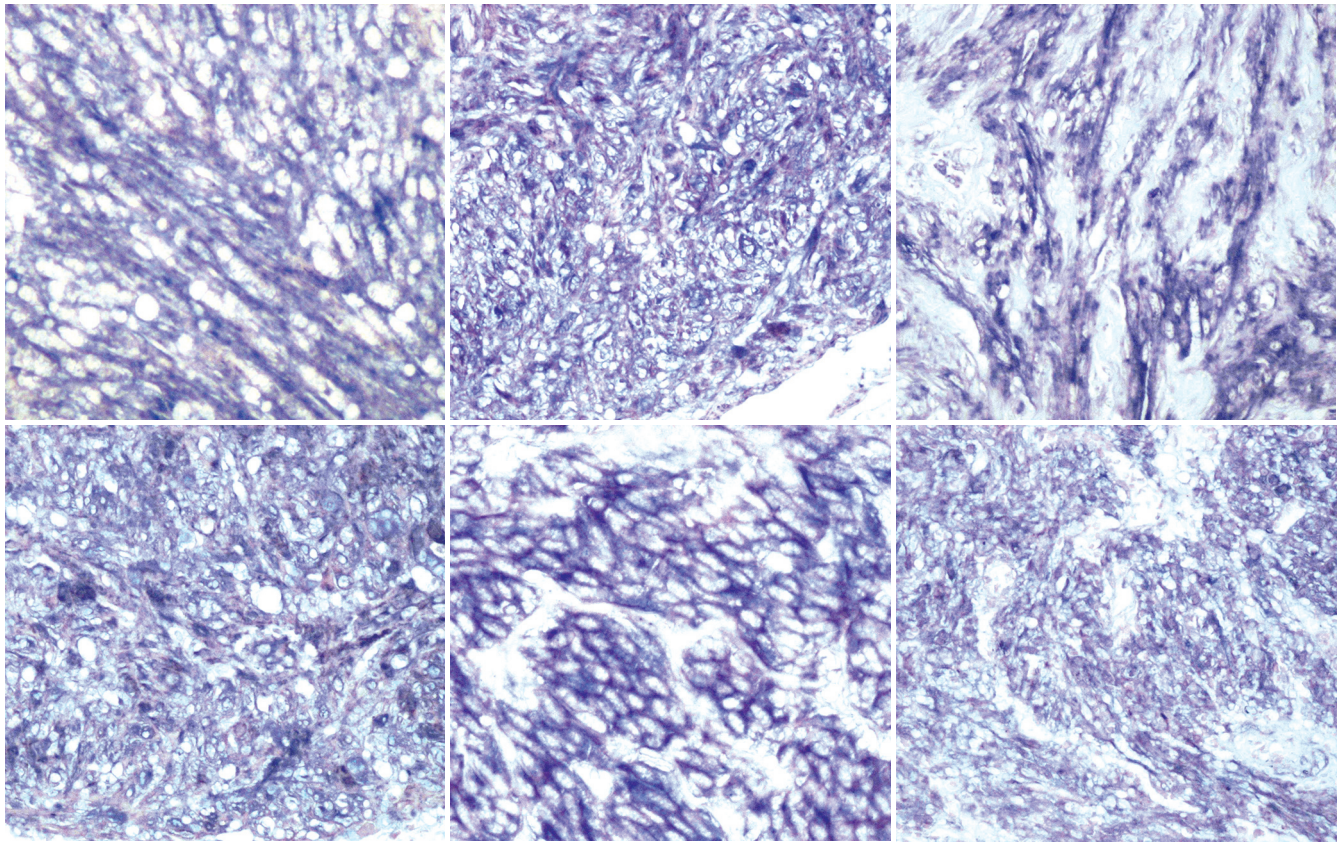
ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2006 年 10 月 18 日　第 14 卷　第 29 期　(Volume 14 Number 29)



29 | 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
二零零六年十月十八日
第十四卷
第二十九期
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
曹志成院士 香港
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
刘作金副教授 重庆
龙致贤教授 北京

世界华人消化杂志®
编辑委员会

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
阴赪宏研究员 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
展玉涛副主任医师 北京
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
郑鹏远教授 郑州
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 10 月 18 日　第 14 卷　第 29 期　(总第181期)

述　评

2825 肠源性内毒素血症在胰腺炎发病中的作用
韩德五

基础研究

2830 大鼠实验性肝癌发生中卵圆细胞的变化
朱言亮, 陈孝平, 张万广, 裘法祖

2834 肝癌细胞系放射诱导的细胞凋亡和细胞周期的变化
董广璐, 邢丽娜, 刘晓滨, 刘伟, 金茜, 张淑云

2838 survivin反义寡核苷酸对胰腺癌荷瘤裸鼠的治疗作用
刘江伟, 张永久, 皇甫清风, 李开宗, 张东, 雷涛

2844 双歧杆菌对内毒素损伤幼年大鼠抗氧化作用的影响
王玮, 李金梅, 马文旭, 孙梅

临床研究

2849 *H pylori*相关性胃溃疡、胃癌组织中VEGF和NF-κB的表达及意义
袁禧先, 王凤荣, 薛鸿鹏, 姜威

2854 YMDD耐药变异与HLA等位基因多态性的相关性
张淑云, 李兴库, 董广璐, 仰曙芬, 谷鸿喜, 李迪, 金茜, 刘伟, 杜博, 卢滨

2860 中药降肝隆联合抗病毒药长期治疗活动性肝炎肝硬变对其预后的影响
文睿, 王坚, 陈敏, 严明

文献综述

2865 食管上段胃黏膜异位症
唐宇, 马洪升

2868 糖尿病胃肠道并发症
张天成

研究快报

2872 不同给药途径对大鼠溃疡性结肠炎结肠黏膜EGF表达的影响
王雪茜, 王新月, 杨莉莉

2876 非酒精性脂肪肝大鼠瘦素水平及丹参注射液的预防作用
黄妙珍, 孙丽伟, 付珍春, 朱善济, 王祖武, 任晓华, 陈兆军

临床经验

2880 蛋白质二硫键异构酶在幽门螺杆菌感染者胃黏膜中的表达及意义
王孟春, 郭静波, 刘明华, 方文刚, 李岩

2883 幽门螺杆菌感染与胃癌发病关系的文献计量学分析
王孝宁, 崔雷

2889 终末期肝病模型评估我国肝硬化患者预后的能力
林菁华, 文卓夫

2893 十二指肠间质瘤临床分析30例
张勇, 陈凛

2897 结直肠癌手术前后血清P53抗体, CEA及CA19-9的检测意义
张宏, 丛进春, 陈春生, 乔雷, 冯勇, 刘恩卿

附　　录	2901 世界华人消化杂志投稿须知
致　　谢	2906 致谢世界华人消化杂志编委
消　　息	2829 国际会议 2843 2006中国结直肠肛门外科学术会议通知 2848 第六届西太平洋幽门螺旋杆菌会议通知 2853 第十九届全国中西医结合消化会议征文通知 2867 2007中华肝胆胰脾外科(国际)学术论坛征文通知 2871 中国中西医结合学会第九次全国中西医结合影像学术交流大会 2879 中国学术期刊综合引证报告(2006) 2900 世界华人消化杂志关于作者署名的声明
封面故事	Toshiyuki Nakayama, Yang Cheul Cho, Yuka Mine, Ayumi Yoshizaki, Shinji Naito, Chun Yang Wen, Ichiro Sekine. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors VEGFR-1 and 2 in gastrointestinal stromal tumors, leiomyomas and schwannomas. *World J Gastroenterol* 2006; 12(38): 6182-6187 http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/6182.asp
国际会议	71st ACG Annual Scientific Meeting and Postgraduate Course October 20-25, 2006 14th United European Gastroenterology Week 21-25 October 2006 Berlin United European Gastroenterology Federation www.uegw2006.de 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

世界華人消化雜志

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 2006-10-18
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 张焕兰 王晓瑜
电子编辑 张敏 李琪
本期审读 张焕兰

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

October 2006 Contents in Brief Volume 14 Number 29

EDITORIAL

2825 Roles of intestinal endotoxemia in pathogenesis of pancreatitis
Han DW

BASIC RESEARCH

2830 Role of oval cells in carcinogenesis of experimental hepatocellular carcinoma in rats
Zhu YL, Chen XP, Zhang WG, Qiu FZ

2834 Properties of radiation-induced apoptosis and cell cycle changes in liver cancer cell lines
Dong GL, Xing LN, Liu XB, Liu W, Jin Qian, Zhang SY

2838 Therapeutic effects of survivin antisense oligonucleotide on nude mice bearing human pancreatic carcinoma xenograft
Liu JW, Zhang YJ, Huangfu QF, Li KZ, Zhang D, Lei T

2844 Effect of bifidobacteria on the antioxidation in infant rats with endotoxin-induced injury
Wang W, Li JM, Ma WX, Sun M

CLINICAL RESEARCH

2849 Expression of vascular endothelial growth factor and nuclear factor kappa B and their significances in *Helicobacter pylori*-associated gastric ulcer and gastric cancer
Yuan XX, Wang FR, Xue HP, Jiang W

2854 Correlation of hepatitis B virus YMDD mutations with the polymorphism of HLA alleles in patients with chronic hepatitis B virus infection
Zhang SY, Li XK, Dong GL, Yang SF, Gu HX, Li D, Jin Q, Liu W, Du B, Lu B

2860 Chinese medicine Jiangganlong combined with anti-virus medicine in long-term treatment of active liver cirrhosis and its effect on prognosis of patients
Wen R, Wang J, Chen M, Yan M

REVIEW

2865 Advance in heterotopic gastric mucosa in upper esophagus
Tang Y, Ma HS

2868 Progress in gastrointestinal complications of diabetes
Zhang TC

RAPID COMMUNICATION

2872 Effects of different administration approaches on expression of epidermal growth factor after in rats with ulcerative colitis
Wang XQ, Wang XY, Yang LL

2876 Level of leptin in nonalcohic fatty liver of rats and preventive effects of Salvia miltiorrhiza injection
Huang MZ, Sun LW, Fu ZC, Zhu SJ, Wang ZW, Ren XH, Chen ZJ

CLINICAL PRACTICE

2880 Expression of protein disulfide isomerase in gastric mucosa infected with *Helicobacter pylori*
Wang MC, Guo JB, Liu MH, Fang WG, Li Y

2883 Bibliometric analysis of literatures on relationship between *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinogenesis
Wang XN, Cui L

2889 Capability of end-stage liver disease model in predicting the prognosis of Chinese patients with liver cirrhosis
Lin JH, Wen ZF

2893 Clinical analysis of 30 patients with duodenal gastrointestinal stromal tumors
Zhang Y, Chen L

2897 Pre- and post-operative sequential changes of serum P53 antibody, carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 in patients with colorectal cancer
Zhang H, Cong JC, Chen CS, Qiao L, Feng Y, Liu EQ

APPENDIX

2901 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology

ACKNOWLEDGMENT

2906 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology

COVER

Nakayama T, Cho YC, Mine Y, Yoshizaki A, Naito S, Wen CY, Sekine I.
Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors VEGFR-1 and 2 in gastrointestinal stromal tumors, leiomyomas and schwannomas.
World J Gastroenterol 2006; 12(38): 6182-6187
http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/6182.asp

INTERNATIONAL MEETINGS

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

14th United European Gastroenterology Week
21-25 October 2006
Berlin
United European Gastroenterology Federation
www.uegw2006.de

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 October 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10月18日; 14(29): 2825-2829
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

述评 EDITORIAL

肠源性内毒素血症在胰腺炎发病中的作用

韩德五

韩德五, 山西医科大学肝病研究所 山西省太原市 030001
韩德五, 教授, 博士生导师, 主要从事于肠源性内毒素血症的基础与临床研究.
通讯作者: 韩德五, 030001, 山西省太原市新建南路56号, 山西医科大学肝病研究所. smuhan@public.ty.sx.cn
电话: 0351-4135073
收稿日期: 2006-04-06 接受日期: 2006-04-29

摘要

急性胰腺炎时由于禁食等因素使肠黏膜通透性升高, 形成肠源性内毒素血症(intestinal endotoxemia, IETM). 肠源性内毒素激活枯否细胞、中性粒细胞、肥大细胞与淋巴细胞释放多种细胞因子(如TNF-α)、炎性因子、氧自由基等, 引起炎症级联反应以及微循环障碍, 造成胰腺腺泡的凋亡与坏死. 总之, IETM对胰腺实施了“第二次打击”, 故而发展成为重型急性胰腺炎.

关键词: 胰腺炎; 内毒素/肠源性; 肠黏膜通透性

韩德五. 肠源性内毒素血症在胰腺炎发病中的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(29):2825-2829
http: //www. wjgnet. com/1009-3079/14/2825. asp

0 引言

近年来, 对于急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP), 特别是重型急性胰腺炎(serious acute pancreatitis, SAP)的研究, 已取得重要进展, 先后有“微循环障碍”[1]、“中性粒细胞过度激活”[2]、“肠道细菌移位”[3]、“自由基损伤”及“腺泡Ca^{2+}超载”[4]等观点, 都从不同侧面和角度对SAP的发病进行了阐述. SAP多伴有肠源性内毒素血症(intestinal endotoxemia, IETM), 现已成为共识. 然而, IETM在SAP发病中有何等作用? 与已发表的诸多观点有何内在联系? 轻型胰腺炎是如何转化为重型胰腺炎的, 尚无更多报道.

1 AP时IETM的发生机制

根据我们以往大量实验证实, IETM的形成主要与肠黏膜通透性增高和肝脏枯否细胞(Kupffer cell, KC)吞噬功能减弱有关.

1.1 肠黏膜通透性增高 我们的实验用胰胆管逆行注射50 g/L牛磺胆酸钠建立SAP大鼠模型, 观察SAP时肠黏膜通透性的变化及其机制. 实验分为3组: 假手术组(SO)、禁食组(FD): 皮下注射100 g/L葡萄糖与9 g/L的生理盐水混合液20 mL, 禁食72 h, 与SAP组. 结果发现, FD组大鼠肠壁变薄, 肠绒毛变短变细, 肠上皮细胞严重缺损, 肠组织有淤血与出血现象, SAP组则更为严重. 通过血浆与小肠组织二胺氧化酶(DAO)测定也证实上述所观察的结果. FD组与SAP组血浆内毒素水平均明显高于SO组, 而SAP组又明显高于FD组. 统计学处理发现肠黏膜损伤与IETM密切相关. 在探讨肠黏膜通透性变化机制时, 发现SAP组的通透指数明显高于FD组, 肠上皮细胞凋亡数也较FD为多, 并与IETM呈正相关. 此外, 甲苯胺蓝染色结果显示, 呈激活状态的肥大细胞数量与脱颗粒现象在SAP组明显多于FD组, 此结果说明内毒素也可通过激活补体使肥大细胞活化, 脱颗粒释放组胺, 引起肠黏膜和血管通透性的增高与炎性反应增强, 从而使肠黏膜通透指数增高. 此项研究提示, 禁食组大鼠由于肠黏膜通透性增强使肠内的内毒素通过门静脉经肝脏进入体循环而形成IETM, IETM又反作用于肠黏膜使其上皮细胞凋亡, 此种恶性循环促使SAP大鼠形成更为严重的IETM. 因此, 对当前临床治疗SAP患者时采用禁食, 即所谓胃肠道外营养的得失提出质疑[5].

1.2 肝脏KC活化 我们对SAP时KC是否被活化进行了研究. 实验分为3组: 假手术组、SAP组与$GdCl_3$预处理组. 结果发现, SAP组大鼠血浆内毒素水平、TNF-α、NO、MDA均较$GdCl_3$预处理组为高. SAP组大鼠KC吞噬指数和KC数量与假手术组无差异, 而$GdCl_3$预处理组较SAP组明显减弱与减少. 病理组织学观察表明, SAP组大鼠肝组织出现点状坏死与凋亡, 后者从流式细胞仪检测也得到了证实. 然而, 经$GdCl_3$预处理的SAP组大鼠未见明显肝损伤. 胰腺病理学检查证实SAP组大鼠胰腺发生了胰腺腺泡坏死并伴严

■背景资料
近年来对于急性胰腺炎(AP), 特别是重型急性胰腺炎(SAP)的研究, 已取得重要进展, 先后有“微循环障碍”、“中性粒细胞过度激活”、“肠道细菌移位”、“自由基损伤”及“腺泡Ca^{2+}超载”等观点, 都从不同侧面和角度对SAP的发病进行了阐述. SAP多伴有肠源性内毒素血症(IETM), 现已成为共识.

■应用要点
本文从肠源性内毒素血症(IETM)角度探讨重症急性胰腺炎(SAP)的发病机制过程中,发现IETM与现已发表的诸多学说,如胰腺微循环障碍学说、白细胞过度激活学说、细胞因子级联反应学说、肠道细菌移位-胰腺组织继发感染学说等均有着因果联系,并在其中发挥着中心作用,IETM对胰腺发挥"二次打击"的作用,为防治SAP提供新的思路.

重的炎症反应, 而经$GdCl_3$预处理的胰腺未见有所减轻, 这与血清中AMS水平未见降低相一致. 此实验结果再次提示SAP时KC已被活化, 促使其分泌功能增强, 但吞噬功能未见增强. 在KC活化时伴有肝脏实质细胞的损伤, 这与临床所作的报道相一致[6].

在观察$GdCl_3$预处理对微循环障碍的影响时发现SAP组大鼠血中ET-1, NO及ET-1/NO比值与TXA_2与6-keto-$PGF_1\alpha$及其比值均较假手术组明显增高, 提示SAP组大鼠血中ET-1与TXA_2水平占有优势, 提示微血管处于收缩状态. 而$GdCl_3$预处理组大鼠上述两个比值均明显低于SAP组, 提示$GdCl_3$预处理可使SAP动物微循环得到明显改善.

2 IETM在AP发病中的作用

我们研究结果提示为此作了系统研究, 其实验共分假手术组、SAP组与双利肝, 甘氨酸治疗组. 双利肝由活血化淤药物丹参与清热解毒药物大黄所组成. 此实验是用他们的有效单体进行的. 这些药物均有降低血浆内毒素水平及抑制内毒素的生物学效应发挥的药效[7].

2.1 *细胞因子* 实验结果表明, 随着模型时间的延长, 血浆内毒素水平逐渐升高, 于3 h已形成IETM, 之后呈直线上升, 36 h后则呈缓慢上升趋势. 各时间点测定的内毒素水平与同时测定的TNF-α, IL-1β, NO及OFR水平相比较, 二者呈正相关, 并证实了主要是由于IETM激活KC所致. 实验结果表明, SAP组大鼠胰腺组织TNF-α mRNA的表达较假手术组明显上调, 而双利肝与甘氨酸治疗后则明显下调. 应用Western blot方法检测结果显示IETM可使胰腺组织iNOS和ICAM-1表达上调, 并与血浆内毒素呈正相关, 经双利肝与甘氨酸治疗后iNOS和ICAM-1表达均下调.

2.2 *微循环障碍与血液流变学* 通过对SAP大鼠血清中ET-1, NO及ET-1/NO比值与TXA_2与6-keto-$PGF_1\alpha$以及TXA_2/6-keto-$PGF_1\alpha$比值的测定, 发现二者的比值均升高, 并与血浆内毒素呈正相关, 提示收缩微循环的因子占有主导地位. 在造模36 h后胰腺微血管内可看到大量蓝色丝状团块样的微血栓. 透射电镜下可见毛细血管基底膜与内皮细胞的肿胀与断裂. 全血黏度与最大血小板凝聚力增大, 并与血浆内毒素水平密切相关.

2.3 *免疫功能* 实验根据Th细胞产生的细胞因子如Th1细胞检测IL-12, IFN-γ, Th2细胞检测IL-4与IL-10, 并观察Th1/Th2 比值. 结果发现, SAP组Th1/Th2比值升高, 提示细胞免疫功能增强与促炎细胞因子占优势, 使胰腺腺泡细胞坏死与炎症反应加重. 而经双利肝与甘氨酸治疗后由于IL-10升高特别显著导致Th1/Th2比值趋于平衡, 炎症反应明显减轻.

2.4 *病理细胞学* SAP组大鼠胰腺出现片状坏死, 腺泡结构破坏, 伴有出血与炎症细胞浸润. 毛细血管内可见微血栓. 免疫组织化学观察还发现胰腺组织有大量的腺泡细胞凋亡[5], 透射电镜下可见腺泡细胞内线粒体肿胀, 嵴模糊不清或者断裂, 呈空泡样变. 内质网扩张与溶解. 细胞核变性, 染色体边集, 核周隙增宽等. 用双利肝与甘氨酸治疗后胰腺组织的损害明显减轻.

3 二次打击论

综合上面的实验结果发现: ⑴在SAP早期(3 h)即伴有IETM, 并持续存在于发病的全过程; ⑵IETM与SAP发病的诸多观点与学说存在着紧密的内在联系, 激活单核巨噬细胞、中性粒细胞等所释放的细胞因子(TNF-α, IL-1β等)、炎性递质与氧自由基等除加重腺泡细胞的坏死与炎症反应外, 还加重微循环障碍与Th1/Th2比值的失衡来影响SAP的发病过程. 因此可以认为IETM在SAP发病中起着关键作用. 双利肝与甘氨酸的治疗作用也从另一侧面证实了此点.

现有资料表明, 炎症启动的特征是参与炎症反应的细胞被激活. 这些细胞包括单核巨噬细胞(KC占据其80%)、中性粒细胞、肥大细胞、血小板和内皮细胞等. 内毒素的主要毒性成分脂多糖(LPS)与KC、中性粒细胞等细胞表面的受体结合, 启动多条信号转导通路: ⑴激活转录因子NF-κB: NF-κB是一种能与多种基因启动子部位的κB位点发生特异性结合并能促进其转录的DNA结合蛋白的总称, 是调控多种炎性因子基因表达的枢纽[8]. 大量实验证实, NF-κB活化是AP时炎症递质过度表达和炎症反应的关键因素[9-10]. LPS等刺激因子可以引起IκB发生磷酸化进而降解使NF-κB二聚体与IκB解离, 并迅速从细胞质移位到细胞核, 启动相关基因转录. Ethridge *et al*[11]发现在AP动物模型中除了30 min NF-κB即有强烈的表达外, 在3-6 h NF-κB表达又出现第二个高峰. Han *et al*[12]实验证明, 所出现的两个高峰与LPS有关. LPS通过早

期激活NF-κB和继发性激活AP-1加重炎症反应, 进一步说明NF-κB在炎症递质调解网络中发挥主要作用[13]. Fujioka *et al*[14]在体外实验也得出了同样结果. 由此可见, LPS激活中性粒细胞、KC和内皮细胞[15]的NF-κB导致大量炎症递质产生, 如IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α, 细胞间黏附因子(ICAM-1), 血管黏附因子(VCAM-1), 氧自由基(OFR), iNOS, PAF, 粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF), COX_2及P, E选择素等而使AP进一步严重化, 并伴发全身炎症反应综合症(SIRS)和多器官功能衰竭(MOF), 进而成为AP患者致死的主要原因. 因此选用特异性的NF-κB抑制剂阻断NF-κB激活的信号转导通路, 可能为防止AP的发展提供了可能[16]. ⑵激活MAPK家族, 尤其是p38: p38MAPK信号转导通路可与NF-κB通路在下游聚合, 调控细胞因子的产生, 故在AP发展中起着极其重要的作用. Dabrowski *et al*[17]发现活性氧(ROS)可显著激活MAPK胰腺腺泡p38MAPK. Liu *et al*[18]在牛磺胆酸钠诱导AP模型中发现巨噬细胞MAPK活性增强, 同时伴有NF-κB的激活. Murr *et al*[19]用弹性蛋白酶刺激KC在7 min即可检测出磷酸化的p38MAPK, SAPK/JNK和ERK1/2, 以及活化的NF-κB和TNF-α的表达. 然而在60 min时NF-κB和TNF-α回落, 而p38MAPK仍处于活化状态. O'Neill *et al*[20]发现p38MAPK持续的激活可引起炎性因子的不断产生, 而导致级联“瀑布”效应, 并由此导致SIRS, MOF的发生. 抑制p38MAPK信号转导能发挥有效的抗炎作用, 减少细胞因子, 炎症递质的释放, 减轻胰腺腺泡细胞损伤, 明显提高动物的生存率[21-22]. 此外, TNF-α, IL-1β等促炎细胞因子可进一步激活白细胞和内皮细胞, 使其表达黏附分子, 并可使中性粒细胞出现吞噬活性, 释放蛋白水解酶和氧自由基, 从而导致炎性反应的扩大.

研究发现, IETM伴有高组胺血症. 其机制是内毒素通过旁路途径激活补体, 形成过敏毒素C3a, C5a为主的补体片段, 促使肥大细胞脱颗粒而释放组胺. 组胺可抑制IL-12的表达, 也可抑制LPS诱导单核细胞产生IFN-γ, 但可增加IL-4与IL-10的生成. 组胺与多种细胞因子之间的互相调节, 具有抑制Th1型细胞因子的分泌及向Th2型转换的特点[23]. LPS激活肥大细胞的主要途径是通过其膜上的Toll样受体. 肥大细胞在LPS作用下, 可快速释放出已储存在颗粒中的和新合成的TNF-α, 组胺, 白三烯B4, 白三烯C4, IL-1α, IL-1β, IL-8等, 使中性粒细胞与嗜酸性粒细胞聚集在炎症部位. 肥大细胞过量释放炎症介质和细胞因子有助于引发“瀑布式级联反应”, 造成组织细胞的炎症损伤. 肥大细胞释放的组胺和蛋白水解酶能使血管通透性增高, 血管内皮细胞黏附分子的表达明显升高, 从而加重局部的炎症反应. 总之, 肥大细胞同巨噬细胞、中性粒细胞一样具有多种免疫功能[24].

近年来的研究显示, SAP并不是简单的“胰酶自身消化”的结果, 而更多的与免疫异常有关. Th细胞是免疫应答的中心细胞, 他不但是机体免疫应答的启动细胞, 而且其活性对整个免疫应答具有重要的调节作用. Th1与Th2细胞主要是通过分泌的细胞因子发挥其生物学效应. 成熟的Th1细胞分泌IL-1, IL-2, IL-12, TNF-α, IFN-γ等细胞因子, 以促炎症介质为主, 故又称之为炎症性T细胞, 主要介导细胞免疫. 一般认为Th1应答能增强宿主抗微生物感染. 成熟的Th2细胞分泌IL-4, IL-5, IL-6, IL-10等细胞因子, 以抗炎症介质为主, 主要介导体液免疫应答, 与炎症的持续、进展和慢性化有关. Th1和Th2细胞通过各自分泌的细胞因子, 进行交叉调节, 相互抑制. 在SAP的早期, 机体以Th1优势应答为主要病理改变, 表现为多种促炎介质升高, 可导致全身炎症反应综合征(SIRS); 在SAP的中晚期, Th1细胞功能普遍降低, 而Th2细胞功能明显升高, Th1向Th2型细胞漂移. 由于Th1/Th2细胞因子形成动态的复杂的网络, Th1/Th2失衡会造成“瀑布样级联反应”, 导致免疫异常贯穿病程始终[25].

SAP时微循环障碍(MCD)已不仅局限于胰腺组织本身, 而且已经累及全身各个器官, 并可以诱发多器官功能不全(MOD)或衰竭(MOF)[26]. 至今对微循环障碍在AP发病过程中是启动还是促进因素这个问题仍在争议. AP时胰腺微血管运动失调, 血管收缩(失血)与血管扩张(再灌注再氧化)参与胰腺炎的发病. 因此, 缺血再灌注损伤在胰腺微循环障碍中的作用已倍受关注. 有人提出胰腺炎时血浆中NO/ET的失调是引起微血管运动失调的重要因素[27]. 在AP早期毛细血管的通透性就明显增加, 炎症递质如PAF, ICAM, ET, OFR等均参与了此过程. Eibl *et al*[28]在SAP动物上应用以上炎症递质的相应抗体或受体拮抗时发现微循环障碍明显改善, 也提示炎症递质在MCD中的重要地位. 我们通过降低IETM水平可使炎症递质释放减少, 毛细血管淤滞减轻, 微

■同行评价

本文对IETM在SAP发病中的作用进行了全面系统的综述, 文章层次分明, 文笔流畅, 内容新颖, 有可读性. 对SAP的实验研究和临床诊治均有一定的指导价值.

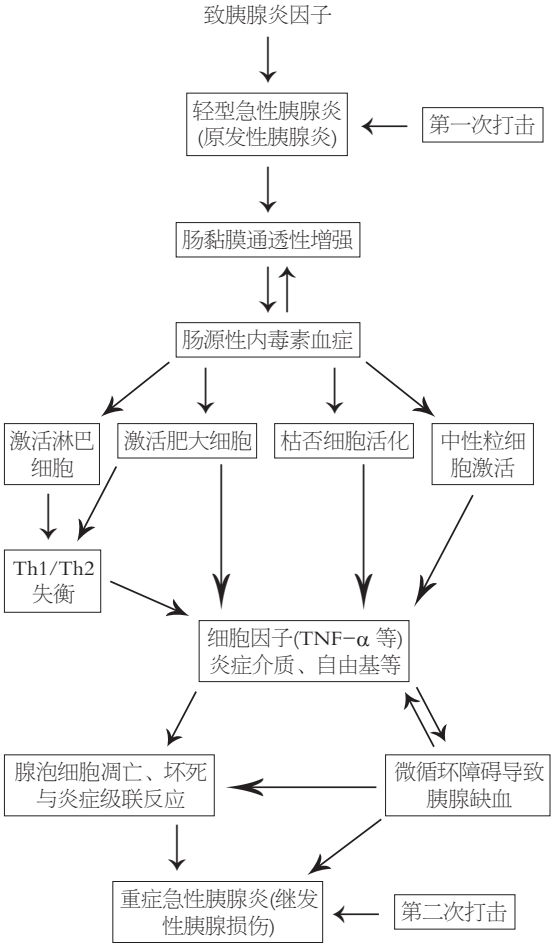


图 1 IETM对胰腺炎的二次打击示意图

血栓减少, 血液黏度减轻, 使MCD明显改善, 与此同时NO/ET比值亦近于正常.

目前有诸多学说, 如胰酶自身消化学说, 细菌移位和继发感染学说, 微循环障碍学说, 白细胞过度激活学说, 氧自由基学说, 细胞因子和炎症递质学说等都是从不同角度或侧面来阐明AP的发病机制, 故用单一学说难以解释AP发病机制的全部. IETM在AP发病机制中与上述各学说有着直接或间接的联系. 换言之, IETM在AP发病机制网络中处于中心地位.

总之, SAP所伴的IETM激活KC、中性粒细胞、肥大细胞与淋巴细胞释放大量细胞因子、炎症介质与自由基等引起炎症级联反应, 从而通过炎症反应扩大, Th1/Th2失衡与微循环障碍等又对原来的胰腺炎实施“第二次打击”使之转化为重症急性胰腺炎(图1). 这与我们多年研究的IETM对肝脏的作用相一致: 各种肝损伤因子通过不同机制引起原发性肝损伤, 后者所出现的IETM又使肝脏经受第二次打击而发生继发性肝损伤, 后者或使肝炎重型化, 或使其慢性化, 最终以肝衰竭而告终[29].

4 参考文献

1 Klar E, Messmer K, Warshaw AL, Herfarth C. Pancreatic ischaemia in experimental acute pancreatitis: mechanism, significance and therapy. *Br J Surg* 1990; 77: 1205-1210

2 Rinderknecht H. Fatal pancreatitis, a consequence of excessive leukocyte stimulation? *Int J Pancreatol* 1988; 3: 105-112

3 Wang X, Andersson R. Intestinal brush border membrane function. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29: 289-299

4 张红, 李永渝. 急性胰腺炎的发病机制研究进展. 中国危重病急救医学 2000; 12: 121-125

5 邓群, 黎沾良, 陆连荣, 梁延杰, 孙小庆. 急性坏死性胰腺炎时肠屏障损害及肠源性细菌和内毒素移位的实验研究. 中国普通外科杂志 2001; 10: 313-316

6 张喜平, 王蕾. 重症急性胰腺炎并发肝损害的机制研究进展. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1335-1339

7 韩德五. 肠源性内毒素血症与肝病: 肝衰竭的IETM学说. 北京: 中国科学技术出版社, 2004: 34-41

8 Storz P, Toker A. NF-kappaB signaling--an alternate pathway for oxidative stress responses. *Cell Cycle* 2003; 2: 9-10

9 Virlos I, Mazzon E, Serraino I, Di Paola R, Genovese T, Britti D, Thiemerman C, Siriwardena A, Cuzzocrea S. Pyrrolidine dithiocarbamate reduces the severity of cerulein-induced murine acute pancreatitis. *Shock* 2003; 20: 544-550

10 Hietaranta A, Mustonen H, Puolakkainen P, Haapiainen R, Kemppainen E. Proinflammatory effects of pancreatic elastase are mediated through TLR4 and NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 323: 192-196

11 Ethridge RT, Hashimoto K, Chung DH, Ehlers RA, Rajaraman S, Evers BM. Selective inhibition of NF-kappaB attenuates the severity of cerulein-induced acute pancreatitis. *J Am Coll Surg* 2002; 195: 497-505

12 Han SJ, Ko HM, Choi JH, Seo KH, Lee HS, Choi EK, Choi IW, Lee HK, Im SY. Molecular mechanisms for lipopolysaccharide-induced biphasic activation of nuclear factor-kappa B (NF-kappa B). *J Biol Chem* 2002; 277: 44715-44721

13 Krappmann D, Wegener E, Sunami Y, Esen M, Thiel A, Mordmuller B, Scheidereit C. The IkappaB kinase complex and NF-kappaB act as master regulators of lipopolysaccharide-induced gene expression and control subordinate activation of AP-1. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 6488-6500

14 Fujioka S, Niu J, Schmidt C, Sclabas GM, Peng B, Uwagawa T, Li Z, Evans DB, Abbruzzese JL, Chiao PJ. NF-kappaB and AP-1 connection: mechanism of NF-kappaB-dependent regulation of AP-1 activity. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 7806-7819

15 Mole DJ, Taylor MA, McFerran NV, Diamond T. The isolated perfused liver response to a 'second hit' of portal endotoxin during severe acute pancreatitis. *Pancreatology* 2005; 5: 475-485

16 Pezzilli R, Ceciliato R, Barakat B, Corinaldesi R. Immune-manipulation of the inflammatory response in acute pancreatitis. What can be

expected? *JOP* 2004; 5: 115-121
17 Dabrowski A, Boguslowicz C, Dabrowska M, Tribillo I, Gabryelewicz A. Reactive oxygen species activate mitogen-activated protein kinases in pancreatic acinar cells. *Pancreas* 2000; 21: 376-384
18 Liu HS, Pan CE, Liu QG, Yang W, Liu XM. Effect of NF-kappaB and p38 MAPK in activated monocytes/macrophages on pro-inflammatory cytokines of rats with acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2513-2518
19 Murr MM, Yang J, Fier A, Gallagher SF, Carter G, Gower WR Jr, Norman JG. Regulation of Kupffer cell TNF gene expression during experimental acute pancreatitis: the role of p38-MAPK, ERK1/2, SAPK/JNK, and NF-kappaB. *J Gastrointest Surg* 2003; 7: 20-25
20 O'Neill S, O'Neill AJ, Conroy E, Brady HR, Fitzpatrick JM, Watson RW. Altered caspase expression results in delayed neutrophil apoptosis in acute pancreatitis. *J Leukoc Biol* 2000; 68: 15-20
21 Yan SR, Al-Hertani W, Byers D, Bortolussi R. Lipopolysaccharide-binding protein- and CD14-dependent activation of mitogen-activated protein kinase p38 by lipopolysaccharide in human neutrophils is associated with priming of respiratory burst. *Infect Immun* 2002; 70: 4068-4074
22 English JM, Cobb MH. Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23: 40-45
23 李红, 韩德五, 张素美, 赵龙凤. 乙型肝炎患者肠源性内毒素血症、高组胺血症与细胞免疫功能之间的关系. 中国病理生理杂志 2006; 22: 559-562
24 周艳春, 何韶衡. 肥大细胞在细菌和病毒感染中的作用. 中国病理生理杂志 2006; 22: 607-611
25 马小鹏, 易继林. Th1/Th2平衡在急性胰腺炎中的作用. 肝胆胰外科杂志 2005; 17: 337-339, 342
26 Foitzik T, Eibl G, Hotz B, Hotz H, Kahrau S, Kasten C, Schneider P, Buhr HJ. Persistent multiple organ microcirculatory disorders in severe acute pancreatitis: experimental findings and clinical implications. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 130-138
27 Vollmar B, Menger MD. Microcirculatory dysfunction in acute pancreatitis. A new concept of pathogenesis involving vasomotion-associated arteriolar constriction and dilation. *Pancreatology* 2003; 3: 181-190
28 Eibl G, Buhr HJ, Foitzik T. Therapy of microcirculatory disorders in severe acute pancreatitis: what mediators should we block? *Intensive Care Med* 2002; 28: 139-146
29 Han DW. Intestinal endotoxemia as a pathogenetic mechanism in liver failure. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 961-965

电编 张焕兰 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 •

国际会议

American College of Gastroenterology
Annual Scientific
20-25 October 2006
Las Vegas, NV

71st ACG Annual Scientific and
Postgraduate Course
20-25 October 2006
Venetian Hotel, Las Vegas, Neveda
The American College of
Gastroenterology

AASLD 57th Annual - The Liver Meeting™
27-31 October 2006
Boston, MA
AASLD

9th World Congress on Gastrointestinal Cancer
20-23 June 2007
Barcelona
Imedex
meetings@imedex.com

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年10月18日; 14(29): 2830-2833
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

大鼠实验性肝癌发生中卵圆细胞的变化

朱言亮, 陈孝平, 张万广, 裘法祖

■背景资料
肝癌是最常见恶性肿瘤之一, 到目前为止, 肝癌发生的细胞学机制仍不十分清楚. 近几年成人干细胞的研究提示, 肝癌的发生与干细胞密切相关, 并由此提出了肿瘤干细胞的概念. 较多研究资料显示, 肝干细胞是肝细胞癌和胆管细胞癌的祖细胞. 由于肝干细胞更新迅速, 生命期长, 极易成为致癌因子的靶细胞. 若肝癌起源于干细胞这一学说得到证实, 将改变人们对肝癌发生机制的认识, 极大地促进肝癌相关研究进展, 有可能在起源细胞水平找到彻底治愈肝癌的措施.

朱言亮, 陈孝平, 张万广, 裘法祖, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝脏外科 湖北省武汉市 430030
朱言亮, 1996年蚌埠医学院本科毕业, 2006年华中科技大学同济医学院博士, 主要从事肝癌的基础研究.
国家自然科学基金资助课题, No. 30430670
通讯作者: 朱言亮, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝脏外科. yl_zhu@126.com
收稿日期: 2006-04-09 接受日期: 2006-04-30

Role of oval cells in carcinogenesis of experimental hepatocellular carcinoma in rats

Yan-Liang Zhu, Xiao-Ping Chen, Wan-Guang Zhang, Fa-Zu Qiu

Yan-Liang Zhu, Xiao-Ping Chen, Wan-Guang Zhang, Fa-Zu Qiu, Center of Hepatic Surgery, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30430670
Correspondence to: Yan-Liang Zhu, Center of Hepatic Surgery, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. yl_zhu@126.com
Received: 2006-04-09 Accepted: 2006-04-30

Abstract

AIM: To discuss the role of oval cells in the carcinogenesis and progression of hepatocellular carcinoma.

METHODS: A total of 60 male Sprague Dawley rats were divided into experiment group (n = 48) and control group (n = 12). 3′-methyl-4-dimethylaminoazobenzene (3′-Me-DAB) was used to induce hepatocellular carcinoma, and the presence of oval cells, the expression of p53 gene and P53 protein were dynamically (4, 8, 12, 16, 20, 24 wk) detected by immunohistochemistry, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively.

RESULTS: Large numbers of oval cells appeared in the periportal regions 4 wk after the induction of carcinoma, and these cells were OV-6-positive. Cancer nodules were observed at the 16th wk, and the oval cells were located in and around the cancer nodule. A part of these proliferated cells were P53-positive, and the two kinds of cells were almost located in the same region. Twenty weeks after cancer induction, the levels of p53 mRNA (F = 4.78, P < 0.05) and P53 protein in the cancer tissues of rat liver were significantly elevated (F = 2.46, P < 0.05).

CONCLUSION: Oval cells are involved in the process of rat hepatocarcinogesis induced by 3′-Me-DAB, and its mechanism may be related to the mutation of p53 gene.

Key Words: Hepatic stem cell; Oval cells; Hepatocarcinoma; P53; Experimental rat

Zhu YL, Chen XP, Zhang WG, Qiu FZ. Role of oval cells in carcinogenesis of experimental hepatocellular carcinoma in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(29):2830-2833

摘要

目的: 探讨卵圆细胞在大鼠肝癌发生、发展过程中的作用.

方法: 60只SD大鼠随机分为对照组(n = 12)和实验组(n = 48). 用化学致癌剂3'-甲基-4-二甲基氨偶氮苯(3'-Me-DAB)诱发大鼠肝癌, 通过免疫组织化学、RT-PCR, Western blot技术对大鼠诱癌过程(4, 8, 12, 16, 20, 24 wk)中肝组织内卵圆细胞及p53基因表达的变化进行动态的检测.

结果: 诱癌4 wk, 大鼠肝门管区及坏死区内均见大量卵圆细胞, 这些细胞呈OV-6染色阳性. 诱癌16 wk, 肝组织内可见癌结节形成, 癌结节内外均可见有卵圆细胞聚集, 部分增生的卵圆细胞P53阳性反应, 二者的分布区域基本一致. 诱癌20 wk后大鼠肝癌组织内的p53 mRNA(F = 4.78, P<0.05), P53蛋白水平均显著升高(F = 2.46, P<0.05).

结论: 卵圆细胞贯穿了大鼠受化学诱癌剂作用后发生肝癌的全过程, 与肝癌的发生有着密切的联系; 其机制可能与p53基因的突变有关.

关键词: 肝干细胞; 卵圆细胞; 肝癌; P53; 实验大鼠

朱言亮, 陈孝平, 张万广, 裘法祖. 大鼠实验性肝癌发生中卵圆细胞的变化. 世界华人消化杂志 2006;14(29):2830-2833
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2830.asp

0 引言

成体干细胞(adult stem cells, ASC)的研究是生命科学中一个应用前景极为广阔的领域. 目前有研究认为, 肿瘤的发生可能与ASC的异常分化有关, 并由此提出了肿瘤干细胞的概念[1]. 卵圆细胞(oval cell)作为肝脏内的干细胞其在肝癌发生中的作用一直是肝癌发生学研究中的重要课题. 我们通过化学诱癌剂3'-甲基-4-二甲基氨偶氮苯(3'-Me-DAB)诱发大鼠肝癌的发生, 动态观察卵圆细胞及*p*53基因的表达在肝组织中的变化, 探讨卵圆细胞与实验性肝癌的发生关系, 以期对肝癌的癌变机制及其发生学提供进一步的实验依据.

1 材料和方法

1.1 *材料* 体质量140±20 g的♂SD大鼠60只, 购自同济医学院动物实验中心, 3'-Me-DAB购自东京化成工业株式会社, 小鼠抗大鼠OV-6抗体购自R&D公司, 小鼠抗大鼠P53抗体购自Zymed公司, 山羊抗小鼠IgG二抗及化学发光ECL系统购自上海申能博彩公司, 免疫组化SABC试剂盒购自武汉博士德, 总RNA提取试剂TRIzol, 逆转录试剂盒及Taq DNA聚合酶购自深圳晶美生物技术有限公司. *p*53和内参照β-actin引物自行设计并由上海生工生物公司合成.

1.2 *方法* 将60只大鼠随机分为正常组(12只)和实验组(48只). 正常组和实验组再随机分成6个亚组, 每个亚组分别为2只和8只. 正常组大鼠常规喂饲和饮水; 实验组大鼠喂饲0.6 g/L的DAB饲料, 常规饮水. 二组大鼠于肝癌造模后4, 8, 12, 16, 20及24 wk分别处死一个亚组的大鼠, 取出肝脏后立即置-70℃冰箱冷冻保存待用. 另留一部分以40 g/L中性甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋, 5 μm连续切片, 行光镜及免疫组织化学染色鉴定.

1.2.1 *SABC法* 取大鼠肝脏组织石蜡切片标本, 常规脱蜡和水化后, 30 g/L过氧化氢灭活内源性过氧化物酶, 抗原热修复后以50 g/L BSA封闭, 室温20 min, 以消除背景染色, 然后加入第一抗体工作液(小鼠抗大鼠OV-6抗体1∶100; 小鼠抗大鼠P53抗体1∶100)4℃过夜, PBS洗2 min×3次, 加入生物素标记的第二抗体(山羊抗小鼠IgG)室温处理20 min, 加SABC复合物37℃孵育20 min, DAB室温显色, 镜下控制反应时间, 苏木素轻度复染、脱水、透明、封片, 显微镜下观察. 以PBS缓冲液代替一抗作阴性对照.

1.2.2 *RT-PCR检测p53 mRNA* 总RNA提取和逆转录反应按试剂盒说明书进行操作. 内参照β-actin 引物: 上游: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3', 下游: 5'-ACCACAGTCCATGCCATGCCATCAC-3'(扩增片段126 bp), *p*53引物: 上游: 5'-ATGACTGCCATGGAGGAGTCACAG-3', 下游: 5'-CTAGCAGTTTGGGCTTTCCTCCTTG-3'(扩增片段488 bp); PCR反应条件: 94℃ 2 min, 94℃ 1 min, 56℃ 50 s, 72℃ 1 min, 30个循环, 72℃延伸10 min, 扩增体系50 μL. 用15 g/L琼脂糖凝胶电泳PCR产物, SybrGreen Ⅰ染色, 凝胶成像系统和图像分析系统观察并半定量计算PCR产物的相对表达量, 结果以目的基因与β-actin mRNA的灰度值比值表示.

1.2.3 *三去污剂法提取组织总蛋白* 配置三去污裂解液, 临用前加入100 mg/L苯甲基磺酰氟(PMSF)和1 g/L抑肽酶, 预冷后取200 μL与0.1 g组织一起加入匀浆器研磨, 冰上作用30 min, 收集裂解液, 12 000 r/min离心10 min, 取上清, 置于-70℃备用.

1.2.4 *Western blot检测P53蛋白表达* 取50 μg提取的总蛋白, SDS-PAGE凝胶电泳, 电转移至硝酸纤维素膜, 丽春红染色证实转移成功, 一抗封闭过夜, 二抗孵育1 h, 加发光底物ECL及增强剂, 暗室内曝光, 洗片. 一抗: 小鼠抗大鼠P53抗体1∶2000稀释, 二抗: 羊抗小鼠IgG抗体1∶500稀释.

统计学处理 采用SPSS 10.0软件包, 所有数据以mean±SD表示, 数据比较采用单因素方差分析.

2 结果

2.1 *HCC发生情况* 第1例HCC发生于16 wk, 未至时间点死亡的大鼠不计数, 至实验结束24 wk时止, 实验组HCC发生率为66.7%(14/21); 正常组大鼠无HCC发生.

2.2 *大鼠肝脏组织学变化特点* 诱癌4 wk, 大鼠肝门管区及坏死区内均见大量卵圆细胞, 这些细胞呈OV-6染色阳性(图1A). 诱癌16 wk始, 肝组织表面散在肉眼可见的粟粒样大小的结节, 肝脏质地变硬, 镜下可见癌结节形成(图1B), 癌结节内外均可见有卵圆细胞聚集(图1C), 部分增生

■**研发前沿**
目前原发性肝癌的细胞起源学说认为他由肝卵圆细胞成熟受阻、异常分化而来, 其间有多个癌基因和/或抑癌基因共同调控使肝卵圆细胞向肝癌细胞转化, 具体机制还不详. 目前已证实了白血病干细胞的存在, 但在实体瘤中尚无确凿的证据. 关于肝干细胞增殖分化异常与肝癌发生密切相关的观点更多是基于理论与现象的推测, 尚迫切需要通过进一步的实验分离鉴定肝干细胞, 探索其向肿瘤演进的机制.

■相关报道
Huang *et al*研究Hoxa-13基因在乙型肝炎病毒/丙型肝炎病毒相关的肝癌病例中的表达情况时发现，Hoxa-13基因在来源于肝干细胞的肝癌细胞系中表达，而不在来源于肝细胞及胆管细胞的肝癌细胞系中表达，因而推测其对于肝干细胞向肝癌细胞的转化具有重要意义. Ruch *et al*认为卵圆细胞的分化与其表达的Connexin的种类和与之发生细胞间缝隙连接信息交流(GJIC)的细胞种类有关. GJIC受阻可能决定卵圆细胞是否进展为恶性肿瘤.

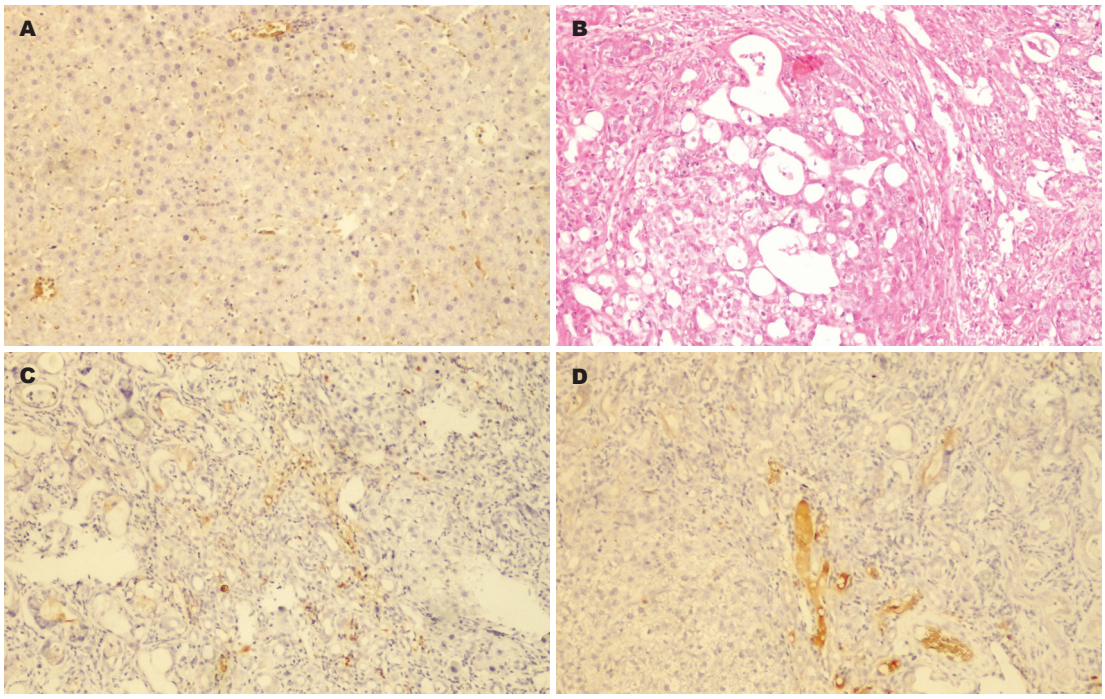


图 1 诱癌大鼠肝组织变化(×40). A: 4 wk门管区大量卵圆细胞OV−6阳性; B: 16 wk癌结节形成; C: 癌结节内外均有卵圆细胞聚集(OV−6); D: 部分增生的卵圆细胞P53阳性反应.

的卵圆细胞P53阳性反应，二者的分布区域基本一致(图1D). 正常组大鼠肝组织未见显著性变化.

2.3 大鼠肝癌组织*p*53 mRNA的表达 肝组织的内参照β-actin mRNA表达水平接近(图2A)，表明他可以作为衡量*p*53 mRNA表达水平相对高低的参照. 大鼠肝癌组织内的*p*53 mRNA水平(4, 8, 12, 16, 20, 24 wk分别为1.042±0.416, 1.063±0.188, 1.109±0.515, 1.096±0.262, 4.164±0.874和3.559±0.694)在诱癌20 wk以后显著升高(F = 4.78, P<0.05)；而正常组大鼠肝组织内的P53 mRNA水平无明显变化.

2.4 大鼠肝癌组织P53蛋白的表达 从实验早期(8 wk)至HCC发生前，已可在实验组大鼠的肝组织内检出突变的P53蛋白(图2B). 证明*p*53基因突变发生在肝细胞发生癌变之前；正常组无HCC发生，也未检出P53蛋白及*p*53突变，提示*p*53基因突变是启动细胞癌变过程中非常重要的因素. 同大鼠肝癌组织内*p*53 mRNA的表达水平相似(4, 8, 12, 16, 20, 24 wk分别为117±35, 268±74, 325±39, 302±68, 841±107和854±143)，在诱癌20 wk以后P53蛋白的表达呈显著性升高(F = 2.46, P<0.05).

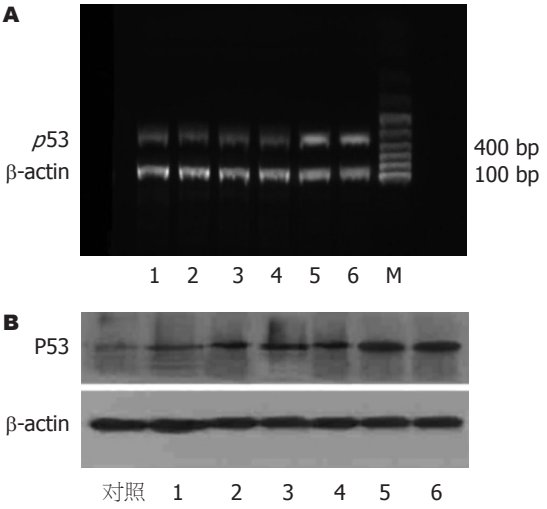


图 2 大鼠肝癌组织内*p*53的表达. A: *p*53 mRNA; B: P53蛋白.

3 讨论

卵圆细胞被认为是肝脏内的干细胞，在创伤修复、细胞移植、基因治疗和器官功能重建方面具有广阔的应用前景. 但另一方面，卵圆细胞的异常分化过程也会导致肝脏肿瘤的发生[2-3]. 对卵圆细胞与肝癌的关系进行研究以探讨卵圆细胞发生转化的分子机制从而阻断其恶变，甚至逆转其异常分化有助于我们进一步在细胞水平上认识肿瘤的发病机制，并最终找到治疗肿瘤安全有效的方法. 关于原发性肝癌的细胞学起源有二种学说[4]：其一认为来源于分化成熟的细胞，通过去分化过程演变而来；其二是由肝内未分化的干细胞或卵圆细胞异常分化所致. 目前

多数研究结果支持卵圆细胞参与肝癌发生的假说[5-7], 其依据包括: (1)在许多肝脏肿瘤的实验动物模型中可以观察到卵圆细胞增生的现象; (2)卵圆细胞在形态上与过渡细胞、小肝细胞、嗜碱性细胞、胆管上皮细胞有过渡, 提示上述细胞均由卵圆细胞分化而来; (3)将转化的卵圆细胞株接种到裸鼠或新生大鼠体内可诱导胆管上皮癌和肝细胞癌的发生. 我们的实验也支持卵圆细胞参与了肝癌发生, 主要证据有: (1)卵圆细胞贯穿了DAB诱发大鼠肝癌发生、发展的全过程. 从诱癌4 wk至20 wk肝癌结节的形成, 均可看到卵圆细胞的聚集, 可见卵圆细胞对肝癌的发生、发展起到重要作用; (2)卵圆细胞在诱癌过程中有*p*53基因表达产物的检出, 表现在部分增生的卵圆细胞呈P53阳性反应, 其与OV-6阳性细胞的分布区域基本一致, 这表明卵圆细胞的异常增生可能为致癌物作用后癌基因的异常激活所引起的. 大量研究显示, 细胞癌变及恶性肿瘤的形成是多因素、多阶段、多基因变异所致的结果, 其癌变过程的每一个阶段都存在癌基因和抑癌基因一系列的变化. *p*53基因是迄今发现的与人类肿瘤相关性最高的一种抑癌基因, *p*53基因的缺失和突变可引起细胞恶性增殖, 导致肿瘤的发生[8-9]. 我们的实验显示, 诱癌末期, 肝癌组织中*p*53 mRNA, P53蛋白的表达水平均有显著升高($P<0.05$), 表明*p*53的突变参与了化学致癌剂DAB诱发的大鼠肝癌的发生, 其可能是通过卵圆细胞的异常增生、分化而引起了肝癌的发生. 我们的实验没有提供直接的证据证实*p*53突变导致卵圆细胞异常分化为癌细胞, 在下一步的实验中, 我们将对纯化的卵圆细胞施以致癌因素的影响, 观察卵圆细胞是否能诱变为肝癌细胞以及诱癌过程中*p*53的动态变化, 从而为原发性肝癌起源于肝脏干细胞的异常分化提供更为直接的证据.

总之, 我们认为卵圆细胞贯穿了大鼠受化学诱癌剂作用后发生肝癌的全过程, 与肝癌的发生有着密切的联系, 其机制可能与*p*53基因的突变有关, 但具体机制仍有待于进一步的研究.

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 Becker R, Luthgens B, Oesch F, Dienes HP, Steinberg P. Ha-rasVal12 but not p53Ser247 leads to a significant neoplastic transformation rate of the putative rat liver stem cells (oval cell). *Carcinogenesis* 1996; 17: 2635-2640

3 Hooth MJ, Coleman WB, Presnell SC, Borchert KM, Grisham JW, Smith GJ. Spontaneous neoplastic transformation of WB-F344 rat liver epithelial cells. *Am J Pathol* 1998; 153: 1913-1921

4 Sell S. Is there a liver stem cell? *Cancer Res* 1990; 50: 3811-3815

5 Lowes KN, Brennan BA, Yeoh GC, Olynyk JK. Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity. *Am J Pathol* 1999; 154: 537-541

6 Libbrecht L, De Vos R, Cassiman D, Desmet V, Aerts R, Roskams T. Hepatic progenitor cells in hepatocellular adenomas. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 1388-1396

7 廖钢陵, 陈晋彦, 丁濂, 张彦东. 大鼠肝癌前病灶与卵圆细胞的关系. 中华病理学杂志 1998; 27: 87-90

8 Levine AJ, Finlay CA, Hinds PW. P53 is a tumor suppressor gene. *Cell* 2004; 116: S67-69

9 Itoh T, O'Shea C, Linn S. Impaired regulation of tumor suppressor p53 caused by mutations in the xeroderma pigmentosum DDB2 gene: mutual regulatory interactions between p48(DDB2) and p53. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 7540-7553

■**名词解释**

1 干细胞: 指具有无限自我复制、自我更新的全能或多能分化能力的细胞群, 可分化为多种细胞系并形成组织和器官.

2 肿瘤干细胞: 肿瘤由不同类型的癌细胞组成, 只有极少数癌细胞亚群能无限增殖并具有致瘤源性, 这类肿瘤细胞与干细胞的自我更新机制相似, 将这部分肿瘤细胞称为肿瘤干细胞.

■**同行评价**

本文实验方法可靠, 结论可信, 具有一定的学术水平.

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10月18日; 14(29): 2834-2837
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

肝癌细胞系放射诱导的细胞凋亡和细胞周期的变化

董广璐, 邢丽娜, 刘晓滨, 刘 伟, 金 茜, 张淑云

■背景资料
射线照射不仅使受照组织细胞坏死, 更可诱导组织细胞凋亡, 是肿瘤放射治疗的主要机制. 射线诱导细胞凋亡的发生与射线剂量、细胞周期和组织源性等有关. 大剂量(20Gy)射线可使受照细胞在4-6 h内发生快速细胞凋亡, 主要发生在细胞周期S相的细胞, 伴有caspase-3的快速激活. 低剂量(5Gy)射线照射使受照细胞在24 h后发生延迟细胞凋亡, 主要发生在细胞周期G1相的细胞, 且在24 h内不伴有caspase-3的激活. 但EL-4细胞即使在20Gy射线照射下也只发生延迟细胞凋亡. 这种差异的确切机制尚不清楚, 可能与细胞凋亡信号传导系统和DNA损伤修复系统功能有关, 决定了组织细胞的放射敏感性.

■研发前沿
不同的射线剂量和照射后时间诱导的基因转录谱和蛋白表达谱差异的研究是目前研究的热点, 有助于阐明放射诱导的细胞凋亡的机制.

董广璐, 邢丽娜, 刘晓滨, 哈尔滨医科大学附属第二医院肿瘤放射治疗科 黑龙江省哈尔滨市 150086
刘伟, 金茜, 张淑云, 哈尔滨医科大学附属第二医院科研实验中心 黑龙江省哈尔滨市 150086
董广璐, 1993年哈尔滨医科大学硕士, 副主任医师, 副教授. 主要从事肿瘤放射治疗.
黑龙江省科技计划攻关项目, No. GC03C606-4
通讯作者: 张淑云, 150086, 哈尔滨市南岗区学府路246号, 哈尔滨医科大学附属第二医院科研实验中心.
zhshuyun136@yahoo.com.cn
电话: 0451-86605487 传真: 0451-86688011
收稿日期: 2006-08-29 接受日期: 2006-09-28

Properties of radiation-induced apoptosis and cell cycle changes in liver cancer cell lines

Guang-Lu Dong, Li-Na Xing, Xiao-Bin Liu, Wei Liu, Qian Jin, Shu-Yun Zhang

Guang-Lu Dong, Li-Na Xing, Xiao-Bin Liu, Department of Tumor Radiotherapy, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Wei Liu, Qian Jin, Shu-Yun Zhang, Research Center, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Supported by the Key Science and Technology Project of Heilongjiang Province, No. GC03C606-4
Correspondence to: Shu-Yun Zhang, Research Center, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. zhshuyun136@yahoo.com.cn
Received: 2006-08-29 Accepted: 2006-09-28

Abstract
AIM: To analyze the properties of radiation-induced apoptosis and cell cycle changes in liver cancer cell lines.

METHODS: Liver cancer cell lines HepG2 and SMMC-7721 were included in this study, and normal liver cell line HL-7702, pulmonary small cell carcinoma cell line HCI-H460 and lung adenocarcinoma cell line A549 were used as controls. After routine culture for 48 h, all the cells were irradiated under 4Gy X-radiation. The cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry (FCM) before and 6, 12, 24, 36, 48 h after irradiation.

RESULTS: After irradiation, cell apoptosis started from the 6th h and reached to the peak at 12 h in HepG2 cells (ΔApo_{HepG2} = 45.16%, t = 8.864, P < 0.0025), while at 24 h in SMMC-7721 cells (ΔApo_{7721} = 24.94%). In comparison with SMMC-7721 cells, HepG2 cells had an earlier and higher apoptosis peak. The cell cycle and apoptosis were generally in the same situation in HCI-H460 and A549 cells as those in SMMC-7721 and HepG2 cells. The pre-S-phase cell apoptosis was found in both kinds of liver cancer cells. Significant blockage of G_2/M phase occurred 12 h after irradiation.

CONCLUSION: After 4Gy X-radiation, premitotic apoptosis occurs both in HepG2 and SMMC-7721 cells. Furthermore, X-radiation may induce G_2/M-phase cell injuries and deaths in HepG2 cells.

Key Words: X-radiation; Apoptosis; Cell cycle; Cell line; Flow cytometry

Dong GL, Xing LN, Liu XB, Liu W, Jin Qian, Zhang SY. Properties of radiation-induced apoptosis and cell cycle changes in liver cancer cell lines. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(29):2834-2837

摘要
目的: 探讨肝癌细胞系放射诱导的细胞周期和细胞凋亡的变化特点.

方法: 研究细胞系为肝癌细胞系HepG2和SMMC-7721, 对照细胞系为正常肝细胞系HL-7702、肺小细胞癌HCI-H460和肺腺癌A549. 常规培养48 h后接受4Gy射线照射, 收获受照前(0 h)和受照后6, 12, 24, 36和48 h的细胞, 采用流式细胞术(FCM)检测各细胞系细胞周期和细胞凋亡.

结果: 4Gy X线照射后, HepG2在照射后12 h出现细胞凋亡高峰, 射线诱导的细胞凋亡比率为45.16% (t = 8.864, P<0.0025), 而SMMC-7721在24 h达高峰, 诱导的细胞凋亡比率为24.94%, HepG2较SMMC-7721射线诱导的细胞凋亡高峰出现早、比率高; HepG2和SMMC-7721与

HCI-H460和A549变化较一致, 凋亡变化的走势和峰值均与S期的相反, 两株肝癌细胞可能均发生了射线诱导的有丝分裂前S期细胞凋亡. HepG2在照射后12 h有明显的G_2/M期阻滞, 可能有射线诱导的G_2/M期细胞损伤, 发生了延迟的间期死亡.

结论: 两株肝癌细胞可能均发生了射线诱导的有丝分裂前S期细胞凋亡, HepG2可能伴有射线诱导的G_2/M期细胞损伤, 发生了延迟的间期死亡.

关键词: X射线; 细胞周期; 细胞凋亡; 细胞系; 流式细胞术

董广璐, 邢丽娜, 刘晓滨, 刘伟, 金茜, 张淑云. 肝癌细胞系放射诱导的细胞凋亡和细胞周期的变化. 世界华人消化杂志 2006;14(29):2834-2837

http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2834.asp

0 引言

射线诱导的肿瘤细胞凋亡是放射治疗的主要机制之一, 与肿瘤组织细胞放射敏感性或放射抗性有关[1-2]. 在临床放射治疗中, 不同组织器官或不同组织来源的肿瘤具有不同的放射敏感性, 如肺小细胞癌较肺腺癌或宫颈癌放射敏感性高. 对体外细胞系的研究也表明, 同种组织不同个体或不同组织来源的细胞系放射敏感性不同[3]. 这可能与射线诱导的依赖细胞周期的细胞凋亡特点不同有关[4-5]. 为了更好的利用细胞系开展放射治疗的相关研究, 我们对我院科研实验中心正在使用的肝癌细胞系放射诱导的细胞周期和细胞凋亡的特点进行了研究.

1 材料和方法

1.1 *材料* 肝癌细胞系HepG2和SMMC-7721, 正常肝细胞系HL-7702, 肺小细胞癌细胞系HCI-H460和肺腺癌细胞系A549均购于中国医学科学院上海肿瘤研究所. 直线加速器为XHA600C(山东新华医疗器械厂). 流式细胞仪为FAC sort(美国BD公司). 流式细胞术(FCM)检测所用试剂为Becton Dickinson公司的试剂盒(Cycle Test™ Plus DNA Reagent Kit).

1.2 *方法* 以肝癌细胞系HepG2和SMMC-7721为研究细胞系, 以正常肝细胞系HL-7702为同种组织对照细胞系, 以放射敏感的肺小细胞癌细胞系HCI-H460和相对放射抗拒的肺腺癌细胞系A549为不同肿瘤组织对照细胞系; 用含100 mL/L小牛血清的DMEM常规培养细胞, 5×10^5个/孔接种6孔板, 培养48 h. 用4Gy X线照射(剂量率: 250 cGy/min)后, 继续培养受照细胞. 按试剂盒要求收获照射前0 h和照射后6, 12, 24, 36和48 h的细胞, 并用FCM进行细胞周期和细胞凋亡检测.

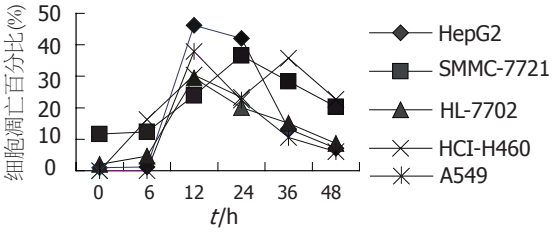


图 1 4Gy射线照射前后细胞凋亡的变化.

统计学处理 率的比较采用t检验, P<0.05有统计学意义.

2 结果

2.1 *放疗前后细胞凋亡(Apo)的变化*(图1) 4Gy X线照射后6 h HepG2和SMMC-7721与HL-7702和A549较一致均未诱导明显的细胞凋亡, 照射后12 h均诱导了明显的细胞凋亡, 诱导的细胞凋亡率 分别为45.16%, 12.25%, 27.45%和37.93%, 而且HepG2和HL-7702, A549一样达到高峰, 诱导了显著的细胞凋亡(t = 8.864, P<0.0025). 而SMMC-7721在24 h达高峰, 诱导的细胞凋亡率为24.94%, 接近HL-7702在12 h时诱导的细胞凋亡水平. 没有细胞系与HCI-H460一致, 在射线照射后6 h即诱导了明显的细胞凋亡, 在12 h达高峰, 而且在36 h出现第二个细胞凋亡峰, 两峰分别为30.41%和35.79%. 两株肝癌细胞在放射前后也呈现不同的细胞凋亡特点, HepG2在照射前细胞凋亡水平较低, 在照射后12 h诱导了较高的细胞凋亡比率, 而SMMC-7721在照射前细胞凋亡水平较高, 在照射后24 h才诱导了较高的细胞凋亡比率, 低于HepG2(24.94% *vs* 45.16%).

2.2 *放疗前后细胞周期的变化*(图2) 在G_0/G_1期, HepG2和HL-7702较一致, 呈现先降后升或平的走势; SMMC-7721和HCI-H460、A549较一致, 呈现先升后降的走势. 各株细胞在多个时间点均呈现较高的比例(>40%), 只是HepG2在24 h和36 h呈明显降低. 在G_2/M期, HepG2、SMMC-7721和HL-7702以及HCI-H460和A549在多个时间点均呈现较低的比例(<20%), 只是HepG2在12 h和48 h呈明显增高. 在细胞周期的S期, HepG2和SMMC-7721与HCI-H460和A549走势较一致, 均先降后升, 且均在12 h降为最低, 而HL-7702则成

■创新盘点

本文同时对比研究了肝癌细胞HepG2和SMMC-7721, 同种组织的正常肝细胞系HL-7702, 不同肿瘤组织细胞系HCI-H460和A549在4Gy X射线照射后细胞凋亡和细胞周期变化特点, 为以细胞凋亡为指标的放射生物学研究者选择合适的研究剂量和检测时间点提供了实验依据.

■应用要点
在以细胞凋亡为指标的放射生物学研究中, 一定要考虑特定组织细胞放射诱导的细胞凋亡和细胞周期的特点, 选择合适的研究剂量和检测时间点.

相反走势先升后降.

2.3 放疗前后细胞凋亡的变化与细胞周期的关系 (图2) HepG2和SMMC-7721与HCI-H460和A549相似, 在照射后细胞的凋亡峰值均与S期的最低值相对, 射线诱导的细胞凋亡变化和S期成相反走势, 射线诱导的细胞凋亡可能主要发生在有丝分裂前S期(图2A-B, D-E). 没有细胞株与HCI-H460相似, 在射线照射后6 h即诱导了明显的细胞凋亡, 在12 h达高峰, 在36 h出现第二个细胞凋亡峰, 可能也发生了快速间期细胞凋亡和细胞周期延迟异常的有丝分裂期凋亡, 该细胞系在照射后48 h未有明显的细胞周期的恢复(图2D). HepG2在照射后12 h, 出现G_2/M期高峰, 可能有G_2/M期阻滞. HepG2和SMMC-7721与HL-7702和A549相似, 在照射后24-48 h均有细胞周期的恢复(图2A-C, E).

3 讨论

近年来, 对放射诱导的细胞凋亡与细胞周期的关系及其分子机制均有了较深入的认识[5-11]. 依据不同的实验技术分析可得出不同模式的细胞凋亡. 用染料排除实验(dye exclusion test)可分析间期细胞死亡(interphase death), 用集落生成实验(clonogenic assay)可分析细胞增殖性死亡(reproductive death), 能切实反映细胞的放射敏感性. 而FCM能够很好地分析细胞凋亡与细胞周期变化的关系[5,12-13], 已得出几种模式: (1)快速间期死亡(rapid interphase death), 发生在射线照射后5-6 h以内, 主要是由DNA双链断裂识别系统启动S期细胞死亡; 延迟的间期死亡(delayed interphase death), 发生在G_2期阻滞后, 主要依赖G_2期细胞的损伤; 有丝分裂或延迟的有丝分裂死亡(mitotic/delayed mitotic death), 发生在一次或几次有丝分裂后, 主要由于致命的染色体异常所致. (2)快速间期凋亡(rapid interphase apoptosis), 同快速间期死亡; 延迟异常的有丝分裂凋亡(delayed aberrant mitotic apoptosis), 有一个长时间的细胞周期延迟, 细胞死亡发生在照射后36-60 h; 有丝分裂后间期凋亡(postmitotic interphase apoptosis), 主要发生在一次或几次有丝分裂后S期细胞. (3)有丝分裂前凋亡(premitotic apoptosis)和有丝分裂后凋亡(postmitotic apoptosis). 我们通过对肝癌细胞HepG2和SMMC-7721在4Gy X线照射后细胞凋亡和细胞周期进行检测, 并与同种组织的正常肝细胞系HL-7702, 不同肿瘤组织细胞系HCI-H460和A549的检测结果比较分析表明,

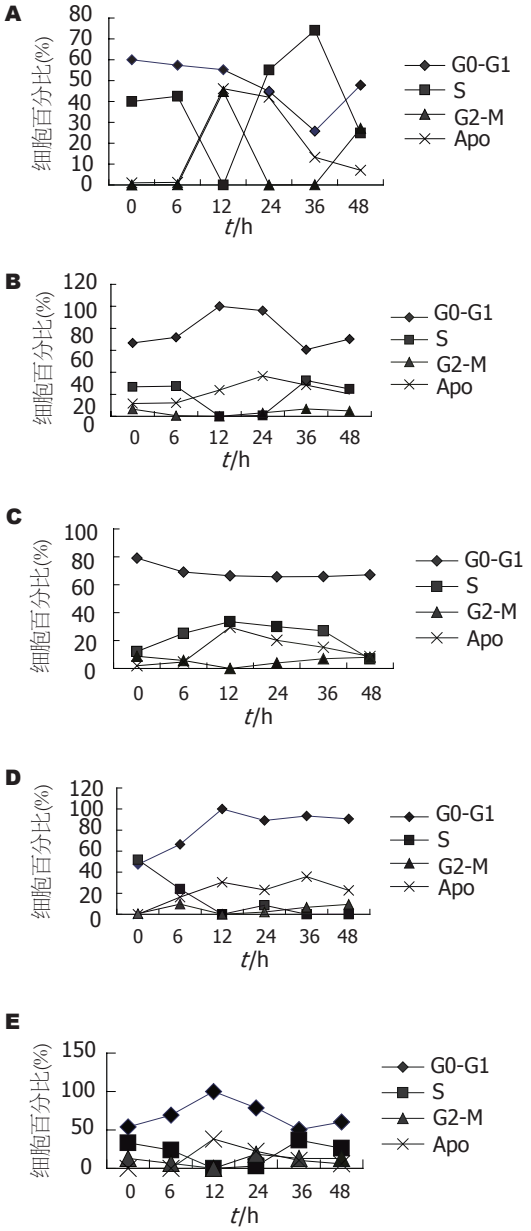


图 2 五株细胞4Gy射线照射前后细胞凋亡和细胞周期的变化. A:HepG2; B: SMMC−7721; C: HL−7702; D: HCI−H460; E: A549.

HepG2与HL-7702, A549和HCI-H460较一致, 在射线照射后6-12 h诱导了明显的细胞凋亡, 且达高峰; 而SMMC-7721略有不同, 在射线照射后6-24 h诱导了明显的细胞凋亡, 且达高峰; HepG2和SMMC-7721以及HL-7702和A549均未出现HCI-H460射线诱导的细胞凋亡特点, 即在射线照射后6 h即诱导了明显的细胞凋亡, 在12 h达高峰, 而且在36 h出现第二个细胞凋亡峰. HCI-H460是小细胞肺癌细胞株, 对射线敏感, 本实验中该细胞系呈现的射线诱导的细胞凋亡特点与其放射敏感性较一致, 而A549是肺腺癌细胞株, 对射线有一定的抗拒性, 两株肝癌细胞

和正常肝细胞与其呈现了较相似的射线诱导的细胞凋亡特点. 两株肝癌细胞在放射前后也呈现不同的细胞凋亡特点, HepG2较SMMC-7721射线诱导的细胞凋亡峰出现早、比率高.

将细胞凋亡变化和细胞周期变化综合分析发现, HepG2和SMMC-7721与HCI-H460和A549变化模式较一致, 凋亡变化的走势和峰值均与S期的相反, 可能发生了有丝分裂前S期细胞凋亡. HCI-H460在照射后6 h内即发生明显细胞凋亡, 可能发生了快速间期凋亡; 该细胞又在36 h出现第二个细胞凋亡峰, 可能发生了细胞周期延迟异常的有丝分裂凋亡, 使该细胞在48 h时也未有明显的细胞周期的恢复. HepG2和SMMC-7721, 以及A549和HL-7702不同于HCI-H460, 均未出现快速间期凋亡和细胞周期延迟异常的有丝分裂凋亡, 使这些细胞在48 h时已有明显的细胞周期的恢复. HepG2在照射后12 h有明显的G_2/M期阻滞, 也使该细胞在该时间点被诱导了较高水平的细胞凋亡, 但在48 h则表现为最低水平的凋亡, 这与Liu *et al*[14]的报道较一致.

在我们的研究中同种组织不同性质或来源的细胞呈现了不同的细胞周期和细胞凋亡特点, 进一步证实射线诱导的细胞凋亡和细胞周期变化有组织细胞依赖性, 可能有不同的分子机制的参与[15-17], 有待进一步研究. 另外提示, 在以细胞凋亡为指标的放射生物学研究中, 一定要考虑特定组织细胞放射诱导的细胞凋亡和细胞周期的特点, 选择合适的研究剂量和检测时间点.

4 参考文献

1 沈瑜, 糜福顺. 肿瘤放射生物学. 第一版. 北京: 中国医药科技出版社, 2001: 420-441

2 董广璐, 张淑云, 邢丽娜, 郑淑香. 宫颈癌放疗前后肿瘤细胞凋亡及其相关基因的变化. 中国肿瘤临床 2004; 31: 1098-1100

3 Otomo T, Hishii M, Arai H, Sato K, Sasai K. Microarray analysis of temporal gene responses to ionizing radiation in two glioblastoma cell lines: up-regulation of DNA repair genes. *J Radiat Res (Tokyo)* 2004; 45: 53-60

4 Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 59: 928-942

5 Shinomiya N. New concepts in radiation-induced apoptosis: 'premitotic apoptosis' and 'postmitotic apoptosis'. *J Cell Mol Med* 2001; 5: 240-253

6 Ding LH, Shingyoji M, Chen F, Hwang JJ, Burma S, Lee C, Cheng JF, Chen DJ. Gene expression profiles of normal human fibroblasts after exposure to ionizing radiation: a comparative study of low and high doses. *Radiat Res* 2005; 164: 17-26

7 Nome RV, Bratland A, Harman G, Fodstad O, Andersson Y, Ree AH. Cell cycle checkpoint signaling involved in histone deacetylase inhibition and radiation-induced cell death. *Mol Cancer Ther* 2005; 4: 1231-1238

8 Ross GM. Induction of cell death by radiotherapy. *Endocr Relat Cancer* 1999; 6: 41-44

9 Blakely EA. Radiation-induced changes in a cell's program for life. *Acta Oncol* 1998; 37: 127-128

10 Nakajima T. Signaling cascades in radiation-induced apoptosis: Roles of protein kinase C in the apoptosis regulation. *Med Sci Monit* 2006; 12: RA220-RA224

11 Lee YJ, Soh JW, Dean NM, Cho CK, Kim TH, Lee SJ, Lee YS. Protein kinase Cdelta overexpression enhances radiation sensitivity via extracellular regulated protein kinase 1/2 activation, abolishing the radiation-induced G(2)-M arrest. *Cell Growth Differ* 2002; 13: 237-246

12 Huang X, Halicka HD, Traganos F, Tanaka T, Kurose A, Darzynkiewicz Z. Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis. *Cell Prolif* 2005; 38: 223-243

13 Darzynkiewicz Z, Huang X, Okafuji M. Detection of DNA strand breaks by flow and laser scanning cytometry in studies of apoptosis and cell proliferation (DNA replication). *Methods Mol Biol* 2006; 314: 81-93

14 Liu ZZ, Huang WY, Li XS, Lin JS, Cai XK, Lian KH, Zhou HJ. Prediction value of radiosensitivity of hepatocarcinoma cells for apoptosis and micronucleus assay. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7036-7039

15 Fabbro M, Savage K, Hobson K, Deans AJ, Powell SN, McArthur GA, Khanna KK. BRCA1-BARD1 complexes are required for p53Ser-15 phosphorylation and a G1/S arrest following ionizing radiation-induced DNA damage. *J Biol Chem* 2004; 279: 31251-31258

16 Essmann F, Engels IH, Totzke G, Schulze-Osthoff K, Janicke RU. Apoptosis resistance of MCF-7 breast carcinoma cells to ionizing radiation is independent of p53 and cell cycle control but caused by the lack of caspase-3 and a caffeine-inhibitable event. *Cancer Res* 2004; 64: 7065-7072

17 Raffoul JJ, Wang Y, Kucuk O, Forman JD, Sarkar FH, Hillman GG. Genistein inhibits radiation-induced activation of NF-kappaB in prostate cancer cells promoting apoptosis and G2/M cell cycle arrest. *BMC Cancer* 2006; 6: 107

■同行评价

本文以探讨了肝癌细胞系放射诱导的细胞周期和细胞凋亡的变化特点. 课题设计合理, 实验流程清晰, 结论及分析论点明确. 其实验结果对临床工作有一定的指导意义.

电编 李琪 编辑 张焕兰

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年10月18日; 14(29): 2838-2843
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

survivin反义寡核苷酸对胰腺癌荷瘤裸鼠的治疗作用

刘江伟, 张永久, 皇甫清风, 李开宗, 张 东, 雷 涛

■背景资料
胰腺癌因恶性程度高, 手术切除率低, 同时存在对放疗和化疗的不敏感性, 在临床上对胰腺癌的治疗面临着巨大的挑战, 近年来, 以某些肿瘤基因作为靶点的基因治疗可能为胰腺癌的治疗提供新的有效方法. survivin是近年发现的一种凋亡抑制基因, 属于凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族的新成员, 是目前发现的最强的凋亡抑制因子, 因其在肿瘤组织表达的特异性而成为研究的热点.

刘江伟, 张永久, 张东, 雷涛, 兰州军区乌鲁木齐总医院普外科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000
皇甫清风, 兰州军区乌鲁木齐总医院干部病房 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000
李开宗, 第四军医大学西京医院肝胆外科 陕西省西安市 710032
刘江伟, 博士, 副主任医师, 主要从事普外科基础与临床研究.
通讯作者: 刘江伟, 830000, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市友好北路41号, 兰州军区乌鲁木齐总医院普外科. ljw273@sohu.com
电话: 0991-4992101-305
收稿日期: 2006-07-09 接受日期: 2006-08-10

Therapeutic effects of survivin antisense oligonucleotide on nude mice bearing human pancreatic carcinoma xenograft

Jiang-Wei Liu, Yong-Jiu Zhang, Qing-Feng Huangfu, Kai-Zong Li, Dong Zhang, Tao Lei

Jiang-Wei Liu, Yong-Jiu Zhang, Dong Zhang, Tao Lei, Department of General Surgery, Urumqi General Hospital of Lanzhou Military Command, Chinese PLA, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Qing-Feng Huangfu, Department of Carder Ward, Urumqi General Hospital of Lanzhou Military Command, Chinese PLA, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Kai-Zong Li, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China
Correspondence to: Jiang-Wei Liu, Department of General Surgery, Urumqi General Hospital of Lanzhou Military Region, Chinese PLA, 41 Youhao North Road, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. ljw273@sohu.com
Received: 2006-07-09 Accepted: 2006-08-10

Abstract

AIM: To investigate the therapeutic effects of survivin antisense oligonucleotide (ASODN) on nude mice bearing human pancreatic carcinoma xenograft.

METHODS: The nude mouse model of pancreatic cancer was established using human pancreatic cancer cell line BxPC-3. The mice bearing tumor were intratumorally injected with survivin ASODN (40 g/200 L per mouse). The tumor size and volume were measured before and after injection. The pathological changes of tumor tissues were observed. The expression level of survivin mRNA was measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and the activity of caspase-3 was evaluated using a caspase-3 assay kit. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and microvessel density (MVD) were detected by immunohistochemistry.

RESULTS: Twenty days after injection, the tumor volume and weight were significantly decreased in survivin ASODN group as compared with those in the control and SODN group (427.34 ± 12.44 mm^3 *vs* 703.56 ± 12.51, 687.59 ± 12.44 mm^3, $P < 0.01$; 0.57 ± 0.06 g *vs* 1.16 ± 0.12, 1.07 ± 0.10 g, $P < 0.01$), and the tumor inhibition rate was 50.86%. The expression of survivin mRNA was decreased by 50%, while the caspase-3 activity was significantly higher in survivin ASODN group than that in the control and SODN group (0.040 ± 0.018 *vs* 0.006 ± 0.001, 0.007 ± 0.002, $P < 0.01$). The expression of PCNA and MVD were significantly lower in survivin ASODN group than those in the control and SODN group (28.33 ± 2.16 *vs* 35.17 ± 3.71, 34.33 ± 3.27, $P < 0.01$; 15.50 ± 3.08 *vs* 21.33 ± 2.94, 20.67 ± 2.16, $P < 0.01$). However, both expression of PCNA and MVD had no significant difference between the control and SODN group ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Survivin ASODN can inhibit the growth of human pancreatic carcinoma xenograft in nude mouse through activating caspase-3 to induce apoptosis, and suppressing the proliferation of pancreatic cancer cells as well as the angiogenesis of carcinoma.

Key Words: Pancreatic cancer; survivin; Antisense oligonucleotide; Nude mice

Liu JW, Zhang YJ, Huangfu QF, Li KZ, Zhang D, Lei T. Therapeutic effects of survivin antisense oligonucleotide on nude mice bearing human pancreatic carcinoma xenograft. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(29):2838-2843

摘要

目的: 探讨survivin反义寡核苷酸对胰腺癌荷

瘤裸鼠的治疗作用.

方法: 构建胰腺癌荷瘤裸鼠模型, 采用瘤内注射方式, 每只注射survivin反义寡核苷酸(ASODN) 40 g/200 L, 对裸鼠进行干预治疗. 观测裸鼠肿瘤生长情况及瘤体质量、病理形态; 应用RT-PCR检测肿瘤的survivin mRNA变化; 应用caspase-3试剂盒检测caspase-3活性; 免疫组织化学法检测肿瘤增殖指数(PI)和微血管密度(MVD).

结果: 治疗20 d后, survivin ASODN治疗组的平均体积(427.34±12.44 mm^3)明显小于对照组(703.56±12.51 mm^3)和正义组(687.59±12.44 mm^3)(P<0.01); 治疗组瘤重(0.57±0.06 g)也显著低于对照组(1.16±0.12 g)和正义组(1.07±0.10 g)(P<0.01), 抑瘤率为50.86%. survivin ASODN治疗组survivin mRNA与对照组和正义组相比降低了约50%; survivin ASODN治疗组肿瘤的caspase-3相对活性明显高于对照组和正义组(0.040±0.018 *vs* 0.006±0.001, 0.007±0.002, P<0.01); survivin ASODN治疗组的PI(28.33±2.16)明显低于对照组(35.17±3.71)和正义组(34.33±3.27)(P<0.01); survivin ASODN组MVD(15.50±3.08)明显低于对照组(21.33±2.94)和正义组(20.67±2.16)(P<0.01); 而对照组和正义组PI和MVD均无显著性差异(P<0.05).

结论: survivin ASODN可显著抑制荷胰腺癌裸鼠的肿瘤生长, 其作用机制可能是通过提高caspase-3活性来诱导细胞凋亡, 通过抑制肿瘤细胞的增殖和新生血管的形成来发挥抗肿瘤效应.

关键词: 胰腺癌; survivin; 反义寡核苷酸; 裸鼠

刘江伟, 张永久, 皇甫清风, 李开宗, 张东, 雷涛. survivin反义寡核苷酸对胰腺癌荷瘤裸鼠的治疗作用. 世界华人消化杂志 2006;14(29):2838-2843

http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2838.asp

0 引言

在中国, 胰腺癌在肿瘤引起的死亡中占第6位, 胰腺癌的5 a生存率不到4%, 而且, 近年来胰腺癌的发病率在中国呈上升趋势[1-2]. 因胰腺癌起病隐匿, 发展迅猛, 缺乏有效的早期诊断工具, 在胰腺确诊时大部分患者已经出现转移, 只有20%的患者有手术切除的机会, 但术后预后较差, 另一方面胰腺癌对放疗和化疗存在着不敏感性, 因此, 对胰腺癌的治疗面临着巨大的挑战[3]. 近年来随着对肿瘤分子学机制研究的不断深入, 以某些肿瘤基因作为靶点的基因治疗可能为胰腺癌的治疗提供新的有效方法[4-5]. survivin是近年发现的一种凋亡抑制基因, 属于凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族的新成员, survivin选择性的表达于胚胎发育组织和大多数肿瘤组织, 其表达与肿瘤患者的病程恶性进展、预后差、肿瘤的复发和耐药性密切相关[6-12]. 我们先前的研究表明, survivin在胰腺癌组织中高表达, 而在正常组织中不表达, 其表达与胰腺癌的细胞增殖、凋亡和血管生成密切相关, 并且survivin反义寡核苷酸(antisense oligonucleotides)可诱导胰腺癌BxPC-3细胞增殖、诱导细胞凋亡并增加BxPC-3细胞对吉西他滨化疗敏感性[13-16]. 本研究进一步探讨survivin ASODN对胰腺癌荷瘤裸鼠的治疗作用.

■应用要点

本研究在先前研究的基础上, 建立胰腺癌裸鼠模型, 应用survivin反义寡核苷酸, 从荷胰腺癌裸鼠模型的体内实验进一步证明靶向survivin的基因治疗可抑制肿瘤细胞的增殖、抑制血管生成, 通过提高caspase-3的活性来诱导细胞凋亡, 在临床上有广阔的应用前景.

1 材料和方法

1.1 材料 胰腺癌BxPC-3细胞系购自第四军医大学口腔生物细胞培养库. ASODN序列[16-17]为5'-CCCAGCCTTCCAGCTCCTTG-3', 正义寡核苷酸(SODN)序列为: 5'-CAAGGAGCTGGAAGGCTGGG-3', 二者均经硫代磷酸化修饰, 以及survivin和内参β-actin引物均由上海生工生物工程公司合成. 阳离子脂质转染剂转染(LipofectAMINE™2000)系Gibco公司产品; RNA提取液(TRIzol)购自Life Technologies公司; RT-PCR购自TaKaRa公司; 鼠抗人PCNA mAb为北京中山公司产品; 兔抗人FⅧ-RAg多克隆抗体和Envision二步法免疫组化试剂盒系DAKO公司产品; caspase-3比色检测试剂盒系Calbiochem公司产品. 所用BALB/C nu/nu遗传背景的裸鼠购于第四军医大学动物中心, 选用4-6周龄、体质量18-22 g的♀裸鼠21只, 在兰州军区乌鲁木齐总医院动物中心SPF级条件下饲养.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及裸鼠荷瘤模型的建立 胰腺癌BxPC-3以含100 mL/L的新生小牛血清(56℃, 灭活30 min)、100 kU/L青霉素、100 mg/L链霉素的RPMI 1640培养基(Gibco公司), 在37℃, 50 mL/L CO_2饱和湿度条件下培养, 每2-3 d换液传代, 取对数期生长的细胞实验. 至对数生长期的细胞用2.5 g/L胰酶消化后, 收集制成10^{11}个/L的细胞悬液备用. 将胰腺癌BxPC-3细胞10^7混以0.1 mL PBS皮下注射于裸鼠背部, 建立肿瘤模型. 每只裸鼠取1个注射点, 接种后每天观察有

■同行评价
本文内容丰富, 实验设计合理, 数据处理准确, 结论较为明确, 是一篇较好的实验研究文稿.

无肿瘤形成及注射点有无破溃红肿, 按规定时间测量肿瘤体积, 经过3-7 d潜伏期, 可见接种部位皮下出现灰白色结节, 并逐渐长大, 呈圆形或椭圆形, 突出于体表, 以肿瘤直径0.5 cm为成瘤.

1.2.2 实验分组及处理 皮下接种15 d后, 有19只裸鼠成瘤, 将其中18只裸鼠随机分为3组, 每组6只. 正常对照组: 注射lipofectin 10 μg+转染液(无血清无抗生素培养液), 总量200 μL; 正义治疗组: 注射survivin SODN 40 μg+lipofectin 10 μg+转染液总量200 μL; 反义治疗组: survivin ASODN 40 μg+lipofectin 10 μg+转染液总量200 μL. 各组均同时于第15, 20, 25, 30天瘤内多点注射试剂200 μL, 注射前脂质体先于室温下溶于转染液中45 min, 再与寡核苷酸包裹并室温下静置15 min.

1.2.3 检测指标和检测方法 每次在转染开始前用游标卡尺测量肿瘤大小1次, 每5 d 1次, 连续观测20 d, 期间未出现裸鼠死亡, 于第35天拉颈处死裸鼠, 剥离皮下肿瘤, 测量肿瘤长、短径, 称瘤质量m. 肿瘤体积按公式$V = 3.14/6\times a\times b^2$计算, 其中$a$为肿瘤的长径, b为短径, 单位为毫米(mm). 抑瘤率 = (对照组m-实验组m/对照组m)×100%, 肿瘤标本部分快速投入液氮罐中, -80℃保存, 部分组织用40 g/L中性甲醛固定, 石蜡包埋, 连续切片, 厚度4 μm, 以备免疫组化染色和HE染色用. 取肿瘤组织50 mg, 用RNA提取液TRIzol提取总RNA. 用RT-PCR试剂盒方法, 取1 μg总RNA用于逆转录合成cDNA, 10 μL cDNA用于PCR反应, 加入survivin的引物序列为: 5'-GTGAATTTTTGAAACTGGACAG-3'(F)和5'-CCTTTCCTAAGACATTGCTAAG-3'(R), 243 bp; 内参β-actin引物序列为: 5'-CTTCTACAATGAGCTGCGTG-3'(F)和5'-TCATGAGGTAGTCAGTCAGG-3'(R), 309 bp; 经过变性后进入循环. PCR产物5 μL在20 g/L琼脂糖上电泳(含0.5 mg/L溴化乙锭), 经凝胶图像分析仪分析结果, 将survivin和β-actin的比值做为survivin表达的参数, 对survivin的PCR产物进行相对定量. 实验取未处理的BxPC-3细胞做对照.

1.2.4 caspase-3活性测定 取肿瘤组织20 mg, 将组织团块加入1 mL冰裂解液(50 mmol/L HEPES, 1 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L EDTA, 10 g/L CHAPS, pH 7.4)中10 min, 4℃; 13 000 g离心10 min, 取上清液; 用Coomassie Reagent(Pierce)进行蛋白定量; 100 μg蛋白用裂解液稀释到40 μL; 加入40 μL反应缓冲液(100 mmol/L NaCl, 50 mmol/L HEPES, 10 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA, 10 g/L CHAPS, 100 mL/L丙三醇, pH 7.4)和20 μL比色标记的caspase-3底物(Ac-DEVD-pNA), 使终浓度为200 μmol/L, 放入50 mL/L CO_2孵箱, 37℃, 4 h; 用酶标免疫测定仪测定波长405 nm下的吸光度值来反映caspase-3相对活性的吸光度. 实验重复两次, caspase-3相对活性用mean±SD表示.

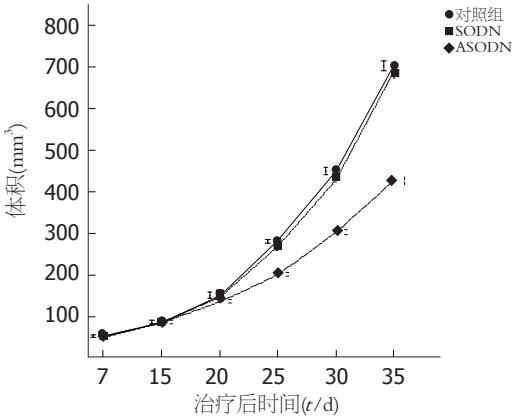


图 1 三组裸鼠的肿瘤生长曲线.

1.2.5 增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的检测 采用免疫组化SP法染色. 鼠抗人PCNA mAb工作浓度1∶50. PCNA蛋白表达以细胞核出现棕黄色颗粒为阳性细胞, 每例切片计数至少10个400倍视野, 以平均每1000个细胞中所含阳性细胞的个数作为增殖指数(proliferating index, PI).

1.2.6 肿瘤微血管密度(microvessel density, MVD) 采用免疫组化SP法染色, 兔抗人FⅧ-RAg多克隆抗体工作浓度1∶100. 光镜下进行微血管计数并取其均值, 方法如下: 每张切片先在低倍镜下(100倍)全面观察, 确定5个血管密度最高热点, 再在高倍镜下(<200倍)进行微血管计数. 记录5个热点视野的微血管数, 取其均值作为该标本的MVD.

统计学处理 采用SPSS 10.0, 进行作图和统计分析, 均数比较用t检验.

2 结果

2.1 survivin ASODN对胰腺癌荷瘤裸鼠的肿瘤生长抑制作用 应用经典的胰腺癌皮下移植瘤方法建立胰腺癌裸鼠模型, 1 wk后可见裸鼠胰腺癌移植瘤成功率90.47%, 种植肿瘤15 d开始进行治疗(图1), 在接种肿瘤的第25天(即治疗开

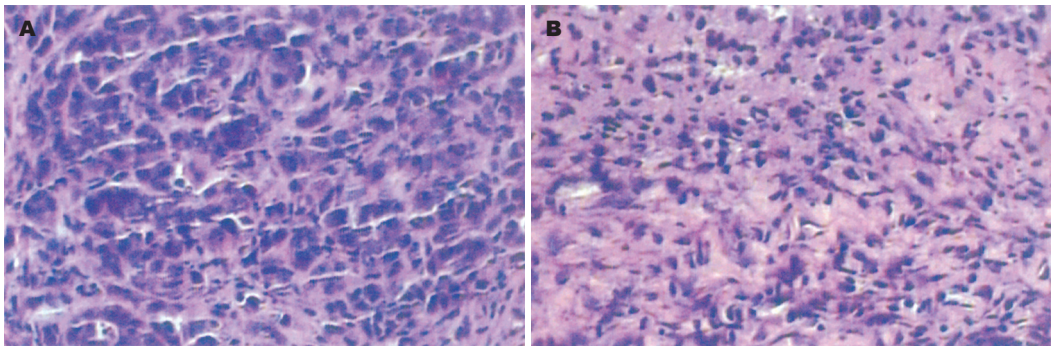


图 2 对照组和反义治疗组肿瘤的组织学形态(HE × 200). A: 对照组; B: 反义治疗组.

始的第10天), survivin ASODN治疗组的肿瘤的体积明显小于对照组和正义组, 到第35天, 对照组、正义组和survivin ASODN组肿瘤的平均体积分别为703.56±12.51, 687.59±12.44, 427.34±12.44 mm^3, survivin ASODN治疗组的平均体积明显小于对照组和正义组(P<0.01), 而对照组、正义组之间差异无显著性(P>0.05)(图1), 3组的平均瘤质量分别为1.16±0.12, 1.07±0.10, 0.57±0.06 g, survivin ASODN治疗组的平均瘤重明显小于对照组和正义组(P<0.01), 而对照组、正义组之间差异无显著性(P>0.05). survivin ASODN组的平均抑瘤率为50.86%. 在饲养期间未发现裸鼠死亡及出现其他躯体的毒性反应.

2.2 组织学观察 对照组组织切片HE染色可见, 肿瘤细胞为导管上皮细胞, 肿瘤细胞在部分区域呈实性巢状排列, 许多瘤细胞排列松散, 亦偶可见呈游离状态的瘤细胞, 间有小腺腔样结构, 肿瘤细胞异型性明显, 瘤巨细胞及多核瘤细胞可见. 治疗组组织切片发现, 肿瘤细胞出现坏死区, 可见淋巴浸润细胞(图2).

2.3 肿瘤组织survivin mRNA的表达 RT-PCR产物电泳显示对照组和处理组在243 bp处均出现特异性的survivin条带, ASODN组survivin mRNA的表达明显低于对照组, 经凝胶图像分析仪分析结果显示, 对照组、正义组和survivin反义寡核苷酸组的平均survivin/β-actin mRNA分别为0.87±0.05, 0.84±0.04和0.44±0.06, survivin ASODN组与对照组和正义组之间均具有显著性差异(P<0.01). survivin ASODN组survivin与对照组相比下降了约50%.

2.4 survivin ASODN对肿瘤组织caspase-3活性的影响 对照组、正义组和survivin ASODN组肿瘤的caspase-3相对活性分别为0.006±0.001, 0.007±0.002和0.040±0.018, survivin ASODN组与对照组和正义组之间均具有显著性差异(P<0.01).

表 1 三组肿瘤的增殖指数、微血管密度和瘤质量

分组	PI	MVD	瘤质量(g)
对照组	35.17 ± 3.71	21.33 ± 2.94	1.16 ± 0.12
SODN组	34.33 ± 3.27	20.67 ± 2.16	1.07 ± 0.10
ASODN组	28.33 ± 2.16[b]	15.50 ± 3.08[b]	0.57 ± 0.06[b]

[b]P<0.01 *vs* 对照组.

2.5 survivin ASODN对肿瘤的细胞增生和血管生成的影响 surviving ASODN组肿瘤的PCNA PI(28.33±2.16)明显低于对照组(35.17±3.71)和正义组(34.33±3.27), 差异具有显著性(P<0.01). 对照组、正义组和survivin ASODN组肿瘤的MVD分别为21.33±2.94, 20.67±2.16, 15.50±3.08, survivin ASODN组的MVD明显低于对照组和正义组, 均具有显著性差异(P<0.01), 而对照组和正义组PI和MVD均无显著性差异(表1).

3 讨论

survivin是IAP家族的新成员, 是目前发现的最强的凋亡抑制因子, survivin的组织分布特征具有明显的选择性, 其表达于胚胎和发育的胎儿组织, 但不见于终末分化的成人组织(胸腺、生殖腺除外), 而表达于大多数的肿瘤组织中[18-19]. survivin具有抑制凋亡和调节细胞分裂的双重功能, 他参与细胞增生、分裂、细胞周期及细胞凋亡的调控, 与肿瘤的发生密切相关, 研究表明, survivin能够通过杆状病毒IAP重复序列(BIR)作用于caspase-3, caspase-7来抑制细胞凋亡[20-21], survivin的高表达可以使肿瘤细胞免受各种凋亡信号的刺激而帮助细胞存活[22-23]. 一些研究表明, survivin的高表达与肿瘤的预后差和耐药性有关[24-26]. survivin的过表达与胰腺癌的发生、发展密切相关[27]. 本研究结果显示, survivin ASODN作用于荷瘤裸鼠瘤体20 d后,

survivin ASODN治疗组的平均体积明显小于对照组和正义组, 而对照组、正义组之间差异无显著性. survivin ASODN治疗组的平均瘤重明显小于对照组和正义组, 而对照组、正义组之间差异无显著性. survivin ASODN组的平均抑瘤率为50.86%. 在饲养期间未发现裸鼠死亡及出现其他躯体的毒性反应. survivin ASODN组survivin mRNA与对照组相比下降了约50%. 这充分表明, survivin ASODN对荷瘤裸鼠体内靶基因表达和肿瘤生长确有一定抑制作用. 同时发现, survivin ASODN治疗组肿瘤的caspase-3相对活性明显高于对照组和正义组. caspase是细胞凋亡的核心机制, survivin直接作用于caspase, 主要抑制caspase-3和caspase-7的活性, 阻断细胞凋亡过程[21]. caspase-3主要通过以下途径促进凋亡: 裂解DNA修复相关分子; 裂解凋亡抑制蛋白等; 裂解细胞外基质蛋白及骨架蛋白; 裂解其他相关分子[28]. caspase-3对底物的切割不仅特异, 而且高效. 在凋亡发生的过程中, caspase-3既可作为凋亡的启动者, 也可作为凋亡的效应物, 从而形成瀑布式连锁反应, 促使凋亡得以完成[29]. 研究证明, 利用反义核酸技术干扰survivin的表达或抑制其功能的发挥可抑制有丝分裂并促进自发的细胞凋亡[30]. 使肿瘤生长速度延缓, 瘤重量减轻. 我们的实验数据显示, survivin ASODN组肿瘤的PCNA PI明显低于对照组和正义组, 具有显著性差异. survivin ASODN组的MVD明显低于对照组和正义组, 均具有显著性差异, 表明survivin ASODN对肿瘤的抑制作用是通过抑制细胞增殖和血管生成来实现. survivin在肿瘤血管新生调节中是至关重要的, 正常血管内皮细胞不表达survivin, 而体内外研究证明, 肿瘤血管内皮细胞过度表达survivin, 使得肿瘤血管内皮细胞凋亡减少, 有利于肿瘤生长. 因此, 反义survivin能够拮抗肿瘤血管内皮因子的保护作用, 从而抑制肿瘤血管的新生, 促进肿瘤内皮细胞凋亡, 最后导致肿瘤生长受到抑制, 达到治疗肿瘤的目的[31].

肿瘤的基因治疗在实验室阶段取得了瞩目的进步, 肿瘤的反义基因治疗是应用反义核酸在转录和翻译水平阻断某些异常基因的表达, 以阻断瘤细胞内的异常信号传导, 使瘤细胞进入正常分化轨道或引起细胞凋亡的一种治疗手段, 由于survivin基因表达的特异性, 可能成为基因治疗的有效靶点, 在临床上具有广阔的应用前景.

4 参考文献

1 Guo X, Cui Z. Current diagnosis and treatment of pancreatic cancer in China. *Pancreas* 2005; 31: 13-22

2 Wang L, Yang GH, Li H, Lu XH. The changing pancreatic cancer mortality in China (1991-2000). *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2005; 44: 509-513

3 Rodriguez JA, Li M, Yao Q, Chen C, Fisher WE. Gene overexpression in pancreatic adenocarcinoma: diagnostic and therapeutic implications. *World J Surg* 2005; 29: 297-305

4 Okusaka T, Matsumura Y, Aoki K. New approaches for pancreatic cancer in Japan. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004; 54 Suppl 1: S78-82

5 Blasco F, Penuelas S, Cascallo M, Hernandez JL, Alemany C, Masa M, Calbo J, Soler M, Nicolas M, Perez-Torras S, Gomez A, Tarrason G, Noe V, Mazo A, Ciudad CJ, Piulats J. Expression profiles of a human pancreatic cancer cell line upon induction of apoptosis search for modulators in cancer therapy. *Oncology* 2004; 67: 277-290

6 Altieri DC. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 2001; 7: 542-547

7 林连捷, 郑长青. Survivin与肿瘤. 世界华人消化杂志 2003; 11: 2027-2029

8 陆才德, 戴德坚, 孟化. Survivin-值得关注的抗癌治疗靶. 世界华人消化杂志 2005; 13: 701-705

9 金玉, 林连捷, 郑长青. 大肠癌组织中Survivin和Cox-2表达的相关性. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1218-1220

10 高思海, 赵金平, 潘铁成, 李军. 凋亡抑制基因survivin在食管鳞癌中的表达及其与p53基因表达相关性研究. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1468-1470

11 赵晶, 刘铁夫, 董春燕, 博挽澜. 反义Survivin诱导食管鳞癌细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1447-1449

12 苏琪, 吴硕东, 殷红专, 韩霞, 陈春生, 冯勇, 刘恩卿. 直肠癌旁移行黏膜中Survivin基因表达的意义. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2201-2202

13 刘江伟, 李开宗, 窦科峰. Survivin在胰腺癌组织中的表达及其与血管内皮生长因子的相关性研究. 中华肝胆外科杂志 2003; 9: 486-488

14 刘江伟, 李开宗, 窦科峰. Survivin在胰腺癌组织中的表达及其与细胞增殖的关系研究. 中国现代医学杂志 2003; 13: 77-78, 82

15 刘江伟, 李开宗, 窦科峰, 马福成. Survivin在胰腺癌组织中的表达及其与p53的相关性研究. 西北国防医学杂志 2003; 24: 417-419

16 刘江伟, 李开宗, 窦科峰, 苏明权, 于文彬, 张福琴. Survivin反义寡核苷酸诱导胰腺癌细胞凋亡并增加吉西他滨的化疗敏感性. 中华普通外科杂志 2004; 19: 401-403

17 Olie RA, Simoes-Wust AP, Baumann B, Leech SH, Fabbro D, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U. A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Res* 2000; 60: 2805-2809

18 Tong QS, Zheng LD, Chen FM, Zeng FQ, Wang L, Dong JH, Lu GC. Selection of optimal antisense accessible sites of survivin and its application in treatment of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 634-640

19 Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003; 22: 8581-8589

20 Zhu XD, Lin GJ, Qian LP, Chen ZQ. Expression of

survivin in human gastric carcinoma and gastric carcinoma model of rats. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1435-1438
21 Johnson AL, Langer JS, Bridgham JT. Survivin as a cell cycle-related and antiapoptotic protein in granulosa cells. *Endocrinology* 2002; 143: 3405-3413
22 Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, Reed JC. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 1998; 58: 5315-5320
23 Conway EM, Pollefeyt S, Steiner-Mosonyi M, Luo W, Devriese A, Lupu F, Bono F, Leducq N, Dol F, Schaeffer P, Collen D, Herbert JM. Deficiency of survivin in transgenic mice exacerbates Fas-induced apoptosis via mitochondrial pathways. *Gastroenterology* 2002; 123: 619-631
24 Ikeguchi M, Kaibara N. survivin messenger RNA expression is a good prognostic biomarker for oesophageal carcinoma. *Br J Cancer* 2002; 87: 883-887
25 Chakravarti A, Noll E, Black PM, Finkelstein DF, Finkelstein DM, Dyson NJ, Loeffler JS. Quantitatively determined survivin expression levels are of prognostic value in human gliomas. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1063-1068
26 Zaffaroni N, Pennati M, Colella G, Perego P, Supino R, Gatti L, Pilotti S, Zunino F, Daidone MG. Expression of the anti-apoptotic gene survivin correlates with taxol resistance in human ovarian cancer. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 1406-1412
27 Qiao JG, Zhang YQ, Yin YC, Tan Z. Expression of Survivin in pancreatic cancer and its correlation to expression of Bcl-2. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2759-2761
28 Grutter MG. Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol* 2000; 10: 649-655
29 Budd RC. Activation-induced cell death. *Curr Opin Immunol* 2001; 13: 356-362
30 Xia C, Xu Z, Yuan X, Uematsu K, You L, Li K, Li L, McCormick F, Jablons DM. Induction of apoptosis in mesothelioma cells by antisurvivin oligonucleotides. *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 687-694
31 O'Connor DS, Schechner JS, Adida C, Mesri M, Rothermel AL, Li F, Nath AK, Pober JS, Altieri DC. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. *Am J Pathol* 2000; 156: 393-398

电编 张敏 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

2006中国结直肠肛门外科学术会议通知

本刊讯 为了加强与世界同行的交流与接轨, 将我国直肠肛门外科的专利化发展到一个新的台阶, 由“中华医学会外科学分会结直肠肛门外科学组”、“中国抗癌协会大肠癌专业委员会”、“中国中医药学会肛肠分会”和“中国中西医结合学会大肠肛门病专业委员会”共同主办的“2006中国结直肠肛门外科学术会议”将于2006-11-09/12在珠海国际会议中心大酒店举行. 届时结直肠肛门外科的专家、同行将共聚一堂, 规划我国结直肠肛门外科协作研究、共同发展的前景. 大会将邀请国际最著名的美国、欧洲、新加坡、日本、香港及台湾的专家和我国外科界、中医界、肿瘤界以及相关领域的专家就本专业进展作专题报告. 大会同时还采用手术录像、提问、讨论、争鸣、答疑、展板等多种方式进行研究交流. 这将是我国结直肠肛门外科学界的一次盛会. 诚邀普通外科、结直肠肛门外科的专家、同行参会, 参会者可获得中华医学会Ⅰ类继续教育学分. 联系电话: 020-87331428, 87332200-86698

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年10月18日; 14(29): 2844-2848
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

双歧杆菌对内毒素损伤幼年大鼠抗氧化作用的影响

王 玮, 李金梅, 马文旭, 孙 梅

■背景资料
肠源性感染是儿科多脏器功能衰竭的重要致病因素. 双歧杆菌是肠黏膜屏障中生物屏障的主要成分, 目前对其抗菌机制的研究集中在产生有机酸, 产生过氧化氢, 产生类似细菌素的蛋白质, 对其确切的作用机制目前还不清楚.

王玮, 孙梅, 中国医科大学附属第二临床学院儿科 辽宁省沈阳市 110004
李金梅, 鸡西矿业集团总医院儿科 黑龙江省鸡西市 158100
马文旭, 大庆油田总医院儿科 黑龙江省大庆市 163001
通讯作者: 孙梅, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属第二临床学院儿科. sunm@cmu2h.com
电话: 024-83956503, 83955572
收稿日期: 2006-07-11 接受日期: 2006-08-18

Effect of bifidobacteria on the antioxidation in infant rats with endotoxin-induced injury

Wei Wang, Jin-Mei Li, Wen-Xu Ma, Mei Sun

Wei Wang, Mei Sun, Department of Pediatrics, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Jin-Mei Li, Department of Pediatrics, General Hospital of Jixi Mining Bureau, Jixi 158100, Heilongjiang Province, China
Wen-Xu Ma, Department of Pediatrics, Daqing Oilfield General Hospital, Daqing 163001, Heilongjiang Province, China
Correspondence to: Mei Sun, Department of Pediatrics, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. sunm@cmu2h.com
Received: 2006-07-11 Accepted: 2006-08-18

Abstract

AIM: To investigate the changes of superoxide dismutase (SOD) during the endotoxin-induced injuries in infant rats and the protective effect of bifidobacteria.

METHODS: A total of 160 rats were randomly and averagely divided into group C, E, Tc and and T. The rats in group E were intraperitoneally injected with lipopolysaccharide (LPS), and those in group T were intragastrically administrated with bifidobacteria suspension 7 d in advance. Meanwhile, the rats in group C were intraperitoneally injected with normal saline and those in group Tc were intragastrically administrated with normal saline 7 d before intraperitoneal injection of LPS. The tissue injuries of the ileum were observed under naked eyes and light microscope, and the serum and tissue SOD activity were detected at different time points.

RESULTS: The rats in group T had milder symptoms such as cachexia, anorexia, abdominal distention, diarrhea, intestinal congestion and edem, and distension of the intestine than those in group E. Light microscopy showed that the damaged intestinal villi were repaired in advance after hematoxylin and eosin staining. The serum SOD activity in group T was significantly higher than that in group E at 6, 12 and 24 h (2158.10 ± 219.04, 2295.96 ± 247.38, 2416.48 ± 197.21 *vs* 1644.66 ± 240.38, 2016.40 ± 147.03, 2108.42 ± 225.55; all $P < 0.05$). The tissue SOD activity in the ileum of group T was marked higher than that of group E at 6 and 12 h (7604.69 ± 662.80, 7573.85 ± 780.66 *vs* 6805.36 ± 741.98, 6723.51 ± 614.62; both $P < 0.05$).

CONCLUSION: Bifidobacteria can lessen the endotoxin-induced injuries of the ileum in infant rats, and the mechanism may be associated with the increase of SOD activity at well as the inhibition of lipid peroxidation.

Key Words: Bifidobacteria; Lipopolysaccharide; Antioxidation; Superoxide dismutase; Infant rat

Wang W, Li JM, Ma WX, Sun M. Effect of bifidobacteria on the antioxidation in infant rats with endotoxin-induced injury. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(29):2844-2848

摘要

目的: 探讨内毒素损伤时幼年大鼠体内超氧化物歧化酶(SOD)的变化及双歧杆菌的保护作用.

方法: ip内毒素制造内毒素损伤动物模型(模型组, E组), 治疗组(T组)提前7 d给予双歧杆菌灌胃, 同时设对照组(C组, ip生理盐水)和治疗对照组(Tc组, ip内毒素同时提前7 d给予生理盐水灌胃), 于不同时间点处死后观察大体及光镜下肠组织损伤变化, 同时检测血清和肠组织中SOD的活性.

结果: 双歧杆菌治疗组大鼠萎靡、食欲差、腹胀、腹泻、肠组织的充血水肿及肠管扩张

情况均比模型组轻, HE染色光镜下可见肠绒毛损伤修复时间提前. 治疗组血清SOD活性6 h(2158.10±219.04), 12 h(2295.96±247.38)和24 h(2416.48±197.21)比模型组高(1644.66±240.38, 2016.40±147.03, 2108.42±225.55, $P<0.05$); 治疗组回肠组织SOD活性6 h(7604.69±662.80), 12 h(7573.85±780.66)比模型组高(6805.36±741.98, 6723.51±614.62, $P<0.05$).

结论: 双歧杆菌能减轻由内毒素损伤引起的幼年大鼠的肠组织改变, SOD活性增高进而抑制脂质过氧化损伤可能是其作用机制之一.

关键词: 双歧杆菌; 内毒素; 抗氧化作用; 超氧化物歧化酶; 幼年大鼠

王玮, 李金梅, 马文旭, 孙梅. 双歧杆菌对内毒素损伤幼年大鼠抗氧化作用的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(29):2844-2848
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2844.asp

0 引言

双歧杆菌是人体主要的益生菌之一, 参与了宿主的消化、营养、代谢、吸收、免疫及抗感染过程, 尤其在维持机体肠黏膜屏障的完整性方面起重要作用[1-2]. 我们通过研究双歧杆菌对内毒素损伤幼鼠的抗氧化作用探讨其对肠道的保护机制.

1 材料和方法

1.1 材料 双歧杆菌为婴儿双歧杆菌(*Bifidobacterium infantis*), 菌种编号KLDS 2.0002, 购自乳品科学教育部重点实验室(KLDS)-东北农业大学; 大肠杆菌精制内毒素(lipopolysaccharide, LPS, *Escherichia coli* O_{55}: B_5脂多糖, Sigma公司); 考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒和超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒购自南京建成生物工程研究所; Wistar大鼠由哈尔滨医科大学附属二院实验动物中心提供.

1.2 方法

1.2.1 内毒素损伤动物模型制作 健康18日龄Wistar大鼠160只, 平均体质量31.16±6.38 g, 雌雄不限, 进食鼠乳. 除对照组40只外均ip LPS 5 mg/kg[3-5], 配比浓度为5 mg/L, 用生理盐水溶解. 注射后仍送回母鼠笼内哺喂鼠乳.

1.2.2 实验分组 实验动物随机分为4组, 每组40只. 对照组(C组)ip生理盐水1 mL/kg, 模型组(E组)ip LPS(5 mg/kg, 5 mg/L); 治疗组(T组)提前1 wk给予双歧杆菌混悬液(2.0×10^{12} cfu/L, 由乳品科学教育部重点实验室提供)灌胃, 每次0.5 mL, 每日2次, 直至实验结束[6-8]; 治疗对照组(Tc组)提前1 wk给予生理盐水灌胃, 每次0.5 mL, 每日2次, 直至实验结束. 分别于注射LPS或生理盐水后2, 6, 12, 24, 72 h断头处死动物, 留取血清和回肠组织(表1).

表 1 实验动物分组及处理因素

分组	ip	灌胃
C组	生理盐水	
E组	内毒素(LPS)	
T组	内毒素(LPS)	双歧杆菌
Tc组	内毒素(LPS)	生理盐水

1.2.3 观察指标及测定方法 各组动物于各时间点断头处死后, 取血, 3500 r/min离心15 min, 取上清-20℃保存. 距回盲部2-3 cm处留取0.5-1 cm回肠, 置于0.1 mol/L PBS配置的40 g/L多聚甲醛溶液中固定, 常规石蜡包埋, 切片, 常规苏木精-伊红(HE)染色, 观察形态学变化; 距回盲部3-4 cm处留取2-3 cm回肠, 冰生理盐水冲洗肠腔内容物后, 滤纸吸干水分, 称质量, 用生理盐水制成10 g/L匀浆, 3000 r/min离心10 min, 留上清-20℃保存. 血清和回肠组织SOD活性采用黄嘌呤氧化酶法, 回肠组织匀浆蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝染色法, 具体操作严格按照试剂盒说明进行.

统计学处理 采用SPSS 10.0统计软件, 计量资料结果以mean±SD表示, 组间比较采用t检验法, $P<0.05$提示差异有显著性意义.

2 结果

2.1 动物模型临床表现 C组幼鼠反应及活动如常; E组及Tc组注射LPS后出现懒动、萎靡、食欲差, 1-2 h出现腹胀、腹泻, 6-12 h时上述症状加重, 同时出现呼吸促, 口唇青紫, 少动, 体毛凌乱、少光泽, 24 h时上述症状部分缓解, 72 h基本恢复正常; T组症状较模型组轻, 且恢复快.

2.2 大体及组织学表现 C组肠管有光泽, 颜色正常; E组及Tc组大体见胃滞留, 肠壁及肠系膜血管充血, 肠管扩张, 肠腔渗出物增多, 严重者见肠壁点、片状出血, 以6 h组表现明显; T组大体所见较以上表现减轻. HE染色光镜下C组肠绒毛完整, E组及Tc组2 h无明显异常, 6 h肠绒毛腺体脱落、缺失, 纹状缘变薄或缺失, 肠绒毛高矮

■相关报道
体外实验证明, 双歧杆菌可刺激肠上皮细胞产生β-防御素-2; 亦有研究表明双歧杆菌能维持肠黏膜上皮细胞增殖与凋亡的平衡; 还有研究证实双歧杆菌可增加脑组织的SOD活性.

■应用要点
双歧杆菌目前多用于腹泻和肠菌群失衡的治疗. 本研究结果表明双歧杆菌可做为肠源性感染及多器官功能衰竭的辅助治疗.

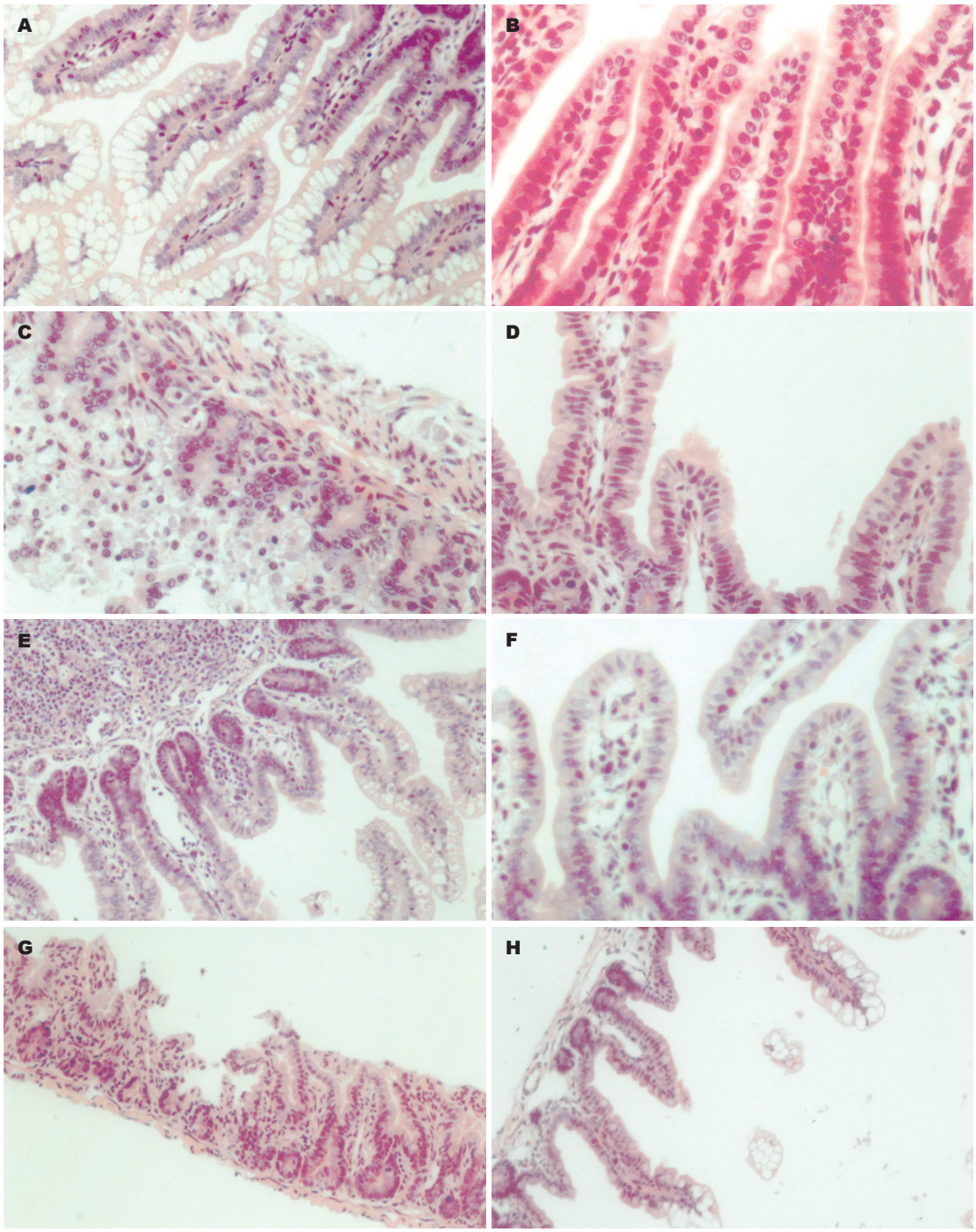


图 1 各组大鼠不同时间点组织学改变. A: C组(×200); B: E组72 h(×400); C: E组6 h(×400); D: T组6 h(×400); E: E组12 h(×200); F: T组12 h(×400); G: E组24 h(×200); H: T组24 h(×200).

不一, 密度减低, 固有层毛细血管充血, 炎细胞浸润, 12 h部分肠绒毛上皮细胞开始修复, 24 h修复明显, 72 h基本正常; T组6 h可见肠绒毛上皮细胞有修复, 部分肠管杯状细胞分泌亢进, 12 h修复明显, 24 h基本正常, 72 h修复完全或正常(图1).

2.3 血清SOD检测结果 E组SOD活性在6, 12, 24 h与C组比较有显著降低($P<0.05$), T组SOD活性在2, 6, 12, 24 h与E组比较有显著升高($P<0.05$), Tc组SOD活性在2, 6, 12, 24 h与T组比较有显著降低($P<0.05$), Tc组与E组在各个时间点均无显著性差异(表2).

2.4 肠组织SOD检测结果 E组肠组织SOD活性在6, 12, 24 h与C组比较有显著降低($P<0.05$), T组SOD活性在6, 12 h与E组比较有显著升高($P<0.05$), Tc组SOD活性在6, 12, 24 h与T组比较有显著降低($P<0.05$), Tc组与E组在各个时间点均无显著性差异(表3).

表 2 各组大鼠不同时间点血清SOD活性(mean ± SD, nkat/mL)

分组	2 h	6 h	12 h	24 h	72 h
C组	2080.2 ± 138.7	2208.9 ± 157.5	2386.8 ± 177.0	2387.6 ± 221.5	2385.1 ± 176.7
E组	2087.8 ± 109.2	1644.7 ± 240.4[a]	2016.4 ± 147.0[a]	2108.4 ± 225.6[a]	2412.0 ± 218.9
T组	2263.6 ± 144.2[c]	2158.1 ± 219.0[c]	2296.0 ± 247.4[c]	2416.5 ± 197.2[c]	2382.8 ± 209.4
Tc组	2011.2 ± 181.9[e]	1815.2 ± 273.4[e]	1898.7 ± 199.7[e]	1901.0 ± 197.2[e]	2340.3 ± 331.6

[a]P<0.05 *vs* C组; [c]P<0.05 *vs* E组; [e]P<0.05 *vs* T组.

表 3 各组大鼠不同时间点肠组织SOD活性(mean ± SD, nkat/mgprot)

分组	2 h	6 h	12 h	24 h	72 h
C组	8180.6 ± 494.1	8251.5 ± 399.4	8287.2 ± 664.5	8400.8 ± 578.1	8239.6 ± 690.1
E组	8040.8 ± 584.0	6805.4 ± 742.0[a]	6723.5 ± 614.6[a]	7226.6 ± 878.0[a]	8146.6 ± 582.3
T组	8212.3 ± 507.9	7604.7 ± 662.8[c]	7573.8 ± 780.7[c]	7518.2 ± 605.3	8174.0 ± 477.4
Tc组	7803.4 ± 476.3	6771.2 ± 323.4[e]	6888.5 ± 402.6[e]	6953.7 ± 345.7[e]	8314.7 ± 628.3

[a]P<0.05 *vs* C组; [c]P<0.05 *vs* E组; [e]P<0.05 *vs* T组.

■**同行评价**

本文针对研究热点, 设计合理, 研究方法得当, 结果真实可靠, 统计详实, 讨论分析逻辑性强, 文献引用详尽, 紧跟研究前沿, 实事求是. 但讨论的深度有待进一步提高.

3 讨论

胃肠功能障碍在多器官功能衰竭的发展进程中起重要作用, 而肠黏膜屏障功能损伤是胃肠功能障碍发生的主要机制之一, 双歧杆菌是肠黏膜屏障中生物屏障的主要成分, 是人体主要的益生菌之一, 参与了宿主的消化、营养、代谢、吸收、免疫及抗感染过程, 尤其在维持机体肠黏膜屏障的完整性方面起重要作用. 消化道为人体最大的细菌库, 危重患者因禁食、使用制酸剂及抗生素等因素, 可破坏肠道内微生态稳定性, 由此引起的肠道菌群失调已成为细菌移位及肠源性感染的最主要原因[9]. 体外研究中, RT-PCR和Northern杂交证明双歧杆菌可刺激人肠腺上皮细胞β-防御素-2基因的表达, 并初步确定双歧杆菌胞壁及胞壁蛋白是其主要的活性成分[10]. 双歧杆菌分泌型黏附素能抑制LPS和H_2O_2对肠上皮的损害作用, 有效维持肠黏膜上皮细胞增殖与凋亡的平衡, 从而保持肠黏膜屏障功能的完整性[11]. 外源性双歧杆菌在肠道定植, 能拮抗潜在致病菌的过度增殖, 减少细菌和内毒素移位, 并能利用肠道谷氨酸合成谷氨酰胺, 有利于肠损伤的恢复[8]. 双歧杆菌作为肠黏膜的主要生物屏障, 目前对其抗菌机制的研究主要为以下3个方面: (1)产生有机酸, 能显著降低环境中的pH值, 使不耐酸的腐败菌和致病菌的生长繁殖受到抑制; (2)产生类似细菌素的蛋白质, 有一定的杀菌作用; (3)产生H_2O_2, 从而激活机体产生过氧化氢酶, 抑制和杀灭革兰阴性菌[12]. 生理情况下, 机体内自由基的生成与清除处于一种动态平衡中, 但在感染、创伤等病理状态下, 体内自由基生成增多[13], 从而引发强烈的脂质过氧化反应, 形成的脂质过氧化物损伤细胞膜, 造成细胞的损伤. SOD是体内重要的抗氧化酶, 与超氧阴离子(O_2^-)反应生成过氧化氢, 在酶促作用下转变成水, 因而可以清除体内的自由基, 保护细胞免受损伤. 有研究报道, 双歧杆菌表面分子脂磷壁酸(LTA)能明显增强衰老小鼠的脑组织SOD活性, 提高脑组织对自由基的清除能力, 阻断自由基的组织细胞损伤[14].

本研究表明, ip LPS可以使幼年大鼠血清SOD下降, 以6, 12, 24 h明显(P<0.05), 回肠组织匀浆SOD下降, 以6, 12, 24 h明显(P<0.05), 提前1 wk给予双歧杆菌混悬液灌胃, 可以减轻血清2, 6, 12, 24 h和回肠组织6, 12 h的SOD下降, 增加SOD活性, 抑制自由基的脂质过氧化反应, 保护肠道或促进肠损伤恢复. 双歧杆菌含有SOD, 而且经过长期驯化的兼性厌氧双歧杆菌SOD活性比初代分离的活性高[15], 本研究应用的双歧杆菌属于驯化后的兼性厌氧菌, 其自身含有SOD, 故灌服双歧杆菌引起的内毒素损伤幼鼠血清和回肠SOD增加是外源性还是内源性的机制还有待于进一步研究.

4 参考文献

1 Alvarez-Olmos MI, Oberhelman RA. Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. *Clin Infect Dis*

2001; 32: 1567-1576
2 吴承堂, 黄祥成, 齐德林, 黎沾良. 急性坏死性胰腺炎早期内毒素血症及其防治. 第一军医大学学报 1999; 19: 402-404
3 Lee IK, Lee YM, Song IS, Chung SJ, Kim SG, Lee MG, Shim CK. Hepatobiliary excretion of tributylmethylamonium in rats with lipopolysaccharide-induced acute inflammation. *Arch Pharm Res* 2002; 25: 969-972
4 Gitomer WL, Miller BC, Cottam GL. In vivo effects of lipopolysaccharide on hepatic free-NAD(P)(+)-linked redox states and cytosolic phosphorylation potential in 48-hour-fasted rats. *Metabolism* 1995; 44: 1170-1174
5 李军, 赵亚娟, 孙梅, 潘莉莉, 高红. 肠三叶因子对内毒素诱导幼鼠肠组织NO和MDA的作用. 世界华人消化杂志 2006; 14: 63-67
6 Choi SS, Kang BY, Chung MJ, Kim SD, Park SH, Kim JS, Kang CY, Ha NJ. Safety assessment of potential lactic acid bacteria Bifidobacterium longum SPM1205 isolated from healthy Koreans. *J Microbiol* 2005; 43: 493-498
7 Eizaguirre I, Urkia NG, Asensio AB, Zubillaga I, Zubillaga P, Vidales C, Garcia-Arenzana JM, Aldazabal P. Probiotic supplementation reduces the risk of bacterial translocation in experimental short bowel syndrome. *J Pediatr Surg* 2002; 37: 699-702
8 Caplan MS, Miller-Catchpole R, Kaup S, Russell T, Lickerman M, Amer M, Xiao Y, Thomson R Jr. Bifidobacterial supplementation reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Gastroenterology* 1999; 117: 577-583
9 Hadfield RJ, Sinclair DG, Houldsworth PE, Evans TW. Effects of enteral and parenteral nutrition on gut mucosal permeability in the critically ill. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1545-1548
10 王国兴, 冯云, 汪宇辉, 黄宁, 吴琦, 王伯瑶. 双歧杆菌胞壁蛋白诱导人肠腺上皮细胞β-防御素-2 mRNA的表达. 四川大学学报(医学版) 2003; 34: 622-624
11 钟世顺, 张振书, 王继德, 赖卓胜, 潘令嘉. 双歧杆菌黏附素对脂多糖和H_2O_2调节肠上皮细胞增殖和凋亡的影响. 第一军医大学学报 2004; 24: 264-267
12 梁冰, 吴力克, 姜峰, 付海波, 熊德鑫, 修淑丽. 双歧杆菌Q J405、乳杆菌Q J405在试管内对肠道致病菌抑杀效果的初步报告. 中国微生态学杂志 2000; 12: 269-271
13 Guegan C, Onteniente B, Makiura Y, Merad-Boudia M, Ceballos-Picot I, Sola B. Reduction of cortical infarction and impairment of apoptosis in NGF-transgenic mice subjected to permanent focal ischemia. *Brain Res Mol Brain Res* 1998; 55: 133-140
14 付玉荣, 王跃, 陈淑惠, 刘明方. 双歧杆菌脂磷壁酸对衰老小鼠脑组织自由基代谢和器官指数的影响. 中国老年学杂志 2004; 24: 1034-1035
15 熊德鑫. 部分正常菌群分离菌株的超氧化歧化酶活性的测定. 中国微生态学杂志 1993; 5: 44

电编 张敏 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

第六届西太平洋幽门螺旋杆菌会议通知

本刊讯 由泰国Chulalongkorn医院承办的第六届西太平洋幽门螺旋杆菌会议将于2006-11-12/14在泰国曼谷举行, 欢迎各国研究幽门螺旋杆菌的学者报名参加.

1 地址

General Secretariat, GI Unit, Department of Medicine, 1873 Prompun Building 1st Floor. Chulalongkorn Hospital, Rama 4 Road, Patumwan, Bangkok 10330 Thailand

2 联系方式

电话: +662-256-4265; 传真: +662-253-8272, +662-652-4219; Email: wphc_2006@mail.com; 网址: www.6wphc2006.com; 联系人: Dr. Duangporn Thong-Ngam

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年10月18日; 14(29): 2849-2853
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

*H pylori*相关性胃溃疡、胃癌组织中VEGF和NF-κB的表达及意义

袁禧先, 王凤荣, 薛鸿鹏, 姜 威

袁禧先, 王凤荣, 姜威, 佳木斯大学附属第一医院消化科 黑龙江省佳木斯市 154002
薛鸿鹏, 黑龙江省医院 黑龙江省哈尔滨市 150086
袁禧先, 1987年佳木斯医学院硕士, 主任医师、教授, 硕士生导师, 主要从事胃肠道肿瘤的免疫组化研究和胃肠道微生态研究.
黑龙江省教育厅资金资助项目, No. 10541233
通讯作者: 袁禧先, 154002, 黑龙江省佳木斯市, 佳木斯大学附属第一医院消化科. yuanxx8862@163.com
收稿日期: 2006-06-28 接受日期: 2006-08-10

Expression of vascular endothelial growth factor and nuclear factor kappa B and their significances in *Helicobacter pylori*-associated gastric ulcer and gastric cancer

Xi-Xian Yuan, Feng-Rong Wang, Hong-Peng Xue, Wei Jiang

Xi-Xian Yuan, Feng-Rong Wang, Wei Jiang, Department of Digestive Diseases, the First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154002, Heilongjiang Province, China
Hong-Peng Xue, Heilongjiang Provincial Hospital, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Supported by the Fund from Education Bureau of Heilongjiang Province, China, No. 10541233
Correspondence to: Dr. Xi-Xian Yuan, Department of Digestive Diseases, the First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154002, Heilongjiang Province, China. yuanxx8862@163.com
Received: 2006-06-28 Accepted: 2006-08-10

Abstract

AIM: To probe the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), nuclear factor kappa B (NF-κB) in *H pylori*-associated gastric ulcer (GU) and gastric cancer (GC) tissues and their correlations, and further investigate the mechanism of *H pylori*-induced GU and GC.

METHODS: SABC immunohistochemical technique was used to detect the expression of *H pylori*, VEGF, and NF-κB in pathological samples of GU (n = 36) and GC (n = 52).

RESULTS: The incidence rate of GU existed significant difference between *H pylori* positive and negative group (78% *vs* 22%, $P < 0.05$). The expression of VEGF or NF-κB in *H pylori* positive GU tissues was markedly higher than that in *H pylori* negative ones (53.6% *vs* 12.5%, $P < 0.05$; 39.3% *vs* 0, $P < 0.05$). The expression of VEGF or NF-κB in *H pylori* positive GC tissues was notably higher than that in *H pylori* negative ones (84% *vs* 40.7%, $P < 0.05$; 80% *vs* 48.1%, $P < 0.05$). There existed significant correlations between the expression of NF-κB and VEGF in GC and GU tissues (r = 0.997, $P < 0.05$).

CONCLUSION: *H pylori* infection is closely related to the expression of VEGF and NF-κB in GU and GC. *H pylori* infection may be the initiating factor, and the activation of NF-κB may be the key event in the pathogenesis of GU and GC. *H pylori* infection, NF-κB activation, and VEGF expression play synergic roles in the occurrence of GU and GC.

Key Words: Gastric ulcer; Gastric cancer; *Helicobacter pylori*; Vascular endothelial growth factor; Nuclear factor kappa B

Yuan XX, Wang FR, Xue HP, Jiang W. Expression of vascular endothelial growth factor and nuclear factor kappa B and their significances in *Helicobacter pylori*-associated gastric ulcer and gastric cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(29):2849-2853

摘要

目的: 探讨*H pylori*相关性胃溃疡、胃癌组织中VEGF, NF-κB的表达及三者的相互关系, 进一步了解*H pylori*致胃溃疡、胃癌的发病机制.

方法: 选择胃镜室及外科手术切除的36例胃溃疡和52例胃癌病理标本, 应用免疫组化SABC法, 检测*H pylori*, VEGF及NF-κB的表达.

结果: *H pylori*(+)组胃溃疡发病率与*H pylori*(-)组比较差别有显著性(78% *vs* 22%, $P<0.05$), 36例胃溃疡组织中*H pylori*(+)组VEGF, NF-κB表达明显高于*H pylori*(-)组(53.6% *vs* 12.5%,

■背景资料
胃溃疡(GU)是内科常见病, 胃癌(GC)是人类常见的恶性肿瘤, 两者的发病机制一直未完全明确. 幽门螺杆菌(*H pylori*)是两者的常见病因, 血管内皮生长因子(VEGF)、核转录因子-κB(NF-κB)与GU, GC发病密切相关, 故研究*H pylori*相关性GU, GC组织中VEGF, NF-κB的表达, 对明确GU, GC的发病机制有意义.

■研发前沿
H pylori, VEGF, NF-κB在胃溃疡、胃癌组织中的表达及意义已有报道, 但结论均来自体外实验, 并且为单因素研究居多. 今后的重点是积极开展体内实验, 进一步明确VEGF, NF-κB在胃溃疡、胃癌组织中的异常表达状态, 以及多因素相关性的研究.

P<0.05; 39.3% *vs* 0, *P*<0.05); 52例胃癌组织中*H pylori*(+)组VEGF, NF-κB表达明显高于*H pylori*(-)组(84% *vs* 40.7%, *P*<0.05; 80% *vs* 48.1%, *P*<0.05); NF-κB与VEGF在胃溃疡、胃癌组织中的表达具有相关性($r = 0.997$, *P*<0.05).

结论: 胃溃疡、胃癌组织中NF-κB, VEGF的表达与*H pylori*感染相关, 其中*H pylori*感染为初始因素, 而*H pylori*对NF-κB的激活, 则可能是胃溃疡、胃癌发病的关键步骤, 三者的协同作用导致胃溃疡、胃癌的发病.

关键词: 幽门螺杆菌; 胃溃疡; 胃癌; 血管内皮生长因子; 核转录因子κB

袁禧先, 王凤荣, 薛鸿鹏, 姜威. *H pylori*相关性胃溃疡、胃癌组织中VEGF和NF-κB的表达及意义. 世界华人消化杂志 2006;14(29):2849-2853
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2849.asp

0 引言

胃溃疡(GU)是内科常见病, 胃癌(GC)是人类常见的恶性肿瘤, 居全球肿瘤发病和癌症死亡率的第二位, 我国是世界人口最多的国家, GU, GC的发病率又明显高于世界平均水平, 所以GU, GC的发病机制研究尤为重要. 目前已经明确幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)感染是GU和GC的最常见病因. 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种高度特异的血管内皮细胞有丝分裂素, 他促进血管内皮细胞增殖、血管生成, 增加血管通透性, 有胃黏膜保护作用和促溃疡愈合作用, 同时, GC的生长、转移和预后与VEGF和血管生成有密切的关系[1]. 核转录因子(nuclear factor kappa B, NF-κB)是一种调控多种基因表达的重要转录因子, *H pylori*作为胃黏膜最常见和最重要的感染因素, 可以活化NF-κB, 改变多种细胞因子表达, 引起局部炎症反应, 从而参与胃部炎症的发生和发展, 并与GC形成、浸润转移等有关[2]. 近年*H pylori*, VEGF, NF-κB与GU, GC的关系分别有相关报道证实, 但*H pylori*相关性GU, GC组织中VEGF, NF-κB的表达及3者的相互关系尚未见报道. 本研究通过免疫组化SABC法检测GU 36例、GC 52例组织中*H pylori*, VEGF, NF-κB的表达, 探讨3者在GU, GC发病过程中的作用, 进一步了解*H pylori*致GU, GC的发病机制.

1 材料和方法

1.1 材料 2003-11/2005-10佳木斯大学附属第一医院胃镜室及外科手术切除的GU, GC病理标本共88例, 其中GU 36例, 男20例, 女16例, 年龄21-76(平均50.2)岁; GC 52例, 男43例, 女9例, 年龄34-81(平均61.9)岁. 所有病例胃镜检查前或手术前无抗溃疡治疗和化疗、放疗史. 所有检测的病理标本按有无*H pylori*表达分为阳性组和阴性组.

1.2 方法

1.2.1 标本处理及阳性判定 取GU, GC病理组织置入固定液(40 g/L中性甲醛)中固定3 h后取出, 依次脱水、透明、浸蜡及包埋, 制成5 μm切片, 免疫组织化学染色玻片经poly-Lysine处理, *H pylori*, VEGF, NF-κB用免疫组化SABC法染色(所需试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司), 染色结果显示, 棕黄色颗粒者为阳性. *H pylori*阳性部位胃小凹上皮表面, VEGF阳性部位细胞质为主, NF-κB阳性部位细胞核为主.

1.2.2 阳性标准判定 *H pylori*: 切片中高倍视野见到淡黄、棕黄或棕褐色染色颗粒为阳性; VEGF, NF-κB: 每张切片随机选取5个高倍视野进行结果判定, 按染色强度计分(无色: 0分; 淡黄色: 1分; 棕黄色: 2分; 棕褐色: 3分)和阳性细胞百分比计分(<5%: 0分; 5%-25%: 1分; 26%-50%: 2分; >50%: 3分)的乘积判定为: (-): 0分; (+): 1-3分; (++): 4-5分; (+++): ≥6分.

统计学处理 应用SPSS 10.0统计软件进行统计学处理, 采用χ^2检验和Spearman等级相关性分析. 检验水准$\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 *H pylori*在GU, GC组织中的检测结果 88例病理组织*H pylori*检测结果中(表1), 可见GU *H pylori*(+)组发病率78%(28/36)与*H pylori*(-)组发病率22%(8/36)比较差别有显著性(*P*<0.05); *H pylori*(+)组GU, GC总体发病率为60.2%(53/88), *H pylori*(-)组为39.8%(35/88), 说明*H pylori*感染与GU, GC发病相关.

2.2 *H pylori*, VEGF, NF-κB 3者在GU组织中的表达结果 36例GU标本中*H pylori*(+)组的VEGF(53.6%), NF-κB(39.3%)的表达明显高于*H pylori*(-)组(12.5%, 0%)(*P*<0.05, 表2).

2.3 *H pylori*, NF-κB, VEGF 3者在GC组织中的表达结果 52例GC组织中*H pylori*(+)组VEGF表达(84%)明显高于*H pylori*(-)组(40.7%); NF-κB表达(80%)明显高于*H pylori*(-)组(48.1%)(表3).

2.4 VEGF, NF-κB在GU, GC组织中表达的相关

表 1 *H pylori*在GU, GC组织中的检测结果

	GU (*n*)	百分率 (%)	GC (*n*)	百分率 (%)	总发病率 (%)
H pylori(+)	28[a]	78[a]	25	48	60.2
H pylori(−)	8	22	27	52	39.8

[a]$P<0.05$ *vs H pylori*(−)组.

表 2 *H pylori*与GU组织中VEGF, NF-κB的表达关系

	VEGF (*n*)				百分率(%)	NF-κB (*n*)				百分率(%)
	−	+	++	+++		−	+	++	+++	
H pylori(+)	13	13	2	0	53.6[a]	17	10	1	0	39.3[a]
H pylori(−)	7	1	0	0	12.5	8	0	0	0	0

[a]$P<0.05$ *vs H pylori*(−)组.

性结果 NF-κB与VEGF在GU, GC组织中的表达具有相关性(表4).

3 讨论

1983年Warren和Marshall首次报道从人胃黏膜中培养出*H pylori*, 并注意到这一细菌与胃炎[3]和消化性溃疡相关[4]. 经过几十年的大量研究, 现已清楚, *H pylori*感染后通过各种机制影响胃酸和胃泌素的生理学[5-9]. *H pylori*毒力因子空泡毒素(VacA)蛋白和细胞毒素相关基因(CagA)蛋白及诱导的炎症反应、免疫反应破坏胃黏膜组织上皮结构[10], 导致损害黏膜侵袭因素与黏膜自身的防御因素之间失去平衡, 最终导致胃炎和消化性溃疡的发生、发展. 许多研究都表明, *H pylori*感染与GC的发生有明确的关系[11-12], 但*H pylori*致GC的确切机制不明. 本实验结果显示, *H pylori*感染与GU, GC的发病密切相关, GU组中*H pylori*阳性率为78%, 与有关文献报道一致, GC组*H pylori*阳性率48%, 阳性率较低, 与一部分报道一致[13], 可能的原因为GC后*H pylori*的生存场地胃上皮小凹大量被萎缩的黏膜和肠腺化生所替代, 导致*H pylori*不宜被查到[14]. *H pylori*致GC是一个复杂的过程, 从人类*H pylori*感染率较高(约占正常人群的一半)但最终发生、发展为GC极少的相关结果分析, *H pylori*感染后导致GU, GC还有其他因素. 所以研究者们已从*H pylori*本身的致病因素研究发展到从细菌(*H pylori*)-环境-宿主3方面及其相互作用中寻找答案.

VEGF是1989年Leung *et al*[15]从牛垂体滤泡星状细胞的体外培养液中首先纯化出来并命名

表 3 *H pylori*与GC组织中VEGF, NF-κB的表达关系

	VEGF (*n*)				百分率(%)	NF-κB (*n*)				百分率(%)
	−	+	++	+++		−	+	++	+++	
H pylori(+)	4	9	10	2	84[a]	5	9	7	4	80[a]
H pylori(−)	16	5	6	0	40.7	14	7	5	1	48.1

[a]$P<0.05$ *vs H pylori*(−)组.

表 4 NF-κB, VEGF在GU, GC组织中表达的相关性 (*n*)

NF-κB	VEGF(GU)				VEGF(GC)			
	−	+	++	+++	−	+	++	+++
−	15	9	1	0	12	6	1	0
+	8	2	0	0	5	5	6	0
++	0	0	1	0	3	3	6	0
+++	0	0	0	0	0	2	1	2
相关性	$\gamma = 0.997$ $P = 0.003$				$\gamma = 0.981$ $P = 0.019$			

的, VEGF能通过其受体特异性作用于血管内皮细胞, 促进其增殖, 新生血管形成, 增加血管通透性的作用, 现已证实VEGF是唯一对血管形成具有特异性的重要生长因子. 有研究表明, VEGF表达增强的肿瘤患者多有血管、淋巴结侵犯和肝脏等脏器转移, 是一种有效的促进肿瘤血管生长的介质[16]. 所以VEGF是评价肿瘤患者状况和预后不良的重要因素. 本实验表明, *H pylori*感染与VEGF共同促进GU, GC发病, VEGF在GC组织中的高表达, 在*H pylori*(+)组更加明显, 但VEGF在GC和GU发病中的作用不同. 有研究证实, 长期持续的*H pylori*感染的刺激, 可上调VEGF的表达, 诱导GC组织中的新生血管形成, 促进GC的发生[17]. 而VEGF在GU的发病中则起到积极的促溃疡愈合作用, 其机制为通过增加微血管通透性稀释胃内有害物质, 保护胃黏膜和通过刺激腺体和血管生成促进溃疡愈合[18]. 所以, 我们推测, *H pylori*与VEGF在GU发病中的双重性, 可能存在于溃疡的不同时段, 即早期*H pylori*感染阶段VEGF上调不明显甚至被抑制, 溃疡形成后, 由于机体复杂的自我保护调节, VEGF可能反馈升高, 以利愈合溃疡, 也可能是不同结构的*H pylori*其生物学特点不同.

NF-κB是在1986年由Sen和Baltimore[19]首先报道的. 他们发现B细胞核提取物中有一种蛋白, 能与免疫球蛋白κ轻链基因增强子κB序列特异结合, 促进了κ轻链的表达, 称其为NF-κB. 后来发现, 许多组织细胞中的蛋白质基因的启

■相关报道

国外研究已证实, *H pylori*阳性者的胃黏膜上皮细胞中NF-κB表达程度明显高于*H pylori*阴性者. 体外实验显示, 将*H pylori*和胃癌细胞一起培养可激活NF-κB, 而*H pylori*可分别使胃癌MKN45细胞、KATOⅢ细胞、TMK_1细胞中NF-κB活性提高5.2倍、6.9倍、3.4倍, 而且有完整CagPAI的菌株可使NF-κB激活, 而CagPAI部分或完全缺失的菌株则否, 提示*H pylori*的生物学特征与其致病性有关. 此外有研究表明, VEGF在GU的发病中则起到积极的促溃疡愈合作用, VEGF是评价肿瘤患者状况和预后不良的重要因素.

■应用要点

H pylori, VEGF, NF-κB三者的联合检测, 可以进一步明确*H pylori*致GU, GC的发病机制、NF-κB的活化机制、作用的靶基因等, 有利于全面规范评估胃癌的进展及预后, 为临床应用VEGF, NF-κB的激活剂和抑制剂提供基础资料, 对*H pylori*相关性疾病的防治提供新的途径.

动子和增强子部位均存在κB基序. 有研究[20]表明, *H pylori*相关性胃炎中NF-κB上调有关细胞因子或黏附分子表达, 参与胃炎发生和病情发展. 尤为重要的是, *H pylori*可使GC细胞中NF-κB呈持续活化状态, NF-κB通过调控各种靶基因, 如IL-8, COX-2, Bcl-2, uPA等的表达, 参与GC的发生、发展及转移. Handa *et al*[21]发现细胞因子诱导的中性粒细胞趋化因子-1(CINC-1)的启动子含有NF-κB结合位点, *H pylori*活化NF-κB并促使黏膜上皮细胞合成并释放CINC-1, 引起中性粒细胞趋化和聚集. NF-κB亦与细胞间黏附分子-1(ICAM-1)基因上转录调控区结合, 增加ICAM-1表达. NF-κB还可上调血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)和E-选择素(E-selectin)的表达, 参与中性粒细胞的浸润[22-23]. NF-κB可在转录水平调控TNF-α, IL-1b, IL-6, IL-8和COX-2等多种炎性因子, 上述化学因子吸引中性粒细胞、淋巴细胞、单核巨噬细胞等到达*H pylori*定植部位, 炎症细胞释放炎性介质, 最终破坏胃黏膜, 导致胃炎、胃溃疡的形成; 另外, NF-κB与GC的浸润和转移有关[24-25]. 本实验表明, GU和GC *H pylori*(+)组中VEGF, NF-κB表达与*H pylori*(-)组相比差别有显著性($P<0.05$), 表明VEGF, NF-κB对GU和GC的致病机制与*H pylori*感染有关. 而NF-κB与VEGF在GU和GC组织中的表达有相关性($r = 0.997$, $P<0.05$), 表明VEGF与NF-κB, *H pylori* 3者在GU, GC的发生、发展过程中具有协同作用. *H pylori*感染可能为初始因素(*H pylori*感染上调或抑制VEGF), 通过活化NF-κB导致一系列炎性细胞浸润和细胞因子释放, 最终破坏黏膜上皮形成GU. 同时NF-κB上调VEGF表达则有助于溃疡的愈合, 所以NF-κB在GU的发病中可能有双重性. 而进一步发展的NF-κB的抑制细胞凋亡作用, 再加上宿主的免疫功能缺陷和其他因素, 则可能是后期形成GC的机制.

联合检测*H pylori*, VEGF, NF-κB, 可以进一步明确NF-κB, VEGF在GU, GC组织中的异常表达与*H pylori*的关系, 以及NF-κB在GC中的活化机制、作用的靶基因, 从而明确*H pylori*致GU, GC的发病机制. 3者的联合检测将为GU, GC的诊断和治疗提供新的理论依据, 以及更全面、规范评估GC的进展情况和预后, 同时也为临床应用VEGF, NF-κB的激活剂和抑制剂提供基础资料, 这也将为GC的诊断、治疗和预防提供新的途径.

4 参考文献

1 陈贵, 谢岳林, 尹浩然. 血管内皮生长因子与胃癌. 国外医学・消化系疾病分册 2004; 24: 71-73

2 蒲泽锦, 吴灵飞. NF-κB与幽门螺杆菌相关性胃炎及胃癌. 国际消化病杂志 2006; 26: 46-48

3 Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983; 1: 1273-1275

4 Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1: 1311-1315

5 el-Omar EM, Penman ID, Ardill JE, Chittajallu RS, Howie C, McColl KE. *Helicobacter pylori* infection and abnormalities of acid secretion in patients with duodenal ulcer disease. *Gastroenterology* 1995; 109: 681-691

6 Peterson WL, Barnett CC, Evans DJ Jr, Feldman M, Carmody T, Richardson C, Walsh J, Graham DY. Acid secretion and serum gastrin in normal subjects and patients with duodenal ulcer: the role of *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 2038-2043

7 el-Omar E, Penman I, Dorrian CA, Ardill JE, McColl KE. Eradicating *Helicobacter pylori* infection lowers gastrin mediated acid secretion by two thirds in patients with duodenal ulcer. *Gut* 1993; 34: 1060-1065

8 Sumii M, Sumii K, Tari A, Kawaguchi H, Yamamoto G, Takehara Y, Fukino Y, Kamiyasu T, Hamada M, Tsuda T. Expression of antral gastrin and somatostatin mRNA in *Helicobacter pylori*-infected subjects. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 1515-1519

9 Graham DY, Lew GM, Lechago J. Antral G-cell and D-cell numbers in *Helicobacter pylori* infection: effect of *H. pylori* eradication. *Gastroenterology* 1993; 104: 1655-1660

10 Figura N. *Helicobacter pylori* exotoxins and gastroduodenal diseases associated with cytotoxic strain infection. *Aliment Pharmacol Ther* 1996; 10 Suppl 1: 79-96

11 Zhou L, Sung JJ, Lin S, Jin Z, Ding S, Huang X, Xia Z, Guo H, Liu J, Chao W. A five-year follow-up study on the pathological changes of gastric mucosa after *H. pylori* eradication. *Chin Med J (Engl)* 2003; 116: 11-14

12 Wong BC, Lam SK, Wong WM, Chen JS, Zheng TT, Feng RE, Lai KC, Hu WH, Yuen ST, Leung SY, Fong DY, Ho J, Ching CK, Chen JS. *Helicobacter pylori* eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 291: 187-194

13 杨占凤, 林万隆, 王晓燕, 王允野. Hp感染与胃炎性病变, 不典型增生及胃癌关系的研究. 中国实验诊断学 2004; 8: 373-375

14 Jung M, Kondratyev A, Lee SA, Dimtchev A, Dritschilo A. ATM gene product phosphorylates I kappa B-alpha. *Cancer Res* 1997; 57: 24-27

15 Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246: 1306-1309

16 何鹏, 金一, 马林. VEGF与肿瘤血管生成. 沈阳医学院学报 2000; 2: 190-193

17 佟书娟, 刘亚平, 尹清云. 幽门螺杆菌感染与胃癌中VEGF的表达及肿瘤血管形成的关系. 实用肿瘤学杂志 2005; 19: 161-163

18 温忠慧, 欧阳钦. Hp与良恶性疾病的关系. 国外医学・消化系疾病分册 2002; 20: 199

19 Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986; 47: 921-928
20 刘红, 孙秀菊, 孙开来. NF-κB与Hp感染及胃癌关系的研究进展. 国外医学遗传学分册 2004; 27: 102-104
21 Handa O, Naito Y, Takagi T, Shimozawa M, Kokura S, Yoshida N, Matsui H, Cepinskas G, Kvietys PR, Yoshikawa T. Tumor necrosis factor-alpha-induced cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1) production by rat gastric epithelial cells: role of reactive oxygen species and nuclear factor-kappaB. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 309: 670-676
22 Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001; 107: 7-11
23 Moese S, Selbach M, Meyer TF, Backert S. cag+ *Helicobacter pylori* induces homotypic aggregation of macrophage-like cells by up-regulation and recruitment of intracellular adhesion molecule 1 to the cell surface. *Infect Immun* 2002; 70: 4687-4691
24 Vasudevan KM, Gurumurthy S, Rangnekar VM. Suppression of PTEN expression by NF-kappa B prevents apoptosis. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 1007-1021
25 Lee KH, Bae SH, Lee JL, Hyun MS, Kim SH, Song SK, Kim HS. Relationship between urokinase-type plasminogen receptor, interleukin-8 gene expression and clinicopathological features in gastric cancer. *Oncology* 2004; 66: 210-217

■**同行评价**
本文立题有依据, 标本病理诊断确切, 免疫组化检测方法和观察标准规范, 统计学处理恰当, 结果可靠, 讨论观点比较明确.

电编 张敏 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

第十九届全国中西医结合消化会议征文通知

本刊讯 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会决定于2007-08下旬在石家庄市召开第十九届全国中西医结合消化学术交流会, 并同时举办全国中西医结合消化疾病诊治新进展学习班.

1 征文内容和要求

征文内容: (1)有关消化系统疾病包括食管、胃、肝、胰等诊疗、实验研究进展; (2)中西医结合对慢性肝炎(病)、肝纤维化临床诊治以及基础、实验研究; (3)中西医结合对消化系统肿瘤诊治经验与实验研究; (4)中西医结合对“淤血症”以及脾胃学说与脾虚证研究进展. 征文要求: 来稿请附800字论文摘要, 并附软盘或发电子邮件至211zyke@163.com或czs.xiaohua@163.com(尽量以电子邮件发送). 征文请于2007-06-30前邮寄.

2 学习班招收对象

学习班招收对象: 从事中西医结合、中医或西医消化专业医师以上人员. 参加学习班者授予国家继续教育学分12分；在大会有论文报告者另授继续教育学分6分.

3 联系方式

(1) 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路45号 解放军第211医院中医科(中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会), 邮编: 150080, 联系人: 李春雷, 贾云, 联系电话: 0451-57752440或86632450, 传真: 0451-86603878或0451-57752440; (2) 河北省石家庄和平西路215号河北医科大学附属第二医院, 邮编: 050000, 联系人: 姚希贤, 冯志杰, 联系电话: 0311-87222301或13333015658.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年10月18日; 14(29): 2860-2864
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床研究 CLINICAL RESEARCH

中药降肝隆联合抗病毒药长期治疗活动性肝炎肝硬变对其预后的影响

文 睿, 王 坚, 陈 敏, 严 明

■背景资料
活动性肝炎肝硬变(ALC)的临床特点是在病毒持续复制的基础上, 肝脏炎症的持续存在, 导致肝纤维的持续增生, 以致由代偿性ALC发展为失代偿性ALC. 中药治疗ALC有较好的保护肝脏、抗纤维化作用, 也有一定的抗病毒作用.

文睿, 王坚, 陈敏, 东南大学附属南京市第二医院中西医结合科 江苏省南京市 210003
严明, 江苏省中医院中医内科 江苏省南京市 210003
文睿, 副主任中医师, 中华中医药学会学感染病专业委员会常委, 江苏省中医药感染病专业委员会委员, 从事中西医结合感染病临床医疗工作24年, 目前主要从事各类肝病的临床治疗.
通讯作者: 文睿, 210003, 江苏省南京市, 东南大学附属南京市第二医院中西医结合科. wenrui_51@qq.com
电话: 025-83607891
收稿日期: 2006-07-20 接受日期: 2006-08-10

Chinese medicine Jiangganlong combined with anti-virus medicine in long-term treatment of active liver cirrhosis and its effect on prognosis of patients

Rui Wen, Jian Wang, Min Chen, Ming Yan

Rui Wen, Jian Wang, Min Chen, Department of Integrated Chinese Medicine and Western Medicine, the Affiliated Nanjing Second Hospital of Southeast University, Nanjing 210003, Jiangsu Province, China
Ming Yan, Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210003, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Rui Wen, Department of Integrated Chinese Medicine and Western Medicine, the Affiliated Nanjing Second Hospital of Southeast University, Nanjing 210003, Jiangsu Province, China. wenrui_51@qq.com
Received: 2006-07-20 Accepted: 2006-08-10

Abstract

AIM: To study the efficacy of Chinese medicine Jiangganlong combined with anti-virus medicine in the treatment of active liver cirrhosis (ALC).

METHODS: A total of 114 ALC patients were divided into treatment group and control group, named A and B, respectively. The patients in group A were treated with Jiangganlong and lamivudine (LAM). Jiangganlong decoction or pills were given a dose every three days, or 4.0 g (tid). LAM was administered 0.1 g per day. After the emergence of YMDD variations, adefovir (ADV) was added. LAM was stopped when HBV DNA YMDD variation became negative. The patients in group B received general and symptomatic treatment. The mean treatment therapeutic time was 36 months.

RESULTS: The rates of negative conversion for the serum HBV DNA were 75.4% (43/57) and 3.5% (2/57) in group A and B, respectively, and there was significant difference between them ($P < 0.01$). The cumulative rate of YMDD variations among patients of group A was 40.4% (23/57). After the emergence of YMDD variations, 20 patients received ADV treatment, 90% (18/20) of which were found YMDD variation-negative; there were 3 patients who did not receive ADV treatment, and they died of liver failure. The negative conversion rates of HBeAg were 44.4% (16/36), 16.7% (5/30) in group A, B, respectively, and there was marked difference between them ($P < 0.05$). The total bilirubin (TBIL) and alanine aminotransferase (ALT) returned to the normal level, and the albumin level, Child-Pugh score, and decompensation status were improved in group A. The rate of complications was dramatically lower in group A than that in group B [14.0% (8/57) *vs* 50.8% (29/57), $P < 0.01$]. The mortality rate was also decreased in group A as compared with that in group B [7.0% (4/57) *vs* 29.8% (17/57), $P < 0.01$], while the survival time was notably prolonged (3.3 ± 2.1 a *vs* 1.1 ± 1.0 a, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Chinese medicine Jiangganlong combined with anti-virus medicine can inhibit the replication of HBV DNA, ameliorate liver function, decrease the rate of complications, reduce the mortality rate, and prolong the survival time as well as improve the prognosis of ALC patients.

Key Words: Jiangganlong; Lamivudine; Adefovir; Active Liver Cirrhosis; Hepatitis B; YMDD variation; Mortality rate; Survival time

Wen R, Wang J, Chen M, Yan M. Chinese medicine Jiangganlong combined with anti-virus medicine in long-term treatment of active liver cirrhosis and its effect on prognosis of patients. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(29):2860-2864

摘要

目的: 观察降肝隆联合抗病毒治疗活动性肝炎肝硬变(ALC) 114例的长期疗效及对预后的影响.

方法: 随机选择ALC 114例, 分为治疗组和对照组. 治疗组: 降肝隆煎剂1付/3 d或丸剂4.0 g, 3次/d, LAM 0.1 g/d, YMDD变异后加用ADV联合中药的治疗, 待HBV DNA阴转后停用LAM, ADV联合中药继续治疗; 对照组: 中成药如复方鳖甲软肝片、或大黄蛴虫丸等抗纤维化治疗、降酶, 对症治疗. 两组均可予以支持, 感染、出血、肝性脑病等合并症的对症处理相同. 平均疗程36.0 mo.

结果: 治疗组与对照组HBV DNA总阴转率分别为75.4%(43/57)、3.5%(2/57), 两组相比有显著差异(P<0.01). 治疗组YMDD变异率为40.4%(23/57), YMDD变异后, 3例未加用ADV, 肝功能衰竭而死亡; 加用 ADV治疗20例, HBV DNA变异病毒阴转率90%(18/20). 治疗组的HBeAg(+)阴转率为44.4%(16/36), 和对照组16.7%(5/30)相比差异显著(P<0.05). 治疗组患者的TBIL、ALT的复常率均明显优于对照组, 治疗后白蛋白明显升高, Child-Pugh积分下降, 肝功能失代偿例数明显减少, 合并症的发生率14.0%(8/57)和对照组50.8%(29/57)相比有明显差异(P<0.01). 治疗组的死亡率为7.0%(4/57), 对照组为29.8%(17/57), 两组相比差异显著(P<0.01). 治疗组中失代偿肝硬变的生存时间显著长于对照组(3.3±2.1 a *vs* 1.1±1.0 a, P<0.01).

结论: 中药降肝隆联合LAM抗病毒药治疗ALC, 病毒复制受到抑制, 患者的肝功能持续改善, 减少了合并症的发生, 降低了ALC的病死率, 延长了患者的生存时间, 改善了ALC患者的预后, 且未见肾功能损伤.

关键词: 降肝隆; 拉米夫定; 阿德福韦酯; 活动性肝硬变; 乙型肝炎; YMDD变异; 病死率; 生存时间

文睿, 王坚, 陈敏, 严明. 中药降肝隆联合抗病毒药长期治疗活动性肝炎肝硬变对其预后的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(29):2860-2864

http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2860.asp

0 引言

慢性乙型肝炎相关性活动性肝炎肝硬变(ALC)预后极差. ALC的临床特点是在病毒持续复制的基础上, 肝脏炎症的持续存在, 导致肝纤维的持续增生, 以致由代偿性ALC发展为失代偿性ALC. 中药治疗ALC有较好的保护肝脏、抗纤维化作用, 也有一定的抗病毒作用[1], 但是对于HBV DNA高复制、TBIL, ALT顽固难降, 很快由代偿性肝硬变发展为代偿性肝硬变的患者, 单一中草药难以控制病情. LAM和ADV抗乙肝病毒的治疗效果是肯定的, 单一抗病毒能否改善和逆转其病程? 在本实验初, 部分患者曾一度采用LAM单一治疗, 虽然病毒复制指标阴转, 但是肝功能反复异常, 脾脏增大, 表明单一抗病毒治疗并不能改善所有ALC患者的肝纤维化进程. 要想改善ALC的预后, 就必须在抗病毒的同时, 予以保肝、抗肝纤维化治疗. 因此我们将临床治疗ALC有效中药方剂降肝隆及抗病毒药LAM和ADV设为治疗组, 中药复方鳖甲软肝片或大黄蛴虫丸作为对照组, 并进行了较长时间的临床观察, 分析了其对ALC预后的影响, 将有关情况报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 选择1999-08/2006-06我院住院、门诊及江苏省中医院门诊的114例ALC患者, 用分层随机抽样平均分为治疗组和对照组. 入选病例标准: 年龄18岁以上、男或女ALC患者, HBeAg, HBV DNA均阳性或HBeAg阴性、HBV DNA阳性、肝功能异常、B超提示肝硬化者. 排除病例: 临床诊断肝癌或可疑肝癌患者; 病原学提示有其他病毒感染者; 有严重合并症者; 酒精性肝硬变者; 代谢性肝硬变者. 治疗组: 57例, 其中男48例, 女9例; 年龄19-71(中位数41.0)岁; 病程0.5-34(中位数为10.7)a; 代偿性肝硬变34例, 失代偿性肝硬变23例; Child-Push分级, A级34例, B级12例, C级11例. 对照组: 57例, 其中男48例, 女9例; 年龄18-66(中位数39.8)岁; 病程0.5-34(中位数10.6)a; 代偿性肝硬变33例, 失代偿性肝硬变24例; Child-Push分级, A级40例, B级8例, C级9例. ALC的临床诊断依照西安会议《病毒性肝炎防治方案》制定的ALC临床诊断标准. Child-Pugh分级按陈灏珠主编的《实用内科学》第11版标准: A级5-6分, B级7-9分, C级≥10分. 治疗组及对照组在年龄、性别、病程、诊断及Child-Pugh分级等诸方面均有可比性. 肌酐(Cr)试剂由英国Randox公司提供; 凝血酶原时间(PT)试剂由上海太阳生物技术有限公司提供; ELISA试剂由美国Abbott公司提供; HBV DNA提取试剂为QIAamp DNA Blood Mini Kit, 由美

■同行评价

作者采用中药降肝隆联合西药拉米夫定及阿的氟韦抗病毒药物对114例活动性肝硬化进行了长期的治疗和预后观察, 应当说积累了一定的经验, 而且在探索中药治疗肝病方面做了不少工作, 值得肯定.

表 1 治疗前后的血清HBeAg、HBV DNA、YMDD变异、TB、A、Child-Pugh积分的变化 (n = 57)

分组	HBeAg (+)(n)	HBeAg (–)(n)	HBV DNA (+)(n)	YMDD (+)(n)	加用ADV后 HBV DNA(–)(n)	TBil正常 (n)	ALT正常 (n)	A (g/L)	Child-Pugh 积分
治疗组									
治疗前	36	21	57			27	5	40.31 ± 6.27	7.06 ± 2.38
治疗后	20[a]	37	14[b]	23	18	45[b]	43[b]	43.14 ± 7.51[b]	5.13 ± 2.46[b]
对照组									
治疗前	30	27	57			17	9	39.48 ± 7.43	7.00 ± 2.37
治疗后	25	32	55			17	12	38.05 ± 8.52	7.75 ± 3.05

[a]P<0.05, [b]P<0.01 *vs* 对照组.

国QIAGEN公司提供; PCR试剂由大连宝生物有限公司提供; YMDD测序试剂盒由美国USB公司提供. TBIL试剂由瑞士得克公司提供; ALT、血清白蛋白(A)试剂由上海长征康仁医学有限公司提供; 测序仪(美国DNA Sequencer).

1.2 *方法* 治疗组的治疗方法: 告之患者病情及用药之利弊, 经患者同意签字后, 方可选入治疗组. 治疗组用中药煎剂降肝隆(基本方: 巴戟天、叶下珠、白术、杏仁、鸡血藤等. 阳虚者加温阳药; 阴虚者加用生、熟地、女贞子), 1剂/3 d, 或丸剂, 4.0 g, 3次/d, 拉米夫定0.1 g/d, YMDD变异后, LAM加ADV联合中药治疗, 待HBV DNA阴转后, ADV联合中药继续治疗; 对照组: 中成药如复方鳖甲软肝片、或大黄蜇虫丸等抗纤维化治疗及降酶, 保肝, 对症治疗. 两组均可予以支持治疗, 感染、出血、肝性脑病等合并症的对症处理相同. 两组疗程最短12 mo, 最长79 mo, 疗程的中位数36.0 mo(治疗组包括ADV治疗时间). 在治疗期间两组患者每月查肝功能及血常规、肾功能, 生化仪检测血清TBIL, ALT, A, Cr; 每3 mo作HBV-M检测, 用ELISA法检测; HBV DNA定量检测用PCR法, <5.0×10^5 copies/L为阴性, HBeAg定量<280 PEIU/L为阴性, HBeAb ≤1.0 S/CO为阳性; 对患者血清中的HBV DNA进行提取、扩增(PCR)、测序作YMDD检测, 每6 mo查PT1次, B超检查肝脾大小及门静脉的变化; 凝固法检测PT, 检测时质控同时进行. 同时认真观察症状及合并症的变化, 患者的病死率等.

统计学处理 计数数据用χ^2检验, 计量资料mean±SD, 用t检验.

2 结果

2.1 *治疗前后的血清HBeAg, HBV DNA, YMDD变异变化* 治疗组的HBeAg(+)治疗前36例, 治疗后20例, 阴转16例, 阴转率44.4%(16/36), 和对照组16.7%(5/30)相比, P<0.05; 治疗组57例患者使用LAM, YMDD变异率为40.4%(23/57). YMDD变异后, 3例未加用ADV而死亡, 加用 ADV治疗20例, HBV DNA变异病毒阴转率90%(18/20), HBV DNA总阴转率为75.4%(43/57)与对照组3.5%(2/57)相比, P<0.01(表1).

2.2 *治疗前后TBIL, A, ALT, Child-Pugh积分变化* 治疗组、对照组TBIL的复常率分别为31.6%(18/57), 0%(0/57), 两组比较差异显著(P<0.01); 治疗组、对照组的ALT复常率分别为66.7%(38/57), 5.2%(3/57), 两组比较差异显著(P<0.01); 治疗组、对照组治疗前后白蛋白分别为40.31±6.27, 43.14±7.51, 39.48±7.43, 38.05±8.52 g/L, 两组比较差异显著(P<0.01); 治疗组、对照组治疗前后Child-Pugh积分分别为7.06±2.38, 5.13±2.46, 7.00±2.37, 7.75±3.05, 两组比较差异显著(P<0.01); 治疗组和对照组治疗前肝功能失代偿例数分别为23, 24; 治疗后肝功能失代偿例数分别为3, 27, 两组比较差异显著(P<0.01, 表1).

治疗组和对照组脾脏回缩率分别为47.4%(27/57), 10.5%(6/57), 两组相比P<0.01; 脾脏无变化率分别为29.8%(17/57), 12.3%(7/57), 两组相比P<0.05; 脾脏增大率分别为12.3%(7/57), 68.4%(39/57), 两组相比P<0.01(表2).

2.3 *两组合并症与死亡率比较(表3)* 治疗组合并症(包括: 感染、出血、肝性脑病、肝肾综合征)的发生率14.0%(8/57), 和对照组50.8%(29/57)相比, P<0.01; 慢性重型肝炎的发生率7.0%(4/57), 和对照组14.0%(8/57)相比, P>0.05; 肝癌的发生率治疗组与对照组分别为7.0%(4/57), 12.3%(7/57), 两组相比, P>0.05; 治疗组的死亡率

表 2 两组治疗前后脾脏的变化 (n = 57, n)

分组	治前切脾	治疗后		
		脾脏回缩	无变化	增大
治疗组	6	27[b]	17[a]	7[b]
对照组	5	6	7	39

[a]P<0.05, [b]P<0.01 *vs* 对照组治疗后.

表 3 两组合并症与死亡率比较 (n = 57, n)

分组	合并症					重型肝炎	肝癌	死亡人数	死亡率
	感染	出血	肝脑	肝肾	合计				
治疗组	3	3	2	0	8[b]	4	4	4[b]	7.0%[b]
对照组	13	6	6	4	29	8	7	17	29.8%

[b]P<0.01治疗组 *vs* 对照组.

7.0%(4/57), 对照组为29.8%(17/57), 两组相比差异显著(P<0.01).

生存时间: 治疗组和对照组中失代偿肝硬变患者的生存时间分别是3.3±2.1, 1.1±1.0 a, 两组相比差异显著(P<0.01).

治疗组病例用药后未见肾功能损伤及血小板进一步减少.

3 讨论

LAM治疗HBV相关的失代偿性肝硬变, 短期内有良好的相关性[4-5]. 中药降肝隆联合LAM治疗ALC, 能抑制病毒复制, 推迟YMDD变异的发生[2-3], YMDD变异部分患者可能引起致命性的肝炎活动[6], 及时加用ADV[7-9], YMDD变异病毒再次受到抑制, 肝功能中TBIL, ALT, A, Child-Pugh积分仍持续改善, 脾脏回缩, 合并症减少, 死亡率下降, 失代偿性肝硬变的生存时间延长, 生活质量提高, 明显改善患者的预后.

中药联合抗病毒药治疗ALC, 可明显改善其预后, 首要因素是病毒复制的持续抑制, 降低了由YMDD变异而致的慢性重型肝炎的死亡率. LAM能抑制病毒复制, HBeAg, HBV DNA阴转后, 患者病情改善. 随着LAM治疗时间的延长, YMDD变异可能引起致命性的肝炎活动[10], 治疗组4例患者均因YMDD变异发生了慢性重型肝炎, 前2例患者未能加用ADV, 发生暴发性肝功能衰竭而死亡; 后2例及时加用了ADV, 变异病毒的复制受到了持续的抑制[11-12], 肝功能持续改善, 和国内有关报道相一致[13]; 治疗组57例患者使用LAM, YMDD变异率为40.4%(23/57). YMDD变异后加用ADV, YMDD变异病毒HBV DNA阴转率90.0%(18/20), 表明ADV对YMDD变异病毒有明显的抑制作用; 治疗组总的HBV DNA阴转率为75.4%(43/57)与对照组3.5%(2/57)相比P<0.01. 治疗组HBeAg阴转率为44.4%(16/36), 和对照组16.7%(5/30)相比, P<0.05; 抗病毒药物的序贯使用, 使病毒复制持续抑制, 因而减少了ALC由于变异病毒的复制而引起致命性的肝炎活动造成肝功能衰竭. 对照组有8例患者发生了慢性重型肝炎, 死亡8例, 病死率100.0%(8/8); 治疗组慢性重型肝炎病死率50%(2/4), 与对照组100.0%(8/8)相比, 差异显著(但需临床更多病例的证实). 中药联合抗病毒药治疗ALC, 使其在治疗中合并肝癌患者死亡率下降, 生存时间延长. 在肝炎肝硬变的基础上合并肝癌患者的预后极差, 肝功能衰竭及合并症的发生是其重要的死因. 抗病毒治疗后, 由于病毒复制的持续抑制, 肝功能的改善, 使患者对肝癌的治疗有更多的选择[14-15]. 对照组中ALC合并肝癌的患者死亡率为100.0%(7/7), 治疗组为25%(1/4), 治疗组除一例在治疗服用LAM第27月发生肝癌, 外院行肝移植术4 mo后, YMDD变异, 未加用ADV, 发生暴发性肝功能衰竭死亡外, 另外3例均在抗病毒的基础上, 加用放射性介入疗法及中药治疗, 现均健在, 最长存活期已达3 a. 中药联合抗病毒药治疗ALC合并症的减少是死亡率下降、生存时间延长的第三个原因. ALC合并症的发生, 是死亡的重要原因. 在抗病毒药物使用, 病毒复制持续受到抑制的同时, 中药降肝隆温补肾阳、清热解毒外, 加用了益气养血、化瘀通络之白术、鸡血藤等, 改善了患者的肝功能, 表现为胆红素、ALT的复常率比对照组明显升高, A的升高, Child-Pugh积分下降, 肝功能持续好转, 脾脏的回缩, 肝组织持续改善[16], 肝功能失代偿例数明显减少, 治疗组患者的病情相对稳定, 治疗组合并症的发生率14.0%(8/57), 和对照组50.8%(29/57)相比, 差异显著; 合并症的减少, 使死亡率下降, 治疗组的死亡率7.0%(4/57), 对照组为29.8%(17/57), 两组相比差异显著; 死亡率下降使患者的生存期延长, 治疗组和对照组中失代偿肝硬变的生存时间治疗组和对照组分别是3.3±2.1, 1.1±1.0 a, 与肝功能失代偿1 a生存率为55%-70%, 5 a生存率为14%-28%[17-18]的有关报道资料相比, 治疗组肝功能失代偿1 a生存率为100.0%, 平均生存时间已超过3 a. 且未见肾功能损伤[19]及血小板进

一步减少.

总之, 中药降肝隆联合LAM治疗ALC, 有较好的疗效, 部分患者发生了YMDD变异, 加用了ADV治疗后, HBV DNA复制再次受到抑制, 肝功能指标改善, Child-Pugh积分下降, 脾脏回缩, 失代偿肝硬变例数减少, 合并症减少, 肝炎肝硬变患者的慢性重型肝炎、肝癌的死亡率下降, 从而降低了肝炎肝硬变患者的死亡率, 延长了患者的生存时间, 提高了患者的生存质量, 改善了ALC患者的预后, 且未见肾功能损伤及血小板进一步减少.

4 参考文献

1 杨婉凤, 王灵台, 陈建杰. 补肾冲剂抗鸭乙型肝炎病毒的实验研究. 肝脏 2002; 7: 110-111

2 文睿, 王坚, 严明. 中药降肝隆联合拉米夫定治疗活动性肝炎90例. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2509-2513

3 文睿, 王坚, 严明. 中药降肝隆联合拉米夫定治疗活动性肝炎肝硬变的长期疗效观察. 中华实用中西医杂志 2004; 4: 2444-2446

4 Kapoor D, Guptan RC, Wakil SM, Kazim SN, Kaul R, Agarwal SR, Raisuddin S, Hasnain SE, Sarin SK. Beneficial effects of lamivudine in hepatitis B virus-related decompensated cirrhosis. *J Hepatol* 2000; 33: 308-312

5 Hiraoka A, Michitaka K, Kumagi T, Kurose K, Uehara T, Hirooka M, Yamashita Y, Kubo Y, Miyaoka H, Iuchi H, Okada S, Ohmoto M, Yamamoto K, Horiike N, Onji M. Efficacy of lamivudine therapy for decompensated liver cirrhosis due to hepatitis B virus with or without hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2005; 13: 1159-1163

6 Wang JH, Lu SN, Lee CM, Lee JF, Chou YP. Fatal hepatic failure after emergence of the hepatitis B virus mutant during lamivudine therapy in a patient with liver cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 366-369

7 Peters MG, Hann Hw H, Martin P, Heathcote EJ, Buggisch P, Rubin R, Bourliere M, Kowdley K, Trepo C, Gray Df D, Sullivan M, Kleber K, Ebrahimi R, Xiong S, Brosgart CL. Adefovir dipivoxil alone or in combination with lamivudine in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2004; 126: 91-101

8 Benhamou Y, Thibault V, Vig P, Calvez V, Marcelin AG, Fievet MH, Currie G, Chang CG, Biao L, Xiong S, Brosgart C, Poynard T. Safety and efficacy of adefovir dipivoxil in patients infected with lamivudine-resistant hepatitis B and HIV-1. *J Hepatol* 2006; 44: 62-67

9 Xiong X, Flores C, Yang H, Toole JJ, Gibbs CS. Mutations in hepatitis B DNA polymerase associated with resistance to lamivudine do not confer resistance to adefovir *in vitro*. *Hepatology* 1998; 28: 1669-1673

10 Manolakopoulos S, Karatapanis S, Elefsiniotis J, Mathou N, Vlachogiannakos J, Iliadou E, Kougioumtzan A, Economou M, Triantos C, Tzourmakliotis D, Avgerinos A. Clinical course of lamivudine monotherapy in patients with decompensated cirrhosis due to HBeAg negative chronic HBV infection. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 57-63

11 Liaw YF, Lee CM, Chien RN, Yeh CT. Switching to adefovir monotherapy after emergence of lamivudine-resistant mutations in patients with liver cirrhosis. *J Viral Hepat* 2006; 13: 250-255

12 Kim KM, Choi WB, Lim YS, Lee HC, Chung YH, Lee YS, Suh DJ. Adefovir dipivoxil alone or in combination with ongoing lamivudine in patients with decompensated liver disease and lamivudine-resistant hepatitis B virus. *J Korean Med Sci* 2005; 20: 821-828

13 Su GG, Zhao NF, Zhou Y, Ying MF. Adefovir dipivoxil in treatment of decompensated liver cirrhosis patients with YMDD mutation. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2005; 34: 470-472

14 Yeo W, Chan PK, Ho WM, Zee B, Lam KC, Lei KI, Chan AT, Mok TS, Lee JJ, Leung TW, Zhong S, Johnson PJ. Lamivudine for the prevention of hepatitis B virus reactivation in hepatitis B s-antigen seropositive cancer patients undergoing cytotoxic chemotherapy. *J Clin Oncol* 2004; 22: 927-934

15 Lau GK, Yiu HH, Fong DY, Cheng HC, Au WY, Lai LS, Cheung M, Zhang HY, Lie A, Ngan R, Liang R. Early is superior to deferred preemptive lamivudine therapy for hepatitis B patients undergoing chemotherapy. *Gastroenterology* 2003; 125: 1742-1749

16 Dienstag JL, Goldin RD, Heathcote EJ, Hann HW, Woessner M, Stephenson SL, Gardner S, Gray DF, Schiff ER. Histological outcome during long-term lamivudine therapy. *Gastroenterology* 2003; 124: 105-117

17 Fattovich G, Pantalena M, Zagni I, Realdi G, Schalm SW, Christensen E. Effect of hepatitis B and C virus infections on the natural history of compensated cirrhosis: a cohort study of 297 patients. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2886-2895

18 Hui AY, Chan HL, Leung NW, Hung LC, Chan FK, Sung JJ. Survival and prognostic indicators in patients with hepatitis B virus-related cirrhosis after onset of hepatic decompensation. *J Clin Gastroenterol* 2002; 34: 569-572

19 Izzedine H, Hulot JS, Launay-Vacher V, Marcellini P, Hadziyannis SJ, Currie G, Brosgart CL, Westland C, Arterbrun S, Deray G. Renal safety of adefovir dipivoxil in patients with chronic hepatitis B: two double-blind, randomized, placebo-controlled studies. *Kidney Int* 2004; 66: 1153-1158

电编 张敏 编辑 张焕兰

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年10月18日; 14(29): 2854-2859
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床研究 CLINICAL RESEARCH

YMDD耐药变异与HLA等位基因多态性的相关性

张淑云, 李兴库, 董广璐, 仰曙芬, 谷鸿喜, 李 迪, 金 茜, 刘 伟, 杜 博, 卢 滨

■背景资料
目前常用的抗HBV药物有干扰素和核苷类似物. 干扰素(IFN)是机体组织细胞产生的一种具有抗病毒、抗细胞增殖和免疫调节等生物活性的细胞因子. 核苷(酸)类似物是一类抗病毒的化学药物, 目前已批准临床应用的有拉米夫定(LMD)、阿德福韦(adefovir)和恩替卡韦(entecavir). 美国FDA于1998年底批准葛兰素威康公司的拉米夫定(贺普丁)用于治疗CHB. 但长期应用易发生HBV YMDD变异, 从而影响拉米夫定的疗效和应用. 目前HBV YMDD变异的机制尚未完全阐明.

张淑云, 李兴库, 仰曙芬, 金茜, 刘伟, 杜博, 卢滨, 哈尔滨医科大学附属第二医院科研实验中心 黑龙江省哈尔滨市 150086
董广璐, 哈尔滨医科大学附属第二医院肿瘤放射治疗科 黑龙江省哈尔滨市 150086
谷鸿喜, 李迪, 哈尔滨医科大学微生物学教研室 黑龙江省哈尔滨市 150086
张淑云, 1993年哈尔滨医科大学硕士, 哈尔滨医科大学2003级博士生, 副主任医师, 主要从事临床分子病毒学研究和临床基因诊断工作.
黑龙江省自然科学基金资助项目, No. D0307
黑龙江省卫生厅课题基金资助项目, 2005-311
通讯作者: 董广璐, 150086, 哈尔滨市南岗区学府路246号, 哈尔滨医科大学附属第二医院肿瘤放射治疗科. dgl64@163.com
电话: 0451-86605742 传真: 0451-86688011
收稿日期: 2006-07-02 接受日期: 2006-08-10

Correlation of hepatitis B virus YMDD mutations with the polymorphism of HLA alleles in patients with chronic hepatitis B virus infection

Shu-Yun Zhang, Xing-Ku Li, Guang-Lu Dong, Shu-Feng Yang, Hong-Xi Gu, Di Li, Qian Jin, Wei Liu, Bo Du, Bin Lu

Shu-Yun Zhang, Xing-Ku Li, Shu-Feng Yang, Qian Jin, Wei Liu, Bo Du, Bin Lu, Research Center, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Guang-Lu Dong, Department of Tumor Radiotherapy, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Hong-Xi Gu, Di Li, Department of Microbiology, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Supported by the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province, No. D0307, and the Fund from Health Department of Heilongjiang Province, No. 2005-311
Correspondence to: Guang-Lu Dong, Department of Tumor Radiotherapy, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. dgl64@163.com
Received: 2006-07-02 Accepted: 2006-08-10

Abstract

AIM: To investigate the relationship between HBV YMDD mutations and the polymorphism of human leukocyte antigen (HLA) alleles in patients with chronic hepatitis B virus (HBV) infection.

METHODS: Fluorescent hybridization biprobe PCR and melting curve assay (FH-PCR-MC) was used to determine HBV YMDD mutations in serum specimens from 142 patients with chronic HBV infection. HLA-A, B, and DRB1 alleles in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were detected by polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP). The PBMCs were collected from 56 of the 142 patients.

RESULTS: YMDD mutations occurred in 56.3% of the 142 patients who received lumivudine treatment. The frequencies of HLA-B*58 and DRB1*03 alleles were significantly lower in YMDD mutation group in comparison with those in YMDD wild group (0.013 *vs* 0.094, P = 0.036; 0.000 *vs* 0.063, P = 0.024). The frequency of HLA-A*30 allele was markedly higher in YIDD group than that in YVDD group (0.158 *vs* 0.024, P = 0.034), while the frequency of HLA-A*33 allele was lower in YIDD group (0.119 *vs* 0.000, P = 0.028).

CONCLUSION: YMDD mutation is associated with the polymorphism of HLA alleles in patients with chronic hepatitis B. Individuals with HLA-B*58 and DRB1*03 alleles may have resistance to YMDD mutation. Patients with HLA-A*30 allele may have a susceptibility to YIDD mutation, and those with HLA-A*33 allele are susceptible to YVDD mutation.

Key Words: Hepatitis B virus; Chronic hepatitis B; YMDD mutation; HLA allele

Zhang SY, Li XK, Dong GL, Yang SF, Gu HX, Li D, Jin Q, Liu W, Du B, Lu B. Correlation of HBV YMDD mutations with the polymorphism of HLA alleles in persons with chronic HBV infection. Shi jie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(29):2854-2859

摘要

目的: 初步探讨慢性乙型肝炎(CHB)患者拉米夫定治疗中YMDD变异与HLA-A, B, DRB1各位点等位基因分布频率的相关性.

方法: 对142例CHB患者, 采用荧光标记杂交双探针PCR融解曲线法(FH-PCR-MC)检测血

浆HBV YMDD变异; 对其中56例患者的外周血白细胞, 采用序列特异性引物/聚合酶链式反应(PCR-SSP)技术检测人类白细胞表面抗原等位基因(HLA-A, B, DRB1)分型.

结果: 在用拉米夫定治疗的142例CHB患者中, YMDD变异率为56.3%. HLA-B*58和DRB1*03等位基因分布频率在YMDD变异组与YMDD野生组比较有显著性降低(0.013 *vs* 0.094, $P = 0.036$; 0.000 *vs* 0.063, $P = 0.024$); HLA-A*30等位基因分布频率在YIDD组明显增高, 与YVDD组比较差异显著(0.158 *vs* 0.024, $P = 0.034$); HLA-A*33等位基因分布频率在YVDD变异组明显增高, 与YIDD变异组比较差异显著(0.119 *vs* 0.000, $P = 0.028$).

结论: YMDD耐药变异与HLA等位基因多态性有一定相关性. 携有HLA-B*58和DRB1*03等位基因的个体感染的HBV可能不易发生YMDD变异; 携有HLA-A*30等位基因的个体感染的HBV可能易发生YIDD变异; 携有HLA-A*33等位基因的个体感染的HBV可能易发生YVDD变异.

关键词: 乙型肝炎病毒; 慢性乙型肝炎; YMDD变异; 人类白细胞抗原等位基因

张淑云, 李兴库, 董广璐, 仰曙芬, 谷鸿喜, 李迪, 金茜, 刘伟, 杜博, 卢滨. YMDD耐药变异与HLA等位基因多态性的相关性. 世界华人消化杂志 2006;14(29):2854–2859
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2854.asp

0 引言

HBV感染仍然是全球性的健康问题. 目前全球约有20亿人感染过HBV, 其中慢性感染者达3.5亿之多, 并易发展为肝硬化和肝癌, 每年约有100万人死于肝硬化和肝癌, 严重地威胁着人类的健康. 我国是乙型肝炎高发区, 约占全球HBV感染者的50%, 对HBV的防治仍是我国健康与传染病控制中的首要问题[1-2]. 拉米夫定是目前治疗慢性乙型肝炎(CHB)较有效的药物, 但长期服用易出现耐药. 这主要与HBV的多聚酶基因变异有关, 在HBV基因序列上主要表现为739位A→G 或741位G→T,在HBV聚合酶上表现为酪氨酸-蛋氨酸-天门冬氨酸-天门冬氨酸(tyrosine-methionine-asparticacid-asparticacid, YMDD)基序改变, 即第522位蛋氨酸(M)被缬氨酸(V)或异亮氨酸(I)所取代, 形成M552V(YVDD)与M552I(YIDD)变异株[3-7]. 他们可单独或混合存在, 在群体中表现出异质性. 目前HBV YMDD变异发生的机制尚不清楚. 大量研究表明YMDD变异与用药时间呈正相关[8-11]. 近年也有研究报道YMDD变异可能与机体感染的HBV基因型[12-14]以及机体免疫功能[15-19]等因素有关. 人类白细胞抗原(HLA)作为免疫遗传因素在HBV感染、免疫和治疗中已备受关注[20-22]. HLA等位基因在乙肝疫苗的有无应答[23-24]、乙肝病毒的清除或持续[25-27]、对干扰素治疗反应[28-30], 以及肝硬化等[31]的发生上都有优势位点. 但YMDD变异与HLA等位基因多态性是否相关未见报道. 为深入探讨HBV YMDD变异的机制, 对拉米夫定治疗的CHB患者HBV YMDD变异和HLA-A, B, DRB1等位基因多态性进行了检测和分析 .

■**研发前沿**
深入研究HBV YMDD变异发生的机制和影响因素, 以及如何控制HBV YMDD变异的发生是目前该领域研究的热点.

1 材料和方法

1.1 *材料* 2004-10/2005-11就诊CHB患者142例, 男112例, 女30例, 年龄18-63(平均42.4±11.9)岁, 诊断符合第10次全国病毒性肝炎及肝病学术会议讨论修订的诊断标准[32]. 所有患者均口服拉米夫定(100 mg/d)进行治疗, 时间为8-40 mo; 均为无血缘关系的黑龙江地区汉族人, 排除免疫性疾病和共感染因素. HBV YMDD突变核酸扩增(PCR)荧光检测试剂购自深圳匹基生物工程有限公司; HLA-A, B, DRB1等位基因检测试剂盒(Biotest ABDR SSPtray kit)购自北京诺诗生物技术有限公司.

1.2 *方法* HBV YMDD变异采用荧光标记杂交双探针荧光PCR融解曲线法(FH-PCR-MC)检测, 具体操作步骤按试剂盒的说明进行. 该试剂盒可检出YMDD野生型(YMDD)、变异型(YVDD或YIDD)或混合型(YVDD和YIDD). 根据对照品融解温度(Tm)值和标本Tm值之间符合情况, 判定标本YMDD变异类型. 对照品Tm值: YMDD(Tm) = 50.0±1.5°C; YVDD(Tm) = 58.0±1.5°C; YIDD(Tm) = 42.5±1.5°C(图1). HLA-A, B, DRB1等位基因采用序列特异性引物/聚合酶链式反应(PCR-SSP)技术检测; 基因组DNA提取、PCR反应和电泳按试剂盒说明进行; 通过凝胶成像分析系统记录电泳结果(图2); 用试剂公司提供的软件进行HLA等位基因判断. 该试剂盒可检测HLA A*01-80等位基因44个, B*07-83等位基因163个和DRB1*01-16等位基因43个. 等位基因分布频率(AF)采用直接计数法.

统计学处理 分组间比较采用χ^2检验, $P<0.05$

■**创新盘点**
本文对56例应用拉米夫定的CHB患者(YMDD16例、YIDD21例和YVDD19例)HLA多态性进行了检测，检出了HLA-A*01~68共11个位点，HLA-B*07~58共14个位点，HLA-DRB1*01~15共11个位点. 结果分析表明HBV YMDD耐药变异与HLA等位基因多态性可能有一定相关. 携有HLA-B*58和DRB1*03等位基因的个体感染的HBV可能不易发生YMDD变异; 携有HLA-A*30等位基因的个体感染的HBV可能易发生YIDD变异; 携有HLA-A*33等位基因的个体感染的HBV可能易发生YVDD变异.

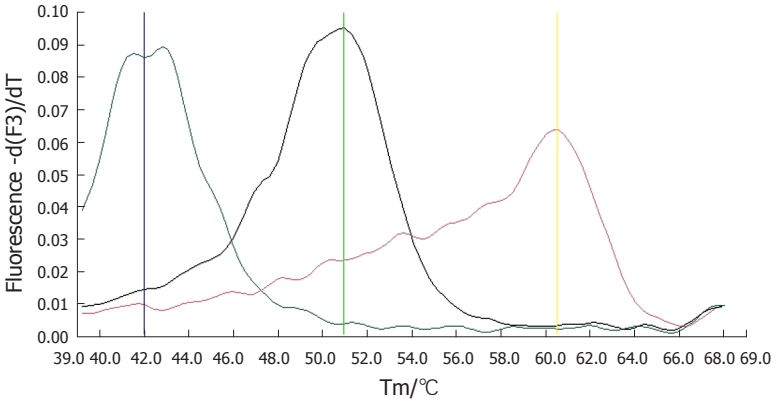


图 1 YMDD及其变异标准质粒融解曲线图(Tm值). Tm: YIDD 42.5±1.5℃, YMDD 50.0±1.5℃, YVDD 58.0±1.5℃.

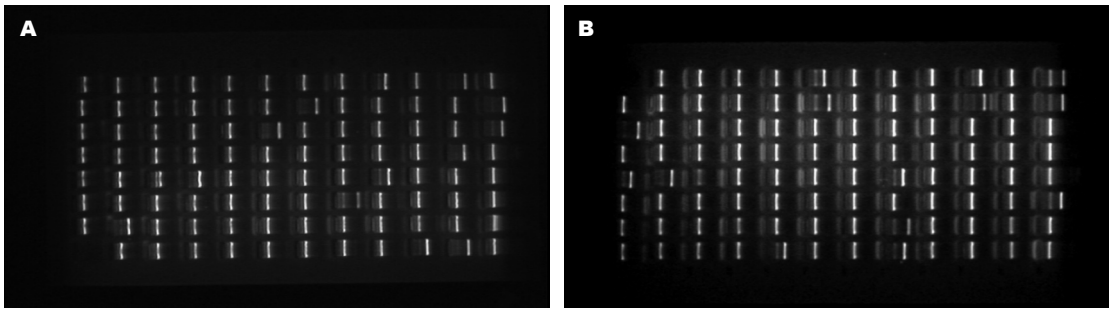


图 2 HLA-A, B, DRB1等位基因电泳图. A: HLA-A*26/A*30, B*13/B*40, DRB1*07/DRB1*11; B: HLA-A*02/A*11, B*35/B*55, DRB1*01/DRB1*14.

有统计学意义; AF≥0.010的等位基因纳入统计分析; 关联度采用优势比(odds ratio, *OR*)反映, 并计算其95%可信区间(95%CI). 数据处理采用SPSS 10.0统计软件完成.

2 结果

2.1 HBV YMDD变异检测 在142例CHB患者中, 62例为YMDD野生型(YMDD), 占43.7%; 80例发生YMDD变异, 占56.3%. 在YMDD变异中, 38例发生YIDD变异, 占47.5%; 24例发生YVDD变异, 占30.0%; 18例发生YIDD+YVDD混合变异, 占22.5%.

2.2 YMDD, **YIDD和YVDD 3组中HLA-A, B,** DRB1各位点等位基因分布(表1) 对56例检测了HBV YMDD变异的CHB患者(包括YMDD16例、YIDD19例和YVDD21例)的外周血白细胞进行了HLA-A, B, DRB1等位基因检测. 检出HLA-A*01-68共11个位点, HLA-B*07-58共14个位点, HLA-DRB1*01-15共11个位点. 以AF≥1.00为优势基因, HLA-A*02, 11, B*13和DRB1*12在3组中均为优势基因, 而HLA-A*30, B*40和DRB1*07, 09, 15在YIDD组中为优势基因; HLA-A*24, 33, B*40和DRB1*07, 15在YVDD组中为优势基因; HLA-A*33和DRB1*09在YMDD组中为优势基因.

2.3 YMDD变异组和野生组HLA-A, B, DRB1各位点等位基因分布频率 在40例YMDD变异(YIDD或/和YVDD)患者中, HLA-B*58和DRB1*03等位基因分布频率明显降低, 与YMDD比较差异显著(0.013 *vs* 0.094, $P = 0.036$; 0.000 *vs* 0.063, $P = 0.024$); 虽然HLA-A*31和A*33均有2倍以上降低($OR < 0.500$), HLA-B*40, DRB1*07和DRB1*15等位基因频率均有2倍以上增高($OR>2.000$), 但均没有统计学意义($P>0.05$)(表2). 其他位点未见明显差异.

2.4 YIDD和YVDD 变异组HLA-A, B, DRB1各位点等位基因分布频率 在YIDD组, HLA-A*30等位基因分布频率明显增高, 而HLA-A*33则明显降低, 与YVDD组比较差异显著(0.158 *vs* 0.024, $P = 0.034$和0.000 *vs* 0.119, $P = 0.028$); HLA-A*01和A*32在YIDD组也明显增高, 但与YVDD组比较统计学上均无显著差异(0.079 *vs* 0.000, $P = 0.063$); HLA-DRB1*09和DRB1*11在YIDD组均较YVDD组2倍以上增高($OR>2.000$), HLA-A*24, B*15和B*35在YIDD组均较YVDD组2倍以上降低($OR < 0.500$), 但均没有统计学意

表 1 不同YMDD变异HLA- A，B，DRB1各位点等位基因频率分布

HLA Alleles		YIDD		YVDD		YMDD	
		n = 19	AF	*n* =21	AF	*n* = 16	AF
A	01	3	0.079	0	0.000	1	0.031
	02	8	0.211	10	0.238	7	0.219
	03	3	0.079	4	0.095	0	0.000
	11	4	0.105	7	0.167	4	0.125
	24	2	0.053	7	0.167	5	0.156
	26	2	0.053	1	0.024	2	0.063
	30	6	0.158	1	0.024	2	0.063
	31	0	0.000	2	0.048	3	0.094
	32	3	0.079	0	0.000	0	0.000
	33	0	0.000	5	0.119	5	0.156
	68	2	0.053	1	0.024	0	0.000
B	07	2	0.053	1	0.024	1	0.031
	13	8	0.211	5	0.119	6	0.188
	15	1	0.026	4	0.095	3	0.094
	35	1	0.026	4	0.095	2	0.063
	38	0	0.000	1	0.024	1	0.031
	40	8	0.211	8	0.190	3	0.094
	44	3	0.079	4	0.095	2	0.063
	46	3	0.079	1	0.024	1	0.031
	48	0	0.000	2	0.048	1	0.031
	51	1	0.026	3	0.071	3	0.094
	52	2	0.053	2	0.048	0	0.000
	55	0	0.000	3	0.071	0	0.000
	57	2	0.053	0	0.000	1	0.031
	58	0	0.000	1	0.024	3	0.094
DRB1	01	1	0.026	2	0.048	1	0.031
	03	0	0.000	0	0.000	2	0.063
	04	3	0.079	4	0.095	3	0.094
	07	8	0.211	6	0.143	3	0.094
	08	2	0.053	3	0.071	1	0.031
	09	6	0.158	3	0.071	6	0.188
	11	3	0.079	1	0.024	2	0.063
	12	6	0.158	11	0.262	8	0.250
	13	1	0.026	0	0.000	1	0.031
	14	1	0.026	1	0.024	2	0.063
	15	4	0.105	7	0.167	2	0.063

■应用要点
本文为深入研究HBV YMDD发生的机制和影响因素, 以及如何控制HBV YMDD发生和开展个体化治疗等提供理论和实验依据.

义(P>0.05)(表3). 其他位点未见明显差异.

3 讨论

拉米夫定即2',3'-双脱氧-3'-硫代胞嘧啶核苷(3TC), 为双脱氧胞嘧啶核苷类似物, 是逆转录酶抑制剂. 拉米夫定口服后在体内磷酸化为三磷酸3TC, 和dGTP竞争掺入病毒DNA链中, 抑制HBV的逆转录酶, 有效阻止病毒核酸的合成.由于拉米夫定能抑制HBV DNA复制, 故能迅速降低患者的血清HBV DNA水平, 促进血清丙氨酸转氨酶(ALT)恢复正常[33], 获得一定比率的HBeAg消失[34], 改善肝组织损伤[35], 已广泛应用于CHB患者的治疗, 但长期应用易发生耐药. YMDD变异是拉米夫定治疗发生耐药的主要原因[34]. 本研究对142例应用拉米夫定治疗的CHB患者进行了YMDD变异及其分型检测, 结果YMDD变异总检出率为56.3%, 与文献报道基本一致[8-11].在YMDD变异中, YIDD变异占47.5%; YVDD变异占30.0%; YIDD+YVDD混合变异占22.5%. 这些结果也体现了YMDD变异的异质性和个体差异.

我们以前的研究已表明不同个体感染相同基因型, 用相同的药物剂量, 可发生不同的变异类型; 不同的HBV基因型发生YIDD和YVDD的变异趋势不同, 如B基因型以YVDD变异为主占77.8%, 而YIDD变异仅占22.2%; C基因型则以YIDD变异为主占50.0%, YVDD变异占25.0%, YVDD+YIDD混合变异占25.0%[14]. 另外, HLA等位基因的多态性不仅与HBV在体内的持续或清除有关[27], 也与易感染何种HBV基因型有关(资料未发表). 为探讨YMDD变异的异质性和个体差异是否与HLA等位基因的多态性相关, 我们对142 例应用拉米夫定的CHB患者中的56例

■同行评价
作者对接受拉米夫定治疗的142例慢性乙型肝炎患者检测了血清HBV YMDD变异; 并对其中56例患者的外周血白细胞检测了人类白细胞表面抗原(HLA)等位基因(HLA-A, B, DRB1)分型, 结果初步显示YMDD耐药变异与拉米夫定治疗时间有关; 与HLA等位基因多态性也可能有一定的关系. 立题新颖, 实验方法先进, 文章具有科学性.

表 2 YMDD变异组和野生组HLA-A, B, DRB1各位点等位基因分布频率差异

HLA Alleles		YMDD变异 n = 40	AF	YMDD n = 16	AF	χ^2	P	OR	95%CI
A	03	7	0.088	0	0.000	2.987	0.084	–	–
	31	2	0.025	3	0.094	2.533	0.111	0.248	0.039–1.560
	33	5	0.063	5	0.156	2.471	0.116	0.360	0.097–1.341
B	40	16	0.200	3	0.094	1.832	0.176	2.417	0.653–8.946
	52	4	0.050	0	0.000	1.659	0.198	–	–
	58	1	0.013	3	0.094	4.381	0.036	0.122	0.012–1.224
DRB1	03	0	0.000	2	0.063	5.091	0.024	0.000	–
	07	14	0.175	3	0.094	1.172	0.279	2.051	0.547–7.685
	09	9	0.113	6	0.188	1.108	0.292	0.549	0.178–1.694
	15	11	0.138	2	0.063	1.235	0.263	2.391	0.499–11.453

表 3 YIDD和YVDD 变异组HLA-A, B, DRB1各位点等位基因分布频率差异

HLA Alleles		YIDD n = 19	AF	YVDD n = 21	AF	χ^2	P	OR	95%CI
A	01	3	0.079	0	0.000	3.445	0.063	–	–
	24	2	0.053	7	0.167	2.598	0.107	0.278	0.054–1.430
	30	6	0.158	1	0.024	4.492	0.034	7.688	0.880–67.121
	31	0	0.000	2	0.048	1.856	0.173	0.000	–
	32	3	0.079	0	0.000	3.445	0.063	–	–
	33	0	0.000	5	0.119	4.825	0.028	0.000	–
B	13	8	0.211	5	0.119	1.227	0.268	1.973	0.585–6.662
	15	1	0.026	4	0.095	1.617	0.203	0.257	0.027–2.406
	35	1	0.026	4	0.095	1.617	0.203	0.257	0.027–2.406
	48	0	0.000	2	0.048	1.856	0.173	0.000	–
	55	0	0.000	3	0.071	2.820	0.093	0.000	–
DRB1	09	6	0.158	3	0.071	1.494	0.222	2.438	0.565–10.523
	11	3	0.079	1	0.024	1.277	0.258	3.514	0.350–35.322
	12	6	0.158	11	0.262	1.290	0.256	0.528	0.174–1.604

(YMDD16例、YIDD21例和YVDD19例)HLA多态性进行了检测和分析, 结果表明HLA-DRB1*03和B*58等位基因频率在YMDD变异组明显低于YMDD野生组(P = 0.024和P = 0.036), 说明含有HLA-DRB1*03和B*58等位基因的患者可能不易发生YMDD变异; HLA-A*33等位基因频率在YVDD变异组显著高于YIDD变异组(P = 0.028), 但在YMDD变异组与YMDD野生组比较中无差异, 说明含有HLA-A*33等位基因的患者可能与YMDD变异发生无关, 但若发生YMDD变异则可能以YVDD变异为主.HLA-A*30等位基因分布频率在YIDD组明显高于YVDD组, 为7倍以上增高(OR = 7.688, P = 0.034), 但在YMDD变异组与YMDD野生组比较中无差异, 说明含有这些等位基因的患者也可能与YMDD变异发生无关, 但若发生YMDD变异则可能以YIDD变异为主. 另外, HLA-B*40, DRB1*07和DRB1*15等位基因分布频率在YMDD变异组都高于YMDD野生组2倍以上, 但统计学上差异不显著, 而且在变异分型比较中这些等位基因都未见明显差异, 提示含有这些等位基因的患者可能有发生YMDD变异的趋势, 但没有变异类型上的差异, 其确切的临床意义还有待于扩大标本量进一步研究.

4 参考文献

1 Tran TT, Martin P. Hepatitis B: epidemiology and natural history. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 255-266

2 谷鸿喜, 徐子龙, 刘建宇, 钟照华, 王华庆, 张淑云, 李迪, 张海红, 阿部贤治. 多引物对巢式PCR法检测HBV基因型的流行病学分析. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1073-1076

3 Humphries JC, Dixon JS. Antivirals for the treatment of chronic hepatitis B: current and future options. *Intervirology* 2003; 46: 413-420

4 Quan DJ, Peters MG. Antiviral therapy: nucleotide and nucleoside analogs. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 371-385

5 Ling R, Mutimer D, Ahmed M, Boxall EH, Elias E, Dusheiko GM, Harrison TJ. Selection of mutations

in the hepatitis B virus polymerase during therapy of transplant recipients with lamivudine. *Hepatology* 1996; 24: 711-713
6 Tipples GA, Ma MM, Fischer KP, Bain VG, Kneteman NM, Tyrrell DL. Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine *in vivo*. *Hepatology* 1996; 24: 714-717
7 Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, Tipples GA, Walters KA, Tyrrell DL, Brown N, Condreay LD. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. *Hepatology* 1998; 27: 1670-1677
8 Suzuki F, Tsubota A, Arase Y, Suzuki Y, Akuta N, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Ikeda K, Kobayashi M, Matsuda M, Satoh J, Takagi K, Kumada H. Efficacy of lamivudine therapy and factors associated with emergence of resistance in chronic hepatitis B virus infection in Japan. *Intervirology* 2003; 46: 182-189
9 Liaw YF, Leung NW, Chang TT, Guan R, Tai DI, Ng KY, Chien RN, Dent J, Roman L, Edmundson S, Lai CL. Effects of extended lamivudine therapy in Asian patients with chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. *Gastroenterology* 2000; 119: 172-180
10 Wright TL. Clinical trial results and treatment resistance with lamivudine in hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2004; 24 Suppl 1: 31-36
11 Leung N. Treatment of chronic hepatitis B: case selection and duration of therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 409-414
12 Zollner B, Petersen J, Schroter M, Laufs R, Schoder V, Feucht HH. 20-fold increase in risk of lamivudine resistance in hepatitis B virus subtype adw. *Lancet* 2001; 357: 934-958
13 Wang YG, Zhu WJ, Yang XL. Investigation of the relationships between HBV YMDD variation and its genotypes. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2005; 13: 193, 197
14 Li D, Gu HX, Zhang SY, Zhong ZH, Zhuang M, Hattori T. YMDD mutations and genotypes of hepatitis B virus in northern China. *Jpn J Infect Dis* 2006; 59: 42-45
15 Song JW, Zhang G, Lin JG, Tang WX, Lin JS. Clinical study of lamivudine and interferon combinate administration to inhibit hepatitis B virus replication. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2004; 12: 593-596
16 Lin CL, Tsai SL, Lee TH, Chien RN, Liao SK, Liaw YF. High frequency of functional anti-YMDD and -mutant cytotoxic T lymphocytes after in vitro expansion correlates with successful response to lamivudine therapy for chronic hepatitis B. *Gut* 2005; 54: 152-161
17 Wolters LM, Niesters HG, Hansen BE, van der Ende ME, Kroon FP, Richter C, Brinkman K, Meenhorst PL, de Man RA. Development of hepatitis B virus resistance for lamivudine in chronic hepatitis B patients co-infected with the human immunodeficiency virus in a Dutch cohort. *J Clin Virol* 2002; 24: 173-181
18 Seehofer D, Rayes N, Steinmuller T, Muller AR, Settmacher U, Neuhaus R, Radke C, Berg T, Hopf U, Neuhaus P. Occurrence and clinical outcome of lamivudine-resistant hepatitis B infection after liver transplantation. *Liver Transpl* 2001; 7: 976-982
19 Bock CT, Tillmann HL, Torresi J, Klempnauer J, Locarnini S, Manns MP, Trautwein C. Selection of hepatitis B virus polymerase mutants with enhanced replication by lamivudine treatment after liver transplantation. *Gastroenterology* 2002; 122: 264-273
20 Wang FS. Current status and prospects of studies on human genetic alleles associated with hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 641-644
21 Kacprzak-Bergman I, Nowakowska B. Influence of genetic factors on the susceptibility to HBV infection, its clinical pictures, and responsiveness to HBV vaccination. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2005; 53: 139-142
22 He YL, Zhao YR, Zhang SL, Lin SM. Host susceptibility to persistent hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4788-4793
23 Wang C, Tang J, Song W, Lobashevsky E, Wilson CM, Kaslow RA. HLA and cytokine gene polymorphisms are independently associated with responses to hepatitis B vaccination. *Hepatology* 2004; 39: 978-988
24 Godkin A, Davenport M, Hill AV. Molecular analysis of HLA class II associations with hepatitis B virus clearance and vaccine nonresponsiveness. *Hepatology* 2005; 41: 1383-1390
25 Wu YF, Wang LY, Lee TD, Lin HH, Hu CT, Cheng ML, Lo SY. HLA phenotypes and outcomes of hepatitis B virus infection in Taiwan. *J Med Virol* 2004; 72: 17-25
26 Thio CL, Thomas DL, Karacki P, Gao X, Marti D, Kaslow RA, Goedert JJ, Hilgartner M, Strathdee SA, Duggal P, O'Brien SJ, Astemborski J, Carrington M. Comprehensive analysis of class I and class II HLA antigens and chronic hepatitis B virus infection. *J Virol* 2003; 77: 12083-12087
27 张淑云, 李迪, 谷鸿喜, 李兴库, 金茜, 刘伟, 杜博, 卢滨. HBV感染者人类白细胞Ⅰ, Ⅱ类抗原等位基因多态性分析. 世界华人消化杂志 2006; 14: 963-968
28 Han YN, Yang JL, Zheng SG, Tang Q, Zhu W. Relationship of human leukocyte antigen class II genes with the susceptibility to hepatitis B virus infection and the response to interferon in HBV-infected patients. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5721-5724
29 钱毅, 章廉, 侯金林. 慢性乙型肝炎病毒感染者干扰素治疗无应答与HLA−DRB1*07的相关性. 免疫学杂志 2002; 18: 371−374, 377
30 Chu RH, Ma LX, Wang G, Shao LH. Influence of HLA-DRB1 alleles and HBV genotypes on interferon-alpha therapy for chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4753-4757
31 林菊生, 程元桥, 田德英, 廖家志, 刘南植, 熊平, 梁扩寰. HLA−DRB$_1$和肿瘤坏死因子α基因多态性与肝硬化的遗传易感性. 中华内科杂志 2002; 41: 818-821
32 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订. 病毒性肝炎防治方案. 中华传染病杂志 2001; 19: 56-62
33 Dienstag JL, Cianciara J, Karayalcin S, Kowdley KV, Willems B, Plisek S, Woessner M, Gardner S, Schiff E. Durability of serologic response after lamivudine treatment of chronic hepatitis B. *Hepatology* 2003; 37: 748-755
34 Perrillo RP, Lai CL, Liaw YF, Dienstag JL, Schiff ER, Schalm SW, Heathcote EJ, Brown NA, Atkins M, Woessner M, Gardner SD. Predictors of HBeAg loss after lamivudine treatment for chronic hepatitis B. *Hepatology* 2002; 36: 186-194
35 Honkoop P, de Man RA, Zondervan PE, Schalm SW. Histological improvement in patients with chronic hepatitis B virus infection treated with lamivudine. *Liver* 1997; 17: 103-106

电编 张焕兰 编辑 张焕兰

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2006年10月18日; 14(29): 2865-2867
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

食管上段胃黏膜异位症

唐 宇, 马洪升

唐宇, 马洪升, 四川大学华西医院消化内科 四川省成都市 610041
通讯作者: 马洪升, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院消化内科. tangyuchinatown@163.com
收稿日期: 2006-06-20 接受日期: 2006-08-10

摘要

食管上段胃黏膜异位症(heterotopic gastric mucosa in upper esophagus, HGMUE)是胚胎发育时期鳞状上皮不完全取代柱状上皮形成的先天性残余病变. 发病率0.1%-10%, 患者多无临床症状, 但也可以出现胸骨后烧灼感、吞咽困难或疼痛、咽部不适等症状, 可导致溃疡、穿孔、瘘管、狭窄等并发症. 诊断依赖内镜和活检. 处理包括随访、对症、内镜下黏膜切除、局段食管切除等. 我们就该病变相关研究资料作一全面综述.

关键词: 上段食管; 异位胃黏膜

唐宇, 马洪升. 食管上段胃黏膜异位症. 世界华人消化杂志 2006;14(29):2865-2867
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2865.asp

0 引言

食管上段胃黏膜异位症(heterotopic gastric mucosa in upper esophagus, HGMUE)是一种先天性胚胎残余病变, 是指食管上段存在有胃黏膜. 随着内镜技术水平的提高及人们对本病认识的提高, 其发现率逐渐增加. 由于有不少报道证实其有癌变的趋势, 使广大学者对其倍加重视. 我们就HGMUE的发病机制、临床表现、治疗、预后等方面的研究进展作一全面综述.

1 发病情况

Schmidt于1805年首次报道该病, 儿童尸检发现率达4.5%. HGMUE的发病率国外报道从5%到10%不等[1], 国内多在0.1%-1%之间, 可能因为国内实际发病率低, 或是对该病的重视程度和警惕性不够所致. 据Maconi *et al*[2]报道, 若医师镜检时特别注意, 检出率为2.27%, 不注意时则为0.3%. 其发病与年龄、性别无关. 普遍接受的观点是: HGMUE是胚胎发育时期鳞状上皮不完全取代柱状上皮形成的先天性残余病变. 食管是从内胚叶的前肠发生的, 发生初期被覆腺上皮, 以后逐渐被柱状上皮置换, 出生5 mo左右被鳞状上皮替换, 这种置换是从食管中部开始分别向上下两个方向进行, 该替换过程可以因某种原因而中途停止, 食管上段因置换不完全而残留的柱状上皮被称为异位性胃黏膜, 食管下段残留的柱状上皮被称为先天性Barrett食管上皮. Feurle *et al*[3]用免疫组化检测比较HGMUE和Barrett食管上皮, 显示两者都含有分泌胰高血糖素、生长抑素、血清素抗体和胰多肽的细胞, HGMUE还含有胃泌素细胞, Barrett上皮则还含有神经紧张素细胞, 提示可能在两者的鉴别中发挥作用. 另一种观点认为, HGMUE的形成有多种因素的联合作用: 创伤、反流、感染等因素损伤了原有的鳞状上皮, 异位胃黏膜继发性增生以修复损伤, 从而表现为黏膜固有层内的先天性异常. Chatelain *et al*[4]报道1例HGMUE腺癌, 肿瘤表面和周围的HGMUE都测出具有和Barrett食管相同的免疫组化标志即CK7/CK20阳性, 并推断HGMUE腺癌和Barrett食管有相同的病理机制, 都与胃食管反流有关. 多位学者研究证实, 异位胃黏膜存在G细胞, 并可分泌胃泌素、生长抑素, 亦有泌酸功能[5-6].

2 临床表现

大多数HGMUE患者无任何症状, 部分患者可出现胸骨后烧灼感或疼痛、吞咽困难或吞咽痛、咽部球状异物感、声音嘶哑、咳嗽等, 与异位的胃黏膜内的壁细胞分泌胃酸破坏食管黏膜有关, 严重者甚至可并发溃疡、穿孔、出血、狭窄、气管食管瘘[7-9]而出现相应的症状. HGMUE的泌酸功能可能是引起咽喉反流导致咽喉炎的原因. 一项以儿童为对象的研究提示, 有HGMUE的儿童更易发生呼吸道症状. 异位性胃黏膜可以是单发性, 亦可以是多发性的黏膜片段, 常发生于食管的上1/3段, 近环咽肌水平. 国外的报道是食管起始3 cm段好发, 多位于侧壁和后

■背景资料
食管上段胃黏膜异位症(HGMUE)是胚胎发育时期鳞状上皮不完全取代柱状上皮形成的先天性残余病变. 发病率0.08%-20%, 患者可以出现胸骨后烧灼感、吞咽困难或疼痛、咽部不适等症状, 可导致溃疡、穿孔、瘘管、狭窄等并发症. 诊断依赖内镜和活检. 处理包括随访、对症、内镜下黏膜切除、局段食管切除等.

■同行评价
胃黏膜异位症在临床上较为少见，对该病的流行病学资料、临床表现、病理和治疗等进行总结认识有利于提高对该类疾病的认识. 本文较全面综述了病理，机制，临床，分类，治疗等，可提高医生对这一少见病认识，有一定的科学性和可读性.

壁，也可环绕食管全周径，若为双发则多形成对吻性. 镜下可见表面被覆桔红色黏膜的圆形或卵圆形嵌入斑片(inlet patch)，边界清晰，与周围灰珍珠色的正常食管鳞状上皮区别明显，直径可从几个微米到30 mm以上. 一些微小的异位斑片可能被周围鳞状上皮掩盖而不易发现. 斑片表面一般光滑，可以呈平坦、凹陷或息肉样隆起. 该病变易漏诊，镜检时应特别注意食管上段环咽肌远端数厘米区域，缓慢退镜，重复少量注气扩张并旋转镜身. 另外，镜下也可能见到并发的溃疡、瘘管、狭窄、息肉、食管蹼等病变.

异位斑片的病理组织学检查显示，类似胃黏膜的柱状上皮比正常胃黏膜薄，其中含有壁细胞和主细胞. 胃底型、**胃窦型和两者的过渡**型都有报道，比例不近一致，以胃底型居多. 斑片周围多有轻到中度的慢性炎症，其中幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)的检出率不同的报道差别明显，从3%-73%不等. Jacobs *et al*[10]在33例HGM患者中仅检出1例*H pylori*阳性，认为*H pylori*与HGMUE周围的炎性浸润无关. 而Gutierrez *et al*[11]研究表明，异位斑片的*H pylori*定植密度与胃内*H pylori*密度关系密切，检出*H pylori*的斑片周围的炎性浸润程度与胃内*H pylori*感染的炎性活动度有关. *H pylori*多位于胃窦部，而且并不是所有HGMUE都能检出*H pylori*，提示胃食管反流可能是*H pylori*定植于HGMUE的原因. Borhan *et al*[12]的结论则是，HGMUE内的*H pylori*感染是*H pylori*阳性胃炎的一个组成部分，不存在胃内*H pylori*阴性而HGMUE内却检出*H pylori*的情况. HGMUE缺乏特异的临床表现，对于患者出现的食管和咽喉部的一些症状，包括胸骨后烧灼感或疼痛、**吞咽困难或吞咽痛、梗噎感、声嘶、咽喉不适甚至咳嗽，都应警惕**HGMUE的可能，及早行内镜检查，镜检时注意好发部位与周围灰色黏膜分界明显的桔红色黏膜斑片，组织学检查见到柱状上皮即可确诊. 国外有学者对HGMUE分级如下[13]：Ⅰ：无症状，无并发的病理形态改变(狭窄、食管蹼、瘘管等)的HGMUE携带者；Ⅱ：有症状，无并发的病理形态改变；Ⅲ：有并发病理形态改变并引起相应的症状；Ⅳ：恶化，形成上皮内肿瘤；Ⅴ：进一步发展为上段食管腺癌. 另外，Tc99高锝酸盐放射性核素显象能显示异位胃黏膜[14]，可作为该病的辅助诊断. 临床医师对HGMUE的认识和警惕性是发现该病的关键.

3 预后及转归

HGMUE泌酸能力的强弱是决定预后的重要因素. 大多数患者的HGMUE斑片终身存在且不引起任何不适. 部分人出现食管和咽喉部症状，经抑酸等对症处理缓解，如未能及时发现病变可能导致溃疡、出血、狭窄、穿孔、瘘管等严重后果，HGMUE有癌变的可能，但多数报道其自身的恶变倾向很低. 据Noguchi *et al*[15]报道，到2004年共发现19例异位性胃黏膜癌变的病例. 19例患者中大多数为男性，女性仅2例. 其他临床病理特征如年龄、肿瘤大小、大体形态、分化程度及浸润程度等均没有差别.

无症状的HGMUE不需要特别治疗或者内镜监测，有症状的患者视具体情况而定，如良性狭窄可行扩张术，针对反流症状可使用抑酸剂，如质子泵抑制剂. 源于HGMUE的食管上段腺癌尚无统一的治疗方案，放化疗后行局段食管切除，有一定效果，早期的腺癌可行内镜下黏膜切除术.

4 参考文献

1 Borhan-Manesh F, Farnum JB. Incidence of heterotopic gastric mucosa in the upper oesophagus. *Gut* 1991; 32: 968-972

2 Maconi G, Pace F, Vago L, Carsana L, Bargiggia S, Bianchi Porro G. Prevalence and clinical features of heterotopic gastric mucosa in the upper oesophagus (inlet patch). *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12: 745-749

3 Feurle GE, Helmstaedter V, Buehring A, Bettendorf U, Eckardt VF. Distinct immunohistochemical findings in columnar epithelium of esophageal inlet patch and of Barrett's esophagus. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 86-92

4 Chatelain D, de Lajarte-Thirouard AS, Tiret E, Flejou JF. Adenocarcinoma of the upper esophagus arising in heterotopic gastric mucosa: common pathogenesis with Barrett's adenocarcinoma? *Virchows Arch* 2002; 441: 406-411

5 Dayal Y, Wolfe HJ. Gastrin-producing cells in ectopic gastric mucosa of developmental and metaplastic origins. *Gastroenterology* 1978; 75: 655-660

6 Kohler B, Kohler G, Riemann JF. Spontaneous esophagotracheal fistula resulting from ulcer in heterotopic gastric mucosa. *Gastroenterology* 1988; 95: 828-830

7 Sanchez-Pernaute A, Hernando F, Diez-Valladares L, Gonzalez O, Perez Aguirre E, Furio V, Remezal M, Torres A, Balibrea JL. Heterotopic gastric mucosa in the upper esophagus ("inlet patch"): a rare cause of esophageal perforation. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 3047-3050

8 Powell RW, Luck SR. Cervical esophageal obstruction by ectopic gastric mucosa. *J Pediatr Surg* 1988; 23: 632-634

9 Garcia AO, Mazzadi SA, Raffo L, Bonfanti M, Salis GB, Arra A, Chiocca JC. Heterotopic gastric mucosa

in the upper esophagus: report of a case with a fistula. *Dis Esophagus* 2002; 15: 262-265
10 Jacobs E, Dehou MF. Heterotopic gastric mucosa in the upper esophagus: a prospective study of 33 cases and review of literature. *Endoscopy* 1997; 29: 710-715
11 Gutierrez O, Akamatsu T, Cardona H, Graham DY, El-Zimaity HM. Helicobacter pylori and hetertopic gastric mucosa in the upper esophagus (the inlet patch). *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1266-1270
12 Borhan-Manesh F, Farnum JB. Study of Helicobacter pylori colonization of patches of heterotopic gastric mucosa (HGM) at the upper esophagus. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 142-146
13 von Rahden BH, Stein HJ, Becker K, Liebermann-Meffert D, Siewert JR. Heterotopic gastric mucosa of the esophagus: literature-review and proposal of a clinicopathologic classification. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 543-551
14 Chen CH, DeRidder PH, Fink-Bennett D, Alexander TJ. Detection of heterotopic gastric mucosa in the upper esophagus with 99mTc-pertechnetate scintigraphy. *J Clin Gastroenterol* 1989; 11: 23-26
15 Noguchi T, Takeno S, Takahashi Y, Sato T, Uchida Y, Yokoyama S. Primary adenocarcinoma of the cervical esophagus arising from heterotopic gastric mucosa. *J Gastroenterol* 2001; 36: 704-709

电编 张敏 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

2007 中华肝胆胰脾外科(国际)学术论坛征文通知

本刊讯 “2007中华肝胆胰脾外科(国际)论坛”应澳门特区外科学会的盛情邀请于2007-04-13/16在澳门举办, 现将征文通知公布如下:

1 征文内容

(1)肝癌诊断及外科与综合治疗: 新诊断技术-可切除与否的界定-综合治疗与序贯化思路-对复发转移的研究进展-微创技术实际应用的可能性; (2)医源性胆管损伤的预防-胆管下端功能状态对修复及重建的影响-肝胆管结石外科治疗的新经验-肝门胆管癌根治性切除的实施与效果; (3)胰腺炎-重症急性、出血坏死性、“凶险性”-治疗中早期复苏的策略与实施-相关并发症的预防和处理; (4)胰腺癌-早期诊断的思路与进展-根治术在当前的含义和尺度-术前减黄与并发症的处理; (5)脾功能研究进展-保脾和切脾含义和抉择-PH时单纯切脾的指征与价值; (6)肝移植-应用指征的决策-供肝切取与保存-技术性与非技术性并发症-再移植-远期存活的努力.

2 投稿要求及截稿日期

来稿请寄未曾公开发表过4000字以内全文及800字论文摘要各1份(无摘要不入汇编)并请在信封上注明“会议征文”. 截稿日期: 2007-01-31. 正式代表发论文证书并授一级继续教育学分. 来稿请寄:《中华肝胆外科杂志》编辑部.

3 联系方式

地址: 北京市复兴路28号; 邮编: 100853; 电话: 010-66936223; 电传: 010-68177009; E-mail: zhgdwkzz@vip.163.com; 详情请登陆网站: www.zhgdwkzz.net.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2006年10月18日; 14(29): 2868-2871
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

糖尿病胃肠道并发症

张天成

■背景资料
糖尿病并发胃肠道疾病是糖尿病的常见并发症之一, 其发病机制不清, 可能与糖尿病自主神经病变、内分泌功能失调、胃肠微血管病变、幽门螺杆菌易感及糖尿病代谢紊乱等因素相关. 临床上表现主要为消化系统症状, 常诊断食道运动障碍、胃轻瘫、应激性溃疡和消化性溃疡、糖尿病性腹泻、糖尿病性便秘; 须行相关辅助检查排除消化道原发疾病以明确. 应尽早防治糖尿病, 积极控制血糖, 改善微循环, 控制和改善内脏神经病变, 同时予以对症治疗减轻症状.

张天成, 上海市第一人民医院宝山分院消化内科 上海市 200940
通讯作者: 张天成, 200940, 上海市第一人民医院宝山分院消化内科. zbh_9000510@yahoo.com.cn
收稿日期: 2006-07-04 接受日期: 2006-08-10

摘要
糖尿病并发胃肠道疾病是糖尿病的常见并发症, 与糖尿病自主神经病变、内分泌功能失调、胃肠微血管病变、幽门螺杆菌易感及糖尿病代谢紊乱等因素相关. 临床上表现为食道、胃、肠道病变, 须行相关辅助检查排除消化道原发疾病以明确诊断. 应在尽早防治糖尿病的基础上积极对症治疗. 本文就此作一综述.

关键词: 糖尿病; 胃肠道; 并发症

张天成. 糖尿病胃肠道并发症. 世界华人消化杂志 2006;14(29):2868-2871
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2868.asp

0 引言
糖尿病作为一种常见的内分泌疾病, 以糖代谢障碍为主, 随着其病程进展, 易发生各种并发症, 分为慢性和急性两类, 而以慢性尤为重要, 是严重影响患者生存质量以及致残致死的主要原因, 可累及全身器官和组织. 糖尿病消化系统并发症是糖尿病常见并发症之一, 食道、胃肠、肝、胆等均可不同程度的累及并产生功能紊乱或(和)病变, 临床表现不一, 主要包括糖尿病性胃肠病、糖尿病性胆石和胆道感染、糖尿病性肝脏病变等. 糖尿病胃肠病变发生率占糖尿病患者的1/2左右, 有报道其中胃部病变占10%左右, 腹泻和便秘各约占20%, 因部分患者无临床表现, 故临床就诊发病率比实际发病率低.

1 发病机制
1.1 自主神经病变 内脏自主神经包括迷走神经和交感神经2种, 糖尿病患者自主神经病变发生率为20%-40%[1], 常与以下几点相关: (1)迷走神经和交感神经节发生退行性改变, 进而引起胃肠蠕动功能和分泌功能下降, 导致胃轻瘫、胃潴留、便秘等; 同时, 因为内脏神经节的病变, 导致迷走神经与交感神经电偶联异常, 电偶联增强时使肠蠕动增加, 产生腹泻, 电偶联减弱时, 则表现为便秘. (2)胃肠暴发峰电位减弱, 影响胃肠的协调性运动, 导致便秘等发生[2].

目前有多种关于自主神经病变学说: (1)多元醇通路学说: 糖尿病时, 多元醇通路活性增加, 在醛糖还原酶作用下, 产生一系列酶联反应, 使神经细胞内山梨醇通路代谢上升, 果糖生成增加, 易致神经细胞水肿. (2)山梨醇-肌醇失常学说: 糖尿病患者常有肌醇水平降低, 代谢产物磷酸肌醇生成减少, 致使神经元细胞膜上K^+-Na^+-ATP酶活性下降, Na^+在细胞内增加, 导致神经节去极化减弱, 神经传导速度下降或失去. (3)氧自由基学说: 糖尿病患者糖代谢过程中可产生大量的超氧化物和过氧化氢, 这些高度活性物质在神经组织中的增加使神经细胞膜磷脂内不饱和磷脂酸发生过氧反应, 导致一系列生化反应和结构改变, 引起胃肠神经功能异常. (4)蛋白质非酶糖化学说: 由于糖尿患者过度糖化终末产物(AGEs)生成增加, 其参与修饰神经细胞内蛋白质表达, 引起神经元细胞功能障碍.

1.2 内分泌功能失调[3] (1)胃泌素: 胃泌素是一种简明结构的胃-肠-胰(GEP)激素, 为血清中主要的循环激素之一, 其生理作用包括促进胃酸分泌和营养胃黏膜并刺激胃黏膜生长、修复. 当糖尿病患者伴有自主神经病变, 迷走神经对胃泌素分泌调控作用减弱, 致使出现高胃泌素血症, 诱发胃炎和溃疡等. (2)胃动素: 胃动素系22个氨基酸多肽组成, 主要由十二指肠及空肠黏膜分泌, 结肠和远端小肠也有少量分泌, 在消化间期时血中含量最高, 以促进胃肠内未消化食物残渣排空. 糖尿病患者迷走神经病变时, 胃动素分泌下降, 导致胃动力障碍发生. (3)胰高血糖素: 胰高血糖素是胰腺A细胞分泌的一种29氨基酸残基单链多肽, 参与抑制胃、小肠、结肠张力及蠕动, 抑制胆囊收缩和胰外分泌以及抑制肠道对水、盐的吸收. 自主神经病变引起其分泌量改变, 容易导致腹泻和便秘等肠道并发

症的发生. (4)胆囊收缩素: 由十二指肠和空肠黏膜中I细胞或CCK细胞分泌, 有刺激胰岛素、胰消化酶合成和分泌、胆囊收缩、Oddi氏括约肌舒张等作用, 同时CCK神经也参与胃肠道功能调节. 糖尿病自主神经病变时, 胆囊收缩素分泌障碍, 引起和加重相关消化系症状或疾病. (5)胰多肽: 为36氨基酸多肽, 由胰PP细胞分泌, 是强力胰腺外分泌抑制剂, 对胰液外分泌起重要的负调控作用. 糖尿病患者常有胃多肽分泌障碍. (6)生长抑素: 其活性成分为小环状14肽, 主要由神经核分泌合成, 少量D细胞分泌, 参与抑制胃液、胃酸、胰液、肝胆汁、消化酶等分泌, 抑制消化道多肽类激素的分泌, 抑制胃肠蠕动和对葡萄糖、果糖的吸收. 糖尿病患者大多有生长抑素分泌下降. (7)P物质: 是第一个发现的一种脑肠肽, 由十一个氨基酸残基组成, 在整个胃肠道均有分布, 主要存在于十二指肠和空肠EC1细胞内, 是促进胃肠运动的神经递质, 糖尿病胃肠病变患者血浆P物质水平低于单纯糖尿病患者[4].

1.3 胃肠微血管病变和血流变异常及血液理化改变 糖尿病患者微血管病变主要表现为血管基底膜糖蛋白沉积引起血管壁增厚, 伴有内皮细胞增生, 使血管管腔狭窄, 形态扭曲, 加上高血糖引起的血黏滞度升高和血小板、红细胞聚集增加, 容易引起血流减慢, 甚至于导致血栓形成或血管闭塞, 导致胃肠黏膜水肿、糜烂和溃疡. 胃肠微血管病变和血流变异常发生与蛋白激酶C(PKC)活性增加有关, PKC活化是糖尿病血管并发症的重要生化机制: (1)细胞内PKC通路参与血管功能调节, 包括血管舒缩、通透性、基底膜再生、内皮细胞生长、血管再生、血流动力学和血凝机制等; (2)参与NO生成调节: 一方面抑制NO合成酶的活性, 使NO生成减少, 另一方面又可抑制NO介导的cGMP生成, 导致微血管动力学改变; (3)通过调节V-W因子的分泌, 增加PAI-1含量和活性, 增强血小板功能, 使糖尿病患者血液高凝和高黏滞度. 过度糖化终末产物(AGEs)在血管中长期蓄积, 以共价键的形式与蛋白质相结合, 在微血管和血流异常时, 使胶原蛋白质和血浆蛋白之间发生不可逆性交联, 导致微血管基底膜增厚, 血流变更加异常, 甚至于血管腔阻塞. 糖尿病血液易产生高凝状态, 进一步加重了器官和组织的缺氧, 这主要与血液理化改变有关, 如高血脂、高血糖、低氧血症、血小板黏附增加等.

1.4 幽门螺杆菌感染 有研究表明, 糖尿病胃轻瘫患者幽门螺杆菌感染率为75.56%, 远高于糖尿病无胃轻瘫患者的幽门螺杆菌感染率的43.85%, 后者感染率与普通正常人群接近, 提示幽门螺杆菌与糖尿病胃轻瘫相关[5].

1.5 胆酸吸收障碍 因糖尿病患者胆汁酸吸收不良, 排泄增加, 加之其有刺激肠道蠕动作用, 故常易导致腹泻.

1.6 胰腺外分泌功能障碍 胰腺内分泌激素有促进胰腺腺泡生长的作用, 特别是胰岛素, 当胰岛素分泌不足时, 糖尿病患者常有不同程度的外分泌功能障碍, 表现为脂肪吸收不良性腹泻.

1.7 酮症酸中毒 酮症酸中毒时, 患者常伴有中毒产物增加、低氧血症、水电解质平衡紊乱等, 使胃黏膜微循环障碍, 产生缺血缺氧, 引起胃黏膜广泛充血、水肿、糜烂、出血, 甚至于产生溃疡.

2 临床表现

2.1 食道 大多数患者无食道症状, 为亚临床表现. 有症状者, 与食道动力障碍有关, 通常表现为: 胸骨后不适、返酸、嗳气, 更有甚者发生吞咽困难.

2.2 胃 (1)糖尿病性胃轻瘫: 1/3左右的糖尿病患者出现胃轻瘫, 老年糖尿病患者发病率更高, 可达70%左右, 主要表现为胃动力障碍、排空延迟所致的上腹胀、早饱、嗳气或模糊不清的上腹不适感, 严重者出现恶心、呕吐, 表现为胃潴留、胃扩张等. Jones *et al*研究发现, 上腹饱胀感与胃轻瘫明显相关, 且胃排空延迟女性患者明显高于男性[6]. (2)应激性溃疡: 在应激状态下(如感染、创伤、手术等), 患者因胃黏膜缺血、血流量下降、胃黏膜黏液分泌下降、上皮更新速度减慢、前列腺素生成减少、胃酸作用可导致上腹痛、呕吐咖啡色液体、黑便并伴有头晕、乏力出汗、口干等失血表现, 更有甚者发生失血性休克. (3)消化性溃疡: 在糖尿病患者中, 可发生消化性溃疡, 主要为胃溃疡, 十二指肠发生率低, 这可能与低胃酸分泌有关.

2.3 肠道 (1)糖尿病性腹泻: 糖尿病性腹泻主要与糖尿病所致内脏植物神经变性有关, 也可因小肠内细菌异常繁殖所致. 多表现为间歇性水样泻或脂肪泻, 有时腹泻与便秘交替出现, 也可表现为顽固性水样泻, 往往无明显诱因且以夜间多发. 大多数患者伴有周围神经性病变(包括肌张力下降、腱反射减弱、四肢末梢感觉异常等)

和自主神经病变(瞳孔对光反射减弱、多汗、尿潴留、大便失禁等), 多发生于长期胰岛素依赖型糖尿病患者, 且血糖控制不良者. (2)糖尿病性便秘: 糖尿病性便秘是糖尿病患者中常见的消化道症状之一, 约2/3的糖尿病患者有便秘史, 糖尿病并发广泛神经病变患者便秘发生率约90%, 主要因结肠动力障碍所致, 有的患者表现为结肠扩张, 甚至肠梗阻[4].

3 诊断与鉴别诊断

诊断原则: 有明确的糖尿病病史, 需除外胃肠道自身的器质性病变、其他系统疾病和药物反应、精神因素等影响. (1)食道运动障碍: 通过食道测压确诊并需胸部X线或CT、食道吞钡或胃镜检查除外食道本身及其周围占位性病变或者器质性病变, 如食道炎、食道癌、纵隔肿瘤等. (2)胃轻瘫: 双核素固体和液体食物排空时间检查被认为是诊断本病的金标准[7], 有报道B超和胃肠电图也可作出诊断, 但首先需上消化道钡餐或胃镜等检查排外消化道器质性病变和其他全身性疾病. (3)应激性溃疡和消化性溃疡: 均须通过胃镜检查确诊. 应激性溃疡镜下表现为: 胃窦或胃角充血、水肿糜烂、出血, 消化性溃疡应注意与胃癌、胃淋巴瘤等相鉴别. (4)糖尿病性腹泻: 因糖尿病性腹泻无特异性, 故诊断需除外其他原因所致, 如肠源性、胰源性、肝胆源性和其他全身性疾病, 必要时小肠镜或胶囊内镜检查除外小肠病变. (5)糖尿病性便秘: 诊断为排除性, 钡灌肠、肠镜除外结肠器质性病变如克罗恩病、结肠炎、结肠癌等后方可确诊[8].

4 治疗

原则: 由于糖尿病胃肠病变的发生与血糖控制不良、微循环病变、自主神经变性等密切相关, 故治疗上需考虑: 积极控制血糖, 改善微循环, 控制和改善内脏神经病变.

4.1 *食道运动障碍* (1)积极控制血糖. (2)饮食治疗: 采用低脂低糖高纤维素饮食. (3)药物治疗: 上腹烧灼感者, 可加用抗酸剂(H2受体抑制剂或质子泵抑制剂); 上腹饱胀感者, 可加用胃动力药(如吗丁啉等), 若并发有霉菌感染需加用抗霉菌药等.

4.2 *胃轻瘫* (1)控制血糖. (2)饮食治疗. (3)营养神经: B族维生素、肌醇片等. (4)对症治疗: 中枢和外周多巴胺受体拮抗剂, 胃复安, 一般采用10-20 mg, tid; 吗丁啉, 常用剂量10-20 mg, tid. 胃动素受体激动剂, 一般采用红霉素, 200 mg, qd. (5)呕吐剧烈伴有脱水患者, 应积极纠正水电解质平衡. (6)幽门螺杆菌根除治疗: 一般采用质子泵抑制剂加甲硝唑、阿莫西林和克拉霉素等3种抗生素中的任意2种组成三联方案的1 wk疗法, 青霉素过敏者, 采用不选用阿莫西林的三联方案, 根治失败者, 可加用铋制剂等组成四联用药方案. (7)手术: Watkins *et al*发现胃切除术能明显缓解糖尿病胃轻瘫所致的难治性呕吐且无反弹[9].

4.3 *应急性溃疡* 积极去除诱因, 加用抗酸类针剂药物(H2受体抑制剂或质子泵抑制剂), 病情严重者, 应禁食、胃肠减压, 补液、输血等抗休克治疗.

4.4 *消化性溃疡* 治疗以抑酸、保护胃黏膜为主, 有饱胀者, 加用胃动力药(吗丁啉), 幽门螺杆菌阳性者, 需根除治疗: 一般采用质子泵抑制剂加甲硝唑、阿莫西林和克拉霉素等3种抗生素中的任意两种组成三联方案的2 wk疗法, 青霉素过敏者, 采用不选用阿莫西林的三联方案, 根治失败者, 可加用铋制剂等组成四联用药方案.

4.5 *糖尿病性腹泻* 除积极控制血糖、营养神经、饮食治疗外, 并发感染者需加用抗生素, 一般选用抗革兰氏阴性菌和厌氧菌类药物, 如青霉素、甲硝唑等. 其他药物治疗包括: 思密达, 得每通胶囊, 消胆胺, 生长抑素等.

4.6 *糖尿病性便秘* 高纤维素饮食配合促动力药(西沙比利等)以及改善大便性状类药物(福松等)进行治疗, 效果欠佳和顽固性便秘者可结合直肠电生理反馈治疗.

5 预防

糖尿病胃肠病变患者应积极进行二级和三级预防, 在积极控制血糖的情况下, 尽量避免诱发因素, 如感染、外伤等, 同时患者应在医生的指导下合理饮食、用药、控制体质量等, 以有效控制疾病进展.

6 参考文献

1 Vinik A, Mitchell B. Clinical aspects of diabetic neuropathies. *Diabetes Metab Rev* 1988; 4: 223-253
2 刘剑锋. 糖尿病性胃肠病变的胃肠动力学改变.《国外医学》内分泌学分册 1995; 15: 195-196
3 萧树东. 江绍基胃肠病学. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 2001: 55-60
4 孔维, 孙侃. 胃肠激素与糖尿病结肠功能紊乱. 世界华人消化杂志 2006; 14: 519-521
5 张春芳, 赵文. 2型糖尿病患者与幽门螺杆菌感染. 医师进修杂志 2002; 25: 26-27

6 Jones KL, Russo A, Stevens JE, Wishart JM, Berry MK, Horowitz M. Predictors of delayed gastric emptying in diabetes. *Diabetes Care* 2001; 24: 1264-1269
7 Tosetti C, Stanghellini V, Tucci A, Poli L, Salvioli B, Biasco G, Paparo GF, Levorato M, Corinaldesi R. Gastric emptying and dyspeptic symptoms in patients with nonautoimmune fundic atrophic gastritis. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 252-257
8 邝贺龄. 内科疾病鉴别诊断学. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 321-323
9 Watkins PJ, Buxton-Thomas MS, Howard ER. Long-term outcome after gastrectomy for intractable diabetic gastroparesis. *Diabet Med* 2003; 20: 58-63

电编 张敏 编辑 张焕兰

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

• 消息 •

中国中西医结合学会第九次全国中西医结合影像学术交流大会

本刊讯 兹定于2007-05-10/14, 在泰安市泰山饭店召开中国中西医结合学会影像学专业委员会第九次学术会议暨全国中西医结合影像诊断与研究学习班. 欢迎相关领域研究人员、医师与会交流经验. 现将有关征文事项通知如下:

1 征文内容及类别

大会征集内容包括: (1)中西医结合影像学的基础与临床应用研究; (2)影像学(包括X线、CT、MRI、USG及核素等)的临床应用; (3)介入技术的临床应用; (4)其他传统医学, 如针灸等方面的影像学研究及有关信息的交流; (5)影像学最新进展介绍及有关信息的发布. 文章内容可涉及: 有创新意义的实验研究、临床论著、综述、技术交流、经验介绍及临床病例报告、短篇、个案等.

2 征文要求

来稿请寄3000字左右全文及300字左右摘要各一份, 统一用A4纸打印并附3.5寸Word文档软盘(发E-mail者可不交软盘). 软盘文件名或E-mail的主题请注明“中西医影像学术会议征文”; 来稿必须附单位介绍信, 注明论文作者署名无争议、不涉及保密、无一稿多投. 已在全国公开发行的刊物上发表的论文不再采用; 稿件请自留底稿, 概不退稿.

3 联系方式及截止日期

山东省济南市文化西路42号《中国中西医结合影像学杂志》编辑部. 邮编: 250011; 电话: 0531-82950414-6689; E-mail: yxbjb@163.com; 1jb@sdzydfy.com. 2006-12-30截止收稿, 以当地邮戳为准.

4 其他

大会同期将举办国家级继续教育项目: 中国中西医结合影像学诊断与研究学习班. 届时将邀请国内知名专家前来讲学, 并授予国家级继续教育学分.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年10月18日; 14(29): 2872-2875
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

不同给药途径对大鼠溃疡性结肠炎结肠黏膜EGF表达的影响

王雪茜, 王新月, 杨莉莉

■背景资料
溃疡性结肠炎被世界卫生组织列为现代难治性疾病之一, 是中医消化胃肠领域所关注的热点. 目前中医药对本病的研究主要集中在经方验方的疗效方面, 少数研究应用现代方法技术探讨了单独药物或方剂的治疗机制, 鲜有报道把关注热点集中在给药途径的比较上.

王雪茜, 王新月, 杨莉莉, 北京中医药大学东直门医院 北京市 100700
国家自然科学基金资助项目, No. 30572390
国家中医药管理局中医药科学技术研究基金资助项目, 国中医药科02-03GP03
通讯作者: 王新月, 100700, 北京市东城区海运仓5号, 北京中医药大学东直门医院. wxy6687@sina.com
电话: 010-84013361
收稿日期: 2006-05-19 接受日期: 2006-06-30

Effects of different administration approaches on expression of epidermal growth factor after in rats with ulcerative colitis

Xue-Qian Wang, Xin-Yue Wang, Li-Li Yang

Xue-Qian Wang, Xin-Yue Wang, Li-Li Yang, Dongzhimen Hospital affiliated to Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30572390, and State Administration of Chinese Medicine Science and Technology Foundation of China, National Chinese Medicine Department 02-03GP03
Correspondence to: Dr. Xin-Yue Wang, Dongzhimen Hospital affiliated to Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 5 Haiyuncang, Dongcheng District, Beijing 100700, China. wxy6687@sina.com
Received: 2006-05-19 Accepted: 2006-06-30

Abstract

AIM: To observe the effects of *Kui Jieyin* given in different ways on the expression of mucosal epidermal growth factor (EGF) in the rectum and colon of rats with ulcerative colitis (UC), and explore a better method for the treatment of UC.

METHODS: The UC rat model was induced by intermixture of TNBS and ethanol. All the rats were divided into 5 groups. Normal group (n = 15) and model group (n = 15) were given distilled water. The rest rats were intragastrically administered with olsalazine sodium (group A) or *Kui Jieyin* (group B), or treated with *Kui Jieyin* enema (group C). Then the expression of rectal and colonic mucosal EGF was detected by immunohisthchemical staining.

RESULTS: After drugs interference, the expression of colonic mucosal EGF in UC was increased, especially in group B and C. For the active UC, the expression of EGF was higher in group B than that in group C (no significance) or A (0.312 ± 0.160 *vs* 0.217 ± 0.052, $P < 0.05$). The drugs had no marked effect on the UC in the middle stage. For the late-stage UC, expression of EGF was significantly increased in group B and C. Furthermore, there was notable difference between group C and B (0.372 ± 0.132 *vs* 0.307 ± 0.101, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Intragastric administration of *Kui Jieyin* is superior in the acute stage of UC, while *Kui Jieyin* clyster has constant effect from the beginning to the end of this disease. Combination of these two approaches may accelerate the concrescence of ulcer.

Key Words: *Kui Jieyin*; Epidermal growth factor; Ulcerative colitis; Rats

Wang XQ, Wang XY, Yang LL. Effects of different administration approaches on expression of epidermal growth factor after in rats with ulcerative colitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(29):2872-2875

摘要

目的: 观察中药溃结饮不同给药途径对大鼠溃疡性结肠炎结肠黏膜EGF表达水平的影响, 揭示口服与灌肠给药结肠黏膜修复的作用特点, 获得指导合理选择用药途径, 制定综合治疗方案的理论和实验依据.

方法: 采用TNBS/乙醇法造模, 将大鼠随机分为5组, 正常组和模型组蒸馏水灌胃, 其余分别为奥沙拉秦钠灌胃组, 溃结饮灌胃组和灌肠组. 采用免疫组化方法及图像分析测定不同给药途径下, 结肠黏膜表皮生长因子(EGF)表达的动态变化.

结果: 药物干预后大鼠溃疡性结肠炎结肠黏

膜EGF表达含量增加, 溃结饮治疗组别优势明显. 急性期溃结饮灌胃后EGF表达量超过溃结饮灌肠组和奥沙拉秦钠组, 与灌肠组比较无统计学意义, 与奥沙拉秦钠组比较差异有显著性(0.312±0.160 *vs* 0.217±0.052, $P<0.05$). 病程中期药物干预作用不明显. 后期中药溃结饮无论在灌胃还是在灌肠方面都显示出其增加黏膜EGF含量的优势, 且溃结饮灌肠组优于溃结饮灌胃组, 两者比较差异有显著性(0.372±0.132 *vs* 0.307±0.101, $P<0.05$).

结论: 溃结饮灌胃起效快, 急性期占一定优势; 溃结饮灌肠起效较慢, 从开始发挥作用直至病程末期都能良好促进黏膜修复. 联合应用两种给药方法, 急性期和中后期分别以口服和灌肠为主治疗本病, 可能会有效缩短黏膜修复时间, 加快溃疡愈合.

关键词: 溃结饮; 表皮生长因子; 溃疡性结肠炎; 大鼠

王雪茜, 王新月, 杨莉莉. 不同给药途径对大鼠溃疡性结肠炎结肠黏膜EGF表达的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(29):2872-2875

http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2872.asp

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)以腹痛、腹泻、黏液脓血便、里急后重为主要临床表现, 被世界卫生组织列为现代难治性疾病之一, 是当前中医消化胃肠领域所关注的热点. 临床治疗UC的途径与方法多样, 主要以口服、灌肠及口服灌肠相结合为主. 究竟口服和灌肠治疗哪一种方式更有利于溃疡的愈合和疾病的康复尚无深入研究. 溃结饮为田德禄老师临床治疗UC的经验方之一[1], 主要组成有黄柏、苦参、炮姜、肉桂粉、三七粉等, 疗效确切. 本实验通过比较中药溃结饮不同给药途径及西药奥沙拉秦钠对UC大鼠结肠黏膜EGF表达水平的影响, 揭示在口服与灌肠给药在黏膜修复方面的作用特点. 获得合理选择UC用药途径和制定综合治疗方案的指导理论和实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级健康♂SD大鼠, 体质量180-220 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物合格证号SCXK京2002-0003; 奥沙拉秦钠胶囊由天津力生制药股份有限公司生产, 配置成水溶液(24 g/L). 溃结饮由黄柏、苦参、炮姜、肉桂粉、三七粉等组成, 生药量1264 g/L用于灌胃, 生药量2528 g/L用于灌肠. 2, 4, 6-三硝基苯磺酸(TNBS)由Sigma公司生产. 乌拉坦(氨基甲酸乙酯), 购于恒业中远化工有限公司. EGF兔抗鼠一抗和即用型SABC实剂盒, 购于武汉博士德生物工程有限公司; Shandon全自动石蜡切片机, Shandon半自动石蜡包埋机, Nikon显微照相系统, Image-Pro Plus 4.1图像分析系统.

1.2 方法 将清洁级健康SD大鼠135只禁食36 h, 然后随机抽取120只用200 g/L乌拉坦(5 mL/kg)麻醉后, 用50 g/L TNBS与500 mL/L乙醇12∶5比例混合的复合物于结肠肛门以上8-10 cm处注射(其中TNBS 120 mg/kg), 见黏液脓血便则造模成功; 造模后的动物随机分为模型组、奥沙拉秦钠组、溃结饮灌胃组和溃结饮灌肠组, 每组30只, 进行药物干预(各组给药量为体质量50 kg成年人用量的8倍). 另设正常组15只作为对照. 正常组和模型组每天以蒸馏水灌胃一次(10 mL/kg); 奥沙拉秦钠对照组每天以奥沙拉秦钠混悬液灌胃一次(0.24 g/kg); 溃结饮灌胃组每天以溃结饮灌胃一次(12.64 g/kg); 溃结饮灌肠组每天以溃结饮灌肠一次(12.64 g/kg), 疗程共4 wk; 实验动物每次取材前禁食不禁水24 h, 模型组、奥沙拉秦钠组、溃结饮灌胃组、溃结饮灌肠组分别于造模后1, 2, 4 wk各组随机抽取10只大鼠, 正常组于同一时间随机抽取5只, 以200 g/L乌拉坦(4 mL/kg)腹腔麻醉后, 剖腹取结肠上距肛门8-10 cm处组织1-2 cm, 用生理盐水冲洗干净后, 置于40 g/L甲醛中固定, 之后制作6 μm厚切片, 进行标准免疫组化染色操作. Nikon显微照相系统观察病理改变、阳性颗粒着色情况, 继而用Image-Pro Plus 4.1图像分析系统统计比较结肠黏膜EGF阳性染色颗粒的吸光度(A).

2 结果

2.1 不同给药途径对大鼠UC模型结肠组织中EGF阳性染色颗粒吸光度值(A)的影响 第1周除模型组外3个药物干预组结肠黏膜EGF阳性染色颗粒吸光度值均显著增加, 奥沙拉秦钠组增加量低于溃结饮灌胃组和溃结饮灌肠组, 且溃结饮灌胃组与奥沙拉秦钠组比较(0.312±0.160 *vs* 0.217±0.052, $P<0.05$), 差异有显著性. 中药不同给药途径下无显著差异. 第2周模型组EGF阳性染色颗粒吸光度值(A)有所升高, 表明随病情发展大鼠自体修复机制启动. 这一时期各药物干预组别EGF阳性染色颗粒吸光度值均小于模型组, 其中溃结饮灌胃组EGF含量升高小于奥沙

■应用要点

由于临床治疗UC以口服、灌肠及口服灌肠相结合的用药方式为主. 所以从不同给药途径差异的角度探讨口服和灌肠治疗哪一种方式更有利于溃疡的愈合和疾病的康复有十分重要的理论和临床意义. 本实验通过比较中药溃结饮不同给药途径及西药奥沙拉秦钠对UC大鼠结肠黏膜EGF表达水平的影响, 揭示在口服与灌肠给药在黏膜修复方面的作用特点. 希望获得合理选择UC用药途径和制定综合治疗方案的指导理论和实验依据.

表 1 不同给药途径对UC大鼠模型结肠组织中EGF阳性染色颗粒吸光度值(A)的影响(mean ± SD)

分组	n	第1周	第2周	第4周
正常	5	0.106 ± 0.018	0.101 ± 0.013	0.101 ± 0.011
模型	10	0.181 ± 0.043	0.270 ± 0.099[b]	0.212 ± 0.103[a]
奥沙拉秦钠	10	0.217 ± 0.052[a]	0.219 ± 0.092[bc]	0.196 ± 0.075[a]
溃结饮灌肠	10	0.265 ± 0.090[bc]	0.254 ± 0.090[be]	0.372 ± 0.132[acde]
溃结饮灌胃	10	0.312 ± 0.160[bc]	0.184 ± 0.041[ac]	0.307 ± 0.101[acd]

[a]$P<0.05$, [b]$P<0.001$ *vs* 正常组; [c]$P<0.05$ *vs* 模型组; [d]$P<0.001$ *vs* 奥沙拉秦钠组; [e]$P<0.05$ *vs* 溃结饮灌胃组.

拉秦钠组, 差异有显著性. 溃结饮灌肠组EGF阳性染色颗粒吸光度值降低不明显, 溃结饮灌胃组较灌肠组降低明显(0.184±0.041 *vs* 0.254±0.090, $P<0.05$). 第4周无论溃结饮灌胃还是灌肠都明显促进了结肠黏膜EGF的表达使EGF阳性染色颗粒吸光度值(*A*)有所增高, 中药干预组与模型组和奥沙拉秦钠组比较都有显著差异, *P*值分别小于0.05和0.001. 溃结饮灌肠组EGF阳性染色颗粒吸光度值高于溃结饮灌胃组, 两者比较(0.372±0.132 *vs* 0.307±0.101, $P\leqslant0.05$), 差异有显著性(表1).

2.2 EGF在大鼠UC结肠黏膜的表达部位 急性期正常组黏膜下层及血管内皮可见散在EGF弱阳性表达, 黏膜上皮、腺体和基层未见阳性棕黄色颗粒. 模型组肉芽组织表层、浅层和深层均可见稀疏的强阳性EGF表达颗粒, 肉芽组织间隙和溃疡周边结肠黏膜可见强阳性较密集的棕黄色. 奥沙拉秦钠组溃疡肉芽组织表层和浅层可见比较密集的强阳性EGF表达颗粒, 肉芽组织深层和血管内皮有少量阳性EGF颗粒. 溃结饮灌胃组肉芽和瘢痕组织深部EGF大量密集的表达. 少量毛细血管内皮细胞上也有EGF颗粒的弱阳性表达. 溃结饮灌肠组肉芽组织浅层和深层可见EGF颗粒的强阳性表达. 中期正常组和模型组EGF表达部位与急性期相同. 奥沙拉秦钠组溃疡肉芽组织表层至深层可见较多的强阳性EGF表达颗粒. 溃结饮灌胃组结肠黏膜表面和肉芽组织深层可见稀疏的强阳性棕黄色EGF表达颗粒, 血管内皮细胞上也可见少量阳性EGF颗粒. 溃结饮灌肠组黏膜下层、肉芽组织深层和血管内皮细胞上可见较密集的EGF颗粒的强阳性表达. 后期正常组结肠黏膜表面可见散在的EGF弱阳性表达颗粒. 模型组黏膜表面及下层可见稀疏的强阳性EGF颗粒表达, 以白细胞胞质中表达为多. 奥沙拉秦钠组黏膜表层可见少量棕黄色EGF阳性颗粒表达. 溃结饮灌胃组EGF集中在肉芽组织间隙及深层. 溃结饮灌肠组黏膜下层、肉芽组织深层及重建中的黏膜组织中强阳性深染的EGF颗粒大量、集中的表达在成纤维细胞、纤维母细胞和白细胞胞质中. 血管内皮细胞上也可见少量阳性表达. 高倍镜下可见EGF颗粒主要表达在白细胞、纤维母细胞和部分成纤维细胞胞质中呈棕黄色深染的EGF阳性颗粒.

3 讨论

EGF由53个氨基酸残基组成, 相对分子质量为6×10^3 kDa, 其与受体EGFR结合后对创伤愈合、细胞的增殖分化及肿瘤的发生起到重要作用. EGF可以促进上皮细胞、间质细胞的生长, 增加黏膜细胞DNA, RNA和蛋白质合成, 增加黏膜血流, 促进黏液分泌, 刺激组织生长修复, 保护胃肠黏膜, 因此许多学者将其应用到UC的研究领域上. 研究发现, EGF腔内应用可诱导小肠黏液泌杯状细胞分泌黏液, 保护鼠肠黏膜免受油酸诱导的损伤[2], 从而维持了结肠黏膜的健康完整. Mazumdar *et al*[3]对小鼠UC模型采用EGF体内注射方法治疗, 结果发现, 结肠溃疡与炎症明显减轻. 此外, Sinha *et al*[4]通过实验证实, EGF灌肠能够有效治疗活动性左侧UC. 所以, EGF的黏膜保护和组织修复作用是有依据的, 他能促进黏膜细胞增殖和再生, 减轻炎症损伤, 加快溃疡愈合. 本研究中我们通过观察EGF阳性染色颗粒吸光度值来了解EGF的表达情况, 结果发现不同药物不同给药途径下结肠黏膜EGF的表达有一定差异. 首先, 中药溃结饮促进结肠黏膜修复的能力优于西药奥沙拉秦钠. 实验第1周造模各组结肠黏膜的EGF表达含量均有所增加, 其中, 模型组EGF的增多, 与正常组比较并无统计学意义, 可能由大鼠自身修复能力所诱导, 相比之下3个给药组结肠黏膜EGF表达增加明显; 且溃结饮灌胃组EGF表达高于奥沙拉秦钠组. 说明中药组促进黏膜细胞增殖再生, 加快溃疡愈合速

度的能力优于西药奥沙拉秦钠. 第2周给药各组EGF升高幅度有所下降, 模型组EGF表达量却显著增加. 这是因为第1周中相对较好的修复作用使3个给药组别的炎症已得到一定程度的控制. 而模型组此期其相对病变较重激发产生EGF过量表达而造成的. 第4周中药溃结饮治疗各组结肠黏膜EGF表达含量有所回升, 奥沙拉秦钠组该指标与中期相比变化不大. 溃结饮灌胃和灌肠组EGF表达含量都显著高于奥沙拉秦钠组和模型组. 这说明, 炎症后期中药溃结饮各组对破损结肠黏膜的修复能力仍优于奥沙拉秦钠组. 由上述结果可以推测, 中药溃结饮在病程急性期和后期均能显著增加损伤结肠黏膜EGF的表达, 从而行使EGF促进上皮细胞、间质细胞生长, 增加黏膜细胞DNA, RNA和蛋白质合成, 增加黏膜血流, 促进黏液分泌, 刺激组织生长修复的功能, 在这一点上优于西药奥沙拉秦钠. 其次, 中药不同给药途径对结肠黏膜EGF表达含量影响不同. 急性期溃结饮灌胃组与溃结饮灌肠组结肠黏膜EGF在表达含量上没有明显差异, 其中溃结饮灌胃增加EGF表达的能力显著优于奥沙拉秦钠, 溃结饮灌肠组却与奥沙拉秦钠组无显著差异. 所以急性期溃结饮灌胃促进细胞增长和组织修复的效果略好于溃结饮灌肠. 第2周以后不同给药途径的作用差异逐渐明显, 不论是第2周末还是第4周末的实验结果都表明, 溃结饮灌肠促进结肠黏膜EGF表达的作用更为突出, 优于溃结饮灌胃组. 因此, 不同给药途径作用于损伤肠黏膜EGF表达这一环节的作用是交叉的, 他们的起效时间点有一定差别. 溃结饮灌胃起效较早, 而且急性期效果占一定优势; 溃结饮灌肠起效较晚, 但从其作用开始发挥直至病程末期良好的促黏膜修复作用一直维持在较高水平. 由此可见联合应用两种给药方法, 并在病程急性期和中后期分别以口服和灌肠为主治疗本病, 可能会得到更好的效果, 更有效缩短黏膜修复时间, 加快溃疡愈合. 此实验结果与本课题另一实验内容中药溃结饮不同给药途径对大鼠UC血清IFN-γ, IL-4浓度和IFN-γ/IL-4比值的影响结果是一致的, 起到了相互印证的作用.

4 参考文献

1 谭丹, 王新月, 田德禄, 李澎涛, 金美花. 溃结饮对UC大鼠血清EGF含量的影响. 中国实验方剂学杂志 2002; 8: 39-40

2 Ishikawa S, Cepinskas G, Specian RD, Itoh M, Kvietys PR. Epidermal growth factor attenuates jejunal mucosal injury induced by oleic acid: role of mucus. *Am J Physiol* 1994; 267: G1067-1077

3 Mazumdar S, Das KM. Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal peptide and substance P in the colon from normal subjects and patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 176-181

4 Sinha A, Nightingale J, West KP, Berlanga-Acosta J, Playford RJ. Epidermal growth factor enemas with oral mesalamine for mild-to-moderate left-sided ulcerative colitis or proctitis. *N Engl J Med* 2003; 349: 350-357

电编 张敏 编辑 王晓瑜

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年10月18日; 14(29): 2876-2879
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

非酒精性脂肪肝大鼠瘦素水平及丹参注射液的预防作用

黄妙珍, 孙丽伟, 付珍春, 朱善济, 王祖武, 任晓华, 陈兆军

■背景资料
大部分临床和实验研究显示, Leptin在非酒精性脂肪性肝、非酒精性脂肪性肝炎、肝纤维化中表达升高. 祖国医学认为脂肪肝由于长期过食肥甘酒酪之物, 长久内伤七情, 肝病之后, 造成肝胆疏泄失调, 脾失健运, 痰湿瘀浊停积胶着于肝, 致使肝络阻滞而发病. 活血祛瘀是基本法则.

黄妙珍, 孙丽伟, 付珍春, 杭州师范学院附属医院消化科 浙江省杭州市 310015
朱善济, 王祖武, 杭州师范学院形态实验室 浙江省杭州市 310036
任晓华, 陈兆军, 杭州师范学院附属医院放射免疫中心 浙江省杭州市 310015
通讯作者: 黄妙珍, 310015, 浙江省杭州市温州路126号, 杭州师范学院附属医院消化科. hmzhope@sina.com
电话: 0571-88303653
收稿日期: 2006-07-25 接受日期: 2006-08-22

Level of leptin in nonalcohic fatty liver of rats and preventive effects of Salvia miltiorrhiza injection

Miao-Zhen Huang, Li-Wei Sun, Zhen-Chun Fu, Shan-Ji Zhu, Zu-Wu Wang, Xiao-Hua Ren, Zhao-Jun Chen

Miao-Zhen Huang, Li-Wei Sun, Zhen-Chun Fu, Department of Digestive Diseases, the Affiliated Hospital of Hangzhou Normal University, Hangzhou 310015, Zhejiang Province, China
Shan-Ji Zhu, Zu-Wu Wang, Department of Morphous Lab, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, Zhejiang Province, China
Xiao-Hua Ren, Zhao-Jun Chen, Department of Radioimmune Center, the Affiliated Hospital of Hangzhou Normal University, Hangzhou 310015, Zhejiang Province, China
Correspondence to: Miao-Zhen Huang, Department of Digestive, the Affiliated Hospital of Hangzhou Normal University, 126 Wenzhou Road, Hangzhou 310015, Zhejiang Province, China. hmzhope@sina.com
Received: 2006-07-25 Accepted: 2006-08-22

Abstract

AIM: To detect the level of leptin in the nonalcohic fatty liver of rats and the preventive effects of Salvia miltiorrhiza (SM) injection.

METHODS: Male Sprague Dawley rats were selected randomly and given a fat-rich diet for 8 wk. The rats with fatty livers were randomly divided into model group, high-dose SM group, low-dose SM group and reduced glutathione control group. The serum level of leptin was detected by radioimmunoassay (RIA). The pathological changes in rat livers were observed.

RESULTS: The index of rat nonalcohic fatty liver was significantly higher than that in normal rats (3.09% ± 0.24% *vs* 2.63% ± 0.19%, t = 4.61, P = 0.00), while the level of leptin was markedly lower than that in normal rats (1.83 ± 0.44 μg/L *vs* 3.04 ± 0.55 μg/L, t = 5.08, P = 0.00). The level of leptin was dramatically elevated while the fat accumulation area in rat livers was decreased after high-dose SM injection as compared with that in model rats (leptin: 2.29 ± 0.46 μg/L *vs* 1.83 ± 0.44 μg/L, t = 2.33, P = 0.03; area: 1.45 ± 0.93 *vs* 2.40 ± 0.70, t = 2.60, P = 0.02).

CONCLUSION: SM injection can improve fat metabolism by increasing the level of leptin.

Key Words: Nonalcoholic fatty liver; Leptin; Salvia miltiorrhiza injection; Rats

Huang MZ, Sun LW, Fu ZC, Zhu SJ, Wang ZW, Ren XH, Chen ZJ. Level of leptin in nonalcohic fatty liver of rats and preventive effects of Salvia miltiorrhiza injection. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(29):2876-2879

摘要

目的: 探讨脂肪肝大鼠瘦素水平的变化及丹参注射液的影响.

方法: ♂SD大鼠随机分为5组, 其中1组为正常组, 服用普通饲料, ip生理盐水; 余4组用高脂饲料建立脂肪肝模型后, 随机分为模型组、大剂量治疗组、小剂量治疗组、对照组, 分别ip生理盐水、大、小剂量丹参注射液、古拉啶溶液. 8 wk后取血处死大鼠, 测定血清瘦素等, 观察脂肪肝病理变化.

结果: 脂肪肝模型大鼠肝指数较正常组升高(3.09%±0.24% *vs* 2.63%±0.19%, t = 4.61, P = 0.00), 而血清瘦素水平较正常组低下(1.83±0.44 μg/L *vs* 3.04±0.55 μg/L, t = 5.08, P = 0.00), 大剂量丹参注射液提高模型组大鼠血清瘦素水平(2.29±0.46 μg/L *vs* 1.83±0.44 μg/L, t = 2.33, P = 0.03). 大剂量丹参治疗后脂肪肝大鼠肝组织脂肪沉者面积减少(1.45±0.93 *vs* 2.40±0.70, t = 2.60, P = 0.02).

结论: 丹参注射液改善脂肪代谢可能通过提高瘦素水平而实现.

关键词: 脂肪肝; 瘦素; 丹参注射液; 大鼠

黄妙珍, 孙丽伟, 付珍春, 朱善济, 王祖武, 任晓华, 陈兆军. 非酒精性脂肪肝大鼠瘦素水平及丹参注射液的预防作用. 世界华人消化杂志 2006;14(29):2876-2879
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2876.asp

0 引言

随着经济的发展和生活水平的提高, 非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver, NAFL)的发病率在发达国家乃至发展中国家均达到相当高的水平. 脂肪肝与其他慢性肝病一样可通过细胞因子、肝星状细胞的激活机制进展为脂肪性肝炎、肝纤维化, 是隐源性肝硬化的重要原因. 一旦发展为肝硬化, 其预后与一般的门脉性肝硬化相同[1]. 脂质代谢异常是脂肪肝发生、发展的主要特征. NAFL除饮食控制、体育锻炼外, 发展到一定程度需要药物治疗, 相比于西药, 中医中药治疗具有明显优势. 根据脂肪肝多有血瘀的特点, 本实验选择具有活血祛瘀的丹参注射液, 从NAFL的瘦素(leptin)水平进行实验研究.

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠60只, ♂, 清洁级, 体质量180-220 g. 由浙江省实验动物中心提供, 大鼠分笼喂养. 大鼠正常喂养1 wk后随机分为5组. 胆固醇为河南郑州生物技术有限公司产品, 胆盐为杭州微生物试剂厂产品. 丹参注射液由正大青春宝药业有限公司提供, 注射用还原型谷胱甘肽钠由积华药业有限公司提供, 瘦素试剂盒购自北方生物技术研究所.

1.2 方法

1.2.1 造模方法 造模方法参考文献[2]. 第1组为正常饮食对照组(正常组), 食普通饲料; 第2-5组为脂肪肝组(食高脂饲料, 即基础饲料77.5%, 猪油8%, 胆固醇4%, 胆盐0.5%, 蛋黄粉10%, 饲料加工成粉末状有利于服用和吸收). 其中第2组为高脂饮食组(模型组); 第3, 4组为丹参注射液治疗大、小剂量治疗组(治疗组); 第5组为为还原型谷胱甘肽对照组(对照组).

1.2.2 给药方法 治疗组大鼠每天丹参注射液3.3 mL/kg ip(用生理盐水稀释至5 mL, 按5 mL/kg注射, 以成人60 kg用20 mL计算, 剂量相当于成人20倍)、1.65 mL/kg ip(用生理盐水稀释至5 mL, 按5 mL/kg注射, 剂量相当于成人10倍); 对照组每天还原型谷胱甘肽溶液10 mL/kg ip (0.2 g溶于5 mL生理盐水, 按5 mL/kg注射, 以成人60 kg用1.2 g计算, 剂量相当于成人20倍); 正常组和模型组ip等量生理盐水, 连续8 wk.

表 1 肝小叶内脂肪沉着判断标准

结果	计分	肝小叶内含脂滴细胞数/总细胞数比值
–	0	偶见或无
+	1	<1/3
++	2	1/3-2/3
+++	3	>2/3

1.2.3 观察指标及测定方法 实验期间每周称体质量1次, 观察食欲行为、粪便、毛发及动物死亡情况. 第8周后各大鼠禁食不禁水16 h, 腹腔动脉取血, 按常规制备血清, 处死大鼠, 取出肝脏, 观察肝脏外观, 称湿质量, 在同一部位剪取肝脏, 用40 g/L的甲醛固定, 观察病理变化. 放射免疫法测定血清leptin, 按试剂盒规范操作. 脂肪肝变性程度参考文献[3], 肝小叶内脂肪沉着判断标准见表1.

统计学处理 应用SPSS 10.0统计软件包进行统计, 计量资料mean±SD表示, 各组间均数的比较采用t检验.

2 结果

2.1 一般情况 实验期间各组大鼠活动度及毛发变化不大, 大便正常. 实验结束有效动物数分别为10, 10, 11, 11, 8只. 高脂饮食大鼠第3周开始体质量上升较正常组大鼠缓慢而实验结束肝湿质量增加. 肉眼观正常组肝表面颜色普遍暗红, 色泽鲜亮, 中等硬度, 切面略有颗粒感, 无油腻感. 模型组大鼠多数肝脏表面颜色发黄, 肝脏体积明显增大, 包膜紧张, 部分肝脏呈奶黄色, 切面油腻, 有油滴, 无颗粒感. 大剂量治疗组大鼠肝脏较正常组偏大, 大部分颜色红润, 个别淡黄色, 切面略有颗粒感, 无油腻感. 小剂量治疗组和对照组大鼠部分肝脏肥厚, 红黄相间, 个别大鼠切面油腻, 有油滴. 肝湿质量及肝指数(肝湿质量/体质量×100%)变化见表2.

2.2 各组大鼠血清leptin变化 实验结果显示, 各脂肪肝大鼠血清leptin水平反较正常组低下(P<0.05), 模型组下降更明显(P<0.01), 用大剂量药物治疗后血清leptin水平提高(P<0.05), 具体见表2.

2.3 各组大鼠肝组织病理变化 镜下见肝小叶基本清楚, 中央静脉明显. 肝细胞脂肪变出现在小叶周围. 脂肪空泡可分为中小两种, 少见大泡.

■应用要点
本实验结果提示leptin在非酒精性脂肪性肝中表达低下, 中药丹参注射液有提高leptin的作用, 这为我们对瘦素的认识和中药的应用提供了新的内容.

■同行评价
本文探讨脂肪肝大鼠瘦素水平的变化及丹参注射液对其的影响, 有一定临床应用前景.

表 2 各组大鼠肝湿质量、肝指数、血清leptin及肝组织病理变化(mean ± SD)

分组	*n*	大鼠体质量 (g)	肝湿质量 (g)	肝指数 (%)	leptin (μg/L)	肝脂肪细胞沉着面积计分
正常组	10	415.00 ± 44.33	10.94 ± 1.66	2.63 ± 0.19	3.04 ± 0.55	0
模型组	10	382.70 ± 16.17[a]	11.82 ± 1.21	3.09 ± 0.24[b]	1.83 ± 0.44[b]	2.4 ± 0.70[b]
大剂量治疗组	11	370.36 ± 39.95[a]	11.07 ± 1.67	2.99 ± 0.30[b]	2.29 ± 0.46[bc]	1.45 ± 0.93[bc]
小剂量治疗组	11	375.27 ± 34.57[a]	12.17 ± 1.80	3.23 ± 0.27[b]	1.83 ± 0.64[b]	1.73 ± 1.19[b]
对照组	8	373.38 ± 31.90[a]	11.83 ± 1.42	3.17 ± 0.23[b]	1.95 ± 0.42[b]	2.13 ± 0.99[b]

[a]$P<0.05$, [b]$P<0.01$ *vs* 正常组; [c]$P<0.05$ *vs* 模型组.

肝细胞因脂肪变而肿大, 同时也由于肝细胞水肿(与脂肪空泡同时出现于同一肝细胞)而呈空泡状, 肝血窦常狭窄、闭塞. 汇管区常见少量炎症细胞浸润, 主要为单核和淋巴细胞. 小叶内炎症细胞不多见, 主要也为单核和淋巴细胞, 罕见有中性白细胞. 肝细胞内有坏死灶出现, 多少不一, 量少者常可看到正常肝血窦. 结果提示模型组肝脂肪沉着面积明显, 大剂量丹参治疗后沉着面积减少(表2).

3 讨论

正常肝脏的脂质含量为4%-7%, 其中甘油三酯占一半. 当某些致病因子使这种调控系统受损, 输入肝脏的脂质及游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)过多而肝脏脂蛋白合成代谢发生障碍, FFA氧化又不足时, 脂肪就会在肝脏沉积, 发生脂肪肝. leptin属于蛋白质激素, 主要由脂肪细胞产生, 最初发现其参与机体代谢调节, 控制机体脂肪量. leptin又称脂肪抑制素, 在正常机体中, 作为减肥激素, 在保持体质量和体脂稳定方面起重要作用. 但临床观察大部分显示leptin在NAFL、肥胖、非酒精性脂肪性肝炎患者中血清水平升高[4-6]; 少数文献报道leptin与人类非酒精性脂肪性肝病、非酒精性脂肪性肝炎无关或低下[7-9]. 动物实验均提示leptin在NAFL、肝纤维化、非酒精性脂肪性肝炎中表达增高, 在促进炎症、促进肝纤维化中起主要作用[10-12]. 本研究显示leptin在NAFL大鼠模型中表达低下, 表2提示脂肪肝模型大鼠虽然肝湿质量和肝指数上升, 但总体质量并未升高, 反而较正常组降低, 这可能由于脂肪肝大鼠因脂肪代谢紊乱, 营养物质吸收利用障碍所致. leptin能利用脂肪, 若脂肪利用障碍, 则易在局部堆积, 由于脂肪肝大鼠leptin水平低下, 以致不能充分代谢脂肪, 出现肝指数升高. 这可能为NAFL的预防、诊断和治疗提供新的途径.

祖国医学认为脂肪肝由于长期过食肥甘酒酪之物, 长久内伤七情, 肝病之后, 造成肝胆疏泄失调, 脾失健运, 痰湿瘀浊停积胶着于肝, 致使肝络阻滞而发病. 活血祛瘀是基本法则. 丹参为唇形科多年生草本植物丹参*Salvia miltiorrhiza Bge*.的根, 是活血化瘀的代表药. 实验研究显示, 丹参具有抑制炎症反应, 减轻肝细胞的变性坏死, 促进肝细胞的再生, 清除对肝脏有害的自由基, 改善和加强肝脏的微循环, 增加和加强肝内血管床的数量和质量, 减轻瘀血缺血状态, 减低脂质的过氧化反应[13-15]. 还原型谷胱甘肽为天然的活性物质, 为各种肝病治疗的基础用药, 他可直接补充肝病患者内源性谷胱甘肽的缺乏, 调节体内瘦素和肿瘤坏死因子等表达, 防御动物脂肪性肝炎的肝损伤达[16-17]. 本实验研究显示, 丹参注射液在降低肝指数、改善脂肪沉着、提高瘦素水平方面优于还原型谷胱甘肽. 丹参注射液改善症状可能通过提高leptin水平、改善脂质代谢而实现.

4 参考文献

1 James O, Day C. Non-alcoholic steatohepatitis: another disease of affluence. *Lancet* 1999; 353: 1634-1636

2 钟岚, 范建高, 王国良, 吴伟清, 史祺. 肥胖、高脂血症性脂肪性肝炎模型的建立. 实验动物科学与管理 2000; 17: 16-20

3 Diehl AM, Goodman Z, Ishak KG. Alcohollike liver disease in nonalcoholics. A clinical and histologic comparison with alcohol-induced liver injury. *Gastroenterology* 1988; 95: 1056-1062

4 Pagano C, Soardo G, Pilon C, Milocco C, Basan L, Milan G, Donnini D, Faggian D, Mussap M, Plebani M, Avellini C, Federspil G, Sechi LA, Vettor R. Increased serum resistin in nonalcoholic fatty liver disease is related to liver disease severity and not to insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 1081-1086

5 Valtuena S, Numeroso F, Ardigo D, Pedrazzoni M, Franzini L, Piatti PM, Monti L, Zavaroni I. Relation-

ship between leptin, insulin, body composition and liver steatosis in non-diabetic moderate drinkers with normal transaminase levels. *Eur J Endocrinol* 2005; 153: 283-290
6 Javor ED, Ghany MG, Cochran EK, Oral EA, DePaoli AM, Premkumar A, Kleiner DE, Gorden P. Leptin reverses nonalcoholic steatohepatitis in patients with severe lipodystrophy. *Hepatology* 2005; 41: 753-760
7 Angulo P, Alba LM, Petrovic LM, Adams LA, Lindor KD, Jensen MD. Leptin, insulin resistance, and liver fibrosis in human nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2004; 41: 943-949
8 Chalasani N, Crabb DW, Cummings OW, Kwo PY, Asghar A, Pandya PK, Considine RV. Does leptin play a role in the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis? *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2771-2776
9 Liangpunsakul S, Chalasani N. Relationship between unexplained elevations in alanine aminotransferase and serum leptin in U.S. adults: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Gastroenterol* 2004; 38: 891-897
10 Balasubramaniyan V, Nalini N. Effect of hyperleptinaemia on chronic ethanol-induced hepatotoxicity in mice. *Fundam Clin Pharmacol* 2006; 20: 129-136
11 Gauthier MS, Favier R, Lavoie JM. Time course of the development of non-alcoholic hepatic steatosis in response to high-fat diet-induced obesity in rats. *Br J Nutr* 2006; 95: 273-281
12 赵文霞, 段荣章, 苗明三, 李建国, 叶放. 赤芍对大鼠脂肪肝模型胰岛素抵抗及瘦素影响的实验研究. 四川中医 2005; 23: 33-34
13 赵浩亮, 武小勇, 李士骏, 陈孝平, 裘法祖. 氧自由基在肝脏保存再灌注损伤中的作用及丹参的保护作用. 中华实验外科杂志 2000; 17: 237-238
14 丁钢, 王宝仁, 陈乐明. 丹参素、熊去氧胆酸、辛伐他汀对脂肪肝鼠肝脏功能的影响. 江苏医药 2005; 31: 787-789
15 叶龙彬, 奚涛, 陈峰, 王瑜. 丹参酮ⅡA对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用. 中国药科大学学报 2004; 35: 267-270
16 余小虎, 朱金水, 邱夏地, 顾国妹. 还原型谷胱甘肽对酒精性肝炎患者血清TNF-α、瘦素的影响. 实用肝脏病杂志 2005; 8: 140-142
17 Oz HS, Im HJ, Chen TS, de Villiers WJ, McClain CJ. Glutathione-enhancing agents protect against steatohepatitis in a dietary model. *J Biochem Mol Toxicol* 2006; 20: 39-47

电编 张敏 编辑 张焕兰

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

• 消息 •

中国学术期刊综合引证报告(2006)

本刊讯 根据《中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)》2005年6182种统计刊源析出的214万条中国期刊引文数据库及CNKI “中国期刊网”中心网站2005-01/12全文下载记录(1.5亿篇次)的大样本数据统计分析得到: 世界华人消化杂志[标准刊号: ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R; 类目名称: 医药科学\临床科学\呼吸及消化系统疾病(YK5.2.3)]总被引频次为2471, 影响因子为0.661, 5年影响因子为0.644, 即年指标为0.079, 他引总引比为0.73, 被引期刊数为491, 被引半衰期为4.6, 2005载文量为768, 基金论文比为0.44, Web即年下载率为0.6. [中国学术期刊(光盘版)电子杂志社; 中国科学文献计量评价研究中心] .

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年10月18日; 14(29): 2880-2882
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

蛋白质二硫键异构酶在幽门螺杆菌感染者胃黏膜中的表达及意义

王孟春, 郭静波, 刘明华, 方文刚, 李 岩

■背景资料
人胃黏膜感染幽门螺杆菌后发生热休克反应, 产生许多热休克蛋白. 蛋白质二硫键异构酶为热休克蛋白, 同时是内质网分子伴侣家族重要成员, 有关幽门螺杆菌感染胃黏膜后的热休克反应中是否有蛋白质二硫键异构酶参与及其作用机制如何尚未见研究报道.

王孟春, 郭静波, 刘明华, 李岩, 中国医科大学附属第二医院消化内科 辽宁省沈阳市 110004
方文刚, 中国医科大学发育生物教研室 辽宁省沈阳市 110001
辽宁省教育厅基金资助项目, No. 202010794
通讯作者: 王孟春, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第二医院消化内科. wangmc@cmu2h.com
电话: 024-83956416 传真: 024-23892617
收稿日期: 2006-06-20 接受日期: 2006-08-14

Expression of protein disulfide isomerase in gastric mucosa infected with *Helicobacter pylori*

Meng-Chun Wang, Jing-Bo Guo, Ming-Hua Liu, Wen-Gang Fang, Yan Li

Meng-Chun Wang, Jing-Bo Guo, Ming-Hua Liu, Yan Li, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Wen-Gang Fang, Department of Developmental Biology, College of Basic Medical Science, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Correspondence to: Meng-Chun Wang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. wangmc@cmu2h.com
Received: 2006-06-20 Accepted: 2006-08-14

Abstract
AIM: To study the expression of protein disulfide isomerase (PDI) in gastric mucosa infected with *H pylori*.

METHODS: Semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot were used to examine the mRNA and protein expression of PDI, respectively, in human gastric mucosa with or without *H pylori* infection (n = 32 or 28).

RESULTS: The expression amounts of PDI mRNA and protein were 0.5704 ± 0.0794 and 0.5198 ± 0.0379 in the mucosa without *H pylori* infection, which were significantly lower than those in the ones with *H pylori* infection (1.0642 ± 0.1533, 0.8252 ± 0.0321, P < 0.01).

CONCLUSION: *H pylori* infection can increase the transcription of PDI mRNA and synthesis of PDI protein in gastric mucosa.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Protein disulfide isomerese

Wang MC, Guo JB, Liu MH, Fang WG, Li Y. Expression of protein disulfide isomerase in gastric mucosa infected with *Helicobacter pylori*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(29):2880-2882

摘要
目的: 了解蛋白质二硫键异构酶(protein disulfide isomerase, PDI)在幽门螺杆菌(*H pylori*)感染人胃黏膜组织中的表达情况.

方法: 分别应用半定量RT-PCR方法及Western blot方法检测感染(n = 32)与未感染(n = 28)*H pylori*的人胃黏膜组织中PDI mRNA及蛋白的表达情况.

结果: 未感染组PDI mRNA及蛋白表达量分别为0.5704±0.0794, 0.5198±0.0379, 感染组PDI mRNA及蛋白表达量分别为1.0642±0.1533, 0.8252±0.0321; 两组相比差异显著(P<0.01).

结论: 正常情况下胃黏膜组织有PDI mRNA的表达及蛋白的合成, *H pylori*感染可使胃黏膜增加PDI mRNA的表达及蛋白的合成.

关键词: 幽门螺杆菌; 蛋白质二硫键异构酶

王孟春, 郭静波, 刘明华, 方文刚, 李岩. 蛋白质二硫键异构酶在幽门螺杆菌感染者胃黏膜中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2006;14(29):2880-2882
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2880.asp

0 引言
生物细胞在受热和其他许多损害因素如缺血、缺氧、感染等作用后发生热休克反应, 可以抑制一些正常蛋白质的合成, 同时启动一类新的

表 1 *H pylori*对不同胃黏膜组织PDI mRNA及蛋白表达的影响 (mean ± SD)

分组	PDI mRNA				PDI蛋白			
	n	*H pylori* 阳性	*n*	*H pylori* 阴性	*n*	*H pylori* 阳性	*n*	*H pylori*阴性
基本正常胃黏膜			10	0.5789 ± 0.0706			10	0.5160 ± 0.0447
浅表胃炎(中–重度)	12	1.0683 ± 0.1397	8	0.5716 ± 0.0581	12	0.8160 ± 0.0249	8	0.5222 ± 0.0293
胃溃疡	10	1.0734 ± 0.1617	5	0.5441 ± 0.0565	10	0.8381 ± 0.0339	5	0.5290 ± 0.0437
十二指肠溃疡	10	1.0499 ± 0.1590	5	0.5779 ± 0.0565	10	0.8233 ± 0.0337	5	0.5207 ± 0.0267

■**同行评价**
本文反映了目前幽门螺杆菌感染的基础研究进展, 证实了蛋白质二硫键异构酶在幽门螺杆菌感染者胃黏膜中的表达及意义. 方法得当, 具有科学价值.

蛋白质合成基因-热休克蛋白基因, 合成热休克蛋白(heat shock protein, HSP). 人胃黏膜感染幽门螺杆菌(*helicobacter pylori*, *H pylori*)后同样可发生热休克反应, 产生许多HSP. 蛋白质二硫键异构酶(protein disulfide isomerase, PDI)为热休克蛋白, 又是内质网分子伴侣家族重要成员, 作为酶PDI可催化蛋白质分子中二硫键的形成, 作为分子伴侣PDI在蛋白质的翻译及翻译后进行的转运过程中起着重要作用. 有关*H pylori*感染胃黏膜后的热休克反应中是否有PDI参与及其作用如何尚未见研究报道. 本文以RT-PCR方法及Western blot方法分别检测了*H pylori*感染后胃黏膜组织中PDI mRNA及蛋白的表达状况.

1 材料和方法

1.1 材料 胃镜检查时将除外心脑血管、肝肾疾病, 检查前2 wk未用抗生素及铋剂的患者列入本实验. 于胃镜检查时取胃窦黏膜6块, 分别用于快速尿素酶试验、Giemsa染色、RNA提取、蛋白提取. 快速尿素酶试验、Giemsa染色同时阳性为*H pylori*感染组, 共32例, 其中浅表性胃炎12例, 胃溃疡10例, 十二指肠溃疡10例. 2项检测同时阴性为*H pylori*未感染组, 共28例, 其中基本正常胃黏膜10例, 浅表性胃炎8例, 胃溃疡5例, 十二指肠溃疡5例. 所需试剂为TRIzol试剂, Gibco BRL; AMV逆转录酶, 5×buffer、RNAsin, Promega; Taq酶, dNTP, 10×buffer, $MgCl_2$, Takara公司; 50×TAE 琼脂糖, 上海生工生物制品公司; ECL试剂盒, Amerham Phamarcia; 一抗、二抗分别为小鼠抗羊PDI多克隆抗体, Santa Cruz; HRP标记羊抗小鼠二抗, 中山公司.

1.2 方法

1.2.1 PDI mRNA表达的检测 胃镜下于胃窦大弯、小弯各取黏膜1块, 置于预冷的装有200 μL TRIzol的EP管中, 用TRIzol试剂盒提取总RNA, 用紫外分光光度计测定RNA的纯度及浓度, 两步法RT-PCR扩增, 为校正逆转录效率及不同样品间的差异, 以β-actin为内部参照物, 在同一反应体系中与PDI同时扩增, 以定量PDI mRNA的表达量, 与β-actin的比值作为校正后的PDI mRNA表达量. 反应条件: 94℃ 10 min后, 94℃变性1 min、58℃复性45 s、72℃延伸45 s, 进行30循环后, 72℃进行10 min延伸反应. 20 g/L琼脂糖凝胶电泳后, 在紫外灯下确认电泳带, PDI为478 bp, β-actin为750 bp. 在凝胶成像系统分别扫描PDI与β-actin电泳带密度, 求出二者比值, 即为PDI表达的相对水平.

表 2 *H pylori*感染与未感染胃黏膜组织中PDI mRNA及蛋白的表达(mean ± SD)

分组	*n*	PDI mRNA	PDI蛋白
*H pylori*阴性	28	0.5704 ± 0.0794	0.5198 ± 0.0379
*H pylori*阳性	32	1.0642 ± 0.1533[b]	0.8252 ± 0.0321[b]

[b]$P<0.01$ *vs* *H pylori*阴性组.

1.2.2 PDI蛋白表达 胃镜检查时于胃窦大弯、小弯各取黏膜1块, 裂解液中匀浆、低温离心, 考马斯亮蓝法定量. 含15 μg蛋白的样品在80 g/L SDS-PAGE进行电泳, 半干转印仪至PVDF膜, 将PVDF膜浸入封闭液中室温过夜, 加入用杂交液按1∶1000稀释的一抗, 摇床上室温杂交30 min至2 h或过夜. 加入用杂交液按1∶5000稀释的二抗, 摇床杂交30 min. 将ECL试剂盒内的detection reagent 1与detection reagent 2等体积混合后, 均匀滴在PVDF膜上, 固定于暗盒中, 曝光、洗片. 电脑扫描, Kodak1D软件系统计算PDI的密度值及β-actin的密度值, 二者比值作为该样品PDI蛋白的表达量.

统计学处理 数据经SPSS 10.0软件*t*检验处理, 以mean±SD表示, $P<0.05$为有显著差异.

2 结果

2.1 PDI mRNA表达的检测结果 *H pylori*阳性组不同病变胃黏膜PDI mRNA表达量无差异, *H pylori*阴性组不同病变胃黏膜PDI mRNA表达量无差异(表1). *H pylori*阳性组胃黏膜PDI mRNA

表达量明显高于*H pylori*阴性组(P<0.01, 表2).

2.2 PDI蛋白表达结果 *H pylori*阳性组不同病变胃黏膜PDI蛋白表达量无差异, *H pylori*阴性组不同病变胃黏膜PDI 蛋白表达量无差异(表1). *H pylori*阳性组PDI蛋白表达量明显高于*H pylori*阴性组(P<0.01, 表2).

3 讨论

胃黏膜是热休克反应的代表, 无论是离体培养的胃黏膜细胞还是动物实验、人胃黏膜均有HSP的多量表达[1-5]. 而感染*H pylori*后更增加了某些热休克蛋白的合成[6-7], 如HSP70, HSP72, HSP90等, 我们曾报道胃黏膜感染*H pylori*后可增加内质网分子伴侣Grp94、Grp78的合成[8-9], 可能与*H pylori*感染后胃黏膜合成的一些细胞因子、激素等有关, 也可能在维持胃黏膜细胞正常形态及功能上起重要作用. 本实验检测了另一个内质网分子伴侣PDI的表达情况, 同样发现PDI在胃黏膜有基础表达, *H pylori*感染组PDI mRNA及蛋白的表达均明显高于*H pylori*未感染组, *H pylori*感染组与未感染组不同胃黏膜病变中的表达无差异性, 提示*H pylori*感染后胃黏膜也增加了PDI的合成. PDI是一种多功能分子伴侣存在于内质网管腔中, 含量丰富, 占细胞总蛋白的0.4%. 作为折叠酶PDI能催化蛋白质分子中二硫键的形成[10], 作为分子伴侣PDI能识别未折叠好的或部分折叠的新生肽折叠中间物的非天然结构, 或变性蛋白在重折叠过程中形成的折叠中间物的非天然结构, 通过其多肽结合部位与之结合, 从而防止靶蛋白或底物蛋白之间错误的结合和聚合. 目前的研究表明, 在蛋白质折叠过程的早期, PDI可能是作为分子伴侣防止部分折叠的肽链由于错误相互作用导致的聚合; 在后期, 当多肽链已经折叠到一定程度, PDI的基本功能则表现为异构酶, 即催化配对巯基的氧化联接或错接二硫键的异构. 像内质网中的其他分子伴侣一样, PDI也会因为分泌蛋白的过量合成或未折叠好的和错误折叠的蛋白在内质网中的积聚, 而被诱导表达[11].

*H pylori*是一种革兰氏阴性杆菌, 本身所具有的毒素、尿素酶、脂多糖等对胃黏膜有损害作用[12-14], 胃黏膜感染*H pylori*后上皮细胞发生空泡变性、G细胞、D细胞等也受到影响, 细胞内质网的形态发生变化, 因此, 这些细胞在其分泌粘蛋白、胃肠激素等过程中出现异常, 如在细胞内聚集未折叠好的或错误折叠的蛋白, 就可能激发热休克反应, 激活热休克因子, 使PDI的合成增多, 增多的PDI能防止蛋白错误折叠, 催化二硫键的形成, 从而维持胃黏膜细胞的正常功能. PDI的增多到底与哪些胃肠激素的合成分泌有关, 这也是我们感兴趣的问题, 有待今后进一步探讨.

4 参考文献

1 Rokutan K. Molecular stress response in the stomach. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1999; 114: 265-272

2 Rokutan K. Significance of heat shock protein in gastric lesions--gastric mucosal cells culture. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 1995; 92: 1-6

3 Rokutan K, Hirakawa T, Teshima S, Honda S, Kishi K. Glutathione depletion impairs transcriptional activation of heat shock genes in primary cultures of guinea pig gastric mucosal cells. *J Clin Invest* 1996; 97: 2242-2250

4 Rokutan K, Teshima S, Miyoshi M, Kawai T, Nikawa T, Kishi K. Glutathione depletion inhibits oxidant-induced activation of nuclear factor-kappa B, AP-1, and c-Jun/ATF-2 in cultured guinea-pig gastric epithelial cells. *J Gastroenterol* 1998; 33: 646-655

5 Nakamura K, Rokutan K, Marui N, Aoike A, Kawai K. Induction of heat shock proteins and their implication in protection against ethanol-induced damage in cultured guinea pig gastric mucosal cells. *Gastroenterology* 1991; 101: 161-166

6 Leri O, Teichner A, Sinopoli MT, Abbolito MR, Pustorino R, Nicosia R, Paparo Barbaro S. Heat-shock-proteins-antibodies in patients with Helicobacter pylori associated chronic gastritis. *Riv Eur Sci Med Farmacol* 1996; 18: 45-47

7 易屏, 李国成, 刘胜洪, 罗树星, 陶秀良. HSP72、HSP B在幽门螺杆菌感染的十二指肠球部溃疡患者胃黏膜中的表达. 中国中西医结合脾胃杂志 2001; 8: 336-338

8 王孟春, 方文刚, 陈澄, 李岩. 葡萄糖调节蛋白GRP78在幽门螺杆菌感染者胃黏膜中的表达和意义. 中国医科大学学报 2004; 33: 70-71, 74

9 王孟春, 方文刚, 顾金歌, 李岩. 幽门螺杆菌感染者胃黏膜中内质网分子伴侣Grp94的表达. 世界华人消化杂志 2003; 11: 551-553

10 Freedman RB, Hirst TR, Tuite MF. Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 331-336

11 Lodish HF, Kong N, Wikstrom L. Calcium is required for folding of newly made subunits of the asialoglycoprotein receptor within the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1992; 267: 12753-12760

12 Marshall BJ. *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: S116-S128

13 Hazell SL, Lee A. Campylobacter pyloridis, urease, and gastric ulcers. *Lancet* 1986; 2: 626

14 Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A. cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14648-14653

电编 李琪 编辑 王晓瑜

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年10月18日; 14(29): 2883-2888
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

幽门螺杆菌感染与胃癌发病关系的文献计量学分析

王孝宁, 崔 雷

王孝宁, 崔雷, 中国医科大学信息管理与信息系统(医学)系 辽宁省沈阳市 110001
通讯作者: 崔雷, 110001, 辽宁省沈阳市和平区北二马路92号, 中国医科大学信息管理与信息系统(医学)系. lcui@mail.cmu.edu.cn
电话: 024-23256666-5440
收稿日期: 2006-08-14 接受日期: 2006-09-12

Bibliometric analysis of literatures on relationship between *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinogenesis

Xiao-Ning Wang, Lei Cui

Xiao-Ning Wang, Lei Cui, Department of Information Management and Information System (Medicine), China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Correspondence to: Lei Cui, Department of Information Management and Information System (Medicine), China Medical University, 92 Beier Road, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. lcui@mail.cmu.edu.cn
Received: 2006-08-14 Accepted: 2006-09-12

Abstract

AIM: To present the research progress on the correlations between *Helicobacter pylori* infection and the risks of gastric cancer, and conclude the hot topics.

METHODS: The international papers, published from 2001 to 2006 on this topic, were analyzed by the method of citation analysis, and then the highly-cited references were clustered by SPSS soft package. Based on the contents of the papers in each cluster, the hot-topic researches were concluded.

RESULTS: Research literatures about the topic mainly come from the comprehensive journals that were well-known in the world, and the core journals of oncology and gastroenterology took the second place. There were 1547 related papers covered in Science Citation Index (SCI) from 2001 to 2006, of which 42 were cited more than 60 times, and then they were clustered into five parts according to their co-cited frequencies.

CONCLUSION: The hot topics are classified as: *H pylori* infection and epidemiology of gastric cancer; *H pylori* infection and animal model of gastric cancer; eradication of *H pylori* and gastric cancer; *H pylori* infection, cytokine polymorphisms and gastric cancer; genes related to *H pylori*-associated diseases.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Gastric cancer; Bibliometrics analysis

Wang XN, Cui L. Bibliometric analysis of literatures on relationship between *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinogenesis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(29):2883-2888

摘要

目的: 了解*H pylori*感染与胃癌关系研究现状, 总结研究热点, 提供参考信息.

方法: 采用引文分析方法对国外2001-2006有关该主题的重要文献进行调查分析, 并用SPSS对高频被引文献进行聚类分析, 根据各个类中的文献内容分析当前研究的热点.

结果: *H pylori*感染与胃癌关系研究的重要文献多数发表于世界著名的综合性刊物上, 肿瘤学与胃肠病学核心期刊次之. 检得SCI数据库中相关文献1547篇, 其参考文献出现频次高于60次论文42篇. 高被引论文聚类分析树图分5类.

结论: *H pylori*感染与胃癌流行病学、胃癌动物模型, *H pylori*感染的根除与胃癌的关系, *H pylori*感染、宿主细胞因子多态性与胃癌易感性, 以及*H pylori*致病相关基因的为研究热点.

关键词: 幽门螺杆菌; 胃癌; 文献计量学

王孝宁, 崔雷. 幽门螺杆菌感染与胃癌发病关系文献计量学分析. 世界华人消化杂志 2006;14(29):2883-2888
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2883.asp

■背景资料
胃癌是发病率很高的肿瘤之一, 其发病涉及多因素. 最近研究显示, 幽门螺杆菌(*H pylori*)感染是诱发胃癌的一个重要危险因素, 但*H pylori*感染诱发胃癌发生的具体机制目前尚不清楚.

0 引言

胃癌是世界范围内癌症导致死亡的第二大原

■研发前沿
胃癌的发病是多因素多步骤的过程，大量的流行病学和病理组织学资料表明，*H pylori*感染是诱发胃癌最重要的单一危险因素. 但是，关于*H pylori*与胃癌的关系仍存在一些无法解释的现象，现代分子生物学技术的发展有望为这些问题的解决开辟一条新的途径.

因，每年大约导致65万人死亡. 胃癌的发病是多因素多步骤的过程，研究显示，幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)感染是诱发胃癌的一个重要危险因素，世界卫生组织下属的国际癌症研究机构(IARC)已将其定为人类胃癌的Ⅰ类致癌原[1]. *H pylori*感染与胃癌的关系近年来引起了广泛的关注，是医学界的热点问题.

本文采用文献计量学中的引文分析方法[2]对国外近年来有关该主题的重要文献进行调查分析，总结出该领域的研究热点，为广大专业人员深入开展*H pylori*感染与胃癌关系的研究提供参考信息.

1 材料和方法

1.1 材料 本研究采用美国科学情报研究所出版的大型综合性数据库《科学引文索引》(science citation index, SCI)为样本来源，以“*Helicobacter pylori* AND gastric cancer”为检索策略，检索到2001/2006-07的相关文献1547篇. 将全部相关文献的引文(即参考文献，共65457条)套录下来，统计每一篇参考文献的出现频次，并由高到低进行排序，截取其中出现频次高于60次的论文作为高频被引文献，共42篇. 这些高频被引文献是目前本专业领域的研究人员在进行*H pylori*感染与胃癌关系这一主题研究的时候最为关注的论文，也是该主题的核心文献. 因此，对这些核心文献的分析可以反映出当前研究的热点.

1.2 方法 为了反映这些核心文献之间的内在联系，本文采用了同被引分析方法：2篇文献如果同时被后来的某一篇或者多篇文献引用，则称这2篇文献为同被引. 如果同被引次数越多，说明他们在引用者看来具有共同的特点. 因此，根据论文的同被引次数可以分析出他们之间的亲疏关系(距离)，运用统计分析软件SPSS对这些高频被引文献进行聚类分析. 由此形成这些高被引论文的聚类树图，根据各个类中的文献内容分析当前*H pylori*感染与胃癌关系研究的热点.

2 结果

2.1 高频被引论文及被引频次 高频被引论文大多数发表在世界著名的综合性刊物上，如Nature, Science, New England Journal of Medicine等，共20篇(47%)，发表于肿瘤学核心期刊9篇(21%)，如Cancer Research等，发表于胃肠病学核心期刊9篇(21%)，如Gastroenterology, Gut，其余4篇(1%)(表1).

2.2 高频被引论文的同被引聚类分析 聚类树图见图1. 纵轴的文字是这些论文的作者姓名和文献发表年代等内容，其后面数字代表表1中的文献序号；横轴的数字代表2个高被引论文之间的距离，如果2篇文献在越短的距离内聚集到一起，说明他们关系密切. 可以看到，文献15和文献30首先聚在一起，说明这2篇文献之间的距离是所有文献中最小的，因此他们的关系也是最近的，从文献题目中也可以看出他们都是有关*H pylori*全基因组序列测定的研究.

3 讨论

根据上面聚类分析的结果，我们可以把这42篇论文分为5个类别，分别是：(1)*H pylori*感染与胃癌流行病学研究：包括文献2, 6, 9, 10, 1, 4, 7, 14, 5, 21和33. 流行病学调查最先证实了*H pylori*感染与胃癌的发生相关，特别是3例前瞻性病例对照研究(Parsonnet *et al*, Nomura *et al*和Forman *et al*)相继一致发现，感染*H pylori*的人群发生胃癌的危险性增加(*OR*值分别为3.6, 6.0和2.77). Uemura *et al*前瞻性研究了1246例感染者，平均随访7.8 a，结果2.9%罹患胃癌. 胃癌发生于*H pylori*阳性胃病患者，如胃溃疡、胃增生性息肉和非溃疡性消化不良等；尽管十二指肠球部溃疡患者*H pylori*阳性，但无一例发生胃癌；所有*H pylori*阴性患者均无胃癌发生. 这项研究充分说明，感染*H pylori*有可能发展为胃癌. 国际性机构EUROGAST的大规模流行病学调查显示，*H pylori*感染人群发生胃癌的风险是非感染人群的6倍. Huang *et al*采用Meta分析方法评价二者的关系，结果显示*H pylori*感染是胃癌发生的危险因素，并指出现有研究结果不一致的原因是由于对照组的选择、患者的年龄、胃癌发生的部位及分期差异等多种混杂因素的影响. (2)*H pylori*感染与胃癌动物模型的研究：包括文献8, 24和42. 来自动物实验的依据证实，长期单独感染*H pylori*可诱发胃癌. 例如Watanabe *et al*用*H pylori*感染50只♂蒙古沙鼠，于感染后连续观察胃黏膜的形态变化，发现第6周动物胃黏膜出现严重的急、慢性炎症和上皮增生，第26周出现胃溃疡和肠上皮化生等病变，到第62周时，59%发生了胃溃疡，85%出现了肠上皮化生，37%发生了胃腺癌. 此研究表明，*H pylori*感染可直接诱发蒙古沙鼠胃癌，以高分化的腺癌为主，从而在动物实验中直接证实了*H pylori*与胃癌发生有关. (3)*H pylori*感染的根除与胃癌关系的研究：

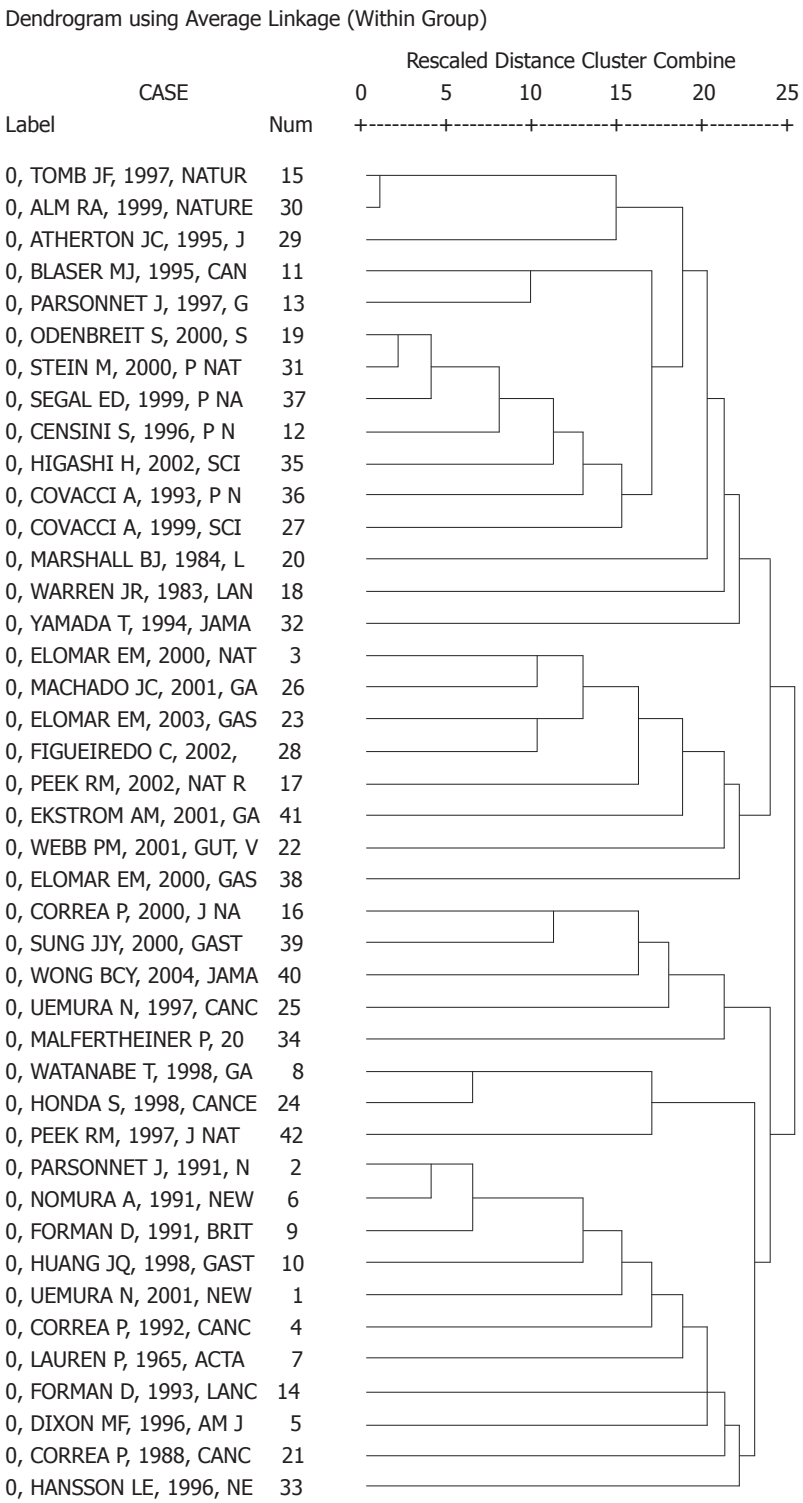


图 1 42篇高频被引论文的聚类分析图.

■相关报道
此前曾有报道运用引文分析方法分析SCI数据库收录胃癌前病变专题文献的参考文献, 以确定胃癌前病变研究的核心作者和核心期刊, 探索胃癌前病变专题文献的外部特征及核心信息源.

包括文献16, 39, 40, 25和34. 根除*H pylori*能否降低发生胃癌的风险是一个很重要的问题, 目前已有一些关于根除*H pylori*能否改善胃黏膜组织形态学的研究结果. 例如Wong *et al*在中国胃癌高发的福建长乐地区的7.5 a随访研究结果显示, 胃内无癌前疾病(如萎缩性胃炎)和癌前病变(如肠化生、异型增生)者, *H pylori*根除后无胃癌发生, 对于已有癌前疾病和病变者, 根除*H pylori*还不能防止胃癌的发生. Uemura *et al*对*H pylori*阳性早期胃癌在内镜切除癌肿病变后接受*H pylori*根除治疗, 3 a的内镜随访研究显示, 根除*H pylori*可改善胃黏膜嗜中性粒细胞渗透和肠化生, 抑制新发癌灶的产生. (4)*H pylori*感染、宿主细胞因子多态性与胃癌易感性研究: 包括文献3, 26, 23, 28, 17, 41, 22和38. *H pylori*感染关键的病理生理效应是启动了炎症反应, 其主要介质是细

■**应用要点**
本文采用文献计量学中的引文分析方法对国外近年来有关该主题的重要文献进行调查分析，总结该领域的研究热点，以期为*H pylori*感染与胃癌关系的研究提供参考信息.

表 1 2001-2006年有关*H pylori*感染与胃癌关系研究的高频被引论文

序号	文献出处	被引频次
1	Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001; 345: 784-789	275
2	Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelman JH, Orentreich N, Sibley RK. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 325: 1127-1131	261
3	El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, Lanyon G, Martin M, Fraumeni JF Jr, Rabkin CS. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000; 404: 398-402	248
4	Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process-First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 1992; 52: 6735-6740	202
5	Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 1161-1181	198
6	Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Kato I, Perez-Perez GI, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med* 1991; 325: 1132-1136	165
7	Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965; 64: 31-49	159
8	Watanabe T, Tada M, Nagai H, Sasaki S, Nakao M. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. *Gastroenterology* 1998; 115: 642-648	152
9	Forman D, Newell DG, Fullerton F, Yarnell JW, Stacey AR, Wald N, Sitas F. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *BMJ* 1991; 302: 1302-1305	138
10	Huang JQ, Sridhar S, Chen Y, Hunt RH. Meta-analysis of the relationship between *Helicobacter pylori* seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology* 1998; 114: 1169-1179	135
11	Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN, Nomura A. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1995; 55: 2111-2115	132
12	Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A. cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14648-14653	116
13	Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelman H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1997; 40: 297-301	103
14	An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. The EUROGAST Study Group. *Lancet* 1993; 341: 1359-1362	100
15	Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzegerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocayne JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weidman JM, Fujii C, Bowman C, Watthey L, Wallin E, Hayes WS, Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, Venter JC. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997; 388: 539-547	95
16	Correa P, Fontham ET, Bravo JC, Bravo LE, Ruiz B, Zarama G, Realpe JL, Malcom GT, Li D, Johnson WD, Mera R. Chemoprevention of gastric dysplasia: randomized trial of antioxidant supplements and anti-*helicobacter pylori* therapy. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1881-1888	92
17	Peek RM Jr, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 28-37	87
18	Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983; 1:	87

1273–1275

19 Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 2000; 287: 1497–1500 86

20 Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1: 1311–1315 86

21 Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 1988; 48: 3554–3560 82

22 Gastric cancer and *Helicobacter pylori*: a combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts. *Gut* 2001; 49: 347–353 79

23 El–Omar EM, Rabkin CS, Gammon MD, Vaughan TL, Risch HA, Schoenberg JB, Stanford JL, Mayne ST, Goedert J, Blot WJ, Fraumeni JF Jr, Chow WH. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology* 2003; 124: 1193–1201 76

24 Honda S, Fujioka T, Tokieda M, Satoh R, Nishizono A, Nasu M. Development of *Helicobacter pylori*–induced gastric carcinoma in Mongolian gerbils. *Cancer Res* 1998; 58: 4255–4259 74

25 Uemura N, Mukai T, Okamoto S, Yamaguchi S, Mashiba H, Taniyama K, Sasaki N, Haruma K, Sumii K, Kajiyama G. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on subsequent development of cancer after endoscopic resection of early gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6: 639–642 73

26 Machado JC, Pharoah P, Sousa S, Carvalho R, Oliveira C, Figueiredo C, Amorim A, Seruca R, Caldas C, Carneiro F, Sobrinho–Simoes M. Interleukin 1B and interleukin 1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2001; 121: 823–829 72

27 Covacci A, Telford JL, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 1999; 284: 1328–1333 72

28 Figueiredo C, Machado JC, Pharoah P, Seruca R, Sousa S, Carvalho R, Capelinha AF, Quint W, Caldas C, van Doorn LJ, Carneiro F, Sobrinho–Simoes M. *Helicobacter pylori* and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high–risk individuals for gastric carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 1680–1687 72

29 Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995; 270: 17771–17777 72

30 Alm RA, Ling LS, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, Smith DR, Noonan B, Guild BC, deJonge BL, Carmel G, Tummino PJ, Caruso A, Uria–Nickelsen M, Mills DM, Ives C, Gibson R, Merberg D, Mills SD, Jiang Q, Taylor DE, Vovis GF, Trust TJ. Genomic–sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1999; 397: 176–180 71

31 Stein M, Rappuoli R, Covacci A. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag–driven host cell translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1263–1268 69

32 NIH Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in Peptic Ulcer Disease. *JAMA* 1994; 272: 65–69 68

33 Hansson LE, Nyren O, Hsing AW, Bergstrom R, Josefsson S, Chow WH, Fraumeni JF Jr, Adami HO. The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease. *N Engl J Med* 1996; 335: 242–249 68

34 Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Hungin AP, Jones R, Axon A, Graham DY, Tytgat G. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection–the Maastricht 2–2000 Consensus Report. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 167–180 67

35 Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, Asaka M, Hatakeyama M. SHP–2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* 2002; 295: 683–686 65

36 Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, Massone A, Papini E, Xiang Z, Figura N. Molecular characterization of the 128–kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5791–5795 65

37 Segal ED, Cha J, Lo J, Falkow S, Tompkins LS. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 14559–14564 64

■名词解释

文献计量学是借助文献的各种特征的数量, 采用数学与统计学方法来描述、评价和预测科学技术的现状与发展趋势的图书情报学分支学科. 有助于科研人员分析、追踪热点研究领域、判断科学发展的宏观态势、推测学科发展及确定科研选题等.

■同行评价
本文采用文献计量学中的引文分析方法对国外近年来有关该主题的重要文献进行调查分析, 以期为*H pylori*感染与胃癌关系的研究提供参考信息, 具有一定的指导意义, 课题设计合理, 结论可信, 具有较高的理论水平.

38 El-Omar EM, Oien K, Murray LS, El-Nujumi A, Wirz A, Gillen D, Williams C, Fullarton G, McColl KE. Increased prevalence of precancerous changes in relatives of gastric cancer patients: critical role of *H. pylori*. *Gastroenterology* 2000; 118: 22-30 62

39 Sung JJ, Lin SR, Ching JY, Zhou LY, To KF, Wang RT, Leung WK, Ng EK, Lau JY, Lee YT, Yeung CK, Chao W, Chung SC. Atrophy and intestinal metaplasia one year after cure of *H. pylori* infection: a prospective, randomized study. *Gastroenterology* 2000; 119: 7-14 62

40 Wong BC, Lam SK, Wong WM, Chen JS, Zheng TT, Feng RE, Lai KC, Hu WH, Yuen ST, Leung SY, Fong DY, Ho J, Ching CK, Chen JS. *Helicobacter pylori* eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 291: 187-194 62

41 Ekstrom AM, Held M, Hansson LE, Engstrand L, Nyren O. *Helicobacter pylori* in gastric cancer established by CagA immunoblot as a marker of past infection. *Gastroenterology* 2001; 121: 784-791 61

42 Peek RM Jr, Moss SF, Tham KT, Perez-Perez GI, Wang S, Miller GG, Atherton JC, Holt PR, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* cagA+ strains and dissociation of gastric epithelial cell proliferation from apoptosis. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 863-868 60

胞因子. 例如El-Omar *et al*报道*IL*-1基因多态性可能表达大量的IL-1β蛋白, 与*H pylori*感染导致胃酸分泌减少及胃癌发生相关联. Machado *et al*发现*IL*-1B-511T和*IL*-1RN*2基因型增加肠型胃癌发生的风险(*OR*值为2.7), 进一步证实*IL*-1基因多态性与胃癌发生密切相关, *IL*-1B与*IL*-1RN基因多态性之间存在协同作用. (5)*H pylori*致病相关基因的研究: 包括文献15, 30, 29, 11, 13, 19, 31, 37, 12, 35, 36, 27, 20, 18和32. *H pylori*感染与胃癌发生相关的分子机制研究, 是目前*H pylori*研究的主要方面. Tomb *et al*和Alm *et al*对2株*H pylori* 26695和J99全基因组序列测定工作的完成, 加速了*H pylori*的研究进程. Atherton *et al*报道特异性空泡毒素A(VacA)与体外细胞毒素活力的水平相关, 且与临床表现及进展结果相关. 许多研究将注意力集中在CagA上. Parsonnet *et al*报道CagA阳性的*H pylori*感染者发生胃癌的风险是无*H pylori*感染者的5.8倍, 且对肠型和弥漫性癌均如此. Segal *et al*报道*H pylori*与胃上皮细胞共同培养可引起信号传递和145 kDa宿主细胞蛋白的酪氨酸磷酸化. Odenbreit *et al*发现CagA是经由一个复杂的“注射器”样的Ⅳ型分泌系统进入胃上皮细胞的, 此分泌装置由CagA致病岛基因编码. Higashi *et al*发现CagA进入胃上皮细胞后被磷酸化, 磷酸化的CagA结合并激活细胞内的酪氨酸磷酸化酶SHP-2, 使SHP-2锚定于胞膜上, 并进一步活化去磷酸化的信号传导级联反应通路, 导致细胞的形态学改变.

经过对上述有关*H pylori*感染与胃癌关系专题相关文献的引用情况调查分析, 可得如下2个结论: (1)*H pylori*感染与胃癌关系研究的重要文献多数发表于世界著名的综合性刊物上, 肿瘤学与胃肠病学核心期刊次之. (2)目前关于*H pylori*感染与胃癌关系的研究热点包括5个方面: *H pylori*感染与胃癌流行病学研究, *H pylori*感染与胃癌动物模型的研究, *H pylori*感染的根除与胃癌关系的研究, *H pylori*感染、宿主细胞因子多态性与胃癌易感性研究, *H pylori*致病相关基因的研究.

4 参考文献

1 林三仁, 张莉. 幽门螺杆菌与胃癌关系的研究进展. 中华医学杂志 2004; 84: 1210-1211

2 崔雷. 专题文献高频主题词的共词聚类分析. 情报理论与实践 1996; 19: 49-51

电编 张敏 编辑 王晓瑜

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年10月18日; 14(29): 2889-2892
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

终末期肝病模型评估我国肝硬化患者预后的能力

林菁华, 文卓夫

林菁华, 文卓夫, 中山大学第三附属医院消化内科 广东省广州市 510630
通讯作者: 文卓夫, 510630, 广东省广州市天河路600号, 中山大学附属第三医院消化内科. wenzfu@163.com
电话: 020-85516867-3082 传真: 020-87536401
收稿日期: 2006-07-11 接受日期: 2006-08-23

Capability of end-stage liver disease model in predicting the prognosis of Chinese patients with liver cirrhosis

Jing-Hua Lin, Zhuo-Fu Wen

Jing-Hua Lin, Zhuo-Fu Wen, Department of Gastroenterology, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China
Correspondence to: Dr. Zhuo-Fu Wen, Department of Gastroenterology, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, 600 Tianhe Road, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China. wenzfu@163.com
Received: 2006-07-11 Accepted: 2006-08-23

Abstract

AIM: To evaluate the capability of the model for end-stage liver disease (MELD) in predicting the prognosis of Chinese patients with liver cirrhosis.

METHODS: A cohort of 216 patients with liver cirrhosis were retrospectively studied and followed up. The area under the receiver operating characteristic (ROC) curve (AUC) was used to compare MELD, U-MELD (MELD modified by the United Network for Organ Sharing), Child-Turcotte-Pugh (CTP) score and classification in predicting accuracy. MELD score was obtained for each patient according to the modified formula by Kamath. U-MELD score was obtained according to the modified formula by the United Network for Organ Sharing (UNOS). Nonparametric approach was applied for the comparison of AUC.

RESULTS: The AUC value generated by the ROC curve for MELD was 0.838 at 3 mo, 0.856 at 6 mo and 0.877 at 1 year. MELD was better than CTP classification, and there was significant difference between them. However, there was no significant difference between MELD and CTP score. U-MELD was more accurate than CTP score in predicting the 3-mo prognosis (P = 0.028), while it did not show significant superiority in predicting 6-mo and 1-year prognosis.

CONCLUSION: There is no significant difference between MELD and CTP score, but U-MELD is superior to CTP score in predicting the 3-mo prognosis.

Key Words: Liver cirrhosis; Prognosis; Model

Lin JH, Wen ZF. Capability of end-stage liver disease model in predicting the prognosis of Chinese patients with liver cirrhosis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(29):2889-2892

摘要

目的: 评价终末期肝病模型(MELD)在评估我国肝硬化患者预后方面的作用.

方法: 选择具有完整临床资料和随访结果的216例肝硬化患者进行回顾性分析. 利用受试者工作特征曲线(ROC)及其下面积(AUC)比较MELD、美国器官共享网络(UNOS)修改后的MELD(U-MELD)、Child-Turcotte-Pugh(CTP)评分及分级判断预后的能力. 每位患者的MELD值根据Kamath修改后的公式计算, U-MELD值根据UNOS修改后的计算方法计算. AUC的比较采用非参数方法.

结果: MELD在判断患者3, 6 mo, 1 a等生存时间的ROC曲线AUC值分别是0.838, 0.856, 0.877, 均大于CTP评分及分级的AUC值, 与CTP分级有显著性差异, 但与CTP评分无显著性差异. U-MELD在判断3 mo预后时的AUC值与CTP评分的差异有统计学意义(P = 0.028), 而在6 mo, 1 a时两者间的AUC差异尚无统计学意义.

结论: MELD与CTP评分的差异无统计学意义, 而U-MELD在评估3 mo预后方面较CTP评分已有显著优势.

■背景资料
2000年, Malinchoc建立了一个用于判断行TIPS的肝硬化患者预后的模型. 2001年, Kamath修改了该模型, 称其为MELD. 2002年, UNOS正式选择MELD作为器官分配的依据, 并再次对其进行了一些修改. 目前对于MELD的作用和地位尚有争议, 其是否适用于我国肝硬化患者仍有待证明.

■研发前沿
如何进一步改进MELD以及正确评价MELD的地位是近年来国际上的一个研究热点. 有的研究将MELD与其他指标联合, 有的研究则将MELD中的某些指标删除, 但目前尚无公认的更好的新模型.

关键词: 肝硬化; 预后; 模型

林菁华, 文卓夫. 终末期肝病模型评估我国肝硬化患者预后的能力. 世界华人消化杂志 2006;14(29):2889-2892
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2889.asp

0 引言

如何判断肝硬化患者的预后一直是临床医生们关注的问题. 近年来, 随着肝移植技术的发展, 越来越多的患者选择肝移植. 但供体数目有限, 临床医生需要更准确的评估患者预后, 以合理选择进行肝移植的病例. Child-Turcotte-Pugh(CTP)评分系统已逐渐暴露出自身的一些局限性. 2000年, Malinchoc *et al*[1]选取231例行经颈静脉肝内门体静脉分流术(TIPS)的肝硬化患者进行研究, 通过Cox比例风险回归模型分析, 建立了一个用于判断此类患者短期预后的评分模型. 2001年, Kamath *et al*[2]对这个模型进行了一些修改, 称其为终末期肝病模型(MELD). 2002年, 美国器官共享网络(UNOS)正式选择MELD作为器官分配的依据, 并再次对其进行了一些修改. 目前, 对于MELD的作用和地位以及其是否能取代CTP评分系统尚有争议, 一部分研究认为MELD比传统的CTP评分系统要优越[3-4]; 一部分研究则认为MELD的这种优势并不明显, 尚不能取代CTP评分系统[5]. 且国外肝硬化病因以酒精性及丙型病毒性肝炎为主, 国内肝硬化病因以乙型病毒性肝炎为主, MELD建立的数据基础来源于国外少数拟行TIPS的肝硬化患者, 其是否适用于我国肝硬化患者仍有待大量临床病例去证明. 目前, 已有的研究多采用Kamath修改后的MELD公式, 较少研究比较UNOS修改后的MELD(U-MELD). 我们拟将MELD与U-MELD及CTP评分系统进行比较, 以评价MELD在评估我国肝硬化患者预后方面的作用.

1 材料和方法

1.1 *材料* 1999-01/2005-09在我院消化内科住院治疗的216例具有完整住院资料和随访结果的肝硬化患者进行回顾性分析, 所有患者均经病史、症状和体征、生化和影像学检查确诊, 诊断按照2000年西安全国传染病与寄生虫病学术会议修订的诊断标准. 其中男172人(79.63%), 女44人(20.37%); 年龄16-81(中位54)岁; 乙肝肝硬化153例(70.83%), 酒精性肝硬化35例(16.20%), 丙肝肝硬化10例(4.63%), 其他或原因不明者18例(8.33%). 平均随访16.27 mo, 最长生存75 mo. 随访期内共有85例(39.4%)患者死亡. 216例患者中, CTP分级A级35例(16.2%), 随访期间死亡1例(占A级的2.8%), B级81例(37.5%), 随访期间死亡21例(占B级的25.9%), C级100例(46.3%), 死亡63例(占C级的63.0%).

1.2 *方法* 复习病历, 根据患者的临床资料, 计算其MELD, U-MELD, CTP评分及CTP分级. 其中, MELD = 3.8×$\log_e$[胆红素(mg/dL)]+11.2×$\log_e$[国际标准化比值(INR)]+9.6×$\log_e$[肌酐(mg/dL)]+6.4×[病因(酒精性或胆汁性为0, 其他为1)], 结果取近似的整数[2].

U-MELD = 0.957×$\log_e$[肌酐(mg/dL)]+0.378×$\log_e$[胆红素(mg/dL)]+1.120×$\log_e$[国际标准化比值(INR)]+0.643. 其中小于1.0的数据设为1.0, 肌酐的最大值定为4.0 mg/dL, 所得结果乘以10并取近似整数, 设分值上限40和分值下限6(供肝分配原则及U-MELD的计算器可以在www.UNOS.org上查找到).

CTP评分及分级按参考文献[6]计算. 根据随访情况, 计算生存时间. 利用受试者工作特征(ROC)曲线及其下面积(AUC)比较MELD, U-MELD, CTP评分及分级判断预后的能力. ROC的AUC比较采用非参数方法[7].

统计学处理 采用SPSS 13.0及SAS 9.1软件进行. $P<0.05$(双侧)为显著性差异.

2 结果

MELD在评估患者3, 6 mo, 1 a预后时ROC曲线的AUC分别为: 0.838, 0.856, 0.877; U-MELD在评估患者3, 6 mo, 1 a预后时的AUC分别为0.859, 0.867, 0.893; CTP评分的AUC分别为0.770, 0.798, 0.837; CTP分级则分别为0.733, 0.755, 0.790(表1).

MELD与U-MELD的AUC比较, 3 mo(χ^2 = 2.0380, P = 0.1534), 6 mo(χ^2 = 0.6873, P = 0.4071), 1 a(χ^2 = 1.4810, P = 0.2236)均无显著性差异($P>0.05$); MELD与CTP评分比较, 3 mo(χ^2 = 2.2706, P = 0.1318), 6 mo(χ^2 = 2.2151, P = 0.1367), 1 a(χ^2 = 1.3627, P = 0.2431)均无显著性差异($P>0.05$); MELD与CTP分级比较, 3 mo(χ^2 = 4.7021, P = 0.0301<0.05), 6 mo(χ^2 = 5.8326, P = 0.0157<0.05), 1 a(χ^2 = 5.5232, P = 0.0188<0.05)均有显著性差异(表2).

CTP评分与CTP分级的AUC比较, 3 mo(χ^2 =

表 1 不同时间患者生存情况各评分系统ROC曲线的AUC结果

生存时间	ROC曲线的AUC结果及95%可信区间			
	MELD	U-MELD	CTP评分	CTP分级
3 mo	0.838 (0.764–0.912)	0.859 (0.795–0.923)	0.770 (0.703–0.837)	0.733 (0.662–0.804)
6 mo	0.856 (0.791–0.920)	0.867 (0.809–0.924)	0.798 (0.737–0.859)	0.755 (0.689–0.822)
1 a	0.877 (0.822–0.932)	0.893 (0.843–0.942)	0.837 (0.779–0.894)	0.790 (0.724–0.855)

■应用要点

本文评价了MELD在评估我国肝硬化患者预后方面的作用, 为临床医生评估肝硬化患者预后及使用这些预后模型提供了参考.

表 2 MELD与U-MELD、CTP评分、CTP分级的AUC比较

生存时间	U-MELD		CTP评分		CTP分级	
	χ^2	P	χ^2	P	χ^2	P
3 mo	2.0380	0.1534	2.2706	0.1318	4.7021	0.0301
6 mo	0.6873	0.4071	2.2151	0.1367	5.8326	0.0157
1 a	1.4810	0.2236	1.3627	0.2431	5.5232	0.0188

表 3 CTP评分与CTP分级的AUC比较

生存时间	χ^2	P
3 mo	4.0851	0.0433
6 mo	6.8791	0.0087
1 a	9.5758	0.0020

表 4 U-MELD与CTP评分的AUC比较

生存时间	χ^2	P
3 mo	4.8281	0.0280
6 mo	3.7368	0.0532
1 a	3.0116	0.0827

4.0851, P = 0.0433<0.05), 6 mo(χ^2 = 6.8791, P = 0.0087<0.01), 1 a(χ^2 = 9.5758, P = 0.0020<0.01), 显示两者有显著性差异(表3).

U-MELD与CTP评分的AUC比较, 3 mo(χ^2 = 4.8281, P = 0.0280<0.05), 6 mo(χ^2 = 3.7368, P = 0.0532>0.05), 1 a(χ^2 = 3.0116, P = 0.0827>0.05), 显示U-MELD在判断患者3 mo预后时与CTP评分的差异有统计学意义, 而在6 mo, 1 a时两者间的差异尚无统计学意义(表4).

3 讨论

ROC曲线是以假阳性率(1-特异度)为横坐标, 灵敏度为纵坐标, 依照连续变化的诊断阈值, 由不同灵敏度和特异度画出的曲线, 用于二分类判别效果的评价. 其AUC越大, 诊断的准确性越高[8]. 当一个判断指标的AUC>0.8时, 可以认为他是一个非常好的判断标准[9]. 在3, 6 mo, 1 a这几个时间点上, MELD评估患者生存情况的ROC曲线的AUC值都>0.8, 比CTP评分或分级都要高, 可以认为MELD在评估我国肝硬化患者预后方面是一个很好的模型. 其中MELD与CTP分级的差别具有显著性(P<0.05), 但MELD与CTP评分的差别不具有显著性, 提示MELD优于CTP分级, 但尚未能完全取代CTP评分. CTP中的胆红素和凝血酶原时间等指标为不连续的断点, 而MELD为连续性的数值, 因此MELD有更好的鉴别力[10]. 但也因如此, MELD的计算要比CTP复杂得多. CTP计算方便, 便于临床使用, 故仍有其存在的价值. CTP评分的判断能力比CTP分级要好, 两者的差别具有显著性(P<0.05). 这是因为CTP分级只有3个级别, 在同一个级别内就不能再分类了. 用CTP评分代替CTP分级可以提高其判断预后的能力.

目前的研究中, MELD的计算方法并不统一. 有的研究采用Kamath的公式, 有的研究采用Malinchoc的公式, 有的研究者则自行对MELD作了部分修改. 为此, 我们特意比较了Kamath的计算方法(MELD)与UNOS的计算方法(U-MELD). MELD判断预后时, 其ROC曲线的AUC一直比U-MELD低, U-MELD所作出的修改应该是有益的. 虽然两者间不具有显著性差异, 但U-MELD在评估患者3 mo预后时的能力已明显优于CTP评分(P<0.05), 而MELD在各时间点上与CTP评分均无显著性差异. 正如Kamath的研究所见, 病因对MELD并没有太大意义[2], U-MELD就不再使用病因这个指标了.

■同行评价
本文评价晚期肝病的预后具有重要临床价值, 有较好的设计、统计处理, 结论对肝病临床工作者有指导意义. 只是对观察对象随访时间尚短, 如能延长随访则说服力更大.

U-MELD对一些指标的计算作了一些调整, 也限制了最大分值和最小分值, 这样就避免了一些极端数据的影响, 也避免了出现负数分值. 目前, 对MELD的各种改进意见仍层出不穷. Giannini *et al*[11]发现AST/ALT比值与MELD联合, 可提高评估病毒相关肝硬化患者中期预后的准确性. Robert *et al*[12]的研究认为, 国际标准化比值(INR)并不适用于在肝功能不全的患者中代替PT值, 仅PT活动度(PTA)可作为这类患者PT值报告的统一尺度. 因此, 用PTA来取代INR可能会更好. Heuman *et al*[13]的研究认为, 当MELD分值低于21分时, 对预后的评估能力是不足的, 腹水及低钠血症可以在低分组识别出那些有高死亡风险的患者. Saab *et al*[14]的研究则认为, MELD并不能反映患者的生存质量, CTP因包含了腹水和肝性脑病这两项指标而与生存质量高度相关. 最近, Biggins *et al*[15]又提出了MELD与血钠的联合公式(MELD-Na)以求更精确地评估预后.

总之, MELD是一个评估我国肝硬化患者预后的良好模型, 优于CTP分级, 但尚未能完全取代CTP评分系统. U-MELD在评估患者3 mo预后方面较CTP评分已有显著优势, 而MELD在各时间点上与CTP评分无明显差异. MELD仍有改进的可能.

4 参考文献

1 Malinchoc M, Kamath PS, Gordon FD, Peine CJ, Rank J, ter Borg PC. A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology* 2000; 31: 864-871

2 Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, D'Amico G, Dickson ER, Kim WR. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology* 2001; 33: 464-470

3 Wiesner R, Edwards E, Freeman R, Harper A, Kim R, Kamath P, Kremers W, Lake J, Howard T, Merion RM, Wolfe RA, Krom R. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology* 2003; 124: 91-96

4 Srikureja W, Kyulo NL, Runyon BA, Hu KQ. MELD score is a better prognostic model than Child-Turcotte-Pugh score or Discriminant Function score in patients with alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2005; 42: 700-706

5 Angermayr B, Cejna M, Karnel F, Gschwantler M, Koenig F, Pidlich J, Mendel H, Pichler L, Wichlas M, Kreil A, Schmid M, Ferlitsch A, Lipinski E, Brunner H, Lammer J, Ferenci P, Gangl A, Peck-Radosavljevic M. Child-Pugh versus MELD score in predicting survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunt. *Gut* 2003; 52: 879-885

6 Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 1973; 60: 646-649

7 DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 1988; 44: 837-845

8 颜虹. 医学统计学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 220-221

9 Hanley JA, McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 1982; 143: 29-36

10 Chalasani N, Kahi C, Francois F, Pinto A, Marathe A, Bini EJ, Pandya P, Sitaraman S, Shen J. Model for end-stage liver disease (MELD) for predicting mortality in patients with acute variceal bleeding. *Hepatology* 2002; 35: 1282-1284

11 Giannini E, Botta F, Testa E, Romagnoli P, Polegato S, Malfatti F, Fumagalli A, Chiarbonello B, Risso D, Testa R. The 1-year and 3-month prognostic utility of the AST/ALT ratio and model for end-stage liver disease score in patients with viral liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2855-2860

12 Robert A, Chazouilleres O. Prothrombin time in liver failure: time, ratio, activity percentage, or international normalized ratio? *Hepatology* 1996; 24: 1392-1394

13 Heuman DM, Abou-Assi SG, Habib A, Williams LM, Stravitz RT, Sanyal AJ, Fisher RA, Mihas AA. Persistent ascites and low serum sodium identify patients with cirrhosis and low MELD scores who are at high risk for early death. *Hepatology* 2004; 40: 802-810

14 Saab S, Ibrahim AB, Shpaner A, Younossi ZM, Lee C, Durazo F, Han S, Esrason K, Wu V, Hiatt J, Farmer DG, Ghobrial RM, Holt C, Yersiz H, Goldstein LI, Tong MJ, Busuttil RW. MELD fails to measure quality of life in liver transplant candidates. *Liver Transpl* 2005; 11: 218-223

15 Biggins SW, Kim WR, Terrault NA, Saab S, Balan V, Schiano T, Benson J, Therneau T, Kremers W, Wiesner R, Kamath P, Klintmalm G. Evidence-based incorporation of serum sodium concentration into MELD. *Gastroenterology* 2006; 130: 1652-1660

电编 张敏 编辑 王晓瑜

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年10月18日; 14(29): 2893-2896
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

十二指肠间质瘤临床分析30例

张 勇, 陈 凛

张勇, 陈凛, 中国人民解放军总医院普通外科 北京市 100853
通讯作者: 陈凛, 100853, 北京市, 中国人民解放军总医院普通外科. chenlinbj@vip.sina.com
电话: 010-66937846
收稿日期: 2006-07-25 接受日期: 2006-09-01

Clinical analysis of 30 patients with duodenal gastrointestinal stromal tumors

Yong Zhang, Lin Chen

Yong Zhang, Lin Chen, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Correspondence to: Lin Chen, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China. chenlinbj@vip.sina.com
Received: 2006-07-25 Accepted: 2006-09-01

Abstract

AIM: To investigate clinical characteristics, surgical treatment and prognosis factors for the patients with duodenal gastrointestinal stromal tumors (GISTs).

METHODS: The clinical data of 30 patients with duodenal GISTs from 1993 to 2006 were retrospectively analyzed. The survival rates were calculated by Kaplan-Meier method, and the prognosis factors were analyzed by univariate analysis, and Cox model multivariate analysis.

RESULTS: Common symptoms of duodenal GISTs were abdominal pain and alimentary tract hemorrhage. Common lesions of duodenal GISTs were located in the descending portion. The overall 1-, 3-, and 5-year survival rate were 92.95%, 84.87%, and 69.15%, respectively. Univariate analysis showed that Fletcher's classification (χ^2 = 10.570, P = 0.0143), tumor size (χ^2 = 7.883, P = 0.0485), mitosis (>5, ≤5: χ^2 = 14.155, P = 0.0002), distant metastases (χ^2 = 22.519, P = 0.0000) were significant prognostic factors. The number of patients with radical partial resection was markedly larger than that without radical partial resection (χ^2 = 17.8180, P = 0.0000). COX multivariate analysis indicated that only mitosis was an independent prognostic factor.

CONCLUSION: Surgical treatment of duodenal GISTs should be based on radical partial resection, and mitosis may be an independent prognostic factor for patients with duodenal GISTs.

Key Words: Duodenal gastrointestinal stromal tumors; Mitosis; Prognosis; Radical partial resection

Zhang Y, Chen L. Clinical analysis of 30 patients with duodenal gastrointestinal stromal tumors. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(29):2893-2896

摘要

目的: 分析十二指肠间质瘤的临床特征并探讨其外科治疗及预后因素.

方法: 回顾性分析我科1993-2006年30例十二指肠间质瘤的临床资料. 运用SPSS统计软件进行生存分析, 采用Kaplan Meier法和log-rank检验进行单因素生存预后分析, 多因素分析采用Cox模型.

结果: 十二指肠间质瘤最常见症状为右上腹隐痛不适、消化道出血, 发病部位以十二指肠降段多见. 全组1, 3, 5 a生存率分别为92.95%, 84.87%, 69.15%. 单因素分析Fletcher风险分级(χ^2 = 10.570, P = 0.0143), 肿瘤大小(χ^2 = 7.883, P = 0.0485), 核分裂象(>5, ≤5: χ^2 = 14.155, P = 0.0002), 是否伴发远处转移(χ^2 = 22.519, P = 0.0000)具有显著性, 是否行根治术(χ^2 = 17.8180, P = 0.0000)比较差异具有显著性, 多因素分析表明核分裂象是独立的预后影响因素.

结论: 十二指肠间质瘤宜采用局部切除为主的根治性手术, 本组病例核分裂象是判断预后的独立因素.

关键词: 十二指肠间质瘤; 核分裂象; 预后; 根治术

张勇, 陈凛. 十二指肠间质瘤临床分析30例. 世界华人消化杂志 2006;14(29):2893-2896
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2893.asp

■背景资料
目前公认胃肠道间质瘤是胃肠道最常见的间叶源性肿瘤, 可发生在消化道的各个部位, 但发生于十二指肠的间质瘤很少, 国内外十二指肠间质瘤仅见少数报道, 临床上对其治疗和处理尚未形成标准, 特别是良恶性判断, 手术治疗方式及预后评估仍然是难点.

■应用要点
本文的实际应用价值是总结十二指肠的间质瘤治疗方式及预后评估, 有助于临床诊治的规范.

0 引言

胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumor, GIST)以往被诊断为平滑肌瘤或平滑肌肉瘤, 近年基于免疫组化及电镜的发展被区分出来, 是最常见的间叶组织来源肿瘤, 约占胃肠道肿瘤的2%[1]. 可发生在消化道的各个部位, 但发生于十二指肠的间质瘤较少, 约占所有间质瘤的4.5%[2], 国内外十二指肠间质瘤仅见少数报道[3-7]. 由于其解剖和生理的特殊性, 在诊断和治疗上也有其特点. 现总结1993-2006年我院共收治经病理证实的30例十二指肠间质瘤的临床病理资料, 分析如下.

1 材料和方法

1.1 材料 本组30例, 男23例, 女7例. 年龄28-74(平均53.0)岁, 中位年龄53岁. 肿瘤直径2-21.5 cm, 中位直径7 cm. 肿瘤位于十二指肠球部1例, 降段18例, 水平段9例, 升段2例. 临床症状表现为上腹不适疼痛26例(86.7%), 黑便、便血18例(60.0%), 腹部包块8例(26.7%), 无症状者1例. Fletcher分级极低风险1例(3.3%), 低风险10例(33.3%), 中风险6例(20.0%), 高风险13例(43.3%). 19例行超声检查, 6例提示腹腔占位, 来自胰腺可能; 4例提示腹膜后肿瘤和腹膜后囊性肿瘤; 5例诊断肿瘤来自肠道; 4例未能明确诊断. 13例行十二指肠低张造影, 均诊断病变来自十二指肠. 26例行CT扫描, 15例提示占位来自十二指肠占位, 3例提示囊性占位来自腹膜后, 5例提示胰头后方软组织影, 均与十二指肠关系密切, 3例未能明确诊断. 5例行核磁共振检查均提示来自十二指肠肿瘤. 3例内镜超声检查(EUS)均明确病变部位. 参考Fletcher *et al*[8]提出的风险分级标准将十二指肠间质瘤分为极低风险: 肿瘤直径≤2 cm, 核分裂象<5/50 HPF; 低风险: 肿瘤直径>2-5 cm, 核分裂象<5/50 HPF; 中风险: 肿瘤直径<5 cm, 核分裂象>5-10/50 HPF或肿瘤直径>5-10 cm, 核分裂象<5/50 HPF; 高风险: 肿瘤直径>10 cm, 任何核分裂象或核分裂象>10/50 HPF、任何大小的肿瘤. 免疫组化检测主要内容: SMA蛋白、可溶性酸性蛋白S-100、造血干细胞抗原CD34和酪氨酸受体CD117. 30例均行手术治疗, 11例行局部切除加肠修补术; 5例行十二指肠节段切除(1例行肝肿瘤微波治疗); 3例行远端胃加十二指肠节段切除(其中1例同时行脾切除); 1例行十二指肠节段切除, 右半结肠切除术, 肝肿块部分切除活检术; 9例行胰十二指肠切除术(2例同时行胆囊切除, 1例行右半肝切除, 1例行小肠结肠部分切除); 1例行剖腹探查、胃空肠吻合、胆囊空肠吻合术. 4例再手术治疗. 根治性切除24例, 非根治性手术6例. 根治性手术的标准是肿瘤完整切除无残留, 肿瘤无破裂, 切缘阴性.

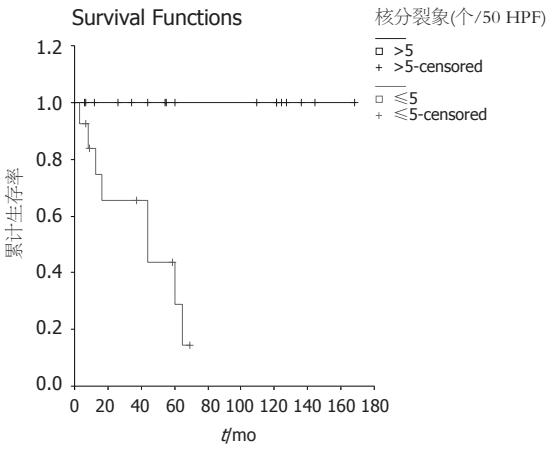


图 1 不同核分裂象生存曲线.

1.2 方法 由本科随访组采取信访、电话随访或门诊随访形式进行随访, 失访病例按死亡计算. 应用SPSS软件行统计学分析, 总样本生存率计算应用Kaplan Meier法, 单因素分析应用log-rank检验, 多因素分析应用Cox回归模型, $P<0.05$作为差异有显著性意义. 单因素分析有统计学差异的因素进入Cox回归分析, 分析多因素对预后的影响.

2 结果

30例均随访到, 无失访, 随访3 mo-14 a(平均4.95 a). 30例十二指肠间质瘤患者1, 3, 5 a生存率为92.95%, 84.87%, 69.15%. 免疫组化染色CD117阳性30例(100%), CD34阳性19例(63.33%), SMA阳性23例(36.67%), S-100阳性2 例(6.67%) .

2.1 单因素分析 对不同性别、年龄(>50岁者17例, ≤50岁者13例)、肿瘤部位, 是否行胰十二指肠切除术分别进行生存率单因素分析差异无显著性意义($P>0.05$). 对不同肿瘤直径大小(<2 cm 1例, 2-5 cm 10例, 5-10 cm 12例, >10 cm 7例)存活率分析, 肿瘤直径≥10 cm组存活率明显降低, $P = 0.0485$. 不同核分裂象(>5/50 HPF 16例, ≤5/50 HPF 14例)组, 核分裂象≤5/50 HPF的肿瘤存活率明显优于核分裂象>5/50 HPF组($P = 0.0002$). 不同Fletcher分级存活率随分级依次递减, 高风险组存活率生存预后差. 极低风险1例(3.3%), 低风险10例(33.3%), 中风险6例(20.0%),

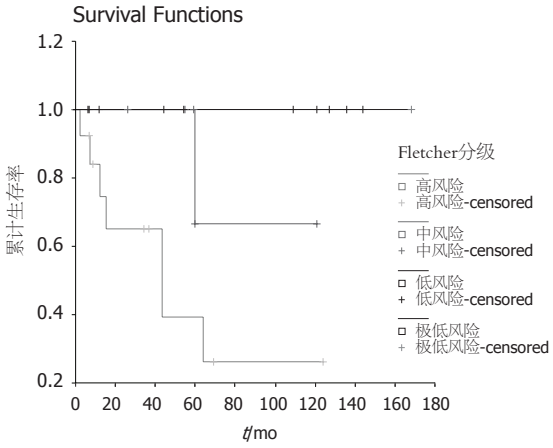


图 2 不同Fletcher分级生存曲线.

高风险13例(43.3%), 各组比较差异有显著性(P = 0.0143). 伴远处转移与否(5例伴转移, 25例无远处转移), 根治性手术组与非根治性手术组(24例根治性手术, 6例非根治性手术), 差异均具有显著性(P均 = 0.0000). 不同Fletcher分级, 核分裂象生存曲线(图1-2, 表1).

2.2 多因素分析结果 Cox回归分析: Cox回归方程χ^2 = 19.2168, P = 0.0002, 回归方程拟和较好, P = 0.0362显示核分裂象是影响预后的独立预后因素.

表 1 影响30例十二指肠间质瘤预后的单因素分析

	n	χ^2	P
性别			
男	23	2.613	0.1060
女	7		
年龄		0.056	0.8132
≤50	17		
>50	13		
解剖部位			
球部	1	1.850	0.6042
降段	18		
水平段	9		
升段	2		
肿瘤大小(cm)			
≤2	1	7.883	0.0485
2–5	10		
5–10	12		
≥10	7		
核分裂象(50 HPF)			
≤5	16	14.155	0.0002
>5	14		
手术方式			
胰十二指肠切除术	9	1.100	0.2943
其他手术	21		
根治性手术			
是	24	17.8180	0.0000
否	6		
转移			
是	25	22.519	0.0000
否	5		
Fletcher分级			
极低风险	1	10.570	0.0143
低风险	10		
中风险	6		
高风险	13		

3 讨论

GIST过去曾被诊断为平滑肌源性或神经源性肿瘤, Mazur *et al*[9]1983年首次提出GIST的概念, 近年来随着电镜和免疫组化等技术的发展, 已证实GIST是一种非定向分化的间质瘤, 是消化道独立的一类间叶组织肿瘤, 可发生在从食管至肛门的胃肠道全长范围, 但发生于十二指肠的间质瘤较少. 十二指肠间质瘤多发于十二指降段, 临床表现差异较大, 通常无特殊症状, 当肿瘤较大时可出现症状, 如腹部肿块、呕血、黑便、上腹不适等. 免疫组化检查是诊断间质瘤的主要依据. CD117是最具特征的免疫组化标记物[2], CD34阳性说明肿瘤来源于间叶细胞, 病理诊断上CD117和CD34阳性最有诊断意义.

GIST对放疗和化疗均不敏感[10], 仍以手术切除为主[2,11-12]. 但十二指肠解剖及生理的特殊性给十二指肠间质瘤的处理带来困难, 如何选择最佳的手术方式也无定论[13]. 虽然有报道40%的十二指肠间质瘤行胰十二指肠切除术[13], 但其可能并无必要. 我们认为将肿瘤完整切除, 无瘤体破裂, 切缘阴性即达到根治性标准. 手术还是以局部切除为主, 一般认为切缘距肿瘤1.5 cm即可, 手术中还应注意防止肿瘤破裂[14]. 由于十二指肠固定血循差, 难保吻合口安全愈合, 所以在十二指肠端端吻合或十二指肠缺损部修补困难时, 空肠和十二指肠缺损部吻合是必要的. 本组6例行十二指肠缺损部与空肠侧侧吻合, 愈合良好. 我们认为只要不影响乳头的正常功能, 切除范围足够, 尽可能保持十二指肠原有的解剖和生理功能, 没有必要扩大手术范围. 只有肿瘤直径≥5 cm且肿瘤位于十二指肠降部, 距离十二指肠大乳头2 cm以内, 行胰十二指肠切除术. 本组9例位于十二指肠降部, 且直径均>5 cm, 行胰十二指肠切除术. 近来也有一些新的治疗方法, 如经导管动脉栓塞(TAE)后使肿瘤缩小后行手术切

■同行评价
本文探讨了发生在十二指肠的间质瘤的临床特征和手术治疗方法, 具有较好的临床意义, 并对临床治疗提供了指导, 条理较清晰, 统计方法较严谨.

除, 以减小手术难度[15]. 对于不能切除或转移性的GIST, 可使用甲磺酸伊马替尼. 一种通过选择性抑制酪氨酸激酶的第571号信号传导, 从而抑制间质瘤细胞的代谢和增殖, 并促进细胞的凋亡和死亡分子靶向药物. 80%-90%的患者在使用后能疾病进展能得到控制, 仅有10%-15%在使用药物后1 a内死亡[16]. 格列卫与手术联合治疗间质瘤效果良好[17], 但有待于进一步深入研究和病例积累.

对于间质瘤的预后, Emory *et al*[18]提出的标准将间质瘤分为良性、恶性、交界性, 而事实上即使分类为良性的间质瘤也有一部分恶变. 因此Fletcher *et al*[8]认为所有间质瘤均有潜在恶性, 间质瘤应该以风险程度分级, 依据间质瘤的危险程度, 以肿瘤大小, 核分裂象多少为基础分级. Fletcher分级对间质瘤的分级评定更为全面合理. 本组资料不同Fletcher分级的肿瘤预后差异有显著性, 高风险组生存预后差. 另外单因素分析, 肿瘤直径, 核分裂象, 是否行根治术, 是否有远处转移影响预后. 虽然Emory *et al*[18]认为核分裂象并不是影响间质瘤预后的因素, 但本文多因素分析表明核分裂象是影响存活预后的独立预后因素, 可作为判断预后的依据, 从而指导术后的治疗. 对于核分裂象大于5个/50 HPF的患者, 应考虑术后及时联合格列卫治疗.

4 参考文献

1 Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): definition, occurrence, pathology, differential diagnosis and molecular genetics. *Pol J Pathol* 2003; 54: 3-24

2 Pidhorecky I, Cheney RT, Kraybill WG, Gibbs JF. Gastrointestinal stromal tumors: current diagnosis, biologic behavior, and management. *Ann Surg Oncol* 2000; 7: 705-712

3 田艳涛, 赵平, 邵永孚, 吴健雄, 王成峰, 单毅, 宋艳. 十二指肠间质瘤11例. 中国普通外科杂志 2004; 13: 696-698

4 Cavallini M, Cecera A, Ciardi A, Caterino S, Ziparo V. Small periampullary duodenal gastrointestinal stromal tumor treated by local excision: report of a case. *Tumori* 2005; 91: 264-266

5 Goh BK, Chow PK, Ong HS, Wong WK. Gastrointestinal stromal tumor involving the second and third portion of the duodenum: treatment by partial duodenectomy and Roux-en-Y duodenojejunostomy. *J Surg Oncol* 2005; 91: 273-275

6 Sakakura C, Hagiwara A, Soga K, Miyagawa K, Nakashima S, Yoshikawa T, Kin S, Nakase Y, Yamaoka N, Sagara Y, Yamagishi H. Long-term survival of a case with multiple liver metastases from duodenal gastrointestinal stromal tumor drastically reduced by the treatment with imatinib and hepatectomy. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2793-2797

7 张宗明, 李刚, 高原, 邢海林, 朱建平, 宿砚明, 钟华, 郭金星, 杨俊雄. 原发性十二指肠肿瘤诊治8例. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1330-1332

8 Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, Miettinen M, O'Leary TJ, Remotti H, Rubin BP, Shmookler B, Sobin LH, Weiss SW. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Hum Pathol* 2002; 33: 459-465

9 Mazur MT, Clark HB. Gastric stromal tumors. Reappraisal of histogenesis. *Am J Surg Pathol* 1983; 7: 507-519

10 Chhieng DC, Jhala D, Jhala N, Eltoum I, Chen VK, Vickers S, Heslin MJ, Wilcox CM, Eloubeidi MA. Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy: a study of 103 cases. *Cancer* 2002; 96: 232-239

11 DeMatteo RP, Lewis JJ, Leung D, Mudan SS, Woodruff JM, Brennan MF. Two hundred gastrointestinal stromal tumors: recurrence patterns and prognostic factors for survival. *Ann Surg* 2000; 231: 51-58

12 Pierie JP, Choudry U, Muzikansky A, Yeap BY, Souba WW, Ott MJ. The effect of surgery and grade on outcome of gastrointestinal stromal tumors. *Arch Surg* 2001; 136: 383-389

13 Uehara K, Hasegawa H, Ogiso S, Sakamoto E, Shibahara H, Igami T, Ohira S, Mori T. Gastrointestinal stromal tumor of the duodenum: diagnosis and treatment. *Geka* 2001; 63: 1058–1061

14 Ludwig DJ, Traverso LW. Gut stromal tumors and their clinical behavior. *Am J Surg* 1997; 173: 390-394

15 Sakamoto Y, Yamamoto J, Takahashi H, Kokudo N, Yamaguchi T, Muto T, Makuuchi M. Segmental resection of the third portion of the duodenum for a gastrointestinal stromal tumor: a case report. *Jpn J Clin Oncol* 2003; 33: 364-366

16 Duffaud F, Blay JY. Gastrointestinal stromal tumors: biology and treatment. *Oncology* 2003; 65: 187-197

17 Chen TW, Liu HD, Shyu RY, Yu JC, Shih ML, Chang TM, Hsieh CB. Giant malignant gastrointestinal stromal tumors: recurrence and effects of treatment with STI-571. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 260-263

18 Emory TS, Sobin LH, Lukes L, Lee DH, O'Leary TJ. Prognosis of gastrointestinal smooth-muscle (stromal) tumors: dependence on anatomic site. *Am J Surg Pathol* 1999; 23: 82-87

电编 张敏 编辑 张焕兰

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2006年10月18日; 14(29): 2897-2900
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

结直肠癌手术前后血清P53抗体, CEA及CA19-9的检测意义

张 宏, 丛进春, 陈春生, 乔 雷, 冯 勇, 刘恩卿

张宏, 丛进春, 陈春生, 乔雷, 冯勇, 刘恩卿, 中国医科大学附属第二医院(盛京医院)普外科 辽宁省沈阳市 110004
通讯作者: 张宏, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属第二医院(盛京医院)普外科.
zhanghong1203@yahoo.com.cn
电话: 024-83955074 传真: 024-23862410
收稿日期: 2006-07-10 接受日期: 2006-07-31

Pre- and post-operative sequential changes of serum P53 antibody, carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 in patients with colorectal cancer

Hong Zhang, Jin-Chun Cong, Chun-Sheng Chen, Lei Qiao, Yong Feng, En-Qing Liu

Hong Zhang, Jin-Chun Cong, Chun-Sheng Chen, Lei Qiao, Yong Feng, En-Qing Liu. Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital (Shengjing Hospital) of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Correspondence to: Hong Zhang, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital (Shengjing Hospital) of China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. zhanghong1203@yahoo.com.cn
Received: 2006-07-10 Accepted: 2006-07-31

Abstract

AIM: To investigate the value of sequential change of pre- and post-operative serum P53 antibodies, carcinoembryonic antigen (CEA) and carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9) in patients with colorectal cancer.

METHODS: A total of 132 patients with colorectal cancer and 36 ones with benign lesions (as controls) were included in this prospective study. The blood samples were collected 1 h before operation and 30 d postoperatively. The presence of serum P53 antibody was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The levels of serum CEA and CA19-9 were detected using radioimmunoassay (RIA).

RESULTS: The positive rate of serum P53 antibodies in patients with colorectal cancer were significantly higher than that in ones with benign disease (χ^2 = 18.11, P < 0.0001). Thirty-nine (74%) of P53 seropositive patients showed negative conversion 1 mo after operation, including 3 cases (33%) in palliative surgery group and 36 cases (82%) in radical operation group (χ^2 = 9.04, P = 0.0026). Thirteen (54%) of CEA seropositive patients showed negative conversion 1 mo after operation, including 2 cases (18%) in palliative surgery group and 11 cases (85%) in radical operation group (χ^2 = 10.60, P = 0.0011). Seven (41%) of CA19-9 seropositive patients showed negative conversion 1 mo after operation, including 2 cases (20%) in palliative surgery group and 5 cases (71%) in radical operation group (χ^2 = 4.50, P = 0.034).

CONCLUSION: Monitoring of sequential changes of pre- and post-operative serum P53 antibodies, CEA and CA19-9 in patients with colorectal cancer can help to evaluate responses to treatment, judge prognosis and guide the comprehensive treatment after operation.

Key Words: Colorectal cancer; Serum P53 antibodies; Carcinoembryonic antigen; Carbohydrate antigen 19-9

Zhang H, Cong JC, Chen CS, Qiao L, Feng Y, Liu EQ. Pre- and post- operative sequential changes of serum P53 antibody, CEA and CA19-9 in patients with colorectal cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(29):2897-2900

摘要

目的: 通过检测结直肠癌患者手术前后血清P53抗体, CEA, CA19-9的变化, 评价其临床意义.

方法: 选择2002-04/2003-01手术治疗的结直肠癌患者132例和36例非肿瘤患者为研究对象. 用ELISA法定性检测血清P53抗体, 放射免疫分析法(RIA)定量检测CEA, CA19-9.

■背景资料
目前已知CEA, CA19-9等与结直肠癌预后相关, 国内外近年又陆续有血清P53抗体作为一种新的肿瘤标志物的报道. 国内目前对结直肠癌患者术后随访的一项主要内容就是监测血清CEA水平, 而血清P53抗体的敏感性明显高于像CEA等肿瘤标志物. 国外已有学者已经开始联合应用血清P53抗体, CEA及CA19-9作为结直肠癌术后监测的指标.

■**创新盘点**
对结直肠癌手术前后血清P53抗体，CEA及CA19-9等肿瘤标志物的动态监测文献报道不多，这是本文的创新和立题新颖之处.

结果：结直肠癌组中53例血清P53抗体阳性，而对照组仅1例阳性(χ^2 = 18.11, P<0.0001). CEA和CA19-9在结直肠癌患者中的阳性率分别为18.2%和12.9%. 血清P53抗体阳性患者术后1 mo有39例(74%)抗体转阴，其中姑息性手术组3例(33%)，而根治性切除组36例(82%)(χ^2 = 9.04, P = 0.0026). CEA阳性的24例患者中，术后1 mo有13例(54%)转为阴性，其中姑息性手术组2例(18%)，而根治性手术组11例(85%)(χ^2 = 10.60, P = 0.0011). 术前CA19-9阳性的17例患者中7例(41%)在术后1 mo转为阴性，在姑息性手术组和根治性切除组的转阴率分别为20%(2例)和71%(5例)(χ^2 = 4.50, P = 0.034).

结论：血清P53抗体，CEA，CA19-9的手术前后动态检测有助于临床判定病情，监测疗效.

关键词：**结直肠癌；血清P53抗体；癌胚抗原；糖类抗原CA19-9**

张宏，丛进春，陈春生，乔雷，冯勇，刘恩卿. 结直肠癌手术前后血清p53抗体，CEA及CA19-9的检测意义. 世界华人消化杂志 2006;14(29):2897-2900
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2897.asp

0 引言

结直肠癌是威胁人类健康和生命的常见恶性肿瘤之一，即使手术切除仍然有部分患者出现复发和转移. 目前已知CEA，CA19-9等与结直肠癌预后相关，国内外近年又陆续有血清P53抗体作为一种新的肿瘤标志物的报道. 我们通过对结直肠癌患者手术前后血清P53抗体，CEA及CA19-9阳性率的检测，评价其在判定疗效、监测预后中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 选择2002-04/2003-01手术治疗的结直肠腺癌患者132例和非肿瘤患者36例为研究对象. 结直肠癌术后吻合口复发或伴有其他脏器原发癌肿的患者不在本研究之内. 结直肠癌组临床资料见表1. 其中男74例，女58例；年龄32-87(平均64.8)岁. 右半结肠癌43例，包括肿瘤位于盲肠、升结肠、结肠肝曲、横结肠的患者；左半结肠癌33例，包括肿瘤位于结肠脾曲、降结肠、乙状结肠的患者；直肠癌56例，包括腹膜返折上方15 cm远端的癌肿，肛管癌除外. 所有病例术前未采取化疗和/或放疗，术后经病理组织学检查证实诊断. 其中高分化腺癌35例，中分化腺癌69例，低分化腺癌28例. Dukes分期：A期7例，B期64例，C期43例，D期18例. 对照组患者年龄33-75(平均65.3)岁；男19例，女17例. 急性阑尾炎9例，腹股沟疝11例，腹部闭和伤7例，单纯性下肢静脉曲张3例，混合痔6例(表2). 分别于术前1 h及术后1 mo采取外周静脉血10 mL，室温静置30 min，4℃下1500 r/min离心10 min，取上清放置-80℃冰箱保存备用. 血清P53抗体ELISA试剂盒为德国Dianova公司生产(购于Cosmobio公司).

表 1 132例结直肠癌患者临床病理资料

临床病理		n
性别	男	74
	女	58
肿瘤位置	右半结肠	43
	左半结肠	33
	直肠	56
组织分化	高分化腺癌	35
	中分化腺癌	69
	低分化腺癌	28
Dukes分期	A	7
	B	64
	C	43
	D	18

表 2 对照组36例患者临床资料

临床病理	n
男	19
女	17
急性阑尾炎	9
腹股沟疝	11
腹部闭和伤	7
单纯性下肢静脉曲张	3
混合痔	6

1.2 方法 P53抗体的测定：严格按照说明书的要求操作. 稀释100倍的血清样品100 μL和标准对照样品分别加入人重组P53蛋白包被的聚苯乙烯微量反应板内，室温下孵育1 h. 洗涤5次后，加入100 μL过氧化物酶标记的羊抗人IgG抗体结合液，室温下孵育1 h. 洗涤后加入反应底物TMB(四甲基联苯胺)，避光反应30 min后加入终止液2 mol/L的HCl. 用酶标仪在450 nm读取光吸收值. 参照说明书，P53抗体效价指数(titre index)大于10%为阳性. CEA和CA19-9的测定：采用放射免疫分析法(RIA)，由医院中心检验科统一检测. CEA大于5 μg/L为阳性，CA19-9大于37 U/mL为阳性.

统计学处理 所有统计分析用Statview version 5.0.1 (SAS institute Inc 产品) 统计软件处理, $P<0.05$认为差异有显著性.

2 结果

2.1 血清P53抗体, CEA和CA19-9阳性率的比较 132例结直肠癌患者中53例(40.2%)血清P53抗体呈阳性, 而对照组仅1例(2.9%)阳性, 两组间有显著差异(χ^2=18.11, P<0.0001). 尽管CEA和CA19-9在结直肠癌患者中的阳性率分别为18.2%和12.9%, 但是与对照组比较无显著差异(图1).

2.2 术后1 mo血清P53抗体, CEA和CA19-9的变化 血清P53抗体阳性的53例患者中, 术后1 mo有39例(74%)抗体转阴, 其中姑息性手术组3例(33%), 根治性切除组36例(82%), 二组间有显著差异, χ^2 = 9.04, P = 0.0026<0.01. 术前CEA阳性的24例患者中, 术后1 mo有13例(54%)转为阴性, 其中姑息性手术组2例(18%), 而根治性手术组11例(85%), 差异有显著性(χ^2 = 10.60, P = 0.0011<0.01). 术前CA19-9阳性的17例患者中7例(41%)在术后1 mo转为阴性, 在姑息性手术组和根治性切除组的转阴率分别为20%(2例)和71%(5例), 差异有显著性(χ^2 = 4.50, P = 0.034<0.05) (图2).

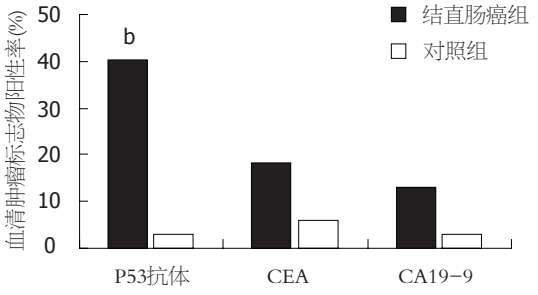


图 1 血清P53抗体, CEA及CA19-9在结直肠癌组和对照组中阳性率的比较. ^bP<0.01 *vs* 对照组.

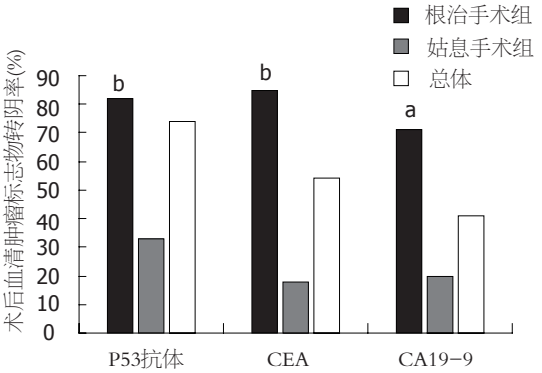


图 2 术后1 mo血清P53抗体, CEA及CA19-9转阴率的比较. ^aP<0.05, ^bP<0.01 *vs* 姑息手术组.

3 讨论

CEA是肠腺癌和胎儿肠中的一种胚胎抗原, 也是一种膜抗原和可溶性抗原, 分子质量约200 kDa, 在细胞质中形成, 越过细胞膜进入体液中, 故可在多种体液中检测出, 是消化系统恶性肿瘤诊断的可靠指标, 尤其是结直肠癌的诊断意义最大. CA19-9是消化道肿瘤细胞株分泌的低聚糖肿瘤相关抗原, 主要存在于胃肠或胰腺癌患者的组织中, 正常人血清中含量甚微. 最近国外学者应用ELISA技术在各种恶性肿瘤患者血清中检测到P53抗体[1-2], 尤其是在结直肠癌和卵巢癌中抗体的阳性率最高[3], 因而受到众多学者的关注. 资料显示, 血清P53抗体的阳性率在结直肠癌患者中为23%-68%[4-7], 在健康人群为1%-4%[3-4,6]. 本研究中血清P53抗体在结直肠癌中的阳性率为40.2%, 对照组的非肿瘤患者为2.9%. 这一结果充分说明血清P53抗体和结直肠癌有显著的相关性, 可以作为诊断的辅助指标之一. 同时我们还发现CEA和CA19-9的敏感性较低, 在结直肠癌组的阳性率分别为18.2%和12.9%, 且阳性率在结直肠癌组和对照组间的差异无显著性.这些都表明CEA和CA19-9这些简易的肿瘤标志物对结直肠癌诊断价值不大. Kressner *et al*[8]对一组根治性切除的结直肠癌患者的多变量分析显示, 血清P53抗体是独立的预后因素. 术前血清P53抗体水平升高的患者生存期明显缩短. 因此我们主张对于术前血清P53抗体阳性的患者, 应在手术切除后采取辅助性治疗来改善预后. 近年很多文献都显示出辅助性化疗和/或放疗可以降低复发率, 提高5 a生存率.

我们对血清P53抗体, CEA及CA19-9阳性的患者, 在术后1 mo再次测定这些标志物, 结果显示74%的血清P53抗体阳性患者抗体转阴, 54%的CEA阳性患者转阴, 41%的CA19-9阳性患者转阴, 在根治性切除组和姑息性手术组的转阴率有显著差异. 这表明可以通过血清学检测这3种肿瘤标志物来判定临床疗效. 然而遗憾的是我们只随访至术后1 mo, 无法说明是否会有部分患者由于时间短而暂时没有转为阴性. Takeda *et al*[9]也发现手术根治度与术后血清P53抗体的转阴有显著相关, 28例术前抗体阳性的行根治切除术患者中, 27例(96%)术后抗体转阴. Broll *et al*[10]认为对于术前血清P53抗体阳性的患者, 通过术

■应用要点
对结直肠癌手术前后血清P53抗体, CEA及CA19-9的动态监测将有助于判定疗效, 监测预后.

■同行评价
本文通过检测结直肠癌患者手术前后血清P53抗体, CEA, CA19-9的变化, 评价其临床意义. 选题思路清晰, 技术可行, 具有一定临床价值.

后的动态监测将有助于早期发现转移或复发. 国内目前对结直肠癌患者术后随访的一项主要内容就是监测血清CEA水平, 而血清P53抗体的敏感性明显高于像CEA等肿瘤标志物[6]. 国外已有学者已经开始联合应用血清P53抗体, CEA及CA19-9作为结直肠癌术后监测的指标. 因此对手术前后血清P53抗体, CEA及CA19-9的动态监测将是我们今后的进一步研究内容.

4 参考文献

1 Tang R, Ko MC, Wang JY, Changchien CR, Chen HH, Chen JS, Hsu KC, Chiang JM, Hsieh LL. Humoral response to p53 in human colorectal tumors: a prospective study of 1,209 patients. *Int J Cancer* 2001; 94: 859-863

2 Angelopoulou K, Stratis M, Diamandis EP. Humoral immune response against p53 protein in patients with colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 1997; 70: 46-51

3 Angelopoulou K, Diamandis EP, Sutherland DJ, Kellen JA, Bunting PS. Prevalence of serum antibodies against the p53 tumor suppressor gene protein in various cancers. *Int J Cancer* 1994; 58: 480-487

4 Coomber D, Hawkins NJ, Clark M, Meagher A, Ward RL. Characterisation and clinicopathological correlates of serum anti-p53 antibodies in breast and colon cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996; 122: 757-762

5 Shiota G, Ishida M, Noguchi N, Oyama K, Takano Y, Okubo M, Katayama S, Tomie Y, Harada K, Hori K, Ashida K, Kishimoto Y, Hosoda A, Suou T, Kanbe T, Tanaka K, Nosaka K, Tanida O, Kojo H, Miura K, Ito H, Kaibara N, Kawasaki H. Circulating p53 antibody in patients with colorectal cancer: relation to clinicopathologic features and survival. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 122-128

6 Takeda A, Shimada H, Nakajima K, Yoshimura S, Suzuki T, Asano T, Ochiai T, Isono K. Serum p53 antibody as a useful marker for monitoring of treatment of superficial colorectal adenocarcinoma after endoscopic resection. *Int J Clin Oncol* 2001; 6: 45-49

7 Shibata Y, Kotanagi H, Andoh H, Koyama K, Itoh H, Kudo S. Detection of circulating anti-p53 antibodies in patients with colorectal carcinoma and the antibody's relation to clinical factors. *Dis Colon Rectum* 1996; 39: 1269-1274

8 Kressner U, Glimelius B, Bergstrom R, Pahlman L, Larsson A, Lindmark G. Increased serum p53 antibody levels indicate poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998; 77: 1848-1851

9 HTakeda A, Shimada H, Nakajima K, Imaseki H, Suzuki T, Asano T, Ochiai T, Isono K. Monitoring of p53 autoantibodies after resection of colorectal cancer: relationship to operative curability. *Eur J Surg* 2001; 167: 50-53

10 Broll R, Duchrow M, Oevermann E, Wellm C, Schwandner O, Schimmelpenning H, Roblick UJ, Bruch HP, Windhovel U. p53 autoantibodies in sera of patients with a colorectal cancer and their association to p53 protein concentration and p53 immunohistochemistry in tumor tissue. *Int J Colorectal Dis* 2001; 16: 22-27

电编 张焕兰 编辑 张焕兰

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

• 消息 •

世界华人消化杂志关于作者署名的声明

本刊讯 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. (世界胃肠病学杂志社2006-09-08)

世界华人消化杂志 2006年10月18日; 14(29): 2901-2905
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 •

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!

白爱平 主治医师
中山大学附属第一医院消化内科

曹志成 科学主任(医学)
香港伊利沙伯医院临床肿瘤部、肿瘤研究科

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

范建高 教授
上海交通大学附属第一人民医院消化内科、脂肪肝诊治中心

范志宁 主任医师
南京医科大学第二附属医院内镜中心

高润平 教授
吉林大学第一医院肝病科

龚建平 教授
重庆医科大学附属第二医院肝胆外科

黄恒青 主任医师
福建省第二人民医院消化内科

黄晓东 副主任医师
武汉市中心医院消化内科

蒋龙元 副教授
中山大学附属第二医院急诊科

李晓宇 主任医师
北京航天中心医院院办

李永哲 副研究员
中国医学科学院中国协和医科大学、北京协和医院检验科

林胜璋 副教授
温州医学院附属二院肝胆外科

刘冰熔 教授
黑龙江省哈尔滨医科大学附属第二临床医院消化内科

刘杞 教授
重庆医科大学病毒性肝炎研究所

梅林 教授
北京大学医学部生理学与病理生理学系神经调节和消化内分泌研究室

欧希龙 副教授
东南大学中大医院消化科

潘秀珍 教授
福建省立医院消化研究室

谭学瑞 教授
汕头大学医学院第一附属医院院长室

汪思应 教授
安徽医科大学实验动物中心、病理生理学教研室

王健生 副教授
西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

王鲁 副教授
上海复旦大学附属中山医院肝外科、复旦大学肝癌研究所

王正康 教授
北京中日友好医院普外科

王志刚 副主任医师
上海市第六人民医院普外科

张筱茵 副教授
第四军医大学西京医院消化疾病研究所

张绪清 副教授
第三军医大学附属西南医院全军感染病研究所

周国雄 主任医师
南通大学附属医院消化内科

朱金水 教授
上海交通大学附属第六人民医院消化科