893

《世界华人消化杂志》对所有来稿均进行同行评议，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》，俄罗斯《文摘杂志》收录.

特别声明
本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社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.

2006年版权归世界胃肠病学杂志社所有

ISSN 1009-3079	邮发代号	国外代号	国内定价	广告经营许可证
CN 14-1260/R	82-262	M 4481	每期24.00元 全年864.00元	1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

June 2006 Contents in Brief Volume 14 Number 17

EDITORIAL

1649 Value the treatment of liver cirrhosis
Xu LM

BASIC RESEARCH

1654 RNA interference inhibits expression of hypoxia inducible factor-1α in human esophageal squamous cancer cell line Eca-109 *in vitro*
Xiao B, Shi RH, Du YP, Zhu H, Ling TS, Zhang GX, Lin Y, Hao B

1662 Effects of electroacupuncturing at Zuyangming and Zushaoyang Jingxue on stomach and gallbladder kineses and related brain-gut peptide in rabbits
Chang XR, Yan J, Liu YQ, Zhang H, Yi SX, Lin YP

1669 Preparation of polylactic acid-O-carboxymethylated chitosan nanoparticles and their influences on the cultured porcine hepatocytes
Chen Z, Dai XZ, Yang XR, Zhu WC

1675 Effects of matrine on cold ischemia and reperfusion injury during orthotopic liver transplantation in rats
Zhu XH, Qiu YD, Shi MK, Ding YT

1681 Targeted killing effect of lentivirus-mediated CD/TK suicide genes on colorectal carcinoma cells
Chen HJ, Huang ZH, Su GQ, Wu AG, Yu JL

1688 Mechanism of lung injury and protective effect of prostaglandin E_1 in experimental acute pancreatitis
Yin Y, Li ZL

CLINICAL RESEARCH

1693 *In vitro* effects of lamivudine on function of dendritic cells derived from patients with chronic hepatitis B infection
Zhang DY, Zheng PY, Zhang XQ, Liu GH, Lou HP, Tang FA, Bai JX, Qi YM

1699 Role of DNA methylation in control of tumor suppressor gene and oncogene expression in colorectal carcinoma
Li G, Qian XL, Cui J, Wang ZQ, Ye YP, Yang XY, Li YZ

1704 Comparison between effects of ligation and sclerotherapy in treatment of esophageal variceal bleeding after liver cirrhosis: a meta-analysis
Fan TY, Cheng LF

REVIEW

1710 Advance in relationship between stem cells and gastric cancer
Wang N, Chen L, Zhao XY

1714 Research progress in transposon and its related techniques
Huang C, Zhang WJ

1721 Significance of gastrointestinal system changes in chronic heart failure
Yu JH, Wang LF

1726 Basic research progress on hyperthermia in treatment of tumors
Zhang AP, Liu BH, Zhang LY

RAPID COMMUNICATION

1731 Expression of beta-2-glycoprotein Ⅰ receptor on membranes of hepatoma cell line SMMC-7721
Gao YH, Gao PJ, Wang D, Shi Y, Li YQ, Piao YF, Yang HY

CLINICAL PRACTICE

1735 Efficacy of HBsAg vaccine-pulsed dendritic cells combined with hepatitis B immunoglobulin in treatment of chronic hepatitis B patients and hepatitis B virus carriers
Zheng PY, Bai R, Lou HS, Tang FA, Bai JX, Si FM, Ju X, Xu JQ

1739 Chinese herbs *Tongfu Xiere Fang* in treatment of acute perforated peptic ulcer complicated with sepsis: an analysis of 23 cases
Xie XH, Zhao XM, Huang Y, Yang YF

1742 Therapeutic effect of Medilac-S combined with sulfasalazine in treatment of ulcerative colitis: an analysis of 22 cases
Xiang JY, Feng YC

1745 Relationship between human cytomegalovirus infection and three diseases including infantile hepatitis syndrome, biliary stresia, and choledochal cyst
Wang BX, Zhu RQ

CASE REPORT

1748 Fixed drug eruption induced by phenobarbital: one case analysis
Liang SW, Qu CM, Wang XY

APPENDIX

1749 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology

ACKNOWLEDGMENT

1754 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology

COVER

Lian M, Liu Y, Yu SZ, Qian GS, Wan SG, Dixon KR.
Hepatitis B virus x gene and cyanobacterial toxins promote aflatoxin B1-induced hepatotumorigenesis in mice.
World J Gastroenterol 2006; 12(19): 3065-3072
http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/3065.asp

INTERNATIONAL MEETINGS

7th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association
September 3-7, 2006
convention@edinburgh.org
www.edinburgh.org/conference

71st ACG Annual Scientific Meeting and Postgraduate Course
October 20-25, 2006

XXX pan-american congress of digestive diseases
XXX congreso panamericano de anfermedades digestivas
November 25-December 1, 2006
amg@gastro.org.mx
www.gastro.org.mx

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi
World Chinese Journal of Digestology
Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date June 18, 2006
Honorary-Editor-in-Chief
Bo-Rong Pan
President and Editor-in-Chief
Lian-Sheng Ma

Edited by Editorial Board of
World Chinese Journal of Digestology
PO Box 2345, Beijing 100023, China
Published by The WJG Press
PO Box 2345, Beijing 100023, China
Overseas Distributor
China International Book Trading Corporation
PO Box 399, Beijing 100044, China

Code No.M4481
Mail-Order Circulation Section, The WJG Press
PO Box 2345, Beijing 100023, China
Telephone: +86-10-85381901
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com
http://www.wjgnet.com
ISSN 1009-3079 **CN** 14-1260/**R**

Copyright © 2006 by The WJG Press

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年6月18日; 14(17): 1649-1653
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

述评 EDITORIAL

重视肝纤维化的治疗

徐列明

徐列明, 上海中医药大学肝病研究所 上海中医药大学附属曙光医院 上海市 201203
徐列明, 1982年上海中医学院本科毕业, 1992年上海中医学院获博士学位, 教授, 主要从事中医内科(肝病), 专于肝纤维化的临床和实验研究.
上海市重点学科建设项目资助, 项目编号Y0302
通讯作者: 徐列明, 201203, 上海市浦东新区张衡路528号, 上海中医药大学肝病研究所, 上海中医药大学附属曙光医院.
xulieming@chinatcm.net
电话: 021-51322445 传真: 021-51322445
收稿日期: 2006-03-13 接受日期: 2006-04-17

摘要

肝硬化的最基础治疗措施, 应是抗肝纤维化. 我国已有数个经SFDA批准上市的抗肝纤维化中药制剂用于临床. 应用中医药开展抗肝纤维化治疗, 能使我国肝病研究在国际学术界独树一帜. 在抗肝纤维化的临床实践中, 我们面临的问题: 什么时候开始治疗肝纤维化为宜? 抗肝纤维化疗程应多长? 病因去除后肝纤维化是否还会进展? 转氨酶正常的带病毒者是否需要抗肝纤维化治疗? 抗肝纤维化与其他疗法的关系? 本文围绕这些问题加以述评, 认为肝纤维化治疗愈早愈好, 需长期坚持; 肝纤维化可不受病因影响, 主动进展; 转氨酶正常的带病毒者要注意治疗肝纤维化; 抗病毒治疗联合抗肝纤维化治疗可提高疗效.

关键词: 肝纤维化; 肝硬化; 抗病毒; 治疗

徐列明. 重视肝纤维化的治疗. 世界华人消化杂志 2006;14(17):1649-1653
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1649.asp

0 引言

据统计, 我国仅慢性乙型肝炎患者就达2000万人, 他们中有相当一部分人伴有肝纤维化. 如未接受正确治疗, 20%以上的慢性乙型肝炎患者可发展为肝硬化患者. 这些患者病情多缠绵反复, 预后多较差. 如何治疗这类患者, 是世界性难题. Roberts *et al*回顾分析了1968年至1999年英国牛津地区8192名住院肝硬化患者的死亡情况, 发现肝硬化患者在住院后1 a内的死亡率为34%, 在30 a内这一死亡率保持不变, 是该地区总人口死亡率的16.5倍. Gluud以“肝硬化死亡率: 35 a未变”为题撰文, 对此令人沮丧的结果加以评论. 他指出: 我们已应用了许多新的干预措施希望能降低死亡率. 这些措施在当时都已被推荐, 如肝移植、内镜治疗静脉曲张出血、用β-阻滞剂预防静脉曲张出血和再出血、给予针对乙肝或丙肝的抗病毒药物, 以及预防和治疗肝硬化并发症的抗生素, 但是为什么事与愿违呢? 他认为有3种主要的原因: (1)错误的发现、有关干预有效性的观念被误导和使用干预措施不正确. 错误的发现包括: ①患者掺和, 如肝硬化门诊患者每年以2%的速率增加, 其中因病情严重者入院增加的死亡人数, 抵消了治疗措施改进后的死亡率下降的幅度; 30 a前很少有“非酒精性脂肪性肝炎”和“非酒精性肝纤维化和肝硬化”的诊断, 而现在这些疾病已成趋势, 这部分病情不严重的患者从酒精性肝硬化中划出也可造成影响; ②抽样错误; ③统计上的II类错误的影响等. (2)上述被认为有效的干预措施实际上并不能有效降低肝硬化的死亡率. (3)医生应用的一些干预措施的疗效尚未得到循证医学的证实. Gluud建议开展广泛合作, 研究新的治疗方法以提高肝硬化的疗效[1].

肝硬化的最基础治疗措施, 应落实到抗肝纤维化上. 抑制、阻断或逆转肝纤维化, 可使肝硬化进展延缓、停止发展甚至有所减轻[2]. 近20 a来, 发达国家对肝纤维化和肝硬化的发病机制研究很深, 但在肝纤维化的治疗方面成果不多. 2005年, 中国中西医结合学会肝病分会在上海主办了“首届国际中西医结合肝病学术会议”, 当今国际知名肝纤维化研究学者Scott L. Friedman教授在特邀报告中指出:“对肝纤维化基本机制深入了解, 使有效抗肝纤维化治疗实际可行. 肝星状细胞活化的发现提供了1种重要的网络以确定抗肝纤维化疗法的作用点. 这些疗法包括: ①治疗原发病以预防损伤; ②减轻炎症或宿主的反应以避免刺激肝星状细胞活化; ③直接下调星状细胞的活化; ④抵消星状细胞

■背景资料

各种慢性肝病都伴有肝纤维化的病理改变, 因此抗肝纤维化是治疗慢性肝病的重要方面. 近30 a来的研究已改变了以往认为肝纤维化不可逆转的观点, “肝纤维化经过适当的治疗可以减轻或治愈”已得到共识. 近年来有关肝硬化是不治之症的观点也受到挑战, 愈来愈多的证据显示肝硬化经过治疗也是可以逆转的. 科技先进国家相关基础研究深入, 但是临床药物的研发尚处于实验室阶段. 我国发掘祖国医学宝库, 已有数个中药制剂经SFDA批准作为新药在临床用于治疗肝纤维化, 已证实具有相当的疗效. 开创临床肝纤维化治疗新纪元的重任已历史性地落在我国肝病工作者的肩上, 我们应当利用这一优势, 在实践中解答前人无法解决的临床难题.

■研发前沿
科技发达国家对肝纤维化的机理研究已深入到分子生物学水平. 围绕调控肝星状细胞的活化和凋亡, 研发基因疗法和生物疗法抗肝纤维化, 是国际肝病研究领域的热点之一. 我国近几年开发中医药抗肝纤维化的制剂比较热烈, 我们应当利用中医药的优势, 将临床抗肝纤维化治疗的研究作为我国肝病研究的前沿, 以此开创具有我国特点的研究热点. Scott Friedman 提出当务之急要解决2个问题: 一是发展更好的诊断方法以帮助确定肝纤维化的疗效、明确临床试验的终点; 二是需要建立1种能使任何慢性肝病肝纤维化病理停止发展甚至逆转的抗肝纤维化疗法. 我国抗肝纤维化已进入临床实用阶段, 一些问题如哪些患者是抗肝纤维化治疗的适宜对象?何时开始抗肝纤维化治疗为宜? 疗程应多长? 肝硬化患者是否也需抗肝纤维化治疗? 都亟待在临床实践中寻找答案, 得到验证.

的增殖、形成纤维、收缩和/或对炎症的反应; ⑤刺激星状细胞的凋亡; ⑥由刺激细胞产生基质金属蛋白酶、下调基质金属蛋白酶抑制物或直接给予金属基质蛋白酶以增加细胞外基质的降解[3]. 但是在2005年召开的第56届美国肝病年会上, 仍缺乏令人振奋的治疗肝纤维化和肝硬化的临床研究报告. Friedman在美国年会期间的1次晨会中指出, 抗肝纤维化的生物制剂如可溶性TGF-β1受体因半衰期短而无法应用于临床, 基因疗法在最近的20-30 a内应用于临床的可能性也不大. 因而笔者预计西方国家肝硬化的死亡率在未来数年仍将维持在较高水平. Friedman指出: 逆转肝纤维化的前景现在已引起了巨大的兴趣, 基础科学的发展正在转化为新的有希望的抗肝纤维化疗法. 在未来25 a里, 治疗肝硬化的梦想将变为现实[4]. 开创临床肝纤维化治疗新纪元的重任已历史地落在我国肝病工作者的肩上. 我国已有数个经SFDA批准上市的抗肝纤维化中药制剂可用于临床, 已证实具有相当的疗效. 我们应当利用我国在国际肝病领域仅有的这点“优势”, 在肝纤维化和肝硬化临床治疗上独树一帜, 在国际讲坛上争得一席之地. 在抗肝纤维化的临床实践中, 我们面临这些问题: 什么时候开始治疗肝纤维化为宜? 抗肝纤维化疗程应多长? 病因去除后肝纤维化是否还会进展? 转氨酶正常的带病毒者是否需要抗肝纤维化治疗? 抗肝纤维化与其他疗法的关系?

1 肝纤维化治疗愈早愈好, 需长期坚持

Friedman教授在上海会议指出,“不仅肝纤维化是可逆的, 肝硬化的可逆问题也逐渐明晰起来. 丙肝、乙肝、丁肝和酒精性肝病所致肝硬化的可逆性现已被很好地证明了”[3]. 由此可见, 在可逆的肝纤维化阶段给予适当的抗肝纤维化治疗, 可以取得较好的疗效. 即使患者已是肝硬化了, 仍然有逆转的可能性存在, 仍应积极地抗肝纤维化治疗. 最近, Friedman撰文, 建议用“regression”表示“逆转”肝纤维化或肝硬化, 其定义是纤维化的程度较前减轻, 而不必对逆转的幅度量化或要求组织学完全恢复到正常. 相应的临床重要概念是达到纤维化稳定或面对持续的肝损伤不再进展[4]. 笔者认为, 理性的肝纤维化治疗的目标应该由最高目标和最低目标两部分组成: 肝纤维化阶段的最高目标是完全逆转肝纤维化, 最低目标是阻断或延缓肝纤维化进展; 肝硬化阶段的最高治疗目标是阻断肝纤维化进展, 最低目标是延缓肝纤维化进展. 因此我们应当争取尽早干预肝纤维化的形成, 以其实现治疗的最高目标.

从生化角度分析, 纤维组织中的主要成分胶原蛋白一旦“共价交联”, 结构将变得相当稳定, 不易被基质金属蛋白酶所降解, 因此胶原蛋白的共价交联是阻碍肝硬化逆转的重要因素[5]. 我们现有的抗肝纤维化中药制剂, 其主要机制可能主要在于通过抑制肝星状细胞的活化从而抑制细胞外基质的合成分泌, 以及通过提高金属基质蛋白酶活性从而促进细胞外基质的降解[6-9]. 在有效针对胶原蛋白共价交联的抗肝纤维化治法方药问世以前, 我们只能“设卡”在胶原蛋白共价交联之前, 以防止细胞外基质在肝脏沉积, 所以肝纤维化治疗宜早. 研究发现这种共价交联与肝星状细胞的活化密切相关, 而肝星状细胞在肝病时是不断活化的(见下文), 因此在找到有明确的促进活化肝星状细胞凋亡的治疗方法以前, 肝纤维化需要长期不松懈的连续治疗.

2 肝纤维化可不受病因影响, 主动进展

有人认为只要失去病因的刺激, 例如清除病毒或戒酒, 肝纤维化就不会再发展甚至可能逆转, 因此不必特意抗肝纤维化. 我认为这种认识上的误区来源于对肝纤维化形成机制缺乏足够了解. 10多年前我们就知道, 肝星状细胞的活化主要有2条途径: 由病因刺激损伤的肝细胞以及枯否细胞和内皮细胞等能合成分泌一些细胞因子, 激活肝星状细胞, 这称为旁分泌途径; 而肝星状细胞活化后也能合成分泌相同的细胞因子, 自我进一步激活, 此谓自分泌途径[10]. 这一认识至今仍被认可[11]. 自分泌途径一旦开放, 意味着即使没有病因的进一步刺激, 肝纤维化也可能主动进展. 因此病因治疗和原发病的治疗不能代替抗肝纤维化治疗. 在参加56届美国肝病年会期间, 我曾与Friedman教授专门探讨了这一问题, 他完全同意我的看法, 并指出如果不能完全消除病因, 例如不能彻底清除乙肝病毒, 那么少量残存病毒通过刺激免疫系统损伤肝细胞后, 仍然可以刺激肝纤维化的形成.

3 转氨酶正常的带病毒者要注意治疗肝纤维化

对慢性HBV携带者, 如肝炎病变不明显或未作肝组织学检查, 国内外各种《抗乙肝病毒用药指南》都建议暂不进行治疗. 对非活动性HBsAg携带者, 各《指南》也都认为一般不需治疗[12]. 需

要明确的是, 这里所称的“治疗”是特指“抗乙肝病毒治疗”. 对这类人员不作抗乙肝病毒治疗的理由是疗效不好. Yalcin *et al*曾对转氨酶为正常水平的13个HBeAg阳性慢乙肝患者[男7女6, 平均年龄23.3±5.8岁, 平均ALT活性为450 nkat/L(350-667 nkat/L)(原文27 IU/L, 21-40 IU/L), 平均HBV DNA为4116 ng/L(2885-6628 ng/L)]给予了3 mo疗程的拉米夫定治疗, 并与33例不接受治疗的患者[男18女15, 平均年龄24.8-6.9岁, 平均ALT活性为500 nkat/L(317-650 nkat/L)(原文30 IU/L,19-39 IU/L), 平均 HBV DNA为4094 ng/L (782-7387 ng/L)]相对照. 观察到拉米夫定在降低HBV DNA到不可检测的水平、HBeAg/anti-HBe血清转换以及降低转氨酶活性等方面都没有明显的作用. 治疗开始后第12 mo的HBV DNA和ALT与治疗前的差值在2组间无差异. 治疗组无1例发生HBeAg血清转换和由HBsAg阳性转换为抗-HBs阳性[13].

假如以转氨酶活性在正常范围内来判断肝炎是“非活动性”, 可能会得出错误的结论. 韩国保险公司曾对94 533例男性和47 522例女性作了为期8 a的随访, 研究正常范围的血清转氨酶浓度与肝病死亡率之间的关系. 他们根据死亡证明获得肝脏疾病死亡率, 发现转氨酶浓度与肝脏疾病的死亡率有正相关, 甚至在正常范围内(583-667 nkat/L)(原文35-40 IU/L)也是如此. 与浓度<333 nkat/L(原文<20 IU/L)相比, 谷草转氨酶的浓度为333-483 nkat/L(原文20-29 IU/L)和500-650 nkat/L(原文30-39 IU/L)时, 调整后的相对危险性分别为男性为2.5(95%可信区间2.0-3.0)和8.0(6.6-9.8), 女性为3.3(1.7-6.4)和18.2(8.1-40.4). 谷丙转氨酶相应的危险性分别为男性2.9(2.4-3.5)和9.5(7.9-11.5), 女性3.8(1.9-7.7)和6.6(1.5-25.6). 作者提出谷草转氨酶和谷丙转氨酶预测男性肝脏疾病的最佳临界点分别为517 nkat/L及500 nkat/L(原文31 IU/L及30 IU/L). 结论是: 对于转氨酶活性轻度升高但仍在正常范围者, 应密切观察并进一步进行肝脏疾病的检查[14]. 如对这类人群作肝穿刺检查, 可以发现肝脏有哪些病理改变呢? 广州第八人民医院杨湛 *et al*对112例转氨酶在正常范围内的慢性HBsAg携带者进行了肝活检, 结果显示肝组织学有病理改变者占89.3%(100/112). 其中炎症改变分布G_1 68.8%(77/112), G_2 16.1%(18/112), G_3 3.6%(4/112) , G_4 0.9%(1/112); 纤维化程度分布S_0 17.9%(20/112), S_1 41.1%(46/112), S_2 25.9%(29/112), S_3 3.6%(4/112), S_4 0.9%(1/112). 肝组织炎症程度与同期HBeAg及HBV DNA定量水平无关; 肝组织纤维化程度与HBV DNA定量水平也无关; S_2期中以HBeAg(-)患者所占比例为多(P<0.01), 且外周血中HA、 PⅢP有明显升高(P<0.05, P<0.01)[15]. 这项非常有价值的研究提示我们, 那些无症状且肝功能也正常的乙肝带病毒者的肝脏实际大多有炎症存在, 很可能已经有肝纤维化了. 如果不给予任何治疗, 任其发展, 若干年后无纤维化者可能出现肝纤维化, 已有肝纤维化者可发展为肝硬化. Colletta *et al*的研究给了我们这方面更多的证据, 他们对40例未经治疗的HCV-RNA阳性患者作了2次肝穿刺检查, 前后平均间隔78.5 mo, 观察期间受试者的ALT浓度从未超过正常值上限的1.2倍. 他们观察到在第1次肝穿刺时, 仅有1例(2.5%)有明显的肝纤维化(≥ F2), 而在第2次肝穿刺时, 这个数字增加到14例(35%)[16]. 最近1份来自意大利的报告提供了以下资料: 他们在为期10 a的研究和观察中, 共收集了207例 (平均年龄49.7±11.6岁)抗HCV阳性同时ALT在正常水平(<500 nkat/L , 原文<30 IU/L)的资料. 其中189例在研究初期HCV RNA阳性, 到观察期末有25例转为阴性, 平均病毒载量1 320 500 kU/L, 101(48.8%)例的ALT持续正常, 106例(51.2%)的ALT不时升高到(2-3)×UNL. 肝脏病理组织学显示: 1.4%的患者无损伤, 轻微改变占24.2%, 慢性中等度肝炎为40.6%, 伴或不伴有肝硬化的严重肝炎为33.8%. 5 a后在101例ALT正常者中, 有5例的ALT升高, 72/96患者直至第2次肝穿刺ALT都持续正常. 尽管没有生化指标的异常, 在HCV阳性而ALT持续正常者中有20.8%显示明显的纤维化. 因此报告提出, 确认ALT正常的病毒携带者需要长达5 a的连续观察; 以血清HCV RNA或ALT水平来预测肝纤维化的活动度及程度都不可信[17]. 我们平时在临床上经常遇到一些患者, 称数年前感染了乙肝病毒, 但转氨酶活性一直在正常范围之内, 因医生告知不需治疗而未予重视, 结果拖成了肝硬化. 笔者非常赞成最近发布的《慢性乙型肝炎防治指南》[18]的建议, “对慢性HBV携带者, 应动员其作肝组织学检查. ”如病理发现有炎症和纤维化, 不论是否抗病毒治疗, 都要抗肝纤维化治疗, 其理由来自于我国著名肝脏病理学家胡锡琪教授的病理观察, 他对慢乙肝患者治疗前后

■相关报道

Friedman和Bansal为Hepatology创刊25周年撰写的Reversal of hepatic fibrosis-fact or fantasy? (*Hepatology* 2006;43, Suppl 1: S82-88), 对过去25 a肝病研究领域特别是肝纤维化研究领域所取得的成就作了精辟的总结, 提出不但肝纤维化是可逆的, 肝硬化也是可以逆转的. 他们建议用“regression”表示“逆转”肝纤维化或肝硬化, 其定义是纤维化的程度较前减轻, 而不必对逆转的幅度量化或要求组织学完全恢复到正常. 相应的临床重要概念是达到纤维化稳定或面对持续的肝损伤不再进展. 认为逆转肝纤维化的前景现在已引起了肝病学者巨大的兴趣, 基础科学的发展正在转化为新的有希望的抗肝纤维化疗法. 他们乐观地预计, 在未来25 a里, 治疗肝硬化的梦想将变为现实.

■**创新盘点**
肝硬化的最基础治疗措施，应落实到抗肝纤维化上. 抑制、阻断或逆转肝纤维化，可使肝硬化进展延缓、停止发展甚至有所减轻. 本文围绕在抗肝纤维化的临床实践中医生和患者共同面临的问题加以述评，认为肝纤维化治疗愈早愈好，需长期坚持；肝纤维化可不受病因影响，主动进展；转氨酶正常的带病毒者要注意治疗肝纤维化；抗病毒治疗联合抗肝纤维化治疗可提高疗效. 提出肝纤维化的治疗目标应该由最高目标和最低目标两部分组成：肝纤维化阶段的最高目标是完全逆转肝纤维化，最低目标是阻断或延缓肝纤维化进展；肝硬化阶段的最高治疗目标是阻断肝纤维化进展，最低目标是延缓肝纤维化进展.

2次肝穿刺标本的对比观察，得出的结论是慢性肝炎不伴纤维化，炎症易吸收消失；慢性肝炎伴纤维化，炎症难以吸收消失[19]. 如果患者血清转氨酶活性虽在正常范围但接近正常值的上限达1年以上，又不愿作肝穿刺检查，根据前述韩国保险公司和广州八院提供的数据，估计会有肝脏炎症和肝纤维化，因此建议要及时保肝抗肝纤维化治疗.

4 肝窦毛细血管化阻碍了药效的发挥和肝细胞的修复

胡教授提出“慢性肝炎伴纤维化，炎症难以吸收消失”的观点是很有道理的. Shindo *et al*[20]在抗病毒治疗慢性乙型肝炎时也发现，在肝纤维化存在的情况下，干扰素的药效发挥受限，拉米夫定的疗效虽不受影响，但是肝纤维化进展快速的患者服拉米夫丁后YMDD变异很快就会出现. 这种现象可能与肝纤维化时的一个重要病理特点-“肝窦毛细血管化”有关[21-23]. 正常肝窦内皮细胞胞体富有窗孔，细胞间连接也很松散留有孔隙，肝窦内皮面向狄氏间隙侧覆盖着1层充满筛孔的功能性基底膜. 这些孔隙结构允许血液中的一些成分通过，进入狄氏间隙，与肝细胞进行物质交换. 肝脏受损后，肝窦内皮细胞肿胀、窗孔消失、细胞连接紧密，活化的肝星状细胞合成分泌Ⅰ型胶原、形成致密的基底膜，使肝窦变成毛细血管样的结构. 此种病理变化，影响了肝窦对肝细胞的血液供应，从而使肝细胞与肝窦之间的物质交换发生障碍[24]. 通过抗肝纤维化，可以抑制甚至逆转“肝窦毛细血管化”[25]，改善肝脏血液微循环，改善肝细胞的血液供应，也能使吸收在血液中的抗病毒药物和保肝降酶药物成分更多更好地与肝细胞接触，发挥药效. 而抗病毒有效的结果，则是减轻肝内的炎症，减少肝细胞的损伤，从而减少对肝星状细胞的旁分泌激活. 抗病毒药物和抗纤维化药物联合应用，双管齐下，既能提高抗病毒的疗效，也能增强抗肝纤维化的疗效. 我们已经积累了相关疗效较好的病例资料.

总之，抗肝纤维化已进入我国临床实践，我们对这一疗法的认识将随着应用实践不断加深并得到检验. Hans Popper教授的至理名言：“谁能阻止或延缓肝纤维化，谁将能医治大多数慢性肝病(Anyone who can stop or delay liver fibrosis would be able to cure most chronic liver diseases.)[26]”我们记忆犹新. 重视肝纤维化治疗，应用中医药开展抗肝纤维化治疗，能使我国肝病研究在国际学术界独树一帜，可望降低肝硬化患者的死亡率.

5 参考文献

1 Gluud C. Mortality from cirrhosis: lack of progress over the last 35 years. *Gut* 2005; 54: 1523-1526
2 Chuang JH, Wang PW, Tai MH. An adipocentric view of liver fibrosis and cirrhosis. *Chang Gung Med J* 2004; 27: 855-868
3 Friedman SL. Hepatic Fibrosis, The new frontier in liver disease. 上海: 首届国际中西医结合肝病学术会议论文汇编 2005: 8-19
4 Friedman SL, Bansal MB. Reversal of hepatic fibrosis-fact or fantasy? *Hepatology* 2006; 43: S82-S88
5 上海第一医学院. 医用生物化学(下册). 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1979: 1285
6 刘平. 中医药在抗肝纤维化治疗中的优势. 中国中西医结合杂志 2002; 22: 328-329
7 崔红燕, 姜哲浩, 刘成, 刘成海. 扶正化瘀方对肝纤维化大鼠间质性基质金属蛋白酶活性的影响. 上海中医药大学学报 2003; 17: 35-38
8 张杰, 徐列明. 中医药治疗实验性肝纤维化作用机制研究进展. 中西医结合学报 2003; 1: 142-145
9 薛冬英, 徐列明, 洪嘉禾. 浅谈中药复方在抗肝纤维化中的作用. 中国中医药信息杂志 2003; 10: 34-35
10 徐列明, 曾明德. 贮脂细胞体外培养及其生物功能的研究进展. 中华消化杂志 1992; 12: 112-114
11 张锦生. 肝星状细胞激活的内在机制. 世界华人消化杂志 2005; 13: 831-834
12 Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update of recommendations. *Hepatology* 2004; 39: 857-861
13 Yalcin K, Degertekin H, Kokoglu OF, Ayaz CA. Three-month course of lamivudine therapy in HBeAg-positive hepatitis B patients with normal aminotransferase levels. *Turk J Gastroenterol* 2004; 15: 1-3
14 Kim HC, Nam CM, Jee SH, Han KH, Oh DK, Suh I. 正常血清转氨酶浓度与肝病死亡率危险性的关系: 前瞻性队列研究. 英国医学杂志中文版. *BMJ* 2004; 328: 983
15 杨湛, 张春兰, 范慧敏, 李文莉, 张建珍, 马俊卿. 慢性HBsAg携带者肝组织学改变与临床. 上海: 首届国际中西医结合肝病学术会议论文汇编 2005: 73-74
16 Colletta C, Smirne C, Fabris C, Toniutto P, Rapetti R, Minisini R, Pirisi M. Value of two noninvasive methods to detect progression of fibrosis among HCV carriers with normal aminotransferases. *Hepatology* 2005; 42: 838-845
17 Vandelli C, Renzo F, Romano L, Tisminetzky S, De Palma M, Stroffolini T, Ventura E, Zanetti A. Lack of evidence of sexual transmission of hepatitis C among monogamous couples: results of a 10-year prospective follow-up study. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 855-859
18 中华医学肝病学分会、感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南中华肝脏病杂志 2005; 881-891
19 胡锡琪. 乙型肝炎病理. 胃肠病学 2002; 7: 295-298
20 Shindo M, Hamada K, Nishioji K, Muramatsu A, Oda Y, Okuno T. The predictive value of liver fibrosis in determining the effectiveness of interferon and lamivudine therapies for chronic hepatitis B. *J Gastroenterol* 2004; 39: 260-267
21 Xu B, Broome U, Uzunel M, Nava S, Ge X, Kumagai-Braesch M, Hultenby K, Christensson B,

Ericzon BG, Holgersson J, Sumitran-Holgersson S. Capillarization of hepatic sinusoid by liver endothelial cell-reactive autoantibodies in patients with cirrhosis and chronic hepatitis. *Am J Pathol* 2003; 163: 1275-1289
22 Kimura H, Mochida S, Inao M, Matsui A, Fujiwara K. Angiopoietin/tie receptors system may play a role during reconstruction and capillarization of the hepatic sinusoids after partial hepatectomy and liver necrosis in rats. *Hepatol Res* 2004; 29: 51-59
23 Xu GF, Wang XY, Ge GL, Li PT, Jia X, Tian DL, Jiang LD, Yang JX. Dynamic changes of capillarization and peri-sinusoid fibrosis in alcoholic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 238-243
24 王宝恩, 张定凤. 现代肝脏病学. 第1版. 北京: 科学出版社, 2003: 539
25 王宪波, 刘平, 陆雄, 刘成海, 胡义扬, 顾宏图, 刘成. 二甲基亚硝胺大鼠肝纤维化形成中门脉压力的动态变化. 世界华人消化杂志 2002; 10: 401-405
26 Brunner H: Procollagen III levels in serum: Do they provide additional information in liver disease? Hepatology: A festschrift for Hans Popper. Edited by Brunner H. and Thaler H. Raven Press, New York 1985: 251

电编 李琪 编辑 潘伯荣

■名词解释

肝窦毛细血管化: 正常肝窦内皮细胞胞体富有窗孔, 细胞间连接也很松散留有孔隙, 肝窦内皮面向狄氏间隙侧覆盖着1层充满筛孔的功能性基底膜. 这些孔隙结构允许血液中的一些成分通过, 进入狄氏间隙, 与肝细胞进行物质交换. 肝脏受损后, 肝窦内皮细胞肿胀、窗孔消失、细胞连接紧密, 活化的肝星状细胞合成分泌Ⅰ型胶原、形成致密的基底膜, 使肝窦变成毛细血管样的结构. 此种病理变化, 影响了肝窦对肝细胞的血液供应, 从而使肝细胞与肝窦之间的物质交换发生障碍.

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

国际肝胆胰协会中国分会第二届全国学术研讨会暨第三届全国普通外科主任论坛通知

本刊讯 第二届国际肝胆胰协会中国分会学术会议将于2006-10在武汉举行.

在各方面的大力支持下, 国际肝胆胰协会中国分会第一届学术研讨会已于2004-12在武汉成功举办, 与会代表一千余人, 中国人大副委员长吴阶平院士、国际肝胆胰前主席刘允怡教授、Jim Tooli教授, 国际肝胆胰协会侯任主席Büechler教授和欧洲肝胆胰协会主席Broelsch教授等亲自到会. 会议受到国内外专家及到会代表的一致赞赏, 并受到国际肝胆胰协会的通报好评, 会议取得巨大成功.

第二届会议将邀请国外和国内著名专家做专题讲座, 针对国际国内肝胆胰外科进展及近年来的热点、难点问题进行讨论; 并交流诊治经验, 推广新理论、新技术、新方法, 了解国内外肝胆胰疾病诊断、治疗发展趋势; 同时放映手术录像. 大会热烈欢迎全国各地肝胆胰领域的内科、外科、影像科各级医师以及科研人员积极投稿和报名参加.

会议同时召开第三届全国普外科主任论坛, 因此也欢迎从事医疗卫生管理的各级医院正、副院长及正、副主任积极投稿和报名参加.

本次会议已列入2006年国家级继续医学教育项目, 参会代表均授予国家级继续医学教育学分10分.

来稿要求: 寄全文及500-800字论文摘要, 同时寄论文的软盘一份或发电子邮件. 以附件的形式发送至chenxp@medmail.com.cn, 也可将稿件打印后寄至: 武汉市解放大道1095号, 武汉华中科技大学附属同济医院肝胆胰外科研究所张志伟、黄志勇副教授(收), 邮编: 430030; 联系电话: 027-83662599.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年6月18日; 14(17): 1654-1661
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

RNA干扰体外抑制人食管鳞癌细胞Eca-109缺氧诱导因子-1α的表达

肖 斌, 施瑞华, 杜琰萍, 朱 宏, 凌亭生, 张国新, 林 艳, 郝 波

■背景资料
HIF-1α与肿瘤的增殖、血管生成、代谢、侵袭转移等多种生物学行为有关, 多种肿瘤组织中存在HIF-1α的高表达, 现已成为肿瘤诊断、基因治疗研究的热点之一. 但通过分子生物学手段在食管鳞癌中研究HIF-1α功能的研究尚不多见.

肖斌, 施瑞华, 杜琰萍, 朱宏, 凌亭生, 张国新, 林艳, 郝波, 南京医科大学第一附属医院消化科 江苏省南京市 210029
肖斌, 1997年南京医科大学本科毕业, 主治医师, 硕士在读, 主要从事消化系统疾病的临床与基础研究.
江苏省自然科学基金资助项目, No. BK2005153
通讯作者: 施瑞华, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院消化科. ruihuashi@126.com
电话: 025-83718836-6973
收稿日期: 2006-03-24 接受日期: 2006-05-09

RNA interference inhibits expression of hypoxia inducible factor-1α in human esophageal squamous cancer cell line Eca-109 *in vitro*

Bin Xiao, Rui-Hua Shi, Yan-Ping Du, Hong Zhu, Ting-Sheng Ling, Guo-Xin Zhang, Yan Lin, Bo Hao

Bin Xiao, Rui-Hua Shi, Yan-Ping Du, Hong Zhu, Ting-Sheng Ling, Guo-Xin Zhang, Yan Lin, Bo Hao, Department of Gastroenterology, the Frist Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2005153
Correspondence to: Dr. Rui-hua Shi, Department of Gastroenterology, the Frist Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. ruihuashi@126.com
Received: 2006-03-24 Accepted: 2006-05-09

Abstract

AIM: To investigate inhibitory effect of hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α) short hairpin RNA (shRNA) on the expression of HIF-1α in human esophageal squamous cancer cell line Eca-109, and to screen suitable interference targets in HIF-1α gene.

METHODS: Three pairs of oligonucleotides targeting HIF-1α were cloned into linearized PGCsi eukaryotic expression vector after annealing. The recombinant plasmids were identified by sequencing. Human esophageal squamous cancer cells Eca-109 and embryonic kidney cells 293T were transfected with the recombinant plasmids, respectively. Fluorescence microscopy was used to observe the effect of RNA interference and evaluate the efficacy of transfection. The transcription of HIF-1α gene and the expression of HIF-1α protein were determined by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively.

RESULTS: DNA sequencing showed that three recombinant plasmids (pGCsi-HIF 1, 2, 3) were successfully constructed. The mean efficacy of transfection was 85.4% in 293T cells, and it was 73.2% in Eca-109 cells. The transcription of HIF-1α gene and the expression of HIF-1α protein were down-regulated by RNA interference. The pGCsi-HIF 2 and pGCsi-HIF 3 showed higher interfering efficiency than pGCsi-HIF 1. The inhibition rates of pGCsi-HIF 2 and pGCsi-HIF 3 were 78.5% and 86.9% (P = 0.000, P = 0.000 *vs* control group) in 293T cells 72 h after transient transfection, respectively. The inhibition rate of pGCsi-HIF 3 was also 69.7% (P = 0.000 *vs* control group) in Eca-109 cells after screening for 2 wk.

CONCLUSION: The recombinant plasmid pGCsi-shHIF can effectively suppress the expression of HIF-1α in esophageal squamous cancer cells Eca-109, and the efficient interfering targets in HIF-1α gene are screened out.

Key Words: Esophageal squamous cancer; Hypoxia inducible factor-1α; RNA interference; Short hairpin RNA

Xiao B, Shi RH, Du YP, Zhu H, Ling TS, Zhang GX, Lin Y, Hao B. RNA interference inhibits expression of hypoxia inducible factor-1α in human esophageal squamous cancer cell line Eca-109 *in vitro*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(17):1654-1661

摘要

目的: 观察缺氧诱导因子-1α(hypoxia inducible factor-1α, HIF-1α)短发夹状RNA(short hairpin RNA, shRNA)对人食管鳞癌细胞系Eca-109中HIF-1α基因的沉默效应, 筛选有效干扰靶点.

方法: 设计合成干扰缺氧诱导因子-1α RNA寡核苷酸片段, 经退火、连接等步骤克隆至线性化的PGCsi真核表达载体上, 测序鉴定. 应用Lipofectamine™ 2000将该质粒分别转染Eca-109细胞和293T细胞, 其中Eca-109抗性细胞又经2-4 wk的G418筛选. 荧光显微镜评估转染效率, 荧光定量RT-PCR检测HIF-1α mRNA表达情况, Western blot检测HIF-1α蛋白表达情况.

结果: 成功构建了3个靶点的重组质粒pGCsi-H1-shHIF, 293T细胞平均转染效率为约85.4%, Eca-109细胞的平均转染效率约73.2%. 荧光定量RT-PCR和Western blot显示瞬时转染这3种重组质粒的293T细胞和筛选2 wk的Eca-109细胞HIF-1α mRNA和蛋白表达均较对照组有不同程度的下降, 其中2号和3号靶点的干扰效应尤为明显. 在瞬时转染72 h后的293T细胞中, 其抑制率分别达到了78.5%、86.9% (P = 0.000, P = 0.000 *vs* 72 h空白对照组), 筛选2 wk的Eca-109细胞中, 3号靶点对HIF-1α mRNA的抑制率也达到了69.7% (P = 0.000 *vs* 2 wk空白对照组).

结论: 重组质粒pGCsi-shHIF能有效抑制食管鳞癌细胞Eca-109中HIF-1α基因的表达, 经不同细胞中的瞬时和稳定转染筛选出了有效干扰靶位.

关键词: 食管鳞癌; 缺氧诱导因子-1α; RNA干扰; 短发夹状RNA

肖斌, 施瑞华, 杜琰萍, 朱宏, 凌亭生, 张国新, 林艳, 郝波. RNA干扰体外抑制人食管鳞癌细胞Eca-109缺氧诱导因子-1α的表达. 世界华人消化杂志 2006;14(17):1654-1661
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1654.asp

0 引言

缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)是在哺乳动物体内广泛分布的核蛋白, 是目前公认的在细胞缺氧自适应调节过程中重要的转录因子之一. HIF-1属于bHLH-PAS(basic helix-loop-helix-Per/ARNT/Sim)转录因子家族, 是由α亚基和β亚基组成的异二聚体, 其中HIF-1α的表达与缺氧有关, 是调控下游转录的活性亚基, 其表达随细胞内氧浓度的下降而增加. 对缺氧的耐受是肿瘤细胞能够在实体瘤组织中存活和快速增殖的基础, 在多种肿瘤组织中检出了HIF-1α的过表达[1], 进一步研究发现, HIF-1α还与肿瘤血管生成、能量代谢、离子和儿茶酚胺代谢、肿瘤细胞凋亡、侵袭转移和耐药性的产生有关[2-3]. HIF-1α在核内与HIF-1β结合形成异二聚体, 通过与下游靶基因上含共有序列5'-RCGTG-3'的缺氧反应元件(hypoxia response element, HRE)结合, 促进靶基因如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、血红素加氧酶(hemeoxygenase 1, HO-1)、诱导型NO合酶(iducible nitricoxide synthase, iNOS)、转铁蛋白及其受体、胰岛素样生长因子Ⅱ(insulin-like growthing factor Ⅱ, IGF-Ⅱ)及多种糖酵解相关酶等基因的转录, 从而启动一系列的代偿反应, 使肿瘤细胞在缺血缺氧的恶劣环境下存活并保持旺盛的增殖活力. 目前HIF-1α的研究已应用到肿瘤的诊断、预后评估和基因靶向治疗等方面. 我们通过构建针对HIF-1α mRNA的shRNA真核表达载体并转染人食管鳞癌细胞Eca-109和胚肾细胞293T, 以RNA干扰手段抑制HIF-1α的表达, 经实时荧光定量RT-PCR和Western blot分别在核酸和蛋白水平上验证干扰效率, 从而筛选出针对HIF-1α mRNA的有效靶位, 为进一步研究HIF-1α在食管鳞癌发生、发展过程中的作用以及在肿瘤基因治疗中的应用打下基础.

■**研发前沿**
RNA干扰是近年来兴起的高效、高特异性基因沉默技术, 该技术广泛应用于基因功能研究. 目前食管鳞癌中的干扰报道不多.

1 材料和方法

1.1 材料 pGCsi-H1-GFP环形质粒(上海吉凯公司)为携带cGFP报道基因并不干扰任何内源基因的短发夹状RNA载体, 同时携有H1启动子及氨苄、新霉素抗性. 人食管鳞癌细胞Eca-109及胚肾细胞293T购自中科院上海细胞所, 细胞培养液为含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液. 胎牛血清及DMEM均为Hyclone公司产品, 感受态大肠杆菌DH5α由本实验室保种. 限制性内切酶*Bam*H Ⅰ、*Hin*d Ⅲ和T4 DNA连接酶为Fermantas公司产品, 脂质体细胞转染试剂Lipofectamine™ 2000购自Invitrogen公司, 质粒抽提纯化试剂盒(3SHL Spin Column Plasmid Maxi-Prep Kit V4)购自上海申能博彩生物科技有限公司, 小鼠HIF-1α mAb为Chemicon公司产品(MAB5382), HRP标记羊抗鼠二抗为Rockland公司产品, 鼠抗人的Tubulin-α mAb为Sigma公司产品, PVDF膜购自Roche公司, BCA蛋白定量试剂盒、化学发光试剂盒均购自Pierce公司, 总RNA抽提试剂Tri-Blue购自上海申能博彩生物科技有限公司, RNA逆转录试剂盒(#K1622)、Taq酶(#EP 0404)、10 mmol/L dNTP Mix (#R0191)均

■相关报道
HIF-1α基因研究微观上已进入亚分子水平(参考文献[11-13]), 宏观上在提高早期肿瘤检出率、提高对放、化疗、光动力治疗敏感性及肿瘤基因治疗等方面均有积极的尝试(参考文献[15-17]). 而应用RNA干扰手段进行基因治疗的研究更是层出不穷(参考文献[19-30]).

为Fermentas公司产品, SYBR Green Ⅰ购自上海捷瑞生物工程有限公司(RS0975). 相差倒置荧光显微镜为Carl Zeiss公司产品, 荧光实时定量PCR仪(RG-3000)为Corbett Research公司产品, 蛋白电泳及转膜系统为Bio-Rad公司产品.

1.2 方法

1.2.1 HIF-1α shRNA表达载体的构建、扩增与纯化 根据人HIF-1α基因序列(GenBank No. NM001530)设计合成3对HIF-1α-siRNA寡核苷酸片段, 序列分别为: 1号靶正义链: 5'-GATCCCGAGGAAGAACTATGAACATAA *TTCAAGAGA* TTATGTTCATAGTTCTTCCTC TTTTTGGAT-3', 反义链: 5'-AGCTATCCA AAAAGAGGAAGAACTATGAACATAA *TCTCTTGAA* TTATGTTCATAGTTCTT CCTCGG-3'; 2号靶正义链: 5'-GATCCC GCACAGGCCACATTCACGTATA *TTCAAGAGA* TATACGTGAATGTG GCCTGTGCTTTTTGGAT-3', 反义链: 5'-AGCTATCCAAAAAGCACAGGCCACA TTCACGTATA *TCTCTTGAA* TATACGTG AATGTGGCCTGTGCGG-3'; 3号靶正义链: 5'-GATCCC GACTGATGACCAGCAACTTGA *TTCAAGAGA* TCAAGTTGCTGGTCATCAGTC TTTTTGGAT-3', 反义链: 5'-AGCTATCCA AAAAGACTGATGACCAGCAACTTGA *TCTCTTGAA* TCAAGTTGCTGGTCATCAGT CGG-3'(斜体为LOOP). 每对寡核苷酸两端分别带有*Bam*H Ⅰ和*Hin*d Ⅲ酶切位点. 将各1 μL的正向和反向siRNA寡核苷酸片段与48 μL的退火缓冲液混合; 混合物在90℃温育4 min, 70℃温育10 min. 缓慢冷却退火的寡核苷酸片段至10℃. 同时用*Hin*d Ⅲ和*Bam*H Ⅰ限制酶将1 μL的pGCsi载体线性化. 将2 μL退火后的siRNA寡核苷酸片段加到T4 DNA连接酶缓冲液中, 接着再加1 μL pGCsi载体、5 μL DEPC水、1 μL T4 DNA连接酶, 室温下温育过夜. 构建成的质粒分别称为: pGCsi-HIF 1, pGCsi-HIF 2和pGCsi-HIF 3. 常规方法将重组质粒及pGCsi空载体转化入感受态宿主细胞DH5α, 细菌在含氨苄青霉素的LB平板37℃培养过夜后挑单克隆, 接种至LB培养基(10 g/L胰蛋白酶胨, 5 g/L酵母提取物, 10 g/L氯化钠), 37℃振摇培养过夜, 次日按说明书操作以试剂盒进行质粒纯化抽提, 测浓度后保存于-20℃备用. 部分质粒送英骏公司测序.

1.2.2 细胞转染、培养和观察 两种细胞各分5组, 分别为0组空白对照组、1组转染pGCsi-HIF 1质粒组、2组转染pGCsi-HIF 2质粒组、3组转染pGCsi-HIF 3质粒组、4组转染空载体组. 转染前一天取对数生长期的Eca-109细胞及293T细胞2.5×10^5个接种于35 mm培养皿, 培养于不含抗生素的DMEM培养液(含100 mL/L胎牛血清), 次日观察细胞长至约90%聚合开始转染. 取质粒4 μg, 脂质体Lipofectamine™ 2000 10 μL稀释于不含抗生素的DMEM, 室温孵育20 min后加入培养皿, 培养于37℃培养箱, CO_2浓度为50 mL/L. 6 h后更换新鲜的含100 mL/L胎牛血清, 100 kU/L青霉素, 100 mg/L链霉素的DMEM培养液. 其后每2 d换液. 293T细胞做瞬时转染, 分别于48, 72 h收集细胞, Eca-109细胞转染后24 h按1∶9的比例传代, 48 h后开始用含800 mg/L G418的选择性培养液进行筛选, 2 wk后挑取克隆在400 mg/L G418培养液中继续传代培养2-4 wk, 分别收集该时段细胞进行检测. 细胞转染后48 h在荧光显微镜下观察绿色荧光显色情况并照相, 镜下分别计算10个40倍视野下发绿色荧光的细胞占总细胞数的百分率作为细胞转染效率的近似值.

1.2.3 实时定量PCR 收集各组细胞, 采用一步法提取细胞总RNA(Tri-blue), 随后取RNA 2.5 μg按试剂盒说明书以小鼠M-MuLV逆转录酶进行逆转录, 转录后的cDNA中取1个样品进行梯度稀释作为绘制标准曲线的样本, 与其余样品同时进行QPCR, 在25 μL体系中加入HIF-1α的上、下游引物各0.12 μmol/L, Taq酶0.625 U, dNTP Mix 0.2 mmol/L, SYBR Green Ⅰ终浓度为0.3×, 以β-actin作为内参照同时扩增, 每样品均做复孔, 另有2管为不加模板的空白对照. 94℃ 5 min预变性, 94℃ 20 s, 58℃ 20 s, 72℃ 30 s, 80℃ 10 s读板, 扩增35个循环, 最后72℃延伸10 min. 应用Rotor-Gene Real-Time Analysis Software 6.0软件分析数据得到CT值, 绘制标准曲线并根据公式amount of target = $2^{-\triangle\triangle CT}$计算得出相对样品模板量[4]. 所用引物以Primer-5软件根据引物设计要求自行设计, 交由上海申能博彩生物科技有限公司合成, HIF-1α上游引物: 5'-GCA AGA CTT TCC TCA GTC GAC ACA-3', 下游引物: 5'-GCA TCC TGT ACT GTC CTG TGG TGA-3'; β-actin上游引物: 5'-CCA GCC ATG TAC GTT GCT ATC-3', 下游引物: 5'-CAG GTC CAG ACGCAGGATGGC-3'. 扩增结束后取PCR产物10 μL上样, 10 g/L琼脂糖凝胶电泳,

EB染色, Tanon凝胶成像系统摄片并分析结果.

1.2.4 Western blot 收细胞, 冰PBS洗2次, 加入细胞裂解液[20 mmol/L Tris (pH 7.5), 4 mmol/L EDTA, 20 g/L SDS] 150 μL裂解细胞, 超声破碎后12 000 r/min, 离心5 min, 取上清, 用BCA蛋白定量试剂盒检测总蛋白浓度后, 以蛋白上样量60 μg, 行稳流100 g/L SDS-PAGE电泳, 稳压冰浴电转至PVDF膜, 50 g/L脱脂奶粉室温封闭1 h后TBST洗膜, 加入鼠抗HIF-1α mAb(工作浓度1∶400) 4℃孵育过夜. 次日TBST洗膜后再加HRP标记的羊抗鼠二抗(工作浓度为1∶10 000)室温孵育1 h, TBST洗膜. ECL化学发光法显影, 暗室曝光. 以α-Tubulin(单抗工作浓度为1∶4000)为内参照.

统计学处理 所得数据均以mean±SD表示, 采用SPSS 11.0软件进行统计分析. 单因素方差分析, LSD法检验各组与对照组间差异, $P<0.05$ 认为两组数据存在显著性差异. 感光胶片条带以Tanon Gis软件进行灰度值分析, 以目的条带与内参照α-Tubulin条带的比值代表目的基因蛋白的表达水平.

2 结果

2.1 pGCsi-HIF重组质粒 质粒抽提后送上海英骏生物技术有限公司测序, 测序结果证实与设计相符, 插入shRNA序列100%正确(测序结果略).

2.2 细胞转染效率 转染后48 h于倒置荧光显微镜下观察绿色荧光表达情况(图1), 按发绿色荧光的细胞占总细胞数的百分率计算, 293T细胞转染空载体及3个重组质粒的平均转染效率为约85.4%, Eca-109细胞的平均转染效率约73.2%.

2.3 HIF-1α mRNA表达 转染3种重组质粒的细胞HIF-1α mRNA相对表达量均小于1, 认为3种shRNA在2细胞中均发挥了不同程度的干扰作用, 其中pGCsi-HIF 2和pGCsi-HIF 3的干扰效应尤为明显, 在瞬时转染72 h后的293T细胞中, 抑制率分别达到了78.5%, 86.9%(P均<0.01, ^{f}P = 0.000, ^{g}P = 0.000 *vs* 72 h空白对照组, 图2A), 在转染后经G418筛选2 wk的Eca-109细胞中, 质粒pGCsi-HIF 3对HIF-1α mRNA的抑制率也达到了69.7%($P<0.01$, ^{k}P = 0.000 *vs* 2 wk空白对照组, 图2B), 接近70%. 而在筛选4 wk的Eca-109细胞中, HIF-1α mRNA的表达似乎有不同程度的上升, 相对于同时间段的空白对照细胞而言, 3种质粒的抑制率仅为29.3%, 33.0%, 40.4%(P均<0.05, ^{m}P = 0.016, ^{n}P = 0.008, ^{o}P = 0.002 *vs* 4 wk对照组, 图2B). 此外, 转染空载体的各组细胞HIF-1α mRNA表达量均接近1, 与空白对照组无显著性差异(^{d}P = 0.525, ^{h}P = 0.412, ^{i}P = 0.372, ^{p}P = 0.848), 说明转染空载体细胞中未发生针对HIF-1α mRNA的干扰效应.

2.4 HIF-1α蛋白表达 在瞬时转染的293T细胞中转染pGCsi-HIF 2, pGCsi-HIF 3两种质粒的实验组蛋白表达量较空白对照均有不同程度的低减, 其中转染后72 h的HIF-1α蛋白表达水平尤其低下, 此外, 在经G418筛选的Eca-109细胞中, 转染pGCsi-HIF 3质粒的细胞HIF-1α蛋白表达较空白对照组也有一定程度的降低, 但这种抑制效应不如瞬时转染的293T细胞中明显, 同时检测的仅转染空质粒的对照组(4组)和空白对照组(0组)相比HIF-1α蛋白表达未见明显差异($P>0.05$, 图3). 灰度扫描结果与上述结果相符合(图4). 这说明重组载体pGCsi-HIF 2、pGCsi-HIF 3通过RNA干扰有效抑制了HIF-1α蛋白的表达, 其中pGCsi-HIF 3的干扰效应尤其强烈. 结果与荧光实时定量PCR一致.

3 讨论

我国是食管癌的高发区, 死亡率居世界第一, 病理类型中鳞癌占绝大多数, 约90%左右. 食管癌确诊时往往已届晚期, 大多已无手术机会, 放化疗对鳞癌的疗效甚差, 故而通常治疗困难, 预后不佳. 因此, 研究发病机制、提高早期诊断率、寻找新的治疗途径和预后判断标准就成为食管癌防治研究的关键. 作为生长迅速的实体肿瘤, 食管癌组织内常常存在缺氧微环境和代谢紊乱状态, 在缺氧数小时内, 肿瘤细胞即可分泌大量促血管生成因子如血管内皮生长因子(VEGF)等, 从而使血管内皮细胞大量增殖, 肿瘤组织中新生血管生成, 同时细胞内无氧代谢增加以使其在恶劣环境下得以生存并保持增殖活性, 在此过程中, 缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)发挥了重要作用[5-6], 目前认为HIF-1α是调节VEGF转录最重要的核转录因子之一[7]. 研究表明, HIF-1α在人类大多数肿瘤的缺氧部位表达明显上调[8]. 不仅如此, HIF-1α在细胞代谢、转录调控、凋亡抑制、侵袭性和耐药性等肿瘤相关生物学行为中都扮演着重要角色. 多种抑癌基因失活或原癌基因激活也会诱导HIF-1α的高表达[9]. 在结构上HIF-1α具有氧浓度依赖性功能域(ODD), 常氧下该功能域与E3泛醌连接酶结合通过泛素-蛋白酶体途径将HIF-1α迅速降解, 半衰期不到

■**创新盘点**
利用RNA干扰手段研究食管鳞癌中HIF-1α基因功能, 抑制效应高, 特异性好, 该手段将为食管癌相关基因研究开辟广阔前景.

■应用要点
本研究构建了3种针对HIF-1α基因的质粒载体并验证了其在食管鳞癌细胞中对该基因的抑制效应，这为进一步研究食管鳞癌中HIF-1α基因功能和以该基因为靶点的基因治疗提供了技术平台.

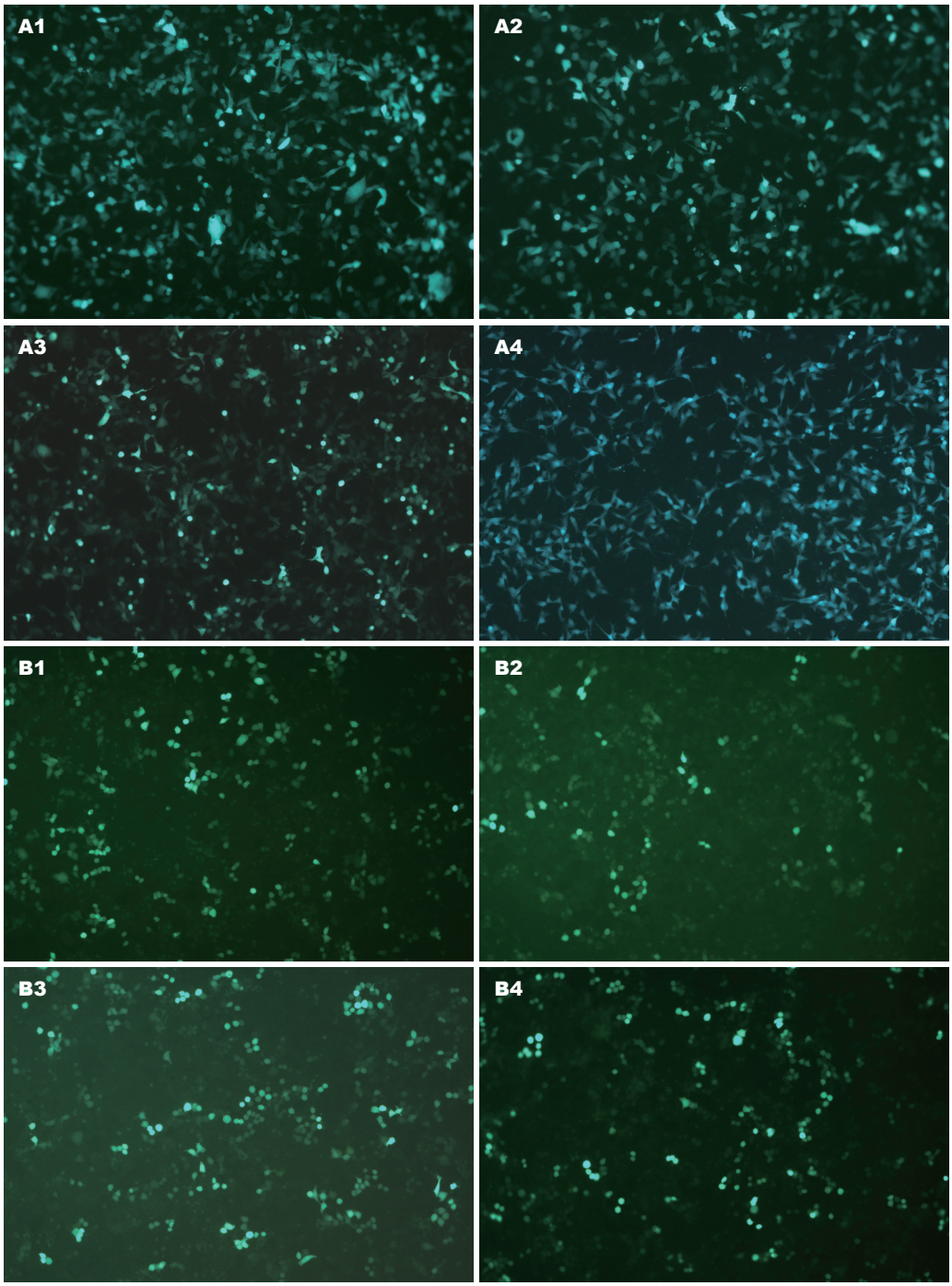


图 1 质粒转染48 h后荧光显微镜观察绿色荧光表达情况(×10). A: 293T细胞; B: Eca−109细胞; 1, 2, 3, 4: 转染pGCsi−HIF 1, pGCsi−HIF 2, pGCsi−HIF 3重组载体和空载体的细胞.

5 min[10], 而缺氧时, 细胞内脯氨酸羟化酶(prolyl hydroxylase domain, PHDs)受抑制, HIF-1α的泛素降解途径受阻, HIF-1α在核内积聚, 同时缺氧也可通过PI3K和MAPK途径将HIF-1α磷酸化, 增加其稳定性, 从而使HIF-1α蛋白表达增加, 并与β亚单位形成有活性的异二聚体HIF-1, 再与下游靶基因上缺氧反应元件(HRE)结合, 调控下游60余种靶基因转录, 最终启动各种生理病理过程[11-13]. 在不同肿瘤组织中进行的研究表明, HIF-1α不仅在肿瘤的局部和转移灶中高表达, 而且与肿瘤的良恶性、发生进展演进过程、侵袭、转移能力及预后状况直接有关[1-2,14], 此外, 在基因治疗方面, Koukourakis *et al*[15]在早期食管癌中进行的研究发现HIF-1α在早期癌组织中亦有明显升高, 高表达HIF-1α者完全缓解(CR)率低, 同时这种升高与癌肿对光动力治疗的敏感性呈正相关, Sun *et al*[16]通过反义HIF-1α的作用完全而持久地消除了直径0.1 cm的肿瘤, 并诱

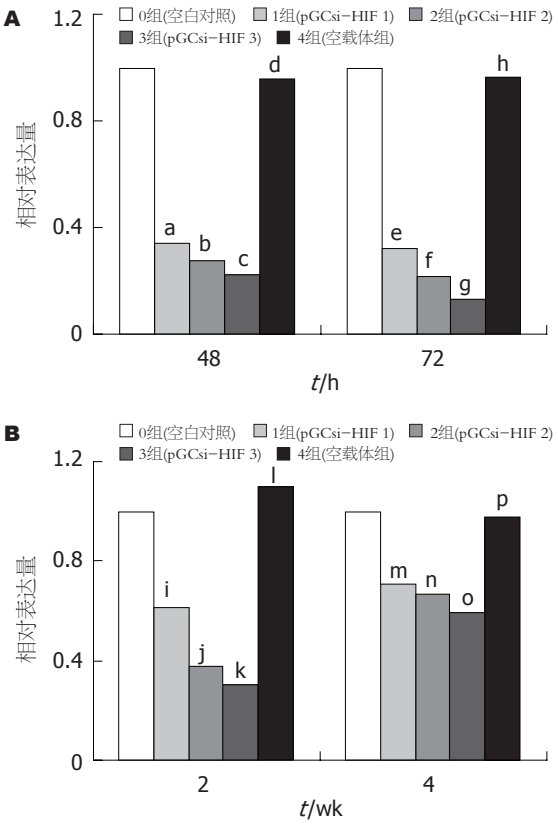


图 2 2种细胞HIF-1α mRNA表达. A: 瞬时转染后293T细胞; B: 筛选后Eca-109细胞.

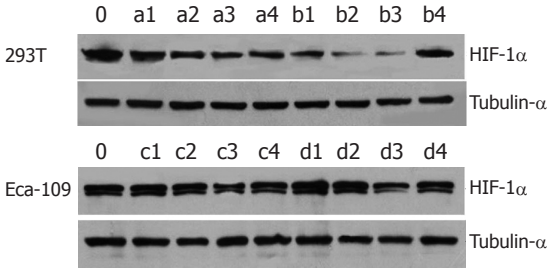


图 3 2种细胞中HIF-1α蛋白表达. 0: 空白对照; 1, 2, 3, 4: 转染pGCsi-HIF 1, pGCsi-HIF 2和pGCsi-HIF 3及空载体的细胞组; a, b: 转染后48, 72 h的293T细胞; c, d: 筛选2, 4 wk的Eca-109细胞.

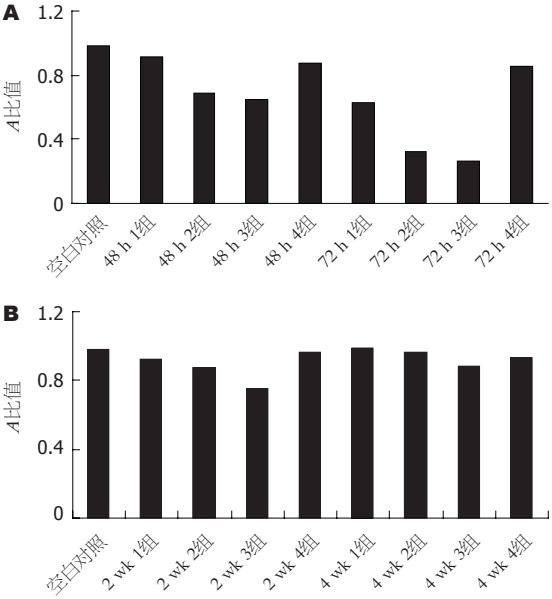


图 4 2种细胞HIF-1α蛋白表达灰度扫描经内参校正后的结果. 1, 2, 3, 4: 转染pGCsi-HIF 1, pGCsi-HIF 2, pGCsi-HIF 3重组载体和空载体的细胞. A: 瞬时转然后293T细胞HIF-1α; B: 筛选2-4 wk Eca-109细胞HIF-1α.

导了NK细胞依赖的杀瘤效应. 业已证明, 针对肿瘤多种信号转导通路的抑癌剂大多间接抑制了HIF-1的作用[17]. HIF-1α在肿瘤的病理过程中起着“中心枢纽”和“最后通路”的作用, 进一步研究HIF-1α在肿瘤细胞中的表达及其功能将为其在肿瘤治疗、早期诊断和预后判断的应用奠定基础[18].

RNA干扰是生物进化过程中基因组水平上的免疫监控机制[19], 他作为一种特异性基因沉默技术, 正越来越多地在反向遗传学研究、细胞信号转导通路研究和某些疾病, 如病毒感染、肿瘤及多种遗传相关性疾病的发病机制和治疗学研究中发挥着重要作用. 相对于传统上反义寡核苷酸和核酶等基因沉默手段来说, 由于siRNA具有RNA双链结构和3'端双核苷酸悬垂, 较难被核酶降解, 所以RNA干扰具有更好的稳定性和更优越的抑制效果[20], 是高通量基因功能研究的得力工具. 不仅如此, RNA干扰的研究为疾病的基因治疗开拓了一个全新的途径, 通过抑制过表达的致瘤基因、干扰细胞周期调节蛋白E及其相关基因阻遏细胞分裂以及通过抑制抗凋亡基因促进细胞凋亡可能对肿瘤的治疗带来重大突破, 以RNA干扰抑制耐药基因及多药耐药基因以改善肿瘤对化疗的反应性也有利于肿瘤的治疗[21]. 此外, 也有利用RNA干扰手段抑制肿瘤细胞的侵袭和转移的研究[22-24]. 体内RNA干扰的难点在于如何将siRNA安全输入并富集于有效部位, 在这方面有学者做了一些有意义的尝试, Zhang *et al*[25]使用带有转铁蛋白受体和胰岛素受体抗体的系统, 将针对表皮生长因子受体(EGFR)的shRNA载体通过血脑屏障和肿瘤细胞膜转入小鼠脑胶质细胞瘤中, 结果使肿瘤中EGFR的表达明显下调, 干扰后进展期颅内肿瘤小鼠的生存期较对照组延长了88%. 至今已有多项针对肿瘤的干扰实验取得明显效果, 如对胃癌、肝癌、白血病、淋巴瘤、口腔癌、脑癌的基因治疗和逆转化疗敏感性的研究[26-30], 但目前在食管鳞癌细胞中的干扰报道

■同行评价

该文采用RNA干扰技术, 研究其对食管鳞癌细胞Eca-109, HIF-1α表达的抑制作用, 为研究食管癌中该基因的功能奠定了基础, 选题新颖, 方法学先进, 结果可信, 有较强的科学性.

尚少. 我们设计了3对HIF-1α-siRNA寡核苷酸片段, 并通过分子克隆技术成功构建了质粒pGCsi-HIF 1、pGCsi-HIF 2和pGCsi-HIF 3. 经脂质体Lipofectamine™ 2000转染入食管鳞癌细胞系Eca-109挑克隆筛选稳定转染细胞, 同时选择转染效率较高的胚肾细胞293T进行瞬时转染靶点筛选. 研究结果显示, 3种shRNA在两细胞中均发挥了不同程度的干扰作用, 其中pGCsi-HIF 2和pGCsi-HIF 3对HIF-1α发生了明显抑制, HIF-1α的表达量较空白对照组和转染空载体组的差异有统计学意义, pGCsi-HIF 3差异尤为明显, 在筛选2 wk的Eca-109细胞中也出现了这种差异. 这表明2号、3号靶位可能是有效的, 而3号靶位的干扰效率是这3个靶点当中最高的. 在筛选4 wk的Eca-109细胞中对HIF-1α基因沉默效应似乎出现了减弱的现象, 我们分析可能与挑克隆的方法有关, 大平皿挑细胞团的方法得到的并非纯合克隆, 其中部分虽带有抗生素抗性基因而未敲除HIF-1α基因的细胞经较长时间的培养呈现出生长优势, 影响了HIF-1α沉默细胞的增殖, 导致总体水平上核酸和蛋白表达水平的增加. 目前我们已另采用有限稀释法进行单克隆化操作筛选稳定转染细胞株, 进一步对HIF-1α基因在食管鳞癌发生、发展和基因治疗中的作用进行研究. 我们构建的HIF1-α短发夹状RNA表达载体在食管鳞癌细胞系Eca-109中特异性地抑制了HIF1-α基因的表达, 这为今后深入研究HIF1-α在食管鳞癌及其他肿瘤发病、进展机制和基因治疗的探索打下了基础.

4 参考文献

1 Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 1999; 59: 5830-5835

2 Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. *Biochem Pharmacol* 2000; 59: 47-53

3 Vaupel P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist* 2004; 9 Suppl 5: 10-17

4 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-408

5 Mizukami Y, Li J, Zhang X, Zimmer MA, Iliopoulos O, Chung DC. Hypoxia-inducible factor-1-independent regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia in colon cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 1765-1772

6 Harris AL. Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 38-47

7 Sanchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Corbi A, Attisano L, Bernabeu C. Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J Biol Chem* 2001; 276: 38527-38535

8 Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 2003; 9: 677-684

9 Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL. Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 2000; 60: 1541-1545

10 Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem* 1996; 271: 32253-32259

11 Mazure NM, Brahimi-Horn MC, Berta MA, Benizri E, Bilton RL, Dayan F, Ginouves A, Berra E, Pouyssegur J. HIF-1: master and commander of the hypoxic world. A pharmacological approach to its regulation by siRNAs. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 971-980

12 Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 2004; 36: 1-12

13 Maynard MA, Qi H, Chung J, Lee EH, Kondo Y, Hara S, Conaway RC, Conaway JW, Ohh M. Multiple splice variants of the human HIF-3 alpha locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex. *J Biol Chem* 2003; 278: 11032-11040

14 Swinson DE, Jones JL, Cox G, Richardson D, Harris AL, O'Byrne KJ. Hypoxia-inducible factor-1 alpha in non small cell lung cancer: relation to growth factor, protease and apoptosis pathways. *Int J Cancer* 2004; 111: 43-50

15 Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Skarlatos J, Corti L, Blandamura S, Piazza M, Gatter KC, Harris AL. Hypoxia inducible factor (HIF-1a and HIF-2a) expression in early esophageal cancer and response to photodynamic therapy and radiotherapy. *Cancer Res* 2001; 61: 1830-1832

16 Sun X, Kanwar JR, Leung E, Lehnert K, Wang D, Krissansen GW. Gene transfer of antisense hypoxia inducible factor-1 alpha enhances the therapeutic efficacy of cancer immunotherapy. *Gene Ther* 2001; 8: 638-645

17 Semenza GL. Development of novel therapeutic strategies that target HIF-1. *Expert Opin Ther Targets* 2006; 10: 267-280

18 Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med* 2002; 8: S62-67

19 Hutvagner G, Zamore PD. RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12: 225-232

20 Bass BL. RNA interference. The short answer. *Nature* 2001; 411: 428-429

21 Izquierdo M. Short interfering RNAs as a tool for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2005; 12:

217-227
22 Patel KN, Maghami E, Wreesmann VB, Shaha AR, Shah JP, Ghossein R, Singh B. MUC1 plays a role in tumor maintenance in aggressive thyroid carcinomas. *Surgery* 2005; 138: 994-1001; discussion 1001-1002
23 Wyatt CA, Geoghegan JC, Brinckerhoff CE. Short hairpin RNA-mediated inhibition of matrix metalloproteinase-1 in MDA-231 cells: effects on matrix destruction and tumor growth. *Cancer Res* 2005; 65: 11101-11108
24 Celetti A, Testa D, Staibano S, Merolla F, Guarino V, Castellone MD, Iovine R, Mansueto G, Somma P, De Rosa G, Galli V, Melillo RM, Santoro M. Overexpression of the cytokine osteopontin identifies aggressive laryngeal squamous cell carcinomas and enhances carcinoma cell proliferation and invasiveness. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8019-8027
25 Zhang Y, Zhang YF, Bryant J, Charles A, Boado RJ, Pardridge WM. Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3667-3677
26 Chen XH, Lan B, Qu Y, Zhang XQ, Cai Q, Liu BY, Zhu ZG. Inhibitory effect of Polo-like kinase 1 depletion on mitosis and apoptosis of gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 29-35
27 Huang SL, Wu Y, Yu H, Zhang P, Zhang XQ, Ying L, Zhao HF. Inhibition of Bcl-2 expression by a novel tumor-specific RNA interference system increases chemosensitivity to 5-fluorouracil in Hela cells. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27: 242-248
28 Damm-Welk C, Fuchs U, Wossmann W, Borkhardt A. Targeting oncogenic fusion genes in leukemias and lymphomas by RNA interference. *Semin Cancer Biol* 2003; 13: 283-292
29 Kudo Y, Kitajima S, Ogawa I, Kitagawa M, Miyauchi M, Takata T. Small interfering RNA targeting of S phase kinase-interacting protein 2 inhibits cell growth of oral cancer cells by inhibiting p27 degradation. *Mol Cancer Ther* 2005; 4: 471-476
30 Boado RJ. RNA interference and nonviral targeted gene therapy of experimental brain cancer. *NeuroRx* 2005; 2: 139-150

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

·消息·

第十一届全国普通外科学术会议征文通知

本刊讯 中华普通外科杂志编辑部将于2006-07下旬在内蒙古呼和浩特市召开“第十一届全国普通外科学术会议”. 本次会议将围绕普通外科手术并发症与外科再手术的主题就普通外科临床与基础研究、外科并发症、以及外科再手术等问题进行研讨. 会议邀请国内外著名外科专家, 对热点问题做专题演讲, 参会代表进行学术交流、经验介绍和开展讨论.

1 征文内容

征文内容包括: (1)腹部外科手术并发症和外科再手术经验; (2)普通外科的新进展、新诊断、新技术、新方法、新手术、新经验; (3)临床研究、基础研究、实验研究; 手术适应证、禁忌证问题; (4)腹腔镜手术; (5)肿瘤的放化疗; (6)手术并发症和再手术的营养支持; (7)手术并发症和再手术的护理等.

2 征文要求

征文要求包括: (1)请将未公开发表的论文全文以及800字以内的中文摘要各1份, 并附拷贝软盘, 寄到100034, 北京西城区阜内大街133号 齐老师 收; 联系电话: 010-66168321转3126, 010-66164704. (2)来稿请注明单位、作者姓名、邮编及联系电话(请自留底稿, 恕不退稿), 请在信封左下角注明“普外会议征文”字样. 参会代表将获得国家级继续医学教育一类学分. (3)截稿日期: 2006-06-30.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年6月18日; 14(17): 1662-1668
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

电针足三里和阳陵泉穴对家兔胃胆运动及脑肠肽的影响

常小荣, 严 洁, 刘玉群, 张 泓, 易受乡, 林亚平

■背景资料
近年来针灸对脑肠肽影响的研究逐渐增多, 针刺是否可通过影响脑肠肽的含量来调控消化道运动是目前的一个研究热点. 本课题组在"九五"期间对足阳明经与胃相关的外周通路研究中发现电针足三里对大鼠胃肌电具有一定兴奋作用, 并有血浆或胃窦组织中胃动素、胃泌素等的含量升高, 提示脑肠肽参与了对足阳明经与胃相关的外周通路的调节.

常小荣, 严洁, 刘玉群, 张泓, 易受乡, 林亚平, 湖南中医药大学针灸推拿学院 湖南省长沙市 410007
常小荣, 1978年湖南中医药大学学士, 教授, 针灸学教研室主任, 针灸重点学科学术带头人, 主要从事针灸经络及针灸治病机理的研究.
国家973计划中医理论基础研究专项, No. 2005-CB523308
通讯作者: 常小荣, 410007, 湖南省长沙市, 湖南中医药大学针灸推拿学院. xrchang1956@sina.com
电话: 0731-5381163 传真: 0731-5557891
收稿日期: 2006-04-18 接受日期: 2006-05-08

Effects of electroacupuncturing at Zuyangming and Zushaoyang Jingxue on stomach and gallbladder kineses and related brain-gut peptide in rabbits

Xiao-Rong Chang, Jie Yan, Yu-Qun Liu, Hong-Zhang, Shou-Xiang Yi, Ya-Ping Lin

Xiao-Rong Chang, Jie Yan, Yu-Qun Liu, Hong-Zhang, Shou-Xiang Yi, Ya-Ping Lin, Acupuncture and Massage College, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China
Supported by the Special Item of Basic Research on Traditional Chinese Medicine Theory during the National 973 Plan, No. 2005-CB523308
Correspondence to: Xiao-Rong Chang, Acupuncture and Massage College, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China. xrchang1956@sina.com
Received: 2006-04-18 Accepted: 2006-05-08

Abstract

AIM: To investigate the correlation between the meridians and zang-fu as well as the specific effect of the points on their related zang-fu.

METHODS: Atropine was intravenously injected in the rabbits to inhibit the myoelectric activities of the stomach and the sphincter of oddi (SO). After electroacupuncturing at Zusanli and Yanglingquan points, the myoelectric activities of the stomach and SO were observed, and the levels of motilin (MTL) and cholcystokinin (CCK) in the antrum, SO and plasma were measured.

RESULTS: After atropine injection, the mean amplitudes for the high activity of myoelectric slow wave and fast wave were significantly decreased (P = 0.028, P = 0.001). Moreover, the average frequency of myoelectric slow wave was not significantly changed. The mean amplitudes for the myoelectric slow wave and fast wave were enhanced to some extent after electroacupuncturing at Zusanli and Yanglingquan points. The levels of MTL (P = 0.000) and CCK (P = 0.001) in the antrum, SO and plasma were increased markedly after electroacupuncturing at Zusanli and Yanglingquan points. The levels of MTL in the antrum (P = 0.020) and plasma (P = 0.001) and CCK in plasma (P = 0.001) were obviously increased after electroacupuncturing at Zusanli point, whereas the levels of MTL in SO and CCK in the antrum and SO were notably increased after electroacupuncturing at Yanglingquan point. There was a positive effect on the release of MTL and CCK after electroacupuncturing at the points.

CONCLUSION: The inhibition for the myoelectric activities of the stomach and SO are improved after electroacupuncturing at Zusanli and Yanglingquan points. The possible mechanism may be that the acupuncture influences the release of MTL and CCK, so as to regulate the activity of the alimentary canal.

Key Words: Electroacupuncture; Zuyangmingjing; Zusanli; Stomach; Zushaoyangjing; Yanglingquan; Sphincter of oddi; Motilin; Cholcystokinin

Chang XR, Yan J, Liu YQ, Zhang H, Yi SX, Lin YP. Effects of electroacupuncturing at Zuyangming and Zushaoyang Jingxue on stomach and gallbladder kineses and related brain-gut peptide in rabbits. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(17):1662-1668

摘要

目的: 研究经脉-脏腑相关理论及经穴对相应脏腑的特异性作用.

方法: 静脉滴注阿托品造成家兔(n = 50)胃和Oddi括约肌运动抑制状态, 观察电针家兔足三里穴及阳陵泉穴对胃电及Oddi括约肌肌电的影响并检测血浆和胃窦平滑肌及Oddi括约肌

组织中胃动素(MTL)胆囊收缩素(CCK)的含量.

结果: 静滴阿托品后家兔胃电和Oddi括约肌肌电慢波高活动相平均振幅(P = 0.001)和快波平均振幅(P = 0.028, P = 0.001)明显降低; 慢波平均频率变化不明显. 电针足三里穴和阳陵泉穴对家兔胃电(P = 0.020, P = 0.000)及Oddi括约肌肌电(P = 0.021, P = 0.001)平均振幅有不同程度的兴奋作用, 表明经脉-脏腑之间既有直接相关又有间接相关. 电针足三里穴和阳陵泉穴可升高胃窦平滑肌、Oddi括约肌组织及血浆中MTL(P = 0.000)、CCK(P = 0.001)含量. 电针足三里穴对胃窦平滑肌和血浆MTL(P = 0.020, P = 0.001)及血浆CCK(P = 0.001)含量升高最显著, 差异有显著性意义. Oddi括约肌MTL及胃窦平滑肌、Oddi括约肌CCK以电针阳陵泉穴明显. 提示MTL和CCK是参与针刺调整消化道运动的重要脑肠肽物质.

结论: 电针足三里和阳陵泉穴可促进胃和Oddi括约肌运动, 其机制之一可能为针刺影响外周MTL、CCK的释放, 进而调整消化道运动. 这种经穴对相应脏腑的调整作用具有相对特异性.

关键词: 电针; 足三里; 阳陵泉; Oddi括约肌; 胃动素; 胆囊收缩素

常小荣, 严洁, 刘玉群, 张泓, 易受乡, 林亚平. 电针足三里和阳陵泉穴对家兔胃胆运动及脑肠肽的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(17):1662-1668
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1662.asp

0 引言

足阳明、足少阳经是人体的重要经脉, 针刺此二经腧穴对胃肠及胆的运动、分泌或排泄、血流等均有显著的调节作用. 近年, 针灸对脑肠肽影响的研究也逐渐增多, 针刺可通过影响脑肠肽的含量来调控消化道运动. 本课题组围绕足阳明经与胃相关进行了大量的研究, 探讨了足阳明经与胃联系途径及与脑肠肽关系. 在"九五"期间对足阳明经与胃相关的外周通路研究中发现电针足三里对大鼠胃肌电具有一定兴奋作用, 并有血浆或胃窦组织中胃动素、胃泌素等的含量升高. 提示脑肠肽参与了对足阳明经与胃相关的外周通路的调节. 本实验比较研究电针足阳明经之足三里穴及足少阳经之阳陵泉穴对胃和Oddi括约肌收缩效应影响及其与相关脑肠肽的关系. 以揭示"经脉-脏腑相关"的物质基础及可能机制.

■研发前沿
足阳明和足少阳经是人体的重要经脉, 针刺二经腧穴对胃肠及胆的运动功能和血浆及组织中的相关脑肠肽物质是否具有调节作用是本实验的研究目的.

1 材料和方法

1.1 材料 新西兰大耳白兔, 50只, 体质量2.0-2.5 kg, 雌雄兼用, 由湖南中医学院实验动物中心提供(普通级), 每只分笼圈养, 于实验前禁食24 h, 自由饮水. 将50只家兔随机分为5组, 空白组、阿托品组、足三里组、阳陵泉组、承筋组, 每组10只. 实验记录肌电60 min后, 耳缘静脉滴注阿托品(剂量: 0.25 mg/kg, 生理盐水中阿托品浓度: 25 g/L, 静滴速度: 20 git/min, 相当于1 mL/min, 静滴时间: 10 min/kg), 造成胃运动、Oddi括约肌运动抑制状态. 100 mg/L EDTA-Na_2(海特生物公司)、抑肽酶4万μL/mL(海特生物公司)、MTL测定试剂盒(北京华英生物技术研究所)、CCK测定试剂盒(北京华英生物技术研究所).

1.2 方法 家兔禁食24 h, 自由饮水后, 称质量, 200 g/L乌拉坦(4.5 mL/kg)耳缘静脉推注麻醉, 将兔仰卧固定于兔台, 气管切开, 接动物人工呼吸机, 上腹部剪毛, 消毒, 铺无菌孔巾, 剑突下腹正中线右侧0.5 cm处纵向切口约6 cm, 暴露胃窦及Oddi括约肌, 分别埋植两根电极, 分别接二道生理记录仪, 同步记录胃电及Oddi括约肌肌电快、慢波活动60 min后, 停记录, 耳缘静脉滴注阿托品(时间: 10 min/kg)并同步电针双侧同一穴位20 min(空白组为耳缘静脉滴注生理盐水10 min/kg), 处理后, 继续记录胃电及Oddi括约肌肌电60 min. 取颈动脉血、胃窦部平滑肌组织及Oddi括约肌、部分十二指肠组织. 肌组织用蒸馏水清洗后, 置冻存管中, 于液氮(-196℃)中保存; 血液离心, 取血浆置-20℃冰箱保存. (手术过程无菌操作)参照林文注[1]《实验针灸学》: 常用实验动物的针灸穴位方法定位及拟人比较法. G6805-Ⅱ型电针治疗仪, 疏密波(疏波: 4 Hz, 密波: 50 Hz), 脉冲宽度0.5 ms, 输出电压60 V, 输出电流4-6 mA, 0-60峰峰(1 KΩ负载), 针刺深度直刺0.8 cm, 时间20 min. 电针极性固定不变, 为左正右负. 二道生理记录仪记录参数: 慢波时间常数2 s, 高频滤波10 Hz, 灵敏度2或5 mV/cm, 走纸速度25 mm/min, 敏度0.5或1或2 mV/cm, 走纸速度25 mm/min. 肌电记录完成后, 取液器取100 mg/L EDTA-Na_2 60 μL和抑肽酶60 μL于试管中, 取颈动脉血4 mL于此试管中, 混匀, 4℃离心(3000 r/min) 15 min, 取液器取上清液(血浆)约3 mL, 分两管装入1.5 mL EP

■创新盘点
本实验比较研究电针足阳明经之足三里和足少阳经之阳陵泉穴对胃、Oddi括约肌收缩效应影响及其与相关脑肠肽的关系. 以揭示"经脉-脏腑相关"的物质基础及可能机制. 为"经脉-脏腑"相关理论及经穴对相应脏腑的特异性研究提供科学依据.

表 1 电针对家兔胃电慢波高活动相振幅和频率的影响 (mean ± SD)

组别	振幅 (mV)			频率 (个/min)		
	处理前	处理后	差值	处理前	处理后	差值
空白	11.2 ± 4.9	14.1 ± 5.8[b]	3.0 ± 2.6[d]	3.3 ± 0.4	3.3 ± 0.5	0.1 ± 0.3
阿托品	12.4 ± 2.8	10.3 ± 2.3[a]	−2.1 ± 2.6	3.4 ± 0.3	3.2 ± 0.6	−0.2 ± 0.6
足三里	11.8 ± 4.3	14.7 ± 8.0	3.0 ± 4.5[d]	3.4 ± 0.4	3.5 ± 0.8	0.1 ± 0.7
阳陵泉	12.3 ± 5.5	15.3 ± 6.45[a]	3.0 ± 3.4[d]	3.3 ± 0.21	3.3 ± 0.6	0.0 ± 0.6
承筋	13.6 ± 1.8	10.2 ± 1.3[b]	−3.4 ± 1.3[fd]	3.3 ± 0.5	3.1 ± 0.6	−0.2 ± 0.7

[a]P<0.05, [b]P<0.01 *vs* 处理前; [d]P<0.01 *vs* 阿托品组; [f]P<0.01 *vs* 空白组和足三里组.

表 2 电针对家兔胃电慢波低活动相平均振幅和平均频率的影响 (mean ± SD)

组别	振幅 (mV)			频率 (个/min)		
	处理前	处理后	处理后−处理前	处理前	处理后	处理后−处理前
空白	3.5 ± 2.1	4.6 ± 2.7	1.0 ± 1.9[de]	3.9 ± 0.3	3.6 ± 0.7	−0.3 ± 0.9
阿托品	4.3 ± 1.1	3.7 ± 1.0[a]	−0.6 ± 0.7	3.8 ± 0.5	3.8 ± 0.5	0.0 ± 0.4
足三里	3.5 ± 1.2	3.1 ± 1.5	−0.4 ± 0.8[d]	3.9 ± 0.6	3.5 ± 0.8	−0.5 ± 0.9
阳陵泉	2.3 ± 1.2	3.8 ± 2.3[a]	1.5 ± 1.7[df]	4.0 ± 0.6	4.0 ± 0.6	0.1 ± 0.6
承筋	4.6 ± 1.5	5.1 ± 1.0	0.4 ± 1.4	4.1 ± 0.4	3.5 ± 0.4[b]	−0.6 ± 0.5

[a]P<0.05, [b]P<0.01 *vs* 处理前; [d]P<0.01 *vs* 阿托品组; [e]P<0.05, [f]P<0.01 *vs* 足三里组.

管中, 置-20℃冰箱保存待测. 取血后, 迅速剪取适宜大小的胃窦平滑肌及Oddi括约肌、部分十二指肠分别装入冻存管置于液氮中保存. 组织块150±2 mg, 称质量后分别置于100℃的生理盐水5 mL中煮沸3 min, 加入1 mol/L冰醋酸0.5 mL于匀浆器中匀浆后, 置4℃ 1-2 h, 再用1 mol/L的NaOH 0.5 mL中和, 4℃离心(3000 r/min) 30 min, 取上清液于EP管, -20℃保存待测. 采用放射免疫分析法, 试剂盒购自北京华英生物技术研究所, 检测仪器为中国科技大学实业总公司生产的GC-911-γ-放射免疫计数器, 操作严格按试剂盒说明书进行.

统计学处理 实验数据以mean±SD表示, 同组自身前后比较若满足正态性采用配对t检验, 否则采用t'检验; 多组样本均数比较, 若方差齐性用F检验, 两两比较用q检验; 方差不齐, 用秩和检验和q'检验. 运用SPSS 10.0及Excel 2000统计软件进行处理分析.

2 结果

2.1 电针对家兔胃电的影响 慢波高活动相平均振幅, 各组处理后与处理前比较(表1), 均有显著性差异(P<0.01, P<0.05); 慢波高活动相平均频率, 各组处理后与处理前比较, 均无显著性差异; 慢波高活动相平均振幅处理前后差值(处理后-处理前), 组间比较: 空白组与阿托品组比较, 有显著性差异(P<0.01); 足三里组、阳陵泉组与阿托品组比较, 均有显著性差异(P<0.01); 承筋组与阿托品组比较, 差异无显著性, 而与空白组、足三里组、阳陵泉组比较, 差异有显著性(P<0.01); 慢波高活动相平均频率处理前后差值(处理后-处理前)组间比较无显著性差异(P>0.05). 慢波低活动相平均振幅, 阿托品组、阳陵泉组处理后与处理前比较(表2), 均有显著性差异(P<0.05); 承筋组处理后慢波低活动相平均频率下降, 与处理前比较, 有显著性差异(P<0.01); 慢波低活动相平均振幅处理前后差值(处理后-处理前), 组间比较: 空白组、阳陵泉组与阿托品组比较, 有显著性差异(P<0.01), 空白组、阳陵泉组与足三里组比较, 有显著性差异(P<0.05, P<0.01); 慢波低活动相平均频率处理前后差值(处理后-处理前), 组间比较无显著性差异(P>0.05). 空白组、足三里组、阳陵泉组处理后快波平均振幅显著升高(表3), 均有显著性差异(P<0.05, P<0.01); 承筋组处理后, 快波平均振幅降低, 前后比较有显著性差异(P<0.05); 快波平均振幅前后差值(处理后-处理前), 组间比较: 空白组、足三里组、阳陵泉组与阿托品组比较

表 3 电针对家兔胃电快波平均振幅和峰簇数据的影响 (mean ± SD)

组别	振幅 (mV)			频率 (个/min)		
	处理前	处理后	处理后–处理前	处理前	处理后	处理后–处理前
空白	0.9 ± 0.4	1.6 ± 0.8[b]	0.6 ± 0.6[d]	3.2 ± 0.3	3.3 ± 0.5	0.1 ± 0.3
阿托品	1.1 ± 0.4	0.9 ± 0.4[a]	–0.2 ± 0.3	3.4 ± 0.3	3.2 ± 0.4	–0.2 ± 0.5
足三里	1.0 ± 0.7	1.6 ± 1.2[a]	0.6 ± 0.6[d]	3.4 ± 0.3	3.5 ± 0.7	0.1 ± 0.6
阳陵泉	0.8 ± 0.6	1.1 ± 0.7[b]	0.3 ± 0.3[c]	3.4 ± 0.2	3.3 ± 0.6	–0.0 ± 0.6
承筋	1.1 ± 0.4	0.9 ± 0.3[a]	–0.2 ± 0.2[fh]	3.3 ± 0.5	3.1 ± 0.6	–0.2 ± 0.7

[a]P<0.05, [b]P<0.01 *vs* 处理前; [c]P<0.05, [d]P<0.01 *vs* 阿托品组; [f]P<0.01 *vs* 空白组和足三里组; [h]P<0.05 *vs* 阳陵泉组.

表 4 电针对家兔Oddi括约肌肌电慢波高活动相平均振幅和平均频率的影响 (mean ± SD)

组别	振幅 (mV)			频率 (个/min)		
	处理前	处理后	处理后–处理前	处理前	处理后	处理后–处理前
空白	10.5 ± 2.6	13.6 ± 2.7[b]	3.2 ± 2.7[d]	3.0 ± 0.3	3.1 ± 0.4	0.1 ± 0.4
阿托品	11.2 ± 3.4	9.6 ± 3.0[a]	–1.6 ± 1.6	3.3 ± 0.7	3.1 ± 0.9	–0.1 ± 0.5
足三里	11.2 ± 1.9	12.1 ± 3.3	0.8 ± 2.4[ce]	3.2 ± 0.3	2.9 ± 0.4	–0.3 ± 0.5
阳陵泉	12.9 ± 2.9	13.8 ± 4.1[a]	0.9 ± 3.3[ce]	3.9 ± 0.9	3.4 ± 0.6	–0.5 ± 0.7
承筋	12.6 ± 1.6	12.7 ± 1.6	–0.1 ± 2.0[f]	3.2 ± 0.4	3.0 ± 0.1	–0.2 ± 0.4

[a]P<0.05, [b]P<0.01 *vs* 处理前; [c]P<0.05, [d]P<0.01 *vs* 阿托品组; [e]P<0.05 *vs* 空白组; [f]P<0.01 *vs* 足三里组.

均有显著性差异(P<0.05, P<0.01); 承筋组与空白组、足三里组、阳陵泉组比较均有显著性差异(P<0.05, P<0.01).

2.2 电针对家兔Oddi括约肌肌电的影响 空白组处理后, 慢波高活动相平均振幅升高(表4), 差异有显著性意义(P<0.01); 阿托品组处理后, 慢波高活动相平均振幅下降, 差异有显著性(P<0.05); 足三里组、阳陵泉组、承筋组处理前后慢波高活动相平均振幅及各组处理前后慢波高活动相平均频率, 均无显著变化; 慢波高活动相平均振幅处理前后差值(处理后-处理前), 空白组、足三里组、阳陵泉组与阿托品组比较有显著性差异(P<0.05, P<0.01); 足三里组、阳陵泉组、承筋组与空白组比较差异有显著性(P<0.05, P<0.01); 慢波高活动相平均频率处理前后差值(处理后-处理前)组间比较, 无显著差异. 各组慢波低活动相平均振幅及频率处理后比较(表5), 无显著性差异; 慢波低活动相平均振幅及频率处理前后差值(处理后-处理前)组间比较, 无显著差异. 空白组处理后快波平均振幅升高(表6), 差异有显著性(P<0.05); 阿托品组处理后快波平均振幅降低, 差异有显著性(P<0.05); 足三里组、阳陵泉组处理后快波平均振幅有升高趋势, 但无显著性意义; 承筋组处理后, 快波平均振幅降低, 差异有显著性(P<0.05); 快波平均振幅处理前后差值(处理后-处理前)组间比较: 空白组、阳陵泉组与阿托品组比较有显著差异(P<0.05, P<0.01); 足三里组、承筋组与空白组比较, 有显著性差异(P<0.05, P<0.01); 承筋组与阳陵泉组比较, 有显著性差异(P<0.05).

2.3 电针对家兔MTL和CCK含量的影响 血浆MTL含量, 空白组、足三里组、阳陵泉组、承筋组较阿托品组高(表7), 有显著性差异(P<0.05, P<0.01); 承筋组比空白组低, 有显著性差异(P<0.05); 阳陵泉组、承筋组比足三里组低, 有显著性差异(P<0.01); 胃窦部MTL含量, 空白组、足三里组、阳陵泉组比阿托品组高, 有显著性差异(P<0.01); 足三里组较空白组高, 承筋组较空白组低, 均有显著性差异(P<0.05, P<0.01); 阳陵泉组、承筋组比足三里组低, 有显著性差异(P<0.01); 承筋组较阳陵泉组低, 有显著性差异(P<0.01); Oddi括约肌MTL含量, 组间比较, 无显著性差异. 血浆CCK含量, 空白组、足三里组、阳陵泉组比阿托品组高(表7), 有显著性差异(P<0.05, P<0.01); 胃窦部CCK含量, 空白组、足三里组、阳陵泉组比阿托品组高, 有显著性差异(P<0.05, P<0.01); 承筋组比足三里组、阳陵泉组低, 有显著性差异(P<0.05,

■应用要点

本研究结果显示电针足三里和阳陵泉穴均能对家兔Oddi括约肌肌电活动及胃肌电活动产生交互作用, 表明经脉-脏腑之间既有直接相关又有间接相关. 电针足三里、阳陵泉穴兴奋胃、Oddi括约肌肌电活动的同时, 伴随血浆、胃窦平滑肌、Oddi括约肌中MTL、CCK含量的增加, 提示MTL、CCK是经脉-脏腑相关的二种重要肽类物质. 针刺对不同脏腑的影响及经脉-脏腑相关的相对特异性与脑肠肽及其释放量的不同有着密切关系.

■名词解释

1 脑肠肽：是一种神经调质，适应于调节缓慢而持久的功能变化，与针灸穴位时作用于内脏缓慢、持久且具有较长时间的后效应，以及循经的缓慢传导等特点十分相似.

2 胃电：分为快波和慢波，人的胃电慢波节律为3次/分，家兔为3-4次/分. 胃电快波是负载于慢波之上的一系列锋电位，是环行肌和纵行肌的动作电位.

表 5 电针对家兔Oddi括约肌肌电慢波低活动相平均振幅和平均频率的影响 (mean ± SD)

组别	振幅 (mV)			频率 (个/min)		
	处理前	处理后	处理后–处理前	处理前	处理后	处理后–处理前
空白	2.6 ± 1.3	3.8 ± 1.7	1.3 ± 1.8	3.7 ± 0.5	3.8 ± 0.6	0.1 ± 0.7
阿托品	3.6 ± 1.8	2.6 ± 1.8	–1.0 ± 2.4	3.6 ± 0.5	3.4 ± 0.8	–0.2 ± 0.7
足三里	3.0 ± 1.2	2.8 ± 1.4	–0.2 ± 1.3	3.8 ± 0.4	3.7 ± 0.5	–0.1 ± 0.6
阳陵泉	2.9 ± 0.9	2.6 ± 0.8	–0.3 ± 0.5	4.1 ± 0.2	4.2 ± 0.4	0.1 ± 0.5
承筋	4.3 ± 1.1	4.7 ± 2.6	0.4 ± 2.7	3.7 ± 0.5	3.3 ± 0.4	–0.4 ± 0.6

表 6 电针对家兔Oddi括约肌肌电快波平均振幅和峰簇数的影响 (mean ± SD)

组别	振幅 (mV)			频率 (个/min)		
	处理前	处理后	处理后–处理前	处理前	处理后	处理后–处理前
空白	0.7 ± 0.3	1.3 ± 0.81[a]	0.6 ± 0.7[d]	3.0 ± 0.2	3.1 ± 0.4	0.1 ± 0.3
阿托品	1.0 ± 0.5	0.8 ± 0.4[a]	–0.2 ± 0.3	3.2 ± 0.7	3.1 ± 0.8	–0.1 ± 0.6
足三里	0.7 ± 0.3	0.9 ± 0.7	0.2 ± 0.5[e]	3.2 ± 0.3	2.9 ± 0.4	–0.2 ± 0.5
阳陵泉	0.7 ± 0.5	1.0 ± 0.9	0.3 ± 0.5[c]	3.8 ± 0.8	3.6 ± 0.5	–0.2 ± 0.4
承筋	1.1 ± 0.2	0.9 ± 0.2[a]	–0.2 ± 0.2[f]	3.1 ± 0.4	3.0 ± 0.1	–0.1 ± 0.3

[a]$P<0.05$ *vs* 处理前; [c]$P<0.05$, [d]$P<0.01$ *vs* 阿托品组; [e]$P<0.05$, [f]$P<0.01$ *vs* 空白组.

表 7 电针对家兔MTL和CCK含量的影响 (n = 10, mean ± SD, ng/L)

分组	血浆MTL	胃窦MTL	Oddi括约肌MTL	血浆CCK	胃窦CCK	Oddi括约肌CCK
空白	127.4 ± 19.5[b]	391.5 ± 51.5[b]	362.4 ± 102.7	6.5 ± 2.2[b]	4.5 ± 1.3[a]	5.9 ± 2.3
阿托品	97.7 ± 12.9	276.9 ± 69.5	357.5 ± 80.8	3.9 ± 1.7	3.5 ± 0.9	4.6 ± 1.9
足三里	140.2 ± 24.2[b]	446.8 ± 58.6[bc]	390.6 ± 60.4	6.1 ± 2.3[a]	4.7 ± 0.8[a]	6.2 ± 1.6
阳陵泉	107.1 ± 12.9[af]	366.1 ± 76.7[bf]	410.2 ± 58.5	5.9 ± 1.9[a]	5.6 ± 1.5[b]	6.8 ± 1.6
承筋	117.4 ± 22.6[acf]	252.0 ± 27.5[dfh]	382.6 ± 37.9	5.0 ± 2.1	3.5 ± 1.3[eh]	5.1 ± 1.9

[a]$P<0.05$, [b]$P<0.01$ *vs* 阿托品组; [c]$P<0.05$, [d]$P<0.01$ *vs* 空白组; [e]$P<0.05$, [f]$P<0.01$ *vs* 足三里组; [h]$P<0.01$ *vs* 阳陵泉组.

$P<0.01$); Oddi括约肌CCK含量，组间比较，无显著性差异.

3 讨论

本结果表明，静滴阿托品后，胃电、Oddi括约肌肌电慢波高活动相振幅及快波振幅明显下降，而慢波活动相振幅，慢波频率及快波峰簇数无明显变化；而静滴生进盐水，家兔胃电、Oddi括约肌肌电慢波高活动相振幅及快波振幅明显增加，其他肌电指标无变化；静滴阿托品同时电针足三里、阳陵泉穴，家兔胃电、Oddi括约肌肌电慢波高活动相振幅及快波振幅明显增加，而电针承筋穴无此作用，且电针足三里穴对胃电、阳陵泉穴对Oddi括约肌肌电兴奋作用明显. 免疫组化结果表明，电针腧穴可提高血浆及胃窦平滑肌、Oddi括约肌组织中MTL、CCK的含量，电针足三里穴对血浆、胃窦平滑肌中MTL含量及血浆中CCK含量升高最明显，而电针阳陵泉穴使Oddi括约肌MTL及胃窦平滑肌、Oddi括约肌CCK含量明显升高，作用最强.

经脉-脏腑相关理论是传统中医学的理论核心，经穴有其相对特异性，对其相应脏腑功能活动有特殊影响. 《灵枢·海论》“夫十二经脉者，内属于府藏，外络于支节”，《灵枢·九针十二原》“五脏有疾也，应出十二原”. 足三里穴、阳陵泉穴分别为足阳明胃经和足少阳胆经的合穴，又是相应内腑的下合穴. 《灵枢·邪气藏府病形》“合治内府”. 《素问·咳论》“治府者，治其合.”《灵枢·五邪》曰：“邪在脾胃……皆调于三里”.” 《四总穴歌》“肚腹三

里留”. 由上述古文献可知足三里穴为主治胃肠疾患的要穴. 阳陵泉穴治疗胆腑疾患, 在古文献中也不乏论述, 如《灵枢·邪气藏府病形》“胆病者: 善太息, 口苦, 呕宿汁……取阳陵泉.”《针灸甲乙经》“胁下支满, 呕吐逆, 阳陵泉主之.” 胃电分为快波和慢波, 胃的慢电位周期恒定不变, 人的胃电慢波节律为3次/min, 家兔为3-4次/min. 胃电快波是负载于慢波之上的一系列锋电位, 是环行肌和纵行肌的动作电位. 胃电慢波并不一定伴有胃肌收缩, 但在胃电慢波基础上产生的动作电位可引起胃肌收缩. 慢波电位本身虽不能引起平滑肌的收缩, 但却是平滑肌的起步电位, 是平滑肌收缩节律的控制波, 决定蠕动的方向、节律和速度[2-6]. 本实验结果表明电针足三里穴、阳陵泉穴均可以使胃电慢波高活动相振幅及快波振幅升高. 而电针承筋穴不能产生同样作用. Oddi括约肌(sphincter of Oddi, SO)为胆总管与胰管进入十二指肠处的肌肉括约肌, 由大量平滑肌纤维所组成, 是胆汁排出胆道的唯一门户, 其生理功能是调节胆囊充盈, 控制胆汁排出及维持胆道系统正常压力等, 这些功能均由括约肌的收缩及其产生的压力变化来实现[7-17]. 我们观察到, 电针阳陵泉穴、足三里穴对家兔SO肌电慢波高活动相及快波振幅有明显的兴奋作用, 而电针承筋穴无此作用. 脑肠肽作为神经调质, 适应于调节缓慢而持久的功能变化, 与针灸穴位时作用于内脏缓慢、持久且具有较长时间的后效应, 以及循经的缓慢传导等特点十分相似. 因而, 近年来, 针灸对脑肠肽影响的研究也逐渐增多起来. 胃动素(MTL)是一个含有22个氨基酸的直链多肽, M_r 2698[18]. 由胃肠分泌细胞分泌, 主要由小肠上部的Mo细胞释放. 在中枢、外周和胃肠道壁内神经系统中同样有MTL存在, 因此, MTL在多个水平上调节胃运动功能, 与胃肠运动有密切关系, 其生理作用是影响胃肠运动, 对胃窦平滑肌有直接收缩作用, 诱发胃强烈的收缩和小肠明显的分节运动, 还可引起结肠与胆囊的运动[19-20]. 胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)的化学结构具有多种分子形式, 消化系统中合成CCK的细胞主要分布于十二指肠和空肠上端的黏膜层. CCK对胆囊平滑肌和Oddi括约肌的作用研究较深入, 进食或刺激胆囊收缩后, CCK释放, 其8肽(CCK-8)可直接作用于Oddi括约肌, 也可间接通过神经机制调节括约肌运动. 不同动物对CCK的反应不同, CCK可兴奋负鼠与兔的Oddi括约肌收缩, 而抑制人、狗和猫的Oddi括约肌收缩, 这可能是通过非肾上腺素和非胆碱能神经直接作用所致[21-24], 目前针刺对CCK影响研究还处于起步阶段, 文献报道较少. 总之, 本实验结果表明针刺足三里、阳陵泉穴可促进胃及Oddi括约肌运动抑制状态得以部分恢复, 对胃电、Oddi括约肌肌电慢波高活动相振幅及快波振幅有明显的兴奋作用. 同时, 可提高MTL、CCK在血液及胃窦平滑肌和Oddi括约肌中的含量, 表明MTL、CCK是参与电针足三里、阳陵泉穴兴奋胃电、Oddi括约肌肌电的重要脑肠肽. 提示针刺足三里、阳陵泉穴对相应内脏运动的调控作用可能是通过外周某些脑肠肽的释放或抑制来实现的. 我们本次实验得出这样的结论: (1)电针足三里及电针阳陵泉穴均能对家兔Oddi括约肌肌电活动及胃肌电活动产生交互作用, 表明经脉-脏腑之间既有直接相关又有间接相关; (2)电针足三里、阳陵泉穴兴奋胃、Oddi括约肌肌电活动的同时, 伴随血浆、胃窦平滑肌、Oddi括约肌中MTL、CCK含量的增加, 提示MTL、CCK是静脉-脏腑相关的二种重要肽类物质, 针刺对不同脏腑的影响及经脉-脏腑相关的相对特异性与脑肠肽及其释放量的不同有密切关系.

■**同行评价**

本文是一篇研究我国针灸学的好文章, 通过电针足阳明、足少阳经穴来观察对家兔胃、胆运动及其相关脑肠肽物质的影响. 文章选题实用, 研究方法、路线可行, 结果可靠, 结论及讨论有据.

4 参考文献

1 林文注, 王佩. 实验针灸学. 上海: 上海科学技术出版社, 1994: 278-282

2 易受乡, 林亚平, 严洁, 常小荣, 杨昱. 针刺足阳明经穴对大鼠胃运动及脑肠肽的影响. 中国中西医结合消化杂志 2001; 9: 17-19

3 郭义, 张艳军, 王秀云, 史丽萍, 徐汤苹, 苗文方, 张春煦. 络合足三里穴Ca^{2+}对针刺足三里抑制家兔亢进胃运动的影响. 上海针灸杂志 1998; 17: 40-41

4 刘志敏, 陈宝忠, 王东岩. 中枢5-HT受体在电针对胃运动、胃电影响中的作用. 上海针灸杂志 2000; 19: 41-42

5 Yokohata K, Tanaka M. Cyclic motility of the sphincter of Oddi. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2000; 7: 178-182

6 Takahata S, Yokohata K, Nabae T, Nishiyama K, Yamaguchi K, Chijiiwa K, Tanaka M. Sphincter of Oddi contractile function after balloon dilation: detailed manometric evaluation in conscious dogs. *Gastrointest Endosc* 2000; 52: 618-623

7 王莉. 胆道运动及其与胃肠运动的关系. 国外医学·消化系疾病分册 2001; 21: 165-167

8 赵平, 董蕾, 兰康, 高东武, 徐尔迪, 戴菲, 罗金燕, 龚均. 多种胃肠激素在消化间期移行性复合运动中作用的研究. 中华消化杂志 2005; 25: 95-97

9 Kuo KK, Utsunomiya N, Nabae T, Takahata S, Yokohata K, Chijiiwa K, Sheen PC, Tanaka M. Sphincter of Oddi motility in patients with hepatolithiasis and common bile duct stones. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 1714-1718

10 Deng ZL, Nabae T, Konomi H, Takahata S,

Yokohata K, Ogawa Y, Chijiiwa K, Tanaka M. Effects of proximal duodenal transection and anastomosis on interdigestive sphincter of Oddi cyclic motility in conscious dogs. *World J Surg* 2000; 24: 863-869
11 周吕. 胃肠生理学-基础与临床. 北京: 科学出版社, 1991: 359
12 侯晓华. 消化道运动学. 北京: 科学出版社, 1998: 460
13 邹多武, 许国铭, 李兆申, 尹宁. 一氧化氮对胆囊收缩素调节兔Oddi括约肌运动的影响. 上海医学 1998; 21: 206-208
14 陈雁南, 韩霞, 邹海珠, 蒋广华. 针刺对急性胆囊炎患者胆囊收缩功能的影响. 上海针灸杂志 2000; 2: 23-24
15 张江红, 金淑英, 李树学. 针刺“日月”穴对狗肝胆汁分泌的影响. 中国针灸 1995; 2: 31-32
16 马骋, 杨文. 电针对金黄地鼠胆石症的防治作用. 针刺研究 1996: 68-72
17 邓明飞, 任宇丁, 李广学. 针刺三阴交、阳陵泉缓解胆绞痛30例. 新疆中医药 1999; 17: 23
18 Wang HJ, Tanaka M, Konomi H, Toma H, Yokohata K, Pasricha PJ, Kalloo AN. Effect of local injection of botulinum toxin on sphincter of Oddi cyclic motility in dogs. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 694-701
19 Shima Y, Mori M, Harano M, Tsuge H, Tanaka N, Yamazato T. Nitric oxide mediates cerulein-induced relaxation of canine sphincter of Oddi. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 547-553
20 Tanaka M, Senninger N, Runkel N, Herfarth C. Sphincter of Oddi cyclic motility. Effect of translocation of the papilla in opossums. *Gastroenterology* 1990; 98: 347-352
21 Scott RB, Diamant SC. Biliary motility associated with gallbladder storage and duodenal delivery of canine hepatic biliary output. *Gastroenterology* 1988; 95: 1069-1080
22 Parodi JE, Zenilman ME, Becker JM. Graded effect of protein on regional myoelectric activity of the opossum sphincter of Oddi. *Surgery* 1988; 104: 326-334
23 Takahashi I, Kern MK, Dodds WJ, Hogan WJ, Sarna SK, Soergel KH, Itoh Z. Contraction pattern of opossum gallbladder during fasting and after feeding. *Am J Physiol* 1986; 250: G227-235
24 张剑峰, 邹声泉, 裘法祖. 胃肠道神经肽对胆道Oddi括约肌活动和心血管功能影响的实验研究. 同济医科大学学报 1997; 26: 153

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2006上海中日早期胃肠肿瘤国际研讨会通告

本刊讯 由上海市胃肠肿瘤重点学科、日本早期胃癌检诊协会、上海交通大学瑞金医院消化肿瘤学科群共同主办“2006上海中日早期胃肠肿瘤国际研讨会”将于2006-11-09/11在上海召开.

1 会议内容

由日本及香港专家主讲: 功能性消化不良和早期胃癌的临床识别; 根除*H pylori*预防胃癌研究; 内镜诊断早期胃癌的深度及组织学类型; 早期胃癌EMR、ESD及外科手术治疗; 早期胃癌和大肠癌标本处理及病理检查规范及国际共识意见; 大肠锯齿状腺瘤、大肠癌及新生癌的诊断, 外科手术及综合治疗.

由中国专家主讲: 放大内镜诊断早期胃癌; 中国早期胃癌临床现状及前景; 胃肠肿瘤腹腔镜治疗; 大肠侧向生长型肿瘤诊治; 大肠癌早期诊断及筛查; 胶囊内镜、双气囊小肠镜及小肠超声内镜诊断小肠肿瘤及临床评估.

2 征文

征文内容包括胃癌、大肠癌、小肠肿瘤基础研究、流行病学调查, 早期胃肠癌诊断及治疗. 论文(电子版)按中华消化杂志格式书写附500字以内中文摘要, 欢迎网上投稿. 截止日期: 2006-08-10. 来稿寄至: 上海市瑞金二路197号上海瑞金医院消化科 汤美萍 (请写明2006胃肠肿瘤大会稿件), 邮政编码: 200025. 联系电话: 021-64370045-665246, E-mail: wuyunlin1951@163.com.

会议将授予国家继续教育Ⅰ类学分8分.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年6月18日; 14(17): 1669-1674
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

聚乳酸–O–羧甲基壳聚糖纳米粒子的制备及其对培养猪肝细胞的影响

陈 钟, 戴新征, 杨欣荣, 祝文彩

陈钟, 戴新征, 杨欣荣, 祝文彩, 南通大学附属医院肝胆外科, 南通大学肝胆外科研究所 江苏省南通市 226001
陈钟, 2002年南京大学博士后, 教授, 主任医师, 主要从事肝细胞移植和肝胆外科研究.
江苏省卫生厅重大基金资助项目, No. H200215
南通大学创新基金资助项目, No. CX0301
通讯作者: 陈钟, 226001, 江苏省南通市西寺路20号, 南通大学附属医院肝胆外科. chenz@ahnmc.com
电话: 0513–85829806 传真: 0513–85106369
收稿日期: 2006–04–07 接受日期: 2006–05–08

Preparation of polylactic acid-O-carboxymethylated chitosan nanoparticles and their influences on the cultured porcine hepatocytes

Zhong Chen, Xin-Zheng Dai, Xin-Rong Yang, Wen-Cai Zhu

Zhong Chen, Xin-Zheng Dai, Xin-Rong Yang, Wen-Cai Zhu, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Nantong University; Institute of Hepatobiliary Surgery, Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China
Supported by the Key Project Foundation from the Health Department of Jiangsu Province, No. H200215, and the Innovation Foundation of Nantong University, No. CX0301
Correspondence to: Zhong Chen, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Nantong University, 20 Xisi Road, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. chenz@ahnmc.com
Received: 2006-04-07 Accepted: 2006-05-08

Abstract

AIM: To prepare polylactic acid-O-carboxymethylated chitosan (PLA-O-CMC) nanoparticles and evaluate their influences on the morphology and functions of cultured porcine hepatocytes.

METHODS: PLA-O-CMC nanoparticles were prepared from PLA and O-CMC by ultrasonic method. The nanoparticles were characterized by atomic force microscopy and X-ray photoelectron spectrometry. Isolated porcine hepatocytes were divided into two groups: commonly culturing group and nanomaterial group (co-culturing hepatocytes with PLA-O-CMC nanoparticles). The morphology and functions of the cultured hepatocytes were observed within 1 wk.

RESULTS: PLA-O-CMC nanoparticles were successfully prepared, and the diameter was 300-500 nm under atomic force microscope. X-ray photoelectron spectrometry showed that the proportions of C, O, and N element were 72.51%, 23.69%, and 3.80%, respectively. The hepatocytes lost their features of polygons after common culture for 48 h. However, after co-culture with PLA-O-CMC nanoparticles, the hepatocytes clustered into conglobulations, and most of them restored their cell polarities, shaping as typical polygons. After culture for 1, 3, and 5 d, the content of albumin (ALB) was significantly higher in nanomaterial group than that in commonly culturing group (3.53 ± 0.052, 3.48 ± 0.075, 3.57 ± 0.137 g/L *vs* 3.10 ± 0.179, 3.17 ± 0.186, 3.10 ± 0.219 g/L, all $P < 0.05$), while on day 3, 5 and 7, the level of alanine aminotransferase (ALT) was markedly lower (15.33 ± 13.05, 8.84 ± 8.87, 7.00 ± 5.22 nkat/L *vs* 24.17 ± 20.35, 16.17 ± 27.49, 15.50 ± 11.95 nkat/L, all $P < 0.05$). From day 3 to 7, the content of supernant blood urea nitrogen (BUN) was higher in nanomaterial group than that in commonly culturing group, but there was no significant difference ($P > 0.05$).

CONCLUSION: PLA-O-CMC nanoparticles are successfully prepared, and can be used in the culture of hepatocytes.

Key Words: Polylactic acid-O-carboxymethylated chitosan; Nanoparticles; Hepatocytes; Culture; Hepatocytes transplantation

Chen Z, Dai XZ, Yang XR, Zhu WC. Preparation of polylactic acid-O-carboxymethylated chitosan nanoparticles and their influences on the cultured porcine hepatocytes. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(17):1669-1674

摘要

目的: 制备聚乳酸-O-羧甲基壳聚糖纳米粒子并探讨其对培养猪肝细胞形态和功能的影响.

■背景资料
肝细胞移植有望成为急性肝衰竭治疗的一种有效手段. 但如何提高移植肝细胞的活性和降低免疫排斥反应是急需解决的两大问题. 移植肝细胞有多种来源, 但除动物肝细胞外, 其他种类肝细胞的研究尚不成熟. 猪肝细胞因其生物功能与人类肝细胞的接近性及易于获得而在肝细胞移植实验和临床研究中受到重视. 探索高活性培养肝细胞的方法仍是目前肝脏组织工程研究的重要内容之一.

■创新盘点
用于组织工程的材料需具有良好的生物相容性和生物可降解性, 壳聚糖便成为良好的选择. 但壳聚糖是非水溶性物质, 这限制了其在细胞培养中的应用. 故我们对其进行了改性得到了O-CMC, 并将其与PLA聚合制备了PLA-O-CMC纳米粒子. PLA和O-CMC是两种性质不同的高分子材料, 均具有良好生物相容性、生物降解性, 且对机体无毒无害; O-CMC为水溶性高分子, 可解决微载体制备和培养过程中的沉淀问题; PLA带负电荷, O-CMC带正电荷, 将二者制备成纳米微球, 可调节微球结构中正负电荷的比例, 从而降低由过强正电荷产生的载体本身的细胞毒性.

方法: 以聚乳酸和O-羧甲基壳聚糖为基质材料, 采用超声波法制备了聚乳酸-O-羧甲基壳聚糖纳米粒子, 用原子力显微镜对其进行了物理表征, 用X射线光电子光谱法对其表面的化学结构进行了表征. 用聚乳酸-O-羧甲基壳聚糖纳米粒子进行原代猪肝细胞培养, 并以普通培养作为对照组. 观察培养后1 wk内肝细胞的形态和功能变化.

结果: 聚乳酸-O-羧甲基壳聚糖纳米粒子制备成功, 原子力显微镜下其直径300-500 nm. 经过XPS光谱分析显示, C, O, N的比例分别为72.51%, 23.69%, 3.80%. 普通培养的肝细胞, 48 h后逐渐失去多边形特征. 而与PLA-O-CMC共培养48 h后, 肝细胞形成细胞黏附聚集的球形体, 大部分肝细胞重建细胞极性, 呈现较典型、均匀的多边形形态特征. 培养后24 h, 3 d和5 d时, 纳米细胞培养组ALB含量高于普通培养组(3.53±0.052, 3.48±0.075, 3.57±0.137 g/L *vs* 3.10±0.179, 3.17±0.186, 3.10±0.219 g/L, 均$P<0.05$); 3, 5, 7 d时, 纳米细胞培养组ALT水平明显低于普通组(15.33±13.05, 8.84±8.87, 7.00±5.22 nkat/L *vs* 24.17±20.35, 16.17±27.49, 15.50±11.95 nkat/L, 均$P<0.05$), 而BUN含量虽然有所升高, 但是不显著($P>0.05$).

结论: 聚乳酸-O-羧甲基壳聚糖纳米粒子是肝细胞培养的良好材料.

关键词: 聚乳酸–O–羧甲基壳聚糖; 纳米材料; 肝细胞; 培养; 肝细胞移植

陈钟, 戴新征, 杨欣荣, 祝文彩. 聚乳酸–O–羧甲基壳聚糖纳米粒子的制备及其对培养猪肝细胞的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(17):1669–1674
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1669.asp

0 引言

急性肝衰竭(acute liver failure, ALF)是各种肝脏疾病特别是病毒性肝炎的主要死因之一. 肝细胞移植可以起到一定的肝功能支持作用. 由于其具有操作简单、对机体生理环境干扰小、供体来源广泛等优点, 已引起了众多研究者的广泛关注[1-3]. 然而, 如何提高移植肝细胞的活性和降低免疫排斥反应是急需解决的两大问题. 纳米材料因其结构特点, 可促进肝细胞的生长[4-6]. 为此, 我们制备了聚乳酸-O-羧甲基壳聚糖(polylatic acid-O-carboxymethylated chitosan, PLA-O-CMC)纳米粒子并应用该材料对猪肝细胞进行了体外培养, 观察培养后肝细胞的形态和功能.

1 材料和方法

1.1 材料 中国实验用小型猪, 雌雄不限, 体质量2-4 kg, 由南通大学动物实验中心提供. 聚乳酸(polylatic acid, PLA)、新生牛血清购自美国Sigma公司. O-羧甲基壳聚糖(O-carboxymethylated chitosan, O-CMC)自制. RPMI 1640培养基、胶原酶Ⅳ、表皮细胞生长因子、肝细胞生长因子购自Gibco公司. 24孔细胞培养板购自晶美生物工程有限公司. 其他试剂为国产分析纯. JY92-2D型超声均质仪购自宁波新芝生物科技股份有限公司. 恒温水浴箱购自上海医疗器械厂. Avanti J-25型高速离心机、低温超速离心机购自美国Beckman Coulter公司产品. 超净工作台购自苏州净化设备厂. 全自动生化分析仪(Vitros 250)购自美国强生公司. CO_2培养箱购自美国Shellab公司. 倒置显微镜购自日本Olympus公司. 真空冷冻浓缩仪购自丹麦Heto公司. CSPM3000原子力显微镜为中科院本原纳米仪器有限公司产品.

1.2 方法

1.2.1 PLA-O-CMC纳米粒子的制备 将10 mL浓度为0.3 g/L PLA二氯甲烷溶液10 mL和1.5 g/L O-CMC溶液10 mL在超声情况下充分反应25 min, 待其中的有机溶剂挥发完全后得到乳光较重的均匀悬浊液. 将此悬浊液先以2000 r/min低速离心5 min, 取上清液以14 000 r/min高速离心10 min, 得到部分白色沉淀, 吸去部分上清液, 将沉淀冷冻抽干取出并置于紫外灯下照射12 h, 消毒后备用.

1.2.2 猪肝细胞的分离和培养 采用原位胶原酶循环肝灌注法分离猪肝细胞[7-10]. 将分离所得肝细胞分为两组进行培养: (1)普通培养组将肝细胞以5×10^8个/L的密度接种到培养板上(1 mL/孔), 置于37℃, 50 mL/L CO_2条件下静置培养12 h内, 每30 min摇动1次, 每次持续5 min, 以利于细胞集聚形成球形体. (2)纳米材料培养组: 将肝细胞以5×10^8个/L与40 mg/L的PLA-O-CMC纳米粒子相混合接种到培养板上(1 mL/孔), 置于37℃, 50 mL/L CO_2条件下静置培养12 h内每30 min震动1次, 每次持续5 min, 以促进纳米材料与肝细胞的结合, 且有利于细胞集聚形成球形体. 冻干后得到的PLA-O-CMC纳米粒子以PBS缓冲液溶解, 将其置于原子力显微

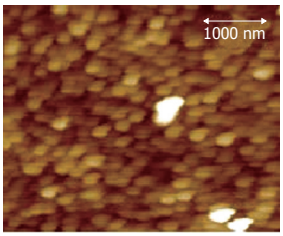


图 1 PLA-O-CMC纳米粒子原子力显微镜照片.

镜下观察其表面形态, X线光电子光谱法(X-ray photoelectron spectrometry, XPS)光谱分析PLA-O-CMC聚合物中C, O, N, S成分.

1.2.3 培养肝细胞形态观察和功能检测 分别取第0.5, 1, 3, 5, 7天的肝细胞培养上清液测定白蛋白(ALB)、谷丙转氨酶(ALT)、尿素氮(BUN), 倒置显微镜观察肝细胞形态, 扫描电镜观察培养在PLA-O-CMC纳米粒子上的肝细胞形态.

统计学处理 数据以mean±SD表示. 用State 7.0软件行方差分析和配对Student *t*检验. $P<0.05$为差异有显著性.

2 结果

2.1 PLA-O-CMC纳米材料的表征 冻干后得到的PLA-O-CMC纳米粒子以PBS缓冲液溶解, 将其置于原子力显微镜下观察, 显示其直径300-500 nm(图1). 经过XPS光谱分析PLA-O-CMC聚合物中C, O, N的比例分别为72.51%, 23.69%, 3.80%, 符合PLA和O-CMC两者聚合后的平均数, 表明新得到的聚合物为PLA-O-CMC.

PLA-O-CMC微球聚合物中C, N, O, S 4种元素的结合能, 见图2. 图中显示, 氮元素的含量约为3.80%. 由于氮元素只存在于O-CMC中, 因此该图谱表明O-CMC位于PLA-O-CMC微球的表面. 这将对微球利用O-CMC带正电的胺基通过静电作用吸附带负电的寡核苷酸非常有利. 这更加有利于细胞在其表面的黏附, 更加有利于细胞的聚集和成团, 为细胞的生长提供了良好的生物支架.

2.2 肝细胞形态变化 分离的肝细胞呈单个球形状态悬浮于培养基中, 用苔盼蓝拒染法检测细胞活率为95%-98%. 普通培养的肝细胞, 接种后很快沉于培养板底并贴壁生长, 其形态立即由刚分离的圆球形向单层扁平多边形伸展, 48-72 h后细胞进一步变薄, 逐渐失去多边形特征, 肝细胞连接成片生长. 将分离的肝细胞与PLA-O-CMC纳米粒子混合培养, 间歇振荡12 h后, 细胞黏附在纳米材料上. 培养48 h后, 形成

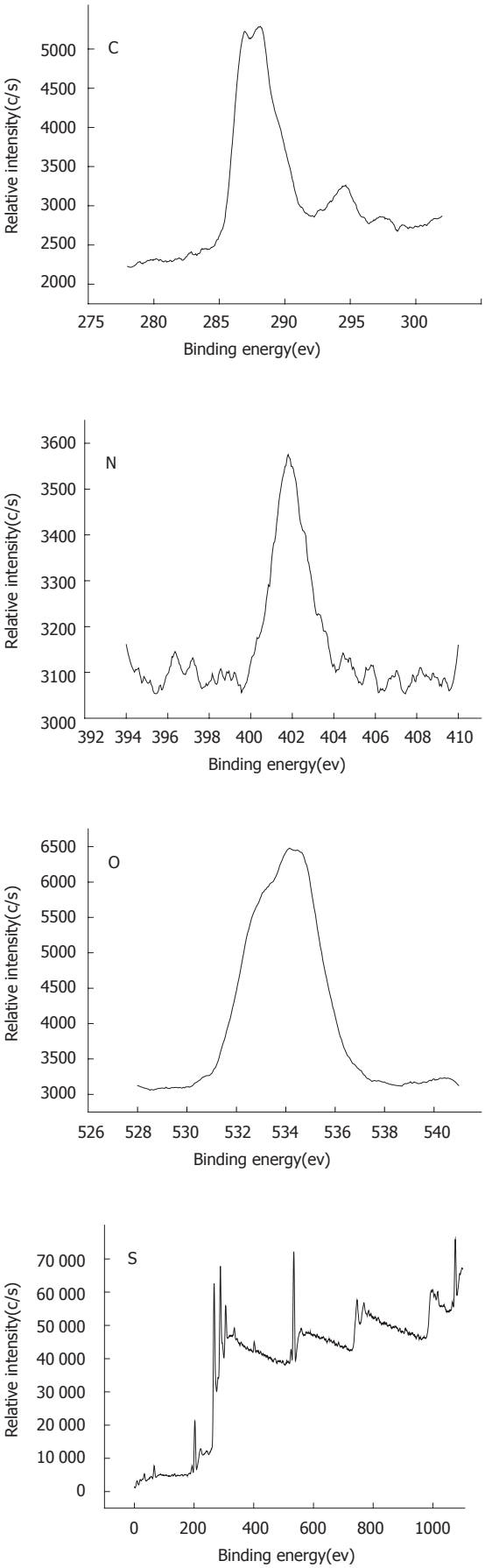


图 2 PLA-O-CMC聚合物表面各元素的结合能.

■应用要点

在肝细胞培养中改性壳聚糖材料已被广泛应用, 但纳米级改性壳聚糖复合材料的使用还鲜见报道. 我们的探索为肝细胞培养中新型生物材料的应用开拓了思路.

■同行评价
本文文笔清晰流畅，有一定创新性，有科研的实用性.

表 1 两组肝细胞培养上清液中ALB含量比较 (mean ± SD)

ALB (g/L)	12 h	24 h	3 d	5 d	7 d
普通培养组 (n = 6)	3.37 ± 0.121	3.10 ± 0.179	3.17 ± 0.186	3.10 ± 0.219	3.13 ± 0.103
纳米材料培养组 (n = 6)	3.33 ± 0.082	3.53 ± 0.052	3.48 ± 0.075	3.57 ± 0.137	3.23 ± 0.137
P值	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05

表 2 两组肝细胞培养上清液中ALT含量比较 (mean ± SD)

ALT (nkat/L)	12 h	24 h	3 d	5 d	7 d
普通培养组 (n = 6)	34.17 ± 9.42	31.33 ± 8.47	24.17 ± 20.35	16.17 ± 27.49	15.50 ± 11.95
纳米材料培养组 (n = 6)	33.00 ± 13.04	30.84 ± 19.45	15.33 ± 13.05	8.84 ± 8.87	7.00 ± 5.22
P值	>0.05	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05

表 3 两组肝细胞培养上清液中BUN含量比较 (mean ± SD)

BUN (mmol/L)	12 h	24 h	3 d	5 d	7 d
普通培养组 (n = 6)	0.65 ± 0.036	0.68 ± 0.038	0.75 ± 0.038	0.80 ± 0.015	0.80 ± 0.026
纳米材料培养组 (n = 6)	0.63 ± 0.029	0.64 ± 0.030	0.82 ± 0.027	0.90 ± 0.037	0.86 ± 0.020
P值	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

细胞黏附聚集的球形体，提高了细胞密度. 培养24 h，大部分肝细胞仍保持圆球状，部分肝细胞向多边形转变，多数肝细胞相互黏连，成束状生长. 约培养48 h后，大部分肝细胞重建细胞极性，呈现较典型、均匀的多边形形态特征. 以扫描电镜对PLA-O-CMC纳米材料肝细胞的混合培养物进行了观察，显示肝细胞成团聚集于PLA-O-CMC纳米材料表面，生长良好(图3).

2.3 肝细胞功能变化

2.3.1 两组肝细胞培养上清中白蛋白(ALB)含量比较(表1) 经统计学处理，培养后24 h、第3天和第5天，纳米细胞培养组ALB含量高于普通培养组(P<0.05). 培养24 h后，普通培养组ALB低于培养后12 h值(P<0.05)；纳米培养组ALB高于培养后12 h值，培养7 d后下降.

2.3.2 两组肝细胞培养上清中丙氨酸转氨酶(ALT)含量比较(表2) 经统计学处理，培养后第3-7天，纳米材料培养组ALT含量低于普通培养组(P<0.05). 两组培养第3天后，ALT含量逐渐降低(P<0.05).

2.3.3 两组肝细胞培养上清液中尿素氮(BUN)含量比较(表3) 经统计学处理，培养后第3-7天BUN含量有所增高，但各组之间及各时段之间相比差异无显著性(P>0.05).

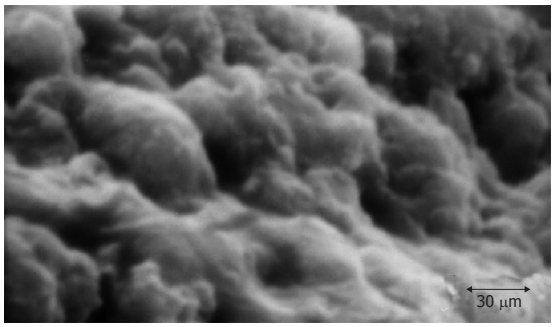


图 3 PLA-O-CMC纳米粒子肝细胞混合培养SEM.

3 讨论

移植肝细胞功能的维持和提高是肝细胞移植临床应用面临的一大问题. 微载体培养是近年来广泛应用的大规模细胞培养的一种方法，有利于细胞的高密度培养，并维持较高的细胞代谢活性. 张立国 *et al*[11-13]运用壳聚糖制作微米级的微载体来进行大鼠肝细胞的培养，表明壳聚糖制成的微载体可以提供肝细胞黏附的生物相容性界面，促进肝细胞之间的相互作用，维持肝细胞的形态和功能，能够较好的维持肝细胞的分化和极性，并且具有良好的组织相容性. Li *et al*[14]制备了CS/胶原复合载体，并将该载体与肝细胞混合培养. 结果表明，CS/胶原复合物是

内置型生物人工肝的良好载体. Yagi *et al*[15]以低压冻干法将果糖连接到多孔CS支架的表面, 将改性后的CS支架(50-200 μm)与肝细胞混合培养. 结果肝细胞的数量显著增多, 肝细胞表现为球型, 表面有大量的微绒毛存在, 表明了肝细胞的生长状况良好, 培养肝细胞白蛋白及尿素的合成功能良好. 此外, Park *et al*[16]制备了半乳糖基壳聚糖, Chung *et al*[17]制备了海藻酸盐/半乳糖壳聚糖支架用于肝细胞的培养都取得了良好的效果. 纳米材料是近年来兴起的一个崭新的领域. 纳米材料具有大量的界面或自由表面, 各纳米单元之间存在着或强或弱的相互作用. 由于这些结构上的特殊性, 使纳米材料具有一些独特的效应, 如表面与界面效应, 小尺寸效应和量子尺寸效应等[18-19]. Xie *et al*[4]的研究表明, 纳米尺寸粗糙表面能够适度地调控细胞的黏附、增殖、分化和凋亡.

我们在金胶纳米粒子上培养猪肝细胞的研究中发现, 细胞在纳米材料上能迅速增殖, 表现出良好的功能[20]. 用于肝细胞移植的纳米材料应具有良好的生物相容性和可降解性. 壳聚糖具有良好的生物相容性和生物可降解性, 还有广谱抗菌、抗感染和很强的凝血作用, 以及促进伤口愈合、调节血脂和降低胆固醇、增强免疫和抗肿瘤等多种生理活性作用[21-24]. 但壳聚糖是非水溶性物质, 故我们对其进行了改性得到了O-CMC, 并与PLA聚合制备了PLA-O-CMC纳米粒子, 将其置于原子力显微镜下观察, 显示其直径大约在300-500 nm, 以XPS分析光谱对其化学性质进行了表征, 进一步证实了所得到的聚合物为PLA-O-CMC. 分别以光学显微镜及电子显微镜观察了PLA-O-CMC纳米粒子对培养猪肝细胞的作用. 结果表明, 与普通肝细胞培养相比较, 纳米培养组的肝细胞形成球形聚集体的时间明显缩短, 球形聚集体的比例明显增加, 细胞形态好, 培养后1, 3和5 d, ALB含量增高. PLA和O-CMC是两种性质不同的高分子材料, 将二者结合作为新的细胞培养载体有如下优点: (1)PLA和O-CMC都是具有良好生物相容性和生物降解性的高分子材料, 对机体无毒无害; (2)O-CMC为水溶性高分子, 可解决微载体制备和培养过程中的沉淀问题; (3)PLA带负电荷, O-CMC带正电荷, 将二者制备成纳米微球, 可调节微球结构中正负电荷的比例, 从而降低由过强正电荷产生的载体本身的细胞毒性; (4)PLA和O-CMC都是可生物降解的高分子材料, 可通过纳米生物技术为细胞的生长提供良好的界面[25-26].

研究结果显示, 培养后3和5 d, 纳米培养组ALT含量低于普通培养组($P<0.05$). 两组培养3 d后, ALT含量逐渐降低($P<0.05$). 表明新制备的肝细胞悬液由于受到胶原酶和其他因素的影响, 肝细胞膜受到不同程度的破坏, 而经培养后肝细胞膜重新修复完整; 纳米材料更有助于肝细胞膜的修复.

4 参考文献

1 Kayler LK, Merion RM, Lee S, Sung RS, Punch JD, Rudich SM, Turcotte JG, Campbell DA Jr, Holmes R, Magee JC. Long-term survival after liver transplantation in children with metabolic disorders. *Pediatr Transplant* 2002; 6: 295-300

2 Nagata H, Ito M, Cai J, Edge AS, Platt JL, Fox IJ. Treatment of cirrhosis and liver failure in rats by hepatocyte xenotransplantation. *Gastroenterology* 2003; 124: 422-431

3 Stefan AM, Coulter S, Gray B, LaMorte W, Nikelaeson S, Edge AS, Afdhal NH. Xenogeneic transplantation of porcine hepatocytes into the CCl4 cirrhotic rat model. *Cell Transplant* 1999; 8: 649-659

4 Xie Y, Sproule T, Li Y, Powell H, Lannutti JJ, Kniss DA. Nanoscale modifications of PET polymer surfaces via oxygen-plasma discharge yield minimal changes in attachment and growth of mammalian epithelial and mesenchymal cells *in vitro*. *J Biomed Mater Res* 2002; 61: 234-245

5 Popat KC, Daniels RH, Dubrow RS, Hardev V, Desai TA. Nanostructured surfaces for bone biotemplating applications. *J Orthop Res* 2006; 24: 619-627

6 Miller DC, Haberstroh KM, Webster TJ. Mechanism(s) of increased vascular cell adhesion on nanostructured poly(lactic-co-glycolic acid) films. *J Biomed Mater Res A* 2005; 73: 476-484

7 Chen Z, Ding YT. Functional evaluation of a new bioartificial liver system *in vitro* and *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1312-1316

8 Chen Z, Ding Y, Li G. Configuration of a new bioartificial liver support system and *in vitro* evaluation of its functions. *Ann Clin Lab Sci* 2005; 35: 7-14

9 Chen Z, Ding Y, Xu Q, Yu D. Bioartificial liver inoculated with porcine hepatocyte spheroids for treatment of canine acute liver failure model. *Artif Organs* 2003; 27: 613-622

10 陈钟, 丁义涛. 原位胶原酶循环灌注法分离猪肝细胞. 细胞生物学杂志 2003; 25: 124-127

11 张立国, 潘继伦, 李结良, 王连永, 俞耀庭. 壳聚糖微载体的制备及原代大鼠肝细胞培养. 中国修复重建外科杂志 2003; 17: 157-160

12 张立国, 潘继伦, 李结良, 俞耀庭. 乳糖修饰壳聚糖微载体的制备及对培养肝细胞代谢活性的影响. 离子交换与吸附 2004; 20: 231-236

13 张立国, 潘继伦, 李结良, 俞耀庭. 果糖修饰壳聚糖微载体的制备及其原代大鼠肝细胞培养. 生物工程学报 2003; 19: 116-119

14 Li J, Pan J, Zhang L, Guo X, Yu Y. Culture of primary rat hepatocytes within porous chitosan scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 2003; 67: 938-943
15 Yagi K, Michibayashi N, Kurikawa N, Nakashima Y, Mizoguchi T, Harada A, Higashiyama S, Muranaka H, Kawase M. Effectiveness of fructose-modified chitosan as a scaffold for hepatocyte attachment. *Biol Pharm Bull* 1997; 20: 1290-1294
16 Park IK, Yang J, Jeong HJ, Bom HS, Harada I, Akaike T, Kim SI, Cho CS. Galactosylated chitosan as a synthetic extracellular matrix for hepatocytes attachment. *Biomaterials* 2003; 24: 2331-2337
17 Chung TW, Yang J, Akaike T, Cho KY, Nah JW, Kim SI, Cho CS. Preparation of alginate/galactosylated chitosan scaffold for hepatocyte attachment. *Biomaterials* 2002; 23: 2827-2834
18 Murphy J, Carr B, Atkinson T. Nanotechnology in medicine and the biosciences. The UK National Symposium on Nanotechnology in Medicine and the Biosciences, London, UK, 16-18 March l994. *Trends Biotechnol* 1994; 12: 289-290
19 陈钟, 吴振宇. 纳米材料在组织工程中的应用研究. 国外医学・生物医学工程分册 2004; 27: 278-280
20 Gu HY, Chen Z, Sa RX, Yuan SS, Chen HY, Ding YT, Yu AM. The immobilization of hepatocytes on 24 nm-sized gold colloid for enhanced hepatocytes proliferation. *Biomaterials* 2004; 25: 3445-3451
21 Khor E, Lim LY. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* 2003; 24: 2339-2349
22 VandeVord PJ, Matthew HW, DeSilva SP, Mayton L, Wu B, Wooley PH. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. *J Biomed Mater Res* 2002; 59: 585-590
23 Felt O, Buri P, Gurny R. Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm* 1998; 24: 979-993
24 吴振宇, 陈钟, 黄华, 田鹏鹏. 离子凝胶法制备壳聚糖纳米微粒. 南通大学学报(医学版) 2005; 25: 20-22
25 常津, 刘海峰, 许晓秋, 原续波, 姚康德, 尤永平, 蒲佩玉. 一种新型纳米基因载体的制备及体外实验. 中国生物医学工程学报 2002; 21: 515-519
26 Bergsma JE, Rozema FR, Bos RR, Boering G, de Bruijn WC, Pennings AJ. *In vivo* degradation and biocompatibility study of *in vitro* pre-degraded as-polymerized polyactide particles. *Biomaterials* 1995; 16: 267-274

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

专家门诊

本刊讯 《世界华人消化杂志》特设“专家门诊”固定专栏为广大消化病患者搭建一个信息平台, 欢迎副主任医师以上的消化内科、普通外科专家为专栏撰稿(附单位介绍信), 免收出版费, 写作格式如下:

胃溃疡诊断和治疗

个人简介(附3.5 cm × 5 cm照片一张)

通信作者（包括邮政编码、工作单位、部门、科室、机构全称、地址、所在省市、E-mail）

0 引言

1 诊断

2 治疗

3 特色

4 门诊时间

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年6月18日; 14(17): 1675-1680
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

苦参碱对大鼠原位肝移植冷缺血再灌注损伤的保护作用

朱新华, 仇毓东, 史敏科, 丁义涛

朱新华, 仇毓东, 史敏科, 丁义涛, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科 江苏省南京市 210008
朱新华, 2003年南京大学博士, 主治医师, 主要从事肝脏移植及原发性肝癌的临床和基础研究工作.
江苏省中医药管理局资助项目, No. SZ9902
通讯作者: 仇毓东, 210008, 江苏省南京市, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科. yudongqiu510@hotmail.com
电话: 025-83304616 传真: 025-83317016
收稿日期: 2006-04-23 接受日期: 2006-05-11

Effects of matrine on cold ischemia and reperfusion injury during orthotopic liver transplantation in rats

Xin-Hua Zhu, Yu-Dong Qiu, Min-Ke Shi, Yi-Tao Ding

Xin-Hua Zhu, Yu-Dong Qiu, Min-Ke Shi, Yi-Tao Ding, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China
Supported by the Traditional Chinese Medicine Administration Bureau of Jiangsu Province, No. SZ9902
Correspondence to: Dr. Yu-Dong Qiu, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China. yudongqiu510@hotmail.com
Received: 2006-04-23 Accepted: 2006-05-11

Abstract

AIM: To investigate the protective effect of matrine on the cold ischemia and reperfusion (I/R) injury during orthotopic liver transplantation (OLT) and its mechanism in rats.

METHODS: Two hundred and twenty-four syngeneic SD rats were randomly divided into control, matrine, and pseudo-treatment group. The rats in matrine group were treated with low (40 mg/kg) and high dose (80 mg/kg) of matrine respectively. After the donor liver was preserved in Ringer's (LR) solution for 5 h, the orthotopic implantation was performed. The serum and tissue samples were collected for analysis 1, 2, 4 and 24 h after reperfusion of the portal vein, and the one-week survival rate was observed in each group.

RESULTS: In comparison with those in the control group, the levels of ALT decreased significantly in low- and high-dose treatment groups at different times post-transplantation, and their one-week survival rates also increased markedly (75%, 75% *vs* 0, $P < 0.01$). Matrine treatment decrease the expression of tissue intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), serum hyaluronic acid (HA) and the adhesion of inflammatory cells to sinusoidal endothelial cells (SEC), and increased the production of nitric oxide (53.1 ± 5.1, 54.2 ± 4.9 μmol/L *vs* 30.2 ± 2.3 μmol/L, $P < 0.01$), resulting in suppression of microcirculation injury caused by hepatic reperfusion. The level of endotoxin (ET) was decreased significantly in low- and high-dose treatment groups (0.343 ± 0.111, 0.302 ± 0.059 kEU/L *vs* 0.643 ± 0.110 kEU/L, $P < 0.01$), and matrine markedly inhibited the activation of Kupffer cells and the release of tumor necrosis factor-α (1.69 ± 0.22, 1.29 ± 0.33 U/L *vs* 5.96 ± 0.59 U/L, $P < 0.01$), and the content of hepatic malondialdehyde (0.87 ± 0.41, 0.69 ± 0.22 μmol/g *vs* 2.35 ± 0.54 μmol/g, $P < 0.01$) were notably decreased. Meanwhile, the activity of superoxide dismutase was elevated notably (19.89 ± 1.84, 21.04 ± 1.86 kU/g *vs* 13.39 ± 0.85 kU/g, $P < 0.01$). Matrine treatment markedly ameliorated the focal necrosis of hepatocytes, inflammatory cell aggregation, and detachment of SEC. No significant difference was observed between the treated groups.

CONCLUSION: Matrine can prevent hepatic cells and SEC from cold ischemia and reperfusion injury during orthotopic liver transplantation in rats, and the mechanism is associated with the inhibition of Kupffer cell activation and the release of inflammatory cytokines.

Key Words: Orthotopic liver transplantation; Matrine; Ischemia and reperfusion injury; Sinusoidal endothelial cell; Rats

Zhu XH, Qiu YD, Shi MK, Ding YT. Effects of matrine on cold ischemia and reperfusion injury during orthotopic liver transplantation in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(17):1675-1680

摘要

目的: 探讨苦参碱对大鼠原位肝移植中供肝

■背景资料
如何防治供肝冷保存再灌注损伤一直是肝移植领域的研究热点, 而临床广泛应用的苦参碱药理学结构明确, 具有抗炎、抗氧化、免疫抑制、保肝等作用, 本文作者在前期的研究中已明确其对供肝的冷保存再灌注损伤具有保护作用, 本文进一步对其分子生物学作用机制进行探讨.

■研发前沿
供肝冷保存再灌注损伤及防治一直是肝移植领域的研究难点, 其中肝窦内皮细胞损伤及微循环障碍机制正成为研究热点. 苦参碱免疫抑制、抗炎抗氧化等药理学作用在移植领域的应用正日益受到人们的关注.

冷缺血再灌注损伤的保护作用及其机制.

方法: 应用延长保存的大鼠原位肝移植模型, 大鼠224只随机分为对照组、低剂量(40 mg/kg)、高剂量苦参碱治疗组(80 mg/kg)和假手术组, 将供肝在4℃林格液中保存5 h后植入受体, 分别观察移植术后1 wk生存率, 并且检测移植术后1, 2, 4, 24 h血ALT, TNF-α, 内毒素(ET), 透明质酸(HA), 一氧化氮(NO)及肝组织丙二醛(MDA), 超氧化物歧化酶(SOD), 细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的含量, 并观察移植肝脏病理形态学的改变.

结果: 与对照组比较, 苦参碱低剂量、高剂量治疗组术后1 wk生存率显著增加(75%, 75% *vs* 0, $P<0.01$), 肝功能改善, 血清HA (277.62±29.06, 406.84±95.04 μg/L *vs* 1109.42±110.28 μg/L, $P<0.01$)和肝组织ICAM-1表达均显著减少, 血清NO含量增加(53.1±5.1, 54.2±4.9 μmol/L *vs* 30.2±2.3 μmol/L, $P<0.01$), TNF-α(1.69±0.22, 1.29±0.33 U/L *vs* 5.96±0.59 U/L, $P<0.01$)、ET (0.343±0.111, 0.302±0.059 kEU/L *vs* 0.643±0.110 kEU/L, $P<0.01$)以及肝组织MDA (0.87±0.41, 0.69±0.22 μmol/g *vs* 2.35±0.54 μmol/g, $P<0.01$)水平均明显降低, 肝组织SOD (19.89±1.84, 21.04±1.86 kU/g *vs* 13.39±0.85 kU/g, $P<0.01$)水平均明显升高, 肝细胞和肝窦内皮细胞形态也发生改善.

结论: 苦参碱可以通过减轻再灌注后内毒素血症, 抑制库氏细胞激活及释放TNF-α, ICAM-1等炎症性细胞因子, 清除氧自由基, 促进NO合成等途径, 减轻肝细胞及肝窦内皮细胞的损伤.

关键词: 原位肝移植; 苦参碱; 缺血再灌注损伤; 内皮细胞; 大鼠

朱新华, 仇毓东, 史敏科, 丁义涛. 苦参碱对大鼠原位肝移植冷缺血再灌注损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2006;14(17):1675–1680
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1675.asp

0 引言

在原位肝移植过程中, 供肝冷保存和门静脉阻断是不可避免的, 研究减轻移植肝脏的再灌注损伤具有重要意义. 供肝冷保存再灌注损伤是一个由多因素参与的复杂的病理过程, 其中肝窦内皮细胞形态和功能的改变可引起肝内微循环障碍, 最终可导致移植肝脏原发性无功能[1-3], 近年研究表明库氏细胞激活释放TNF-α等炎性损伤因子在供肝冷保存再灌注损伤中也发挥着重要作用[4-6]. 苦参碱为中药苦参中提取的有效成分, 其基本结构为苦参次碱-15酮, 具有抗炎、抗氧化、免疫抑制、保肝等作用[7], 临床已广泛用于慢性肝病的治疗. 我们采用大鼠原位肝移植模型, 研究苦参碱对供肝冷缺血再灌注损伤的保护作用, 并对其作用机制进行探讨.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂健康SD大鼠224只(购自南京军区总医院动物中心), 体质量200±10 g, 随机分为对照组、低剂量治疗组、高剂量治疗组和假手术组. 假手术组有大鼠32只, 其余3组各有大鼠32对. 大鼠原位肝移植模型参照改良Kamada法[8]进行. 各组供肝取出后均置于4℃林格液中保存5 h再植入受体. 受体门静脉阻断时间16-18 min. 低剂量治疗组受体术前0.5 h ip苦参碱(购自广州明兴制药厂)40 mg/kg; 高剂量治疗组术前0.5 h ip苦参碱80 mg/kg; 对照组同法注入生理盐水1 mL; 假手术组方法同肝移植受体的肝脏游离, 只是不作肝切除, 目的是进行正常对照, 以排除手术因素或肝动脉结扎对实验的影响. 各组大鼠于再灌注后1, 2, 4和24 h分别取6只经下腔静脉取血4 mL, 离心(4℃, 3000 r/min) 10 min后, 取上清置于-70℃冰箱保存待测. 同时分别取肝中叶组织适量快速置于液氮中保存待测.

1.2 方法 各组分别取8只受体大鼠进行饲养, 观察1 wk存活率. 取各组大鼠再灌注后4和24 h血清, 采用全自动生化分析仪测定ALT.

1.2.1 血清学测定 分别取各组大鼠再灌注后1, 2, 4和24 h血清, 采用以L929细胞为靶细胞的结晶紫法进行测定, 以kU/L表示. 取各组大鼠再灌注后1和2 h血样采用鲎试剂法测定血浆内毒素(内毒素定量测定试剂盒购自上海医学检测中心). 取各组大鼠再灌注后1, 2和4 h血清, 采用透明质酸放射免疫分析测定盒(购于上海海洋医学生物技术中心)测定血清透明质酸浓度. 取各组大鼠再灌注后1和2 h血清, 采用硝酸还原酶法一氧化氮测定试剂盒(购自南京建成生物工程研究所)测定血清NO_2^-/ NO_3^-含量.

1.2.2 肝组织检查 取各组大鼠再灌注后1, 2和4 h肝组织标本1 g, 制成匀浆后, 采用考马斯亮蓝法进行蛋白定量, 分别采用丙二醛法、黄嘌呤氧化酶法测定MDA, SOD含量(测定试剂盒购自南京

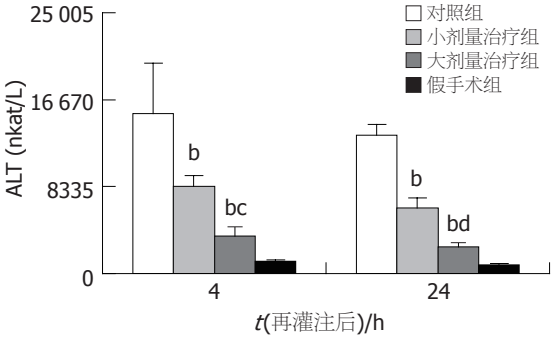


图 1 大鼠原位肝移植术后血清ALT水平. $^{b}P<0.01$ *vs* 对照组; $^{c}P<0.05$, $^{d}P<0.01$ *vs* 小剂量治疗组.

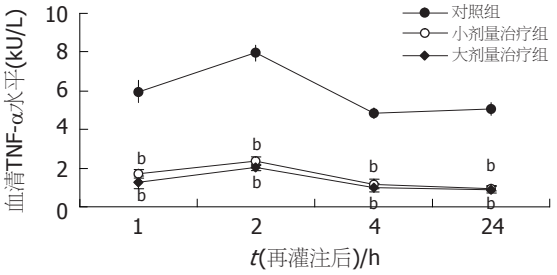


图 2 大鼠原位肝移植术后血清TNF-α活性变化. $^{b}P<0.01$ *vs* 对照组.

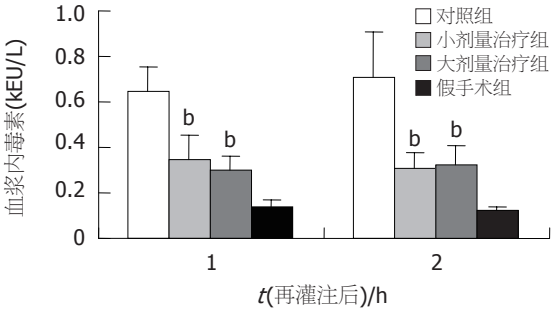


图 3 大鼠原位肝移植术后血浆内毒素浓度变化. $^{b}P<0.01$ *vs* 对照组.

建成生物工程研究所). 再灌注后1, 2和4 h分别处死大鼠后取肝中叶组织, OCT胶包埋后, 液氮冻存. 冰冻切片6 μm, 室温放置30 min后, 入4℃丙酮固定10 min, PBS洗, 5 min×3, 30 mL/L过氧化氢孵育5-10 min后, PBS洗, 5 min×2, 下接常规辣根过氧化物酶法免疫组化染色操作步骤. 一抗采用mouse-anti-rat CD54 (ICAM-1)mAb, MCA773(购自英国Serotec公司), 稀释度为1∶50. 再灌注后4 h处死大鼠, 各取前叶肝组织经40 g/L中性甲醛固定、石蜡包埋后切成4 μm薄片, HE染色, 光镜下观察肝脏组织的病理形态学变化. 再灌注后4 h处死大鼠, 各取前叶1-2 mm见方肝组织放入4℃ 20 g/L戊二醛液中固定, 经锇酸后固定, 乙醇脱水, 环氧树脂Epon 618包埋, 用AO-E型超薄切片机超薄切片, 铅铀双染, 在JEM-1200EX型透射电镜下观察.

统计学处理 所有数据以mean±SD表示, 采用SAS软件方差分析Student-Newman-Keuls法进行统计分析.

2 结果

大鼠原位肝移植手术成功率约为95%, 但对照组8只大鼠都于术后48 h内死亡, 尸体解剖可见腹腔内大量腹水和渗血, 肝脏明显肿大, 且色泽不均, 镜下供肝呈明显的局灶样坏死. 而两苦参碱治疗组大鼠术后的1 wk存活率均达到75%.

2.1 血清学变化 与假手术组比较, 治疗组和对照组移植术后ALT值均升高. 两治疗组术后4和24 h的ALT值均显著低于对照组($P<0.01$, 图1), 且两治疗组间术后4和24 h的ALT值也有显著差异(分别为$P<0.05$和$P<0.01$). 假手术组血清中未检测出TNF-α活性, 而对照组血清TNF-α活性迅速上升, 再灌注后2 h达到高峰(7.94±0.42 kU/L), 4 h后迅速下降(4.83±0.27 kU/L), 到再灌注后24 h一直维持低水平(5.04±0.33 kU/L). 另两治疗组术后TNF-α活性也在再灌注后2 h达到高峰(图2), 且与对照组相比各时间点的TNF-α活性均有显著降低($P<0.01$), 而两治疗组间比较无显著差异. 假手术组术后血中内毒素水平较低(0.137±0.029 kEU/L), 对照组术后1, 2 h内毒素水平分别为0.643±0.110 kEU/L和0.704±0.203 kEU/L(图3). 两治疗组术后1, 2 h内毒素水平均较对照组显著降低($P<0.01$), 而两治疗组间比较无显著差异. 与假手术组比较, 治疗组和对照组移植术后各时间点HA值均升高, 且术后HA的高峰均出现在术后2 h. 两治疗组术后各时间点HA值均显著低于对照组($P<0.01$), 且两治疗组间术后各时间点HA值也有显著差异(分别为$P<0.05$和$P<0.01$, 图4). 与假手术组比较, 治疗组和对照组移植术后各时间点NO_2^-/NO_3^-值均降低. 两治疗组术后NO_2^-/NO_3^-值均显著低于对照组($P<0.01$, 图5), 两治疗组间术后NO_2^-/NO_3^-值无显著差异.

2.2 肝组织的检测 与对照组比较, 两治疗组术后各时间点的MDA含量均显著降低($P<0.01$, 图6), 而两治疗组间的MDA水平无显著差异. 与对照组比较, 两治疗组术后各时间点的SOD水平均显著升高($P<0.01$, 图7), 而两治疗组间的SOD水平无显著差异. 对照组术后1 h即可在肝窦内皮细胞表面、部分肝细胞及肝血窦内出现ICAM-1

■创新盘点

本研究在国内首次将苦参碱应用于防治供肝冷保存再灌注损伤的基础研究, 并且对分子生物学作用机制进行深入探讨.

■应用要点
苦参碱作为药物的单体成分，其化学结构、药代动力学、药效学及药理作用机制明确，副作用很小，并已制备出多种剂型供临床选用，临床应用前景较广泛.

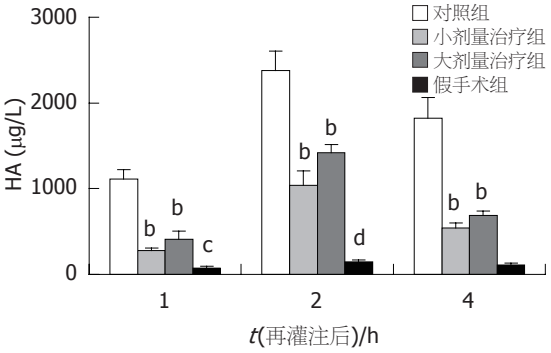


图 4 大鼠原位肝移植术后血清HA浓度变化. $^{b}P<0.01$ *vs* 对照组; $^{c}P<0.05$, $^{d}P<0.01$ *vs* 小剂量治疗组.

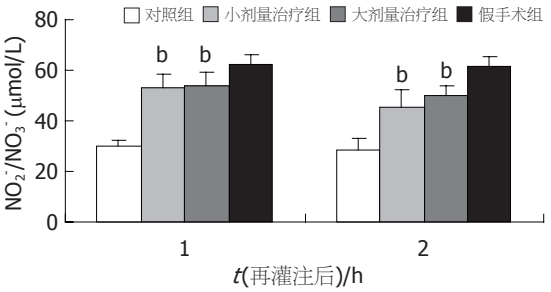


图 5 大鼠原位肝移植冷缺血再灌注损伤后血NO_2^-/NO_3^-的变化. $^{b}P<0.01$ *vs* 对照组.

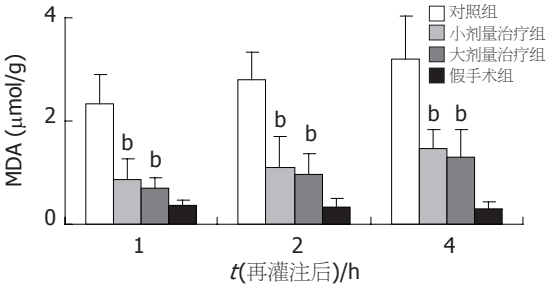


图 6 大鼠原位肝移植术后肝组织MDA含量的变化. $^{b}P<0.01$ *vs* 对照组.

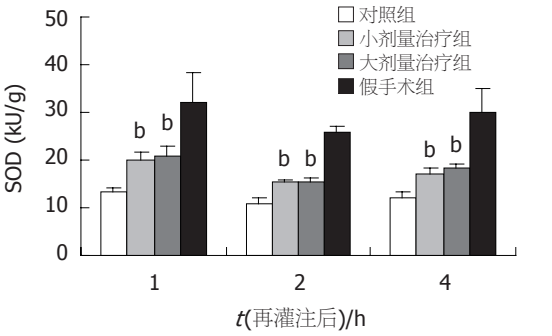


图 7 大鼠原位肝移植术后肝组织SOD水平的变化. $^{b}P<0.01$ *vs* 对照组.

的表达，至术后2和4 h更可见ICAM-1的强表达. 两治疗组术后各时间点在类似部位也出现了ICAM-1的表达，但其表达均明显减弱，且两组间表达程度未见明显差异. 假手术组肝组织结构基本正常，对照组可见肝细胞灶性坏死，伴大量中性粒细胞及单核细胞浸润，肝窦内皮细胞受损，与Disse间隙脱离，枯否氏细胞增生明显. 小剂量治疗组可见少数肝细胞呈空泡变性，无肝细胞坏死，炎性细胞浸润明显减少，枯否氏细胞大致正常. 大剂量治疗组形态学改变与小剂量治疗组相似.

2.3 肝血窦超微结构 假手术组：大多数肝细胞、SEC形态和结构基本正常，未见明显肿胀及凋亡细胞. 对照组：肝细胞核皱缩，染色质浓集，线粒体肿胀，嵴结构不清，粗面内质网扩大成指状. SEC明显肿胀，核膜不规整，可见核固缩、聚集、着边的凋亡细胞，线粒体水肿、部分空泡化，粗面内质网扩张，可见髓鞘样结构. 内皮细胞向血窦腔内突出，并可脱落入肝血窦腔内. 血窦腔内可见大量中性粒细胞、淋巴细胞等浸润. 库氏细胞高度活跃，细胞突起增多，胞质增宽，胞质内可见许多吞噬溶酶体、透明的空泡和颗粒，细胞核形态不规则. 小剂量治疗组：肝细胞核圆居中，线粒体和粗面内质网结构清晰. SEC核膜稍显不规整，伸展部变薄，但覆盖完整. 内皮细胞轻度水肿，溶酶体增多，粗面内质网无扩张，吞饮小泡丰富，SEC损伤明显减轻. 血窦腔内炎性细胞浸润的程度和范围也明显轻于对照组. 枯否氏细胞呈圆形，突起减少，细胞核规则，胞质内容物减少. 大剂量治疗组：SEC损伤仍存在，其与肝细胞、枯否氏细胞的超微结构改变与小剂量治疗组类似.

3 讨论

冷缺血再灌注损伤是缺血再灌注损伤的特殊类型，在现代临床肝移植中越来越显出其重要性. 以往研究表明在肝脏的再灌注期，枯否氏细胞大量激活，释放一系列的炎性损伤因子，导致肝窦内皮细胞损伤及肝功能受损[1,9-10]. 在冷保存期间导致再灌注损伤的因素已经存在，而在再灌注期通过某种途径激活相关损伤因子，导致肝脏损伤[11-12]. 我们将苦参碱作用于再灌注期，以期能打断这种途径，保护肝组织免受再灌注损伤. 大鼠肝脏在4℃平衡液中保存的安全时限为2-4 h[13]，为探讨苦参碱对供肝冷缺血再灌注损伤是否有保护性作用，我们采用将供肝于移植术前置于4℃平衡液中保存5 h，再移植入受体的大鼠原位肝移植模型，观察苦参碱对大鼠移

植术后1 wk生存率及肝细胞形态及功能的影响. 实验结果表明, 苦参碱对移植肝脏有明显的保护作用, 能显著的改善大鼠肝功能和移植术后1 wk存活率. 在本实验中, 对照组大鼠均于术后48 h内死于肝功能衰竭, 1 wk生存率为0%, 而两治疗组大鼠的1 wk存活率均达到75%. 对照组大鼠死后尸体解剖可见腹腔内有大量腹水和渗血, 肝脏明显肿胀, 且颜色深浅不一, 镜下肝脏呈明显的局灶样坏死, 符合其死于移植术后原发性移植肝无功能的表现. 另外, 治疗组的肝功能指标ALT有明显的改善, 并且对再灌注后4 h肝组织光镜和电镜检查也显示治疗组的肝脏枯否氏细胞激活及炎性细胞浸润明显减少, 肝细胞及肝窦内皮细胞损伤程度明显减轻. 随着苦参碱剂量的增加, 其对肝细胞和肝窦内皮细胞的保护作用没有明显增强, 这与Zhang *et al*[14]研究结果相一致, 并且实验过程中并未发现大剂量运用苦参碱的毒性.

肝移植缺血再灌注中, 枯否氏细胞被激活后可产生TNF等炎性细胞因子, 同时释放出大量的氧自由基, 从而在肝脏再灌注损伤中发挥重要作用[5-6,15]. 我们的研究结果表明, 对照组移植术后内毒素血症明显, 枯否氏细胞呈现激活状态, 并且TNF-α随之显著升高, 伴随着肝细胞及肝窦内皮细胞明显受损. 与之相比, 两苦参碱治疗组的血浆内毒素水平明显降低, 伴随着血清TNF-α活性及肝组织中TNF-α含量的显著减少, 并且枯否氏细胞增生活跃程度及炎性细胞浸润也明显减轻. 同时, 苦参碱能增强机体清除氧自由基和抗脂质氧化的能力.

肝血窦内皮细胞损伤及顺应性改变可致肝血窦阻塞, 再灌注障碍, 从而使肝组织细胞仍处于缺血状态, 损伤进一步加重发展[16-17]. 因此, 在肝移植缺血再灌注损伤过程中, 保护内皮细胞和保护肝细胞同样重要[18-20], 这对于防止移植肝脏微循环障碍, 术后发生“无复流”等现象, 最终导致原发性移植肝无功能具有重要临床意义[3,21-23]. 结果表明, 治疗组术后各时间点反映肝窦内皮细胞功能和活力的指标-血HA浓度及肝脏ICAM-1的表达均较对照组明显下降, NO含量显著增加, 肝窦腔内淤血及炎性细胞浸润明显减轻, 并且SEC损伤的超微结构改变也有相应改善. 随着苦参碱剂量的增加, 通过对血HA浓度分析其对SEC的保护作用反而有所降低, 但实验过程中并未发现大剂量运用苦参碱的副作用.

苦参碱具有抗炎、抗氧化、免疫抑制、保肝等作用[7], 苦参碱可以通过减轻再灌注后内毒素血症, 抑制枯否氏细胞激活及释放TNF-α, IL-1, IL-6, ICAM-1等炎症性细胞因子, 清除氧自由基, 促进NO合成等途径, 减少粒细胞与SEC的黏附, 从而减轻肝细胞及SEC的损伤, 改善移植肝脏微循环, 减轻供肝冷保存再灌注损伤. 苦参碱作为药物的单体成分, 其化学结构、药代动力学、药效学及药理作用机制明确, 副作用很小, 并已制备出多种剂型供临床选用, 临床应用前景较广泛.

■同行评价

本文行文规范, 研究对象为当前的热点, 采用传统中药治疗肝移植后缺血再灌注, 对于中药现代化和深入挖掘中药的分子生物学作用机制进行了有益的探索, 是一篇较好的实验论文.

4 参考文献

1 Huet PM, Nagaoka MR, Desbiens G, Tarrab E, Brault A, Bralet MP, Bilodeau M. Sinusoidal endothelial cell and hepatocyte death following cold ischemia-warm reperfusion of the rat liver. *Hepatology* 2004; 39: 1110-1119

2 Emadali A, Nguyen DT, Rochon C, Tzimas GN, Metrakos PP, Chevet E. Distinct endoplasmic reticulum stress responses are triggered during human liver transplantation. *J Pathol* 2005; 207: 111-118

3 Kupiec-Weglinski JW, Busuttil RW. Ischemia and reperfusion injury in liver transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 1653-1656

4 Shimizu H, Miyazaki M, Ito H, Nakagawa K, Ambiru S, Kato A, Nukui Y, Nozawa S, Nakajima N. Mechanism of cold ischemia-reperfusion-induced graft injury after orthotopic liver transplantation in rats. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 216-219

5 Peng Y, Gong JP, Liu CA, Li XH, Gan L, Li SB. Expression of toll-like receptor 4 and MD-2 gene and protein in Kupffer cells after ischemia-reperfusion in rat liver graft. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2890-2893

6 Rentsch M, Puellmann K, Sirek S, Iesalnieks I, Kienle K, Mueller T, Bolder U, Geissler E, Jauch KW, Beham A. Benefit of Kupffer cell modulation with glycine versus Kupffer cell depletion after liver transplantation in the rat: effects on postischemic reperfusion injury, apoptotic cell death graft regeneration and survival. *Transpl Int* 2005; 18: 1079-1089

7 叶明. 苦参碱注射液的药理研究. 广东医学 1997; 18: 793-794

8 王轩, 杨甲梅, 严以群, 姚晓平, 吴孟超. 大鼠原位肝移植不同术式的探讨. 中华器官移植杂志 1998; 19: 76-78

9 Puhl G, Schaser KD, Pust D, Kohler K, Vollmar B, Menger MD, Neuhaus P, Settmacher U. Initial hepatic microcirculation correlates with early graft function in human orthotopic liver transplantation. *Liver Transpl* 2005; 11: 555-563

10 Mueller TH, Kienle K, Beham A, Geissler EK, Jauch KW, Rentsch M. Caspase 3 inhibition improves survival and reduces early graft injury after ischemia and reperfusion in rat liver transplantation. *Transplantation* 2004; 78: 1267-1273

11 Gu XP, Qiu YD, Xu FT, Jiang Y, Ding YT. *In vivo* suppressive effect of nuclear factor-kappaB inhibitor on neutrophilic inflammation of grafts after orthotopic liver transplantation in rats. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3654-3658

12 Kudo A, Kashiwagi S, Kajimura M, Yoshimura Y, Uchida K, Arii S, Suematsu M. Kupffer cells alter organic anion transport through multidrug resistance protein 2 in the post-cold ischemic rat liver. *Hepatology* 2004; 39: 1099-1109
13 Sumimoto R, Jamieson NV, Wake K, Kamada N. 24-hour rat liver preservation using UW solution and some simplified variants. *Transplantation* 1989; 48: 1-5
14 Zhang JP, Zhang M, Jin C, Zhou B, Xie WF, Guo C, Zhang C, Qian DH. Matrine inhibits production and actions of fibrogenic cytokines released by mouse peritoneal macrophages. *Acta Pharmacol Sin* 2001; 22: 765-768
15 Vajdova K, Heinrich S, Tian Y, Graf R, Clavien PA. Ischemic preconditioning and intermittent clamping improve murine hepatic microcirculation and Kupffer cell function after ischemic injury. *Liver Transpl* 2004; 10: 520-528
16 Li XL, Man K, Ng KT, Sun CK, Lo CM, Fan ST. The influence of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway on the ischemic injury during rat liver graft preservation. *Am J Transplant* 2005; 5: 1264-1275
17 Chung KY, Jeong GY, Choi KB, Sung SH, Kim YS. Prevention of primary nonfunction after canine liver allotransplantation: the effect of gadolinium chloride. *Transplant Proc* 2004; 36: 1928-1930
18 Que X, Debonera F, Xie J, Furth EE, Aldeguer X, Gelman AE, Olthoff KM. Pattern of ischemia reperfusion injury in a mouse orthotopic liver transplant model. *J Surg Res* 2004; 116: 262-268
19 Gong JP, Tu B, Wang W, Peng Y, Li SB, Yan LN. Protective effect of nitric oxide induced by ischemic preconditioning on reperfusion injury of rat liver graft. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 73-76
20 Lanteri R, Greco R, Licitra E, Di Benedetto F, Li Destri G, Di Cataldo A. Ischemia and hepatic reperfusion: is it possible to reduce hepatic alterations? *Microsurgery* 2003; 23: 458-460
21 Miyagawa Y, Imamura H, Soeda J, Matsunaga K, Mochida S, Fujiwara K, Matsuyama Y, Kawasaki S. Fate of hepatocyte and sinusoidal lining cell function and kinetics after extended cold preservation and transplantation of the rat liver. *Liver Transpl* 2002; 8: 370-381
22 Hines IN, Harada H, Wolf R, Grisham MB. Superoxide and post-ischemic liver injury: potential therapeutic target for liver transplantation. *Curr Med Chem* 2003; 10: 2661-2667
23 Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284: G15-26

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

技法与经验

本刊讯 《世界华人消化杂志》2006年设置“技法与经验”专栏, 及时报道微创、内镜下治疗消化病新的技术和方法及成熟的经验. 我们热烈欢迎各位作者踊跃投稿, 免费刊登照片. 写作格式如下:

结肠镜下黏膜剥离切除术

0 引言

1 技术方法: 1.1 原理; 1.2 适应证; 1.3 器材准备; 1.4 步骤; 1.5 实例

2 结果

3 讨论: 3.1 并发症; 3.2 优点和缺点; 3.3 经验与技巧

4 参考文献

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年6月18日; 14(17): 1681-1687
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

慢病毒介导的双自杀基因对大肠癌细胞的靶向杀伤作用

陈海金, 黄宗海, 苏国强, 吴爱国, 俞金龙

陈海金, 黄宗海, 苏国强, 吴爱国, 俞金龙, 南方医科大学珠江医院普外科 广东省广州市 510280
陈海金, 2004年南方医科大学博士生, 主要从事大肠癌基因治疗方面研究.
广东省自然科学基金资助项目, No. 013072
通讯作者: 黄宗海, 510280, 广东省广州市, 珠江医院普外科. drhuangzh@yahoo.com.cn
电话: 020-31396133 传真: 020-61643213
收稿日期: 2006-03-12 接受日期: 2006-05-08

Targeted killing effect of lentivirus-mediated CD/TK suicide genes on colorectal carcinoma cells

Hai-Jin Chen, Zong-Hai Huang, Guo-Qiang Su, Ai-Guo Wu, Jin-Long Yu

Hai-Jin Chen, Zong-Hai Huang, Guo-Qiang Su, Ai-Guo Wu, Jin-Long Yu, Department of General Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, Guangdong Province, China
Supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 013072
Correspondence to: Zong-Hai Huang, Department of General Surgery, Zhujiang Hospital, Guangzhou 510280, Guangdong Province, China. drhuangzh@yahoo.com.cn
Received: 2006-03-12 Accepted: 2006-05-08

Abstract

AIM: To investigate the killing effect of lentivirus-mediated double suicide genes under the regulation of kinase domain-containing receptor (KDR) promoter targeted on colorectal carcinoma cells.

METHODS: 293FT packaging cells were transfected by the constructed plasmids pLenti6/V5-D-KDR-CDglyTK and pLenti6/V5-D-GFP. After blasticidin selection and cell cloning, the infectious viruses were generated. Then SW620 (with KDR expression) and LS174T cells (without KDR expression) were transfected with the obtained viruses by lipofectamin 2000. The transfection efficacy was evaluated by the fluorecence microscopy. The expression of CDglyTK was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). After treatment with 5-FC and GCV, the killing effects and bystander effect of CD/TK suicide genes on the two kinds of cell lines were assessed.

RESULTS: The transfection efficacy was not significantly different between SW620 and LS174T cells, and elevated with the increase of virus titer. RT-PCR demonstrated that CDglyTK was expressed only in SW620 cells infected by pLenti6/V5-D-KDR-CDglyTK but not in LS147T cells. For the transfected SW620 cells, the survival rate was 32.34% ± 2.42% or 30.56% ± 2.14% when GCV (100 mg/L) or 5-FC (2.0 g/L) was used alone, respectively, and it was 5.36% ± 1.55% when GCV and 5-FC were used in combination. For the transfected LS174T cells, the survival rate was 95.48% ± 1.70% when GCV and 5-FC were used in combination. SW620 cells had a higher sensitivity to the prodrugs than LS174T cells did ($P < 0.001$), and the effects of double suicide genes were markedly stranger than that of either single gene ($P < 0.001$). Considerable bystander effect was also observed. When the infected cells covered a percentage of 40%, the survival rate of SW620 cells was 11.42% ± 2.66%, while that of LS174T cells was 99.54% ± 2.61% after treatment with GCV and 5-FC. There was significant difference between the two kinds of cells ($P < 0.001$).

CONCLUSION: Lentivirus-mediated CD/TK suicide genes driven by KDR promoter have specific killing effect on colorectal carcinoma cells with KDR expression.

Key Words: Colorectal carcinoma; Kinase domain-containing receptor promoter; Suicide gene; Lentivirus

Chen HJ, Huang ZH, Su GQ, Wu AG, Yu JL. Targeted killing effect of lentivirus-mediated CD/TK suicide genes on colorectal carcinoma cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(17):1681-1687

摘要

目的: 研究慢病毒介导的KDR启动子驱动CD/TK双自杀基因系统对大肠肿瘤细胞选择性杀伤作用.

方法: 构建的重组质粒pLenti6/V5-D-KDR-

■背景资料

理想的病毒载体能同时提供高效的基因转移, 长期稳定的基因表达及生物安全性. 近来, 一些研究者把目光投向了以I型人类免疫缺损病毒(HIV-1)为代表的慢病毒. 研究表明, 以HIV-1为基础构建的这类慢病毒载体具有可感染非分裂细胞,目的基因整合至靶细胞基因组长期表达, 免疫反应小等优点, 适于体内基因治疗, 因此有望成为理想的基因转移载体. 自Folkman提出肿瘤的生长具有血管形成依赖以来, 对实体瘤的血管形成及其相关微循环的研究及抗肿瘤血管生成已成为当今肿瘤研究的热点之一, 以肿瘤血管为靶点, 采用各种途径抑制肿瘤血管的形成, 切断肿瘤的供养, 即能有效抑制肿瘤生长和转移, 因此, 以KDR启动子, 慢病毒介导的双自杀基因疗法可能为基因治疗大肠肿瘤提供一个新的思路.

■研发前沿
目前已证实, KDR在肿瘤血管及肿瘤组织细胞中均高表达, 且正常组织表达甚微或不表达. 基于此, 构建以KDR为启动子调控的CD-TK双自杀基因重组慢病毒载体, 一方面通过KDR为启动子介导双自杀基因选择性杀伤肿瘤细胞及肿瘤血管内皮细胞, 并减少内皮细胞表达KDR. 另一方面通过选择性杀伤肿瘤细胞, 抑制肿瘤细胞分裂增殖, 减少VEGF的分泌. 通过二者的协同作用达到抑制肿瘤原发灶生长, 阻断VEGF和KDR的结合, 抑制由VEGF引起的KDR的磷酸化及其后的信号传导通路, 从而抑制肿瘤血管生成, 削减肿瘤发生远处转移.

CDglyTK及阳性对照质粒pLenti6/V5-D-GFP在lipofectamine 2000介导下转染293FT细胞, 包装扩增后获得病毒颗粒, 体外感染表达KDR的SW620细胞株和不表达KDR的LS174T细胞株, 荧光显微镜下计数确定阳性对照质粒的感染效率并以RT-PCR方法检测转基因细胞CDglyTK的表达, 然后给予不同浓度的前药5-FC及GCV处理, 观察该体系对不同细胞株的杀伤效应及其旁观者效应.

结果: 重组体对各细胞株的感染率相似, 其感染率随慢病毒滴度的增高而递增. RT-PCR方法检测发现: 除LS174T细胞外, SW620细胞有目的基因CDglyTK的表达. 对于转基因的SW620细胞, 单用GCV(100 mg/L)时, 其存活率为32.34%±2.42%. 单用5-FC(2.0 g/L)时, 存活率为30.56%±2.14%. 而联合应用两者时, SW620细胞存活率为5.36%±1.55%, LS174T细胞存活率为95.48%±1.70%. SW620细胞对前药具有较高的敏感性, SW620与LS174T细胞株对前药敏感性有显著性差异(P<0.001), 双自杀基因的疗效优于任一单自杀基因的疗效(P<0.001). 当转基因细胞比率为40%时, 加入前药GCV和5-FC, SW620细胞存活率为11.42%±2.66%, 而LS174T细胞存活率为99.54%±2.61%, 二者比较差异有显著性意义(P<0.001), 该体系旁观者效应明显.

结论: 慢病毒作为载体有较高的转染效率, KDR基因启动子可调控双自杀基因系统选择性杀伤表达KDR的大肠肿瘤细胞.

关键词: 大肠癌; KDR启动子; 自杀基因; 慢病毒

陈海金, 黄宗海, 苏国强, 吴爱国, 俞金龙. 慢病毒介导的双自杀基因对大肠癌细胞的靶向杀伤作用. 世界华人消化杂志 2006;14(17):1681–1687
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1681.asp

0 引言

自杀基因治疗是肿瘤基因治疗中一个重要的研究策略[1-3]. 但基因转移的低效率是这一疗法广泛开展的主要障碍. 实验研究中大多使用逆转录病毒载体和腺病毒载体进行基因转染治疗. 逆转录病毒载体虽可使目的基因整合至靶细胞基因组实现稳定表达, 但只能转导分裂期细胞, 不能转导非分裂期细胞. 腺病毒载体虽能转导分裂期细胞和静止期细胞, 转导效率也较高, 但目的基因不整合至靶细胞基因组, 仅能短暂表达, 而且腺病毒蛋白可引起人体免疫反应及炎症反应. 慢病毒载体可感染非分裂细胞, 目的基因整合至靶细胞基因组长期表达, 转染效率很高, 从而提供长期、稳定的目的基因表达, 并且生物安全性很高, 有望成为理想的基因转移载体[4]. 血管内皮细胞生长因子受体(kinase insert domain-containing receptor, KDR)既表达于肿瘤新生血管内皮细胞, 又表达于恶性程度高的肿瘤细胞. 这为以肿瘤细胞及滋养血管为治疗靶点的基因治疗提供了研究基础. 如果将KDR启动子引入该体系驱动基因治疗则既可避免该方案的副作用, 又可放大其治疗效应. 本研究即探讨慢病毒介导的以KDR为启动子的CD/TK双自杀基因系统对大肠肿瘤细胞的选择性杀伤效应, 为其进一步体内应用提供依据.

1 材料和方法

1.1 材料 ViraPower™ Bsd Lentiviral Support Kit, pLenti6/V5-Directional TOPO® Cloning Kit, 293FT Cell Line (Invitrogen). 质粒pLenti6/V5-D-GFP珠江医院普通外科构建. pMKD-K(大连宝生物公司). pcDNA3, JM109细菌(南方医科大学细胞生物教研室). 各种核酸内切酶, T_4连接酶, Taq DNA聚合酶(New England Biolabs). 大肠癌SW620细胞引自美国ATCC全球生物资源中心, 大肠癌细胞株LS174T来源于中科院上海细胞库. DMEM, 小牛血清及Trizol Reagent试剂盒为Gibco公司产品. GCV为Roche Pharma (Switzerland)公司产品, 5-FC购自Sigma公司. KDR启动子, CD及TK基因引物合成以及DNA测序由上海申友生物技术有限公司完成.

1.2 方法

1.2.1 PCR扩增KDR启动子序列 根据GenBank X89776中KDR启动子序列设计引物(包括KDR启动子最小核心序列-226至+268), 另根据pLenti6/V5-D-TOPO质粒引物设计的要求, 在KDR启动子起始密码子ATG前加上4个碱基CACC, 并在5'端和3'端分别加*Bgl*Ⅱ和*Hin*dⅢ酶切位点. 引物上游序列为: 5'-GGAAGATCTCACCATGAGTTGCTCAGCGCCCGTTAC-3', 下游序列为: 5'-CCCAAGCTTGGCGAAATGCCCAGAACTCG-3'. 抽提正常人外周血基因组DNA为模板, 以TacDNA聚合酶扩增出KDR启动子片段, PCR反应参数为: 94℃变性5 min后30个循环, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 59 s, 最后一循环再72℃ 10 min, 4℃ 2 h. 并将其与T载体连接, 构成pMD-18KDR质粒.

1.2.2 pcDNA3-CDglyTK的构建 根据GenBank S56903中*E.coli* CD的序列, 设计CD引物, 以JM109细菌基因组为模板, 扩增CD片段, 使扩增出的CD基因起始密码子改为ATG, 终止密码子TGA改为编码甘氨酸的GGA, 并在5'端和3'端分别加以*Hin*dⅢ和*Bam*HⅠ酶切位点. CD上下游引物分别为: 5'-GGGAAGCTTAGGCTAGCAATGTCGAATAACGCT-3'与5'-GGGGGATCCTCCACGTTTGTAATCGATGGCTTC-3'. 将GenBank V00470中TK序列与pREP8-TK中的HSV-TK序列核对无误, 以pREP8-TK为模板, 应用Oligo6.0软件设计引物, 使TK基因5'端加上8个编码甘氨酸的密码子和*Bam*HⅠ酶切位点, 3'端加上*Xba*Ⅰ酶切位点, 此TK引物为: 5'-GGGGGATCCGGCGGGGGCGGTGGAGGAGGGGGTATGGCTTCGTAC-3'及5'-GGGTCTAGATTAGTTAGCCTCCCCCATCTC-3'. 将所扩增的CD及TK片段亚克隆入pcDNA3载体构建成质粒pcDNA3-CDglyTK.

1.2.3 pLenti6/V5-D-KDR-CDglyTK的构建 自质粒pMD-18KDR中*Bgl*Ⅱ和*Hin*dⅢ双酶切出KDR片段, 经与相同酶切的pcDNA3-CDglyTK连接构成pcDNA3-KDR-CDglyTK, 转化DH5α感受态筛选鉴定正确后, 抽提质粒, 分别以*Bgl*Ⅱ, *Pvu*Ⅱ单酶切取出3.3 kb的KDR-CDglyTK-PA片段, 将目的基因片段与pLenti6/V5-D-TOPO载体按照pLenti6/V5-D-TOPO克隆试剂盒的说明书要求, 取2 μL PCR产物, 1 μL载体(尽量保证PCR产物与载体的摩尔比为0.5∶1-2∶1), 2 μL无菌水, 1 μL盐(1.2 mol/L NaCl+0.06 mol/L $MgCl_2$), 共计6 μL, 混合并室温温育5 min, 使PCR产物和载体连接, 然后转化至Stb13™感受态大肠杆菌, 将转化菌在含氨苄青霉素的LB培养皿中克隆后, 挑单菌落扩增, 取菌液行PCR鉴定.

1.2.4 重组慢病毒液的制备 制备转染液(溶液A: 分别将含3 μg pLenti6/V5-D-KDR-CDglyTK和pLenti6/V5-D-GFP的重组体质粒和9 μg ViraPower™ Packaging Mix溶于1.5 mL无血清的Opti-MEMI培养基中. 溶液B: 将Lipofectamine™ 2000 36 μL稀释于1.5 mL无血清的Opti-MEMI培养基中). 混匀A、B溶液, 室温孵育20 min, 让DNA-脂质体复合物形成. 将DNA-脂质体复合物加入10 cm组织培养皿中(含5 mL Opti-MEMI生长培养基和血清). 将5 mL 293FT细胞悬液(共6×10^6个细胞)加入含Opti-MEMI培养基和DNA-脂质体复合物的培养皿内, 细胞置于CO_2孵箱内, 37℃孵育过夜后用含1 mmol/L丙酮酸钠的DMEM完全培养基置换. 转染后48-72 h去除培养基, 将含病毒的上清液移入15 mL无菌锥形管中, 4℃ 3000 r/min离心15 min, 将悬液分装后, -80℃保存备用. SW620细胞经2.5 mL/L胰酶消化并计数, 将适量细胞平铺于6孔板, 24 h后细胞达30%-50%汇合, 加入不同稀释度(10^{-2}到10^{-6})的病毒上清1 mL, 每孔内加入polybrene达到终浓度为6 μg/L. 转染后2 d加入2 mL RPMI 1640完全培养基. 24 h后换含适量杀稻瘟菌素(blasticidin)的选择培养液, 经10-12 d, 筛选获得的blasticidin抗性集落, 通过计数不同稀释度病毒上清液感染SW620细胞所产生的blasticidin抗性集落形成单位, 确定病毒滴度(1×10^5 TU/L). 采用PCR方法, 以病毒基因组DNA为模板, 应用CD基因的上游引物和TK基因的下游引物扩增CDglyTK融合基因. 以KDR启动子的上下游引物进行PCR反应, 鉴定KDR启动子.

1.2.5重组慢病毒对SW620, LS174T的感染 SW620及LS174T以含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养. 取对数生长期的上述细胞, 以2×10^5个细胞数接种于6孔培养板, 待细胞丰度达约90%, 加入不同感染复数(multiplicity of infection, MOI)的质粒为pLenti6/V5-D-GFP重组慢病毒, 加少许培养基振荡2-3 h后, 补足培养基继续在37℃, 50 mL/L CO_2孵箱内培养, 12-14 h后在荧光显微镜下计数GFP阳性细胞百分比. 按照Trizol Reagent试剂盒说明提取转基因细胞总RNA, 逆转录合成cDNA, 利用CDglyTK的上下游引物进行PCR反应, 电泳鉴定其产物. 将SW620, LS174T以1×10^4个细胞/孔接种于96孔培养板中, 次日丰度达90%后用40 MOI的重组慢病毒感染之, 培养24 h后弃去培养液, 分别加入以50 mL/L血清培养基稀释的不同浓度的前药GCV和5-FC, 设GCV组、5-FC组、GCV+5-FC组、阴性对照及空白对照组, 加药72 h后, 以MTT法检测细胞生长抑制率. 分别取对数生长期的转基因和未转基因的细胞, 以不同比例进行混合, 以1×10^4个细胞/孔接种于96孔培养板中, 24-48 h后不同组别分别加入GCV和5-FC(GCV浓度为100 mg/L, 5-FC浓度为2.0 g/L). 72 h以后MTT法检测细胞存活率.

统计学处理 应用SPSS 10.0软件进行数据处理, 采用配对计量资料*t*检验及单向方差分析(组间多重比较应用LSD法).

■创新盘点

本实验将目的慢病毒感染表达KDR的肿瘤细胞株SW620和不表达KDR的LS174T, 并分别给以不同浓度的前药5-FC和GCV, 结果发现感染重组慢病毒的细胞株SW620随前药浓度的增加其生存率递减, 而LS174T细胞生存率则几乎不受影响. 这充分表明KDR基因启动子调控的自杀基因体系的细胞特异性.

■应用要点
在对慢病毒载体不断改进的研究前提下，提高慢病毒的生物安全性，慢病毒载体高效长期表达目的自杀基因，不失为肿瘤自杀基因治疗提供一个新途径.

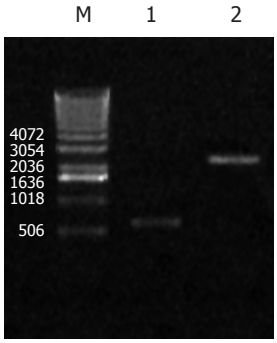


图 1 PCR鉴定重组腺病毒. 1: 580 bp KDR启动子片段; 2: 2.4 kb CDglyTK片段; M: 1 kb DNA Ladder (Gibco公司).

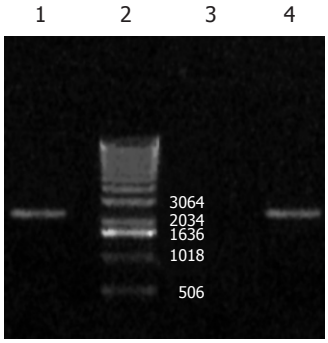


图 2 RT-PCR鉴定感染细胞CDglyTK的表达. 1: 293FT细胞; 2: 1 kb DNA Ladder (Gibco公司); 3: LS174T细胞; 4: SW620细胞.

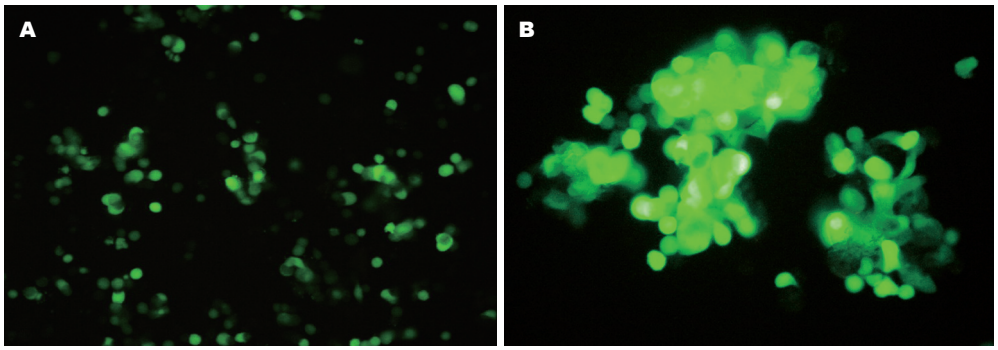


图 3 各种细胞感染重组慢病毒后表达绿色荧光蛋白(MOI = 10). A: SW620细胞; B: LS174T细胞.

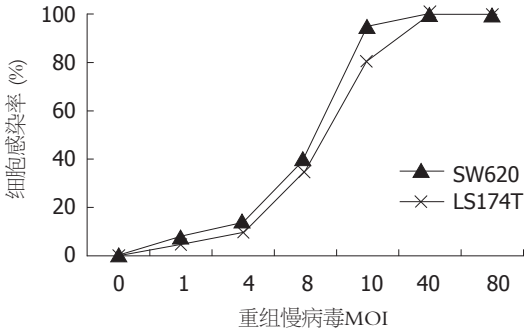


图 4 重组慢病毒对各细胞株的感染率.

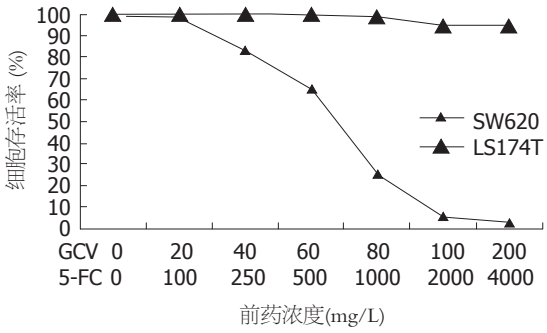


图 5 重组慢病毒对各细胞株的抑制效应.

2 结果

2.1 重组慢病毒的滴度测定及鉴定 转染重组慢病毒质粒的293FT细胞，培养10-12 d后收集细胞，PCR鉴定扩增出目的基因片段(图1). 重组慢病毒表达克隆的滴度为4.55×10^5 TU/ L .

2.2 重组慢病毒的感染效率及转基因细胞CDglyTK基因表达产物的鉴定 以质粒pLenti6/V5-D-GFP为对照质粒，用Lipofectamine™ 2000转染293FT细胞后获得病毒上清，采用不同MOI的重组慢病毒分别感染SW620，LS174T细胞，48 h后观察结果. 细胞的感染率随腺病毒滴度的增加而递增，当MOI = 1时，仅少数细胞有荧光. 当MOI = 10时，LS174T 80%表达，余细胞均有95%以上的GFP表达. MOI =40时，几乎所有的细胞均被感染，且各种细胞具有相似的感染效率(图3, 4). 通过RT-PCR检测发现，除LS174T细胞外，感染pLenti6/V5-D-KDR-CDglyTK的SW620细胞检测到目的基因的表达(图2).

2.3 重组慢病毒对细胞的体外抑制效应 对于转基因的SW620细胞，单用GCV(100 mg/L)时，其存活率为32.34%±2.42%. 单用5-FC(2.0 g/L)时，存活率为30.56%±2.14%. 而联合应用两者时，SW620细胞存活率为5.36%±1.55%，LS174T细胞存活率仍有95.48%±1.70%. SW620细胞对前药具有较高的敏感性，SW620与LS174T细胞株对前药敏感性有显著性差异(P<0.001)，双自杀基因的疗效优于任一单自杀基因的疗效(P<0.001)(图5, 6).

2.4 重组慢病毒对细胞杀伤的旁观者效应 当转基因细胞的比率为40%时, SW620细胞存活率为11.42%±2.66%, 而LS174T细胞存活率为99.54%±2.61%, 二者比较差异有显著性意义(P<0.001)(图7).

3 讨论

肿瘤的自杀基因治疗已成为其基因治疗中研究热点之一, 但目的基因的靶向性及基因转移的低效率是这一疗法广泛开展的主要障碍. 实验研究中大多使用逆转录病毒载体和腺病毒载体进行基因转染治疗, 与其他几种常用的病毒载体相比较, 逆转录病毒载体病毒滴度低, 只能感染分裂期细胞[5], 容纳外源基因的DNA片段长度不超过8 kb. 而腺病毒载体感染细胞时, 病毒DNA游离在细胞核内, 并不整合到染色体上, 在体内不能实现稳定的长期表达, 且反复应用容易引起免疫反应, 因而在应用上这两种病毒载体都受到一定的限制[6]. 慢病毒载体最大的特点是可以感染分裂期及非分裂期细胞, 容纳外源性目的基因的片段大, 可以在体内长期地表达, 免疫反应小, 安全性较好[7], 可在更多范围的宿主细胞内生成高滴度的病毒. 已成为当前基因治疗中载体研究的热点. 人们已成功地应用慢病毒载体转染了肝细胞[8-13], 造血干细胞[14-16], 中央神经系统[17-20]以及慢病毒介导的转基因动物[21-24].

Gusella *et al*[25]已经成功将携带标记基因的慢病毒载体转导到BALB/C小鼠肾脏细胞. Follenzi *et al*[26]应用改良的慢病毒载体可有效地转导大鼠肝脏实质及非实质细胞、脾脏和骨髓细胞, 并可稳定表达标记基因. 同时, 如能使自杀基因选择性地作用于目的肿瘤细胞而不在正常细胞中表达, 将能使该治疗策略更加完善. 既往研究利用肿瘤特异性基因调控元件调控自杀基因表达, 如以erbB-2, α-人乳白蛋白(hALA)启动子驱动自杀基因进行乳腺癌基因治疗, 甲胎蛋白(AFP)基因启动子用于肝癌自杀基因疗法, 癌胚抗原(CEA)基因启动子用于肠道肿瘤自杀基因疗法等. 上述治疗方案中, 每一特异启动子仅能进行针对某一类型肿瘤的靶向肿瘤细胞的基因治疗, 而绝大多数恶性实体瘤的生物学特性为生长迅速, 致使其滋养血管不能及时供应所有肿瘤细胞, 该特点使前体药物难以接近所有肿瘤细胞. 选择一合适启动子既靶向肿瘤血管内皮细胞, 又靶向肿瘤细胞, 如此既可杀伤肿瘤细胞, 又可靶向破坏肿瘤滋养血管使得其灌流区大量肿瘤细胞缺血性坏死, 这样即高效放大了自杀基因的疗效. 大量研究证明, KDR在正常人体组织中呈低水平表达, 而在绝大多数肿瘤中呈现高表达, 且KDR不仅表达于血管内皮细胞, 还表达于肿瘤细胞, 其表达水平与血管内皮细胞更新速度及肿瘤恶性程度呈正相关[27-28]. 故认为除旁分泌外, 还存在自分泌途径. 他不仅促进血管内皮细胞分裂、增殖, 且诱导肿瘤血管增生, 并促使其肿瘤细胞生长转移. 在肿瘤组织内KDR表达明显高于正常内皮细胞, 血管的发生对于肿瘤的生长和转移起着关键的作用. 因此, 将KDR作为靶点, 可为治疗和诊断肿瘤提供新的理论依据. Harada *et al*[29]报道KDR在胃癌、结肠、直肠、卵巢、乳腺癌[30]等多数肿瘤组织中的表达明显增高, 并与其生物学行为相关, 并伴随肿瘤分级的上升而表达增强.

我们发现, 具有较高转移潜能的大肠癌细胞株SW620高表达KDR; 而低转移潜能的大肠癌细胞株LS174T不表达KDR. 为研究KDR启动子驱动的自杀基因体系特异性的杀伤作用, 我们将目的慢病毒感染肿瘤细胞株SW620和不表达KDR的LS174T, 并分别给以不同浓度的前药5-FC和GCV, 结果发现感染重组慢病毒的细胞

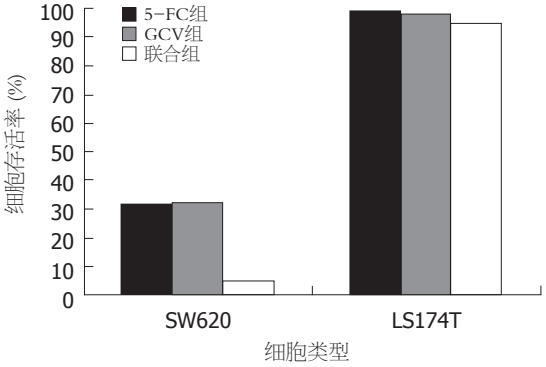


图 6 前药对各细胞株的杀伤作用.

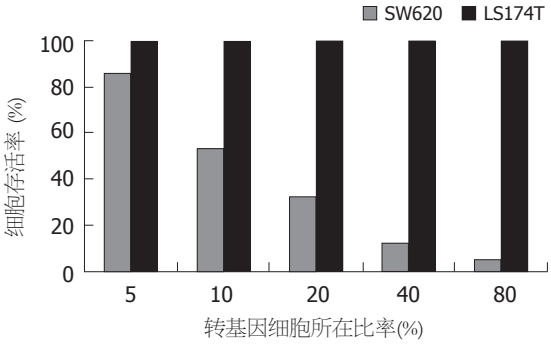


图 7 重组慢病毒对各细胞株的旁观者效应.

■名词解释

自杀基因: 又称化疗敏感基因, 化疗药物前体活化基因, 是存在于细菌或真菌中的一类基因, 哺乳动物体内往往缺乏. 自杀基因通过编码特异的酶, 将一些低毒或无毒的前体化疗药物转化为具有毒性的代谢产物而发挥抗肿瘤作用.

■同行评价
本研究构建以KDR为启动子的CD/TK双自杀基因系统的慢病毒颗粒, 研究其介导的对大肠肿瘤细胞的选择性杀伤效应, 具有一定新颖性.

株SW620随前药浓度的增加其生存率递减, 而不表达KDR的LS174T细胞生存率则几乎不受影响. 这充分表明KDR基因启动子调控的自杀基因体系的细胞特异性. 自杀基因的治疗体系也存在不足, 如单自杀基因存在细胞及组织特异性和治疗的耐药性. 但该治疗体系却具有巨大的应用潜力, 因为自杀基因的旁观者效应与基因联合治疗的优势放大了自杀基因治疗的效果, 并克服了单自杀基因治疗的不足. 本研究发现, 相同浓度的两种前药优于任一单药的疗效, 大肠肿瘤细胞株SW620可见巨大的旁观者效应.

总之, 慢病毒介导的双自杀基因治疗体系转染效率较高, 对肿瘤细胞具有较为满意的杀伤作用, KDR启动子的引入优化了该体系的疗效, 使其选择性的作用于目的肿瘤细胞, 而对正常组织无毒副作用, 为该体系进一步研究及临床应用奠定了基础.

4 参考文献

1 DeFatta RJ, Li Y, De Benedetti A. Selective killing of cancer cells based on translational control of a suicide gene. *Cancer Gene Ther* 2002; 9: 573-578

2 Binley K, Askham Z, Martin L, Spearman H, Day D, Kingsman S, Naylor S. Hypoxia-mediated tumour targeting. *Gene Ther* 2003; 10: 540-549

3 Gilles SI, Romain S, Casellas P, Ouafik L, Fina F, Combes T, Vuaroquaux V, Seitz JF, Bonnier P, Galiegue S, Carayon P, Martin PM. Mutation analysis in the coding sequence of thymidine kinase 1 in breast and colorectal cancer. *Int J Biol Markers* 2003; 18: 1-6

4 杨文宇, 黄宗海. 自杀基因治疗恶性肿瘤的载体效率及基因表达. 世界华人消化杂志 2004; 12: 194-198

5 Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* 2002; 2: 243-247

6 李振宇, 徐开林, 潘秀英. 慢病毒载体构建及结构优化. 国外医学(分子生物学分册) 2002; 24: 310-313

7 Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney DL, Ihrig MM, McManus MT, Gertler FB, Scott ML, Van Parijs L. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* 2003; 33: 401-406

8 Follenzi A, Battaglia M, Lombardo A, Annoni A, Roncarolo MG, Naldini L. Targeting lentiviral vector expression to hepatocytes limits transgene-specific immune response and establishes long-term expression of human antihemophilic factor IX in mice. *Blood* 2004; 103: 3700-3709

9 Nguyen TH, Oberholzer J, Birraux J, Majno P, Morel P, Trono D. Highly efficient lentiviral vector-mediated transduction of nondividing, fully reimplantable primary hepatocytes. *Mol Ther* 2002; 6: 199-209

10 Kang Y, Stein CS, Heth JA, Sinn PL, Penisten AK, Staber PD, Ratliff KL, Shen H, Barker CK, Martins I, Sharkey CM, Sanders DA, McCray PB Jr, Davidson BL. *In vivo* gene transfer using a nonprimate lentiviral vector pseudotyped with Ross River Virus glycoproteins. *J Virol* 2002; 76: 9378-9388

11 VandenDriessche T, Thorrez L, Naldini L, Follenzi A, Moons L, Berneman Z, Collen D, Chuah MK. Lentiviral vectors containing the human immunodeficiency virus type-1 central polypurine tract can efficiently transduce nondividing hepatocytes and antigen-presenting cells *in vivo*. *Blood* 2002; 100: 813-822

12 Park F, Ohashi K, Kay MA. The effect of age on hepatic gene transfer with self-inactivating lentiviral vectors *in vivo*. *Mol Ther* 2003; 8: 314-323

13 Ohashi K, Park F, Kay MA. Role of hepatocyte direct hyperplasia in lentivirus-mediated liver transduction *in vivo*. *Hum Gene Ther* 2002; 13: 653-663

14 Moreau-Gaudry F, Xia P, Jiang G, Perelman NP, Bauer G, Ellis J, Surinya KH, Mavilio F, Shen CK, Malik P. High-level erythroid-specific gene expression in primary human and murine hematopoietic cells with self-inactivating lentiviral vectors. *Blood* 2001; 98: 2664-2672

15 Hanazono Y, Terao K, Ozawa K. Gene transfer into nonhuman primate hematopoietic stem cells: implications for gene therapy. *Stem Cells* 2001; 19: 12-23

16 Horn PA, Morris JC, Bukovsky AA, Andrews RG, Naldini L, Kurre P, Kiem HP. Lentivirus-mediated gene transfer into hematopoietic repopulating cells in baboons. *Gene Ther* 2002; 9: 1464-1471

17 Azzouz M, Ralph GS, Storkebaum E, Walmsley LE, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Carmeliet P, Mazarakis ND. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature* 2004; 429: 413-417

18 Lo Bianco C, Ridet JL, Schneider BL, Deglon N, Aebischer P. alpha -Synucleinopathy and selective dopaminergic neuron loss in a rat lentiviral-based model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 10813-10818

19 Regulier E, Trottier Y, Perrin V, Aebischer P, Deglon N. Early and reversible neuropathology induced by tetracycline-regulated lentiviral overexpression of mutant huntingtin in rat striatum. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 2827-2836

20 de Almeida LP, Ross CA, Zala D, Aebischer P, Deglon N. Lentiviral-mediated delivery of mutant huntingtin in the striatum of rats induces a selective neuropathology modulated by polyglutamine repeat size, huntingtin expression levels, and protein length. *J Neurosci* 2002; 22: 3473-3483

21 Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* 2002; 295: 868-872

22 Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y, Verma IM. Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 2140-2145

23 Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, Weppert M, Vogg B, Ludwig H, Stojkovic M, Boelhauve M, Brem G, Wolf E, Pfeifer A. Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *EMBO Rep* 2003;

4: 1054-1060
24 Hofmann A, Zakhartchenko V, Weppert M, Sebald H, Wenigerkind H, Brem G, Wolf E, Pfeifer A. Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. *Biol Reprod* 2004; 71: 405-409
25 Gusella GL, Fedorova E, Hanss B, Marras D, Klotman ME, Klotman PE. Lentiviral gene transduction of kidney. *Hum Gene Ther* 2002; 13: 407-414
26 Follenzi A, Sabatino G, Lombardo A, Boccaccio C, Naldini L. Efficient gene delivery and targeted expression to hepatocytes *in vivo* by improved lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 2002; 13: 243-260
27 Beierle EA, Dai W, Langham MR Jr, Copeland EM 3rd, Chen MK. Expression of VEGF receptors in cocultured neuroblastoma cells. *J Surg Res* 2004; 119: 56-65
28 Qi L, Robinson WA, Brady BM, Glode LM. Migration and invasion of human prostate cancer cells is related to expression of VEGF and its receptors. *Anticancer Res* 2003; 23: 3917-3922
29 Harada Y, Ogata Y, Shirouzu K. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor KDR (kinase domain-containing receptor)/Flk-1 (fetal liver kinase-1) as prognostic factors in human colorectal cancer. *Int J Clin Oncol* 2001; 6: 221-228
30 Ryden L, Linderholm B, Nielsen NH, Emdin S, Jonsson PE, Landberg G. Tumor specific VEGF-A and VEGFR2/KDR protein are co-expressed in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 82: 147-154

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第六届全国消化道恶性病变介入治疗研讨会第二轮通知

本刊讯 第六届全国消化道恶性病变介入治疗研讨会于2006-09-15/18在浙江省杭州市举行. 本届会议由上海同仁医院和浙江省中医院联合主办, 中华放射学杂志、中华消化内镜杂志、世界华人消化杂志和介入放射学杂志共同协办. 会议将邀请众多著名专家围绕消化疾病介入诊治新热点及消化道内支架治疗的热门技术和疑难问题进行专题演讲和实例操作, 并就消化道支架治疗中的疑难病例和出现问题以沙龙形式深入研讨. 参会代表可获国家级继续教育Ⅰ类学分12分.

1 会议主要议题

消化疾病诊治进展、消化内镜治疗新技术应用、化疗药物应用新进展、上消化道吻合口梗阻和瘘的综合治疗、胸腔胃穿瘘的支架封堵技术、肠道支架临床应用、肝门部胆道梗阻的内支架治疗、食管及胃肠道支架难点研讨以及其他介入新技术应用等.

2 征文内容

征集消化道恶性病变内镜治疗、介入放射治疗、外科治疗、肿瘤化学治疗、生物治疗及免疫治疗等方面的论著、文献综述、临床经验、个案报告等稿件. 欢迎消化、介入放射、肿瘤、普外胸外及、肝胆外科等相关学科医师投稿参会.

3 投稿要求

专题讲座由组委会约稿. 论著需1000字以内的标准论文摘要, 包括目的、方法、结果与结论四要素. 经验交流、短篇报道等全文限1000字以内. 所有稿件一律要求电脑打印用E-mail投稿, 邮寄者需附WORD格式软盘(请自留稿底, 恕不退稿).

4 报名地址及要求

联系地址: 杭州市邮电路54号(浙江省中医院)吕宾 收, 邮编: 310006, 电话: 0571-87032028, 手机: 13906515409, E-mail: lvin@medmail.com.cn; 上海市愚园路786号(上海同仁医院)茅爱武 收, 邮编: 200050, 电话: 021-62524259-3397, 手机: 13371936559, E-mail: maoaw@sohu.com. 会议收费800元, 提前注册收费700元, 截稿日期: 2006-08-15.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年6月18日; 14(17): 1688-1692
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

大鼠急性胰腺炎早期肺损伤机制及前列腺素E_1的保护作用

尹 勇, 李兆丽

■背景资料
急性肺损伤是重症胰腺炎早期的严重并发症, 文献报道95%的重症胰腺炎早期死亡病例存在肺水肿和肺淤血的表现, 在发病7 d内的死亡病例中有60%与急性肺损伤关系密切, 可见防治急性肺损伤对于降低重症胰腺炎早期死亡率至关重要. 研究发现, 大量中性粒细胞聚集于肺组织是急性肺损伤早期的基本病理改变, 也是导致急性肺损伤的重要因素.

尹勇, 苏州大学附属第三医院普外科 江苏省常州市 213003
李兆丽, 苏州大学附属第三医院病理科 江苏省常州市 213003
尹勇, 2004年中山大学附属第一医院博士研究生毕业, 主治医师, 主要从事胃肠胰疾病的研究.
通讯作者: 尹勇, 213003, 江苏省常州市局前街185号, 苏州大学附属第三医院普外科. yinyong1973@163.com
电话: 0519-6180071
收稿日期: 2006-02-27 接受日期: 2006-05-08

Mechanism of lung injury and protective effect of prostaglandin E_1 in experimental acute pancreatitis

Yong Yin, Zhao-Li Li

Yong Yin, Department of General Surgery, the Third Affiliated Hospital of Suzhou University, Changzhou 213003, Jiangsu Province, China
Zhao-Li Li, Department of Pathology, the Third Affiliated Hospital of Suzhou University, Changzhou 213003, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Yong Yin, Department of General Surgery, the Third Affiliated Hospital of Suzhou University, 185 Juqian Street, Changzhou 213003, Jiangsu Province, China. yinyong1973@163.com
Received: 2006-02-27 Accepted: 2006-05-08

Abstract

AIM: To explore the mechanism of lung injury in experimental acute pancreatitis (AP) and the protective effect of prostaglandin E_1 (PGE_1).

METHODS: Seventy-eight rats were averagely and randomly divided into sham operation, AP, and PGE_1 group. AP model was induced by creating a closed duod enal loop in rats. The rats in PGE_1 group were intravenously injected with PGE_1 (60 ng/kg). The histopathological changes of pancreatic and pulmonary tissues were examined by microscopy. The serum level of amylase, the activity of myeloperoxidase (MPO), the pulmonary level of lipid peroxidation (LPO), and lung capillary permeability (LCP) were measured. The expression of pulmonary intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) was determined by immunohistochemical technique (ABC).

RESULTS: In AP group, the progressive pathological damages in the pancreas and lung tissues were clearly observed. The activity of pulmonary MPO (12 h: 5.65 ± 0.80 *vs* 1.22 ± 0.71 kat/g, $P < 0.01$; 24 h: 7.22 ± 1.05 *vs* 1.48 ± 0.57 kat/g, $P < 0.01$), the level of LPO (12 h: 1.44 ± 0.63 *vs* 0.38 ± 0.07 μmol/g, $P < 0.01$; 24 h: 3.64 ± 0.83 *vs* 0.44 ± 0.15 μmol/g, $P < 0.01$) and LCP (12 h: 145.4 ± 23.0 *vs* 47.3 ± 5.5 μg/g wet weight, $P < 0.01$), as well as pulmonary ICAM-1 expression were markedly increased as compared with those in sham operation group. In comparison with those in AP group, the activity of MPO (12 h: 2.96 ± 1.04 *vs* 5.65 ± 0.80 kat/g, $P < 0.05$; 24 h: 3.68 ± 1.15 *vs* 7.22 ± 1.05 kat/g, $P < 0.05$) and the level of LPO (12 h: 0.86 ± 0.34 *vs* 1.44 ± 0.63 μmol/g, $P < 0.05$; 24 h: 1.69 ± 0.45 *vs* 3.64 ± 0.83 μmol/g, $P < 0.05$) in the lung tissues were significantly decreased, and the level of LCP (12 h: 105.9 ± 23.9 *vs* 145.4 ± 23.0 μg/g wet weight, $P < 0.05$), as well as pulmonary ICAM-1 expression was down-regulated (12 h: $P < 0.05$; 24 h: $P < 0.01$) in PGE_1 group. Pathological examination revealed that intra-alveolar hemorrhage, edema and polymorphonuclear leukocytes (PMN) infiltration in the lung tissues were attenuated after PGE_1 treatment, although pancreatic damages were not alleviated.

CONCLUSION: The over-expression of ICAM-1, PMN infiltration and the release of free oxygen radicals in lung tissues may be closely related to pancreatitis-associated lung injury. PGE_1 can ameliorate lung injury by reducing ICAM-1 expression and inhibiting PMN activation and the release of free oxygen radicals.

Key Words: Acute pancreatitis; Lung injury; Prostaglandin E_1; Intercellular adhesion molecule-1; Polymorphonuclear leukocytes; Free oxygen radicals

Yin Y, Li ZL. Mechanism of lung injury and protective effect of prostaglandin E_1 in experimental acute pancreatitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(17):1688-1692

摘要

目的: 探讨实验性急性胰腺炎(acute

pancreatitis, AP)合并肺损伤的发生机制及前列腺素E_1 (PGE_1)的保护作用.

方法: 健康成年SD大鼠78只, 随机平均分为假手术组(SO组)、AP组和PGE_1组, 采用十二指肠闭袢法建立大鼠AP模型. PGE_1组制模后即刻经颈静脉持续每分钟输入PGE_1 60 ng/kg. 观察胰腺和肺组织的病理组织学改变, 测定血清淀粉酶、肺组织中性粒细胞髓过氧化物酶(MPO)活性、脂质过氧化产物(LPO)水平及肺毛细血管通透性(LCP), 免疫组织化学ABC法检测肺组织细胞黏附分子-1(ICAM-1)的表达.

结果: 制模后12和24 h, AP组大鼠胰腺和肺组织病理损伤持续加重, 肺组织MPO (12 h: 5.65±0.80 *vs* 1.22±0.71 kat/g, P<0.01; 24 h: 7.22±1.05 *vs* 1.48±0.57 kat/g, P<0.01)和LPO (12 h: 1.44±0.63 *vs* 0.38±0.07 μmol/g, P<0.01; 24 h: 3.64±0.83 *vs* 0.44±0.15 μmol/g, P<0.01)水平以及LCP (12 h: 145.4±23.0 *vs* 47.3±5.5 μg/g组织湿重, P<0.01)明显高于SO组, AP组大鼠肺组织ICAM-1表达呈阳性或强阳性, 而SO组呈阴性; 与AP组比较, PGE_1组的胰腺病理损伤虽未减轻, 但肺组织MPO (12 h: 2.96±1.04 *vs* 5.65±0.80 kat/g, P<0.05; 24 h: 3.68±1.15 *vs* 7.22±1.05 kat/g, P<0.05)和LPO (12 h: 0.86±0.34 *vs* 1.44±0.63 μmol/g, P<0.05; 24 h: 1.69±0.45 *vs* 3.64±0.83 μmol/g, P<0.05)水平以及LCP (12 h: 105.9±23.9 *vs* 145.4±23.0 μg/g组织湿重, P<0.05)明显降低, ICAM-1表达下调. 肺间质出血、水肿和中性粒细胞(PMN)浸润明显减轻.

结论: 肺组织ICAM-1过度表达、PMN浸润和氧自由基大量释放与AP早期肺损伤的发生关系密切. PGE_1通过降低肺组织ICAM-1表达, 抑制PMN活化和氧自由基释放, 从而减轻AP早期肺损伤.

关键词: 急性胰腺炎; 肺损伤; 前列腺素E_1; 细胞间黏附分子–1; 中性粒细胞; 氧自由基

尹勇, 李兆丽. 大鼠急性胰腺炎早期肺损伤机制及前列腺素E_1的保护作用. 世界华人消化杂志 2006;14(17):1688–1692
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1688.asp

0 引言

急性肺损伤是重症胰腺炎早期主要合并症之一, 在发病1 wk内死亡的病例中有60%归因于急性肺损伤[1], 目前治疗尚无良策. 前列腺素E_1(PGE_1)是一种活性较强的二十碳烯酸代谢产物, 研究发现, PGE_1对急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)早期肺损伤具有防治作用[2], 我们旨在探究AP早期肺损伤的发生机制, 并观察PGE_1的治疗作用.

■创新盘点
本实验研究显示, 肺组织ICAM-1过度表达、中性粒细胞浸润和氧自由基大量释放与AP早期肺损伤的发生关系密切. PGE_1能够降低肺组织ICAM-1表达, 抑制中性粒细胞活化和氧自由基释放, 减轻AP早期肺损伤. 这一结果为临床防治重症胰腺炎早期肺损伤提供了理论依据.

1 材料和方法

1.1 *材料* PGE_1针剂为重庆药友制药有限公司产品; 戊巴比妥钠, Serva进口分装; 伊文思蓝, Fluka进口分装; 髓过氧化物酶(MPO)、脂质过氧化产物(LPO)丙二醛检测试剂盒由南京建成生物工程研究所提供, 小鼠抗大鼠细胞间黏附分子-1(ICAM-1)mAb、SABC免疫组化检测试剂盒及DAB显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司. 健康成年Sprague-Dawley大鼠78只, 雄雌不拘, 体质量180-250 g.

1.2 *方法* 大鼠随机分为假手术组(SO组)、AP组和PGE_1组, 每组各26只. 参照Nevalainen *et al*[3]的十二指肠闭袢法制备大鼠AP模型, 术前禁食24 h, 自由饮水, 30 g/L戊巴比妥钠(30 mg/kg) ip麻醉, 颈静脉插管成功后经皮下隧道引至背部与微量输液泵连接, 消毒腹部皮肤, 正中切口入腹, 胃窦部切开将长3 cm内径0.4 cm无菌塑料软管插入十二指肠, 结扎十二指肠形成闭袢, 袢长2 cm, 缝合胃窦部切口及腹壁. SO组仅作胃窦切开术. PGE_1组制模后即刻经颈静脉持续每分钟输入PGE_1 60 ng/kg, SO组和AP组给予等量生理盐水. 术后12, 24 h每组各取10只大鼠采血用碘比色法测定血清淀粉酶(AMY), 处死大鼠迅速取胰腺和肺组织固定于40 g/L甲醛溶液中, 包埋制片, 采用盲法由病理医师在光镜下观察胰腺和肺组织的病理改变和肺组织ICAM-1蛋白的表达, 另取数块肺组织-70℃保存待测. (1)取肺组织约100 mg, 制备肺组织匀浆, 超声粉碎亚细胞成分, 然后按照MPO检测试剂盒说明书进行操作. (2)肺组织LPO含量的测定采用硫代巴比妥酸法, 按照试剂盒说明书进行操作, 考马斯亮兰法测定组织蛋白含量. (3)肺组织石蜡切片ICAM-1表达采用辣根过氧化物酶标记链霉卵白素(ABC)免疫组织化学法, 一抗工作浓度为1∶50, 以PBS液代替一抗孵育作为阴性对照. 判断标准: 根据细胞染色的深浅和分布进行半定量分析. 无染色-0分, 淡黄色-1分, 棕黄色-2分, 深棕黄色-3分; 视野中显色细胞所占的比例<20%: 0分, 20%-40%: 1分, 40%-60%: 2分, >60%: 3分, 取10个视野的平均值. 将两项评分的乘积作为积分数, 根据积分将ICAM-1表达分为4级: 0分: 阴性, 1-3分: 弱阳性, 4-6分: 阳性, >6

■同行评价
本研究立题依据充分, 实验动物选择标准, 模型建立和实验操作规范, 结论可靠, 文章简洁、论点明确, 条理性强, 组织学图谱清晰漂亮.

表 1 AP大鼠血清AMY和肺组织MPO, LPO水平的改变(mean ± SD, n = 10)

组别	AMY (kat/L)		MPO (kat/g)		MDA (μmol/g)	
	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h
SO组	3079 ± 624	3105 ± 620	1.22 ± 0.71	1.48 ± 0.57	0.38 ± 0.07	0.44 ± 0.15
AP组	21 869 ± 2193[a]	23 627 ± 1805[a]	5.65 ± 0.80[a]	7.22 ± 1.05[a]	1.44 ± 0.63[a]	3.64 ± 0.83[a]
PGE_1组	21 442 ± 2239[a]	23 643 ± 1708[a]	2.96 ± 1.04[ac]	3.68 ± 1.15[bc]	0.86 ± 0.34[ac]	1.69 ± 0.45[ac]

[a]P<0.01, [b]P<0.05 *vs* SO组; [c]P<0.05 *vs* AP组.

分: 强阳性. (4)肺脏毛细血管通透性(LCP)的测定. 每组各取6只大鼠, 于术后12 h经尾静脉穿刺注入20 g/L伊文思蓝(20 mg/kg), 15 min后脱颈处死动物, 迅速剖胸, 由右心室匀速注入生理盐水10 mL冲洗血管内染料, 取出肺脏, 将肺表面水分吸尽后称取湿质量, 浸入甲酰胺4 mL中, 37℃放置24 h, 提取组织中染料, 过滤, 染液620 nm处读取吸光度(A值), 通过标准曲线计算提取出的染料量, 以单位组织中染料提取量反映肺脏毛细血管通透性. 伊文思蓝标准曲线的建立方法: 分别取1 g/L伊文思蓝标准品0, 5, 15, 20, 30, 40 μL, 加入甲酰胺4 mL中, 620 nm比色, 数据进行线性回归分析, 回归方程为: $A = 0.011x - 0.001$ ($r = 0.99$).

统计学处理 用SPSS 10.0软件进行统计学分析, 组间比较采用t检验, ICAM-1表达的积分数比较采用秩和检验.

2 结果

2.1 血清AMY和肺组织MPO, LPO水平 术后12, 24 h AP组和PGE_1组大鼠AMY水平均显著高于SO组(P<0.01, 表1), 而PGE_1组与AP组比较差异无显著性. 术后12 h AP组和PGE_1组肺组织MPO, LPO水平均显著高于SO组(P<0.01, 表1), 至术后24 h, 两组MPO, LPO水平继续升高; 而PGE_1组两时间点MPO, LPO水平明显低于AP组(P<0.05, 表1).

2.2 胰和肺病理组织学改变 SO组胰腺和肺脏组织结构清晰, 无异常改变. AP组术后12 h胰腺组织间质水肿, 可见红细胞漏出, 血管扩张充血, 腺泡间隔增宽, 部分腺泡组织坏死伴PMN浸润, 24 h腺泡坏死范围扩大, 间质出血、PMN浸润更加明显. AP组术后12 h肺间质毛细血管扩张、充血, 肺泡壁塌陷, 肺泡隔PMN浸润明显, 部分肺泡腔有红细胞漏出, 24 h肺组织出血明显加重, 肺泡腔内可见淡红色液体渗出(肺水肿).

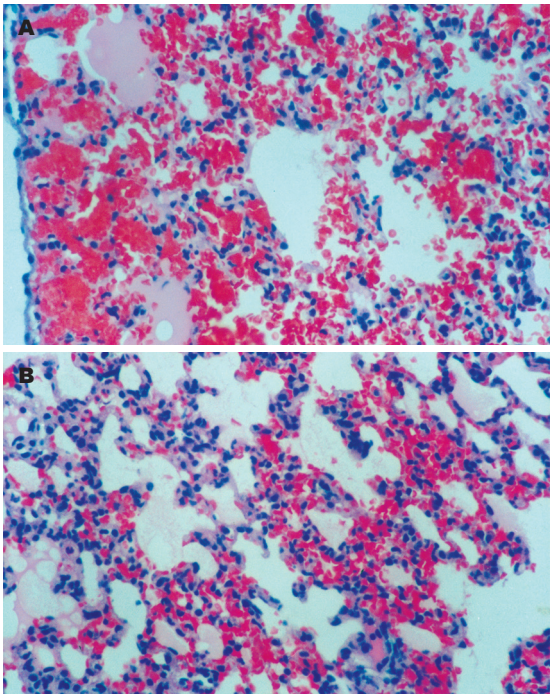


图 1 AP大鼠24 h肺组织损伤的病理改变(HE × 200). A: AP组; B: PGE_1组.

PGE_1组胰腺的病理损伤与AP组无明显差异, 但两时间点肺脏间质充血、出血、水肿和PMN浸润均较AP组明显减轻(图1).

2.3 肺组织ICAM-1表达 SO组肺泡上皮细胞和肺泡隔血管内皮细胞表面均无染色, ICAM-1的表达为阴性. AP组术后12 h肺泡隔血管内皮细胞表面出现淡黄色或棕黄色颗粒, 部分肺泡Ⅰ, Ⅱ型上皮细胞表面也可见淡黄色颗粒, ICAM-1表达为阳性; 24 h肺泡隔血管内皮细胞和肺泡上皮细胞表面出现深棕黄色颗粒, ICAM-1表达呈现强阳性. PGE_1组12, 24 h肺组织ICAM-1表达的分布与AP组基本一致, 但其表达强度的积分数明显低于AP组(12 h: P<0.05; 24 h: P<0.01)(图2).

2.4 肺LCP改变 术后12 h SO组大鼠LCP值为47.3±5.5 μg/g组织湿质量, AP组和PGE_1组的LCP值分别为145.4±23.0 μg/g和105.9±

23.9 μg/g, 均显著高于SO组(P<0.01), 而PGE_1组LCP值与AP组相比明显降低(P<0.05).

3 讨论

急性胰腺炎(AP)是临床常见的消化系急症, 尤其重症胰腺炎发病急骤、凶险, 死亡率高达40%[1]. AP早期易并发急性肺损伤, 其病理特点与急性呼吸窘迫综合征(ARDS)十分相似, 表现为肺泡毛细血管壁通透性增高, 肺泡内皮细胞和肺间质损伤, 肺水肿及中性粒细胞(PMN)聚集. 文献报道95%的重症胰腺炎早期死亡病例存在肺水肿和肺淤血的表现, 发病1 wk内的死亡病例中有60%与急性肺损伤关系密切[1,4], 可见防治急性肺损伤是降低重症胰腺炎早期死亡率的重要措施. 目前对于AP合并肺损伤的发生机制尚未完全阐明, 但研究发现, 大量PMN过度激活并聚集于肺组织是急性肺损伤早期的基本病理改变, 也是导致急性肺损伤的关键因素[5-12]. 过度激活的PMN跨内皮细胞迁移、浸润, 直接释放弹性蛋白酶、促炎细胞因子和氧自由基等大量细胞毒性物质, 使肺内皮细胞损伤、变性, 血管通透性增加, 肺间质水肿, 氧交换障碍[4,13-17]; 另外, 聚集的PMN机械堵塞肺毛细血管致微循环障碍, 并可产生缩血管活性物质, 使肺血管收缩, 产生肺动脉高压, 导致通气/血流比例失调、低氧血症, 发生ARDS[18].

在PMN跨越内皮细胞屏障、聚集浸润于局部受损区域之前, 首先须完成与血管内皮细胞的黏附. 细胞黏附是一个复杂、多步骤的过程, 需要多种细胞表面黏附分子的参与. 其中, PMN表面的整合素CD11b/CD18β_2复合体与血管内皮细胞表面的细胞间黏附分子-1(ICAM-1)以受体-配体的形式相结合是细胞黏附过程中的关键环节. 实验研究发现, AP鼠的胰腺、肺脏及血清中ICAM-1水平均明显升高, 胰腺、肺脏有大量PMN浸润, 而敲除ICAM-1基因或应用抗ICAM-1抗体后AP鼠胰腺、肺脏中PMN积聚数目明显减少, 微血管通透性降低, 组织损伤也明显减轻[14,19-22]. 临床研究也发现, AP早期患者血浆可溶性ICAM-1水平高于正常对照组, 且与胰腺坏死性组织损伤程度密切相关[23-24]. 本实验结果显示, AP组大鼠术后12 h肺组织出现明显的肺泡壁塌陷、充血、出血和PMN浸润等病理改变, 至24 h肺组织损伤程度更为严重. 同时发现, 术后12 h肺泡隔血管内皮细胞和部分肺泡上皮细胞表面即可见ICAM-1表达, 术后24 h肺组织ICAM-1表达强度和范围进一步增大, 肺组织MPO和LPO水平明显高于对照组. 以上结果进一步表明, AP早期肺损伤与肺组织ICAM-1高表达和大量PMN浸润密切相关. 因此, 早期阻断或抑制细胞黏附分子的表达, 降低PMN的黏附能力, 减少活化PMN的迁移和各种炎症介质的释放, 可能成为防治AP早期急性肺损伤的有效手段.

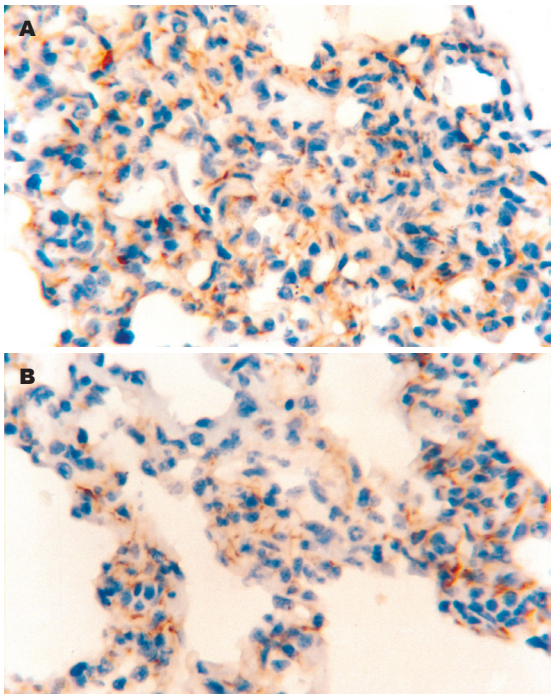


图 2 AP大鼠24 h肺组织ICAM-1的表达(ABC × 400). A: AP组(强阳性); B: PGE_1组(阳性).

PGE_1是一种活性较强的二十碳烯酸代谢产物, 他具有扩张血管, 改善组织血供, 抑制血小板聚集等作用. 此外, PGE_1通过扩张血管, 增加血流速度, 机械性阻止血液中PMN在微血管内皮细胞表面的滚动、紧密黏附及穿越过程, 从而抑制PMN活化和毒性介质的释放, 并诱导具有保护效应因子的生成[2,25-26]. 但在AP时, PGE_1对各种细胞黏附分子的表达有无直接影响目前并不十分清楚. 本研究结果显示, 术后12和24 h, PGE_1组大鼠肺组织中ICAM-1表达较AP组明显减低, MPO活性和LPO水平明显下降. 术后12 h, PGE_1组肺毛细血管通透性明显低于AP组. PGE_1组大鼠胰腺的病理损伤虽无改善, 但肺组织出血、水肿和PMN浸润等病理改变明显减轻. 我们认为, PGE_1可下调大鼠肺脏ICAM-1的表达, 降低PMN的黏附和聚集, 从而减少氧自由基及脂质过氧化产物的释放, 对肺泡上皮细胞和肺

泡隔血管内皮细胞起到一定的保护作用. PGE_1的抗黏附作用为AP合并肺损伤的治疗提供了一条新的思路.

4 参考文献

1 Renner IG, Savage WT 3rd, Pantoja JL, Renner VJ. Death due to acute pancreatitis. A retrospective analysis of 405 autopsy cases. *Dig Dis Sci* 1985; 30: 1005-1018

2 Yamanaka K, Saluja AK, Brown GE, Yamaguchi Y, Hofbauer B, Steer ML. Protective effects of prostaglandin E1 on acute lung injury of caerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Am J Physiol* 1997; 272: G23-30

3 Nevalainen TJ, Seppa A. Acute pancreatitis caused by closed duodenal loop in the rat. *Scand J Gastroenterol* 1975; 10: 521-527

4 Werner J, Z'graggen K, Fernandez-del Castillo C, Lewandrowski KB, Compton CC, Warshaw AL. Specific therapy for local and systemic complications of acute pancreatitis with monoclonal antibodies against ICAM-1. *Ann Surg* 1999; 229: 834-840; discussion 841-842

5 Banerjee AK, Haggie SJ, Jones RB, Basran GS. Respiratory failure in acute pancreatitis. *Postgrad Med J* 1995; 71: 327-330

6 Willemer S, Feddersen CO, Karges W, Adler G. Lung injury in acute experimental pancreatitis in rats. I. Morphological studies. *Int J Pancreatol* 1991; 8: 305-321

7 Donnelly SC, Haslett C. Cellular mechanisms of acute lung injury: implications for future treatment in the adult respiratory distress syndrome. *Thorax* 1992; 47: 260-263

8 Wittel UA, Rau B, Gansauge F, Gansauge S, Nussler AK, Beger HG, Poch B. Influence of PMN leukocyte-mediated pancreatic damage on the systemic immune response in severe acute pancreatitis in rats. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1348-1357

9 Hartwig W, Werner J, Warshaw AL, Antoniu B, Castillo CF, Gebhard MM, Uhl W, Buchler MW. Membrane-bound ICAM-1 is upregulated by trypsin and contributes to leukocyte migration in acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G1194-1199

10 Kyriakides C, Jasleen J, Wang Y, Moore FD Jr, Ashley SW, Hechtman HB. Neutrophils, not complement, mediate the mortality of experimental hemorrhagic pancreatitis. *Pancreas* 2001; 22: 40-46

11 Liu XM, Xu J, Wang ZF. Pathogenesis of acute lung injury in rats with severe acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 614-617

12 Liu XM, Liu QG, Xu J, Pan CE. Microcirculation disturbance affects rats with acute severe pancreatitis following lung injury. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6208-6211

13 Wang X, Sun Z, Borjesson A, Andersson R. Inhibition of platelet-activating factor, intercellular adhesion molecule 1 and platelet endothelial cell adhesion molecule 1 reduces experimental pancreatitis-associated gut endothelial barrier dysfunction. *Br J Surg* 1999; 86: 411-416

14 Frossard JL, Saluja A, Bhagat L, Lee HS, Bhatia M, Hofbauer B, Steer ML. The role of intercellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Gastroenterology* 1999; 116: 694-701

15 Lundberg AH, Granger N, Russell J, Callicutt S, Gaber LW, Kotb M, Sabek O, Gaber AO. Temporal correlation of tumor necrosis factor-alpha release, upregulation of pulmonary ICAM-1 and VCAM-1, neutrophil sequestration, and lung injury in diet-induced pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 2000; 4: 248-257

16 Frossard JL, Hadengue A, Spahr L, Morel P, Pastor CM. Natural history of long-term lung injury in mouse experimental pancreatitis. *Crit Care Med* 2002; 30: 1541-1546

17 Steer ML. Relationship between pancreatitis and lung diseases. *Respir Physiol* 2001; 128: 13-16

18 Bhatia M, Brady M, Shokuhi S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol* 2000; 190: 117-125

19 Lundberg AH, Fukatsu K, Gaber L, Callicutt S, Kotb M, Wilcox H, Kudsk K, Gaber AO. Blocking pulmonary ICAM-1 expression ameliorates lung injury in established diet-induced pancreatitis. *Ann Surg* 2001; 233: 213-220

20 Zaninovic V, Gukovskaya AS, Gukovsky I, Mouria M, Pandol SJ. Cerulein upregulates ICAM-1 in pancreatic acinar cells, which mediates neutrophil adhesion to these cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G666-676

21 Foitzik T, Eibl G, Buhr HJ. Therapy for microcirculatory disorders in severe acute pancreatitis: comparison of delayed therapy with ICAM-1 antibodies and a specific endothelin A receptor antagonist. *J Gastrointest Surg* 2000; 4: 240-246; discussion 247

22 Zhao X, Dib M, Wang X, Widegren B, Andersson R. Influence of mast cells on the expression of adhesion molecules on circulating and migrating leukocytes in acute pancreatitis-associated lung injury. *Lung* 2005; 183: 253-264

23 Kaufmann P, Demel U, Tilz GP, Krejs GJ. Time course of plasma soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) is related to severity of acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 2565-2571

24 Nakae H, Endo S, Sato N, Wakabayashi G, Inada K, Sato S. Involvement of soluble adhesion molecules in acute pancreatitis. *Eur Surg Res* 2001; 33: 377-382

25 de Perrot M, Fischer S, Liu M, Jin R, Bai XH, Waddell TK, Keshavjee S. Prostaglandin E1 protects lung transplants from ischemia-reperfusion injury: a shift from pro- to anti-inflammatory cytokines. *Transplantation* 2001; 72: 1505-1512

26 Matsuo K, Togo S, Sekido H, Morita T, Kamiyama M, Morioka D, Kubota T, Miura Y, Tanaka K, Ishikawa T, Ichikawa Y, Endo I, Goto H, Nitanda H, Okazaki Y, Hayashizaki Y, Shimada H. Pharmacologic preconditioning effects: prostaglandin E1 induces heat-shock proteins immediately after ischemia/reperfusion of the mouse liver. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 758-768

电编 张敏 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年6月18日; 14(17): 1693-1698
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床研究 CLINICAL RESEARCH

拉米夫定体外对慢性乙型肝炎患者树突状细胞功能的影响

张冬云, 郑鹏远, 张晓琴, 刘光辉, 娄惠萍, 唐芙爱, 白经修, 祁元明

张冬云, 郑鹏远, 张晓琴, 刘光辉, 娄惠萍, 唐芙爱, 白经修, 祁元明, 郑州大学第二附属医院消化内科 河南省郑州市 450052
张冬云, 1999年河南医科大学临床医学学士, 2003年郑州大学医学院硕士, 主要从事慢乙肝的基础研究.
河南省医学科技创新人才工程基金资助项目, No. 2004-45
通讯作者: 郑鹏远, 450014, 河南省郑州市经八路2号, 郑州大学第二附属医院消化内科. medp7123@yahoo.com
电话: 0371-65261035
收稿日期: 2006-04-01 接受日期: 2006-04-20

In vitro effects of lamivudine on function of dendritic cells derived from patients with chronic hepatitis B infection

Dong-Yun Zhang, Peng-Yuan Zheng, Xiao-Qin Zhang, Guang-Hui Liu, Hui-Ping Lou, Fu-Ai Tang, Jing-Xiu Bai, Yuan-Ming Qi

Dong-Yun Zhang, Peng-Yuan Zheng, Xiao-Qin Zhang, Guang-Hui Liu, Hui-Ping Lou, Fu-Ai Tang, Jing-Xiu Bai, Yuan-Ming Qi, Department of Digestive Disease, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China
Supported by the Medical Science and Technology Innovation Talent Project of Henan Province, No. 2004-45
Correspondence to: Dr. Peng-Yuan Zheng, The Department of Digestive Disease, The Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 450014, 2 JingBa Rd, Zhengzhou, China. medp7123@yahoo.com
Received: 2006-04-01 Accepted: 2006-04-20

Abstract

AIM: To investigate the effects of lamivudine on the function of dendritic cells derived from patients with chronic hepatitis B (CHB) *in vitro*.

METHODS: Dentritic cells (DCs) derived from the monocytes of CHB patients were cultured with interleukin-4 (IL-4) plus granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). Three days after being cultured, the cells were divided group A and B. Group A was treated with different concentrations of lamivudine (0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 mmol/L), while group B served as the control. Cell morphology was observed under light microscope and cell surface molecules including HLA-DR, CD80, CD83, and CD1a were assayed by flow cytometry. The concentrations of IL-6 and IL-12 in the supernatant were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). T cell proliferation induced by DC was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT).

RESULTS: The cells treated with 0.5 mmol/L lamivudine had the highest expression of CD1a, CD83 and HLA-DR, and the expression of CD80 was not significantly different between the cells with and without lamivudine treatment. After treatment with 0.5 mmol/L lamivudine, the expression of CD1a, CD83 and HLA-DR were significantly higher than those of DCs without lamivudine treatment (CD1a: 54.0 ± 9.2 *vs* 33.6 ± 10.1, $P < 0.05$; CD83: 20.3 ± 6.1 *vs* 11.8 ± 6.2, $P < 0.05$; HLA-DR: 74.5 ± 7.1 *vs* 52.9 ± 7.7, $P < 0.05$); the secretion of IL-12 was significantly increased in comparison with that of the control group (810.0 ± 91.5 ng/L *vs* 268.0 ± 34.3 ng/L, $P < 0.05$), while the level of IL-6 was lowered markedly (28.1 ± 2.6 ng/L *vs* 55.3 ± 7.4 ng/L, $P < 0.05$); the stimulatory capacity of DCs in the allogeneic mixed leukocyte reaction was markedly enhanced as compared with that of the control group (stimulatory index: 1.9 ± 0.6 *vs* 1.2 ± 0.5, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Pulsed with lamivudine in certain concentration, the biological activity of DCs derived from CHB patients can be efficiently enhanced.

Key Words: Chronic hepatitis B; Dendritic cells; Antigen presentation; Lamivudine

Zhang DY, Zheng PY, Zhang XQ, Liu GH, Lou HP, Tang FA, Bai JX, Qi YM. *In vitro* effects of lamivudine on function of dendritic cells derived from patients with chronic hepatitis B infection. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(17):1693-1698

摘要

目的: 体外研究不同浓度拉米夫定(lamivudine, LAM)对慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者树突状细胞(dendritic cell, DC)功能影响.

■背景资料
DC是功能最强的抗原提呈细胞, 能激活初始化T细胞, 诱发T细胞免疫应答. CHB体内DC功能低下, 不能充分提呈抗原给T细胞, 使T细胞活化. 如何增强DC的抗原提呈功能是CHB治疗中需解决的关键性问题. LAM为一口服核苷类药物. 在细胞内经磷酸化后, 与dCTP竞争进入病毒合成中的DNA链, 终止病毒DNA的复制. 国外研究发现LAM在抗病毒同时能提高DC表面HLA-DR的表达, 国内尚未见相关文献报道.

■**创新盘点**
本实验首次以不同浓度LAM与CHB的DC共孵育，通过一系列指标检测来观察LAM对CHB的DC生物学特性的影响，为临床上LAM与DC疫苗相结合治疗慢乙肝寻找理论依据.

方法: 分离慢乙肝患者外周血单核细胞, 在含GM-CSF+IL-4及不同浓度LAM (0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 mmol/L)培养条件下制备DC. 观察DC形态学变化并用MTT法测定DC刺激同种异体淋巴细胞增殖能力, 流式细胞仪(FCM)测定其细胞表型分子CD1a, CD83, CD80及HLA-DR的表达, ELISA法检测培养上清中IL-12和IL-6含量.

结果: 在LAM 0.5 mmol/L组, DC表型分子CD83, CD1a, HLA-DR的表达最高, CD80与LAM未处理组相比无明显差异. 与LAM未处理组相比, LAM 0.5 mmol/L处理组DC膜表面分子CD1a, CD83, HLA-DR表达增高(CD1a: 54.0±9.2 *vs* 33.6±10.1, $P<0.05$; CD83: 20.3±6.1 *vs* 11.8±6.2, $P<0.05$; HLA-DR: 74.5±7.1 *vs* 52.9±7.7, $P<0.05$); 其上清液中IL-12分泌水平增高(810.0±91.5 ng/L *vs* 268.0±34.3 ng/L, $P<0.05$), IL-6则显著降低(28.1±2.6 ng/L *vs* 55.3±7.4 ng/L, $P<0.05$); 刺激同种异体淋巴细胞增殖能力(SI)增强(1.9±0.6 *vs* 1.2±0.5, $P<0.05$).

结论: LAM体外可增强慢乙肝患者树突状细胞活性.

关键词: 慢性乙型肝炎; 树突状细胞; 抗原提呈; 拉米夫定

张冬云, 郑鹏远, 张晓琴, 刘光辉, 娄惠萍, 唐芙爱, 白经修, 祁元明. 拉米夫定体外对慢性乙型肝炎患者树突状细胞功能的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(17):1693-1698
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1693.asp

0 引言

慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)造成免疫耐受的重要原因之一是患者自身树突状细胞(dendritic cell, DC)功能低下, 抗原提呈功能缺陷, 不能有效地把病毒抗原的信号传递给机体免疫系统[1-2]. DC是唯一能激活初始化T淋巴细胞的抗原提呈细胞(antigen-presenting cell, APC), 在抗病毒的细胞免疫治疗中起重要作用[3-4]. 如何加强DC的抗原提呈能力, 发挥其免疫功能已成为治疗CHB急需解决的问题之一. 拉米夫定(lamivudine, LAM)为一口服核苷类药物, 在细胞内经磷酸化后, 与脱氧胞嘧啶核苷(dCTP)竞争进入病毒合成中的DNA链, 终止病毒DNA的复制[5-7]. 国外研究发现LAM在抗病毒同时对DC也有一定作用[8-9]. 国内尚未见相关报道. 我们以不同浓度LAM与CHB的DC共孵育, 观察LAM对CHB的DC生物学特性的影响, 为临床上LAM与DC疫苗联合治疗CHB寻找理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 rhGM-CSF, rhIL-4, 抗人CD1a、CD80、CD83、HLA-DR均购自美国R&D公司; RPMI 1640培养基, 美国GIBCO公司; 胎牛血清, 杭州四季青公司; MTT购自美国Sigma公司; 淋巴细胞分离液, 天津市津脉基因测绘技术有限公司; IL-12, IL-6 ELISA试剂盒, 上海森雄科技有限公司; LAM购自葛兰素史克(苏州)制药有限公司. 按中华医学会传染病与寄生虫学分会、肝病学分会联合修订的《病毒性肝炎防治方案》(2000-09西安)为诊断标准, 从门诊选出HBeAg(+)慢性乙型病毒性肝炎患者15例, 同时设健康对照者15例.

1.2 方法 常规方法分离CHB外周血单核细胞, 悬浮后加入24孔板, 37℃, 50 mL/L CO_2孵箱温育2 h, 吸弃培养上清, 洗涤去除非贴壁细胞, 即获得贴壁细胞. 每孔加入含100 mL/L自体血清, GM-CSF 10 μg/L, IL-4 5 μg/L的RPMI 1640培养基1 mL, 于37℃, 50 mL/L CO_2孵箱培养[10], 并于第4天将DC分成2组: 一组加入LAM (0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 mmol/L)作为实验组即LAM处理组; 一组继续培养作为对照组即LAM未处理组. 各组均隔天半量换液. 第8天收集细胞行相关检测.

1.2.1 DC形态学及表型检测 倒置相差显微镜动态观察DC形态学变化并收集8 d的各组DC, 调细胞密度为1×10^8/L, 各取细胞悬液0.5 mL加入FCM测定管, 分别加入FITC标记的鼠抗人CD1a和鼠抗人CD83, PE标记的鼠抗人CD80和鼠抗人HLA-DR各2 μL, 轻轻摇匀2 s, 室温避光反应45 min, 生理盐水洗涤1次, PBS重悬细胞后上机检测DC表型分子CD1a, CD83, CD80及HLA-DR的表达.

1.2.2 混合淋巴细胞反应[11] 取健康者外周血, 分离出单核细胞, 37℃, 50 mL/L CO_2孵箱温育2 h后吸取未黏附细胞为淋巴细胞, 调密度为1×10^8/L; 收集培养第8天的各组DC并用丝裂霉素C (50 mg/L)孵育30 min, 调密度为1×10^7/L. 按DC与淋巴细胞比例为1∶10混合作为实验孔种植于96孔板, 200 μL/孔, DC组及T淋巴细胞组为对照孔, 设3复孔, 用MTT法在570 nm处测各孔A_{570}值, 并计算刺激指数(SI) = 实验组A值/(反应细胞对照组A值+刺激细胞对照组A值). 另按

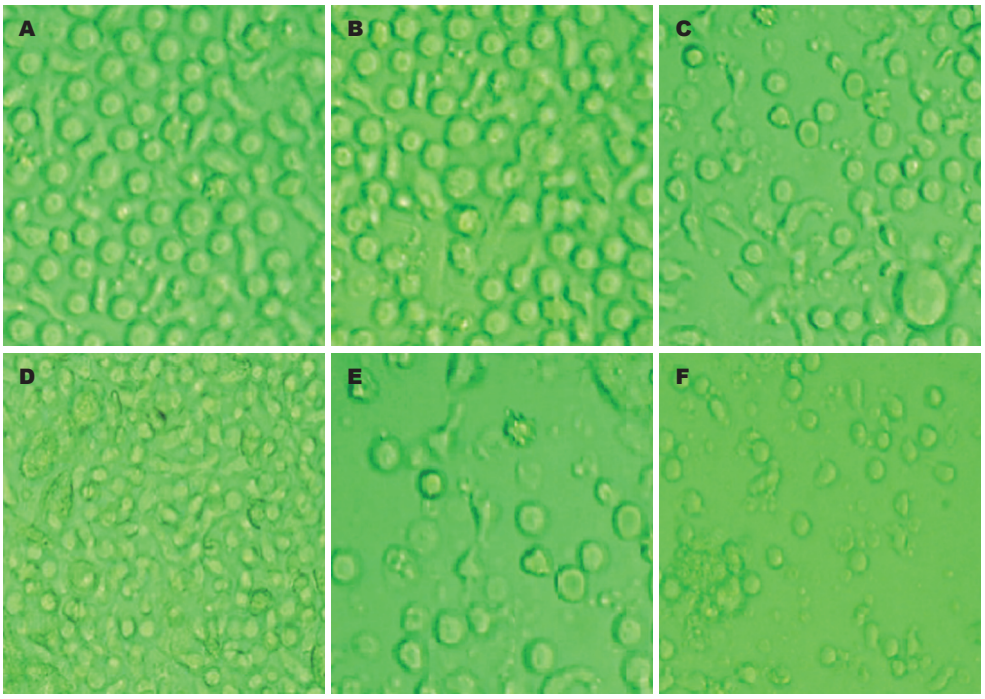


图 1 培养8 d树突状细胞形态(×400). A: LAM未处理组; B: DC+LAM 0.125 mmol/L; C: DC+LAM 0.25 mmol/L; D: DC+LAM 0.5 mmol/L; E: DC+LAM 1 mmol/L; F: DC+LAM 2 mmol/L.

■同行评价
本文题目确切, 结果明确, 对于3TC可能存在的对于DC的免疫调节作用有一定的阐释作用.

表 1 LAM处理后树突状细胞表型分子的表达 (mean ± SD, %)

	CD83	CD80	CD1a	HLA-DR
LAM 0 mmol/L (CHB) (A)	12.8 ± 2.1	35.8 ± 2.4	33.6 ± 3.1	52.8 ± 2.5
0.125 mmol/L	13.4 ± 2.2	37.7 ± 3.2	40.3 ± 2.1	53.7 ± 3.3
0.25 mmol/L	18.3 ± 3.2	41.1 ± 3.6	53.1 ± 2.8	67.8 ± 4.2
0.5 mmol/L (B)	20.2 ± 2.5[ae]	41.7 ± 4.2	54.1 ± 4.2[ae]	74.5 ± 5.2[ae]
1 mmol/L	12.8 ± 2.3	25.7 ± 3.1	16.6 ± 1.9	42.1 ± 3.9
2 mmol/L	11.9 ± 1.3	24.7 ± 2.6	16.5 ± 1.8	41.0 ± 3.5
0 mmol/L (健康人) (C)	61.4 ± 6.6[c]	49.3 ± 6.9	71.1 ± 6.7[c]	87.3 ± 6.5[c]

[a]$P<0.05$, [c]$P<0.05$ *vs* A组; [e]$P<0.05$ *vs* C组.

ELISA试剂盒说明书操作, 测定培养第8天各组DC上清中IL-12和IL-6含量.

统计学处理 用SPSS 10.0统计软件进行处理, 全部数据均采用mean±SD表示, 以$\alpha = 0.05$为检验性水准, $P<0.05$具有统计学意义.

2 结果

2.1 DC形态和表型 倒置显微镜下, 培养24 h后可见细胞呈集落生长, 2 d后细胞数目明显增多, 体积开始逐渐增大, 胞体拉长; 第5天观察部分细胞有多个短突起, 有的胞体四周细胞膜扩展成多方向长突起, 呈树枝状, 面纱状, 第7, 8天时可见培养液中漂浮着颜色较深、云雾状的大细胞或细胞团. LAM处理小剂量组(图1B)与LAM未处理组(图1A)相比, 变形细胞较少, 细胞数目变化不大. LAM处理大剂量组(图1F)于加药第2天镜下观察可发现培养液中出现大量颗粒状物质, 细胞数量减少, 考虑为受药物毒性作用所致裂解的细胞碎片(图1). 在DC+LAM 0.5 mmol/L组, DC表型分子CD83, CD1a, HLA-DR的表达最高, CD80与LAM未处理组相比无明显差异, 但其膜分子表达量与健康人DC相比仍有所降低; 而其他组别与LAM未处理组相比, 虽有差异但无统计学意义. 说明CHB的DC体外与LAM (0.5 mmol/L)共孵育后, 其递呈抗原及刺激T细胞增殖能力相对增强(表1).

2.2 淋巴细胞增殖能力 在DC+LAM 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 mmol/L组DC刺激同种异体T淋

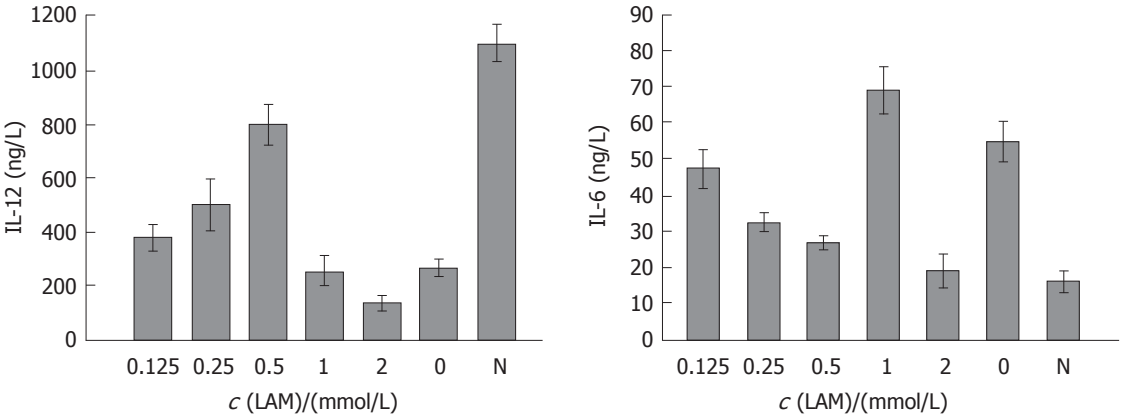


图 2 LAM处理的DC分泌IL-12, IL-6水平(mean ± SD).

巴细胞增殖能力分别为1.2±0.5, 1.3±0.6, 1.5±0.5, 1.9±0.6, 0.9±0.4, 0.6±0.3; **DC+LAM** 2 mmol/L组, 由于大量细胞裂解刺激淋巴细胞增殖能力减弱; 而DC+LAM 0.5 mmol/L组其刺激指数(SI)值与对照组相比有差异. 另经ELISA检测, 在LAM浓度依次为0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 mmol/L时, 与其共孵育的DC培养上清液中IL-12含量分别为268.1±34.3, 380.3±51.2, 500.4±89.4, 810.2±91.5, 255.1±73.1, 138.0±27.9 ng/L; IL-6含量依次为55.2±7.4, 47.1±5.2, 32.2±2.7, 28.4±2.6, 69.1±8.7, 67.3±8.4 ng/L; 健康人DC所分泌的IL-12, IL-6含量依次为1075.3±92.6, 21.2±6.7 ng/L(图2). 其中IL-12含量在DC+LAM 0.5 mmol/L组较高; IL-6含量在此浓度下较低, 与LAM未处理组及健康者DC分泌的IL-12, IL-6相比均有差异. DC+LAM 2 mmol/L组, 由于大量细胞裂解分泌IL-12, IL-6含量下降.

3 讨论

HBV转基因小鼠试验中证明, 在清除乙肝病毒过程中, 机体免疫及细胞因子发挥了重要作用[12]. 感染后首先启动一系列非特异性早期应答, 包括干扰素, NK细胞及枯否氏细胞的活化; 彻底清除病毒则有赖于HBV特异性T细胞[13-14]. HBV分泌的各种抗原可刺激机体产生多克隆的、HBV抗原特异性的CTL应答, 杀伤携带HBV的靶细胞. 若不能对病毒进行有效的清除, 则造成感染的慢性化, 诱导机体内HBV抗原特异性的CD8+T细胞大幅度下降, 导致机体内抗原特异性T细胞免疫耐受, 造成CHB的发生[15-16]. 机体内的APC, 尤其是DC是特异性免疫应答的关键细胞, 启动和介导特异性T细胞免疫应答[17]. HBV感染慢性化与被感染者机体免疫功能低下尤其与其体内DC低表达黏附分子, 递呈抗原及刺激T细胞增殖能力低下有关[18-19]. 选择性修饰DC, 有效激活机体抗HBV特异性免疫反应, 已成为CHB治疗中的一条重要途径[20-22]. Beckebaum *et al*[9]报道, LAM在抗HBV同时, 能提高DC表面HLA-DR表达. 在此基础上, 我们参考LAM的临床应用剂量, 用不同浓度的LAM与培养第4天的DC共孵育, 第8天收获各组细胞进行了检测, 观察LAM对CHB的DC生物学活性的影响.

DC摄取抗原并将其处理成具有免疫原性的多肽, 以MHC-抗原肽复合物的形式表达于其表面的同时, 其膜表面的协同刺激分子与T细胞表面相应配体结合, 进而激活抗原特异性T细胞, 促其活化增殖, 产生免疫应答[23-25]. 实验中分别检测了DC表面CD1a, CD83, HLA-DR及CD80的表达. CD1a是DC的特异性表面标志, CD1a阳性细胞数的多少可反映DC的数量; CD83为DC的成熟性标志; HLA-DR为MHC-Ⅱ类分子之一, 主要参与抗原提呈; CD80为DC表面的共刺激分子之一, 通过与淋巴细胞表面的共刺激分子受体(如CD28)相结合, 形成强烈的共刺激信号, 参与T细胞的活化[26-27]. 本实验结果表明, LAM (0.5 mmol/L)与DC共孵育后提高了DC表面CD1a, CD83, HLA-DR的表达. 其CD80的表达与LAM未处理组相比有所增高, 但统计学上无差异. 与健康者DC相比, 其膜分子表达量仍有所降低. 而适当浓度LAM (0.5 mmol/L)孵育的DC淋巴细胞增殖能力增强, 这初步提示淋巴细胞的活化增殖不是单纯依赖于传统的双信号机制, 可能有其他机制参与. DC通过分泌IL-6, IL-12, IFN-γ等来控制Th0细胞向Th1和Th2细胞分化[28]. IL-12为成熟DC所分泌, 调节Th0细胞向Th1细胞分化, 促进Th1细胞分泌IFN-γ, IL-2等刺激T细

胞活化增殖, 介导细胞免疫应答; IL-6主要由未成熟DC分泌, 主要促使Th0细胞向Th2细胞分化, 通过抑制Th1细胞的功能来抑制细胞免疫, 诱导免疫耐受[29-30]. 实验发现LAM可影响DC分泌IL-12, IL-6水平. 在DC+LAM 0.5 mmol/L组细胞培养上清液中IL-12分泌水平较高, IL-6分泌量较低. 故选择合适浓度LAM处理DC可促使T淋巴细胞增殖能力增强并向Th1分化, 增强其细胞免疫学活性. 实验结果表明, LAM可以提高CHB的DC表面分子CD1a, CD83, HLA-DR的表达, 提高DC分泌细胞因子IL-12水平, 降低IL-6分泌, 增强DC刺激淋巴细胞增殖能力. 表明LAM除了作为抗病毒药物外, 还可作为免疫调节剂, 一定程度上改善CHB的DC生物学活性. 这为临床上LAM与DC疫苗相结合进行慢性乙型肝炎的免疫治疗提供了理论依据.

4 参考文献

1 Hilleman MR. Critical overview and outlook: pathogenesis, prevention, and treatment of hepatitis and hepatocarcinoma caused by hepatitis B virus. *Vaccine* 2003; 21: 4626-4649

2 Bertoletti A, Gehring AJ. The immune response during hepatitis B virus infection. *J Gen Virol* 2006; 87: 1439-1449

3 Liu SR, Zhang Y, Xie Q, Li ZL, Yu ZY, Kong XP. Effect of HBsAg pulsed dendritic cells on the functions of cytokine-induced killer cells. *Xibao Yu Fenzi Mianyixue Zazhi* 2005; 21: 634-636

4 Huang Y, Chen Z, Jia H, Wu W, Zhong S, Zhou C. Induction of Tc1 response and enhanced cytotoxic T lymphocyte activity in mice by dendritic cells transduced with adenovirus expressing HBsAg. *Clin Immunol* 2006; 119: 280-290

5 Zhang HH, He Y, Zhao H, Piao WH, Liu MC, Xi HL, Yu M, Wang GQ. The effect of stimulation of dendritic cell on HBV-epitopic cytotoxic T-lymphocyte. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2005; 85: 1171-1176

6 Wang FS, Xing LH, Liu MX, Zhu CL, Liu HG, Wang HF, Lei ZY. Dysfunction of peripheral blood dendritic cells from patients with chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 537-541

7 Li HW, Wang HF, Wang FS, Jin B, Duan XZ. Clinical profiles of circulating dendritic cell phenotype and lymphocyte subsets in patients chronically infected with HBV during lamivudine treatment. *Zhonghua Shiyan He Linchuangbingduxue Zazhi* 2006; 20: 43-46

8 Feng B, Wei L, Chen M, Han FZ, Wang LP. Dynamic variations of hepatitis B virus polymerase gene in lamivudine-treated hepatitis B patients. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2006; 14: 327-330

9 Beckebaum S, Cicinnati VR, Zhang X, Ferencik S, Frilling A, Grosse-Wilde H, Broelsch CE, Gerken G. Hepatitis B virus-induced defect of monocyte-derived dendritic cells leads to impaired T helper type 1 response *in vitro*: mechanisms for viral immune escape. *Immunology* 2003; 109: 487-495

10 Duan XZ, Wang M, Li HW, Zhuang H, Xu D, Wang FS. Decreased frequency and function of circulating plasmocytoid dendritic cells (pDC) in hepatitis B virus infected humans. *J Clin Immunol* 2004; 24: 637-646

11 Kranz B, Vester U, Bonzel KE, Paul A, Gerken G, Hoyer PF. Antiviral treatment of chronic hepatitis B with lamivudine in pediatric renal transplantation. *Pediatr Transplant* 2006; 10: 384-389

12 Wolters LM, Niesters HG, de Man RA. Nucleoside analogues for chronic hepatitis B. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 1499-1506

13 Arima S, Akbar SM, Michitaka K, Horiike N, Nuriya H, Kohara M, Onji M. Impaired function of antigen-presenting dendritic cells in patients with chronic hepatitis B: localization of HBV DNA and HBV RNA in blood DC by in situ hybridization. *Int J Mol Med* 2003; 11: 169-174

14 Kurose K, Akbar SM, Yamamoto K, Onji M. Production of antibody to hepatitis B surface antigen (anti-HBs) by murine hepatitis B virus carriers: neonatal tolerance versus antigen presentation by dendritic cells. *Immunology* 1997; 92: 494-500

15 Akbar SM, Inaba K, Onji M. Upregulation of MHC class II antigen on dendritic cells from hepatitis B virus transgenic mice by interferon-gamma: abrogation of immune response defect to a T-cell-dependent antigen. *Immunology* 1996; 87: 519-527

16 Accapezzato D, Visco V, Francavilla V, Molette C, Donato T, Paroli M, Mondelli MU, Doria M, Torrisi MR, Barnaba V. Chloroquine enhances human CD8+ T cell responses against soluble antigens *in vivo*. *J Exp Med* 2005; 202: 817-828

17 Akbar SM, Horiike N, Onji M. Immune therapy including dendritic cell based therapy in chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2876-2883

18 Hasebe A, Akbar SM, Furukawa S, Horiike N, Onji M. Impaired functional capacities of liver dendritic cells from murine hepatitis B virus (HBV) carriers: relevance to low HBV-specific immune responses. *Clin Exp Immunol* 2005; 139: 35-42

19 Tavakoli S, Schwerin W, Rohwer A, Hoffmann S, Weyer S, Weth R, Meisel H, Diepolder H, Geissler M, Galle PR, Lohr HF, Bocher WO. Phenotype and function of monocyte derived dendritic cells in chronic hepatitis B virus infection. *J Gen Virol* 2004; 85: 2829-2836

20 Kolb-Maurer A, Brocker EB. The role of dendritic cells during infection. *J Dtsch Dermatol Ges* 2003; 1: 438-442

21 Duan XZ, Zhuang H, Wang M, Li HW, Liu JC, Wang FS. Decreased numbers and impaired function of circulating dendritic cell subsets in patients with chronic hepatitis B infection (R2). *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 234-242

22 Untergasser A, Zedler U, Langenkamp A, Hosel M, Quasdorff M, Esser K, Dienes HP, Tappertzhofen B, Kolanus W, Protzer U. Dendritic cells take up viral antigens but do not support the early steps of hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2006; 43: 539-547

23 Kunitani H, Shimizu Y, Murata H, Higuchi K, Watanabe A. Phenotypic analysis of circulating and intrahepatic dendritic cell subsets in patients with chronic liver diseases. *J Hepatol* 2002; 36: 734-741

24 Szabolcs P, Moore MA, Young JW. Expansion of immunostimulatory dendritic cells among the

myeloid progeny of human CD34+ bone marrow precursors cultured with c-kit ligand, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and TNF-alpha. *J Immunol* 1995; 154: 5851-5861
25 Rodriguez-Fernandez JL, Corbi AL. Adhesion molecules in human dendritic cells. *Curr Opin Investig Drugs* 2005; 6: 1103-1111
26 Rouard H, Leon A, Klonjkowski B, Marquet J, Tenneze L, Plonquet A, Agrawal SG, Abastado JP, Eloit M, Farcet JP, Delfau-Larue MH. Adenoviral transduction of human 'clinical grade' immature dendritic cells enhances costimulatory molecule expression and T-cell stimulatory capacity. *J Immunol Methods* 2000; 241: 69-81
27 Seager Danciger J, Lutz M, Hama S, Cruz D, Castrillo A, Lazaro J, Phillips R, Premack B, Berliner J. Method for large scale isolation, culture and cryopreservation of human monocytes suitable for chemotaxis, cellular adhesion assays, macrophage and dendritic cell differentiation. *J Immunol Methods* 2004; 288: 123-134
28 Foti M, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cell interactions and cytokine production. *Ernst Schering Res Found Workshop* 2006; 61-80
29 Reis E Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 476-483
30 Talmor M, Mirza A, Turley S, Mellman I, Hoffman LA, Steinman RM. Generation or large numbers of immature and mature dendritic cells from rat bone marrow cultures. *Eur J Immunol* 1998; 28: 811-817

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

全国胃黏膜癌前病变与癌前疾病诊治研讨会

本刊讯 全国胃黏膜癌前病变与癌前疾病诊治研讨会将于2006年秋季在重庆举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文及摘要800字(附软盘), 2006-07-15截稿.

2 联系方式

重庆市第三军医大学西南医院消化科赵晶京收(邮编: 400038); E-mail: zhaojingjing-1@sina.com.

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第八届中西医结合实验医学研讨会

本刊讯 第八届中西医结合实验医学研讨会将于2006-10在南京举行, 现将征文通知公布如下:

1 截稿日期

2006-08-31截稿.

2 联系方式

南京中山东路305号南京军区总医院 齐名; 邮编: 210002; 电话: 025-52926620.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年6月18日; 14(17): 1699-1703
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床研究 CLINICAL RESEARCH

DNA甲基化对大肠癌相关基因表达的调控意义

李 庚, 千新来, 崔 静, 王中群, 冶亚平, 杨晓煜, 李永真

李庚, 千新来, 崔静, 王中群, 冶亚平, 杨晓煜, 李永真, 新乡医学院病理教研室 河南省新乡市 453003
李庚, 1995年新乡医学院学士, 2002年山西医科大学获病理学硕士, 讲师, 主要从事肿瘤的病理研究.
河南省科技发展计划基金资助项目, No. 0124170620
通讯作者: 千新来, 453003, 河南省新乡市, 新乡医学院病理教研室. qxlfssws@163.com
电话: 0373-3029123
收稿日期: 2006-03-14 接受日期: 2006-05-08

Role of DNA methylation in control of tumor suppressor gene and oncogene expression in colorectal carcinoma

Geng Li, Xin-Lai Qian, Jing Cui, Zhong-Qun Wang, Ya-Ping Ye, Xiao-Yu Yang, Yong-Zhen Li

Geng Li, Xin-Lai Qian, Jing Cui, Zhong-Qun Wang, Ya-Ping Ye, Xiao-Yu Yang, Yong-Zhen Li, Department of Pathology, Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, Henan Province, China
Supported by the Foundation from Scientific Technology Development Plan of Henan Province, No. 0124170620
Correspondence to: Dr. Xin-Lai Qian, Department of Pathology, Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, Henan Province, China. qxlfssws@163.com
Received: 2006-03-14 Accepted: 2006-05-08

Abstract

AIM: To investigate the relationship between DNA methylation and expression of p16, Rb, and cyclin D_1 in the carcinogenesis of colorectal carcinoma.

METHODS: Methylation-specific polymerase chain reaction (MS-PCR) was used to detect the methylation status of p16, Rb, and cyclin D_1 in the specimens from colorectal carcinoma, cancer-adjacent tissues of carcinoma and adenoma, and normal colorectal mucosa, respectively. The correlations of methylation with protein expression and the clinicopathological indexes were analyzed.

RESULTS: For the levels of p16 and Rb methylation, there were increased tendencies in the carcinogenesis of colorectal cancer, while for the level of cyclin D_1 methylation, there was a decreased tendency. The expression of p16 and cyclin D_1 protein were inversely correlated with the methylation status of p16 (normal mucosa: r = -0.185, P = 0.173; adenoma: r = -0.381, P = 0.013; cancer-adjacent tissues: r = -0.419, P = 0.001; cancer tissues: r = -0.516, P = 0.000) and cyclin D_1 gene (normal mucosa: r = -0.282, P = 0.035; adenoma: r = -0.329, P = 0.033; cancer-adjacent tissues: r = -0.298, P = 0.026; cancer tissues: r = -0.618, P = 0.000). The levels of p16 and cyclin D_1 methylation were significantly correlated with the degrees of differentiation (p16: χ^2 = 11.232, P = 0.002, cyclin D_1: χ^2 = 9.144, P = 0.015), the depth of invasion (p16: χ^2 = 6.229, P = 0.013; cyclin D_1: χ^2 = 8.023, P = 0.006) and the metastasis of lymph node (p16: χ^2 = 5.707, P = 0.016; cyclin D_1: χ^2 = 7.794, P = 0.005). The methylation of Rb gene didn't play a main role in the inhibition of Rb protein expression during colorectal carcinogenesis.

CONCLUSION: Aberrant methylations of p16 and cyclin D_1 are the main mechanisms of p16 inactivation and cyclin D_1 over-expression, which play important roles in colorectal carcinogenesis. They are valuble in the early diagnosis and prognosis of colorectal carcinoma.

Key Words: Colorectal carcinoma; DNA methylation; p16; Rb; cyclin D_1

Li G, Qian XL, Cui J, Wang ZQ, Ye YP, Yang XY, Li YZ. Role of DNA methylation in control of tumor suppressor gene and oncogene expression in colorectal carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(17):1699-1703

摘要

目的: 探讨大肠癌发生与演进中p16, Rb, cyclin D_1甲基化状态与蛋白表达的关系及意义.

方法: 提取正常黏膜、腺瘤、癌旁组织及癌组织基因组DNA, 应用MSP法检测不同病变阶段组织中各基因的甲基化状态, 并对其与蛋白表达及临床病理参数的关系进行分析.

结果: 在大肠癌发生与演进过程中, p16, Rb基因甲基化率呈增高趋势, cyclin D_1基因甲基化率呈下降趋势, p16(切缘: r = -0.185, P

■背景资料
DNA甲基化是哺乳动物细胞基因表达调控的重要方式之一, 对于肿瘤细胞, 基因组中出现高甲基化区域的同时, 还存在着低甲基化区域. 前者对抑癌基因的灭活起重要作用, 后者与癌基因的激活、过量表达有密切关系, 并由此引起细胞的异常增生, 最终导致肿瘤的发生. cyclin D_1作为细胞周期的正调节因子可促进细胞增殖, 已被视为一种癌基因; p16和p27属于CKI家族, 通过抑制CDK的活性阻止细胞周期的进程, 是细胞周期的负性调节因子, 作为抑癌基因可阻止肿瘤的形成. 非磷酸化的Rb蛋白可结合E_2F, 阻止G_1/S期转换.

■创新盘点
在多种人肿瘤中抑癌基因启动子区CpG岛高甲基化而灭活和癌基因低甲基化而过表达，如肝细胞癌、非小细胞肺癌、胃癌、食管癌等，在大肠癌中仅见p16基因高甲基化的检测及其机制的相关报道，缺乏采用较大样本从正常肠黏膜→异常增生→腺瘤→大肠癌系统的多基因联合对比性研究. 为此，本研究采用较大样本(包括大肠癌切缘正常黏膜上皮、癌旁组织、腺瘤和大肠癌标本)利用甲基化特异性PCR(methylation-specific PCR, MSP)技术和免疫组化染色检测了4种与细胞周期调控有关的基因(cyclin D_1、p16、p27和Rb)启动子区CpG岛甲基化状态及其蛋白在大肠癌发生、发展过程中的表达情况.

= 0.173; 腺瘤: r = -0.381, P = 0.013; 癌旁: r = -0.419, P = 0.001; 癌: r = -0.516, P = 0.000)、cyclin D_1(切缘: r = -0.282, P = 0.035; 腺瘤: r = -0.329, P = 0.033; 癌旁: r = -0.298, P = 0.026; 癌: r = -0.618, P = 0.000)基因甲基化程度分别与其蛋白表达呈明显负相关, 且在癌组织分化程度(p16: χ^2 = 11.232, P = 0.002, cyclin D_1: χ^2 = 9.144, P = 0.015)、浸润深度(p16: χ^2 = 6.229, P = 0.013; cyclin D_1: χ^2 = 8.023, P = 0.006)和淋巴结转移(p16: χ^2 = 5.707, P = 0.016; cyclin D_1: χ^2 = 7.794, P = 0.005)上有显著性差异. Rb基因的甲基化状态在Rb表达抑制上不起主要作用.

结论: 大肠癌p16高甲基化和cyclin D_1低甲基化可能是p16失活和cyclin D_1过表达的主要机制, 在大肠癌的发生、发展中发挥重要作用, 对于大肠癌的早期诊断、恶性程度及预后判断有重要意义.

关键词: 大肠癌; DNA甲基化; p16; Rb; cyclin D_1

李庚, 千新来, 崔静, 王中群, 冶亚平, 杨晓煜, 李永真. DNA甲基化对大肠癌相关基因表达的调控意义. 世界华人消化杂志 2006;14(17):1699-1703
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1699.asp

0 引言

大肠癌的发生与演进涉及多种癌基因的过表达和/或抑癌基因的失活[1-6]. 另外, 在基因表达的调控中, DNA甲基化起着重要作用[7], 多种肿瘤的发生过程中伴有癌基因的低甲基化或抑癌基因的高甲基化[8-11]. 我们曾报道了p27基因甲基化在大肠癌发生中的变化[12], 并报道了p16, Rb, cyclin D_1表达与大肠癌的关系[13], 发现p27基因异常甲基化可能是p27失活的主要机制. 为了进一步从细胞周期的角度探讨大肠癌发生的分子机制, 我们检测了大肠癌相关基因p16, Rb, cyclin D_1的甲基化状态, 探讨基因甲基化改变与蛋白表达的关系及其对大肠癌发生、发展的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 新乡医学院三附院、新乡市中心医院、第二人民医院2001-01/12手术切除的大肠癌标本56例(包括癌、癌旁组织、手术切缘上皮)、腺瘤42例, 年龄37-76(中位55)岁, 标本经病理学证实. DNA分子质量Marker, TaqDNA聚合酶、脱氧核苷三磷酸、DNA purify system等为Promega公司产品; 亚硫酸氢钠、氢醌等为国产分析纯. 酚-氯仿法提取组织DNA并定量, 按参考文献[14]方法略作修改进行亚硫酸氢盐处理. 即: 氢氧化钠变性DNA后, 亚硫酸氢钠、氢醌处理, DNA purify system纯化、回收DNA.

1.2 方法 MSP检测基因甲基化状态. PCR反应条件: 95℃预变性10 min后接由94℃变性45 s, 退火(温度见表1)45 s, 72℃延伸45 s三步组成的35个循环, 最后72℃延伸5 min. 引物序列、退火温度及产物长度见表1.

统计学处理 采用χ^2检验或确切概率法及相关分析, 应用SPSS 10.0统计软件处理.

2 结果

2.1 p16, Rb, cyclin D_1基因的甲基化状态 MSP分析各基因的甲基化状态(图1)结果显示, 在大肠癌的发生与演进过程中, p16和Rb甲基化率呈增高趋势, 其在手术切缘上皮、癌旁、腺瘤、癌组织中的甲基化率分别为28.6%和3.6%, 44.6%和10.7%, 0.0%和11.9%, 64.3%和14.3%; cyclin D_1甲基化率呈下降趋势, 其在切缘、癌旁、腺瘤、癌组织中的甲基化率为64.3%, 37.5%, 31.0%和23.2%.

2.2 基因甲基化与其蛋白表达的关系 各病变阶段, p16(切缘: r = -0.185, P = 0.173>0.005; 腺瘤: r = -0.381, P = 0.013<0.05; 癌旁: r = -0.419, P = 0.001<0.001; 癌: r = -0.516, P = 0.000<0.01)、cyclin D_1(切缘: r = -0.282, P = 0.035<0.005; 腺瘤: r = -0.329, P = 0.033<0.05; 癌旁: r = -0.298, P = 0.026<0.005; 癌: r = -0.618, P = 0.000<0.01)甲基化率与其蛋白表达呈明显负相关, 而Rb甲基化率与蛋白表达无相关性(表2).

2.3 癌组织中基因甲基化与临床病理参数的关系 p16, cyclin D_1甲基化率在癌组织分化程度(p16: χ^2 = 11.232, P = 0.002<0.01, cyclin D_1: χ^2 = 9.144, P = 0.015<0.05)、浸润深度(p16: χ^2 = 6.229, P = 0.013<0.05; cyclin D_1: χ^2 = 8.023, P = 0.006<0.01)和淋巴结转移(p16: χ^2 = 5.707, P = 0.016<0.05; cyclin D_1: χ^2 = 7.794, P = 0.005<0.01)上均有显著性差异(表3).

3 讨论

肿瘤细胞区别于正常细胞的基本特征是细胞生长失控和分化受阻, 细胞生长、分化的调节与细胞周期的许多因素密切相关, 细胞周期调控因子是一组调节细胞增殖、分化的正负信号, 他们通过相互促进或抑制作用维持细胞周期的

■应用要点
在大肠癌发生过程中p16基因高甲基化和cyclin D_1基因低甲基化可能是p16失活和cyclin D_1高表达的主要机制, 其在大肠癌的发生、发展中发挥了重要作用, 对于大肠癌的早期诊断、恶性程度和预后判断有重要意义.

表 1 MSP引物序列、退火温度及产物长度

引物	序列 (5'→3')	退火温度	产物长度
p16M	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC GACCCCGAACCGCGACCGTAA	65℃	150 bp
p16U	TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT CAACCCCAAACCACAACCATAA	60℃	151 bp
RbM	GGGAGTTTCGCGGACGTGAC ACGTCGAAACACGCCCCG	55℃	172 bp
RbU	GGGAGTTTTGTGGATGTGAT ACATCAAAACACACCCCA	55℃	172 bp
cyclin D_1M	TACGTGTTAGGGTCGATCG CGAAATATCTACGCTAAACG	55℃	276 bp
cyclin D_1U	GTTATGTTATGTTTGTTGTATG TAAAATCCACCAACACAATCA	55℃	222 bp

表 2 基因甲基化与蛋白表达的关系 (*n*)

	甲基化	p16 蛋白		Rb蛋白		cyclin D_1蛋白	
		−	+	−	+	−	+
切缘	+	5	11	1	1	34	2
	−	6	34	13	41	15	5[a]
癌旁	+	16	9	4	2	16	5
	−	7	24[b]	20	30	16	19[a]
腺瘤	+	15	6	3	2	10	3
	−	7	14[a]	16	21	12	17[a]
癌	+	33	3	5	3	11	2
	−	9	11[b]	26	22	7	36[b]

[a]$P<0.05$, [b]$P<0.01$ *vs* 甲基化阳性者.

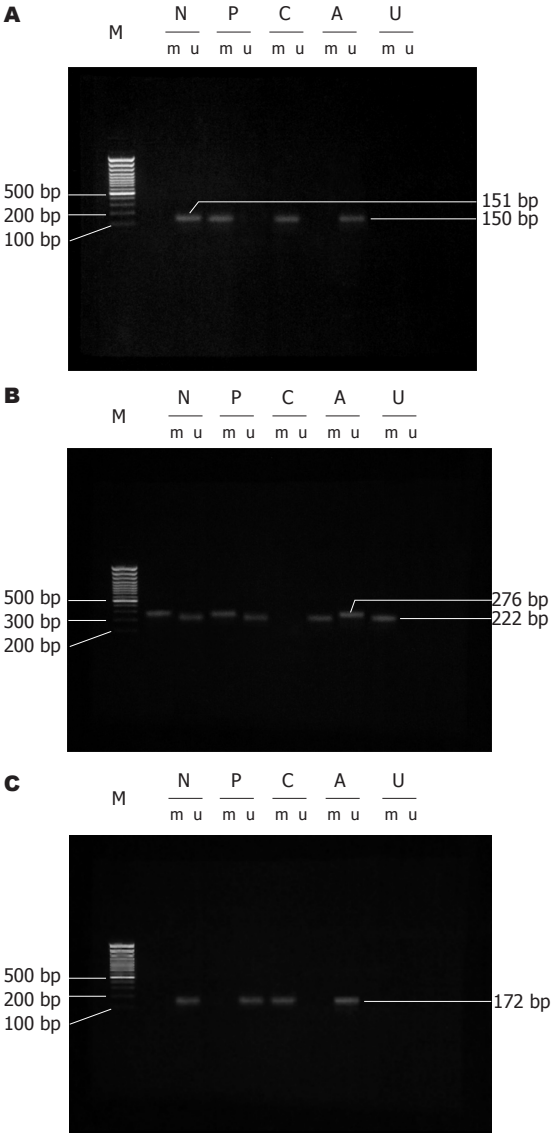


图 1 MSP产物琼脂糖凝胶电泳. M: 标准分子质量DNA; N: 手术切缘黏膜上皮; P: 癌旁组织; C: 癌组织; A: 腺瘤; U: 阴性对照; m: 甲基化特异引物; u: 非甲基化特异引物. A: p16; B: cyclin D_1; C: Rb.

正常进程. 在恶性肿瘤细胞中, 这些调控因子常发生过表达或失活, 从而引起细胞周期的正常调节紊乱, 促进肿瘤的形成与演进[15-18]. p16作为抑癌基因与细胞周期紧密相关, 通过细胞周期与其他癌基因、抑癌基因相互作用, 成为正常细胞增殖的负性调控因子[19]. 目前研究认为, 在与Rb, cyclin D_1/CDK_4共同组成的细胞增殖调控途径中, p16作为cyclin D_1/CDK_4复合物的特异抑制剂而发挥调节作用[20]. Rb作为CDK_4的重要底物参与了细胞周期调控, 与多种细胞蛋白结合抑制其活性转录功能而有G_1期阻滞作用, 作为抑癌基因阻止肿瘤的形成[21-22]. cyclin D_1在细胞周期中与CDK结合, 协同CDK对Rb蛋白磷酸化, 磷酸化后的Rb蛋白失去其抑制活性[23-25], 从而促进细胞增殖成为细胞周期的正调控因子. 研究发现, 大肠癌中存在着多种细胞周期调控因子的异常表达, 但其中对于p16, Rb失活和cyclin D_1过表达的机制目前的报道有诸多差异[11,26-27]. 近

■名词解释
甲基化特异性PCR(methylation-specific PCR, MSP)：是用亚硫酸氢钠处理DNA，则未甲基化胞嘧啶变为尿嘧啶，而甲基化胞嘧啶则不变. 据此，在基因启动子区富含CpG二核苷酸处设计甲基化和非甲基化特异性引物，对所测基因的同一核苷酸序列进行PCR扩增，扩增产物经凝胶电泳后进行结果分析. 此法克服了以往甲基化状态研究方法的局限性，即使肿瘤组织中混有正常组织也不完全影响结果. 因此，MSP法是一种简单、敏感、高效的方法.

表 3 基因甲基化与大肠癌临床病理参数的关系 (*n*)

	n	p16		cyclin D_1	
		−	+	−	+
男	30	10	20	23	7
女	26	10	16	20	6
年龄					
<50	24	8	16	18	6
>50	32	12	20	25	7
分化程度					
高	23	14	9	13	10
中	30	6	24^b	27	3^b
低	3	0	3	3	0
浸润深度					
黏膜下层	24	13	11	14	10
肌层	32	7	25^a	29	3^b
淋巴结转移					
有	23	4	19	22	1
无	33	16	17^a	21	12^b

$^aP<0.05$, $^bP<0.01$.

来研究表明，在肿瘤细胞中常存在DNA甲基化状态的改变，DNA甲基化异常分为甲基化增强和甲基化降低两种类型，可引起与细胞增殖和分化有关基因的表达异常，导致细胞恶变形成肿瘤[7-11]. DNA异常甲基化导致肿瘤发生的机制可能与基因突变、影响染色体凝聚及癌基因、抑癌基因的表达有关[28-29].

本研究结果显示，在大肠癌发生过程中p16基因高甲基化和cyclin D_1基因低甲基化可能是p16失活和cyclin D_1高表达的主要机制，其在大肠癌的发生、发展中发挥了重要作用，对于大肠癌的早期诊断、恶性程度和预后判断有重要意义. 该结果与Norrie *et al*[26]的报道不同，可能与实验中所用样品来源和检测方法不同等有关. 但与Dominguez *et al*[11]的报道一致. 值得注意的是，DNA甲基化改变可发生在大肠癌形成的早期甚至起始阶段，因而建立检测DNA甲基化状态改变的准确而敏感的方法可早期诊断细胞恶变. 在细胞癌变过程中，基因结构改变是不可逆的，DNA甲基化改变是可逆的，尤其是癌变早期的异常改变可能使之向正常逆转[30]，这对肿瘤的防治尤为重要. Rb基因的甲基化率在大肠癌发生中虽然也呈增加趋势，但阳性率很低，并且甲基化程度与Rb蛋白表达也无相关性. 因此在大肠癌发生过程中Rb基因异常甲基化在Rb基因的失活上并不起主要作用，而可能是由于突变、缺失等引起Rb基因的失活，这有待于进一步研究.

4 参考文献

1 Gatenby RA, Vincent TL. An evolutionary model of carcinogenesis. *Cancer Res* 2003; 63: 6212-6220
2 Leslie A, Pratt NR, Gillespie K, Sales M, Kernohan NM, Smith G, Wolf CR, Carey FA, Steele RJ. Mutations of APC, K-ras, and p53 are associated with specific chromosomal aberrations in colorectal adenocarcinomas. *Cancer Res* 2003; 63: 4656-4661
3 郑向奎, 李春仲, 段文都, 王香琢, 王毅, 郭剑, 刘会燕, 李杰. Rb、p16、CyclinD1基因蛋白在大肠癌中的表达及临床意义. 中国肿瘤临床 2005; 32: 1235-1238
4 Cui X, Shirai Y, Wakai T, Yokoyama N, Hirano S, Hatakeyama K. Aberrant expression of pRb and p16(INK4), alone or in combination, indicates poor outcome after resection in patients with colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 2004; 35: 1189-1195
5 Carneiro FP, Ramalho LN, Britto-Garcia S, Ribeiro-Silva A, Zucoloto S. Immunohistochemical expression of p16, p53, and p63 in colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Dis Colon Rectum* 2006; 49: 588-594
6 Tada T, Watanabe T, Kazama S, Kanazawa T, Hata K, Komuro Y, Nagawa H. Reduced p16 expression correlates with lymphatic invasion in colorectal cancers. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 1756-1760
7 Kass SU, Landsberger N, Wolffe AP. DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr Biol* 1997; 7: 157-165
8 Bender CM, Pao MM, Jones PA. Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines. *Cancer Res* 1998; 58: 95-101
9 Gonzalez-Quevedo R, Garcia-Aranda C, Moran A, De Juan C, Sanchez-Pernaute A, Torres A, Diaz-Rubio E, Balibrea JL, Benito M, Iniesta P. Differential impact of p16 inactivation by promoter methylation in non-small cell lung and colorectal cancer: clinical implications. *Int J Oncol* 2004; 24: 349-355
10 Fang XM, Sun LF, Peng JP, Dong Q, Zheng S. The study of 5-Aza-2'-deoxycytidine on transcription regulation of p16/CDKN2 gene demethylation in RKO human colorectal cell line. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2003; 83: 2077-2082
11 Dominguez G, Silva J, Garcia JM, Silva JM, Rodriguez R, Munoz C, Chacon I, Sanchez R, Carballido J, Colas A, Espana P, Bonilla F. Prevalence of aberrant methylation of p14ARF over p16INK4a in some human primary tumors. *Mutat Res* 2003; 530: 9-17
12 崔静, 李庚, 千新来. P27基因甲基化与结直肠癌发生发展及临床生物学行为的关系. 新医学 2005; 36: 145-147
13 付素珍, 崔静, 李娜, 任金萍. 大肠癌发生发展中cyclinD_1和P_{16}的表达及意义. 临床心身疾病杂志 2003; 9: 70-71
14 Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9821-9826
15 Murillo G, Salti GI, Kosmeder JW 2nd, Pezzuto JM, Mehta RG. Deguelin inhibits the growth of colon cancer cells through the induction of apoptosis and cell cycle arrest. *Eur J Cancer* 2002; 38: 2446-2454
16 Pan MH, Chen WJ, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JK. Tangeretin induces cell-cycle G1 arrest through inhibiting cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as elevating Cdk inhibitors p21 and p27 in human colorectal carcinoma cells.

Carcinogenesis 2002; 23: 1677-1684
17 Park WH, Kim ES, Jung CW, Kim BK, Lee YY. Monensin-mediated growth inhibition of SNU-C1 colon cancer cells via cell cycle arrest and apoptosis. *Int J Oncol* 2003; 22: 377-382
18 Theocharis S, Kouraklis G, Margeli A, Agapitos E, Ninos S, Karatzas G, Koutselinis A. Glucocorticoid receptor (GR) immunohistochemical expression is correlated with cell cycle-related molecules in human colon cancer. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 1745-1750
19 Marx J. A challenge to p16 gene as a major tumor suppressor. *Science* 1994; 264: 1846
20 Tam SW, Shay JW, Pagano M. Differential expression and cell cycle regulation of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor p16Ink4. *Cancer Res* 1994; 54: 5816-5820
21 Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995; 81: 323-330
22 Hinds PW, Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev* 1994; 4: 135-141
23 Dowdy SF, Hinds PW, Louie K, Reed SI, Arnold A, Weinberg RA. Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell* 1993; 73: 499-511
24 Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001; 411: 366-374
25 Borges HL, Bird J, Wasson K, Cardiff RD, Varki N, Eckmann L, Wang JY. Tumor promotion by caspase-resistant retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 15587-15592
26 Norrie MW, Hawkins NJ, Todd AV, Meagher AP, O'Connor TW, Ward RL. Inactivation of p16INK4a by CpG hypermethylation is not a frequent event in colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2003; 84: 143-150
27 Zhao P, Hu YC, Talbot IC. Expressing patterns of p16 and CDK4 correlated to prognosis in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2202-2206
28 朱卫国. DNA甲基化, 基因调控和癌症. 世界华人消化杂志 2002; 10: 680-683
29 关志宇, 戴冬秋. 胃癌TIMP3基因启动子甲基化及其蛋白表达的研究. 世界华人消化杂志 2006; 14: 138-143
30 李士谔. DNA甲基化、基因表达与肿瘤. 基础医学与临床 1996; 16: 321-340

电编 张敏 编辑 潘伯荣

■同行评价

本文通过对56例大肠癌和42例腺瘤标本检测分析p16、cyclin D_1和Rb基因的甲基化状态, 探讨基因甲基化与基因失活和蛋白表达异常的关系及其机制. 结果表明p16基因高甲基化和cyclin D_1基因低甲基化可能是p16失活和cyclin D_1高表达的主要机制, 不但对大肠癌早期诊断、恶性程度和预后判断有重要性, 可能还具有防治作用. Rb基因甲基化与蛋白表达无相关性, 因而Rb基因的失活机制尚有待进一步研究. 本文有临床参考价值.

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

•消息•

2006广州肝病防治研究新进展学术报告会

本刊讯 2006广州肝病防治研究新进展学术报告会将于2006-07-01/05在广州举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

要求摘要和正文各一份, 并附软盘或寄到电子信箱.

2 联系方式

广州市广州大道北1838号南文医科大学南方医院消化病研究所(510515), 白岚教授收. 电话: 020-61641658;

E-mail: gdsgzbxh@163.com.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年6月18日; 14(17): 1704-1709
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床研究 CLINICAL RESEARCH

结扎和硬化疗法治疗肝硬化食管静脉曲张出血疗效比较的荟粹分析

范铁艳, 程留芳

■背景资料
对于食道静脉曲张出血应用硬化疗法和套扎疗法疗效的比较一直存在争议. 本文应用荟萃分析的方法对其进行系统评价, 得出对于肝硬化食管静脉曲张出血应用套扎和硬化治疗, 在降低死亡率方面没有明显差异, 在预防再出血方面存在差异的结论. 在国外, 如日本肝硬化的病因以丙肝为主, 欧美发达国家以酒精性肝硬化为主, 而我国肝硬化病因为乙肝肝硬化, 本文所选文献大部分是国外文献, 这是否适合我国国情有待进一步研究. 另外, 为了正确比较两种治疗方法的疗效, 应在我国进行多中心的研究, 且真正作到随机对照前瞻性的研究.

范铁艳, 程留芳, 中国人民解放军总医院 消化内科 北京市 100853
范铁艳, 住院医师, 2005级解放军军医进修学院博士生, 从事肝硬化食管静脉曲张的基础与临床研究.
通讯作者: 范铁艳, 100853, 北京市, 中国人民解放军总医院消化科. fantieyan2006@163.com
电话: 010-66937078
收稿日期: 2006-04-05 接受日期: 2006-04-16

Comparison between effects of ligation and sclerotherapy in treatment of esophageal variceal bleeding after liver cirrhosis: a meta-analysis

Tie-Yan Fan, Liu-Fang Cheng

Tie-Yan Fan, Liu-Fang Cheng, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Correspondence to: Tie-Yan Fan, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, 100853 Beijing, China. fantieyan2006@163.com
Received: 2006-04-05 Accepted: 2006-04-16

Abstract
AIM: To systematically evaluate the therapeutic effect of endoscopic injection sclerotherapy (EIS) and endoscopic variceal ligation (EVL) on esophageal variceal bleeding after liver cirrhosis.

METHODS: The correlated literature about the therapeutic effect of EIS and EVL on esophageal variceal were identified from Medline, EMBase and China Biological Medicine Disk between January, 1985 and November, 2005. RevMan 4.2.8 software was used for data analysis.

RESULTS: According to the included criteria, seven prospective, randomized, controlled, clinical trials were selected finally. The combined results of meta-analysis showed that the rehaemorrhage rate of scherotherapy on the esophageal variceal bleeding after liver cirrhosis was higher than ligation (RR = 1.32, 95%CI: 1.10-1.57, P < 0.05), while their motility rates were similar (RR = 1.24, 95%CI: 0.99-1.55, P > 0.05).

CONCLUSION: In comparing with EIS, EVL has a better effect on obviating rehaemorrhage in esophageal varices bleeding after liver cirrhosis but has no difference in degrading motility.

Key Words: Ligation; Sclerotherapy; Liver cirrhosis; Esophageal variceal bleeding; Meta-analysis

Fan TY, Cheng LF. Comparison between effects of ligation and sclerotherapy in treatment of esophageal variceal bleeding after liver cirrhosis: a meta-analysis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(17):1704-1709

摘要
目的: 对套扎疗法与硬化疗法治疗肝硬化食管静脉曲张出血的疗效进行系统评价.

方法: 通过Medline、EMBase和中国期刊全文数据库检索1985-01/2005-11发表的有关硬化疗法与套扎疗法治疗肝硬化食管静脉曲张出血相关文献, 并采用RevMan4.2.8进行Meta分析.

结果: 按照入选标准, 有7项前瞻性随机对照临床试验纳入. Meta分析结果显示, 硬化疗法在治疗肝硬化食管静脉曲张中的再出血率高于套扎疗法(RR = 1.32, 95%CI: 1.10-1.57, P<0.05); 而在降低死亡率方面二者相似(RR = 1.24, 95%CI: 0.99-1.55, P>0.05).

结论: 套扎疗法较硬化疗法在治疗肝硬化食管静脉曲张中能更好的预防再出血, 在降低死亡率方面无差异.

关键词: 硬化; 套扎; 肝硬化; 食管静脉曲张出血; 荟萃分析

范铁艳, 程留芳. 结扎和硬化疗法治疗肝硬化食管静脉曲张出血疗效比较的荟粹分析. 世界华人消化杂志 2006;14(17):1704-1709
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1704.asp

0 引言
肝硬化患者40%-70%会并发食管静脉曲张, 30%

会发生静脉曲张破裂出血[1], 6 mo内再出血发生率为60%-70%, 病死率高达30%-60%[2]. 食管静脉曲张出血是肝硬化患者主要的致死原因, 因此临床上控制活动性出血及预防再出血显得十分重要. 内镜下硬化疗法(endoscopic injection sclerotherapy, EIS)和内镜下曲张静脉套扎术(endoscopic variceal ligation, EVL)是目前治疗活动性出血和预防再出血的较为有效的方法,可降低食管静脉破裂出血的病死率[3]. 然而对于二者的疗效存在争议. 因此我们设计了荟萃分析来比较两种疗法治疗肝硬化食管静脉曲张破裂出血的疗效, 从而指导临床治疗.

1 材料和方法

1.1 材料 符合以下条件的临床试验可作为研究对象: (1)有关两种疗法的前瞻性, 随机、对照临床实验; (2)所有受试对象均为依据临床及实验室检查或病理学证实的肝硬化患者, 既往有与肝硬化相关的上消化道出血病史; (3)所有受试者均无严重心肺脑等疾患, 除肝硬化外, 无其他肝脏疾患; (4)随访至少半年; (5)研究的终点指标: 再出血和死亡的例数. 再出血的定义为出血停止24 h以上, 又出现出血, 并出现下列指标: 再次呕血, 胃管内抽出血性液体; 内镜下见活动性出血; 临床出现休克表现, 收缩压降低(<90 mmHg), 脉搏增快(>100次/min), 24 h内Hb下降≥20 g/L.

1.2 方法 文献检索方法: 英文数据库以“sclerotherapy”, “ligation”, “esophageal variceal bleeding”为检索词, 检索库为Medline和EMBase(1985-01/2005-11). 中文数据库以“硬化”、“套扎”、“食管静脉曲张”为检索词, 检索库为中国期刊全文数据库(1985-01/2005-11). 查阅所有检出论文的参考文献作为补充. 入选文献评阅标准参照Jadad评分标准[4](表1). 由两名评价员独立选择试验、提取资料, 并进行质量评价. 资料提取时隐去了作者的姓名, 论文发表的期刊名称, 年份, 国家. 摘录的内容: (1)包括研究者, 出版年限, 受试者的例数, 平均年龄, 性别比, 病因, 肝功能分级(Child-pugh分级); (2)实验设计细节, 是否随机, 随机方法, 失访者的例数; (3)治疗方案; (4)随访时间; (5)随访过程中上消化道再出血, 死亡的例数. .

统计学处理 系统分析软件为Cochrane协作网提供的Revman4.2.8. 采用χ^2检验进行各研究间的异质性检验, 假设齐性检验的α值为0.1, 齐性检验的P值>0.1则RR是齐性的, 否则为非齐性. 如果RR齐性, 采用固定效应模型进行统计; 如果RR非齐性, 找出异质性的原因后, 对纳入资料进行亚组分析, 即将具有临床同质性的研究分为一个亚组, 再对其进行统计学异质性分析(以I^2<50%, 亚组内以P>0.1, 亚组间以P>0.05, 为同质性检验水准, 亚组内和无异质性的亚组间合并, 采用固定效应模型; 如亚组间存在异质性, 则采用随机效应模型. 为保证meta分析结论的稳健性, 就文章的样本量的大小分层, 对RR值进行敏感性分析. 方法同上. 考虑到本研究仅仅收集了发表的文献, 我们用失效安全数来估计出版偏倚对在P = 0.05水平有统计学意义的合并检验结果的影响. 失效安全系数$=K\times(Z^2-1.645^2)/1.645^2$ 此值越大说明出版偏倚的影响越小, 结论的可靠性越好.

2 结果

2.1 纳入文献状况 根据检索式和检索词以及入选文献评价标准和对文献的要求, 最终共查找出7篇相关文献, Jadad评分均为3分, 符合入选标准. 其中4篇通过Medline检索获得, 2篇通过EMBase检索获得, 1篇为中国期刊全文数据库获得. 在入选的11项研究中, 其中4项研究为同一作者重复发表, 另外2项研究为同一作者重复发表, 我们分别选择了最近一篇. 最终共纳入7项研究进行评价. 各项研究硬化组和套扎组的病例数、年龄、性别比, 酒精性肝硬化的比例、Child-Pugh各级的人数. 各研究均进行了试验组与对照组间基线的比较, 结果显示两组基线差异无统计学意义(表2). 在7项研究中共纳入762例患者, 硬化组381例, 再出血和死亡的例数分别为166, 119. 套扎组381例, 再出血和死亡的例数分别为125, 95(表3).

2.2 硬化疗法和套扎疗法的评价 在7篇文献中报告了肝硬化食管静脉曲张出血治疗后再出血的人数硬化组166例, 套扎组125例. 各研究间无统计学异质性(P = 0.85, I^2 = 0%), 采用固定效应模型; 两种疗法的疗效差异有统计学意义[RR = 为1.32, 95% CI (1.10, 1.57), P<0.05]; 表明与硬化组相比较, 套扎疗法在降低再出血率方面更加明显(表4). 在7篇文献中报告了肝硬化食管静脉曲张出血治疗后随访期间内死亡的人数硬化组119例, 套扎组95例. 各研究间无统计学异质性(P = 0.36, I^2 = 9.2%), 采用固定效应模型; 两种疗法的疗效无明显差异[RR = 1.24, 95% CI (0.99, 1.55), P>0.05]. 表明与硬化组相比较, 套

■**同行评价**
食道静脉曲张的套扎及硬化治疗是当今食管静脉曲张破裂出血的重要治疗手段, 孰优孰劣, 有争议, 但一直缺乏有说服力的研究报告. 本文以荟萃分析方法进行研究得出的结论具有指导临床治疗价值和理论依据.

表 1 Jadad评分标准[1]

指标	符合要求	不符合要求
分组方案	根据随机数字表或计算机随机产生的数字 (2分)	未有描述 (1分) 半随机或假随机 (0分)
分组隐藏	随机数字置于封好的信封中或类似的方法 (2分)	未有描述 (1分) 随机数字打开或轻易可见 (0分)
双盲	对照组严格采用安慰剂或类似的盲法方案 (2分)	未采用安慰剂方案 (1分) 两组用药途径完全不同 (0分)无盲法 (0分)
随访	描述了任何失访或退出的人数及理由 (1分)	未描述失访或退出人数及理由 (0分)

[1]总分≤2分者为低质量文章, ≥3分者为高质量文章.

表 2 入选文献患者的特征资料

研究者	硬化组/套扎组				
	n/n	年龄 (mean ± SD)	男 *n/n*	病因学 酒精/其他	Child–pugh (A/B/C)
Hou MC *et al*[5]	70/71	60.0 ± 11.9	57/56	13/57	17/34/19
		60.4 ± 12.1		11/60	20/26/25
刘德良 *et al*[6]	40/41	50.1 ± 9.1	31/33	2/38	6/25/9
		48.2 ± 8.5		1/40	8/32/10
Lo GH *et al*[7]	59/61	54 ± 12	49/48	12/47	7/24/28
		57 ± 13		15/46	9/22/30
Laine L *et al*[8]	39/38	48 ± 2	27/31	30/9	9/25/5
		44 ± 1		31/7	4/21/13
Stiegmann GV *et al*[9]	65/64	53 ± 13	51/53	52/13	20/32/13
		51 ± 13		53/11	20/33/12
Gimson AE *et al*[10]	49/54	48.8 ± 14.4	25/32	24/25	15/22/12
		53.9 ± 13.8		25/29	14/25/15
Baroncini D *et al*[11]	54/57	61.4 ± 9.8	37/38	44/10	18/22/14
		63.0 ± 9.1		49/8	17/24/16

表 3 入选文献的特征

研究者	治疗方案	再出血*n/n*	随访时间 (d)	死亡人数*n/n*
Stiegmann GV *et al* (1992)	硬化剂 (1)	31/23	325 ± 214	29/18
	套扎装置 (4)		317 ± 208	
Gimson AE *et al* (1993)	硬化剂 (1)	33/23	322	23/25
	套扎装置 (4)		337	
Laine L *et al* (1993)	硬化剂 (2)	17/10	307 ± 44	3/3
	套扎装置 (4)		295 ± 48	
Lo GH *et al* (1995)	硬化剂 (2)	2/61	295 ± 120	19/10
	套扎装置 (4)		310 ± 105	
刘德良 *et al* (1999)	硬化剂 (3)	8/7	414 ± 38	11/9
	套扎装置 (4)		398 ± 35	
Hou MC *et al* (2000)	硬化剂 (2)	27/24	63.4 ± 11.6	22/18
	套扎装置 (4)		60.1 ± 17.5	
Baroncini D *et al* (1997)	硬化剂 (1)	10/9	534 ± 42	12/12
	套扎装置 (4)		496 ± 40	

(1)1.0%十四烷基硫酸钠; (2)1.5%十四烷基硫酸钠; (3)5%鱼肝油酸钠; (4)Bard International Products, Tewksbury, Ma, USA.

扎疗法降低死亡率方面无明显差异(表5). 由于入选文献均为高质量文章, 由文献质量问题产生的异质性较小. 在剔除刘德良 *et al*[6]这篇样本量较小的文献后, 结果与硬化疗法相比较, 套扎疗法能更好的预防再出血[RR = 1.32, 95% CI (1.11, 1.59), P<0.05]; 在降低死亡率方面无明显差异[RR = 1.24, 95% CI (0.98, 1.56), P>0.05]. 可见我们的meta分析的稳健性较好(见表6,7). 由于套扎疗法和硬化疗法在预防再出血方面存在差异, 我们引入失安全系数这一概念, 失安全系数

表 4 硬化疗法与套扎疗法在再出血率方面的比较

Review 套扎疗法与硬化疗法对肝硬化食管静脉曲张出血疗效的meta分析
Comparison: 01 硬化组 versus. 套扎组
Outcome: 02 再出血

Study or sub-category	硬化组 n/N	套扎组 n/N	RR (fixed) 95% CI	Weight %	RR (fixed) 95% CI	Year
Stiegmann GV *et al*	31/65	23/64		18.48	1.33 [0.88, 2.01]	1992
Gimson AE *et al*	33/54	23/49		19.23	1.30 [0.90, 1.88]	1993
Laine L *et al*	17/39	10/38		8.08	1.66 [0.87, 3.14]	1993
Lo GH *et al*	30/59	29/61		22.73	1.07 [0.74, 1.54]	1995
Baroncini D *et al*	10/54	9/57		6.98	1.17 [0.52, 2.66]	1997
刘德良 *et al*	8/40	7/41		5.51	1.17 [0.47, 2.93]	1999
Hou MC *et al*	37/70	24/71		19.00	1.56 [1.05, 2.32]	2000
Total (95% CI)	381	381		100.00	1.32 [1.10, 1.57]	

Total events: 166 (硬化组), 125 (套扎组)
Test for heterogeneity: Chi?= 2.62, df = 6 (*P* = 0.85), I?= 0%
Test for overall effect: *Z* = 3.03 (*P* = 0.002)

0.1 0.2 0.5 1 2 5 10
Favours treatment Favours control

表 5 硬化疗法与套扎疗法在死亡率方面的比较

Review 套扎疗法与硬化疗法对肝硬化食管静脉曲张出血疗效的meta分析
Comparison: 01 硬化组 versus. 套扎组
Outcome: 03 随访期间内死亡人数

Study or sub-category	硬化组 n/N	套扎组 n/N	RR (fixed) 95% CI	Weight %	RR (fixed) 95% CI	Year
Stiegmann GV *et al*	29/65	18/64		18.96	1.59 [0.99, 2.55]	1992
Gimson AE *et al*	23/54	25/49		27.40	0.83 [0.55, 1.26]	1993
Laine L *et al*	3/39	3/38		3.18	0.97 [0.21, 4.53]	1993
Lo GH *et al*	19/59	10/61		10.28	1.96 [1.00, 3.87]	1995
Baroncini D *et al*	12/54	12/57		12.21	1.06 [0.52, 2.14]	1997
刘德良 *et al*	11/40	9/41		9.29	1.25 [0.58, 2.69]	1999
Hou MC *et al*	22/70	18/71		18.68	1.24 [0.73, 2.10]	2000
Total (95% CI)	381	381		100.00	1.24 [0.99, 1.55]	

Total events: 119 (硬化组), 95 (套扎组)
Test for heterogeneity: Chi?= 6.61, df = 6 (*P* = 0.36), I?= 9.2%
Test for overall effect: *Z* = 1.88 (*P* = 0.06)

0.1 0.2 0.5 1 2 5 10
Favours treatment Favours control

为17, meta分析的结果可能存在出版偏倚. 所得结论需进一步研究.

3 讨论

本系统评价纳入的研究质量较齐. 所有研究按明确的纳入和排除标准. 均为随机、对照研究方法, 对失访者均有描述, 但未提及具体的随机方法, 分组隐藏未有描述, 也未提及评价者是否应用盲法. 根据Jadad评分标准, 均为高质量文章, 因此由此产生的偏倚较少.

食管静脉曲张破裂出血是门脉高压严重的并发症,病死率很高. 套扎法和硬化法是目前安全有效的治疗方法, 可以提高临床治愈率, 减少病死率. 但是二者的疗效一直存在争议. 我们通过较为全面的检索系统对二者在预防再出血和降低随访期间的死亡率方面作一评价. 我们收集了7项前瞻性的随机对照临床试验, 所有试验的硬化组和套扎组除病因学方面有一定的差异, 余无明显差异. 因此具有总体肝硬化病人的代表性. 我们发现应用硬化法和套扎法后, 在随访期内再出血这一不利结局的发生数, 硬化组总共166例, 套扎组总共125例. 综合结果表明RR = 1.32[95% CI, (1.10, 1.57)], 菱形完全位于垂直线的右侧, 得出套扎组比硬化组有效的结论. 但在降低死亡率方面, 图示可见菱形与垂直线相交, 提示二者之间无明显差别. 由于本研究收录的仅仅是发表的文献, 所以我们引用了失效安全数的概念对有差异的分析进行了检验, 失安

表 6

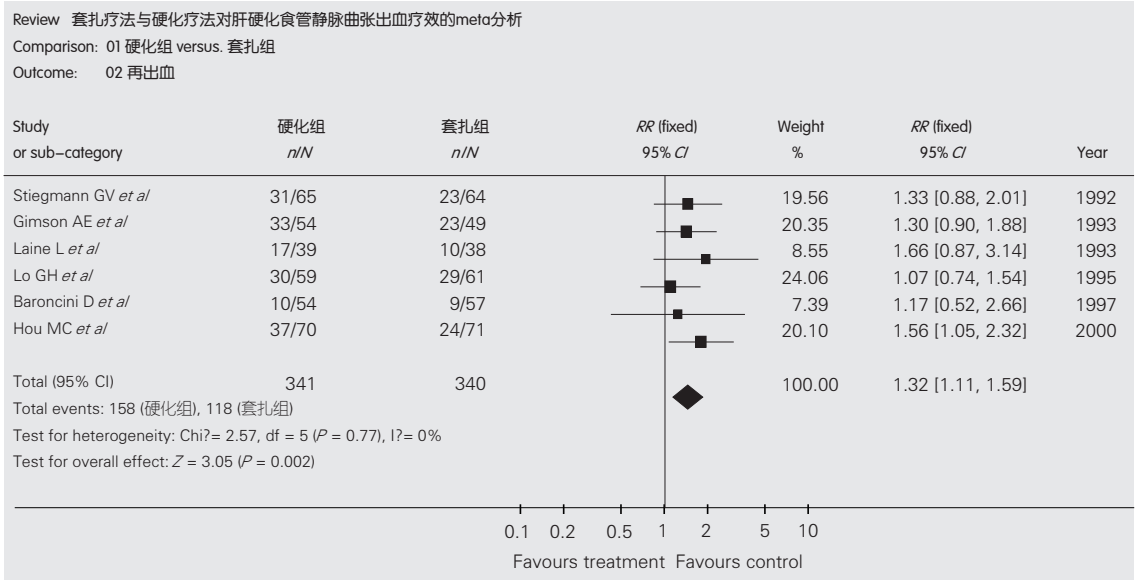
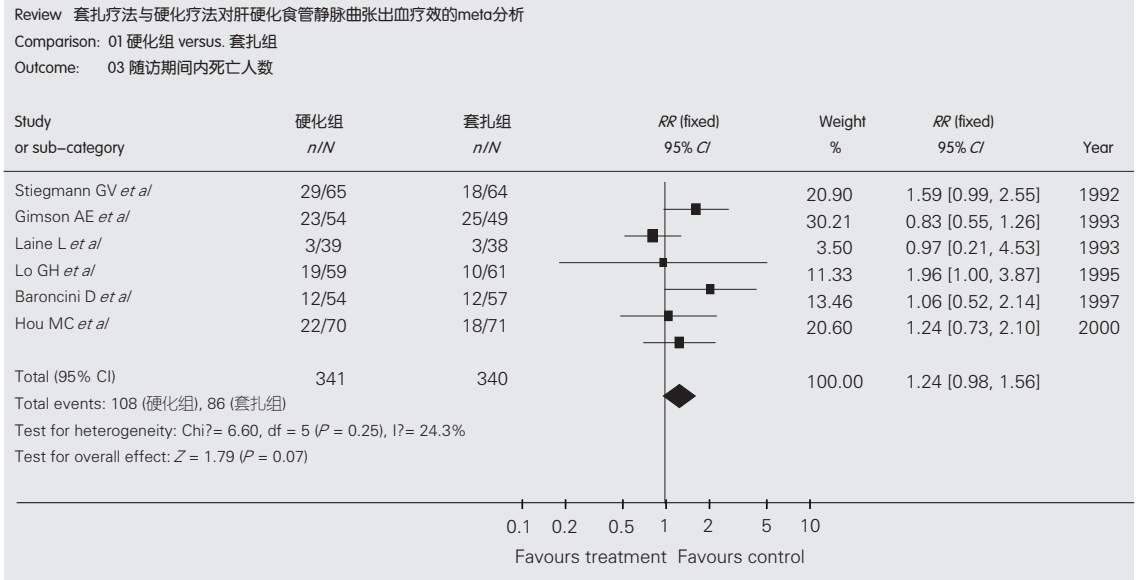


表 7



全系数为17, 因此对于套扎疗法在预防再出血方面优于硬化疗法的结论有待于进一步的讨论. 另外, 本研究存在一定的局限性. 在试验研究中如果具有较高的有效率则有利于文献的发表, 因此我们不能排除发表偏倚的存在. 而且对于肝硬化上消化道出血的患者应用内镜治疗需要较好的设备和经验丰富的医师, 因此这对于随访期间死亡人数亦有一定的影响. 本分析中只有一篇为中文文献, 在病因学中, 国人以肝炎性肝硬化为主, 而发达国家则以酒精性肝硬化为主, 因此只能从总体上反应两种疗法的治疗效果. 由于两种疗法存在各自的优缺点, 目前在国内具体临床工作中作到真正的随机尚有一定的难度. 因此两种疗法在我国治疗肝硬化的疗效评估尚需要进一步研究.

总之, 对于肝硬化食管静脉曲张出血应用套扎和硬化治疗, 在降低死亡率方面没有明显差异, 在预防再出血方面存在差异. Baroncini *et al*[11]认为, 与硬化治疗相比较, 套扎疗法对于食管静脉曲张出血的治疗, 在随访早期具有较大的优势, 但在长期随访中却发现有较高的静脉曲张复发率. 因此两种疗法对于肝硬化食管静脉曲张出血在其他方面的疗效有待进一步研究. 另外, 对于临床试验在方法学上, 除了要做到正确的随机分配、完善分组隐藏并详细报告, 还要对失访者进行详细记录, 对于评价者实施盲法, 这样既可以得到完整的试验结果, 又可以提高Meta分析的可靠性, 从而为临床提供良好

的依据.

4 参考文献

1 de Franchis R, Primignani M. Why do varices bleed? *Gastroenterol Clin North Am* 1992; 21: 85-101

2 曾民德. 食管静脉曲张出血的预测及其治疗对策. 中华肝脏病杂志 1998; 6: 65-66

3 刘诗, 许军英, 侯晓华, 易粹琼. 内镜结扎治疗食管静脉曲张破裂出血的长期疗效观察. 中华消化内镜杂志 2000; 17: 205-207

4 Jadad AR, Moore RA, Carroll D, Jenkinson C, Reynolds DJ, Gavaghan DJ, McQuay HJ. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? *Control Clin Trials* 1996; 17: 1-12

5 Hou MC, Lin HC, Lee FY, Chang FY, Lee SD. Recurrence of esophageal varices following endoscopic treatment and its impact on rebleeding: comparison of sclerotherapy and ligation. *J Hepatol* 2000; 32: 202-208

6 刘德良, 霍继荣, 吴小平, 凌奇荷, 徐杨, 姚玉. 套扎与硬化治疗食管静脉曲张出血的临床对比研究. 湖南医学, 1999; 16: 90-92

7 Lo GH, Lai KH, Cheng JS, Hwu JH, Chang CF, Chen SM, Chiang HT. A prospective, randomized trial of sclerotherapy versus ligation in the management of bleeding esophageal varices. *Hepatology* 1995; 22: 466-471

8 Laine L, el-Newihi HM, Migikovsky B, Sloane R, Garcia F. Endoscopic ligation compared with sclerotherapy for the treatment of bleeding esophageal varices. *Ann Intern Med* 1993; 119: 1-7

9 Stiegmann GV, Goff JS, Michaletz-Onody PA, Korula J, Lieberman D, Saeed ZA, Reveille RM, Sun JH, Lowenstein SR. Endoscopic sclerotherapy as compared with endoscopic ligation for bleeding esophageal varices. *N Engl J Med* 1992; 326: 1527-1532

10 Gimson AE, Ramage JK, Panos MZ, Hayllar K, Harrison PM, Williams R, Westaby D. Randomised trial of variceal banding ligation versus injection sclerotherapy for bleeding oesophageal varices. *Lancet* 1993; 342: 391-394

11 Baroncini D, Milandri GL, Borioni D, Piemontese A, Cennamo V, Billi P, Dal Monte PP, D'Imperio N. A prospective randomized trial of sclerotherapy versus ligation in the elective treatment of bleeding esophageal varices. *Endoscopy* 1997; 29: 235-240

电编 李琪 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

更正与说明专栏

本刊讯 《世界华人消化杂志》为了对同行评议、编辑、校对、审读、文章价值等质量进行跟踪报道, 特设“更正与说明”固定专栏, 包括“事实纠错”、“文字更正”、“解释说明”三个子栏目, 不仅对前一期或近期出现的文字差错和事实错误进行更正、就引发歧义或晦涩难懂之处做解释说明, 而且针对文章的学术水平等进行讨论. 在此, 我们热烈欢迎读者、作者、编委等积极审读《世界华人消化杂志》, 给更正与说明栏目投稿.

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第十一届全国胰腺外科学术研讨会征文

本刊讯 中华医学会外科学分会胰腺外科学组定于2006-09-08/11在西部高原城市青海省西宁市举行第十一届全国胰腺外科学术研讨会, 届时将邀请全国普外科百位知名专家到会就胰腺癌和急性胰腺炎的诊治规范进行专题讨论, 欢迎全国普外科同仁参加此次研讨会, 共同商定我国胰腺癌和急性胰腺炎的诊治规范. 投稿及联系事项: 北京协和医院基本外科, 李丽君. 截稿日期2006-06-30. 通信地址: 北京市东城区王府井大街帅府园1号, 邮编: 100730. 联系电话: 010-65296021, 010-65296016; 传真: 010-65296021.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年6月18日; 14(17): 1710-1713
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

干细胞与胃癌关系的研究进展

王 宁, 陈 凛, 赵向阳

■背景资料
胃癌是对人类健康危害极大的恶性肿瘤, 然而胃癌的发病机制还不清楚. 近年来, 随着对干细胞和肿瘤研究的深入, 已经有越来越多的证据表明至少一些肿瘤中存在干细胞, 肿瘤干细胞是肿瘤生长、侵袭、转移和复发的根源, 提出了肿瘤干细胞学说. 胃癌也可能来源于干细胞, 是一种干细胞疾病.

王宁, 陈凛, 赵向阳, 中国人民解放军总医院普通外科 北京市 100853
国家自然科学基金资助课题, No. 30570522
通讯作者: 陈凛, 100853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院普通外科. aning0516@hotmail.com
电话: 010-80666205 传真: 010-68219860
收稿日期: 2006-03-01 接受日期: 2006-03-15

摘要
胃癌是对人类健康危害极大的恶性肿瘤, 我国胃癌的年死亡率在各种恶性肿瘤中占首位. 胃癌的发病机制还不清楚. 近年来, 随着对干细胞和肿瘤研究的深入, 越来越多的证据表明干细胞和肿瘤细胞有很多相似之处, 肿瘤中某些细胞具有干细胞特性, 提出了肿瘤干细胞学说. 胃癌也可能来源于干细胞, 是一种干细胞疾病.

关键词: 干细胞; 肿瘤; 胃癌

王宁, 陈凛, 赵向阳. 干细胞与胃癌关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(17):1710-1713
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1710.asp

0 引言
胃癌是对人类健康危害极大的恶性肿瘤, 我国胃癌每10万人口的年死亡率为25.21, 在各种恶性肿瘤中占首位. 胃癌的发病机制目前还不十分清楚. 近年来, 随着对干细胞和肿瘤研究的深入, 越来越多的证据表明干细胞和肿瘤细胞有很多相似之处, 肿瘤来源于干细胞的理论越来越受到重视, 干细胞与肿瘤关系的研究已经成为目前研究热点之一, 现对国内外有关干细胞与胃癌关系的研究进行综述.

1 干细胞与肿瘤
干细胞(stem cell)是一类具有自我更新(self-renewal)和增殖分化能力的细胞, 通过不对称分裂能产生和自己完全相同的子细胞, 还能分化为祖细胞. 干细胞分为胚胎干细胞和成体干细胞两大类. 胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)为全能干细胞, 可以分化成人体各种细胞, 这些细胞又构成人体各种组织和器官, 如胚胎干细胞在体外可以被诱导分化出包括3个胚层在内的所有分化细胞. 在动物体内, ESC可分化产生出由3个胚层细胞组成的畸胎瘤. 但ESC在临床应用中受到伦理学和取材困难等因素的限制. 成体干细胞(adult stem cell, ASC)存在于胎儿和成人各种组织及器官中, 来源广泛, 不涉及伦理问题. 过去认为成体干细胞具有组织特异性, 只能分化成特定的组织和器官. 但研究表明成体干细胞也具有强大的分化可塑性, 同样具有分化成其他细胞或组织的潜能.

随着对干细胞研究的不断深入, 在肿瘤研究领域, 亦加深了对肿瘤起源与发病机制的认识. 人们发现干细胞与肿瘤细胞之间存在着很多相似之处[1], 他们都具有自我更新能力和分裂增殖的能力; 具有相似的细胞表面标志, 如Msi-1, CD133, Sox2, nestin, ABCG2/Bcrp1等[2-3]; 以及具有一些相同的细胞信号调节通路参与干细胞和肿瘤细胞的自我更新, 如Notch, Wnt, SHH, Oct3/4信号通路[4-7]. 由于肿瘤细胞与干细胞之间存在着许多相似性, 近年提出了肿瘤干细胞学说, 认为肿瘤组织中存在极少量肿瘤细胞, 在肿瘤中充当干细胞角色, 具有无限的自我更新能力, 能够产生与上一代完全相同的子代细胞; 并有多种分化潜能和高度增殖能力, 产生不同表型的肿瘤细胞, 使肿瘤在体内不断扩大, 或形成新的肿瘤. 早在19世纪, 病理学家们就利用显微镜观察肿瘤组织, 发现了胚胎组织与肿瘤组织之间的相似性, 并提出了肿瘤可能起源于胚胎样组织[8]. Alison *et al*[9]认为: 肿瘤实际上是干细胞疾病, 因为仅持续存在于组织的细胞才能有足够充分的时间来接受肿瘤形成所必须的遗传改变信息. Caussinus *et al*[10]认为, 他们有可靠的证据表明某些类型的癌症是由于干细胞发生错误而产生的. 他们研究显示, 如果干扰干细胞中的某些特殊基因, 使关键分子在干细胞分裂时没有处于正确位置, 最终可能形成致命的肿瘤.

大部分混合瘤中虽然肿瘤细胞有各种不同的组织形态, 但却有遗传同源性, 说明他们很可能来源于一个共同的祖细胞[11]. 大多数肿瘤起源

于单个细胞, 这些细胞转换为肿瘤起始细胞(肿瘤干细胞), 他们具有在体内增殖和形成肿瘤的能力, 然而肿瘤干细胞的起源仍然不是很清楚. 研究发现, 在机体发育和组织损伤的过程中, 不同来源的细胞之间基因和胞质中物质的融合是一个很重要的生理过程, 这种细胞融合和横向的基因传递事件也同一些癌症的基本特性相联系, 而且可能在肿瘤干细胞发育过程中扮演了重要角色[12]. 已经有越来越多的证据表明, 至少一些肿瘤中存在干细胞(肿瘤干细胞), 肿瘤干细胞是肿瘤生长、侵袭、转移和复发的根源, 而肿瘤干细胞可能起源于机体的正常干细胞或其前体细胞. Bonnet *et al*[13]分离出人急性髓系白血病(AML)中的肿瘤干细胞为$CD34^+CD38^-$细胞. 尽管这些细胞只占所有AML细胞的0.2%, 但是他们是唯一能在NOD/DCID鼠内形成AML移植瘤的细胞. 这就排除了所有AML细胞都能形成克隆的可能性, 而能形成克隆的只是少数细胞亚群, 并且能在动物体内形成移植瘤. Al-Hajj *et al*[14]建立了严重联合免疫缺陷小鼠模型, 用于肿瘤干细胞的鉴定, 并利用细胞表面标志物分离出了人乳腺癌肿瘤干细胞, 这些肿瘤干细胞表面抗原为ESA^+, Lin^-, $CD44^+$, $CD24^{-/low}$.

2 胃干细胞与胃癌

随着对胃黏膜上皮细胞动力学、胃癌前病变、微小胃癌以及各种形态胃癌细胞的深入研究, 使人们对过去的一些有关胃癌组织发生的学说产生了质疑, 也许胃癌的组织起源细胞并不那么复杂, 可能都起源于一种细胞-胃腺峡部的原始干细胞. 由于原始干细胞具有多向分化的潜能, 再加之致癌因素及癌变过程的多样化, 而使得最终发生的胃癌呈现了多种多样的形态差异和不同生物学行为. 胃干细胞是有自我更新和复制能力的原始细胞, 属于成体干细胞, 胃腺体多能干细胞通过向祖细胞分化, 后者进一步分化形成胃的各种腺体细胞, 这种特性在维持胃黏膜更新及保持组织内环境稳定方面起着重要作用. 同时, 他可能是基因突变和积累的靶细胞, 所以说胃干细胞可能在胃癌的最早期阶段发挥重要作用. 由于缺乏特异性标志, 不了解调节胃干细胞增殖分化的分子通路, 目前还没有理想的技术可以分离纯化出人类胃干细胞[15]. 因此这也就成为目前的研究热点.

胃腺体多能干细胞被认为存在于胃腺体峡部一带, 于普通制备的标本中不易辨认, 主要是应用^3H标记的胸腺嘧啶核苷注入实验动物体内后, 以放射自显影术发现该部位摄取了胸腺嘧啶核苷, 表明这些细胞处于活跃的增殖状态. 胃黏膜不同种类的前体细胞从这里产生, 并向上或向下双方向迁移, 最终形成成熟的胃黏膜细胞, 即壁细胞、主细胞、黏液细胞和内分泌细胞. Tatematsu *et al*[16]通过对C3H/HeN↔BALB/c嵌合体小鼠研究发现, 在正常嵌合体小鼠的胃肠道黏膜, 每个腺体只包含CSA (C3H strain-specific antigen)阳性或阴性细胞, 没有发现具有混合细胞的腺体. 胃底腺的表皮黏膜细胞(小凹上皮细胞)、颈黏液细胞、壁细胞和主细胞都来源于同一细胞. 同样, 每个胃底腺的表皮黏液细胞和幽门腺细胞也来源于单一的祖细胞. 以上这些都说明各种类型的胃腺体细胞都起源于单一的祖细胞. Yang *et al*[17]研究表明发育中鼠的胃底腺干细胞最初分散在上皮各层, 随后集中在小凹深层, 随着胃底腺的成熟, 干细胞离开腺体基底部向胃腔方向移居. 出生4 wk后胃底腺发育渐趋完善, 干细胞被限制在腺体峡部. 成年鼠胃底腺峡部的干细胞分化形成黏膜表面黏液细胞和腺细胞.

在正常情况下, 组织特异性干细胞产生适应其微环境的特定组织细胞类型. 在胃黏膜内存在潜能干细胞, 即胃干细胞, 他在正常情况下分化为胃黏膜细胞, 当受到持续的炎症刺激、自身抗体或其他因素作用时转向增殖为肠的细胞, 如吸收细胞、杯状细胞和潘氏细胞, 即肠上皮化生. 上皮化生过程是组织细胞分化异常所致, 这种细胞分化异常发生在干细胞水平[18]. Inada *et al*[19]认为人胃的肠上皮化生分为两种类型: 一种是胃肠混合型, 另一种是单纯肠型. 胃肠混合型中既有胃表型细胞(胃小凹和幽门腺细胞), 也有肠表型细胞(杯状、肠吸收和潘氏细胞). 胃细胞类型分析研究表明同一个干细胞可产生胃、肠表型细胞, 结果提示胃的干细胞在肠上皮化生过程中表现出异常的细胞分化. 胃干细胞可以产生胃型和肠型细胞, 与之类似, 各种组织类型胃癌的表型表达能清晰的分为胃型和肠型上皮细胞. 胃癌表型表达的异质化假定反映了向这两个方向分化的内在潜能. 作为独立的组织类型, 早期胃癌主要包括胃型细胞, 在胃癌进展过程中可以清楚地观察到表型从胃型转到肠型. 资料表明: 对于胃癌, 肠上皮化生可能不是癌前病变, 而是肠型细胞独立出现在肠上皮化生和胃癌的胃黏膜中. 胃黏膜的肠上皮

■**研发前沿**
肿瘤与干细胞关系是目前研究的热点之一. 本文从干细胞与肿瘤关系、胃干细胞与胃癌、骨髓间充质干细胞与胃癌等三个方面, 系统、全面地综述了干细胞与胃癌关系的研究进展.

■名词解释

1 干细胞(stem cell): 是一类具有自我更新(self-renewal)和增殖分化能力的细胞. 通过不对称分裂能产生和自己完全相同的子细胞, 还能分化为祖细胞. 干细胞分为胚胎干细胞和成体干细胞两大类.

2 肿瘤干细胞: 肿瘤组织中存在极少量肿瘤细胞, 在肿瘤中充当干细胞角色, 具有无限的自我更新能力, 能够产生与上一代完全相同的子代细胞; 并有多种分化潜能和高度增殖能力, 产生不同表型的肿瘤细胞, 使肿瘤在体内不断扩大, 或形成新的肿瘤. 肿瘤干细胞是肿瘤生长、侵袭、转移和复发的根源.

化生和癌细胞可能表现一种同源异位转化[20].

根据Lauren病理分型, 胃癌可分为弥漫胃癌和肠型胃癌. 弥漫型胃癌被认为直接起源于胃黏膜, 可能发生于胃腺的干细胞区域, 镜下无腺样结构. 肠型胃癌认为源于肠上皮化生, 肿瘤中可见腺泡分化. 胃癌的发生是一个多步骤现象, 以癌前病变开始, 通常是慢性萎缩性胃炎伴肠上皮化生. 在这里胃腺体被黏液分泌细胞所代替, 可发生在胃体、胃窦和胃体-胃窦交界处. 如果胃底黏膜腺体出现分泌黏液的细胞, 被称为假幽门化生、黏液化生或胃窦化. 通常认为幽门腺化生是干细胞基因重组造成的[21]. Tatematsu *et al*[22]发现用N-甲基-N-亚硝基脲染色的C3H/HeN↔Balb/c嵌合小鼠胃癌细胞由同一亲本类型细胞组成.

综合各种资料和研究结果, 认为在各种类型胃癌的组织发生上, 用胃腺多能干细胞起源来解释比较合理. 干细胞通过不对称分裂可以产生子代原始干细胞和定向干细胞, 癌变过程既可能起始于原始干细胞, 也可能起始于定向干细胞.

3 骨髓间充质干细胞与胃癌

成人间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)主要来源于骨髓, 是具有多向分化潜能的成体干细胞. 骨髓MSC是体外培养的骨髓基质细胞(stromal cells)群体中的一类细胞组分, 不表达造血干细胞表面抗原CD34, CD14及白细胞表面抗原CD45. 骨髓MSC表达SH2, SH3, CD29, CD106和CD166等表面抗原. PDGF作为结缔组织生长因子, 对体外MSC生长有理想的促进作用[23]. 在合适的条件下, MSC容易诱导分化为间充质组织细胞, 如成骨细胞和其他结缔组织细胞. MSC也可分化为神经细胞、肝细胞及肌肉细胞. 来源于中胚层的骨髓MSC可跨越胚层界限, 也可向来源于内胚层及外胚层的组织、细胞分化[24]. Serakinci *et al*[25]在活体外研究表明成人间充质干细胞可能是恶性转化的靶细胞. Houghton *et al*[26]发现在幽门螺旋杆菌所致的慢性炎症的小鼠模型中, 骨髓细胞(能够通过特异性的标记检测出)能从骨髓迁移至胃黏膜损伤处参与损伤修复, 但是这种修复由于慢性炎症的刺激而成为异常修复, 骨髓细胞能够转化为上皮细胞, 但不是正常的胃上皮细胞, 他有化生的表现, 骨髓细胞修复而形成的胃黏膜腺体出现紊乱、畸形, 与胃癌前期变化非常相似, 最后这些骨髓源性的细胞增殖形成胃癌. 最后作者还断定参与损伤修复的是骨髓间充质干细胞. 然而, 这项研究并没有提供充足的证据来说明骨髓细胞确实是分化为上皮细胞而不仅仅是和上皮细胞融合. 而且, 由于没有特异的标记物, 还不能说明人类胃癌是否就是由于骨髓细胞造成的[27-28]. 普遍认为胃肠道间质瘤起源于间充质干细胞[29].

总之, 大量的观察和实验结果已证明, 肿瘤中存在肿瘤干细胞. 虽然肿瘤干细胞理论目前还有许多空白之处, 针对胃癌, 还不清楚干细胞转化为肿瘤干细胞的具体机制以及胃癌中肿瘤干细胞的特异标志物等等, 更多的观点是基于现象的分析和理论的推测. 但随着分离工作的不断进展, 胃癌干细胞有望部分替代胃癌细胞系, 而成为更加理想的研究工具. 毫无疑问, 用干细胞理论研究肿瘤的发生机制, 有助于研究观念的转变及对肿瘤本质的理解, 为临床有效地诊断出恶性肿瘤细胞的存在部位, 寻找肿瘤发生的功能蛋白作为潜在的治疗靶点, 提供了新的方法. 随着技术和观念的不断飞跃, 相信这一目标终会达到.

4 参考文献

1 Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-111

2 Akasaka Y, Saikawa Y, Fujita K, Kubota T, Ishikawa Y, Fujimoto A, Ishii T, Okano H, Kitajima M. Expression of a candidate marker for progenitor cells, Musashi-1, in the proliferative regions of human antrum and its decreased expression in intestinal metaplasia. *Histopathology* 2005; 47: 348-356

3 Bunting KD. ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem Cells* 2002; 20: 11-20

4 Byun T, Karimi M, Marsh JL, Milovanovic T, Lin F, Holcombe RF. Expression of secreted Wnt antagonists in gastrointestinal tissues: potential role in stem cell homeostasis. *J Clin Pathol* 2005; 58: 515-519

5 Mazieres J, He B, You L, Xu Z, Jablons DM. Wnt signaling in lung cancer. *Cancer Lett* 2005; 222: 1-10

6 Katoh Y, Katoh M. Hedgehog signaling pathway and gastric cancer. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 1050-1054

7 Tai MH, Chang CC, Kiupel M, Webster JD, Olson LK, Trosko JE. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2005; 26: 495-502

8 Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 51: 1-28

9 Alison MR, Poulsom R, Forbes S, Wright NA. An introduction to stem cells. *J Pathol* 2002; 197: 419-423

10 Caussinus E, Gonzalez C. Induction of tumor growth by altered stem-cell asymmetric division

in Drosophila melanogaster. *Nat Genet* 2005; 37: 1125-1129
11 Huang J, Behrens C, Wistuba II, Gazdar AF, Jagirdar J. Clonality of combined tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126: 437-441
12 Bjerkvig R, Tysnes BB, Aboody KS, Najbauer J, Terzis AJ. Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 899-904
13 Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3: 730-737
14 Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 3983-3988
15 Modlin IM, Kidd M, Lye KD, Wright NA. Gastric stem cells: an update. *Keio J Med* 2003; 52: 134-137
16 Tatematsu M, Masui T, Fukami H, Yamamoto M, Nakanishi H, Inada K, Kusakabe M, Sakakura T. Primary monoclonal and secondary polyclonal growth of colon neoplastic lesions in C3H/HeN<-->BALB/c chimeric mice treated with 1,2-dimethylhydrazine immunohistochemical detection of C3H strain-specific antigen and simple sequence length polymorphism analysis of DNA. *Int J Cancer* 1996; 66: 234-238
17 Yang DH, Tsuyama S, Ge YB, Wakamatsu D, Ohmori J, Murata F. Proliferation and migration kinetics of stem cells in the rat fundic gland. *Histol Histopathol* 1997; 12: 719-727
18 Slack JM. Stem cells in epithelial tissues. *Science* 2000; 287: 1431-1433
19 Inada K, Tanaka H, Nakanishi H, Tsukamoto T, Ikehara Y, Tatematsu K, Nakamura S, Porter EM, Tatematsu M. Identification of Paneth cells in pyloric glands associated with gastric and intestinal mixed-type intestinal metaplasia of the human stomach. *Virchows Arch* 2001; 439: 14-20
20 Tatematsu M, Tsukamoto T, Inada K. Stem cells and gastric cancer: role of gastric and intestinal mixed intestinal metaplasia. *Cancer Sci* 2003; 94: 135-141
21 Schier S, Wright NA. Stem cell relationships and the origin of gastrointestinal cancer. *Oncology* 2005; 69 Suppl 1: 9-13
22 Tatematsu M, Fukami H, Yamamoto M, Nakanishi H, Masui T, Kusakabe N, Sakakura T. Clonal analysis of glandular stomach carcinogenesis in C3H/HeN<==>BALB/c chimeric mice treated with N-methyl-N-nitrosourea. *Cancer Lett* 1994; 83: 37-42
23 Yang M, Li K, Lam AC, Yuen PM, Fok TF, Chesterman CN, Chong BH. Platelet-derived growth factor enhances granulopoiesis via bone marrow stromal cells. *Int J Hematol* 2001; 73: 327-334
24 Daley GQ, Goodell MA, Snyder EY. Realistic prospects for stem cell therapeutics. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2003; 398-418
25 Serakinci N, Guldberg P, Burns JS, Abdallah B, Schrodder H, Jensen T, Kassem M. Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation. *Oncogene* 2004; 23: 5095-5098
26 Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, Carlson J, Li H, Cai X, Fox JG, Goldenring JR, Wang TC. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* 2004; 306: 1568-1571
27 Marx J. Medicine. Bone marrow cells: the source of gastric cancer? *Science* 2004; 306: 1455-1457
28 Secko D. Do stem cells cause gastric cancer? *CMAJ* 2005; 172: 325-326
29 Ogasawara N, Tsukamoto T, Inada K, Mizoshita T, Ban N, Yamao K, Joh T, Itoh M, Tatematsu M. Frequent c-Kit gene mutations not only in gastrointestinal stromal tumors but also in interstitial cells of Cajal in surrounding normal mucosa. *Cancer Lett* 2005; 230: 199-210

■同行评价

本文从干细胞与肿瘤的关系、胃干细胞与胃癌、骨髓间充质干细胞与胃癌等三个方面, 系统、全面地综述了干细胞与胃癌关系的研究进展, 所引文献基本涵盖了代表性的研究论文, 内容较为丰富, 文字通顺流畅, 对开展相关研究有较大的参考价值.

电编 张敏 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年6月18日; 14(17): 1714-1720
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

转座子及其相关技术的研究

黄 春, 张万江

■背景资料
转座子是生物进化的基础. 有自发突变且有重要表型的基因都源于转座子的可动性. 转座子的发现和利用是遗传方法学的革命.

黄春, 张万江, 石河子大学医学院病理生理学教研室/石河子大学新疆地方与民族高发病省部共建教育部重点实验室 新疆维吾尔自治区石河子市 832002
国家自然科学基金资助课题, No. 30460129
通讯作者: 张万江, 832002, 新疆维吾尔自治区石河子市, 石河子大学医学院病理生理学教研室/石河子大学新疆地方与民族高发病省部共建教育部重点实验室. zwj1117@sina.com
电话: 0993-2057100
收稿日期: 2006-03-14 接受日期: 2006-05-08

摘要
本综述目的在于对转座子及其相关技术成果进行归纳总结. 人们已经用各种方法, 在生物界各个领域证实了转座子系统广泛存在. 利用转座子特有的转座功能, 将带有标记的转座子插入目的基因甚至基因组, 产生转座子标签技术、转座子定点杂交技术、转座子基因打靶技术和非病毒载体基因增补技术. 结果, 人们利用这些技术, 可以确定基因组的功能, 基因组间的功能差异; 可以改变目的基因的活性, 获得转基因生物; 可以阻断毒力基因, 获得基因疫苗; 可以促进基因整合, 进行基因治疗等. 转座子及其相关技术是后基因组时代, 人们解开基因组功能之谜的强有力武器.

关键词: 转座子系统; 转座子相关技术

黄春, 张万江. 转座子及其相关技术的研究. 世界华人消化杂志 2006;14(17):1714-1720
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1714.asp

0 引言
“睡美人”转座子系统(sleeping beauty transposon system)于1930年由McClintock[1]提出, 因该系统自然状态下发生转座的能力不足, 大多数突变基因处于抑制“睡眠”状态而得名. 现已证实, 该系统普遍存在于生物基因组中, 甚至在人类细胞中也有发现[2]. 他对基因设计和基因调节有很大影响. 作为基因工具, 已大量用于基因功能的研究[3]. 由此发展起来的转座子标签技术, 已实现人工插入突变而不破坏原有基因功能的目的; 转座子定点杂交技术, 可全面确定微生物必需基因组功能差异; 转座子基因打靶技术, 能阻断毒力基因并鉴定他们在感染过程中的功能及其机制; 非病毒载体基因增补技术即转座子“睡美人苏醒”技术, 克服了基因治疗中缺乏转入基因整合, 阻碍长期表达的难题. 本文就转座子及其相关技术应用做一综述.

转座子(transposon)是存在于DNA上可自主复制和移位的基本单位. McClintock[1]首次在玉米中发现, 从此改变了人们对基因组序列稳定性的认识, 打破了遗传物质在染色体上呈线性固定排列的传统理论. 转座子插入新的位点后, 该位点附近的基因即受到抑制呈现隐性的“睡美人”表型. 一旦转座子在转座酶的作用下从这一位点上转走, 该位点的基因隐性表型又恢复为显性表型, 即“睡美人苏醒”. 调控转座酶和转座子活性的系统称为青蛙王子(Frog Prince). 目前认为, 多数生物体有自发突变且有重要表型效应出现的原因, 都源于转座子的可动性, 并且可以导致宿主基因组发生从点突变到染色体重排的一系列变化. 转座子在进化上为建立宿主基因特性起着重要作用. 用特异的开放阅读框捕获技术, 可以使自然散在的转座酶编码基因高表达, 人为催化激活转座子使其苏醒, 执行插入、黏贴、切除等任务, 目前已经应用于微生物、昆虫、植物、动物及人类基因组功能的研究[4]. 例如蛙类基因组含有Tc1水手转座子超家族, 呈自然失活状态, 转座酶与转座增强子序列末端结合, 在HMGB1蛋白协助下, 激活转座子, 使睡美人转座子苏醒[5].

转座子学说使McClintock荣获1983年诺贝尔生理医学奖[6]. 需要指出的是, 并不是所有具有转座子基因的个体都可以发生转座子转座. 转座能力个体间有很大差别, 通常情况下需要一个激活因子Ac. 当细胞中有Ac时转座子才发生转座, 细胞中无Ac时转座子处于静止状态, 他所控制的基因不能突变, 细胞中的染色体突变现象也就停止下来. 转座子的转座活动控制着结构基因的活性, 造成不同细胞内基因活性状态的差异. 这就为生物体发育和分化研究提供了新线索, 也为认识远缘杂交后代及组织培养中出现大量不稳定的变异类型提供了创建新技

术的平台. 转座子学说首次在生物学史上提出基因调控模型[7], 对后来法国著名分子生物学家Monad提出操纵子学说提供了重要启示.

1 转座子

1.1 各种生物转座子的研究情况

1.1.1 病毒基因组 转座子可以直接插入病毒基因组, 重组病毒克隆以确定病毒繁殖必需、非必需基因[8]. 例如, 转座子Tn3插入巨细胞病毒基因序列可以稳定复制而不影响大多数基因功能[9].

1.1.2 细菌基因组 转座子广泛存在于细菌基因组中[10]. 转座子Tn5用于发现新基因、分析基因功能和形成突变基因文库. 随着成功构建具有活性的转座酶Tnp EK/LP, 以及对Tnp催化中心三维结构的深入研究, 转座子Tn5的转座机制已阐明[11]. 转座子研究最多的革兰氏阳性菌是结核杆菌[12-17]. 利用Himar1水手转座子[18]的插入, 不但确定了不同分枝菌的基因功能[19], 而且还确定了在体外、体内经过巨噬细胞吞噬后, 残存结核杆菌必需基因的功能[20]. 目前发现, 分枝杆菌属中生存必需基因呈遗传同质性, 即具有高度保守的同源序列[21]. 用标示碱性磷酸酶的转座子分析革兰氏阳性菌分泌蛋白的编码基因[22]时发现, 转座子在分析基因调控、蛋白分泌和细菌毒力方面有重要价值. 在需氧环境, 用他插入化脓性链球菌发现, 编码分泌蛋白的基因表达增高[22]. 确定了链球菌属编码输出蛋白的基因[23], 表皮葡萄球菌特征性的非黏液样蛋白和膜内蛋白编码基因[24], 葡萄球菌的肠毒素基因组[25], 金黄色葡萄球菌参与脓肿形成的71条毒力基因[26]. 用转座子相关技术, 找到单核细胞增多性李氏菌在高渗下不能生长的关键基因——rel基因[27].

对革兰氏阴性菌的研究发现, 人们既可以根据目的基因的不同设计和修饰转座子, 也可以用转座子多重插入突变分步骤研究基因组[28]. 大肠杆菌的遗传物质中存在大量转座进化形成的REP序列, 保守、简单、规律性很强[29], 在营养丰富培养基中生长, 有620条保守的必需基因[30]. 插入肠球菌基因组确定了万古霉素抗药性基因oriT[31]. 沙门氏菌需要490条必需基因[32], 致病毒力岛1在维持全身感染中起重要作用, 而持续感染是由于特定的毒力基因在感染的特定时间顺时表达的原故[33]. 幽门螺旋杆菌感染中, 不仅有IS605的插入突变, 还存在其他转座子基因成分参与致病岛的分割[34], 其中有4.5%的基因与毒力相关[35]. 绿脓杆菌插入转座子分析发现有400条必需基因[36]. 淋病双球菌铁代谢相关基因有203条, 30%操纵子级联调控铁代谢[37], 确定了该菌5个与微小移动元件相关的基因[38], 以及菌毛素糖化作用和转变的特征性基因[39]. 流感嗜血杆菌侵袭必需基因有25条, 其中11条基因参与主要代谢酶的编码[40]. 痢疾杆菌致病毒力岛均携带有可移动遗传元件, 他与侵袭性大质粒之间在进化及调控方面关系密切[41]. 副溶血性弧菌的研究是转座子插入单基因突变的例证[42]. 研究厌氧菌脱硫弧菌的脱硫作用认为, 微小转座子Tn10连接pBSL180载体插入基因组, 可检测厌氧菌生存必需基因[43]. 水手转座子Himar1插入双曲钩端螺旋体确定了FecA和FeoB基因参与的铁离子运输系统[44]. 通过全基因组插入转座子序列确定了疏螺旋体表型突变的必需基因[45].

1.1.3 真菌基因组 大量可移动的真菌DNA片段分布、插入位置、拷贝数有显著不同, 导致真菌菌株或群体内的多样性. 以丝状真菌研究为例, 目前已在19个丝状真菌中发现了52个不同类型的转座子[46]. 通用微小Tn7衍生的转座子插入酵母基因组, 既可以断裂基因造成单基因突变, 也可以构建酵母突变基因文库[47]. 原虫的研究中, 用微小Tn5衍生的转座子克隆注入疟原虫虫体内, 开创了研究寄生虫必需基因组的方法[48], 新杆状线虫基因组特征也得到确认[49].

1.1.4 昆虫基因组 目前已经用基因组学区分了果蝇常染色质中的不同转座子[50]. 果蝇质粒P因子是目前受到关注的DNA转座子, 该因子具有易动性和对内部序列的强烈修饰作用, 可用于确认、克隆基因以及安置基因回到基因组. 将目的基因置于P因子中, 在转座酶的作用下插入前胚盘染色体上可产生转基因果蝇[51].

1.1.5 植物基因组 转座子不仅能在植物本基因组中转座, 也能转入其他植物使基因失活, 诱导产生表型突变株. 小麦中发现有黑麦的一条异源转座子导入, 推测异源转座在生物中广泛存在[52]. 玉米的Ac/Ds转座子家族是研究较为深入的植物转座子[53]. 水稻中发现有极高活性的转座子, 对建立水稻基因克隆和探测功能、诱发突变有很大促进作用[54]. 通过正反双向转座子插入突变株的方法, 确定牵牛花B、C和D花器的功能与SEPALLATA样MADS基因家族有关[55]. 结合基因芯片、差异显示技术确定依赖茉莉花素的花药基因[56].

1.1.6 动物基因组 DNA转座子已用于脊椎动物

■**研发前沿**
转座子技术是后基因组时代发展最快的技术之一, 可确定必需基因组功能并有望用于基因修复治疗. 目前正试图用于克隆转基因生物.

■相关报道
转座子使基因标记成为现实, 为研究基因以及基因组打开了方法的大门. 有大量文献报道该技术用于研究基因组功能、鉴别基因群体多样性和基因修复治疗等方面.

功能基因组学的研究[57]. 大量无功能的假基因存在于动物基因组中, 目前认为是整合了大量反转录转座子的结果[58]. 自然选择没有把他们清除, 原因是有利于基因组进化. 反转录转座子是插入突变、多态性和重复序列产生的原因, 也是基因组保持可塑性的原因. 斑马鱼基因组插入转座子可迅速确定其必需基因[59-60].

1.1.7 人类基因组 研究发现, 类人猿的t RNA 76个核苷酸序列中有47个与人类Alu家族核苷酸序列相似. 在演化过程中发生基因突变, 使类人猿t RNA形成了更类似于Alu家族的结构, 揭示了转座子在高等动物基因组中的作用[61]. 用转座子相关技术, 确定了在人类视网膜优先表达的特异性基因[62].

总之, 生物进化从分子水平讲, 其实质就是DNA的扩增和重组. 转座是生物进化的重要手段. 对于转座的机制, 长期以来形成了一种固定模式, 即转座是通过反向转录酶的中介作用, 以DNA为实体插入转座子的模式. 其形式有2种: (1)RNA→DNA→插入点; (2)DNA→RNA→DNA→插入点. 这种理论解释了长序列基因的转座. 而对于大量的短片段的、亚基因的转座却是以RNA为中介的调控反应结果, 又称为调控转座, 即先有调控后有转座, 转座是调控反应的结果. 所以有学者认为, 转座的实体应当是RNA, 而不是DNA, 并且不一定要通过反向转录酶为中介.

1.2 转座子特征与分类 基因转座时发生的插入作用有一个普遍的特征, 那就是受体分子中有一段3-12 bp的靶序列DNA会自我复制, 使插入的转座子位于两个重复的靶序列之间. 不同转座子的靶序列长度不同, 但对于一个特定的转座子来说, 他所复制的靶序列长度都是一样的. 如IS1两翼总有9个碱基对的靶序列, 而Tn3两端总有5 bp的靶序列. 转座子分为简单转座子和复合式转座子. 因没有任何宿主基因, 简单转座子被直接称为插入序列, 是染色体或质粒DNA的正常组成部分. 插入序列都是可以独立存在的单元, 带有协助自身移动的蛋白. 复合式转座子是另一类带有某些抗药性基因或其他宿主基因的转座子, 其两翼往往是两个相同或高度同源的插入序列. 一旦形成复合转座子, 其功能即被修饰, 插入序列就只能作为复合体移动.

2 转座子相关技术

2.1 转座子分离方法 有4种方法用来分离转座子: (1)转座子诱捕法, 此法适用于分离具有相当高的整合和切割频率的转座子. 硝酸盐还原酶基因特别适用于这种方法, 转座子可以通过PCR扩增来分离. (2)Southern杂交法, 此种方法需要有适当的探针, 用于检测已知的转座子. (3)重复DNA序列鉴定法, 适用于高拷贝数的无论是否有活性的转座子. (4)PCR扩增法, 对已知序列的转座子可以设计引物直接PCR扩增.

2.2 转座子标签技术 是根据转座子随机插入引起突变的特性而发展起来的分离未知基因的方法. 转座子整合进入启动子或编码区, 使基因突变失活, 产生一种新的表型, 再根据转座子上设计的已知序列标签克隆失活的基因, 分离转座子和突变基因的侧翼区鉴定该基因, 是定向研究基因的有效方法[63-66], 也是目前开展基因定位及其功能研究, 特别是一系列调控基因研究的首选方法[67]. 转座子标签的设计基本原则是: 只保留转座子上完成转座过程的必需片段, 同时加入筛选标记与报道基因. 该技术具有快速、准确、规模化寻找与某一表型相关基因的特点.

2.3 转座子定点杂交技术 2001年, 哈佛大学Sassetti *et al*[68]将转座子标签技术和基因芯片技术结合起来, 创建转座子定点杂交技术(transposon site hybridization). 原理是: 在一个突变体系中, 将所有的转座子插入靶序列, 同时用DNA基因芯片绘图技术, 确定不同条件下的样本全基因组之间的差别, 迅速地判断其功能特征的技术. 通过对需要比较的两个样本全基因组含有T和A的碱基之间, 随机插入人工合成的转座子序列标签, 酶切含有标签的各种靶序列. 将已知样本制备成基因芯片探针, 与未知样本定点杂交, 层级聚类数据分析得到有功能差异的基因分析图[69-70]. 转座子定点杂交技术的特点是: 转座子插入使基因片段断裂均匀化而利于杂交, 克服了单纯使用芯片时, 基因片段过大或不均匀, 导致杂交困难和杂交不完全的缺点.

2.4 转座子基因打靶技术 是将转座子作为核酸诱变剂插入目的片段, 再将这些突变的基因片段导入生物体中, 通过同源重组使基因组中相应的基因发生突变的技术. 大规模的转座子突变直接应用于内源和外源转座子控制的生物中, 用以阻断病原微生物毒力相关基因, 并确定他们在感染过程中的功能及致病机制. 对于序列已知的目的基因, 可先用转座子插入目的片段, 通过转导将该片段引入宿主细胞内, 然后筛选突变的DNA序列替换野生型亲本DNA序列, 通

过对突变基因的测试来研究相关基因的功能[71].

2.5 基因增补技术即非病毒转座子“睡美人苏醒”技术 “睡美人”转座子系统中含有两个倒置重复/直接重复(IR/DR)序列. 导入基因插在两个IR/DR之间, 携带导入基因的非病毒质粒载体连接在IR/DR的末端作为转座酶的作用位点, 定位于IR/DR之外的转座酶活化, 催化导入基因整合入宿主基因组, “睡美人”苏醒, 在两个IR/DR末端切除DNA产生环状转座子/转座酶复合物, “睡美人”转座子整合入宿主靶基因组DNA中, 并在每个IR/DR末端带上特征性TA标志. 该技术的特点是: 利用了能与DNA特异性识别位点相连并切割转座子的重组转移酶即转座子/转座酶复合物, 为稳定转入并整合长期表达提供了基础, 使基因永久修复成为可能[72].

3 转座子技术的应用

3.1 确定微生物基因组功能 应用转座子及其相关技术, 全面确定了微生物基因组功能特征, 特别是分支菌属基因组功能. 例如, 结核分支杆菌模式菌株的必需基因组及其相关功能均用此类方法得到确认[73-74].

3.2 鉴别菌株及群体多样性 转座子通常限制性地分布于特定的真菌菌株或群体中, 可以作为特定菌株的诊断工具. 已用于丝状真菌群体多样性分析[46]. 在医药工业方面已用于有益菌株的鉴别, 在植物病理学方面已用于鉴别特定的病原体.

3.3 生态环境污染的生物修复 由于基因的可变性及转座子的遗传调控, 许多微生物能够利用人工合成的化学物质[75], 与微生物分解代谢相关的基因往往与插入元件相连[76]. 当环境污染时, 转座子转移频率提高, 增加了微生物种群的生物降解潜力[77].

3.4 转基因生物的克隆 在细胞工程中, 转座子可作为有力的工具和基因载体系统用于克隆转基因生物. 基因组插入质粒P因子已成功克隆转基因果蝇[51]. 通常认为, 转座子的插入能引起新的突变体形成, 但其副作用也许会抵消由转基因提供的任何优势, 以可移动DNA片段作为载体尚存在转移基因结果的不稳定现象和内源跳跃基因的相互影响. 因此, 这方面的应用还处于探索阶段.

3.5 基因修复与转座子的基因治疗 胚胎干细胞同源重组、基因突变定位已发展成为研究人类疾病动物模型的有效研究工具. 干细胞的多向分化性结合“睡美人”转座子的定向点特异性修复能力, 使基因修复且无需进行体外细胞培养治疗多种疾病成为可能. 基于双链Tn5转座子插入的染色体缺失系统可用于少量基因组制备和必需基因的分析[78]. Dupuy *et al*[79]用鼠胚胎干细胞中的“睡美人”转座子作为细菌诱变鼠的遗传分析工具, 非同源片段插入子代基因位点导致基因修复. Yant *et al*[80]用“睡美人”转座子整合于血友病成年鼠体细胞染色体功能基因中, 用Ⅸ因子转座子的供体质粒和“睡美人”转座酶辅助质粒组成的反转录系统, 可使Ⅸ因子稳定在治疗水平. Paul *et al*[81]目前正尝试应用顺式质粒转移系统, 使“睡美人”转座子在人类脐带血干细胞中稳定表达. 干细胞基因修复涉及单核苷酸多态性改变而可能治疗癌变. 此外, 利用胎儿体内直接注射或体外控制胚胎干细胞发育进行宫内基因修复, 也为此类疾病的预防和治疗提供了可能[82]. 目前, 基因修复技术已用于镰状细胞贫血和地中海贫血等血液病的治疗[83].

■**创新盘点**
本文系统介绍了转座子及其相关技术的原理和应用, 对该领域的最新成果进行了归纳总结.

4 参考文献

1 McClintock B. A cytological demonstration of the location of an inter change between two non-homologous chromosomes of zea mays. *Proc Natl Acad Sci USA* 1930; 16: 791-796

2 Ivics Z, Hackett PB, Plasterk RH, Izsvak Z. Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell* 1997; 91: 501-510

3 Schmidt T. LINEs, SINEs and repetitive DNA: non-LTR retrotransposons in plant genomes. *Plant Mol Biol* 1999; 40: 903-910

4 Miskey C, Izsvak Z, Plasterk RH, Ivics Z. The Frog Prince: a reconstructed transposon from Rana pipiens with high transpositional activity in vertebrate cells. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 6873-6881

5 Ivics Z, Kaufman CD, Zayed H, Miskey C, Walisko O, Izsvak Z. The Sleeping Beauty transposable element: evolution, regulation and genetic applications. *Curr Issues Mol Biol* 2004; 6: 43-55

6 McClintock B. The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 1950; 36: 344-355

7 Izsvak Z, Ivics Z, Plasterk RH. Sleeping Beauty, a wide host-range transposon vector for genetic transformation in vertebrates. *J Mol Biol* 2000; 302: 93-102

8 Vilen H, Aalto JM, Kassinen A, Paulin L, Savilahti H. A direct transposon insertion tool for modification and functional analysis of viral genomes. *J Virol* 2003; 77: 123-134

9 Lee M, Abenes G, Zhan X, Dunn W, Haghjoo E, Tong T, Tam A, Chan K, Liu F. Genetic analyses of gene function and pathogenesis of murine cytomegalovirus by transposon-mediated mutagenesis. *J Clin Virol* 2002; 25 Suppl 2: S111-122

10 Hayes F. Transposon-based strategies for microbial functional genomics and proteomics. *Annu Rev*

■应用要点
作为基因工具，转座子技术主要用于基因组功能的研究，生态环境污染的生物修复，基因治疗的基础研究，目前有用于克隆转基因生物的趋势.

Genet 2003; 37: 3-29
11 唐江涛, 何勇强, 唐纪良. 细菌转座子Tn5转座机理的研究进展. 广西农业生物科学 2003; 4: 316-321
12 Flores AR, Parsons LM, Pavelka MS Jr. Characterization of novel Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium smegmatis mutants hypersusceptible to beta-lactam antibiotics. *J Bacteriol* 2005; 187: 1892-1900
13 Ruley KM, Ansede JH, Pritchett CL, Talaat AM, Reimschuessel R, Trucksis M. Identification of Mycobacterium marinum virulence genes using signature-tagged mutagenesis and the goldfish model of mycobacterial pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 232: 75-81
14 Malaga W, Perez E, Guilhot C. Production of unmarked mutations in mycobacteria using site-specific recombination. *FEMS Microbiol Lett* 2003; 219: 261-268
15 Hotter GS, Wards BJ, Mouat P, Besra GS, Gomes J, Singh M, Bassett S, Kawakami P, Wheeler PR, de Lisle GW, Collins DM. Transposon mutagenesis of Mb0100 at the ppe1-nrp locus in Mycobacterium bovis disrupts phthiocerol dimycocerosate (PDIM) and glycosylphenol-PDIM biosynthesis, producing an avirulent strain with vaccine properties at least equal to those of M. bovis BCG. *J Bacteriol* 2005; 187: 2267-2277
16 Sassetti CM, Boyd DH, Rubin EJ. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol* 2003; 48: 77-84
17 Waddell SJ, Chung GA, Gibson KJ, Everett MJ, Minnikin DE, Besra GS, Butcher PD. Inactivation of polyketide synthase and related genes results in the loss of complex lipids in Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *Lett Appl Microbiol* 2005; 40: 201-206
18 Robinson KA, Goyard S, Beverley SM. *In vitro* shuttle mutagenesis using engineered mariner transposons. *Methods Mol Biol* 2004; 270: 299-318
19 Stewart GR, Patel J, Robertson BD, Rae A, Young DB. Mycobacterial mutants with defective control of phagosomal acidification. *PLoS Pathog* 2005; 1: 269-278
20 Lamichhane G, Zignol M, Blades NJ, Geiman DE, Dougherty A, Grosset J, Broman KW, Bishai WR. A postgenomic method for predicting essential genes at subsaturation levels of mutagenesis: application to Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 7213-7218
21 Lamichhane G, Tyagi S, Bishai WR. Designer arrays for defined mutant analysis to detect genes essential for survival of Mycobacterium tuberculosis in mouse lungs. *Infect Immun* 2005; 73: 2533-2540
22 Gibson CM, Caparon MG. Alkaline phosphatase reporter transposon for identification of genes encoding secreted proteins in gram-positive microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 928-932
23 Clancy A, Lee MH, Jones AL, Rubens CE. Construction and characterization of transposon TnphoZ for the identification of genes encoding exported proteins in Streptococcus agalactiae. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 241: 257-264
24 Knobloch JK, Nedelmann M, Kiel K, Bartscht K, Horstkotte MA, Dobinsky S, Rohde H, Mack D. Establishment of an arbitrary PCR for rapid identification of Tn917 insertion sites in Staphylococcus epidermidis: characterization of biofilm-negative and nonmucoid mutants. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 5812-5818
25 Sergeev N, Volokhov D, Chizhikov V, Rasooly A. Simultaneous analysis of multiple staphylococcal enterotoxin genes by an oligonucleotide microarray assay. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2134-2143
26 Bae T, Banger AK, Wallace A, Glass EM, Aslund F, Schneewind O, Missiakas DM. Staphylococcus aureus virulence genes identified by bursa aurealis mutagenesis and nematode killing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 12312-12317
27 Okada Y, Makino S, Tobe T, Okada N, Yamazaki S. Cloning of rel from Listeria monocytogenes as an osmotolerance involvement gene. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 1541-1547
28 Kang Y, Durfee T, Glasner JD, Qiu Y, Frisch D, Winterberg KM, Blattner FR. Systematic mutagenesis of the *Escherichia coli* genome. *J Bacteriol* 2004; 186: 4921-4930
29 刘仁元, 刘吉元, 廖端芳. 大肠杆菌REP序列的进化机理及其对调控、转座机制的证明. 南华大学学报·医学版 2002; 30: 260-268
30 Gerdes SY, Scholle MD, Campbell JW, Balazsi G, Ravasz E, Daugherty MD, Somera AL, Kyrpides NC, Anderson I, Gelfand MS, Bhattacharya A, Kapatral V, D'Souza M, Baev MV, Grechkin Y, Mseeh F, Fonstein MY, Overbeek R, Barabasi AL, Oltvai ZN, Osterman AL. Experimental determination and system level analysis of essential genes in *Escherichia coli* MG1655. *J Bacteriol* 2003; 185: 5673-5684
31 Tomita H, Ike Y. Genetic analysis of transfer-related regions of the vancomycin resistance Enterococcus conjugative plasmid pHTbeta: identification of oriT and a putative relaxase gene. *J Bacteriol* 2005; 187: 7727-7737
32 Knuth K, Niesalla H, Hueck CJ, Fuchs TM. Large-scale identification of essential Salmonella genes by trapping lethal insertions. *Mol Microbiol* 2004; 51: 1729-1744
33 Lawley TD, Chan K, Thompson LJ, Kim CC, Govoni GR, Monack DM. Genome-wide screen for salmonella genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS Pathog* 2006; 2: e11
34 刘炯, 许国铭, 李兆申, 屠振兴, 李淑德, 龚燕芳. 插入序列IS605与cag致病岛分割在中国人幽门螺杆菌中的不一致性. 第二军医大学学报 2002; 23: 170-172
35 Salama NR, Shepherd B, Falkow S. Global transposon mutagenesis and essential gene analysis of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 2004; 186: 7926-7935
36 Jacobs MA, Alwood A, Thaipisuttikul I, Spencer D, Haugen E, Ernst S, Will O, Kaul R, Raymond C, Levy R, Chun-Rong L, Guenthner D, Bovee D, Olson MV, Manoil C. Comprehensive transposon mutant library of Pseudomonas aeruginosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 14339-14344
37 Ducey TF, Carson MB, Orvis J, Stintzi AP, Dyer DW. Identification of the iron-responsive genes of Neisseria gonorrhoeae by microarray analysis in defined medium. *J Bacteriol* 2005; 187: 4865-4874
38 Snyder LA, Davies JK, Saunders NJ. Microarray genomotyping of key experimental strains of Neisseria gonorrhoeae reveals gene complement diversity and five new neisserial genes associated with Minimal Mobile Elements. *BMC Genomics* 2004; 5: 23
39 Power PM, Roddam LF, Rutter K, Fitzpatrick SZ,

Srikhanta YN, Jennings MP. Genetic characterization of pilin glycosylation and phase variation in Neisseria meningitidis. *Mol Microbiol* 2003; 49: 833-847
40 Herbert MA, Hayes S, Deadman ME, Tang CM, Hood DW, Moxon ER. Signature Tagged Mutagenesis of Haemophilus influenzae identifies genes required for *in vivo* survival. *Microb Pathog* 2002; 33: 211-223
41 刘红, 杨帆, 张笑冰, 张继瑜, 杨国威, 董杰, 薛颖, 侯云德, 袁正宏, 闻玉梅, 徐建国, 陈洪松, 马大龙, 王宇, 杨剑, 沈岩, 强伯勤, 吴洪涛, 贺秉坤, 吕渭川, 金奇. 痢疾杆菌全基因组序列及基因组岛的分析. 中国工程科学 2002; 4: 40-47
42 Stewart BJ, McCarter LL. Lateral flagellar gene system of Vibrio parahaemolyticus. *J Bacteriol* 2003; 185: 4508-4518
43 Groh JL, Luo Q, Ballard JD, Krumholz LR. A method adapting microarray technology for signature-tagged mutagenesis of Desulfovibrio desulfuricans G20 and Shewanella oneidensis MR-1 in anaerobic sediment survival experiments. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 7064-7074
44 Louvel H, Saint Girons I, Picardeau M. Isolation and characterization of FecA- and FeoB-mediated iron acquisition systems of the spirochete Leptospira biflexa by random insertional mutagenesis. *J Bacteriol* 2005; 187: 3249-3254
45 Stewart PE, Hoff J, Fischer E, Krum JG, Rosa PA. Genome-wide transposon mutagenesis of Borrelia burgdorferi for identification of phenotypic mutants. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 5973-5979
46 张欣, 谢艺贤. 丝状真菌转座子研究进展. 热带农业科学 2004; 24: 64-69
47 Kumar A, Seringhaus M, Biery MC, Sarnovsky RJ, Umansky L, Piccirillo S, Heidtman M, Cheung KH, Dobry CJ, Gerstein MB, Craig NL, Snyder M. Large-scale mutagenesis of the yeast genome using a Tn7-derived multipurpose transposon. *Genome Res* 2004; 14: 1975-1986
48 Sakamoto H, Thiberge S, Akerman S, Janse CJ, Carvalho TG, Menard R. Towards systematic identification of Plasmodium essential genes by transposon shuttle mutagenesis. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: e174
49 Williams DC, Boulin T, Ruaud AF, Jorgensen EM, Bessereau JL. Characterization of Mos1-mediated mutagenesis in Caenorhabditis elegans: a method for the rapid identification of mutated genes. *Genetics* 2005; 169: 1779-1785
50 Kaminker JS, Bergman CM, Kronmiller B, Carlson J, Svirskas R, Patel S, Frise E, Wheeler DA, Lewis SE, Rubin GM, Ashburner M, Celniker SE. The transposable elements of the Drosophila melanogaster euchromatin: a genomics perspective. *Genome Biol* 2002; 3: RESEARCH0084
51 解生勇. 果蝇P转座因子的研究进展. 遗传 2000; 22: 437-440
52 罗培高, 张怀渝, 张怀琼, 任正隆. 异源转座子存在的证据. 分子植物育种 2004; 2: 829-832
53 Peacock WJ, Dennis ES, Rhoades MM, Pryor AJ. Highly repeated DNA sequence limited to knob heterochromatin in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 4490-4494
54 王文明, 邢少辰, 郑先武, 赵显峰, 朱立煌. 水稻双子房突变体中类*copia*逆转座子同源序列的研究. 植物学报 2000; 42: 43-49
55 Vandenbussche M, Zethof J, Souer E, Koes R, Tornielli GB, Pezzotti M, Ferrario S, Angenent GC, Gerats T. Toward the analysis of the petunia MADS box gene family by reverse and forward transposon insertion mutagenesis approaches: B, C, and D floral organ identity functions require SEPALLATA-like MADS box genes in petunia. *Plant Cell* 2003; 15: 2680-2693
56 Mandaokar A, Kumar VD, Amway M, Browse J. Microarray and differential display identify genes involved in jasmonate-dependent anther development. *Plant Mol Biol* 2003; 52: 775-786
57 Miskey C, Izsvak Z, Kawakami K, Ivics Z. DNA transposons in vertebrate functional genomics. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 629-641
58 Brosius J. How significant is 98.5% 'junk' in mammalian genomes? *Bioinformatics* 2003; 19 Suppl 2: II35
59 Golling G, Amsterdam A, Sun Z, Antonelli M, Maldonado E, Chen W, Burgess S, Haldi M, Artzt K, Farrington S, Lin SY, Nissen RM, Hopkins N. Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. *Nat Genet* 2002; 31: 135-140
60 Amsterdam A. Insertional mutagenesis in zebrafish. *Dev Dyn* 2003; 228: 523-534
61 Okada N. Transfer RNA-like structure of the human Alu family: implications of its generation mechanism and possible functions. *J Mol Evol* 1990; 31: 500-510
62 Chowers I, Gunatilaka TL, Farkas RH, Qian J, Hackam AS, Duh E, Kageyama M, Wang C, Vora A, Campochiaro PA, Zack DJ. Identification of novel genes preferentially expressed in the retina using a custom human retina cDNA microarray. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 3732-3741
63 Berg P, Singer MF. The recombinant DNA controversy: twenty years later. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 9011-9013
64 Kim Y, Harker AR. Cloning and characterization of the regulatory genes phlR1 and phlR2 involved in phenol metabolism from Alcaligenes eutrophus JMP134. *Mol Cells* 1997; 7: 620-629
65 Vermeij P, Wietek C, Kahnert A, Wuest T, Kertesz MA. Genetic organization of sulphur-controlled aryl desulphonation in Pseudomonas putida S-313. *Mol Microbiol* 1999; 32: 913-926
66 McNamara PJ, Milligan-Monroe KC, Khalili S, Proctor RA. Identification, cloning, and initial characterization of rot, a locus encoding a regulator of virulence factor expression in Staphylococcus aureus. *J Bacteriol* 2000; 182: 3197-3203
67 De Pina K, Desjardin V, Mandrand-Berthelot MA, Giordano G, Wu LF. Isolation and characterization of the nikR gene encoding a nickel-responsive regulator in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1999; 181: 670-674
68 Sassetti CM, Boyd DH, Rubin EJ. Comprehensive identification of conditionally essential genes in mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 12712-12717
69 Belosludtsev YY, Bowerman D, Weil R, Marthandan N, Balog R, Luebke K, Lawson J, Johnston SA, Lyons CR, Obrien K, Garner HR, Powdrill TF. Organism identification using a genome sequence-independent universal microarray probe set. *Biotechniques* 2004; 37: 654-658, 660
70 Karaman MW, Groshen S, Lee CC, Pike BL, Hacia

■同行评价

本文介绍了转座子相关研究进展, 可以为广大科研工作者进行基因调控研究提供新的研究路线和参考.

JG. Comparisons of substitution, insertion and deletion probes for resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: e33
71 Copeland NG, Jenkins NA, Court DL. Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 769-779
72 Richardson PD, Augustin LB, Kren BT, Steer CJ. Gene repair and transposon-mediated gene therapy. *Stem Cells* 2002; 20: 105-118
73 Lee PS, Lin DC, Moriya S, Grossman AD. Effects of the chromosome partitioning protein Spo0J (ParB) on oriC positioning and replication initiation in Bacillus subtilis. *J Bacteriol* 2003; 185: 1326-1337
74 Rengarajan J, Bloom BR, Rubin EJ. Genome-wide requirements for Mycobacterium tuberculosis adaptation and survival in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 8327-8332
75 Tsuda M, Minegishi K, Iino T. Toluene transposons Tn4651 and Tn4653 are class II transposons. *J Bacteriol* 1989; 171: 1386-1393
76 Lauf U, Muller C, Herrmann H. The transposable elements resident on the plasmids of Pseudomonas putida strain H, Tn5501 and Tn5502, are cryptic transposons of the Tn3 family. *Mol Gen Genet* 1998; 259: 674-678
77 Asturias JA, Diaz E, Timmis KN. The evolutionary relationship of biphenyl dioxygenase from gram-positive Rhodococcus globerulus P6 to multicomponent dioxygenases from gram-negative bacteria. *Gene* 1995; 156: 11-18
78 Goryshin IY, Naumann TA, Apodaca J, Reznikoff WS. Chromosomal deletion formation system based on Tn5 double transposition: use for making minimal genomes and essential gene analysis. *Genome Res* 2003; 13: 644-653
79 Dupuy AJ, Clark K, Carlson CM, Fritz S, Davidson AE, Markley KM, Finley K, Fletcher CF, Ekker SC, Hackett PB, Horn S, Largaespada DA. Mammalian germ-line transgenesis by transposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 4495-4499
80 Yant SR, Wu X, Huang Y, Garrison B, Burgess SM, Kay MA. High-resolution genome-wide mapping of transposon integration in mammals. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 2085-2094
81 Paul DS, Harmon AW, Winston CP, Patel YM. Calpain facilitates GLUT4 vesicle translocation during insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes. *Biochem J* 2003; 376: 625-632
82 Kaneda H, Hayashi J, Takahama S, Taya C, Lindahl KF, Yonekawa H. Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4542-4546
83 Zanjani ED, Flake AW, Rice H, Hedrick M, Tavassoli M. Long-term repopulating ability of xenogeneic transplanted human fetal liver hematopoietic stem cells in sheep. *J Clin Invest* 1994; 93: 1051-1055

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》

本刊讯 《世界华人消化杂志》为中国科技核心期刊、2003年百种中国杰出学术期刊、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国科技论文统计源期刊,《世界华人消化杂志》发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》, 俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录.

本刊主要报道食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、中医中药、中西医结合等胃肠病学和肝病学的新进展及原创性等基础或临床研究的文章.

《世界华人消化杂志》2006年由北京报刊发行局发行, 国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14–1260/R, 邮发代号82-262, 出版日期8, 18, 28日, 月价72.00, 年价864元. 欢迎广大消化科医务工作者及科教研人员、各大图书馆订阅. 联系地址: 100023 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社. 联系电话: 010-85381901-1020; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; 网址: www.wjgnet.com.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年6月18日; 14(17): 1721-1725
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

慢性心力衰竭中胃肠系统变化的意义

于佳慧, 王岚峰

于佳慧, 王岚峰, 哈尔滨医科大学第一临床医院心内科 黑龙江省哈尔滨市 150001
通讯作者: 王岚峰, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第一临床医院心内科. carolineyjh@yahoo.com.cn
电话: 0451-53643849-5707
收稿日期: 2006-03-16 接受日期: 2006-04-01

摘要

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是多脏器受累的临床综合征, 其中胃肠道系统的变化逐渐引起人们关注. 心衰发生后, 胃肠道低灌注, 胃肠黏膜缺血缺氧, 肠道屏障功能障碍, 从而发生肠道细菌移位和肠源性内毒素血症. 内毒素激活体内细胞因子和炎性介质的释放, 此过程可进一步引起肠道屏障功能障碍和心肌细胞损害, 从而形成恶性循环, 引起心衰进展. 国内外有研究发现, 对心衰胃肠道发生的改变进行干预与治疗, 对改善心衰症状, 阻止心衰进展具有良好效果.

关键词: 胃肠道系统; 慢性心力衰竭

于佳慧, 王岚峰. 慢性心力衰竭中胃肠系统变化的意义. 世界华人消化杂志 2006;14(17):1721-1725
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1721.asp

0 引言

近年来, 随着对慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)的基础和临床研究的深入, 心衰不再被单纯看成以血流动力学障碍为特征的综合征, 神经体液系统以及细胞因子在心衰的发生和发展中的作用逐渐得到人们的关注[1-5]. Rauchhaus *et al*[6-7]认为心衰患者体内炎性介质和细胞因子改变与心衰严重程度以及预后息息相关. 胃肠道是人体内最大的“内毒素库”, 心衰发生后, 肠源性内毒素血症与炎性介质的诱生密切相关[8-9]. 因此, 有研究认为, 胃肠道既是心衰过程中易损伤的靶器官, 又是诱发心衰进展的始动器官[10]. 了解胃肠道系统在CHF中的发生、发展, 并采取相应的临床监测和防治措施, 对于改善心衰症状, 阻止心衰进展, 从而改善心衰患者的预后具有重大意义[11-14]. 本文将对胃肠道系统在CHF中的发生、发展, 对CHF的影响以及相关治疗进展进行综述.

1 胃肠道血供减少和功能障碍

1.1 胃肠道血液供应减少 胃肠道血供丰富, 其血液供应量占全身总量的30%[14]. 全身血流减少10%即可导致全胃肠道血流减少40%[15]. 胃肠道黏膜通过绒毛和微绒毛结构产生大量的吸收面积(100 m^2), 是胃肠道进行新陈代谢的主要场所, 肠黏膜及绒毛的血流分别占胃肠道血液供应量的80%和60%, 因此, 肠黏膜以及小肠绒毛是胃肠道低灌注最敏感部位. 同时小肠绒毛具有特殊的解剖学特点: 小肠绒毛营养血管呈发夹状, 发夹顶端位于绒毛顶部, 以“逆流”形式供血, 血供较差. 当流速低时, 在绒毛根部可产生微动、静脉之间的短路, 使一部分氧直接进入微静脉[16]. 由于这种解剖结构, 小肠绒毛顶端组织氧分压最低, 即使小的血流改变也可引起该部位的缺血[17]. 此外, 胃肠道交感神经分布丰富, 心衰发生后, 前毛细血管阻力血管和后毛细血管容量血管的收缩, 导致内脏灌注延迟和减少[18]. Secchi *et al*[19]发现, 心衰患者, 胃肠道最早发生缺血缺氧, 又最迟得到恢复, 最早发生受损或衰竭.

1.2 胃肠道屏障功能障碍 CHF发生后, 胃肠道低灌注, 出现缺血, 其最早的表现即为肠道通透性增高[20]. 上皮细胞膜及细胞间连接断裂, 黏膜细胞旁路通道(紧密连接)以及跨膜通道失去选择性功能, 导致肠道通透性增加. 肠道通透性增高发生在肠道黏膜细胞发生形态学改变之前[21]. 当肠绒毛进一步缺血坏死, 顶部供血较差的部位首先出现细胞坏死, 继而全层脱落而形成溃疡, 黏膜下水肿, 细胞分泌黏液减少, 胃肠道相关淋巴组织分泌免疫球蛋白减少, 肠道黏膜机械屏障, 免疫屏障以及黏液屏障功能均出现障碍.

2 心衰与胃肠道

2.1 细菌移位与内毒素血症 当肠道屏障功能进

■背景资料
慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是多脏器受累的临床综合征, 在心衰的发生、发展机制中, 神经体液系统以及细胞因子占有重要地位. 心衰发生后, 胃肠道黏膜缺血缺氧, 发生胃肠屏障功能障碍, 细菌移位和肠源性内毒素血症. 内毒素激活体内细胞因子和炎性介质的释放, 在心衰发生、发展中具有重大意义.

■研发前沿
目前研究中, 心衰患者胃肠道改变以及肠源性内毒素血症对心衰进展的影响以及预后逐渐得到人们的关注. 很多研究尝试针对胃肠道发生的改变进行相应的临床治疗.

一步遭到破坏, 大分子物质细菌或其产生的内毒素能够穿越损伤的肠黏膜进入血液循环, 定植于肠道外的肠系膜淋巴结以及远处肝脏、脾脏等器官, 此过程称为细菌移位(bacterial translocation, BT)[22-23]. 在细菌移位过程中, 细菌最初黏附在肠上皮细胞, 随后使黏膜上皮脱落, 从而允许细菌透过达到细胞基底膜, 进一步通过淋巴管系统播散至远处组织及器官[24-26]. 内毒素分子比细菌小, 更容易通过受损黏膜, 因此, 内毒素移位更早于细菌移位, 并通过门静脉系统进入血液循环, 从而产生内毒素血症[27]. 有研究认为, 细菌内毒素在心衰中的作用比细菌更为重要[28]. 内毒素激活全身免疫系统, 单核/巨噬细胞、中性粒细胞、内皮细胞释放大量的炎性介质, 如TNF-α、IL-1等[29-30], 这些炎性介质可引起血管痉挛, 血管内皮细胞损害, 进一步加重胃肠道缺血[31]. TNF等炎性介质还可诱导肠道细胞凋亡[32], 破坏细胞间紧密连接, 直接引起肠道通透性增高, 破坏肠道屏障功能. 此外, 内毒素对胃肠动力也有影响. 王晓艳 *et al*[33]针对充血性心衰患者胃电图进行研究, 发现患者均出现不同程度的胃运动节律紊乱和排空障碍, 且胃电图主频、胃慢波均低于正常, 降低程度与心衰的严重程度相关. 次秀丽 *et al*[34]发现, 内毒素与TNF联合作用, 可致严重的胃肠功能损伤,包括胃肠动力损伤及肠黏膜屏障损伤. 庞玉生 *et al*[35]发现在慢性心理衰竭患者血清中高内毒素血症使患者发生循环低胃动素血症, 胃动素是调节胃肠运动的主要激素, 其生理作用是直接作用于消化道平滑肌, 诱发胃强烈的收缩和小肠明显的分节运动[36], 结果可见心衰患者发生肠源性内毒素血症可引起体内低胃动素血症, 导致胃排空延迟和肠蠕动减弱, 肠道内菌群过度生长, 进一步加重细菌和内毒素移位, 再次形成恶性循环, 如此互为因果, 导致更多的内毒素入血[37].

2.2 肠源性内毒素血症与心力衰竭 Niebauer研究发现[38-39], 心衰伴体循环淤血患者体内内毒素浓度以及促炎症反应因子水平增加, 通过强化利尿治疗以后, 内毒素降至正常水平. Lequier *et al*[40]研究了充血性心力衰竭患者在心肺旁路手术(cardiopulmonary bypass, CPB)术前术后的内毒素水平, 结果证实, 内毒素水平表达的高低与心衰的发生以及严重性密切相关. 研究认为[41], 进展性心衰患者的内毒素升高归因于临床病情严重性以及血清炎性细胞因子水平的增加. 一项临床试验证实心功能Ⅳ级(NYHA分级)患者体内内毒素水平增高, 这种高水平内毒素在心衰患者体内和体外细胞培养中均可诱发全血的超强炎性表达[42]. 内毒素具有广泛的生物学效应, 心衰发生过程中出现的过度炎症、免疫功能异常、血流动力学紊乱和器官功能损害均与内毒素作用有着直接和/或间接关系[4]. 内毒素作用于单核巨噬细胞系统, 使炎症细胞活化, 释放氧自由基、前列腺素及多种细胞因子(如TNF, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8等), 损伤内皮细胞, 产生细胞毒效应, 从而导致心肌细胞内能量代谢紊乱, 心肌细胞脂质过氧化和氧自由基生成增多, 进一步引起心血管内皮细胞、心肌细胞的功能和结构的损伤[42]. 最近研究发现, 血清低水平的内毒素即可诱导体内产生显著高水平的TNF. Mann[43]指出, TNF能够抑制心肌收缩力, 导致左室功能下降, 甚至急性肺水肿, TNF还可促进心肌细胞肥大、诱导胚胎基因表达、加速细胞凋亡、改变细胞外基质构成等, 从而导致左室重构[44-47]. 根据研究结果推断, 心衰发生后, 体内高水平表达的内毒素通过自身对心肌的毒性作用及其诱发的一系列炎性因子的表达, 引起心肌细胞代谢异常, 凋亡, 心脏结构改变, 机体血流动力学变化, 从而促进心衰进展.

3 治疗策略

3.1 胃肠灌注监测 由于胃肠道对于心衰发生以后血流动力学的变化具有高度的敏感性, 在心衰早期即发生胃肠道低灌注. 因此, 监测胃肠道的血流灌注对于心衰早期治疗具有重要指导意义[48]. 目前, 临床用于内脏血流灌注评价以及胃肠道缺血诊断的方法包括内镜, 血管造影, 肝静脉导管插入术(catheterization), 激光多普勒血流计以及胃张力测量法. 张力测量法是目前临床工作中最简单易行的方法, 是评价内脏血流以及有氧代谢充足程度的非创伤性测量方法. 目前[49], 细胞间CO_2水平取决于有氧代谢与无氧代谢过程中产生的CO_2与组织血流和肺泡换气过程中减少的CO_2之间的平衡[50]. 肺泡末CO_2值依靠肺泡通气换气量以及肺泡灌注血流, 从而决定了从血管进入细胞内的CO_2量, 也就是黏膜腔内的CO_2量. 因此, 组织CO_2反映胃肠道代谢、灌注以及肺泡功能的微小平衡. 一项多中心对照性研究表明[51], 胃肠道黏膜间pH值正常的危重症患者(其中25%患者存在心衰)可受益于通过张力计监测指导下进行治疗干预. 与未经过pH监测以及治疗的患者相比较, 死亡率明显降低. 此项研

■创新盘点
本文从心衰发生后, 胃肠道发生肠源性内毒素血症, 激活炎性介质的角度出发, 揭示胃肠道在心衰发生、发展中的重要地位, 为心衰治疗提供一个新的发向.

究并未对单独的心衰人群进行相关报道, 但对于心衰患者尤其是心源性休克患者可能存在特殊临床意义. 据报道, 胃肠道黏膜间低水平pH值可用于预测低心输出量引起的内脏低灌注综合征, 因此胃肠道张力法可用来作为预测心衰以及心衰过程中心输出量改变的一种间接检测指标.

3.2 增加内脏血流 Ray-Chaudhuri *et al*[52]在24名健康志愿者中进行的试验, 采用口服50 mg卡托普利与维生素C相对照, 结果发现口服卡托普利组可明显增加肠道灌注血流. Kincaid *et al*[53]在危重症患者中应用张力测量法监测胃肠道灌注的同时, 应用依那普利0.625 mg弹丸式静脉注射, 结果证实依那普利能够有效的提高胃肠道灌注血流, 其作用机制在于阻断心衰后神经体液因子发生的变化.

3.3 维护肠道屏障功能完整性 吴国豪 *et al*[54]认为, 谷氨酰胺可以通过提供肠道黏膜能量, 加强肠道黏膜的结构屏障功能, 另外, 谷氨酰胺通过对IL-4, IL-10的调节功能增加肠道分泌型IgA分泌, 从而增加肠道黏膜的免疫屏障功能[55], 戚仁斌 *et al*[56]证实, 谷氨酰胺可以抑制内毒素诱导的细胞因子TNF-α释放, 还可以促进谷胱甘肽合成增加, 减少自由基对心肌细胞的损害等作用[57], 改善细胞能量代谢, 防止心肌细胞乳酸堆积等, 对内毒素致心肌的损伤具有良好的保护作用[58-59]. 另外, 有研究证实精氨酸可促进肠黏膜上皮细胞分化和更新、维持肠黏膜屏障的完整, 在体内可以构成碳基团. 在肠内代谢时, 可产生氮, 有抑制细菌的作用和功能, 在应激状态下, 可有效地保护肠道免疫屏障免受损害[60].

3.4 针对细菌移位和内毒素血症 由于细菌移位和内毒素血症是心衰发生后以及胃肠道发生一系列变化的重要环节, 针对细菌移位以及内毒素血症的治疗是目前心衰研究的热点. Gennari *et al*[10]在大鼠内毒素血症模型中应用依那普利, 发现可减少细菌移位的发生. 推断其作用机制可能与减少黄嘌呤氧化酶的氧自由基损伤作用有关. Sorkine *et al*[61]研究发现, 应用抗生素或者乳酸杆菌对肠道内细菌进行选择性肠道脱污染(selective decontamination of the digestive tract, SDD), 则循环中内毒素以及TNF水平相对于对照组明显减少. Sabine *et al*研究认为, 心力衰竭患者中出现的内毒素能够刺激肿瘤坏死因子-α的产生, 对内毒素信号传导进行治疗可能对心衰患者有益.

还有研究证实, 在出血性休克大鼠模型中应用别嘌呤醇通过抑制再灌注损伤介导的黄嘌呤氧化酶氧化应激作用, 可减少细菌移位[62]. 在一项针对梗阻性黄疸试验中应用生长激素以及胰岛素刺激因子意外发现可减少细菌移位, 从而减轻内毒素血症, 此项结果目前尚未用于临床CHF患者. 总之, CHF是一种累及多脏器功能异常的临床综合征, 胃肠道系统因其对血流低灌注的高敏感性而普遍出现改变. 然而, 胃肠道系统在心衰发生、发展中的具体作用机制尚不清楚. 众多研究发现胃肠道系统在心衰早期已发生缺血表现, 肠道通透性增高, 屏障功能障碍, 肠道细菌移位, 肠源性内毒素血症产生. 内毒素激活体内一系列炎性介质和细胞因子的产生, 对胃肠道系统和心肌细胞均有毒性作用, 从而进一步加重肠道功能障碍和心力衰竭, 产生恶性循环. 因此, 针对胃肠道系统发生的改变进行相关干预和治疗, 有望成为改善心衰症状, 阻止心衰进展的一项重要研究方向.

■应用要点

胃肠道对于心衰发生以后血流动力学的变化具有高度的敏感性, 肠源性内毒素血症激活一系列炎性介质和细胞因子, 在心衰发展中具有重要作用. 因此胃肠道既是心衰过程中易损伤的靶器官, 又是诱发心衰进展的始动器官. 针对胃肠道在心衰发生、发展机制的研究, 进而采取相应的防治措施, 可有效的改善心衰症状, 阻止心衰进展, 有望成为心衰治疗新的研究方向.

4 参考文献

1 Hasegawa K, Iwai-Kanai E, Sasayama S. Neurohormonal regulation of myocardial cell apoptosis during the development of heart failure. *J Cell Physiol* 2001; 186: 11-18

2 Loppnow H, Westphal E, Buchhorn R, Wessel A, Werdan K. Interleukin-1 and related proteins in cardiovascular disease in adults and children. *Shock* 2001; 16 Suppl 1: 3-9

3 Aoyama T, Takimoto Y, Pennica D, Inoue R, Shinoda E, Hattori R, Yui Y, Sasayama S. Augmented expression of cardiotrophin-1 and its receptor component, gp130, in both left and right ventricles after myocardial infarction in the rat. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32: 1821-1830

4 Sharma R, von Haehling S, Rauchhaus M, Bolger AP, Genth-Zotz S, Doehner W, Oliver B, Poole-Wilson PA, Volk HD, Coats AJ, Adcock IM, Anker SD. Whole blood endotoxin responsiveness in patients with chronic heart failure: the importance of serum lipoproteins. *Eur J Heart Fail* 2005; 7: 479-484

5 Mari D, Di Berardino F, Cugno M. Chronic heart failure and the immune system. *Clin Rev Allergy Immunol* 2002; 23: 325-340

6 Rauchhaus M, Coats AJ, Anker SD. The endotoxin-lipoprotein hypothesis. *Lancet* 2000; 356: 930-933

7 Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, Young JB, White BG, Mann DL. Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST). *Circulation* 2001; 103: 2055-2059

8 何效东, 董家鸿. 外科危重病症与肠源性细菌/内毒素易位. 中华胃肠外科杂志 2001; 4: 270-272

9 Mitsuoka H, Schmid-Schonbein GW. Mechanisms for blockade of *in vivo* activator production in the ischemic intestine and multi-organ failure. *Shock*

■名词解释

1 细菌移位(bacterial translocation, BT): 心衰发生后, 胃肠道黏膜缺血缺氧, 肠道屏障功能被破坏, 大分子物质细菌或其产生的内毒素穿过肠黏膜进入血液循环, 定植于肠道外的肠系膜淋巴结以及远处肝脏、脾脏等器官, 此过程称为细菌移位.

2 肠源性内毒素血症(gut origin endotoxaemia): CHF造成肠道损伤时内毒素可敬门静脉, 体循环及淋巴系统发生移位, 造成内毒素血症.

3 选择性肠道脱污染(selective decontamination of the digestive tract, SDD): 心衰发生后, 肠道屏障功能发生障碍, 选择性肠道脱污染能选择性抑制肠道中产生内毒素的杆菌, 保护专性厌氧菌, 纠正肠道菌群紊乱, 维护肠道生物屏障功能.

2000; 14: 522-527

10 Gennari R, Alexander JW, Boyce ST, Lilly N, Babcock GF, Cornaggia M. Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril on bacterial translocation after thermal injury and bacterial challenge. *Shock* 1996; 6: 95-100

11 Krack A, Sharma R, Figulla HR, Anker SD. The importance of the gastrointestinal system in the pathogenesis of heart failure. *Eur Heart J* 2005; 26: 2368-2374

12 Kubota T, Miyagishima M, Alvarez RJ, Kormos R, Rosenblum WD, Demetris AJ, Semigran MJ, Dec GW, Holubkov R, McTiernan CF, Mann DL, Feldman AM, McNamara DM. Expression of proinflammatory cytokines in the failing human heart: comparison of recent-onset and end-stage congestive heart failure. *J Heart Lung Transplant* 2000; 19: 819-824

13 Stumpf C, Lehner C, Yilmaz A, Daniel WG, Garlichs CD. Decrease of serum levels of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in patients with advanced chronic heart failure. *Clin Sci (Lond)* 2003; 105: 45-50

14 Takala J. Determinants of splanchnic blood flow. *Br J Anaesth* 1996; 77: 50-58

15 刘春峰, 袁壮. 内脏缺血缺氧代谢障碍在SIRS和MODS中的作用. 小儿急救医学 2000; 7: 180-182

16 Pastores SM, Katz DP, Kvetan V. Splanchnic ischemia and gut mucosal injury in sepsis and the multiple organ dysfunction syndrome. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 1697-1710

17 Anker SD, Egerer KR, Volk HD, Kox WJ, Poole-Wilson PA, Coats AJ. Elevated soluble CD14 receptors and altered cytokines in chronic heart failure. *Am J Cardiol* 1997; 79: 1426-1430

18 Schlichtig R, Bowles SA. Distinguishing between aerobic and anaerobic appearance of dissolved CO2 in intestine during low flow. *J Appl Physiol* 1994; 76: 2443-2451

19 Secchi A, Ortanderl JM, Schmidt W, Gebhard MM, Martin E, Schmidt H. Effect of endotoxemia on hepatic portal and sinusoidal blood flow in rats. *J Surg Res* 2000; 89: 26-30

20 Ceppa EP, Fuh KC, Bulkley GB. Mesenteric hemodynamic response to circulatory shock. *Curr Opin Crit Care* 2003; 9: 127-132

21 吴承堂, 黄祥成, 黎沾良. 肠通透性增高与肠道细菌移位. 世界华人消化杂志 1999; 7: 605-606

22 Wazna E, Gorski A. Bacterial translocation and its clinical significance. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2005; 59: 267-275

23 Husebye E. The pathogenesis of gastrointestinal bacterial overgrowth. *Chemotherapy* 2005; 51 Suppl 1: 1-22

24 Wang ZT, Yao YM, Xiao GX, Sheng ZY. Risk factors of development of gut-derived bacterial translocation in thermally injured rats. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1619-1624

25 Sanchez E, Casafont F, Guerra A, de Benito I, Pons-Romero F. Role of intestinal bacterial overgrowth and intestinal motility in bacterial translocation in experimental cirrhosis. *Rev Esp Enferm Dig* 2005; 97: 805-814

26 Yagci G, Zeybek N, Kaymakcioglu N, Gorgulu S, Tas H, Aydogan MH, Avci IY, Cetiner S. Increased intra-abdominal pressure causes bacterial translocation in rabbits. *J Chin Med Assoc* 2005; 68: 172-177

27 Gebbers JO, Laissue JA. Bacterial translocation in the normal human appendix parallels the development of the local immune system. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1029: 337-343

28 Sharma R, Bolger AP, Rauchhaus M, von Haehling S, Doehner W, Adcock IM, Barnes PJ, Poole-Wilson PA, Volk HD, Coats AJ, Lim S, Anker SD. Cellular endotoxin desensitization in patients with severe chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2005; 7: 865-868

29 Behnam SM, Behnam SE, Koo JY. TNF-alpha inhibitors and congestive heart failure. *Skinmed* 2005; 4: 363-368

30 Brancaccio G, Villa E, Girolami E, Michielon G, Feltri C, Mazzera E, Costa D, Isacchi G, Iannace E, Amodeo A, Di Donato RM. Inflammatory cytokines in pediatric cardiac surgery and variable effect of the hemofiltration process. *Perfusion* 2005; 20: 263-268

31 Straburzynska-Migaj E, Ochotny R, Wachowiak-Baszynska A, Straburzynska-Lupa A, Lesniewska K, Wiktorowicz K, Cieslinski A. Cytokines and heart rate variability in patients with chronic heart failure. *Kardiol Pol* 2005; 63: 478-485; discussion 486-487

32 Bolton AE. Biologic effects and basic science of a novel immune-modulation therapy. *Am J Cardiol* 2005; 95: 24C-29C; discussion 38C-40C

33 王晓艳, 肖雪, 刘俊, 刘伟茹, 张野, 徐颖. 充血性心力衰竭患者的胃肠道功能与胃电图变化. 中华医学丛刊 2004; 4: 16-17

34 次秀丽, 王宝恩, 张淑文, 张宁宁. LPS+TNF-α致休克大鼠胃肠运动及屏障功能的改变. 世界华人消化杂志 1999; 7: 510-512

35 庞玉生, 何伟生, 韦丹, 李杏, 王飞华. 心力衰竭患儿血中胃动素和胃泌素的变化及临床意义. 中国实用儿科杂志 2004; 19: 689-690

36 Tkachenko EV. Clinical importance of gut hormones. *Eksp Klin Gastroenterol* 2004; 111-116, 149

37 张喜平, 张宇. 急性胰腺炎肠道屏障损害机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2006; 14: 417-421

38 Niebauer J. Inflammatory mediators in heart failure. *Int J Cardiol* 2000; 72: 209-213

39 Peschel T, Schonauer M, Thiele H, Anker SD, Schuler G, Niebauer J. Invasive assessment of bacterial endotoxin and inflammatory cytokines in patients with acute heart failure. *Eur J Heart Fail* 2003; 5: 609-614

40 Lequier LL, Nikaidoh H, Leonard SR, Bokovoy JL, White ML, Scannon PJ, Giroir BP. Preoperative and postoperative endotoxemia in children with congenital heart disease. *Chest* 2000; 117: 1706-1712

41 Fiddian-Green RG. Associations between intramucosal acidosis in the gut and organ failure. *Crit Care Med* 1993; 21: S103-107

42 Genth-Zotz S, von Haehling S, Bolger AP, Kalra PR, Wensel R, Coats AJ, Anker SD. Pathophysiologic quantities of endotoxin-induced tumor necrosis factor-alpha release in whole blood from patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol* 2002; 90: 1226-1230

43 Mann DL. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. *Circ Res* 2002; 91: 988-998

44 Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Doria A, Iaccarino L, Turiel M. Tumor necrosis factor-alpha, biologic agents and cardiovascular risk. *Lupus* 2005; 14: 780-784

45 Valgimigli M, Ceconi C, Malagutti P, Merli E,

Soukhomovskaia O, Francolini G, Cicchitelli G, Olivares A, Parrinello G, Percoco G, Guardigli G, Mele D, Pirani R, Ferrari R. Tumor necrosis factor-alpha receptor 1 is a major predictor of mortality and new-onset heart failure in patients with acute myocardial infarction: the Cytokine-Activation and Long-Term Prognosis in Myocardial Infarction (C-ALPHA) study. *Circulation* 2005; 111: 863-870

46 Wang XM, Yang LX, Zhu SJ, Yang YJ, Guo CM, Qi F, Wei L, Shi YK, Wang Y, Ren L. Tumor necrosis factor alpha and myocardial matrix metalloproteinases in left ventricular remodeling. *Zhonghua Neike Zazhi* 2004; 43: 828-831

47 Vadlamani L, Iyengar S. Tumor necrosis factor alpha polymorphism in heart failure/cardiomyopathy. *Congest Heart Fail* 2004; 10: 289-292

48 Portas Gonzalez M, Garutti Martinez I, Fernandez-Quero Bonilla L. Gastrointestinal tonometry: a new tool for the anesthesiologist. *Rev Esp Anestesiol Reanim* 2003; 50: 401-408

49 Dantzker DR. The gastrointestinal tract. The canary of the body? *JAMA* 1993; 270: 1247-1248

50 Lebuffe G, Onimus T, Vallet B. Gastric mucosal-to-end-tidal PCO2 difference during major abdominal surgery: influence of the arterial-to-end-tidal PCO2 difference? *Eur J Anaesthesiol* 2003; 20: 147-152

51 Gutierrez G, Palizas F, Doglio G, Wainsztein N, Gallesio A, Pacin J, Dubin A, Schiavi E, Jorge M, Pusajo J. Gastric intramucosal pH as a therapeutic index of tissue oxygenation in critically ill patients. *Lancet* 1992; 339: 195-199

52 Ray-Chaudhuri K, Thomaides T, Maule S, Watson L, Lowe S, Mathias CJ. The effect of captopril on the superior mesenteric artery and portal venous blood flow in normal man. *Br J Clin Pharmacol* 1993; 35: 517-524

53 Kincaid EH, Miller PR, Meredith JW, Chang MC. Enalaprilat improves gut perfusion in critically injured patients. *Shock* 1998; 9: 79-83

54 吴国豪, 王浩, 吴肇汉. 不同营养方式对肠道缺血再灌注大鼠肠屏障功能的影响. 中华胃肠外科杂志 2004; 7: 499-502

55 Fukatsu K, Kudsk KA, Zarzaur BL, Wu Y, Hanna MK, DeWitt RC. TPN decreases IL-4 and IL-10 mRNA expression in lipopolysaccharide stimulated intestinal lamina propria cells but glutamine supplementation preserves the expression. *Shock* 2001; 15: 318-322

56 戚仁斌, 陆大祥, 王华东, 王海华, 胡巢凤, 屈洋, 杨会杰, 王彦平, 付咏梅, 李楚杰. 谷氨酰胺对内毒素损伤的心肌的保护作用研究. 中国病理生理杂志 2003; 19: 765-768

57 Roth E, Oehler R, Manhart N, Exner R, Wessner B, Strasser E, Spittler A. Regulative potential of glutamine-relation to glutathione metabolism. *Nutrition* 2002; 18: 217-221

58 Wischmeyer PE, Kahana M, Wolfson R, Ren H, Musch MM, Chang EB. Glutamine reduces cytokine release, organ damage, and mortality in a rat model of endotoxemia. *Shock* 2001; 16: 398-402

59 Khogali SE, Harper AA, Lyall JA, Rennie MJ. Effects of L-glutamine on post-ischaemic cardiac function: protection and rescue. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 819-827

60 Ziegler TR, Evans ME, Fernandez-Estivariz C, Jones DP. Trophic and cytoprotective nutrition for intestinal adaptation, mucosal repair, and barrier function. *Annu Rev Nutr* 2003; 23: 229-261

61 Sorkine P, Szold O, Halpern P, Gutman M, Greemland M, Rudick V, Goldman G. Gut decontamination reduces bowel ischemia-induced lung injury in rats. *Chest* 1997; 112: 491-495

62 Scopa CD, Koureleas S, Tsamandas AC, Spiliopoulou I, Alexandrides T, Filos KS, Vagianos CE. Beneficial effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on intestinal bacterial translocation, endotoxemia, and apoptosis in experimentally jaundiced rats. *J Am Coll Surg* 2000; 190: 423-431

■同行评价

本文从内毒素移位和炎症介质等角度出发, 探讨心衰发生、发展的机制, 为今后寻找临床治疗心衰的方法提供了一个可能的方向; 同时也揭示了胃肠道系统在心衰发生机制中的重要性, 不可忽略.

电编 张敏 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年6月18日; 14(17): 1726-1730
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

温热治疗肿瘤的基础研究进展

张安平, 刘宝华, 张连阳

■背景资料
肿瘤温热治疗是运用不同方法对肿瘤进行热治疗, 他与肿瘤的其他治疗方法联合运用可提高疗效. 如腹腔温热灌注化疗就是临床上治疗腹腔肿瘤播散的有效措施, 可有效杀灭腹腔播散的肿瘤细胞, 这在国内外的研究中均有报道. 但温热治疗肿瘤的基础研究仍有待深入.

张安平, 刘宝华, 张连阳, 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
通讯作者: 张安平, 400042, 重庆市, 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: 023-68757248
收稿日期: 2006-03-22 接受日期: 2006-05-08

摘要
在肿瘤治疗学中, 温热治疗是指运用不同方法对恶性肿瘤进行热治疗, 他常与放疗、化疗联用, 肿瘤的温度常在40-43℃. 现综述温热治疗的细胞死亡、体内温热治疗的特征以及温热治疗的效应器等方面的研究进展.

关键词: 温热治疗; 温热敏感性; 效应器

张安平, 刘宝华, 张连阳. 温热治疗肿瘤的基础研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(17):1726-1730
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1726.asp

0 引言
有关研究显示温热治疗方法、治疗费用和治疗有效性等均存在差别. 无论哪种温热治疗均不足以替代放疗、化疗等, 但不容质疑的是温热可增强药物和/或放疗的细胞毒效应, 即热化疗敏感性和热放疗敏感性, 其目的是提高传统治疗的效果[1-2]. 局部和区域温热治疗运用于局部进展期恶性肿瘤的治疗效果尚存在争议. 一些临床观察发现联合运用温热和放疗可提高疗效和生存率, 而也有研究认为疗效与是否联合温热治疗没有明显的关系. 尽管温热治疗的温度和方法各异, 但实验均显示温热剂量与临床治疗效果明显相关, 局部和区域温热治疗联合化疗和放化疗的Ⅱ期实验也证实以上观点[3]. 在肿瘤温热治疗的Ⅲ期临床实验中, 对于局部进展期或复发的表浅盆腔肿瘤运用局部/区域温热治疗联合放疗/化疗, 可明显提高对局部肿瘤的治疗效果和生存率. 间接温热治疗、温热灌注化疗和全身温热治疗(whole-body hyperthermia, WBH)均应用于临床, 且取得良好的治疗效果[4-5]. 自1970年以来温热治疗的作用机制在前期临床研究已经取得相当的进展.

1 温热治疗诱导细胞死亡的基本特点
1.1 温热治疗的细胞毒效应 不同温度(41-47℃)处理培养细胞可得到细胞温热治疗死亡的量-效曲线. 该曲线显示具有明显的平台期, 反应出细胞杀伤的两个步骤, 温热作用初期主要表现为细胞生长停滞, 随之出现细胞死亡, 随温度和作用时间增加细胞生存率降低, 温度低于42-43℃时温热诱导细胞死亡的能力, 与温度高于43℃相比, 其对细胞的杀伤力明显偏低. 从而得出以下公式, $D = tR^{T=43}$, D代表热剂量, t代表处理时间, T代表处理温度, 当$T \geqslant 43$℃时R = 2, 但$T<43$℃或变化时, R = 4. 细胞类型不同则诱导细胞死亡所需的热剂量也不同, 温热治疗的细胞毒效应主要是与细胞质和细胞膜蛋白的改变有关[6-7].

1.2 温热等效应剂量 温热治疗中的热剂量计算公式如上节所述, 这也可转换为临床应用中比较不同温热处理时的“热等效应剂量”(thermal isoeffect dose, TID)的概念, TID可转化为当温度为43℃时产生相同热量的时间(equivalent heating minutes at 43℃, EM43). 虽然在临床温热治疗中TID受多种环境因素如温度分布, 热耐受性, 细胞内的pH和其他环境因素的影响, 但局部和区域温热治疗的实验证实TID仍可作为评价临床温热治疗有效性的良好指标[7].

1.3 细胞周期的影响 处于细胞周期不同阶段的细胞对热的敏感性存在差异, 总的来说, 有丝分裂期细胞对热的敏感性最高, M期细胞受到温热治疗主要表现为有丝分裂损伤而导致有丝分裂不能顺利进行, 同时多倍体的连续性破坏. S期细胞对温热处理也敏感, 主要表现为染色体受到损伤, S/M期细胞在温热治疗后要经历“细胞死亡的慢模式”(slow mode of cell death), G1期细胞对温热治疗并不敏感, 显微镜下观察不到任何损伤. 不同细胞周期阶段的细胞对温热治疗的反应各异, 表明温热治疗诱导细胞死亡存在不同的分子机制[8].

1.4 耐热性的拮抗作用 细胞对热诱导的细胞毒性损伤的敏感性降低称作“耐热性”, 他是由

多种因素造成而并非培养细胞遗传性决定, 部分由热休克蛋白的诱导以及诸如G2期停滞, 细胞新陈代谢的改变等所致. 通常一些外部因素可降低细胞的耐热性如瞬时细胞内pH降低, 耐热性通常与获得性或遗传性耐药性同时并存[9].

2 体内温热治疗的特征

通常低氧、酸中毒和能量耗竭均可使恶性肿瘤的血流和血管密度降低, 这是恶性肿瘤微环境改变的特征之一[10]. 当温度高于42℃, 除了温热的细胞毒效应外, 还可降低肿瘤血流, 使氧和营养供应减少, 诱发酸中毒. 根据肿瘤个体和肿瘤类型的不同, 能够改变肿瘤血流的热剂量也不同, 这通常依赖于对温热发生反应并能作出调节的血管比例. 有关温热治疗对肿瘤微环境的损伤是否为可逆损伤尚存在争议, 可以明确的是温度超过42℃时肿瘤血供发生显著的改变, 肿瘤细胞形态学改变与温热诱导的内皮肿胀, 胞质向细胞间隙流动, 微血栓形成, 血细胞膜的黏度改变等有关, 所有这些因素均促使细胞的氧和营养供应的减少, 导致肿瘤细胞发生酸中毒[11]. 在实验中, 当肿瘤温度超过42℃时, 维持体温调节的周围正常组织对温热的反应使肿瘤的血流进一步减少. 温热治疗可导致肿瘤细胞饥饿. 高糖诱导的肿瘤细胞乳酸盐增多, 以及血管侧支迂回效应均可使肿瘤的血流和营养供应减少, 高血酸可降低正常组织的氧供应. 通常认为提供氧和营养可有助于减轻严重的器官毒性反应. 新近的研究认为, 低于42℃能够更好的改变肿瘤血流和氧供给, 使温热治疗增强放疗(温热增加氧供)和化疗(温热增加血供)的效果. 在临床局部/区域温热抗肿瘤治疗中, 大部分时间的肿瘤内部温度并没有超过42℃, 但是肿瘤患者的情况显然比实验模拟的系统要复杂的多, 肿瘤血管的变化依赖于温热治疗的方法[12]. 如果温热可增加肿瘤血流, 放化疗的治疗目的是使肿瘤的血流减少, 二者联合运用则存在矛盾, 因此临床治疗效果值得在将来进一步研究[13].

类似于热放疗敏感性一样, 温热治疗可使抗肿瘤药物的毒性(热化疗敏感性)增强. 在体内和动物实验中均发现, 温度提高可使化疗药物对细胞周期的抑制增强. 热化疗敏感性可用一定化疗药物浓度下, 高热和正常温度的细胞存活比例或者药物-热相互作用的药代动力学来描述. 其他如在高热情况下某些药物的稳定性丧失, 溶剂和添加剂也可与温热相互影响, 从而诱使细胞产生耐热性或热敏感性[14]. 药物和温热相互作用通常分为随温度升高呈线性增加的“协同效应”、在较低温度时毒性无增加或轻微增加的“临界效应效益”以及药物毒性与温度无关的“非依赖效应”. 通常当温度从37℃升高到超过40.5℃, 一些烷化剂(如环磷酰胺、异环磷酰胺)和铂化合物的细胞毒效应随温度的升高呈线性增加, 而阿霉素则有温度临界值, 抗代谢物如5-FU、长春新碱和紫杉醇的细胞毒效应则与温度变化无关. 不同药物和温热相互作用的效率各异, 原因是热敏感性主要是温度超过43℃体外实验观察, 而这并不能适用于临床温热治疗, 此外, 同一抗肿瘤药物对于不同的动物肿瘤敏感性各异, 药物在正常温度下比在高温时其效应更佳. 不同的给药方式和剂量其热敏感性也有差异. 现有资料表明, 温热治疗同时运用药物或者在温热后短时内给予药物其热化疗敏感性增强, 但也有例外, 如环磷酰胺在治疗广泛肝转移时最好是在温热治疗前运用, 在使用环磷酰胺后即刻联合温热治疗也可取得较好的临床效果. 在体外和大鼠实验模型中, 抗代谢药物吉西他滨最好和温热治疗间隔24 h, 其协同效应最佳. 在体外同时联合依托泊甙(VP16)和温热治疗可导致细胞毒性降低. 如何联合细胞毒性药物和不同温热治疗方法才能取得良好的临床治疗效果需要进一步研究. 实验表明, 温热可有效降低肿瘤的耐药性, 这在抗肿瘤药物顺铂可得到证实. 由于温热使膜通透性、钠/钾ATP酶活性、谷胱甘肽代谢和DNA修复发生改变, 而使顺铂的耐药性改变. 但是也应注意到体外实验的温度要高于临床治疗的温度. 患者在运用顺铂治疗后产生耐药性, 而在联合温热治疗后在较低温度则可逆转这种耐药性. 中度温热处理可诱导培养细胞的热休克蛋白(heat-shock proteins, HSP)表达, 细胞内HSP70的表达升高与耐热性相关, 将HSP70转染成纤维细胞发现热敏感性明显下降, 其他HSP家族成员也可观测类似现象. 耐热性可能与耐药性的不同形式有关, 温热能诱导如多耐药性、温热依赖性的拓扑异构酶Ⅱ失活等, 在有些情况下可能同时出现耐热性和耐药性[15-18]. 在体外, 温热既可克服耐药性又可诱导耐药性, 但温度超过42℃时温热可逆转铂类抗癌药物的耐药性, 在较低温度时可诱导耐药性. 不同的温热方法对耐药性有不同的影响. 对化疗敏感的患者, 在运用温热治疗联合化疗时疗效理想. 中度的温热治疗可

■**研发前沿**
通过对温热治疗效应器研究, 从细胞微观到作用的分子基础, 使温热治疗的基础研究深入到分子生物学水平, 为更好的运用该方法治疗肿瘤提供新的理论依据.

■应用要点
本文通过对肿瘤温热治疗体内特征的认识, 可以指导临床工作者进一步扬长避短, 发挥其治疗优势, 特别是不同药物治疗和温热治疗联合时疗效差异性.

调控耐药性, 但区域温热联合放疗和化疗治疗盆腔肿瘤却可能诱导耐药性[19]. 总之, 在临床运用中温热可逆转耐药性比诱导耐药性是利大于弊. 但仍要注意的**是在中度温热治疗时可能诱**导耐药性.

热化学敏感性只能部分反应药物在温热治疗期的某些药代动力学特征, 对于温热治疗时有关细胞毒性药物的药代动力学基础尚不完全清楚. 在恶性肿瘤组织中药物的分布能够反应肿瘤血液供应的变化, 因此血液供应、电介质以及pH改变均能导致药物的溶解度、分布容量等改变. 温热治疗特别是全身温热治疗, 对于药物的有效剂量影响很大. 胃酸分泌过多和胃肠道液体扣押均对药物分布产生影响, 而且肝脏、肾的新陈代谢和排泄的变化与不同的温热治疗方式相关[20-23]. 在WBH的Ⅰ期临床研究中发现肾脏对卡铂的排泄轻度减少, 原因可能是卡铂(CBCDA)联合温热治疗使其肾毒性增强[24]. 另有实验表明, 严重的肾毒性损害可能是由于体外血液透析系统使WBH本身增强了肾损害. 在盆腔区域温热治疗中, 腹腔内运用卡铂, 发现腹膜的廓清率有升高趋势[3]. 温热治疗时药物的药代动力学研究资料不多, 从现有的资料可以看出, 由于温热治疗改变器官(如肝和肾脏)的循环、温度依赖新陈代谢率改变和液体转移等, 因此全身温热治疗对同步使用的细胞毒性药物的药代动力学肯定存在影响. 但是温热-药物的相互影响和热化学敏感性尚需要更多的临床实验研究.

3 温热治疗的效应器

3.1 *细胞膜和细胞骨架* 体外实验发现, 温热影响细胞膜的流动性和稳定性, 使蛋白的膜转运和细胞表面受体受阻. 温热导致的细胞死亡很大程度上是因细胞膜发生变化引起[25]. 温热导致细胞膜电位改变, 使细胞内钠和钙浓度升高, 钾流出增多. 但是体外实验显示, 温热导致的细胞死亡与这些改变没有多大联系, 即使有关系也可能与温热导致离子的跨膜转运(Na^+/H^+、$HCO3^-/Cl^-$ATP转运)和细胞pH改变有关. 此外温热还可导致细胞骨架形态的改变, 如细胞形态、有丝分裂、胞质内质网、溶酶体. 温热作用于体外培养的细胞, 首先出现细胞膜空泡, 研究认为膜空泡形成可能启动程序性死亡即凋亡的发生. 大量体外和动物实验资料显示温热首先诱导细胞发生凋亡.

3.2 *细胞蛋白和核酸* 体外实验发现当温度在42-45℃之间, 在细胞内的RNA和DNA分子的合成和聚合随温度的升高而降低. 在温热处理终止后RNA和蛋白合成立即恢复. 但是在温热处理后相当长时间内DNA合成受到抑制. 热休克细胞的核基质内蛋白聚集减少, 主要是因温热诱导蛋白伸展后, 细胞内蛋白不能溶解, 限制了细胞核内的蛋白浓度的升高. 有超过100种细胞蛋白的结合力升高, 并且在细胞核内重新分布. 在1960年代, 认为温热如同放射治疗一样主要是直接的DNA损伤和双链断裂, 后来实验证明温热本身并不能导致严重的DNA损伤, 而是使放射诱导的亚致死性细胞损伤修复受阻, 促进放射诱导的DNA断裂[26]. 促进放射诱导DNA断裂的原因是温度依赖性抑制DNA修复酶, 温热主要是抑制DNA多聚酶α和β[27]. 因此认为温热可能专门抑制“错配修复酶”和“剪切修复系统”, 但该推论尚未得到证实.

3.3 *热休克蛋白* 温热可使许多细胞蛋白的合成受损, 但对HSP却有所不同. HSP是由至少5个不同分子质量和生物功能各异的分子伴侣组成, HSP通常分为小分子HSP(分子量小于40 kDa), HSP60, HSP70, HSP90和HSP100蛋白家族组成. HSP家族成员有共同的分子伴侣, 温度升高对HSP表达和伴侣功能并无限制. 在所谓的“热休克因子”(heat shock factors, HSF)失活后的数秒内HSP开始合成, 在三聚作用后HSFs迅速和各种热休克基因的启动子区结合并将之激活, 这对于HSP70尤其如此. 现在认为HSP27和HSP70是“共存活蛋白”, 可以使细胞免受各种致死性(促凋亡)损伤[28]. 在温热条件下, HSPs被认为是保护细胞免受热损伤的蛋白, 同时与耐热性是相互联系的, 当培养细胞在中度温热条件下, HSP的合成增加, 在更高的温度下, HSP的合成减少有一个确定的温度域值. 在某一温度和热剂量下, 不同的实验系统和实验细胞, HSP合成抑制也有所不同[29-30]. 在正常温度下使HSPs失活时(如运用反义寡核苷酸技术)可观察到凋亡增加. HSP表达升高并不能抑制fas配体和NK细胞介导的细胞溶解直接导致的凋亡发生. 通过该途径, 在细胞内HSP水平正常时, 可能导致凋亡发生. 可见, HSP表达和抑制温热诱导的细胞死亡是密切相关的.

总之, 局部和区域温热治疗联合放化疗可提高疗效已得到证实, 对各种温热治疗方法的评价也令人鼓舞. 尽管有关温热治疗的机制已

有大量的研究, 但是其细胞和分子机制仍不是很清楚. 对于肿瘤, 各种温热治疗方法在治疗期和治疗后可观察到复杂的变化, 如血流、肿瘤的营养和氧供、新陈代谢改变、信号转导、免疫、药理学改变等[13,31-35]. 由于温热治疗只是临床治疗肿瘤的方法之一, 因此对于温热在分子和细胞水平如何影响免疫功能更是难以解释. 在实验条件下, 特别是局部和区域温热治疗, 其温度比临床实际应用中更易使温度达到一致, 体外温度超过43℃可能会过高估计温热的细胞毒效应, 在有些条件下却低估温热治疗的副作用, 如对药物效力和活性的损害、诱导耐药性、基因改变、使肿瘤细胞播散等, 而达到治疗效果的肿瘤部位的温度和热剂量如何精确控制仍未得到良好的解决[36-37]. 不同温热模式理想的温热治疗标准各异, 临床资料显示在体内运用温热治疗联合放化疗能取得良好效果的温度要明显低于体外实验温度. 在相对低热剂量下确定的量-效关系, 在WBH联合化疗却没有得出相似的结论. 温热启动HSP启动子以及随温度升高而激活温度依赖的脂质体等使温热治疗也可能成为基因治疗的方法之一[11-12]. 临床温热治疗的机制具有多因素和复杂性, 因此还有待深入研究.

4 参考文献

1 Mahteme H, Pahlman L. Treatment of peritoneal surface malignancy by peritonectomy and intraperitoneal chemotherapy: a novel therapy with curative potential! *Minerva Chir* 2005; 60: 151-157

2 Smeenk RM, Verwaal VJ, Zoetmulder FA. Toxicity and mortality of cytoreduction and intraoperative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in pseudomyxoma peritonei-a report of 103 procedures. *Eur J Surg Oncol* 2006; 32: 186-190

3 Richel O, Zum Vorde Sive Vording PJ, Rietbroek R, Van der Velden J, Van Dijk JD, Schilthuis MS, Westermann AM. Phase II study of carboplatin and whole body hyperthermia (WBH) in recurrent and metastatic cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2004; 95: 680-685

4 Ramirez Plaza CP, Cobo Dols MA, Gomez Portilla A, de la Fuente Perucho A. Cytoreductive surgery and intraoperative intraperitoneal hyperthermic chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. *Clin Transl Oncol* 2005; 7: 421-431

5 Cafiero T, Di Iorio C, Di Minno RM, Sivolella G, Confuorto G. Non-invasive cardiac monitoring by aortic blood flow determination in patients undergoing hyperthermic intraperitoneal intraoperative chemotherapy. *Minerva Anestesiol* 2006; 72: 207-215

6 Atanackovic D, Pollok K, Faltz C, Boeters I, Jung R, Nierhaus A, Braumann KM, Hossfeld DK, Hegewisch-Becker S. Patients with solid tumors treated with high-temperature whole body hyperthermia show a redistribution of naive/memory T-cell subtypes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 290: R585-594

7 van der Heijden AG, Verhaegh G, Jansen CF, Schalken JA, Witjes JA. Effect of hyperthermia on the cytotoxicity of 4 chemotherapeutic agents currently used for the treatment of transitional cell carcinoma of the bladder: an *in vitro* study. *J Urol* 2005; 173: 1375-1380

8 Atallah D, Marsaud V, Radanyi C, Kornprobst M, Rouzier R, Elias D, Renoir JM. Thermal enhancement of oxaliplatin-induced inhibition of cell proliferation and cell cycle progression in human carcinoma cell lines. *Int J Hyperthermia* 2004; 20: 405-419

9 Ramamoorthy P, Thomas S, Ramachandran A, Balasubramanian KA. Mild whole-body heat stress alters retinoid metabolism in the rat small intestine. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 466-470

10 Thews O, Li Y, Kelleher DK, Chance B, Vaupel P. Microcirculatory function, tissue oxygenation, microregional redox status and ATP distribution in tumors upon localized infrared-A-hyperthermia at 42 degrees C. *Adv Exp Med Biol* 2003; 530: 237-247

11 Ahmed M, Goldberg SN. Combination radiofrequency thermal ablation and adjuvant IV liposomal doxorubicin increases tissue coagulation and intratumoural drug accumulation. *Int J Hyperthermia* 2004; 20: 781-802

12 Di Filippo F, Cavaliere F, Anza M, Garinei R, Botti C, Perri P, Di Angelo P, Patrizi V, Di Filippo S, Visca P. Liposomal doxorubicin in the perfusional treatment of advanced soft tissue limb sarcoma. *J Chemother* 2004; 16 Suppl 5: 66-69

13 Hildebrandt B, Drager J, Kerner T, Deja M, Loffel J, Stroszczynski C, Ahlers O, Felix R, Riess H, Wust P. Whole-body hyperthermia in the scope of von Ardenne's systemic cancer multistep therapy (sCMT) combined with chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer: a phase I/II study. *Int J Hyperthermia* 2004; 20: 317-333

14 Ismail-Zade RS. Whole body hyperthermia supplemented with urotropin in the treatment of malignant tumors. *Exp Oncol* 2005; 27: 61-64

15 Belay HT, Brown IR. Cell death and expression of heat-shock protein Hsc70 in the hyperthermic rat brain. *J Neurochem* 2006; 97 Suppl 1: 116-119

16 Singleton KD, Wischmeyer PE. Oral glutamine enhances heat shock protein expression and improves survival following hyperthermia. *Shock* 2006; 25: 295-299

17 Sakamoto N, Kokura S, Okuda T, Hattori T, Katada K, Isozaki Y, Nakabe N, Handa O, Takagi T, Ishikawa T, Naito Y, Yoshida N, Yoshikawa T. Heme oxygenase-1 (Hsp32) is involved in the protection of small intestine by whole body mild hyperthermia from ischemia/reperfusion injury in rat. *Int J Hyperthermia* 2005; 21: 603-614

18 Tolson JK, Roberts SM. Manipulating heat shock protein expression in laboratory animals. *Methods* 2005; 35: 149-157

19 Stein U, Rau B, Wust P, Walther W, Schlag PM. Hyperthermia for treatment of rectal cancer: evaluation for induction of multidrug resistance gene (mdr1) expression. *Int J Cancer* 1999; 80: 5-12

20 Sharma HS, Duncan JA, Johanson CE. Whole-body hyperthermia in the rat disrupts the blood-

cerebrospinal fluid barrier and induces brain edema. *Acta Neurochir Suppl* 2006; 96: 426-431
21 Hildebrandt B, Hegewisch-Becker S, Kerner T, Nierhaus A, Bakhshandeh-Bath A, Janni W, Zumschlinge R, Sommer H, Riess H, Wust P. Current status of radiant whole-body hyperthermia at temperatures >41.5 degrees C and practical guidelines for the treatment of adults. The German 'Interdisciplinary Working Group on Hyperthermia'. *Int J Hyperthermia* 2005; 21: 169-183
22 Hjertaker BT, Froystein T, Schem BC. A thermometry system for quality assurance and documentation of whole body hyperthermia procedures. *Int J Hyperthermia* 2005; 21: 45-55
23 Ismail-Zade RS, Zhavrid EA, Potapnev MP. Whole body hyperthermia in adjuvant therapy of children with renal cell carcinoma. *Pediatr Blood Cancer* 2005; 44: 679-681
24 Gerke P, Filejski W, Robins HI, Wiedemann GJ, Steinhoff J. Nephrotoxicity of ifosfamide, carboplatin and etoposide (ICE) alone or combined with extracorporeal or radiant-heat-induced whole-body hyperthermia. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126: 173-177
25 Agashe VR, Hartl FU. Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Semin Cell Dev Biol* 2000; 11: 15-25
26 Yin HL, Suzuki Y, Matsumoto Y, Tomita M, Furusawa Y, Enomoto A, Morita A, Aoki M, Yatagai F, Suzuki T, Hosoi Y, Ohtomo K, Suzuki N. Radiosensitization by hyperthermia in the chicken B-lymphocyte cell line DT40 and its derivatives lacking nonhomologous end joining and/or homologous recombination pathways of DNA double-strand break repair. *Radiat Res* 2004; 162: 433-441
27 Raaphorst GP, Yang DP, Niedbala G. Is DNA polymerase beta important in thermal radiosensitization? *Int J Hyperthermia* 2004; 20: 140-143
28 Samali A, Holmberg CI, Sistonen L, Orrenius S. Thermotolerance and cell death are distinct cellular responses to stress: dependence on heat shock proteins. *FEBS Lett* 1999; 461: 306-310
29 Zhang H, Wang W, Zhang S, Huang W. Comparison of the anti-tumor effects of various whole-body hyperthermia protocols: Correlation with HSP 70 expression and composition of splenic lymphocytes. *Immunol Invest* 2005; 34: 245-258
30 Shinohara T, Takahashi N, Ooie T, Hara M, Shigematsu S, Nakagawa M, Yonemochi H, Saikawa T, Yoshimatsu H. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation of akt, an essential signal for hyperthermia-induced heat-shock protein 72, is attenuated in streptozotocin-induced diabetic heart. *Diabetes* 2006; 55: 1307-1315
31 Legendre H, Delaunoit T, Chassaing C, Pector JC. Treatment of peritoneal carcinomatosis from colorectal and appendiceal cancer by extensive cytoreductive surgery combined with hyperthermic intraoperative intraperitoneal chemotherapy. *Rev Med Brux* 2005; 26: 439-444
32 Mura G, Framarini M, Milandri C, Rosetti P, Vagliasindi A, Solfrini G, Mazza P, Verdecchia GM. Intraperitoneal chemotherapy with oxaliplatin after complete cytoreduction for peritoneal carcinomatosis from colorectal carcinoma: preliminary experience. *Suppl Tumori* 2005; 4: S111-112
33 Cafiero T, Di Iorio C, Di Minno RM, Sivolella G, Confuorto G. Non-invasive cardiac monitoring by aortic blood flow determination in patients undergoing hyperthermic intraperitoneal intraoperative chemotherapy. *Minerva Anestesiol* 2006; 72: 207-215
34 Pritchard MT, Wolf SF, Kraybill WF, Repasky EA. The anti-tumor effect of interleukin-12 is enhanced by mild (fever-range) thermal therapy. *Immunol Invest* 2005; 34: 361-380
35 Ahlers O, Hildebrandt B, Dieing A, Deja M, Bohnke T, Wust P, Riess H, Gerlach H, Kerner T. Stress induced changes in lymphocyte subpopulations and associated cytokines during whole body hyperthermia of 41.8-42.2 degrees C. *Eur J Appl Physiol* 2005; 95: 298-306
36 Glehen O, Stuart OA, Mohamed F, Sugarbaker PH. Hyperthermia modifies pharmacokinetics and tissue distribution of intraperitoneal melphalan in a rat model. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004; 54: 79-84
37 van Ruth S, Mathot RA, Sparidans RW, Beijnen JH, Verwaal VJ, Zoetmulder FA. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of mitomycin during intraoperative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *Clin Pharmacokinet* 2004; 43: 131-143

电编 张敏 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年6月18日; 14(17): 1731-1734
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

SMMC-7721肝癌细胞膜上β_2糖蛋白Ⅰ受体的表达

高沿航, 高普均, 王 丹, 时 阳, 李玉琴, 朴云峰, 杨翰仪

高沿航, 高普均, 王丹, 时阳, 李玉琴, 朴云峰, 吉林大学第一医院消化内科 吉林省长春市 130021
杨翰仪, 吉林大学基础医学院生物化学教研室 吉林省长春市 130021
国家自然科学基金资助项目, No. 30572106
通讯作者: 高普均, 130021, 吉林省长春市, 吉林大学第一医院消化内科. pujun-gao@163.com
电话: 0431-5612162
收稿日期: 2006-02-13 接受日期: 2006-04-30

Expression of beta-2-glycoprotein Ⅰ receptor on membranes of hepatoma cell line SMMC-7721

Yan-Hang Gao, Pu-Jun Gao, Dan Wang, Yang Shi, Yu-Qin Li, Yun-Feng Piao, Han-Yi Yang

Yan-Hang Gao, Pu-Jun Gao, Dan Wang, Yang Shi, Yu-Qin Li, Yun-Feng Piao, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China
Han-Yi Yang, Department of Biochemistry, School of Basic Medicine, Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30572106
Correspondence to: Dr. Pu-Jun Gao, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China. pujun-gao@163.com
Received: 2006-02-13 Accepted: 2006-04-30

Abstract

AIM: To further study the interaction between beta-2-glycoprotein Ⅰ(β_2GPⅠ) and the membrane of hepatoma SMMC-7721 cells, and to explore the mechanism of hepatitis B virus (HBV) infection.

METHODS: Fluorescence microscopy and fluorescence activated cell sorter (FACS) was used to observe the interaction of β_2GPⅠ with the hepatoma cell line SMMC-7721, gastric carcinoma cell line SGC-7901 and lymphoma cell line HL-60.

RESULTS: Fluorescence microscopy revealed specific binding of FITC-β_2GPⅠ to SMMC-7721 cells, but neither to HL-60 nor SGC-7901 cells. FACS analysis demonstrated that the binding rate of FITC-β_2GPⅠ (20 μL) to SMMC-7721 cells was significantly higher than that in HL-60 or SGC-7901 cells (19% *vs* 1.7%, 1.9%, both $P < 0.01$). When 50 μL FITC-β_2GPⅠ was used, the binding rate of FITC-β_2GPⅠ to SMMC-7721 cells was 20.8%, which was not significantly higher than 19%. The binding rate to SMMC-7721 cells did not increase with the increasing amounts of FITC-β_2GPⅠ.

CONCLUSION: There exists the specific β_2GPⅠ binding protein in the membrane of SMMC-7721 cells.

Key Words: Hepatoma; SMMC-7721 cell line; Beta-2-glycoprotein Ⅰ; Hepatitis B virus; Receptor; Fluorescence activated cell sorter

Gao YH, Gao PJ, Wang D, Shi Y, Li YQ, Piao YF, Yang HY. Expression of beta-2-glycoprotein Ⅰ receptor on membranes of hepatoma cell line SMMC-7721. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(17):1731-1734

摘要

目的: 研究β_2糖蛋白Ⅰ($\beta_2$2GPⅠ)与SMMC-7721肝细胞膜的相互作用过程, 探讨乙型肝炎病毒(HBV)嗜肝性的发生机制.

方法: 采用荧光显微镜及流式细胞仪分析的方法, 检测SMMC-7721、HL-60及SGC-7901三种细胞膜与FITC-β_2GPⅠ相结合的情况以及二者的结合特性.

结果: 仅SMMC-7721细胞膜表面附有大量荧光, 其余2种细胞无此现象. 加FITC-β_2GPⅠ 20 μL时, SMMC-7721与FITC-β_2GPⅠ的结合率为19%, 明显高于FITC-β_2GPⅠ与HL-60的结合率(1.7%)及与SGC-7901的结合率(1.9%)($P<0.01$). 加FITC-β_2GPⅠ 50 μL时, SMMC-7721与FITC-β_2GPⅠ的结合率为20.8%, 与20 μL的结合率无差异($P>0.05$), 说明SMMC-7721与FITC-β_2GPⅠ的结合率不随FITC-β_2GPⅠ量的增加而增高.

结论: 在SMMC-7721肝细胞膜表面存在能与人β_2GPⅠ特异结合的蛋白.

■背景资料

β_2-糖蛋白Ⅰ是血浆中较为丰富的糖蛋白, 他主要由肝细胞合成, 因其具有亲脂特性, 参与脂肪的转运及代谢, 故又称为载脂蛋白H(ApoH). HBV有选择性地感染肝细胞的机制一直是研究的热点问题, 提出了一些学说, 如HBV与肝细胞受体直接结合, 聚合人血清白蛋白桥联双受体嗜肝作用等, 但都无法很令人满意地解释乙肝病毒嗜肝性问题. Mehdi *et al* 提出了β_2GPⅠ与rHBsAg具有结合特性, 这成为了我们科研的切入点. 由于ApoH与脂质有联系, 特别是乳糜微粒(CM)和高密度脂蛋白(HDL), HBV很有可能连接到这些脂质颗粒表面的ApoH上. 在血流中, CM部分被脂蛋白脂酶所降解, 导致CM残余, 这个残余部分被肝脏摄取, HDL在胆固醇的运输过程中也被肝脏摄取, 提示感染的HBV可能与CM或HDL颗粒结合, "免费搭车"带进肝细胞.

■研发前沿
HBV吸附、入侵肝细胞, 是病毒感染肝细胞并引起病变的第一步, 也是HBV嗜肝性的原因之一. 一直以来, HBV吸附肝细胞的机制都是研究的热点. 目前, 提出的主要观点有: HBV与肝细胞受体直接结合, HBV对肝细胞受体的相应配体存在于pres1(21-47)多肽部分. 但不仅肝细胞膜, 外周血和造血系的B细胞膜也含有pres1(21-47)肽段的特异性受体, pres1(21-47)这种广泛的结合很难解释HBV的嗜肝性; HBV能与戊乙醛聚合人血清白蛋白(PHSA)结合, 肝细胞表面有PHSA受体, HBV包膜上也有此受体, 推测HBV以PHSA为桥梁吸附至肝细胞表面. 但不用戊乙醛处理的人血清白蛋白则不表现为与HBV包膜结合的特性, 而血清中并不存在此种大分子. HBsAg与β_2GPⅠ可特异结合, 此复合物与HBV感染肝细胞的关系是目前的热点之一.

关键词: 肝癌; SMMC-7721细胞系; β_2糖蛋白Ⅰ; 乙型肝炎病毒; 受体; 流式细胞术

高沿航, 高普均, 王丹, 时阳, 李玉琴, 朴云峰, 杨翰仪. SMMC-7721肝癌细胞膜上β_2糖蛋白Ⅰ受体的表达. 世界华人消化杂志 2006;14(17):1731-1734
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1731.asp

0 引言

β_2-糖蛋白Ⅰ(beta-2-glycoproteinⅠ, β_2GPⅠ)是血浆中较为丰富的糖蛋白, 人血浆中的含量为150-200 mg/L, 他主要由肝细胞合成[1-2]. 因其具有亲脂特性, 参与脂肪的转运及代谢, 故又称为载脂蛋白H(apolipoprotein H, ApoH)[3-4]. 他是含326个氨基酸的单链糖蛋白, M_r 55 000. 有关β_2GPⅠ的研究文献大部分着眼于β_2GPⅠ参与凝血[5-7]、纤溶系统的调节[8-9]及其与系统性红斑狼疮和抗磷脂抗体综合征等自身免疫性疾病的相关性方面[10-13], 虽成果丰硕, 但对于其受体的研究鲜有报道. 我们通过酶联免疫吸附试验及Western blot方法验证了β_2GPⅠ与rHBsAg具有结合特性, 认为β_2GPⅠ可能介导HBV感染肝细胞[14]. 为了进一步明确乙肝病毒-β_2GPⅠ复合物与肝细胞建立联系的途径, 或者说, 在肝细胞膜上是否存在有β_2GPⅠ的受体, 我们利用Western blot技术对来自多种细胞(肝癌细胞株SMMC-7721、白血病细胞株HL-60及胃癌细胞株SGC-7901)的蛋白提取成分进行了筛选, 在人肝癌细胞株SMMC-7721的40 kDa处, 出现一特异的显色带, 这可能是特异的β_2GPⅠ结合蛋白. 在本研究中, 我们拟探讨这种蛋白是否定位于肝细胞膜上以及明确他与β_2GPⅠ的结合情况.

1 材料和方法

1.1 材料 BSA和FITC购自美国Sigma公司; 人β_2GPⅠ由吉林大学基础医学院张桂荣教授惠赠. 肝癌细胞株SMMC-7721及白血病细胞株HL-60由吉林大学第一医院血液研究所提供; 胃癌细胞株SGC-7901由吉林大学第一医院中心研究室提供. 液氮中冻存的细胞在37℃恒温水浴箱中迅速融化, 先用无血清IMDM洗涤, 700-800 r/min, 离心5 min, 然后用含100 mL/L胎牛血清的IMDM于37℃, 饱和湿度, 50 mL/L CO_2孵箱内培养, 第2天换液1次, 继续培养并观察, 培养条件不变, 3-4 d后待细胞长满后传代1次, 此后每3-4 d传代1次, SMMC-7721及SGC-7901为贴壁细胞, HL-60为悬浮细胞. 实验前收获细胞: 取生长良好的SMMC-7721及SGC-7901, 弃去旧培养液, 用冷PBS轻轻洗1次, 再用2.5 g/L胰蛋白酶消化, 待大部分细胞从壁上脱落后用胎牛血清终止反应, 加入少许PBS, 用滴管反复吹打至细胞完全从壁上脱落, 离心, 弃上清, 再用冷PBS洗涤2次, 再离心, 弃上清, 沉淀下来的细胞即为下一步实验所用. 取生长好的HL-60, 用冷PBS洗涤2次, 离心弃上清, 沉淀下来的细胞用作实验. FITC 1 mg溶于1 mL 0.5 mol/L $NaHCO_3$ (pH 9.0), β_2GPⅠ 50 μg溶于0.9 mL PBS (pH 7.4), 加入1 g/L FITC 0.1 mL, 4℃搅拌反应8 h. β_2GPⅠ-FITC对PBS透析, 4℃ 24 h, 中间换液3次, 除游离FITC. 标记物加入500 mL/L甘油, -20℃保存(避光).

1.2 方法

1.2.1 荧光显微镜观察 分别将SMMC-7721、HL-60及SGC-7901细胞各约1×10^6离心回收后, 用冷0.1 mol/L PBS洗2次, 1000 r/min离心回收, 每次5 min. 细胞悬浮于0.1 mol/L PBS 1 mL中, 加入FITC-β_2GPⅠ 20 μL, 4℃反应10 min. 标记后的细胞离心回收, 用冷PBS洗2次, 1000 r/min离心5 min. 细胞重悬于PBS 0.5 mL中, 取适量进行荧光显微镜观察摄影记录. 检测时用单色激发块: FITC; 三色激发块: DAPI/FITC/TRITC. FITC波长400-500 nm, 油镜检测镜头. 检测细胞是否存活时, 用40 g/L台盼蓝, 1∶1(V/V)滴片在显微镜下观察, 活的细胞不着色, 为亮圆形, 而死亡的细胞则为蓝色.

1.2.2 流式细胞仪分析 分别将SMMC-7721, HL-60和SGC-7901各约3×10^6细胞离心回收, 用冷0.1 mol/L PBS洗2次, 1000 r/min离心回收, 每次5 min. 细胞悬浮于0.1 mol/L PBS 3 mL中, 分别将SMMC-7721, HL-60和SGC-7901平均分为3管. 第1管分别加入FITC-β_2GPⅠ 20 μL, 第2管分别加入FITC-β_2GPⅠ 50 μL, 第3管不加FITC-β_2GPⅠ, 作为对照, 4℃反应10 min. 反应后离心回收用冷PBS洗2次, 1000 r/min离心5 min. 细胞重悬于PBS 1 mL中. 取少许细胞用40 g/L台盼蓝检测存活率. 用Coulter Elite分析, 激发波长488 nm, 发射波长513 nm, 计数5000个细胞.

统计学处理 χ^2检验, 检验水准$\alpha = 0.05$. $P<0.05$表示有统计学差异性, $P<0.01$表示有显著差异性.

2 结果

2.1 荧光显微镜观察 (1)细胞与FITC-β_2GPⅠ

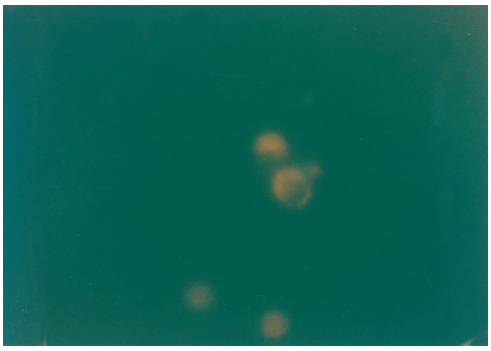


图 1 荧光显微镜观察FITC-β_2GPⅠ与SMMC-7721细胞的结合 (IF × 400).

作用, 荧光显微镜观察前, 检测细胞是否存活, SMMC-7721细胞, 细胞圆而亮, 不被台盼蓝着色, 表明细胞状态好, 可以进行荧光显微镜观察或流式细胞仪分析. (2)SMMC-7721与FITC-β_2GPⅠ作用后, 细胞膜附有大量荧光, 说明SMMC-7721与FITC-β_2GPⅠ能特异结合(图1). (3)HL-60和SGC-7901与FITC-β_2GPⅠ作用, 载玻片全部视野未见带有荧光的细胞.

2.2 流式细胞仪分析 (1)SMMC-7721加FITC-β_2GPⅠ 20 μL的分析图(图2A). 二者的结合率为19%, 明显高于FITC-β_2GPⅠ与HL-60的结合率(1.7%)及与SGC-7901的结合率(1.9%)(P<0.01). (2)SMMC-7721加FITC-β_2GPⅠ 50 μL的分析图(图2B). 在(2)中, SMMC-7721与FITC-β_2GPⅠ的结合率为20.8%, 与(1)比较(19%), 二者无差异(P>0.05), 说明SMMC-7721与FITC-β_2GPⅠ的结合率不随FITC-β_2GPⅠ量的增加而增高, 表明二者结合有饱和性.

3 讨论

长久以来, HBV有选择性地感染肝细胞的机制困扰着临床和基础研究人员, 先后提出了几种学说[15-17], 但都无法很令人满意地解释乙肝病毒嗜肝性问题. 我们在前期工作中也证实了β_2GPⅠ能与重组的乙肝疫苗特异性结合, 认为β_2GPⅠ可能介导HBV感染肝细胞[14]. β_2GPⅠ作为一种血浆蛋白, 他如若介导乙肝病毒感染肝细胞的过程, 中间似乎缺少一个重要的环节, 这一环节将乙肝病毒-β_2GPⅠ的复合物与肝细胞联系起来, 他可能是分布于肝细胞的膜蛋白, 是β_2GPⅠ的受体. 我们的研究小组在初期工作的基础上, 对肝细胞膜上究竟是否存在β_2GPⅠ受体, 进而介导了乙肝病毒感染肝细胞进行了研究. 我们采用蛋白印迹技术对来自3种细胞的蛋白提取成分进行筛选, 在肝癌细胞SMMC-7721的40 kDa处, 出现一特异的显色带, 这可能是一种特异的β_2GPⅠ结合蛋白. 这种蛋白究竟定位于肝细胞中的哪个部位, 他与β_2GPⅠ又具有怎样的结合特性? 在本研究中, 我们进行了进一步的探讨. 为了证明这一特异蛋白的位置, 我们使用FITC标记的人β_2GPⅠ为探针, 同SMMC-7721细胞作用, 实验中使用活的细胞, 避免了死亡细胞质膜外翻对结果的干扰, 同时探针与细胞的反应是在4℃进行, 且作用时间短(5-10 min), 避免了探针的内化, 然后立即取出少量细胞用台盼蓝染色, 证明是存活状态良好的细胞, 并用荧光显微镜观察. 结果表明, FITC-β_2GPⅠ与SMMC-7721有特异结合反应, 但与HL-60及SGC-7901细胞无反应, 说明了这一反应的特异性及这种未知蛋白的膜结合特性.

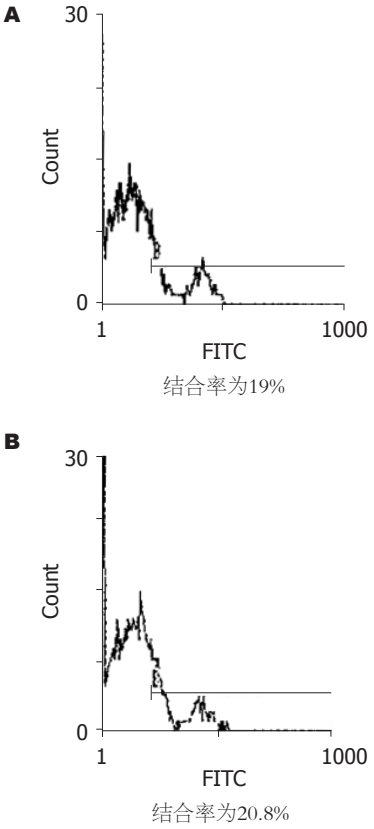


图 2 FACS分析FITC-β_2GPⅠ与SMMC-7721细胞的结合情况. A: SMMC-7721加20 μL FITC-β_2GPⅠ; B: SMMC-7721加50 μL FITC-β_2GPⅠ

细胞表面受体的生物学特性一般应具有受体与配体结合的特异性. 这种结合力极强, 具有高亲和性, 细胞表面受体的数目有限, 一般10^3-10^5个/细胞, 故细胞外低浓度的配体与受体结合即可使受体处于饱和状态. 受体与配

■相关报道

Mehdi *et al*的系列研究发现, β_2GPⅠ可与HBV表面结构相结合, 这种结合具有饱和性, 可以被过量的rHBsAg、抗HBsAg及抗β_2GPⅠ抗体所阻断, 还原以后的β_2GPⅠ结合活性被破坏, 表明β_2GPⅠ中22个二硫键的一个或一个以上在与HBsAg的结合中是必需的. 这一工作为开展HBV吸附肝细胞的机制的研究提供了新的思路. 同时, 研究发现在血管内皮细胞膜上存在β_2GPⅠ受体, 但对于在肝细胞膜上是否也存在其受体尚无报道.

■创新盘点

本文在验证了HBsAg与β_2GPⅠ可特异结合的基础上, 深入探讨二者形成的复合物与肝细胞之间的联系, 从一个新的角度阐释乙肝病毒嗜肝性的机制, 国内外未见相关报道.

■应用要点
如能阐明HBV嗜肝性机制，即可据此制定干预性的治疗措施，阻断HBV吸附、入侵肝细胞的过程. 同时，关于HBsAg与β_2GPⅠ联合感染肝细胞机制的研究也为探讨肝细胞癌发生机制打下基础，进而为提高肝癌的防治水平提供理论依据.

体呈非共价结合，其结合具有可逆性. 我们进行了FACS分析，以FITC标记的人的β_2GPⅠ为探针，同HL-60，SGC-7901和SMMC-7721细胞作用，通过Coulter Eliter检测，FITC-β_2GPⅠ与SMMC-7721的结合率明显高于FITC-β_2GPⅠ与HL-60及SGC-7901的结合率，表明β_2GPⅠ与SMMC-7721细胞膜结合的特异性及高亲和性. FITC-β_2GPⅠ与SMMC-7721的结合率不随FITC-β_2GPⅠ浓度的增加而升高，推测二者的结合具有饱和性. 综合以上结果，我们认为，在SMMC-7721肝细胞膜上存在着特异的结合蛋白，该蛋白很可能是β_2GPⅠ的受体，参与了乙肝病毒对肝细胞的感染过程. 目前，我们已继续开展对与β_2GPⅠ特异结合蛋白的基因克隆，重组克隆载体鉴定和目的基因序列测定，应用GenBank数据库对测序结果进行同源性分析，由此来发现与此β_2GPⅠ特异结合蛋白的基因片段具有高度同源性的物质；通过质谱分析确定其成分；再通过竞争抑制实验等最终明确β_2GPⅠ与其是否为配体与受体的关系. 在未来的工作中，我们将对该蛋白的功能做深入的研究.

4 参考文献

1 Kamboh MI, Ferrell RE, Sepehrnia B. Genetic studies of human apolipoproteins. IV. Structural heterogeneity of apolipoprotein H (beta 2-glycoprotein I). *Am J Hum Genet* 1988; 42: 452-457

2 Gries A, Nimpf J, Wurm H, Kostner GM, Kenner T. Characterization of isoelectric subspecies of asialo-beta 2-glycoprotein I. *Biochem J* 1989; 260: 531-534

3 Wurm H, Beubler E, Polz E, Holasek A, Kostner G. Studies on the possible function of beta 2-glycoprotein-I: influence in the triglyceride metabolism in the rat. *Metabolism* 1982; 31: 484-486

4 Nakaya Y, Schaefer EJ, Brewer HB Jr. Activation of human post heparin lipoprotein lipase by apolipoprotein H (beta 2-glycoprotein I). *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 95: 1168-1172

5 Brighton TA, Hogg PJ, Dai YP, Murray BH, Chong BH, Chesterman CN. Beta 2-glycoprotein I in thrombosis: evidence for a role as a natural anticoagulant. *Br J Haematol* 1996; 93: 185-194

6 Sorice M, Ferro D, Misasi R, Pittoni V, Longo A, Circella A, Garofalo T, Gradini R, Violi F, Gruenberg J, Valesini G. Evidence for anticoagulant activity and beta2-GPI accumulation in late endosomes of endothelial cells induced by anti-LBPA antibodies. *Thromb Haemost* 2002; 87: 735-741

7 Nojima J, Kuratsune H, Suehisa E, Futsukaichi Y, Yamanishi H, Machii T, Kitani T, Iwatani Y, Kanakura Y. Anti-prothrombin antibodies combined with lupus anti-coagulant activity is an essential risk factor for venous thromboembolism in patients with systemic lupus erythematosus. *Br J Haematol* 2001; 114: 647-654

8 Yasuda S, Bohgaki M, Atsumi T, Koike T. Pathogenesis of antiphospholipid antibodies: impairment of fibrinolysis and monocyte activation via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Immunobiology* 2005; 210: 775-780

9 Yasuda S, Atsumi T, Ieko M, Koike T. Beta2-glycoprotein I, anti-beta2-glycoprotein I, and fibrinolysis. *Thromb Res* 2004; 114: 461-465

10 Bertolaccini ML, Atsumi T, Escudero Contreras A, Khamashta MA, Hughes GR. The value of IgA antiphospholipid testing for diagnosis of antiphospholipid (Hughes) syndrome in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2001; 28: 2637-2643

11 Tsutsumi A, Matsuura E, Ichikawa K, Fujisaku A, Mukai M, Koike T. IgA class anti-beta2-glycoprotein I in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1998; 25: 74-78

12 Harel M, Aron-Maor A, Sherer Y, Blank M, Shoenfeld Y. The infectious etiology of the antiphospholipid syndrome: links between infection and autoimmunity. *Immunobiology* 2005; 210: 743-747

13 Atsumi T, Amengual O, Yasuda S, Matsuura E, Koike T. Research around beta 2-glycoprotein I: a major target for antiphospholipid antibodies. *Autoimmunity* 2005; 38: 377-381

14 高普均，郭延军，曲立科，时彤，张洪雁，董春娥，杨翰仪. β_2糖蛋白Ⅰ与重组乙型肝炎表面抗原的结合特性. 中华肝脏病杂志 2002; 10: 31-33

15 Neurath AR, Strick N, Sproul P, Ralph HE, Valinsky J. Detection of receptors for hepatitis B virus on cells of extrahepatic origin. *Virology* 1990; 176: 448-457

16 Seriolo B, Accardo S, Fasciolo D, Sulli A, Bertolini S, Cutolo M. Lipoprotein (a) and anticardiolipin antibodies as risk factors for vascular disease in rheumatoid arthritis. *Thromb Haemost* 1995; 74: 799-800

17 Moestrup SK, Schousboe I, Jacobsen C, Leheste JR, Christensen EI, Willnow TE. beta2-glycoprotein-I (apolipoprotein H) and beta2-glycoprotein-I-phospholipid complex harbor a recognition site for the endocytic receptor megalin. *J Clin Invest* 1998; 102: 902-909

电编 张敏 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年6月18日; 14(17): 1735-1738
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

HBsAg疫苗冲击树突状细胞联合乙肝免疫球蛋白对慢性乙型肝炎及HBV携带者的疗效

郑鹏远, 白 蓉, 娄海山, 唐芙爱, 白经修, 司方明, 琚 新, 徐建强

郑鹏远, 唐芙爱, 白经修, 司方明, 郑州大学第二附属医院消化科 河南省郑州市 450014
白蓉, 郑州大学第五附属医院内科 河南省郑州市 450052
娄海山, 琚新, 徐建强, 许昌市人民医院感染科 河南省许昌市 461000
河南省卫生厅医学创新人才工程项目, No. 2004-45
河南省科技厅科技攻关项目, No. 0324410006
通讯作者: 郑鹏远, 450014, 河南省郑州市经八路2号, 郑州大学第二附属医院消化科. medp7123@yahoo.com
电话: 0371-65261035
收稿日期: 2006-01-10 接受日期: 2006-02-09

Efficacy of HBsAg vaccine-pulsed dendritic cells combined with hepatitis B immunoglobulin in treatment of chronic hepatitis B patients and hepatitis B virus carriers

Peng-Yuan Zheng, Rong Bai, Hai-Shan Lou, Fu-Ai Tang, Jing-Xiu Bai, Fang-Ming Si, Xin Ju, Jian-Qiang Xu

Peng-Yuan Zheng, Fu-Ai Tang, Jing-Xiu Bai, Fang-Ming Si, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China
Rong Bai, Department of Internal Medicine, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Hai-Shan Lou, Xin Ju, Jian-Qiang Xu, Department of Infectious Diseases, Xuchang People's Hospital, Xuchang 461000, Henan Province, China
Supported by Medical Innovation Talent Program of Health Department, Henan Province, No. 2004-45, and the Key Item of Science and Technology Department of Henan Province, No. 0324410006
Correspondence to: Peng-Yuan Zheng, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 2 Jingba Road, Zhengzhou 450014, Henan Province, China. medp7123@yahoo.com
Received: 2006-01-10 Accepted: 2006-02-09

Abstract

AIM: To investigate the potential effect of HBsAg vaccine-pulsed dendritic cells (DC) combined with hepatitis B immunoglobulin (HBIg) on chronic hepatitis B (CHB) patients and hepatitis B virus (HBV) carriers.

METHODS: HBsAg vaccine-pulsed DC (10^6) and HBIg (200 U) were injected into 66 CHB patients once a month, respectively. Six months were considered as one course, and there were two courses in total. At the end of treatment, liver function, HBV DNA level and HBV markers in the patients were measured.

RESULTS: Of the 27 patients with HBeAg(+) CHB, 7 showed complete responses, and 14 showed partial responses. Of the 15 patients with HBeAg(-) CHB, complete responses were observed in 4 patients, and partial responses were observed in 8 cases. Of the 13 chronic HBV carriers, complete responses occurred in 5 cases, and partial responses occurred in 2 cases. Of the 11 inactive HBsAg carriers, 2 cases showed complete responses.

CONCLUSION: HBsAg vaccine-pulsed DC with HBIg is effective in the treatment of CHB patients and HBV carriers.

Key Words: Chronic hepatitis B; Dendritic cell; hepatitis B immunoglobulin

Zheng PY, Bai R, Lou HS, Tang FA, Bai JX, Si FM, Ju X, Xu JQ. Efficacy of HBsAg vaccine-pulsed dendritic cells combined with hepatitis B immunoglobulin in treatment of chronic hepatitis B patients and hepatitis B virus carriers. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(17):1735-1738

摘要

目的: 观察HBsAg疫苗冲击的树突状细胞与乙肝免疫球蛋白联合应用对慢性乙型肝炎的疗效.

方法: 慢乙肝患者66例每月1次注射HBsAg疫苗(10^6/次)冲击的树突状细胞, 乙肝免疫球蛋白200 U/次, 6次为1疗程, 共2疗程, 治疗结束后检查肝功能, HBV DNA定量及乙肝标志.

结果: HBeAg阳性慢乙肝27例治疗后有7例显示完全应答, 14例显示部分应答. HBeAg阴性

■背景资料
慢性乙型肝炎是我国常见的慢性传染病之一, 目前的治疗多以抗病毒药物应用. 我们从提高患者的免疫功能入手, 利用HBsAg致敏树突状细胞, 联合乙肝免疫球蛋白对慢乙肝患者进行治疗, 也取得了较好效果, 这是慢乙肝治疗的又一新途径. 该方法简便易行, 适合我国国情, 是一种有良好前景的方法.

■同行评价
CHB免疫疗法亟待探索, 本文选题良好, 具有先进性, 分组设计科学, 结论符合逻辑, 有参考价值.

的慢乙肝15例中有4例出现完全应答, 8例显示部分应答. 慢性HBV携带者13例中5例显示完全应答, 2例表现为部分应答. 11例非活动性HBsAg携带者中2例出现完全应答.

结论: HBsAg疫苗冲击的树突状细胞与乙肝免疫球蛋白联合可试用于慢乙肝的治疗.

关键词: 乙肝免疫球蛋白; 树突状细胞; 慢性乙型肝炎

郑鹏远, 白蓉, 娄海山, 唐芙爱, 白经修, 司方明, 琚新, 徐建强. HBsAg疫苗冲击树突状细胞联合乙肝免疫球蛋白对慢性乙型肝炎及HBV携带者的疗效. 世界华人消化杂志 2006;14(17):1735-1738
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1735.asp

0 引言

慢性乙型肝炎(CHB)是我国常见的慢性传染病之一, 由于目前所用抗病毒药物如干扰素, 其疗效有限, 不良反应较大; 核苷类似物虽然抗病毒作用强而快, 但疗程难以确定, 长期治疗均可产生耐药突变, 在治疗过程中引起ALT和乙型肝炎病毒(HBV) DNA的突破(breakthrough), 致使病情恶化[1]. 以及长期用药费用较高, 皆严重影响了抗病毒药物的及时广泛合理应用. 故探索新的治疗方法仍是必需的. 已知机体对HBV形成免疫耐受是HBV持续感染的主要原因. CHB患者树突状细胞(DC)功能低下, 导致机体内T、B淋巴细胞呈耐受状态[2]. 故如何打破免疫耐受状态, 诱导有效的机体免疫, 抑制并清除HBV是CHB免疫治疗的关键[3]. 部分HBV患者接种含有HBsAg或其他HBV相关蛋白后可检测到特异性的细胞免疫反应, 并有一定的抗病毒作用[4]. 汪晓莺 *et al*[5]以HBsAg疫苗冲击DC可使DC成熟度升高, MHC分子、共刺激分子表达增加, 免疫功能增强. 我们利用HBsAg疫苗冲击DC, 联合乙肝免疫球蛋白应用于CHB患者及携带者的治疗, 如下.

1 材料和方法

1.1 材料 按CHB防治指南(2005-12-11中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会联合修订)和病毒性肝炎防治方案(中华医学会传染病与寄生虫学分会, 肝病学分会联合修订2000-09西安)为标准, 选择门诊患者66例, 年龄15-46岁, 男42例, 女24例, 病程2-41 a, 可能为母婴传播者21例. 其中HBeAg阳性CHB 27例, 年龄18-45岁, 男17例, 女10例, 血清皆为HBsAg, HBeAg, 抗HBc三项阳性, HBV DNA>10^8-<10^{13}拷贝/L, ALT 117-10 002 nkat/L. HBeAg阴性CHB 15例, 年龄17-46岁, 男15例, 血清HBsAg, 抗HBe, 抗HBc三项阳性者13例, HBsAg, 抗HBc二项阳性者2例. HBV DNA>10^8-<10^{10}拷贝/L, ALT 834-2000 nkat/L. 慢性HBV携带者13例, 年龄15-37岁, 男6例, 女7例, 血清HBsAg, HBeAg, 抗HBc三项阳性者11例; HBsAg, 抗HBe, 抗HBc三项阳性者2例; HBV DNA>10^6-<10^{12}拷贝/L, ALT正常1 a以上. 非活动性HBsAg携带者11例, 年龄18-36岁, 男4例, 女7例, 血清HBsAg, 抗HBe, 抗HBc三项皆阳性. HBV DNA阴性, 肝功能持续正常1 a以上.

1.2 方法 DC制备方法见参考文献[6], 每例患者sc HBsAg疫苗(含$pres_1$) 86 μg冲击致敏的DC 10^6, 每月1次. 乙肝免疫球蛋白200 IU, im, 每月1次. 6次为1疗程, 共2疗程. 开始治疗前1 mo内, 每个疗程结束后及治疗结束后6-12 mo内检查HBV标志, 肝功能及血清中HBV DNA定量(PCR法). 根据“慢性乙型肝炎防治指南”中的抗病毒治疗应答标准统计结果.

2 结果

在27例HBeAg阳性CHB中, 病毒学单项应答结果为13/27 (48.1%)HBV DNA转阴性, 6/27 (22.2%) HBV DNA降低, 其中1例女, 32岁, 于结束治疗1 a后转阴, 余8/27 (29.6%)未应答. 在单项血清学应答中, 发生HBeAg/抗HBe血清学转换9/27 (33.3%), 3/27 (11.1%)为HBeAg消失, 即由HBsAg、HBeAg、抗HBc三项阳性转变为HBsAg、抗HBc二项阳性, 15/27 (55.6%)未应答. 在单项生化学应答中10/27 (37.0%)肝功能恢复正常, 3/27 (11.1%)ALT降低, 余14/27 (51.9%)未应答(表1).

在15例HBeAg阴性CHB中, 于治疗后单项病毒学应答为7/15 (46.7%)HBV DNA转阴性, 8/15 (53.3%)无应答. 单项血清学反应中有1例男, 32岁, 抗HBe消失, 由HBsAg, 抗HBe, 抗HBc三项阳性转为HBsAg, 抗HBc二项阳性. 单项生化学应答中有5/15 (33.3%)ALT恢复正常, 1/15 (0.067%)ALT降低, 余9/15 (60%)无应答(表1).

慢性HBV携带者中, 经治疗后在单项病毒学应答中7/13 (53.8%) HBV DNA转阴性, 6/13 (46.2%)未应答. 在单项血清学应答中, HBsAg, HBeAg, 抗HBc三项阳性的11例中有5/11

表 1 慢性乙型肝炎患者治疗后应答情况统计表 (n/n)

诊断	单项应答			时间顺序应答			联合应答(治疗结束1 a后)		
	病毒学	血清学	生化学	治疗结束时	持久	复发	完全	部分	无
HBeAg(+)慢性乙型肝炎	19/27	12/27	13/27	21/27	20/27	1/27	9/27[1]	12/27	6/27
HBeAg(−)慢性乙型肝炎	7/15		6/15	10/15	10/15		4/15	8/15	3/15
慢性HBV携带者	7/13	5/11		6/13	6/13		5/13	2/13	6/13
非活动性HBsAg携带者					2/11[2]		2/11		9/11

[1]其中1例女, 25岁, 乙肝标志全部呈阴性. 另1例女, 30岁, 治疗后经妊娠、分娩出现HBsAg/抗HBs血清学转换. [2]其中1例女, 20岁, 血清乙肝标志全部呈阴性. 另1例女, 21岁, 血清乙肝标志物由HBsAg, 抗HBc二项阳性转变为抗HBs, 抗HBc二项阳性, 即发生HBsAg/抗HBs血清学转换.

(45.5%)发生HBeAg/抗HBe血清学转换, 余6/11 (54.5%)未应答. 单项生化学应答中有1例男, 24岁, ALT升高达8335 nkat/L, 治疗结束后1 a恢复正常(表1).

在非活动性HBsAg携带者中, 有1例女, 23岁, 在治疗结束后单项血清学应答显示乙肝标志由HBsAg, 抗HBe, 抗HBc三项阳性转变为HBsAg, 抗HBc二项阳性. 治疗1 a后随访中有1例女, 20岁, 血清乙肝标志全部呈阴性, 未出现抗HBs, 肝功能正常, HBV DNA阴性. 另1例女, 21岁, 血清乙肝标志物由HBsAg, 抗HBc二项阳性转变抗HBs, 抗HBc二项阳性, 即发生HBsAg/抗HBs血清学转换, 肝功能正常, HBV DNA阴性(表1).

3 讨论

从本文结果可以看出本免疫疗法对CHB, 无论是HBeAg阳性或HBeAg阴性及慢性HBV携带者都有一定疗效, 治疗结束1 a后的完全应答中依次为33.3% (9/27), 26.7% (4/15), 38.5% (5/13). HBeAg阳性的CHB中有7/27例(25.9%), 慢性HBV携带者中有5/11例(45.5%)发生HBeAg/抗HBe血清学转换, 达到治疗终点[7]. 证明特异性免疫疗法可用于CHB的治疗, 推测其机制可能是HBV特异性多肽负载的DC诱导出高频数、功能强的CTL[8], 即是经HBsAg疫苗冲击后DC数量增多, DC表面分子如CD1a, CD_{80}, CD_{83}, HLA-DR等表达增加, DC成熟度增加, 提高了DC的抗原呈递功能[9]. 此外CHB患者外周血DC在无刺激剂存在时分泌IL-12水平较正常人低, 示CHB患者DC功能存在缺陷[2], 经HBsAg疫苗冲击后DC细胞因子分泌异常状态改变, IL-12分泌增加, IL-6分泌减少, 也促进DC成熟和功能恢复. 由于DC功能缺陷的纠正, 对HBsAg抗原呈递能力增强, 特异性激活CD_8^+T细胞和CD_4^+T细胞, IFN、IL-2等水平升高, 机体免疫能力增强, 诱导HBsAg特异的CTL反应, 从而清除病毒及表达HBsAg抗原的感染了HBV的肝细胞[10-11]. 治疗中联合应用的乙肝免疫球蛋白, 是针对HBV共同抗原a的特异性抗体, 可通过免疫沉淀反应, 形成免疫复合物, 以中和循环中的HBV, 通过抗原呈递细胞增加HBsAg内吞数量, 增强HBsAg特异性CTL克隆的增殖反应, 从而清除HBV[12].

此外1例HBeAg阳性慢乙肝, 女, 25岁, 病程5 a余, 经1个疗程治疗后乙肝标志全部呈阴性, 已随访2 a余, 未见抗HBs出现. 另1例非活动性HBsAg携带者, 女, 20岁, 可能为母婴传播, 经2个疗程治疗后1 a乙肝标志全部呈阴性, 未见抗HBs出现. 这可能是HBsAg疫苗致敏DC后, IL-2, IL-12, IFN等细胞因子分泌增加, 免疫功能增强或由于乙肝免疫球蛋白的应用, 增加了Th1型细胞分化, 促进体内IFN, IL-12分泌, 有效清除HBV后使HBsAg阴性[13-14]. 确切机制尚待进一步探讨. 另外有2例女性患者, 经治疗后发生HBsAg/抗HBs血清学转换1例, 21岁, 病程15 a以上, 为非活动性HBsAg携带者, 经2个疗程治疗后1 a发生HBsAg/抗HBs血清学转换. 另1例为HBeAg阳性慢乙肝, 女, 30岁, 病程10 a以上, 2个疗程后, 经妊娠分娩后出现HBsAg/抗HBs血清学转换.

总之, 利用乙肝疫苗与免疫佐剂如IL-2, 干扰素, 乙肝免疫球蛋白, GM-CSF等联合[15]或联合DC制成特异性DC疫苗[16], 在CHB治疗中已取得较好效果. 这说明从提高CHB患者免疫功能为出发点的CHB特异性免疫治疗途径, 增强CHB患者的T细胞应答是有效的、可行的. 无论对HBeAg阴性或阳性的CHB还是慢性HBV携带者皆可试用. 特别是慢性HBV携带者, 因其血液中有较高水平的HBV, 患者本人及其周围人的心理负担较重, 迫切要求治疗, 若以肝组织学检查决定治疗与否, 这在实践中难以实施. 采用特

异性免疫治疗, 多数患者还是乐于接受的. 对非活动性HBsAg携带者不必进行治疗, 包括免疫治疗在内. 这类患者只要长期追踪观察, 嘱其注意保护肝脏, 提高自身免疫能力, 正确调整心理, 还是可能自愈的(尽管本组病例中有3例出现完全应答). 由于本方法使用简便, 费用低廉, 无明显毒副作用, 只需每月皮下、肌肉注射1次, 适合广大农村及城镇社区应用, 是一种有前景的CHB的治疗方法. 但还需要更大样本、更多时间、更深入地探索, 特别是在病理学、分子生物学方面的研究更待深入. 还应提醒的是对有条件者, 仍尽量合理正规使用干扰素, 以减少肝癌的发生.

4 参考文献

1 斯崇文. 对当前慢性乙型肝炎抗病毒治疗的看法. 中华传染病杂志 2005; 23: 73-74

2 Beckebaum S, Cicinnati VR, Zhang X, Ferencik S, Frilling A, Grosse-Wilde H, Broelsch CE, Gerken G. Hepatitis B virus-induced defect of monocyte-derived dendritic cells leads to impaired T helper type 1 response *in vitro*: mechanisms for viral immune escape. *Immunology* 2003; 109: 487-495

3 俞海俐, 施光峰. 乙型肝炎的慢性化和慢性乙型肝炎的免疫学治疗. 中华传染病杂志 2004; 22: 142-144

4 Dahmen A, Herzog-Hauff S, Bocher WO, Galle PR, Lohr HF. Clinical and immunological efficacy of intradermal vaccine plus lamivudine with or without interleukin-2 in patients with chronic hepatitis B. *J Med Virol* 2002; 66: 452-460

5 汪晓莺, 孙晓雷, 汤伟, 孙伟红, 苏丽, 张学光. HBsAg体外冲击的慢性乙肝患者树突状细胞的生物学特性及其对HBV特异性CTL的诱导作用. 中国免疫学杂志 2003; 19: 850-853

6 李明松, 袁爱力, 张万岱, 刘思德, 吕爱民, 周殿元. 树突状细胞体外诱导抗肝癌免疫. 世界华人消化杂志 1999; 7: 161-163

7 任红. 中国慢性乙型肝炎治疗策略——2004年全国乙型肝炎治疗策略专家峰会纪要. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 326-328

8 王贵强, 魏来, 翁心华, 庄辉. 中华医学会第十二次全国病毒性肝炎及肝病学术会议纪要. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 626-627

9 童华生, 张一, 袁铿, 胡银英, 袁芳. HBsAg负载慢性乙型肝炎患者外周血树突状细胞表型分子的变化. 中华传染病杂志 2005; 23: 32-34

10 刘惠萍, 郑曲波, 祖萍, 张宜俊, 汪恩浩, 曾滢. 高剂量乙型肝炎疫苗对体内血树突状细胞的影响. 上海免疫学杂志 2003; 23: 351-356

11 曲建慧, 张玲霞, 成军, 辛绍杰. 乙型肝炎治疗的新靶点与新方法. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1663-1666

12 Shouval D, Samuel D. Hepatitis B immune globulin to prevent hepatitis B virus graft reinfection following liver transplantation: a concise review. *Hepatology* 2000; 32: 1189-1195

13 Horiike N, Md Fazle Akbar S, Ninomiya T, Abe M, Michitaka K, Onji M. Activation and maturation of antigen-presenting dendritic cells during vaccine therapy in patients with chronic hepatitis due to hepatitis B virus. *Hepatol Res* 2002; 23: 38-47

14 Akbar SM, Furukawa S, Hasebe A, Horiike N, Michitaka K, Onji M. Production and efficacy of a dendritic cell-based therapeutic vaccine for murine chronic hepatitis B virus carrierer. *Int J Mol Med* 2004; 14: 295-299

15 郑佳. 乙型肝炎疫苗的应用进展. 中国计划免疫 2005; 11: 155-158

16 Lipscomb MF, Masten BJ. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev* 2002; 82: 97-130

电编 张敏 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年6月18日; 14(17): 1739-1741
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

中药通腑泻热方辅助治疗消化性溃疡急性穿孔并发脓毒症23例

谢晓华, 赵先明, 黄 谊, 杨银芬

谢晓华, 赵先明, 黄谊, 杨银芬, 广州中医药大学第一附属医院外科 广东省广州市 510405
广东省中医药管理局科研基金资助项目, No. 099514
通讯作者: 谢晓华, 510405, 广东省广州市机场路16号, 广东省广州中医药大学第一附属医院外科. xiexh268@163.com
电话: 020-36591843
收稿日期: 2006-03-31 接受日期: 2006-05-08

Chinese herbs *Tongfu Xiere Fang* in treatment of acute perforated peptic ulcer complicated with sepsis: an analysis of 23 cases

Xiao-Hua Xie, Xian-Ming Zhao, Yi Huang, Ying-Fen Yang

Xiao-Hua Xie, Xian-Ming Zhao, Yi Huang, Ying-Fen Yang, Department of Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China
Supported by the Scientific Research Fund from Traditional Chinese Medicine Administration Bureau of Guangdong Province, No. 099514
Correspondence to: Xiao-Hua Xie, Department of Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 16 Airport Road, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China. xiexh268@163.com
Received: 2006-03-31 Accepted: 2006-05-08

Abstract

AIM: To observe the efficacy of Chinese herbs *Tongfu Xiere Fang* in the treatment of acute perforated peptic ulcer complicated with sepsis.

METHODS: Based on the routine surgical operation and application of antibiotics (n = 44), Chinese herbs *Tongfu Xiere Fang* were used in 23 patients with acute perforated peptic ulcer complicated with sepsis, and the rest (n = 21) served as controls.

RESULTS: In comparison with those of the controls, the incidence rate of complications in the Chinese herbs group was significantly decreased (Intestinal obstruction: 5/23 *vs* 11/21, $P < 0.05$; multiple organ dysfunction syndrome: 2/23 *vs* 7/21, $P < 0.05$), and the mortality rate had a decreasing tendency. After treatment, plasma levels of endotoxin (8.7 ± 3.2 kEU/L *vs* 16.8 ± 4.5 kEU/L, $P < 0.01$), tumor necrosis factor-α (23.3 ± 8.6 ng/L *vs* 30.7 ± 8.7 ng/L, $P < 0.01$), interleukin-6 (30.4 ± 13.6 ng/L *vs* 51.4 ± 16.2 ng/L, $P < 0.01$) and interleukin-8 (20.6 ± 9.4 ng/L *vs* 31.7 ± 10.8 ng/L, $P < 0.01$) in the Chinese herbs group were decreased significantly, while the level of interleukin-2 (754.8 ± 72.4 ng/L *vs* 600.8 ± 65.8 ng/L, $P < 0.01$) was increased significantly as compared with those in the controls.

CONCLUSION: Chinese herbs *Tongfu Xiere Fang* is effective in the treatment of acute perforated peptic ulcer complicated with sepsis by decreasing the level of blood endotoxion and proinflammatory cytokines, so as to reduce the mortality rate.

Key Words: Acute perforated peptic ulcer; Sepsis; Traditional Chinese Medicine; *Tongfu Xiere Fang*

Xie XH, Zhao XM, Huang Y, Yang YF. Chinese herbs *Tongfu Xiere Fang* in treatment of acute perforated peptic ulcer complicated with sepsis: an analysis of 23 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(17):1739-1741

摘要

目的: 观察本法治疗消化性溃疡急性穿孔并发脓毒症的效果.

方法: 在常规手术和抗生素治疗基础上, 给予中药通腑泻热方治疗本病23例, 与常规治疗的21例作随机对照观察.

结果: 与对照组比较, 治疗组并发症发生率降低(肠梗阻: 5/23 *vs* 11/21, $P<0.05$; MODS: 2/23 *vs* 7/21, $P<0.05$), 死亡率呈下降趋势, 治疗后血浆内毒素(8.7±3.2 kEU/L *vs* 16.8±4.5 kEU/L, $P<0.01$), TNF-α (23.3±8.6 ng/L *vs* 30.7±8.7 ng/L, $P<0.01$), IL-6 (30.4±13.6 ng/L *vs* 51.4±16.2 ng/L, $P<0.01$), IL-8 (20.6±9.4 ng/L *vs* 31.7±10.8 ng/L, $P<0.01$)均显著降低, IL-2 (754.8±72.4 ng/L *vs* 600.8±65.8 ng/L,

■背景资料
消化性溃疡急性穿孔并发脓毒症病情危急, 须通过手术紧急对原发病灶进行处理和腹腔灌洗引流以消除脓毒症的始动因素. 但是高危手术的创伤, 高效抗生素杀灭细菌的同时引发内毒素的释放, 常加重脓毒症病情. 然而除了对症治疗和支持疗法以外, 目前对脓毒症的治疗尚缺乏有效的手段, 死亡率仍居高不下. 因此积极探索本病急危重症的有效救治方法, 仍是消化外科临床医学的重要课题.

■应用要点
在常规医疗的基础上, 辩证应用中药通腑泻热方治疗, 可提高消化性溃疡急性穿孔并发脓毒症患者的疗效, 改善预后.

P<0.01)明显升高.

结论: 中药通腑泻热方能降低消化性溃疡急性穿孔并发脓毒症患者血中内毒素及促炎细胞因子水平, 能提高与机体免疫功能直接相关的细胞因子, 防治MODS, 降低病死率.

关键词: 消化性溃疡穿孔; 脓毒症; 中医药; 通腑泻热方

谢晓华, 赵先明, 黄谊, 杨银芬. 中药通腑泻热方辅助治疗消化性溃疡急性穿孔并发脓毒症23例. 世界华人消化杂志 2006;14(17):1739-1741
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1739.asp

0 引言

消化性溃疡急性穿孔并发脓毒症是常见急危重症之一, 需紧急手术治疗. 但脓毒症状况常影响术后病情恢复, 可诱发多种合并症, 甚至诱发多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS), 而腹腔脓毒症所致的MODS是导致本病死亡的主要原因[1]. 2001-01/2006-01我院在常规手术及抗生素治疗基础上, 应用中药通腑泻热方治疗消化性溃疡急性穿孔并发脓毒症, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 消化性溃疡急性穿孔并发脓毒症患者44例, 均为急诊入住患者, 用随机数字表法随机分为治疗组和对照组. 治疗组23例, 男20例, 女3例; 年龄37-80(平均56.5±10.8)岁; 发病至入院时间18-56(平均26.3±8.5) h, APACHE-Ⅱ评分6-15(平均9.86±4.12)分. 对照组21例, 男19例, 女2例; 年龄41-73(平均55.8±11.7)岁; 发病至入院时间15-60(平均28.2±7.6) h, APACHE-Ⅱ评分6-13(平均9.40±3.85)分. 两组在性别、年龄、病程和APACHE-Ⅱ评分方面比较无显著性差异(P>0.05), 具有可比性. 病例选择标准: 纳入病例同时符合如下诊断标准和中医辩证标准, 并排除慢性脏器功能衰竭和长期使用糖皮质激素或肿瘤化疗的病例. 消化性溃疡急性穿孔的诊断标准参照“中西医结合胃十二指肠溃疡急性穿孔诊疗标准”[2]; 脓毒症诊断标准采用1992年美国胸科医师协会和急救医学会联合推荐的定义和诊断标准[3]拟定, 即有明确的腹腔感染灶, 伴有如下表现两项以上者: (1)体温>38℃或<36℃; (2)心率>90次/min; (3)呼吸频率>20次/min或$PaCO_2$<4.3 kPa; 白细胞计数>12.0×10^9/L或<4.0×10^9/L或杆状核白细胞>0.01. 中医辩证标准参照“中西医结合胃十二指肠溃疡急性穿孔诊疗标准”毒热型的辩证要点和中医温病学三焦辩证之热结肠腑辩证要点[4].

1.2 方法 2组均按外科常规急诊手术及术后对症处理、抗生素治疗. 治疗组给予中药通腑泻热方治疗, 早期在禁食及胃管减压期间采用通腑泻热灌肠方, 处方: 大黄(后下)、龙胆草、栀子各30 g, 忍冬藤、虎杖、地胆头各60 g, 莱菔子、芒硝(冲)各20 g, 由本院制剂室制成500 mL的灌肠液备用, 于术前1次和术后8 h开始2次/d, 肛管插入肛门约20-25 cm, 成人每次用250 mL缓慢灌入并保留30-60 min; 解除禁食后给予通腑泻热内服方加减, 处方: 柴胡、川楝子、莱菔子各15 g, 黄芩、赤芍、枳壳各10 g, 大黄6 g, 虎杖、蒲公英各30 g, 甘草3 g, 1剂/d, 加水350 mL煎液200 mL, 分2次口服, 疗程5 d. 对照组用等量生理盐水灌肠或口服, 方法疗程同上. 全部病例在治疗前、治疗后7 d分别抽取外周静脉血测定内毒素(ETS)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白介素(IL)-2, 6, 8, 并观察临床疗效及术后并发症情况. ETS测定方法: 采用合成基质偶氮显色法鲎试剂定量测定, 药盒由上海伊华临床医学科技公司提供, 由本院临床药理超净实验室测定. TNF-α, IL-6, 8: 用酶联法, 药盒由深圳晶美生物工程有限公司提供, 由本院免疫室测定. IL-2: 用放免法, 药盒由北京东亚免疫技术研究所提供, 由本院放免室测定. 术后早期肠梗阻及MODS的判定标准参考相关文献[2,5].

统计学处理 采用t检验和χ^2检验, 用统计软件SAS 8.0处理.

2 结果

治疗组死亡1例, 对照组死亡3例, 均死于术后并发MODS, 两者差异无显著性意义. 治疗组术后早期肠梗阻(5/23 *vs* 11/21, P<0.05)和MODS (2/23 *vs* 7/21, P<0.05)发生率降低, 与对照组差别有显著性意义. 治疗组治疗后ETS, TNF-α, IL-6, 8显著降低, IL-2明显升高, 与本组治疗前和对照组治疗后差别有非常显著性意义(表1).

3 讨论

早期肠梗阻及肠道功能障碍是本病术后主要并发症, 也是脓毒症病情进一步恶化甚至诱发MODS的关键部位. 积极保护和改善肠道功能, 阻断和控制肠源性炎症介质释放及肠内细菌毒素移位, 是治疗本病的重要策略[6]. 中医理论

表 1 通腑泻热方治疗后ETS, TNF-α, IL-2, 6, 8的变化 (mean ± SD)

分组	*n*	治疗	内毒素 (kEU/L)	TNF-α (ng/L)	IL-2 (ng/L)	IL-6 (ng/L)	IL-8 (ng/L)
治疗	23	前	45.3 ± 8.4	53.1 ± 21.7	125.7 ± 26.0	703.0 ± 298.6	339.9 ± 165.9
		后	8.7 ± 3.2[b]	23.3 ± 8.6[b]	754.8 ± 72.4[b]	30.4 ± 13.6[b]	20.6 ± 9.4[b]
对照	21	前	46.3 ± 7.2	52.2 ± 23.3	138.7 ± 28.5	688.8 ± 306.7	312.6 ± 151.6
		后	16.8 ± 4.5	30.7 ± 8.7	600.8 ± 65.8	51.4 ± 16.2	31.7 ± 10.8

[b]$P<0.01$ *vs* 本组治疗前, 对照组治疗后.

■同行评价

中西医结合诊治急危重症是未来疾病的发展方向, 本文充分体现了“六腑以通为用”的理论观点, 具有科学性.

认为, 消化性溃疡急性穿孔并发脓毒症的病理机制为中焦失运, 气血郁闭, 病情进一步发展则郁久化热, 出现热结腑实, 热深厥深. 若腑气不通、热毒不泄, 则邪毒客于营血, 内传五脏, 相继出现五脏阴阳气血衰败. 其中腑气不通、热毒不泄是本病的基本病机, 所以基本治法宜通腑泻热. 在剧烈腹痛呕吐或禁食、持续胃管减压, 不宜内服药物的情况下, 早期用药可通过灌肠由肠道吸收发挥疗效, 待解除禁食后即给予内服中药. 作者在辩证的基础上, 根据岭南地区病多夹湿特点, 拟定的通腑泻热灌肠方和内服方是该科中西医结合治疗急腹症的常用方药, 主要功效为通腑泻热、清热解毒. 经临床观察, 本方灌肠配合电针早期治疗消化性溃疡单纯性急性穿孔, 具有加强疏通中焦气闭, 减轻或防止郁久化热的作用, 从而提高非手术治疗成功率[7].

本结果表明, 本方通腑泻热、清热解毒的功效具有促进肠道功能恢复保护肠道屏障, 遏制肠道细菌和内毒素移位的作用, 从而有效调控消化性溃疡急性穿孔并发脓毒症患者血中内毒素及促炎细胞因子水平, 提高与机体免疫功能相关的细胞因子, 能发挥多途径、多靶点、多环节的免疫调理及遏制全身炎症反应的双向作用[8], 进一步可防治MODS降低病死率.

4 参考文献

1 岳茂兴. 腹腔严重感染致多器官功能障碍的临床救治新对策. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1656-1657

2 陈贵廷, 杨思澍. 实用中西医结合诊断治疗学. 第1版. 北京: 中国医药科技出版社, 1991: 1246-1250

3 ACCP/SCCM. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20: 864-874

4 彭胜权. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 80-81

5 王今达, 王宝恩. 多脏器功能失常综合征(MODS)病情分期诊断及严重程度评分标准. 中国危重病急救医学 1995; 7: 346-347

6 岳茂兴. 胃肠道功能障碍及衰竭的诊断和治疗. 世界华人消化杂志 2002; 10: 3-6

7 谢晓华, 陈铭, 崔学教. 通腑泄热灌肠合剂治疗溃疡病急性穿孔58例早期疗效观察. 新中医 1998; 30: 37, 54

8 岳茂兴, 李成林, 李学彪, 刘志国, 杨鹤鸣, 姜玉峰, 张诗琳. 腹部外科脓毒症临床救治258例. 世界华人消化杂志 2006; 14: 109-113

电编 张敏 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年6月18日; 14(17): 1742-1744
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

美常安联合柳氮磺吡啶治疗溃疡性结肠炎22例

向军英, 冯迎春

■背景资料
目前溃疡性结肠炎在我国的发病率逐年增加, 虽然SASP的运用使一些患者病情好转, 但仍然有部分患者使用SASP治疗后症状无改善, 治疗效果差.

向军英, 冯迎春, 川北医学院附属医院消化内科 四川省南充市 637000
通讯作者: 向军英, 637000, 四川省南充市, 川北医学院附属医院消化内科. xjying93@163.com
收稿日期: 2005-10-25 接受日期: 2005-11-20

Therapeutic effect of Medilac-S combined with sulfasalazine in treatment of ulcerative colitis: an analysis of 22 cases

Jun-Ying Xiang, Ying-Chun Feng

Jun-Ying Xiang, Ying-Chun Feng, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan Province, China
Correspondence to: Jun-Ying Xiang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan Province, China. xjying93@163.com
Received: 2005-10-25 Accepted: 2005-11-20

Abstract
AIM: To evaluate the therapeutic effect of Medilac-S combined with sulfasalazine (SASP) in the treatment of ulcerative colitis (UC).

METHODS: Forty-six patients with mild or moderate UC (active phase) were divided into group A (n = 22) and B (n = 24). The patients in group A were treated with Medilac-S and SASP, while those in group B, serving as the controls, were treated with SASP. The total efficacy rate and the changes of main symptoms were statistically analyzed.

RESULTS: The overall efficacy of group A was 91.66%, which was higher than that of the controls (68.18%, P < 0.05). There was significant difference before and after treatment, as well as between the two groups (P < 0.05) in the changes of abdominal pain, diarrhea, mucus bloody stool and tenesmus (P < 0.05).

CONCLUSION: Combination of Medilac-S and SASP is superior to SASP alone in the treatment of UC.

Key Words: Ulcerative Colitis; Medilac-S; Treatment

Xiang JY, Feng YC. Therapeutic effect of Medilac-S combined with sulfasalazine in treatment of ulcerative colitis: an analysis of 22 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(17):1742-1744

摘要
目的: 评价联合美常安治疗溃疡性结肠炎(UC)的疗效.

方法: 轻、中度活动期UC患者46例, 随机分为美常安加柳氮磺吡啶(SASP)治疗组(n = 22)和SASP对照组(n = 24), 评价治疗前后总的疗效、主要症状的变化.

结果: 治疗组总有效率为91.66%, 明显高于对照组(总有效率为68.18%); 腹痛、腹泻、黏液血便、里急后重主要症状变化的比较二组间有统计学意义(P<0.05).

结论: 联合美常安治疗溃疡性结肠炎比单用SASP疗效好.

关键词: 溃疡性结肠炎; 美常安; 治疗

向军英, 冯迎春. 美常安联合柳氮磺吡啶治疗溃疡性结肠炎22例. 世界华人消化杂志 2006;14(17):1742-1744
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1742.asp

0 引言
溃疡性结肠炎(UC)又称慢性非特异性溃疡性结肠炎, 是一种病因不明的直肠和结肠的慢性炎症性疾病. 病变主要限于大肠黏膜与黏膜下层. 临床表现以腹泻、黏液脓血便和腹痛为主. 病情轻重不等, 多呈反复发作慢性病程. 近年来在我国的发病率有逐渐增加趋势, 目前缺乏根治措施, 给患者造成很大的痛苦. 我院从2003年开始在常规治疗的基础上, 加用美常安治疗本病, 取得较好的近期疗效. 现报告如下.

1 材料和方法
1.1 材料 临床确诊的初发型、慢性复发型活动期轻、中度溃疡性结肠炎患者共46例, 男性21

例, 女性25例, 年龄46.5±10.5岁, 病程最长15 a, 最短10 mo, 平均5.4±0.6 a. 随机分为治疗组24例, 对照组22例. 两组患者的性别、年龄、原发病和病情等各项指标, 经统计学处理差别无显著性(P>0.05).

1.2 方法

1.2.1 诊断标准 参照2000年成都全国炎症性肠病学术研讨会制定的标准[1], 及中华医学会消化病学分会对炎症性肠病诊断治疗规范的建议: 有持续或反复发作的腹泻、黏液及脓血便伴腹痛、里急后重和不同程度的全身症状, 可有关节、皮肤、眼及肝胆等肠外表现. 排除细菌性痢疾、阿米巴痢疾、慢性血吸虫病、肠结核等感染性结肠炎及结肠CD、缺血性结肠炎、放射性结肠炎等. 结肠镜检查发现病变多从直肠开始, 呈连续性弥漫性分布, 有以下改变之一: 黏膜血管纹理模糊、紊乱、充血、水肿、易脆、出血及脓性分泌物附着; 也常见黏膜粗糙呈细颗粒状; 病变明显处可见弥漫性多发糜烂或溃疡; 慢性病变者可见结肠袋囊变浅、变钝或消失、假息肉及桥形黏膜等. 活检病理检查证实有糜烂、溃疡及隐窝脓肿, 腺上皮变性、增生及杯状细胞减少.

1.2.2 治疗 全部患者均常规给与营养支持疗法, 口服柳氮磺吡啶(SASP), 1.0 g/次, 4次/d. 治疗组在此基础上加用美常安(北京韩美药品有限公司生产), 2粒/次, 3次/d, 三餐前口服.

1.2.3 观察 治疗前、治疗2, 4 wk进行症状学随访, 并检查血、尿、大便常规以及肝肾功能, 观察药物不良反应, 所有病例治疗前后均进行结肠镜检查, 并在病变部位取活组织进行病理检查.

1.2.4 疗效判断 完全缓解: 临床症状消失, 结肠镜检查发现黏膜大致正常. 有效: 临床症状基本消失, 结肠镜检查发现黏膜轻度炎症或假息肉形成. 无效: 经治疗后临床症状、内镜及病理检查结果均无改善.

统计学处理 采用样本率的χ^2检验和均数的t检验, P<0.05为差异有显著性.

2 结果

2.1 总的疗效比较 治疗组24例, 其中完全缓解11例(45.83%), 有效11例(45.83%), 无效2例(8.34%), 总有效率91.66%; 对照组22例, 其中完全缓解5例(22.73%), 有效10例(45.45%), 无效7例(31.82%), 总有效率68.18%. 因此治疗组的疗效优于对照组, 并且经统计学处理, 两组间差异有显著意义(P<0.05).

表 1 两组治疗前后症状变化结果

	治疗组 (n)		对照组 (n)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
腹痛	12	2	11	8
腹泻	24	4	22	8
黏液血便	20	1	19	10
里急后重	10	1	8	4

2.2 主要症状疗效比较 两组治疗前后腹痛、腹泻、黏液血便、里急后重主要临床症状的同组比较皆P<0.05, 有统计学差异. 治疗后两组腹痛、腹泻、黏液血便、里急后重临床症状比较P<0.05, 两组间差异有显著意义(表1).

2.3 不良反应 治疗组1例出现恶心; 对照组1例出现恶心、呕吐, 1例头晕. 均为轻微一过性的, 继续服药后消失. 其余患者无明显不良反应及并发症.

3 讨论

UC是一种非特异性的炎性肠病, 其病因和发病机制尚未完全明确, 已知肠道黏膜免疫系统异常反应所导致的炎症反应在UC发病中起重要作用, 目前认为这是由多因素相互作用所致, 主要包括环境、遗传、感染和免疫因素.

柳氮磺吡啶(SASP)是治疗本病的常用药物, 该药口服后大部分到达结肠, 在结肠内经细菌分解为5-氨基水杨酸与磺胺吡啶, 前者是主要的有效成分, 可抑制由嘌呤氧化酶或白细胞介导的氧自由基的形成及抑制肥大细胞放大炎症的作用从而消除炎症. 但由于SASP有抑菌作用, 同时由于UC患者大量使用了抗生素, 反过来又抑制了细菌对SASP的分解作用, 使5-氨基水杨酸在结肠内的浓度不高, 疗效受限.

微生态制剂主要包括益生菌及益生元. 益生菌主要是指能够促进肠道菌群生态平衡, 对人体起有益作用的活的微生物制剂, 其对肠道屏障作用的影响主要通过以下机制来实现: (1)生态平衡理论; (2)生物拮抗理论; (3)生物夺氧; (4)参与肠道局部的体液免疫及细胞免疫[2]. 本实验中所用益生菌是美常安, 即枯草杆菌、肠球菌二联活菌. 实验显示他的作用机制不是通过直接补充双歧杆菌, 而是利用生物夺氧作用, 利用无毒、无害的非致病微耗氧微生物[3], 即枯草杆菌暂时在肠内定植, 降低局部氧浓度和氧还

■研发前沿
关于溃疡性结肠炎的治疗和发病机制方面的研究已成为目前的研究热点.

■应用要点
本研究显示联合用药比单一用药效果好, 有临床推广价值.

原电位, 造成适合厌氧的正常肠道优势菌群生长的环境. 从而抑制需氧的G^-杆菌生长, 减少细菌及内毒素易位. 而耐酸的枯草杆菌与耐胆盐的肠球菌二种活菌的结合, 可使其在消化系统的存活率大大提高, 从而发挥最大的生物学效应.

本文结果显示: 采用美常安与柳氮磺吡啶两者联合治疗对主要症状及内镜下的改善明显优于单用SASP. 治疗组的总有效率91.66%高于对照组总有效率68.18%. 我们认为美常安与柳氮磺吡啶合用, 通过不同的机制来减轻病情, 缩短病程, 具有协同作用, 两药合用效果好于单用一种药物治疗, 临床上有推广价值.

4 参考文献

1 欧阳钦, 万学红, 温忠慧, 胡仁伟. 全国炎症性肠病学术会议纪要. 中华消化杂志 2001; 21: 235-236

2 张达荣. 消化系疾病与微生态. 上海: 上海科学技术出版社, 2001: 437-442

3 Guarner C, Runyon BA, Young S, Heck M, Sheikh MY. Intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *J Hepatol* 1997; 26: 1372-1378

电编 张敏 编辑 菅鑫妍

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2006年第十二届华北区消化学术会议征文通知

本刊讯 为了进一步推动华北地区(北京、天津、河北、山西和内蒙)的消化学术交流与发展、帮助广大消化专业工作者全面了解国内外消化基础和临床研究进展, 提高消化疾病诊治和研究水平. 第十二届华北地区消化学术会议, 将于2006-10-27/29在河北省石家庄举办. 会议由北京、天津、河北、山西和内蒙医学会消化病学分会联合主办, 河北省医学会消化病学分会承办. 本次会议将就近年来国内外消化领域的研究进展、诊断和治疗方面的新技术、新方法进行广泛的学术交流, 大会将邀请国内著名消化病学专家作专题学术报告. 欢迎消化界各位专家和同仁积极投稿参会, 参会者可获得国家级Ⅰ类继续教育学分. 会务费: 500元(含餐费及资料费), 交通住宿费自理.

1 征文内容

(1)消化系统疾病流行病学、发病机制、诊断和治疗的研究进展;

(2)消化系统肿瘤的发病机制、诊断和治疗以及预防的进展;

(3)消化内镜的应用现状及内镜下诊断和治疗的操作表演;

(4)慢性肝病及肝癌近年来的发病情况治疗研究进展;

(5)当前医源性疾病在消化疾病方面的表现与现状;

(6)消化疾病在当前临床研究中热点、难点, 需要解决的问题.

2 征稿要求

来稿要求是未在国内外刊物上公开发表过的论文, 800字摘要一份, 摘要应包括: 目的、材料和方法、结果和结论4个部分. 来稿一律使用A4纸打印、WORD格式, 并附软盘或发电子邮件至: huabeixiaohua@yahoo.com.cn.

截稿日期: 2006-08-30, 以当地邮戳为准. 请务必在信封右上角注明“华北区消化会议”字样.

会议地址: 河北医科大学第二医院图书馆楼三楼会议室

联系人: 河北省医学会学术会务部(邮政编码050011) 徐辉 电话: 0311-85988457; 河北医科大学第二医院(邮政编码050000)蒋树林 电话: 0311-87222301; 0311-87222951

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年6月18日; 14(17): 1745-1747
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

婴儿肝炎综合征、胆道闭锁、胆总管囊肿与巨细胞病毒感染的关系

王宝香, 朱润庆

王宝香, 朱润庆, 武汉大学医学院, 武汉市儿童医院消化内科 湖北省武汉市 430015
通讯作者: 王宝香, 430015, 湖北省武汉市, 武汉市儿童医院消化内科. deying-lu@163.com
电话: 027-62775984
收稿日期: 2006-03-30 接受日期: 2006-04-22

Relationship between human cytomegalovirus infection and three diseases including infantile hepatitis syndrome, biliary stresia, and choledochal cyst

Bao-Xiang Wang, Ren-Qing Zhu

Bao-Xiang Wang, Ren-Qing Zhu, Medical College of Wuhan University; Wuhan Children's Hospital, Wuhan 430015, Hubei Province, China
Correspondence to: Bao-Xiang Wang, Wuhan Children's Hospital, Wuhan 430015, Hubei Province, China. deying-lu@163.com
Received: 2006-03-30 Accepted: 2006-04-22

Abstract

AIM: To explore the relationship between human cytomegalovirus (HCMV) infection and infantile hepatitis syndrome (IHS), biliary atresia, and choledochal cyst.

METHODS: The blood and urine samples from children with IHS (n = 98), biliary atresia (n = 50) and choledochal cyst (n = 50), and the blood and breast milk from their mothers were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Sixty-two subjects without hepatobiliary diseases and their mothers served as controls.

RESULTS: The positive rates of blood CMV-IgM were 61.2% and 33.7% in IHS children and their mothers, 56.0% and 36.0% in biliary atresia children and their mothers, 22.0% and 6.0% in choledochal cyst children and their mothers, and 22.6% and 8.1% in the controls and their mothers, respectively. The positive rates of urine HCMV antigen were 71.4%, 62.0%, 20.0% and 24.2% in IHS, biliary atresia, and choledochal cyst, and control children, while the rates were 91.8%, 82.0%, 54.0% and 56.5%, respectively. The positive rates of CMV-IgM and HCMV antigen in HIS and biliary atresia group were higher than those in the controls (P < 0.01), while the rates in choledochal cyst group had no significant differences with the controls (P > 0.05).

CONCLUSION: HCMV infection is associated with IHS and biliary atresia, but not with choledochal cyst.

Key Words: Human cytomegalovirus; Infantile hepatitis syndrome; Biliary atresia; Choledochal cyst

Wang BX, Zhu RQ. Relationship between human cytomegalovirus infection and three diseases including infantile hepatitis syndrome, biliary stresia, and choledochal cyst. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(17):1745-1747

摘要

目的: 探讨人巨细胞病毒(HCMV)感染与婴儿肝炎综合征(IHS)、胆道闭锁、胆总管囊肿的关系.

方法: 采用ELISA法和免疫组化法对IHS患儿98例、胆道闭锁患儿50例、胆总管囊肿患儿50例血尿及其母亲血和乳汁进行检测, 同时检测62例非肝胆疾病患儿及其母亲.

结果: 血CMV-IgM阳性率IHS组61.2%, 其母亲33.7%; 胆道闭锁组56.0%, 其母亲36.0%; 胆总管囊肿组22.0%, 其母亲6.0%. 对照组阳性率22.6%, 其母亲8.1%. 患儿尿HCMV抗原阳性率HIS组71.4%, 其母亲乳汁HCMV抗原91.8%; 胆道闭锁组62.0%, 其母亲82.0%; 胆总管囊肿组20.0%, 其母亲54.0%. 对照组阳性率24.2%, 其母亲乳汁56.5%. IHS组及胆道闭锁组患儿及其母亲阳性率分别高于对照组患儿及其母亲(P<0.01), 胆总管囊肿组患儿及其母亲阳性率均不高于对照组患儿及其母亲(P>0.05).

■背景资料
巨细胞病毒严重危害胎儿、新生儿、婴幼儿的健康, 可导致多器官多系统的损害. 目前巨细胞病毒感染与肝胆疾病之间的关系虽有报道, 但尚未明确.

■应用要点
本研究旨在揭示讨HCMV与HIS、胆道闭锁、胆总管囊肿的关系，为临床在治疗上述三种肝胆疾病时选用抗病毒药物阐明其理论依据，及早研制减毒活疫苗、必要时终止妊娠或停止母乳喂养对降低HIS及胆道闭锁的发病率具有重要意义.

结论：IHS及胆道闭锁的发病与HCMV感染有关，胆总管囊肿的发病与HCMV感染无明显相关性.

关键词：巨细胞病毒感染；婴儿肝炎综合征；胆道闭锁；胆总管囊肿

王宝香，朱润庆. 婴儿肝炎综合征、胆道闭锁、胆总管囊肿与巨细胞病毒感染的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(17):1745-1747
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1745.asp

0 引言

人巨细胞病毒(HCMV)是人类先天性感染的主要病原，其传递方式多为母婴垂直传播，孕妇发生原发性或复发性HCMV感染时，病毒可通过胎盘侵袭胎儿引起宫内感染，可导致流产、胎儿宫内生长迟缓、死胎、生后夭折等，肝胆、血液系统疾病及不同程度的神经系统损害，甚至造成婴幼儿智力低下、精神运动发育迟缓等严重后果[1]. 在此，我们采用ELISA法检测血CMV-IgM和免疫组化法检测抗CMV^{SP}阳性细胞，探讨HCMV与婴儿肝炎综合征、胆道闭锁、胆总管囊肿的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 2004-01/2006-01住院IHS患儿98例(男65例，女33例)，年龄30-78 d，临床表现为黄疸、肝脏质地变硬(右锁骨中线肋下≥2.5 cm)、肝脏总胆红素及直接胆红素均增高(直接胆红素/总胆红素≥50%-60%)、血清丙氨酸转氨酶(ALT)值增高[2]. 2001-01/2006-01住院胆道闭锁患儿50例(男22例，女28例)，年龄1-3 mo，临床表现为生后1-2 wk黄疸进行性加重，伴陶土色大便、肝脾肿大，肝脏质地变硬(右锁骨中线肋下≥2.5 cm)、肝脏总胆红素及直接胆红素均增高(直接胆红素/总胆红素≥60%)、血清ALT值增高，B超示胆囊不显像或缩小，放射性核素显像示排泄受阻，其中12例接受手术治疗，3例术后病理检查毛细胆管中见巨细胞病毒包涵体；胆总管囊肿患儿50例(男18例，女32例)，年龄0.25-7岁，临床表现为黄疸、腹痛、右上腹肿块，B超及CT、磁共振检查确诊，且手术进一步确诊，术后病理检查均未发现巨细胞病毒包涵体. 清晨07:00抽取母子不抗凝的新鲜静脉血1 mL立即送检；患儿12 h新鲜尿液及母亲新鲜乳汁(≥100 mL)留于清洁容器中，立即送检.

表 1 IHS、胆道闭锁、胆总管囊肿与HCMV感染的关系

分组	n	阳性率 n (%)			
		血CMV-IgM		CMV-SP^{TM}	
		患儿	患儿母血	患儿尿	患儿母乳汁
IHS组	98	60(61.2)	33(33.7)	70(71.4)	90(91.8)
胆道闭锁组	50	28(56.0)	18(36.0)	31(62.0)	41(82.0)
胆总管囊肿组	50	11(22.0)	3(6.0)	10(20.0)	27(54.0)
对照组	62	14(22.6)	5(8.1)	15(24.2)	35(56.5)

1.2 方法 CMV-IgM检测试剂盒(Zeus公司生产)；鼠抗CMV(1∶50 PBS稀释，北京中山有限公司生产)；过氧化物酶标记的链霉卵白素染色试剂盒(简称SP^{TM}，美国ZYMED公司生产). 操作方法：见试剂盒说明书.

统计学处理 采用χ^2检验.

2 结果

巨细胞病毒与婴儿肝炎综合征及胆道闭锁的关系密切，分别与对照组相比，经χ^2检验，前二者与对照组的差异有非常显著意义(P<0.01，表1)，胆总管囊肿组与对照组的差异无显著意义(P>0.05).

3 讨论

CMV是一种DNA病毒，HCMV是人体最常见的机会性感染病毒之一，用检测抗体方法调查HCMV感染率，发达国家人群感染率40%-60%，发展中国家为95%-100%. HCMV可在人体内许多细胞尤其是血液中的单核细胞中长期潜伏，抑制机体的免疫系统. 当人体免疫功能低下时导致多种疾患. 其中危害最大的人群是婴儿和免疫缺陷者. 人们发现HCMV感染是常见的母婴传播性疾病[3-4]. 孕妇HCMV感染可在宫内经胎盘传给胎儿，分娩过程中婴儿吸入母血或生后吮入奶汁而得病. 许多文献报道HCMV感染是引起小儿先天性畸形的主要原因之一[5-6]. 随着人们对HCMV的逐渐认识，HCMV感染引起肝胆疾病的报道也日益增多[7-8]，其中关于HCMV感染引起胆道闭锁的报道也日益增多[9-10].

近年，通过对流行病学调查及病理学观察，多数学者认为，IHS与胆道闭锁组织学检查极为相似，应归属于同一病理过程. 只是一种炎症病变的不同阶段的表现，且可同时存在. IHS是炎症过程的早期阶段，胆道闭锁炎症过程的终末阶段，是炎症性破坏的结局，致使胆管纤维疤痕化闭塞，肝脏发生巨细胞变性，胆管上皮细胞损

坏致胆腔闭塞, 最终至胆汁排泄通路梗阻, 出现梗阻性黄疸. 而胆总管囊肿是先天性胆道囊性扩张症, 主要由胚胎期胆道或胰胆管发育异常引起, 也有报道与病毒感染有关[11-12]. 我们采用ELISA法检测母子血CMV-IgM及免疫组化试管法检测抗CMVSP^{TM}阳性细胞. 结果表明IHS及胆道闭锁组HCMV感染率高于对照组, 胆总管囊肿与对照组无明显差别, 说明IHS、胆道闭锁的发病与HCMV感染有关. 目前, 国外也有报道肝脏CMV感染破坏肝脏胆管系统可导致严重的胆汁淤积及完全缺乏毛细胆管系统[13]. 其机制尚须进一步探讨. IHS及胆道闭锁组患儿母亲HCMV感染率也高于对照组母亲, 表明HCMV引起IHS及胆道闭锁可能与母孕期HCMV活动性感染垂直传播给胎儿或围产期分娩过程中婴儿吸入母血感染或婴儿生后吸吮奶汁的接触传染有关. 通过上述检测, 我们发现HCMV感染是IHS及胆道闭锁发病的一个重要的原因. HCMV感染破坏肝脏胆管系统, 肝脏是炎症性变化, 如门脉区炎性细胞浸润、肝小叶发生微小脓灶或局限性坏死, 闭塞胆管引起胆管炎, 致胆汁淤积引起婴儿肝炎综合征; HCMV感染进一步发展, 产生胆管周围纤维变性, 使胆管逐渐闭塞, 导致胆管闭锁[14]. 董兆文 *et al*[15]曾对孕妇血清中HCMV抗体(IgM)与其流产的绒毛中HCMV抗原检测进行了对照, 其结果显示二者之间有高度的一致性, 说明母婴之间存在垂直传播. 国内报道HCMV孕期活动性感染给子代的危险性为22.4%, 国外报道孕早期宫内HCMV感染率为20%[16], 两数值相近. 由此可见, 一旦发生孕期HCMV感染很容易引起胎儿损害. 孕妇较普通妇女的HCMV活动性感染的机会更多一些, 可能由于孕期内分泌的机能和代谢的改变, 以及孕期母体为保护胎儿而呈暂时性的免疫低下状态, 可以激活潜伏在孕妇体内的HCMV, 从而成为活动性感染. 因此, 在妇幼卫生保健工作中, 必须加强防治HCMV感染的各种措施, 开展孕期及哺乳期血清流行病学监测, 尽快研制HCMV减毒活疫苗, 必要时终止妊娠或停止母乳喂养, 对降低IHS及胆道闭锁的发病率具有重要意义. 此外, 及早治疗IHS的HCMV感染, 尽可能减少胆道闭锁的发病率.

4 参考文献

1 Alford CA, Stagno S, Pass RF, Britt WJ. Congenital and perinatal cytomegalovirus infections. *Rev Infect Dis* 1990; 12 Suppl 7: S745-753

2 董永绥. 婴儿肝胆疾病的现状和进展. 中华临床医生 1999; 27: 7-9

3 方峰, 董永绥, 魏晴, 刘双又. 巨细胞病毒感染的母婴传播研究. 同济医科大学学报 1995; 24: 474

4 杨学磊, 杜文慧, 刘晓红, 加娜尔, 孙荷. 母婴配对巨细胞病毒感染的研究. 中国实用儿科杂志 2000; 15: 355-356

5 Wu TC, Hruban RH, Ambinder RF, Pizzorno M, Cameron DE, Baumgartner WA, Reitz BA, Hayward GS, Hutchins GM. Demonstration of cytomegalovirus nucleic acids in the coronary arteries of transplanted hearts. *Am J Pathol* 1992; 140: 739-747

6 Nuovo GJ, Gallery F, MacConnell P, Becker J, Bloch W. An improved technique for the in situ detection of DNA after polymerase chain reaction amplification. *Am J Pathol* 1991; 139: 1239-1244

7 王晓红, 郭红梅, 朱启镕, 王岱明. 婴儿巨细胞病毒感染与胆道闭锁的关系. 实用儿科临床杂志 2005; 20: 274-275

8 黄志华, 龚四堂, 董永绥. 肝外胆道闭锁与巨细胞病毒感染相关性研究. 同济医科大学学报 1998; 27: 306-308

9 Oliveira NL, Kanawaty FR, Costa SC, Hessel G. Infection by cytomegalovirus in patients with neonatal cholestasis. *Arq Gastroenterol* 2002; 39: 132-136

10 Tarr PI, Haas JE, Christie DL. Biliary atresia, cytomegalovirus, and age at referral. *PEDIATRICS* 1996; 97: 828-831

11 王燕霞. 先天性胆总管囊肿的病因、病理及诊断研究现状. 中国实用儿科杂志 1999; 14: 518-519

12 高世昌, 郭艳春. 先天性胆总管囊肿–附13例报告. 中国优生与遗传杂志 2001; 9: 120-121

13 Kage M, Kosai K, Kojiro M, Nakamura Y, Fukuda S. Infantile cholestasis due to cytomegalovirus infection of the liver. A possible cause of paucity of interlobular bile ducts. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117: 942-944

14 Mack CL, Sokol RJ. Unraveling the pathgenesis and etiology of biliary atresia. *Pediatric Research* 2005; 57: 87R-94R

15 董兆文, 崔应琦, 王毅, 杨增全, 陈岩, 刘孙斌. 绒毛组织免疫组织化学技术检测早孕期人巨细胞病毒宫内感染的研究. 生殖医学杂志 1994; 3: 118

16 Whitley RJ. Congenital cytomegalovirus infection: epidemiology and treatment. *Adv Exp Med Biol* 2004; 549: 155-160

■名词解释

巨细胞病毒: 是一种DNA病毒, 人巨细胞病毒(HCMV)是人体最常见的机会性感染病毒之一. 其特点是细胞肿胀、核变大, 形成巨大细胞, 核内有致密的嗜碱性包涵体, 其外有一晕轮围绕, 宛如“猫头鹰眼”.

■同行评价

本文采用ELISA和免疫组化方法检测婴儿肝炎综合征、胆道闭锁、胆总管囊肿患儿及其母亲样品中的人巨细胞病毒抗原/抗体, 以此为依据探讨人巨细胞病毒感染与这些疾病的相关性, 其方法可靠, 分析讨论全面, 结论有说服力.

电编 张敏 编辑 潘伯荣

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年6月18日; 14(17): 1748
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

病例报告 CASE REPORT

苯巴比妥致固定性药疹1例

梁淑文, 屈昌民, 王晓英

■背景资料
在临床工作中, 抗生素过敏史受到大家的普遍重视. 对常用药物的过敏情况往往容易被忽视. 复方制剂常被使用, 但临床医生对其组成成分有时了解不够. 本例提示, 应重视常用药物的过敏情况, 在使用复方制剂前要清楚其组成成分, 以免出现过敏反应.

梁淑文, 屈昌民, 王晓英, 北京解放军306医院消化内科 100101
通讯作者: 梁淑文, 100101, 北京解放军306医院消化内科.
电话: 010－66356729转2212
收稿日期: 2006-03-10 接受日期: 2006-03-30

摘要
报告1例苯巴比妥治疗Gilbert综合征致固定性药疹的少见病例, 并复习了相关文献. 固定性药疹是药物过敏反应中皮肤损害的常见疹型, 但由苯巴比妥所致者较少见. 对苯巴比妥过敏的部分患者可有磺胺、去痛片过敏史; 某些复方制剂含有苯巴比妥, 故使用苯巴比妥前应仔细了解有无磺胺、去痛片过敏史, 对复方制剂必须清楚其组成成分, 防止苯巴比妥引起不良反应.

关键词: 苯巴比妥; 鲁米那; Gilbert综合征; 药疹

梁淑文, 屈昌民, 王晓英. 苯巴比妥致固定性药疹1例. 世界华人消化杂志 2006;14(17):1748
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1748.asp

0 引言
苯巴比妥致固定性药疹较少见, 应用苯巴比妥治疗Gilbert综合征时引起固定性药疹1例, 现报告如下:

1 病例报告
男, 39岁. 因先天性非溶血性黄疸(Gilbert综合征)入院. 对磺胺、去痛片和克感敏过敏. 入院后苯巴比妥60 mg 3/d治疗, 服用1次4 h后双手背、双足背瘙痒, 双手背、双足背各有一红色斑疹, 手背为1.5 cm×1 cm, 足背为圆形, 直径4 cm, 经扑尔敏4 mg 口服3/d 、维生素C 1.0静滴1/d、葡萄糖酸钙20 mL静滴1/d抗过敏治疗1 wk皮疹逐渐消退、瘙痒消失. 患者口服另一厂家生产的苯巴比妥15 mg 4 h后在双手背、双足背相同的部位出现同样的皮疹, 经扑尔敏4 mg 口服3/d治疗4 d后消退.

2 讨论
Gilbert综合征[1]是由于遗传性或获得性肝细胞微粒体中胆红素葡萄糖醛酸转移酶活性不足, 影响非结合胆红素在肝细胞内结合反应的正常进行, 以致使肝细胞对胆红素的摄取也受到障碍, 因而造成肝细胞对非结合胆红素的摄取和结合功能的双重缺陷, 致使血中非结合胆红素增高而引起黄疸. 苯巴比妥又名鲁米那, 是诊断和治疗Gilbert综合征的措施之一[1]. 不仅具有镇静、催眠和抗惊厥作用, 还可诱导肝细胞葡萄糖醛酸转移酶的活性, 增加肝细胞与非结合胆红素的结合, 促使结合胆红素排泄和增加胆汁流量, 以降低非结合胆红素, 从而使黄疸减轻或消退. 苯巴比妥常见不良反应: **倦睡、眩晕、头痛、乏力等**. 过敏反应多表现为红斑, 偶有荨麻疹型、麻疹样型和固定红斑型同时存在[2]. 严重者可引起剥脱性皮炎[3]. 一般在用药1-2 d出现[4]. 固定性药疹是药物过敏反应中皮肤损害的常见疹型, 但由苯巴比妥所致者较少见[5]. 该患者先后应用不同药厂生产的苯巴比妥后, 均在手背、足背相同部位出现相同的红斑. 该患者服用苯巴比妥后出现反应时间短, 仅4 h. 据报道, 苯巴比妥过敏的部分患者可有磺胺、去痛片过敏史[6], 此患者曾有磺胺、去痛片过敏史, 故应重视常用药物过敏史, 在用苯巴比妥前要仔细询问有磺胺、去痛片过敏情况, 对有磺胺、去痛片过敏史者应避免使用苯巴比妥. 苯巴比妥是某些复方制剂(如常用的有安痛定片、去痛片、撒烈痛片等)成分之一, 提醒临床医师在使用复方制剂前应知晓其组成成分.

3 参考文献
1 郑芝田. 胃肠病学. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 1020-1022
2 柯元芳, 顾传志. 鲁米那钠引起三种不同类型药疹一例. 中华皮肤科杂志 1996; 29: 293
3 周湘玲, 李卫平. 病毒性肝炎患者口服鲁米那致严重剥脱性皮炎1例. 医学理论与实践 2003; 16: 692
4 苏喜改, 柴爱军. 苯巴比妥引起严重固定性药疹. 药物不良反应杂志 2004; 1: 48-49
5 卢长云. 鲁米那引起固定性药疹二例报告. 河南医药信息 1994; 2: 27
6 黄爱明. 口服鲁米那致固定性药疹1例的护理. 齐齐哈尔医学院学报 2005; 26: 105

电编 李琪 编辑 张海宁

世界华人消化杂志 2006年6月18日; 14(17): 1749-1753
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

世界华人消化杂志投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊, 中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊.

1 投稿总则

1.1 性质 世界华人消化杂志®, 国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 大16开, 旬刊, 每期160页, 定价24元, 全年864元, 邮发代号82-262, 由世界胃肠病学杂志社出版. 世界华人消化杂志主要报道消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化病理、消化预防医学、消化护理、消化医学、影像消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化诊断指南、消化治疗指南、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊. 世界华人消化杂志被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录. 国内为中国科技论文统计与分析(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录. 2005年版中国科技期刊引证报告:《世界华人消化杂志》的总被引频次为3 353, 位居1 608种中国科技论文统计源期刊的第8位, 内科医学类, 28种期刊的第2位.《世界华人消化杂志》的影响因子为1.769, 位居1 608种中国科技论文统计源期刊的第14位, 内科医学类, 28种期刊的第2位.《世界华人消化杂志》的即年指标0.211, 他引总引比0.30, 地区分布数28, 基金论文比0.43, 国际论文比0.01. 世界华人消化杂志荣获2001、2003年度百种中国杰出学术期刊称号.

1.2 栏目 述评, 食管癌, 胃癌, 肝癌, 病毒性肝炎, 大肠癌, 幽门螺杆菌, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确. 专家述评4 000字以内, 研究原著6 000字以内, 焦点论坛4 000字以内, 文献综述6 000字以内, 研究快报4 000以内字, 临床经验1 800字以内, 病例报告800字以内.

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals). 见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47.

2.2 名词术语 应标准化, 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, 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD_{50}, 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.

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标.

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(国家科技部, 2003年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2004年版)收录的学术期刊. 世界胃肠病学杂志社, 100023, 北京市2345信箱郎辛庄北路58号院怡寿园1066号, 电话: 010-85381901 Email: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com.

静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服*po*, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, $T_{1/2}$不能写成tl/2或$T\frac{1}{2}$, *V*max不能Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*), *Ilex pubescens* Hook, *et* Arn.*var.glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*n*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; Ibid, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), S(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, ℃), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), T_{max}, C_{max}, *V*d, $T_{1/2}$ *CI*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

2.4 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30kDa(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±1.2℃, 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±0.2℃. BP用kPa(mmHg), RBC数用×10^{12}/L, WBC数用×10^9/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm×6 cm×4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO_2结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B_1、维生素B_2、维生素B_6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B_{12}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; 七年, 7 a; 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 mg, 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•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年, 10 a; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/ L酒精; 5% CO_2, 50 mL/L CO_2; 1∶1 000肾上腺素, 1 g/ L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/ L或100 g/ L葡萄糖; 45 ppm=45×10^{-6}; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用*g*; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

2.5 统计学符号 (1)*t*检验用小写*t*; (2)*F*检验用英文大写*F*; (3)卡方检验用希文小写χ^2; (4)样本的相关系数用英文小写*r*; (5)自由度用希文小写υ; (6)样本数用英文小写*n*; (7)概率用英文斜体大写*P*. 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 统计学显著性用^aP <0.05, ^bP <0.01(P >0.05不注). 如同一表中另有一套*P*值, 则^cP <0.05, ^dP <0.01; 第三套为^eP <0.05, ^fP <0.01等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 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1 000-1 500 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±SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5±420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6±0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4±0.27 cm, 其SD/3=0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48→23.5→24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定:分母≤100, 百分数到个位; 101≤分母≤1 000, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65. 完整的阿位伯数字不移行!

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

3 稿件格式

3.1 *题名* 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字左右, 最好不超过26个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

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

3.3 *单位* 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 *第一作者简介* 格式如: 张旭晨, 男, 1966-02-26生, 河北省定县人, 汉族. 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 *基金资助项目* 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No.30224801

3.6 *通讯作者* 格式如: 通讯作者: 马连生, 030001, 山西省太原市双塔西街77号, 太原消化病研治中心. wcjd@wjgnet.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 接受日期:

3.7 *英文摘要*

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.

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”.

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

基金资助项目 格式如: Supported by National

World Journal of Gastroenterology 自2005-01-01起为周刊发行, 每月7、14、21、28日出版. 北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-261. WJG出版的模式为开放存取+印刷版. 免费通过http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp获取, 即: 阅读、下载、复制、打印和检索论文的全文.

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起为旬刊发行, 每月8、18、28日出版. 北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-262.《世界华人消化杂志》出版的模式为开放存取+印刷版. 免费通过http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp获取, 即: 阅读、下载、复制、打印和检索论文的全文.

Natural Science Foundation of China, No.30224801

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

收稿及接受日期 格式如: Received: Accepted:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致. 格式如下:

Abstract

AIM:

METHODS:

RESULTS:

CONCLUSION:

Zhang XC, Gao RF, Li BQ, Ma LS, Mei LX, Wu YZ, Liu FQ, Liao ZL. Effects of Weixibao nizhuanwan on gastric precancerous lesions 300 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006; 14:

3.8 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象. 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写*P*, 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值), 中文摘要格式如下:

摘要

目的:

方法:

结果:

结论:

张旭晨, 高瑞丰, 李炳庆, 马连生, 梅立新, 吴玉珍, 刘凤芹, 廖振林. 胃细胞逆转丸治疗胃癌前期病变300例. 世界华人消化杂志 2006;14:

3.9 正文标题层次为 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 正文内序号连排用(1), (2), (3).

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系.

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可.

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论.

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾.

图表 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …. 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: $^{a}P<0.05$, $^{b}P<0.01$($P>0.05$不注). 如同一表中另有一套*P*值, 则$^{c}P<0.05$, $^{d}P<0.01$; 第3套为$^{e}P<0.05$, $^{f}P<0.01$. *P*值后注明何种检验及其具体数字, 如$P<0.01$, $t = 4.56$ *vs* 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. "空白"表示无此项或未测, "-"代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用*t*/min, *c*/(mol/L), *p*/kPa, *V*/mL, *t*/℃表达. 黑白图请附黑白照片, 并考入磁盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小7.5 cm×4.5 cm, 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴.

致谢 致谢后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

4 参考文献 本刊采用"顺序编码制"的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在"Pang *et al*"的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注码号. 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年核心期刊为准, 引用被PubMed收录的期刊文献用英文表达, 请附引用文献网上摘要打印件, 包括PMID编号(摘要的左下方). 按顺序编号装订, 并考入磁盘内. 在引用参考文献页码末尾注明PMID编号; 无PMID编号的期刊请删除(重要文献必须保留者, 请附首页复印件). 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. 参考文献格式如下:

1 Ma LS, Pan BR. Strengthen international academic exchange and promote development of gas-troenterology. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 1 [PMID: 11819215]

2 马连生, 潘伯荣, 马景云. 世界胃肠病学杂志英文版的现状. 世界华人消化杂志 2001; 9: 855-863

3 Lam SK. Academic investigator's perspectives of medical treatment for peptic ulcer. In: Swabb EA, Azabo S, eds. Ulcer disease: investigation and basis for therapy. New York: Marcel Dekker, 1991: 431-450

4 尚克中, 陈九如. 胃肠道造影原理与诊断. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1995: 382-385

4 投稿须知

4.1 投稿信件 来稿包括所有作者签名的作者投稿函. 内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)可建议熟悉该专业的审稿人或因利益冲突而不适宜审阅该稿的审稿人姓名; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部, 所有来稿均需接受同行审阅.

4.2 审稿过程 所有来稿均经2位同行专家的严格评审, 所有审稿人的姓名对作者通常是保密的. 投稿时, 作者可以提出要求回避的同行专家名单, 也可以推荐2位非本单位的审稿人, 尤其是本刊编委会成员. 审稿过程大约需要1 mo.

4.3 录用 来稿经本刊编辑部初审、2位同行专家评审, 将评审后的稿件分为优先发表、可以发表、修改后发表、修改后再审、退稿等项处理. 录用稿件作者需交纳发表费, 发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬).

4.4 修改时间 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删节时, 本刊编辑部将把原稿寄回给作者自行修改. 当原稿退还作者修改时, 作者必须于1 mo内将修改后的稿件及软盘寄回编辑部; 逾期寄回的, 作重新投稿处理.

4.5 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》、《中文生物医学期刊/会议文献数据库》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.

4.6 投稿清单 (1)投稿函; (2)第1部分为题名及作者, 作者及单位, 第1作者简介, 基金资助项目, 通讯作者Email, 电话, 传真, 收稿日期, 接受日期; (3)第2部分英文摘要; (4)第3部分中文摘要; (5)第4部分为0引言, 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法, 统计学处理, 2 结果, 3 讨论, 致谢, 4 参考文献.

4.7 投稿地址 在线投稿: http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx. 邮局寄送(已在线提交的稿件不必再寄): 请将打印的稿件一式2份(附高质量的图)、存有全文(文字、图表)的磁盘和其他信息(全部文件的清单, 各文件的名称、格式和使用平台等)寄往: 100023, 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社.

世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市2345信箱
郎辛庄北路58号院怡寿园1066号
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com
http://www.wjgnet.com

World Journal of Gastroenterology创刊于1995-10-01, 原刊名《China National of New Gastroenterology》, 1995-06-27国科发信字(95)225号批准国内外公开发行. 1998-02-12经国家科学技术部和国家新闻出版总署批准更名为WJG, 国科发信字(1998)027号. 2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001158号.

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

白文元 教授
河北医科大学第二医院消化内科

陈红松 副研究员
北京市人民医院肝病研究所

陈积圣 教授
中山大学孙逸仙纪念医院肝胆外科

陈立波 副教授
华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科中心

陈贻胜 教授
福建省立医院消化内科

陈祖林 副教授
第三军医大学新桥医院普通外科

李国威 教授
西安交通大学医学院第二附属医院普通外科

李延青 教授
山东大学齐鲁医院消化科

梁力建 教授
中山大学附属第一医院肝胆外科

刘宝瑞 教授
南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心

刘莉 讲师
第四军医大学药理教研室

刘作金 副教授
重庆医科大学附属第二医院肝胆外科

吕宾 教授
浙江中医学院附属医院消化科

吕明德 教授
中山大学附属第一医院

宁琴 教授
武汉同济医院感染科

潘兴华 副主任医师
成都军区昆明总医院病理实验科

潘秀珍 教授
福建省立医院消化研究室

沈洪 教授
南京中医药大学附属医院江苏省中医院消化科

孙学英 教授
哈尔滨医科大学第一附属医院黑龙江省肝脾外科中心

谭学瑞 教授
汕大医学院第一附属医院院长室

汪波 副主任医师
北京大学第一医院急诊科

吴建国 教授
武汉大学生命科学学院病毒学国家重点实验室

吴君 主任医师
贵州省贵阳市贵阳医学院附属医院感染科

夏建川 研究员
中山大学肿瘤防治中心生物治疗研究室

杨林 副研究员
中山大学附属第三医院感染病科

杨希山 教授
广东省中医药局消化内科

阴赖宏 研究员
首都医科大学附属北京友谊医院感染暨急救医学科

郁宝铭 教授
上海市第八人民医院结直肠中心

张群华 教授
上海复旦大学附属华山医院外科

赵平 副教授
第二军医大学微生物学教研室

周学文 教授
辽宁中医学院附属医院消化内科

朱人敏 教授
南京军区南京总医院消化内科